

食品添加剤の会合体形成能を利用した  
難溶性化合物の溶解性改善に関する研究

2020 年

藤森 美季

# 目次

緒言 .....	6
第 1 章 糖転移化合物を用いた Quercetin の溶解性向上の検討.....	12
1.1 序論 .....	12
1.2 試料ならびに実験方法 .....	13
1.2.1 試料 .....	13
1.2.2 実験方法 .....	14
1.2.2.1 噴霧乾燥粒子及び物理混合物の調製.....	14
1.2.2.2 溶解度測定 .....	15
1.2.2.3 走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM).....	16
1.2.2.4 粉末 X 線回折測定 (Powder X-ray Diffractometry: PXRD) .....	16
1.2.2.5 界面張力の測定 .....	16
1.2.2.6 溶出試験.....	16
1.2.2.7 抗酸化作用の評価 .....	17
1.3 結果と考察 .....	17
1.3.1. 糖転移化合物を用いた溶解度測定 .....	17
1.3.2 噴霧乾燥粒子の物性評価 .....	18
1.3.3 糖転移化合物の会合体形成能 .....	21
1.3.4 溶出試験 .....	23
1.3.5 抗酸化作用の評価 .....	25
1.4 結論 .....	26

第 2 章 糖転移化合物が難溶性フラボノイドである Ipriflavone の 溶解性及び吸収性に与える影響.....	27
2.1 序論 .....	27
2.2 試料ならびに実験方法 .....	28
2.2.1 試料 .....	28
2.2.2 実験方法 .....	28
2.2.2.1 噴霧乾燥粒子および物理混合物の調製 .....	28
2.2.2.2 走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM).....	28
2.2.2.3 粉末 X 線回折測定 (Powder X-ray Diffractometry: PXRD) .....	29
2.2.2.4 溶解度測定 .....	29
2.2.2.5 溶出試験.....	29
2.2.2.6 吸収性試験.....	30
2.3 結果と考察 .....	31
2.3.1 噴霧乾燥粒子の物理化学的性質 .....	31
2.3.2 溶解度測定 .....	33
2.3.3 溶出試験 .....	33
2.3.4 Ipriflavone の吸収性試験 .....	34
2.4 結論 .....	35

第3章 糖転移ステビアと界面活性剤の複合体による難溶性化合物 の溶解性改善 .....	36
3.1 序論 .....	36
3.2 試料ならびに実験方法 .....	37
3.2.1 試料 .....	37
3.2.2 実験方法 .....	38
3.2.2.1 溶解度測定 .....	38
3.2.2.2 動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS)による粒子径分布測定 .....	39
3.2.2.3 界面張力測定 .....	39
3.2.2.4 Stevia-G/LTAC 混合比率の MFA 溶解度への影響 .....	39
3.2.2.5 噴霧乾燥粒子及び物理混合物の調製 .....	40
3.2.2.6 粉末 X 線回折測定 (Powder X-ray Diffractometry: PXRD) .....	41
3.2.2.7 粉末の粒子径分布測定 .....	41
3.2.2.8 溶出試験 .....	41
3.2.2.9 相互作用パラメータの算出 .....	41
3.3 結果と考察 .....	43
3.3.1 界面活性剤の選択 .....	43
3.3.2 Stevia-G の粒子径に及ぼす LTAC の影響 .....	45
3.3.3 Stevia-G と LTAC の混合ミセル形成による MFA 溶解度の変化 .....	48
3.3.4 Stevia-G/LTAC 混合ミセルの MFA 噴霧乾燥粒子への適用 .....	49
3.4 結論 .....	51
総括 .....	52

謝辭 .....	54
參考文獻 .....	55
論文目錄 .....	64
主查・副查 .....	65

## 緒言

我が国では、65歳以上の人口割合が全人口割合の29%を超え、‘超高齢社会’を迎えており、医療費高騰の抑制は重要な課題となっている。特に、高齢化が進むことで糖尿病や高血圧といった生活習慣病を患う人が増加し、厚生労働省の2018年の調査によると悪性新生物を含めた生活習慣病は全体の死因の約6割に達している。生活習慣病については食事や運動といった生活改善によって予防が可能であるため、近年、健康食品やサプリメントを用いて健康を自己管理するセルフメディケーションが政府により推奨されている。日本では1991年に栄養改善法に基づいて、有効性、安全性などの科学的根拠を示し、国の審査のもとに消費者庁の許可を受けた特定保健用食品に関する制度が導入された。しかし、特定保健用食品の申請および登録には、莫大な費用および時間を要する。そのため、保健機能食品は、これまで国が個別に許可した特定保健用食品と国の規格基準に適合した栄養機能食品に限られていた [1]。そこで、機能性を分かりやすく表示した商品を増やし、消費者が商品に関する正しい情報を得て選択できる一つの実行案として、2015年4月に機能性表示食品が制度化された (Figure 1)。機能性表示食品制度自体は、消費者にも事業者にもわかりやすい食品表示制度を目指したものであり、その目的は食品を摂取する際の安全性の確保および自主的かつ合理的な食品の選択の機会を確保することである [2, 3]。あらゆる食品に対して、正確に表示することにより、消費者が不利益を被ることなく、自分自身で自己の栄養や健康を気遣い、消費者の需要に即した食品の振興に寄与することが求められている。さらに、日本政府は国民に対してセルフメディケーションを推奨するため、2017年に一定の条件のもとで所得控除を受けられる制度としてセルフメディケーション税制を創設した。このような背景の下、‘超高齢社会’に直面する日本において、健康食品やサプリメントを含めた機能性食品によるセルフメディケーションの取り組みは医療費削減においても非常に重要である。

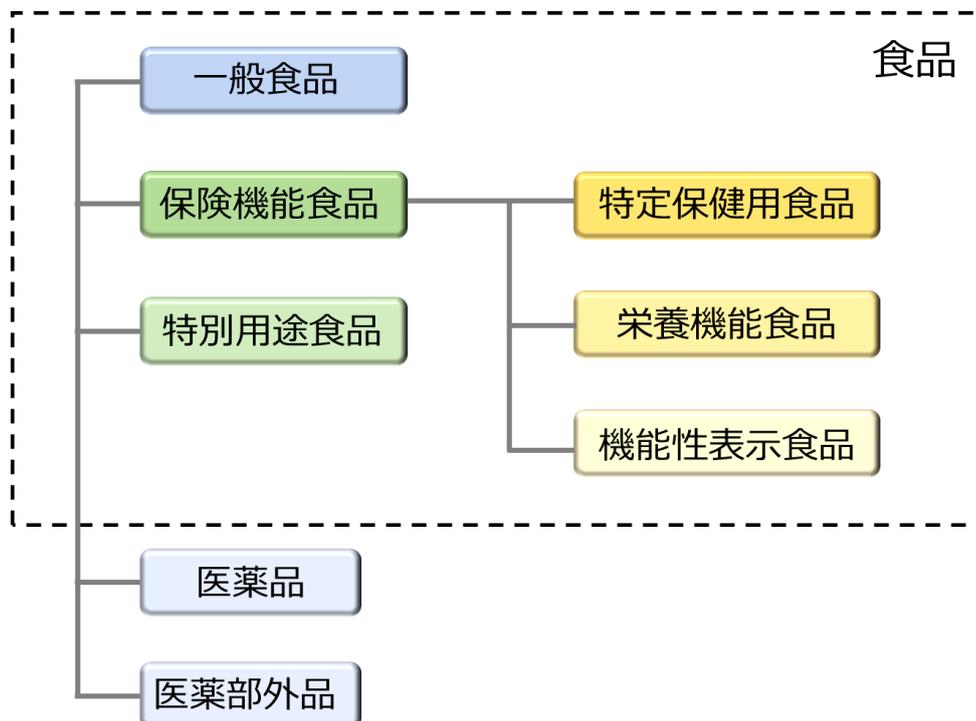


Figure 1 用途別にみた食品の分類 (消費者庁ホームページより一部改編)

これまでも食品の持つ健康促進に対する効果について様々な研究が行われてきた。近年、食品が有する機能性成分の活用によって、生体調節に伴う生活習慣病等の予防を期待した研究が進められている。生体に対する食品の生理的特性については、一次機能、二次機能、三次機能に分類され、一次機能は栄養機能、二次機能は感覚機能、三次機能は生体調節機能と定義されている。特に、食品表示法の施行によって注目されているのが三次機能の生体調節機能である [4, 5]。食品表示法の施行後、栄養機能食品以外にも信頼できる科学的手法で検証した根拠に基づいたものであれば、食品の機能性表示制度が認められるようになった。したがって、機能性表示食品の開発が盛んにおこなわれている。特に、生体調節機能に働きかけると言われているポリフェノール類やフラボノイド類は、機能性食品成分として注目されている [6, 7]。ポリフェノール類やフラボノイド類については、抗酸化作用や抗炎症作用を始め多岐にわたる効果を有する可能性があり、実際サプリメントや健康食品としての開発が既に多数実施されている。しかしながら、健康食品やサプリメントに含まれるポリフェノール類やフラボノイド類の成分のなかには消化管内での溶解性が低いため、吸収性が低い化合物 (以下、難溶性化合物) が数多く存在する [8, 9]。

経口投与された化合物が十分な効能・効果を発揮するためには、消化管内で溶解し、必

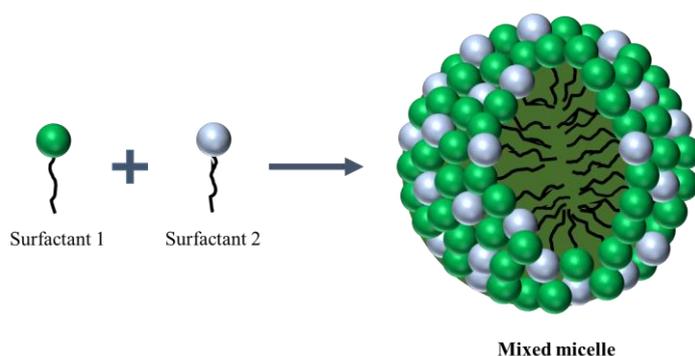
要な化合物量が体内に吸収されなければならない。そのため難溶性化合物の溶解性改善は、医薬品だけでなく、機能性食品開発においても大きな課題となっている [10, 11]。しかし、機能性食品開発における難溶性化合物への取り組みは、医薬品を対象とした研究よりも報告されている例が少ないのが現状である [12-14]。

医薬品分野における難溶性化合物の溶解性および吸収性の改善方法については、界面活性剤を利用したミセル形成による可溶化 [15]、粉碎を利用した粒子の微粒子化 [16, 17]、エマルジョンを利用した製剤化 [18, 19]、シクロデキストリンによる包接体の形成 [20, 21]、固体分散体化 [22-24]など多数存在する。

固体分散体は、水溶性の基剤中に化合物を分散させた製剤の総称であり、化合物が非晶質状態で存在するものに関しては、とくに溶解性改善の期待が大きい。非晶質とは、分子の配列が長距離的な秩序を失った状態と定義され、溶解の際に結晶格子を壊すエネルギーを必要としないため、非晶質化は難溶性化合物の溶解性改善に有用な手法である。しかし非晶質状態は熱力学的に不安定であることや結晶と比較して高い吸湿性を示すこと、高湿度下で容易に再結晶化することなどが問題となる。Polyvinylpyrrolidone (PVP) や hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)、hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate (HPMC-AS) [25, 26]などの水溶性高分子を担体とした固体分散体を形成することが非晶質の再結晶化抑制に有用であると報告されている。水溶性高分子を用いた固体分散体形成による再結晶化抑制は担体による化合物の可溶化や担体と化合物との分子間相互作用などに起因すると考えられている [27-29]。一方で、用いる担体によっては吸湿性の高い水溶性高分子も存在するため、適切な担体の選択が重要である。固体分散体を水に分散させると、一時的に飽和溶解度以上に化合物が溶解した過飽和状態となり、溶解度は増加する。HPMC-AS などの結晶化抑制能を示す高分子を用いた場合、物理混合物では溶解性の改善はほとんど認められないのに対し、非晶質固体分散体では化合物濃度は速やかに上昇し、過飽和状態での濃度が維持されることが報告されている [30]。

また、界面活性剤を利用した難溶性化合物の可溶化についての研究も多く行われている。界面活性剤分子は、親水性と疎水性の二つの相反した性質をもつ分子鎖が互いに結合した分子構造をもつ。そのため、分子分散の飽和値以上に界面活性剤の濃度が増加すると、水溶液中では疎水性の基を内部のコアに、親水性の基を水の連続相に接した分子集合体であるミセルを形成する [15]。界面活性剤によって形成されたミセルの疎水性コアに難溶性化合物が取り込まれ、溶解度が向上する [31-33]。ミセル形成による可溶化では、ミセル内に

可溶化している化合物に対し平衡関係にあるフリー化合物が膜透過に寄与し、吸収性を向上すると考えられる。ドデシル硫酸ナトリウムや胆汁酸ナトリウムなどのイオン性界面活性剤は、難溶性化合物の溶解性改善に関する適応例が多く報告されている。しかし、高い溶解性改善効果を得るためには、難溶性化合物に対して十分量の界面活性剤が必要となり、経口投与製剤の設計に際し、投与量増大による副作用が問題となってしまう。よって処方における界面活性剤の添加量を低減する工夫が必要となる。界面活性剤の副作用の観点から1種類当たりの使用量を減らし、必要な溶解度を得るために複数の界面活性剤を用いることがある [34-37]。複数の界面活性剤を使用した場合には、界面活性剤間での混合ミセル形成が期待できる。混合ミセルの模式図を Figure 2 に示す。界面活性剤の組み合わせを最適化することで、単一のミセルよりも優れた可溶化効果を有し、添加する界面活性剤の総量を減らすことが可能になる [38]。



**Figure 2 Schematic representation of the mixed micelle.**

難溶性化合物の溶解性改善を可能にする添加剤として、糖転移化合物に注目した。糖転移化合物とは、既存の化合物に酵素処理し糖を付加することで、合成した化合物の総称である [39,40]。柑橘類や野菜に含まれる Hesperidin 及び Rutin は抗酸化作用を有するビタミン P 類であり、Hesperidin や Rutin は溶解度が 0.2 mg/mL 以下であるのに対して、それらの化合物に糖を付加した  $\alpha$ -glucosyl hesperidin (Hsp-G) および  $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G) は、溶解度が 200 mg/mL 以上と高い水溶性を示す。また、キク科植物である Stevia の一種、Stevia rebaudiana Bertoni に糖を付加した添加剤が  $\alpha$ -glucosyl stevia (Stevia-G) であり、高い水溶性を示すだけでなく、甘味剤としても使用できる。また Stevia-G は 3 種類のなかで最も強い界面活性作用を有し、水中でミセル構造を形成することが報告されている [42]。さらに、

Stevia-G に対しラウリル硫酸ナトリウム (SDS)などのイオン性界面活性剤を少量添加することで、両添加剤の臨界ミセル濃度以下において難溶性化合物の溶解性を顕著に改善できることが報告されている [43]。しかし、Stevia-G 溶液へのイオン性界面活性剤添加による溶解性改善機構の詳細は明らかにされていない。

本稿では、機能性食品成分として注目されている難溶性フラボノイド化合物をモデルとし、糖転移化合物 (Hsp-G、Rutin-G、Stevia-G)による溶解性改善効果の比較、これまで明らかにされていなかった Stevia-G とイオン性界面活性剤による難溶性化合物の溶解性改善機構に関する研究を行い、第 1 章から第 3 章にそれぞれ結果および考察を記載する。

第 1 章では、使用する糖転移化合物の種類 (Hsp-G、Rutin-G、Stevia-G)が、難溶性フラボノイド化合物である Quercetin の溶解性改善に及ぼす影響を評価した。最も顕著に溶解性改善が認められた処方について、噴霧乾燥粒子を調製し、結晶性の評価や外観の観察を行った。さらに、噴霧乾燥粒子からの Quercetin の溶解性の評価および抗酸化作用の測定を行った。

第 2 章では、難溶性フラボノイド化合物である Ipriflavone の溶解性改善および吸収性改善を目的とし、3 種の糖転移化合物 (Hsp-G、Rutin-G、Stevia-G)を添加した噴霧乾燥粒子の調製を行った。Ipriflavone と糖転移化合物の物理混合物および噴霧乾燥粒子を水に分散し、溶解度を評価した。さらに動物実験を行い糖転移化合物による溶解性改善により Ipriflavone の吸収性改善が可能か検討した。

第 3 章では、添加剤として糖転移化合物の一種である Stevia-G と各種イオン性界面活性剤を用いて、難溶性化合物の溶解性改善および添加剤間での相互作用の解明を目的とした。難溶性モデル化合物として Mefenamic acid (MFA)を用い、Stevia-G 及び各種イオン性界面活性剤 (Lauryltrimethylammonium Chloride (LTAC)など)の物理混合物を水に添加し、溶解度を測定した。Stevia-G と各イオン性界面活性剤の混合溶液の界面張力を測定することで臨界ミセル濃度 (CMC)を算出するとともに、動的光散乱法にて粒子径を測定することで、Stevia-G に対してイオン性界面活性剤を添加した際の粒子径の変化を評価した。相互作用の評価には、相分離モデルに正則溶液論を適用した Rubingh の正則溶液モデルを用いた。Rubingh の理論は混合物の CMC の実測値から容易にイオン性界面活性剤成分間の相互作用 (相互作用パラメータ  $\beta$ )を推定することができるため、混合ミセルの評価において最もよく使用されているモデルである [44]。溶解度が著しく改善された処方に関しては噴霧乾

燥粒子を調製し物性を評価し、パドル法により溶解性の評価を行った。以下、各章にわたり、得られた知見を詳述するとともに、最後に総括する。

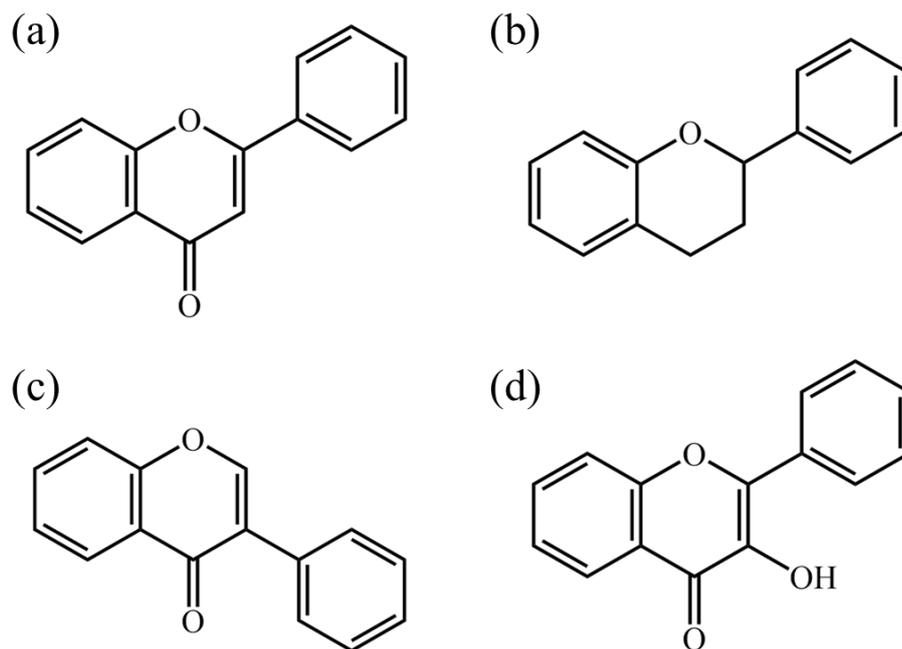
# 第 1 章

## 糖転移化合物を用いた Quercetin の溶解性向上の検討

### 1.1 序論

近年、食品が有する機能性成分の活用によって、生体調節に伴う生活習慣病等を予防することが期待できるとして、様々な研究が進められている。特にポリフェノール化合物の一種であるフラボノイドは、機能の有用性から盛んに研究されている化合物である [45]。フラボノイドは構造によって 7 種に分類されている。本稿に関連する 4 つを Figure 3 に示す。フラボン (Figure 3a) を基本構造とし、C 環の 2 と 3 位が飽和結合のフラボノイドはフラバノンと呼ばれ、柑橘類に特異的に含有されている (Figure 3b)。イソフラボンは B 環が 3 位に結合したものであり、大豆、葛、イナゴ豆に特異的に含有されている (Figure 3c)。フラボンの 3 位に水酸基を有するものはフラボノール (Figure 3d) と呼ばれ、フラボン類とフラボノール類は様々な植物の葉に含まれている [46]。フラボノールに分類される化合物の代表として Quercetin があげられる [47]。Quercetin の構造式を Figure 4 に示す。Quercetin は抗酸化作用を有しており、虚血性心疾患やアテローム性動脈硬化症、腎障害や胆道閉塞を含む多くの疾患に対して効能を示す可能性が報告されている [48]。しかし、Quercetin は 37°C の精製水中での溶解度が 10  $\mu\text{g/mL}$  以下を示す難溶性化合物である [49]。また、バイオアベイラビリティは非常に低く、ヒトにおいては 1% 未満であると報告されている [50-52]。この Quercetin の配糖体である Rutin に酵素処理を行い、糖を付加させたのが  $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G) である。ほかにもフラバノンに分類される Hesperidin に糖を付加させた  $\alpha$ -glucosyl hesperidin (Hsp-G)、甘味料である Stevia に糖を付加させた  $\alpha$ -glucosyl stevia (Stevia-G) が開発されている [41]。既存の食品成分に糖を転移させた糖転移化合物は難溶性化合物の溶解性改善効果を有し、機能性食品添加剤としての有用性が報告されている [53, 54]。

本研究では、食品添加剤として市販されている、3 種の糖転移化合物 (Hsp-G、Stevia-G 及び Rutin-G) を用いて Quercetin の溶解性改善効果について検討した。Quercetin は各糖転移化合物の共存下で噴霧乾燥し、調製した噴霧乾燥粒子の物性及び噴霧乾燥粒子からの Quercetin の溶解性に関して評価した。また、ラジカル消失を定量することで Quercetin の抗酸化作用を評価した。

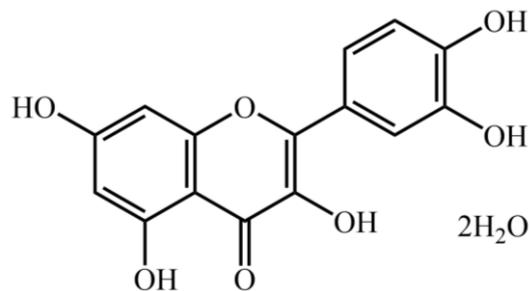


**Figure 3** Chemical structures of (a) flavone, (b) flavanone (c) isoflavone and (d) flavonol.

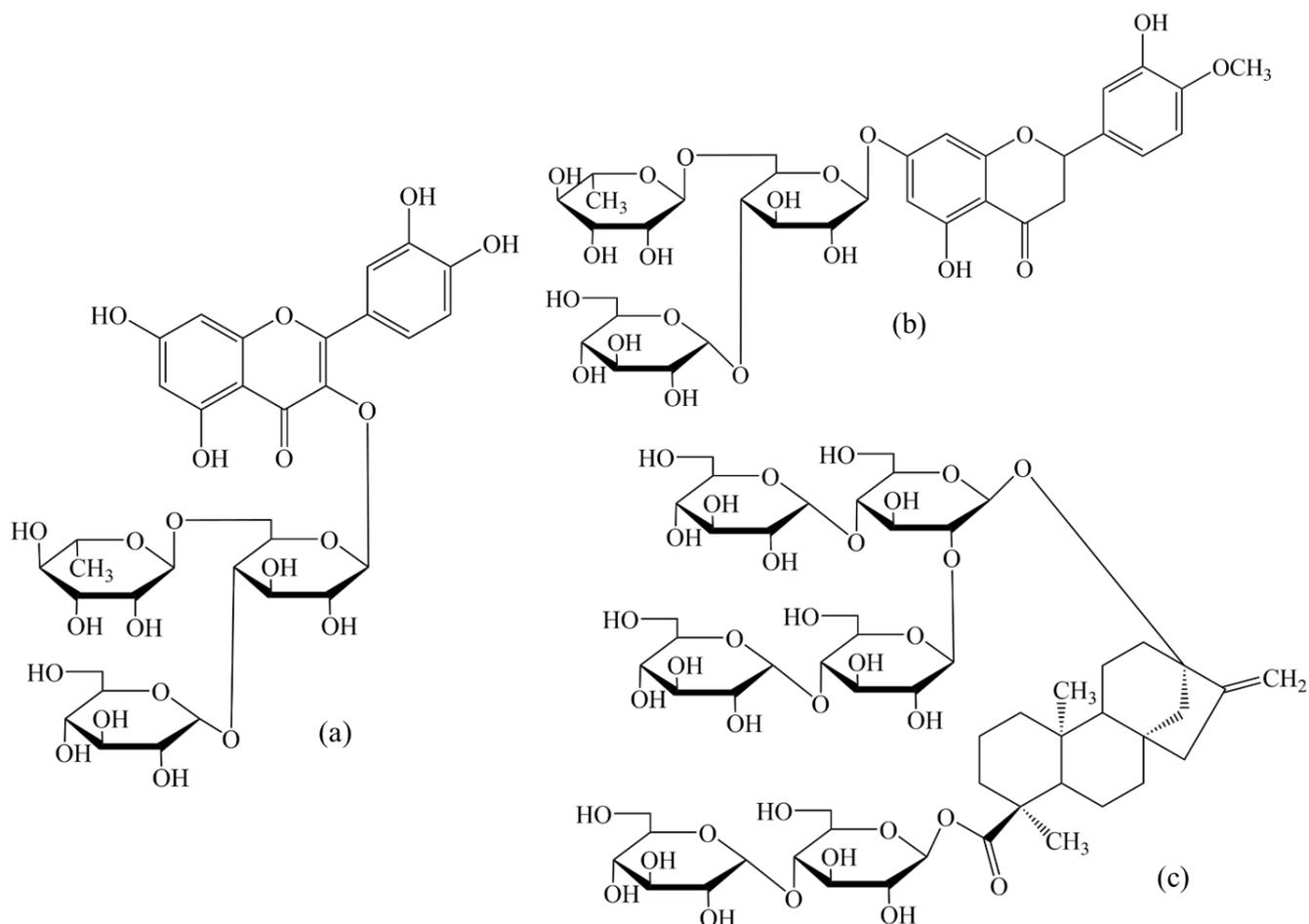
## 1.2 試料ならびに実験方法

### 1.2.1 試料

Quercetin dihydrate (quercetin, Figure 4)は、ナカライテスク株式会社から購入した。糖転移化合物である、Rutin-G (Figure 5a)、Hsp-G (Figure 5b) および Stevia-G (Figure 5c)は東洋精糖株式会社より提供された。1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル試薬は東京化成工業株式会社より購入した。



**Figure 4** Chemical structure of quercetin (M.W. = 302.24).



**Figure 5 Chemical structures of (a)  $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G, M.W. = 772), (b)  $\alpha$ -glucosyl hesperidin (Hsp-G, M.W. = 772) and (c)  $\alpha$ -glucosyl stevia (Stevia-G, M.W. = 1172).**

## 1.2.2 実験方法

### 1.2.2.1 噴霧乾燥粒子及び物理混合物の調製

Quercetin と糖転移化合物の共存するエタノール/水混合溶液を噴霧乾燥し製剤を調製した。Quercetin をエタノール 150 mL に、各量の糖転移化合物を精製水 350 mL に溶解し混合した。この溶液を噴霧乾燥機 (B-290, Büchi 社)を用いて Table 1 の条件で噴霧乾燥した。また、Quercetin と糖転移化合物の物理混合物は 3 分間、単純混合し調製した。調製したサンプルはシリカゲルと共にデシケーターで保存した。

**Table 1 Spray drying conditions**

Inlet temperature	120°C
Outlet temperature	70°C
Pump rate	5.5 mL/min
Air flow rate	410 L/h

### 1.2.2.2 溶解度測定

Quercetin 原末、物理混合物における Quercetin の溶解度を測定した。濃度の異なる糖転移化合物を含有する水溶液 (0, 1, 2, 5, 10 mg/mL) 30 mL に 60 mg の Quercetin を加え、37 °C、100 strokes/min の条件でバスシェイカー (ML-10, Taitec, Co. Ltd.)を用いて攪拌した。24 時間振とう攪拌したサンプルを孔径 0.2 μm の PVDF フィルターに通し、Quercetin の濃度を HPLC (SPD-10A, 株式会社島津製作所)によって Table 2 の条件で測定した。また、Quercetin の溶解度は 1.2.2.1 で調製した噴霧乾燥粒子を Quercetin 含量が 60 mg になるように採取し、30 mL の精製水に加え、物理混合物と同様の条件にて測定した。

**Table 2 HPLC conditions of quercetin.**

	Quercetin
Detector	UV
Wavelength	254 nm
Column	YMC-Triart C <sub>18</sub> 4.6 × 150 mm
Column temperature	40°C
Injection volume	10 μL
Mobile phase	Acetonitrile/0.1% acetic acid = 30/70 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min

### 1.2.2.3 走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM)

対象試料の外観は、走査型電子顕微鏡 (SEM) (VE-7800, Keyence)を用いて評価した。測定試料は、真空条件下で白金を用いて蒸着させ (E-1045, 株式会社日立製作所)、加速電圧 5 keV から 20 keV の範囲で撮影した。

### 1.2.2.4 粉末 X 線回折測定 (Powder X-ray Diffractometry: PXRD)

各試料の粉末 X 線回折測定は Miniflex powder X-ray diffractometer (MiniFlex 600, Rigaku)を用いて行った。電圧 30 kV、電流 15 mA、ステップサイズは 0.02、 $2\theta$  が 5-35° の範囲で 4°/min の速度で測定した。

### 1.2.2.5 界面張力の測定

異なる濃度の Hsp-G、Stevia-G、Rutin-G を精製水に溶解し、最大泡圧法により界面張力の変化を測定した。界面張力計(SITA Science Line t60, SITA Messtechnik)を用いた。測定条件はバブルライフタイム 1000 msec、溶液温度は  $37.0 \pm 1.0$  °Cとし、5 回の平均値を使用した。

### 1.2.2.6 溶出試験

溶出試験は 25 mL 及び 900 mL の 2 種類のスケールで実施した。900 mL スケールの溶出試験は、日本薬局方の溶出試験に従いパドル法を用いて行った。Quercetin 量として 5 mg を仕込み量とし、溶出試験液には精製水を用い、水温 37°C、攪拌速度 50 rpm の条件下で所定の時間経過後 (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) に各 2 mL のサンプリングを行った。サンプリング後の溶液は孔径 0.2  $\mu\text{m}$  の PVDF フィルターでろ過し、HPLC にて溶解した Quercetin 濃度を測定した。HPLC 条件は 1.2.2.2 の Table 2 に示した。25 mL スケールの溶出試験は Quercetin 量として 50 mg を仕込み量とし、溶出試験液には精製水を用い、水温 37°C、100 strokes/min の条件でバスシェイカー (ML-10, Taitec, Co. Ltd.)を用いて攪拌した。サンプリングは所定の時間後 (2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 300 min) に行い、900 mL スケールの時と同様に Quercetin 濃度を測定した。

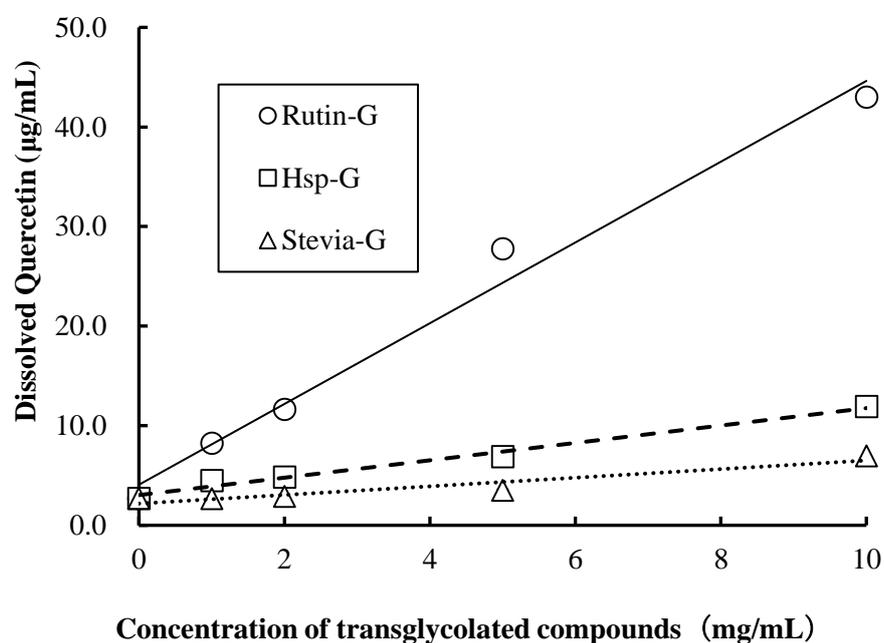
### 1.2.2.7 抗酸化作用の評価

Quercetin の抗酸化作用は DPPH を用いて Jullian らの方法に基づいて調製試料の抗酸化作用を評価した [55]。まず、80%メタノールを用いて 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の DPPH 溶液を作製した。Quercetin はエタノールに溶解し、DPPH 溶液と混合した。このときの Quercetin 濃度は 3、22、27、43、及び 131  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、それぞれ Quercetin 原末、Quercetin/Stevia-G (1/10)、Quercetin/Hsp-G (1/10) Quercetin/Rutin-G (1/10)の物理混合物と Quercetin/Rutin-G (1/10)の噴霧乾燥粒子の溶解度に相当する。混合後の各サンプルの DPPH の量を 517 nm の波長で紫外可視分光光度計 (UV-2900, 株式会社日立製作所)によって評価した。

## 1.3 結果と考察

### 1.3.1. 糖転移化合物を用いた溶解度測定

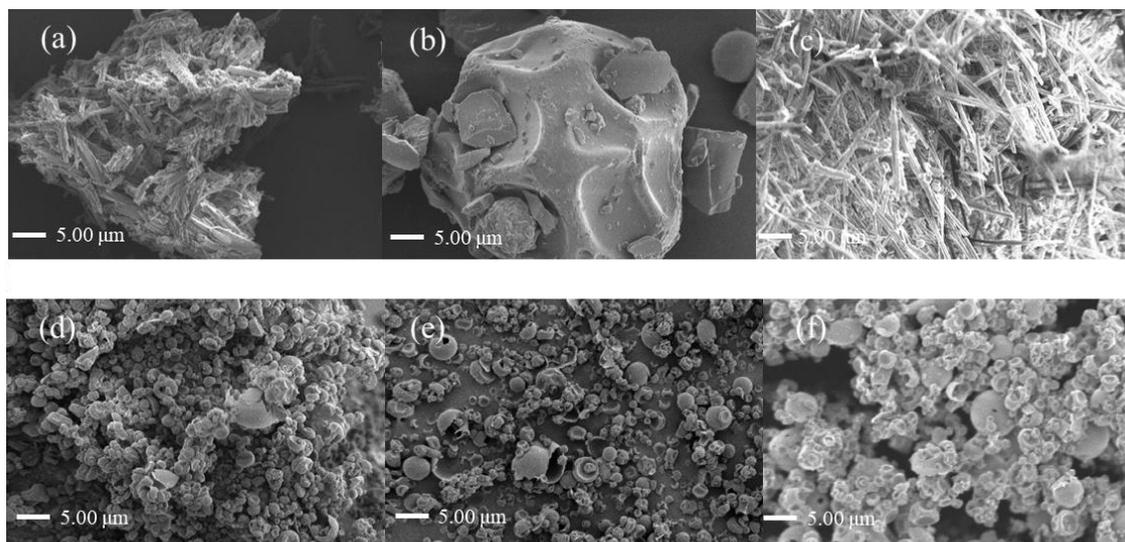
3 種類の糖転移化合物、Hsp-G、Stevia-G、Rutin-G を用いた際の Quercetin の溶解度を測定した。Quercetin の溶解度は、すべての糖転移化合物において添加量が増加すると共に直線的に増加した ( $R^2 > 0.9$ )。糖転移化合物の添加濃度が 10  $\text{mg}/\text{mL}$  の Quercetin の溶解度を比較すると、Stevia-G、Hsp-G、Rutin-G の順に向上しており、それぞれ 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、43  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。Rutin-G を使用した場合に、最も高い Quercetin の溶解度の増大が確認され、原末の溶解度 2.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と比較して、約 16 倍の溶解度の増大が認められた (Figure 6)。



**Figure 6 Relationship between the amount of quercetin dissolved and transglycosylated compounds loaded on physical mixture in water. (n = 3)**

### 1.3.2 噴霧乾燥粒子の物性評価

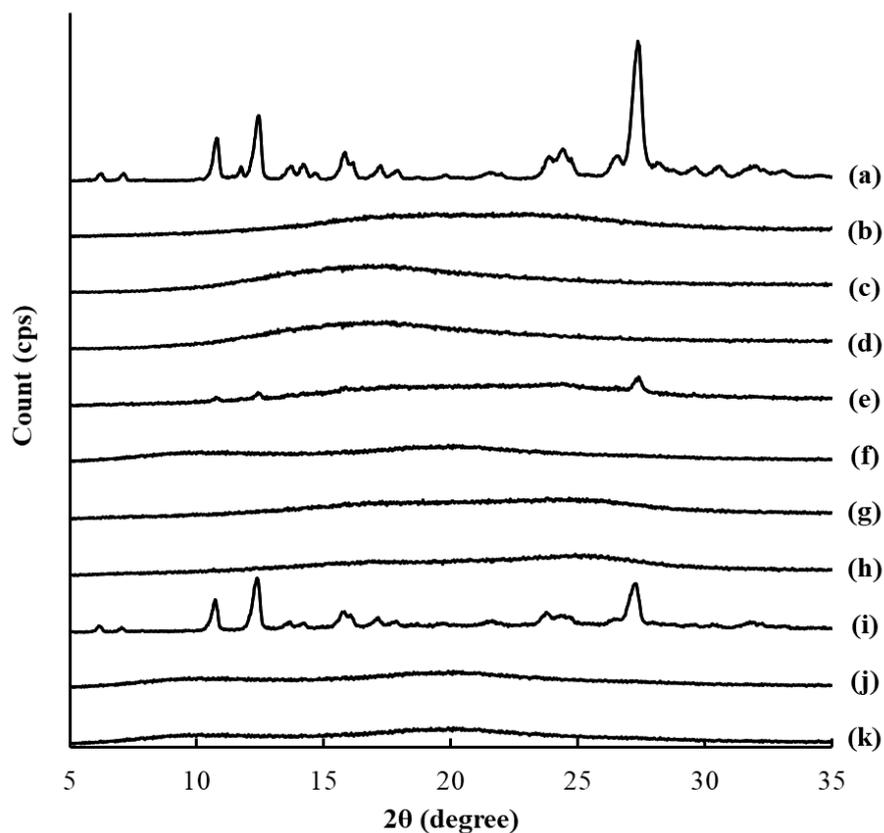
Quercetin 原末、Rutin-G 原末、及び Quercetin/Rutin-G (1/1, 1/2, 1/5, 1/10)の噴霧乾燥粒子の SEM 画像を Figure 7 に示す。Quercetin 原末は、針状粒子であった。Quercetin/Rutin-G (1/1)の噴霧乾燥粒子でも針状粒子が観察された。したがって、Quercetin/Rutin-G (1/1)の噴霧乾燥粒子中に Quercetin の針状粒子が含まれていることが示唆される。一方で、Quercetin/Rutin-G の比率が 1/2、1/5、1/10 で調製した噴霧乾燥粒子は、Quercetin の針状粒子は確認されず、球状の粒子のみが観察された。噴霧乾燥操作では、液滴を急速で乾燥させることにより球状粒子が得られることは多く報告されている [56]。今回、Rutin-G を添加剤として多く含む系においては、SEM 画像において Quercetin 結晶の析出に伴う針状結晶はほとんど観察されておらず、噴霧乾燥粒子中では、添加剤である Rutin-G と Quercetin が複合粒子として存在する状態が示唆された。



**Figure 7 SEM photographs of (a) quercetin crystals, (b) Rutin-G powder, (c) SDPs of quercetin/Rutin-G (1/1), (d) SDPs of quercetin/Rutin-G (1/2), (e) quercetin/Rutin-G (1/5) and (f) quercetin/Rutin-G (1/10).**

Figure 8 に Quercetin 原末、Rutin-G 原末、Hsp-G 原末、Stevia-G 原末、Quercetin/Rutin-G の物理混合物と各噴霧乾燥粒子についての粉末 X 線回折の測定結果を示す。Quercetin/Rutin-G (1/10)の物理混合物では 11.0°、12.5°、27.0° 付近に結晶ピークが確認された。また、Quercetin/Rutin-G (1/1)の噴霧乾燥粒子の場合においても物理混合物と同様の回折パターンが確認された。一方、Quercetin に対する Rutin-G の添加が Quercetin/Rutin-G (1/2) 以上のとき噴霧乾燥粒子は Quercetin 由来の結晶ピークを示さなかった。SEM 画像から、噴霧乾燥粒子中では、Quercetin/Rutin-G の複合粒子が形成されることが示唆されたが、粉末 X 線回折の測定から、Rutin-G の添加比率が高い系では、Quercetin 結晶由来の回折ピークは観察されないことから、Quercetin は X-ray amorphous の状態を示すことが推察された [57]。したがって、噴霧乾燥粒子中での Quercetin の状態は(i)分子分散した状態、(ii)非晶質粒子として存在する状態、もしくは(iii) X 線回折ピークの幅がブロードになり、結晶性のピークとして観察できないほどの微小な結晶として存在する可能性が推察された [58]。Quercetin 結晶を単独で噴霧乾燥処理しても非晶質化せず針状結晶が得られることから、噴

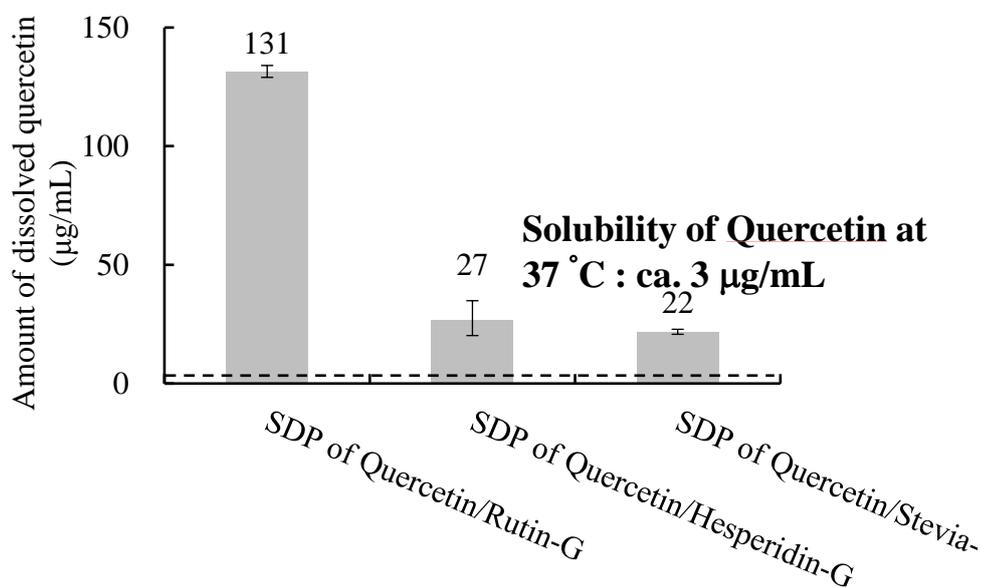
霧乾燥粒子中では、Quercetin 分子が Rutin-G 分子と分子分散した状態、もしくはそれに近い非晶質の状態で複合粒子として存在していると考えられた。



**Figure 8 Powder X-ray diffraction patterns of (a) quercetin crystals, (b) Rutin-G powder, (c) Hsp-G powder, (d) Stevia-G powder, (e) physical mixture (PM) of quercetin/Rutin-G (1/10), (f) SDPs of quercetin/Rutin-G (1/10), (g) quercetin/Rutin-G (1/5), (h) quercetin/Rutin-G (1/2), (i) quercetin/Rutin-G (1/1), (j) quercetin/Hsp-G (1/10) and (k) quercetin/Stevia-G (1/10).**

Figure 9 に Quercetin と各糖転移化合物を 1/10 (w/w) で調製した噴霧乾燥粒子の Quercetin の溶解度を示す。Quercetin 原末の溶解度 (2.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) に対して、すべての噴霧乾燥粒子における Quercetin 溶解度は向上した。Quercetin/Stevia-G、Quercetin/Hsp-G、Quercetin/Rutin-

G の噴霧乾燥粒子からの Quercetin の溶解度は、それぞれ 22、27、131  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、Rutin-G 添加時が最も高い値を示した。



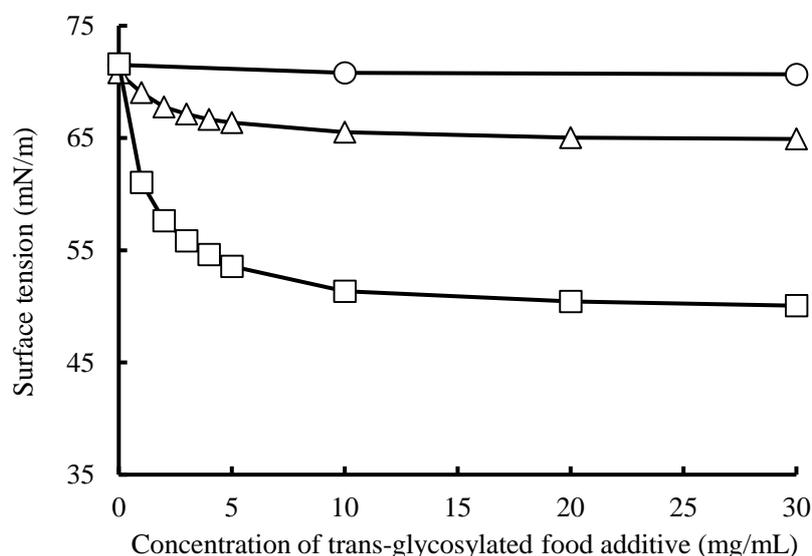
**Figure 9** The amount of dissolved quercetin and transglycosylated compounds (1/10) prepared by spray-drying in water at 37 °C after 24 h (n = 3).

### 1.3.3 糖転移化合物の会合体形成能

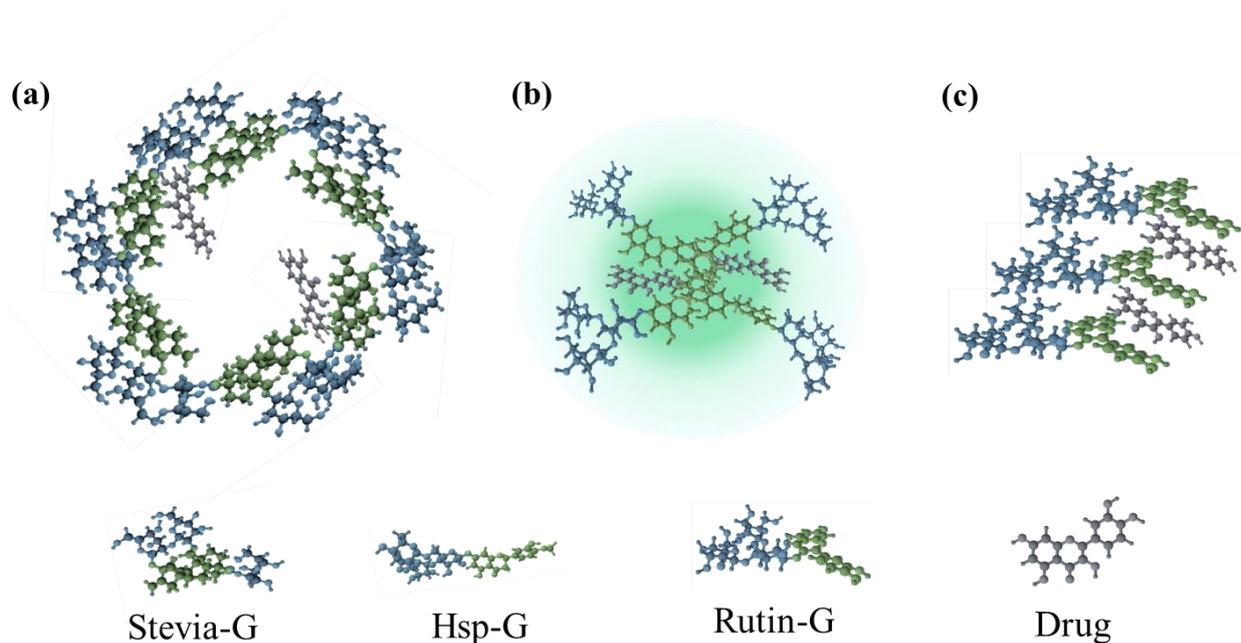
Figure 10 には Hsp-G、Stevia-G 及び Rutin-G を水中に添加した際の、水の界面張力の変化を示した。Hsp-G 溶液の界面張力は、Hsp-G 濃度が増加すると水の界面張力 (72 mN/m) から徐々に減少し、65 mN/m でプラトーに達した。Stevia-G を添加した場合、界面張力は 50 mN/m まで低下した後プラトーに達し、3 つの糖転移化合物のうち最も界面活性作用が大きかった。このことから、Hsp-G と Stevia-G は界面活性作用を有することが示唆された。一方、Rutin-G は水への添加量を増加させても界面張力は低下せず、界面活性作用を示さなかった。

先行研究において、Stevia-G、Hsp-G、Rutin-G が自己会合した集合体を形成し、動的光散乱測定により数ナノメートルの粒子が水中に存在することが報告されている。Stevia-G

はミセル様の自己会合体構造 (Figure 11(a))を形成する可能性が報告されている [59]。Stevia-G の臨界会合濃度 (critical aggregation concentration: CAC)は約 15 mg/mL と報告されており、Pyrene モノマーの蛍光挙動の変化から、Pyrene が疎水的な環境下に存在することが考察されている [60]。Hsp-G は 5 mg/mL 以上の濃度の水溶液中において、core-shell 様の自己集合体 (Figure 11(b))を形成する可能性が報告されている [41, 61]。Hsp-G の自己集合体の形成は、Hsp-G の疎水部であるフラバノン構造間の  $\pi$ - $\pi$  相互作用などの疎水相互作用に起因することが推察されている [62]。Rutin-G の  $^1\text{H-NMR}$  で濃度変化に伴う  $^1\text{H}$  ピークの化学シフトを評価した結果によると、5 mg/mL 以上の濃度でナノ集合体を形成する可能性が示唆されている。 $^1\text{H-NMR}$  と小角 X 線散乱の結果より Rutin-G は Hsp-G と同様に疎水部であるフラボノール構造間で相互作用を示し、ナノ集合体 (Figure 11(c))を形成していることが報告されている [63]。また、Hsp-G は弱い界面活性作用を有しているのに対し、Rutin-G は界面活性作用を有していない (Figure 10)。以上のことから Hsp-G、Stevia-G、Rutin-G は自己集合体を形成しており、それぞれの CAC や界面活性作用の違いから、異なる構造の集合体を形成していると考えられる。その結果、薬物-糖転移化合物間の相互作用の様式および集合体の大きさも異なると推測される。



**Figure 10** Changes in the surface tension as a function of the concentration of transglycosylated food additives. (○, Rutin-G; △, Hsp-G; and □, Stevia-G. Each bar represents the means  $\pm$  SE of 3 experiments.)



**Figure 11 Schematic representation of the structures formed in aqueous solution: (a)  $\alpha$ -glucosyl stevia (Stevia-G), (b)  $\alpha$ -glucosyl hesperidin (Hsp-G) and (c)  $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G).**

#### 1.3.4 溶出試験

Figure 12 に Quercetin 原末および Quercetin 噴霧乾燥粒子の 25 mL スケールでの溶出試験結果を示す。Quercetin/Rutin-G を 1/1 (w/w)から 1/20 (w/w)までの比率で調製した噴霧乾燥粒子を 37°Cの 30 mL の精製水に再分散させ、Quercetin の溶解度を測定した。噴霧乾燥粒子中に Rutin-G が十分に共存していない場合 (1/1、1/2、1/5、1/10)、溶出試験中に容器内で Quercetin の析出が認められた。一方、Quercetin/Rutin-G (1/20)の噴霧乾燥粒子に関しては Quercetin 結晶の析出による溶解度の低下は認められず、約 1500  $\mu\text{g/mL}$  を維持し、原末の溶解度 (2.7  $\mu\text{g/mL}$ )と比較して 500 倍以上の溶解度を示していた。噴霧乾燥粒子が原末の溶解度以上の溶出量を示した要因は Quercetin を Rutin-G とともに噴霧乾燥することで、Rutin-G 中に Quercetin が非晶質となり分散することで溶解性が改善されたこと、および Rutin-G ナノ構造体と Quercetin が会合してナノ複合体を形成することによる可溶化効果が考えられた。

これまで、Quercetin に対し高分子を用いた固体分散体形成による溶解性の向上は過去に報告されているが、Quercetin の溶解度は 10 倍程度までしか改善されない [64]。したがって、Figure 12 で認められた溶解度の向上には、Rutin-G ナノ構造体と Quercetin が会合したナノ複合体の形成による可溶化の寄与が大きいことが考えられる。

Figure 12 の結果より、Rutin-G の濃度が高いほど水中に存在する Rutin-G ナノ構造体の存在数も多くなり、Quercetin 分子と相互作用する頻度が増えるため、より多くの Quercetin 分子を溶解させ得ることが示唆される。今回の Quercetin の可溶化効果を議論するためには、2つの平衡を考慮しなくてはならない。すなわち、i) Rutin-G の水中での会合によるナノ構造体の形成とその解離の平衡、および ii) 水中で形成された Rutin-G のナノ構造体と Quercetin 分子との相互作用によるナノ複合体の形成とその解離の平衡を考慮しなくてはならない。i)の平衡は外部環境によって大きな影響を受けるため、希薄系ではナノ構造体形成が難しく、高濃度系で安定的に Rutin-G ナノ構造体が形成されやすいことが推測される。また、ii)の平衡はシクロデキストリンと薬物の包接化合物形成時の安定度定数のような概念を取り入れればよいと考えられ [65]、複合体形成時の相互作用部位と相互作用の強さ、ナノ構造物の疎水的な空間のサイズと薬物の大きさなどが、複合体の安定度定数の向上効果に寄与することが推察される。

今回、Quercetin が Rutin-G 存在下で最も高い溶解度を示したのは、疎水性の相互作用を考慮した時に、Rutin-G のアグリコンが Quercetin と同じ構造であるため、ナノ複合体形成に優位に働いたことが推察される。安定度定数が高いナノ複合体が形成されれば、複合体の崩壊による Quercetin の析出は抑制されるため、より効率的な可溶化効果が期待できる。

一方、Quercetin/Rutin-G のナノ複合体は、比較的相互作用の弱い複合体と考えられるため、経口投与などで Quercetin/Rutin-G の噴霧乾燥粒子を投与した場合には、体内では希釈されること、pH が変化すること、他の様々な成分が存在することなどから、Quercetin/Rutin-G のナノ複合体の構造は維持されるとは限らない。したがって今回の *in vitro* での溶解度改善効果の吸収性改善への効果を議論するためには、*in vivo* 実験による吸収性の評価が不可欠である。

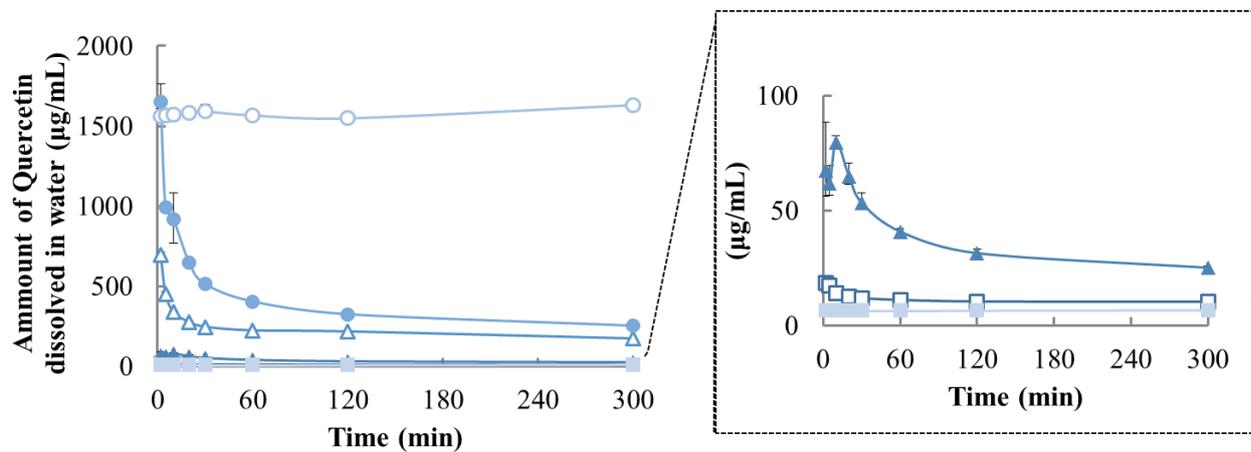
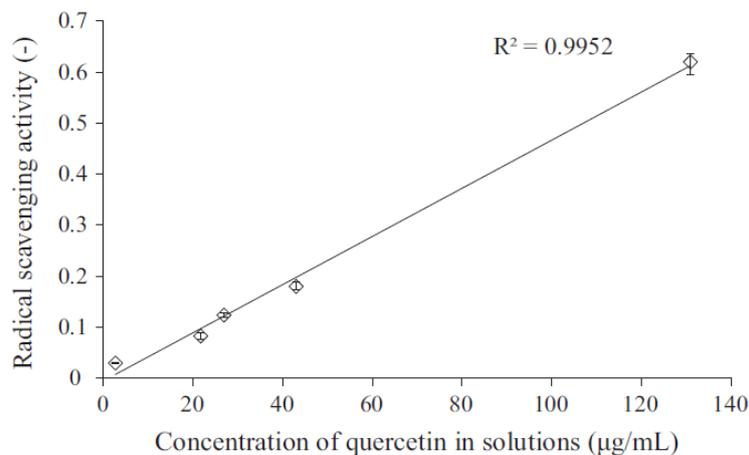


Figure 12 Amount of quercetin dissolved in water at 37 °C. quercetin crystals, ■ ; loading ratio of quercetin/Rutin-G, □1/1; ▲1/2; △1/5; ●1/10; ○1/20. (n = 3)

### 1.3.5 抗酸化作用の評価

サンプル溶液中の DPPH ラジカルの吸光度を測定することで抗酸化活性を算出した [55]。Hsp-G と Rutin-G は高い抗酸化作用の有しているため、Quercetin のみの抗酸化作用を評価した。Figure 6 及び Figure 9 の結果より、Quercetin 原末、Quercetin/Rutin-G (1/10) の物理混合物及び噴霧乾燥粒子の溶解度はそれぞれ 2.7、43、131 µg/mL であり、Quercetin/Stevia-G (1/10)、Quercetin/Hsp-G (1/10) の噴霧乾燥粒子の溶解度は、それぞれ 22、27 µg/mL であった。Figure 13 は、サンプル溶液中の Quercetin のラジカル除去能を示している。Quercetin のラジカル除去能は Quercetin の溶解度が増大するのに比例し向上していた。Quercetin の効能である抗酸化作用を向上させるためには、Rutin-G を用いて Quercetin の溶解度を向上させることが有用であることが示唆された。



**Figure 13 Antioxidant activity of quercetin evaluated from radical DPPH scavenging activity. (n = 3)**

#### 1.4 結論

抗酸化作用を有する Quercetin の溶解度は糖転移化合物の添加量に依存して直線的に向上した。また、Rutin-G は使用した糖転移化合物の中で最も Quercetin への可溶化効果が高かった。Rutin-G を用いて Quercetin と Rutin-G の噴霧乾燥粒子を調製することで、精製水に再分散させた際の溶解度が向上した。Quercetin が Rutin-G 存在下で最も高い溶解度を示したのは、疎水性の相互作用を考慮した時に、Rutin-G のアグリコンが Quercetin と同じ構造であることが、ナノ複合体形成時の安定性の向上に優位に働いたためであると推測された。また、Rutin-G を用いて Quercetin 溶解度を増大させた結果、Quercetin の抗酸化作用も増強された。よって、Rutin-G 共存下で Quercetin の噴霧乾燥粒子を調製することで、難溶性化合物である Quercetin の溶解性の向上が可能であり、Quercetin を含有する機能性食品を開発する上で有用な技術であるといえる。

## 第2章

# 糖転移化合物が難溶性フラボノイドである Ipriflavone の 溶解性及び吸収性に与える影響

### 2.1 序論

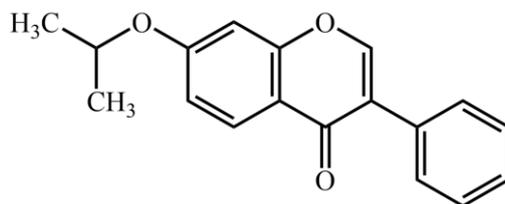
近年、健康食品やサプリメントを使用したセルフメディケーションによる健康管理が注目を集めている。健康食品やサプリメントには多数の有効成分が含有されており、中でもフラボノイド化合物は抗酸化作用や抗炎症作用といった健康管理に有益な効能・効果が期待されている。経口投与された有効成分が吸収されるためには、消化管液中で分子レベルにまで溶解しなければならない。しかし、フラボノイド化合物の中には難溶性を示す化合物が多く存在する [66, 67]。機能性食品開発だけでなく医薬品開発においても同様に、候補化合物のうち、難溶性化合物の割合は増加している。そのため、難溶性化合物の吸収性の改善を目的とした溶解性改善技術が開発されている [68, 69]。医薬品開発に用いられる溶解性改善技術は、機能性食品開発においても有用であり、フラボノイド化合物など難溶性化合物の溶解性改善が報告されている [70, 71]。しかし、難溶性化合物の溶解性を改善し、吸収性まで評価した報告が不足しているのが現状である [72]。

第一章では、 $\alpha$ -Glucosyl hesperidin (Hsp-G)、 $\alpha$ -Glucosyl stevia (Stevia-G)、 $\alpha$ -Glucosyl rutin (Rutin-G)の3種の糖転移化合物を用いて、フラボノイド類である Quercetin の溶解性改善を検討した。その結果、Quercetin に糖を付加した化学構造を持つ Rutin-G を用いた際に、最も高い Quercetin の溶解性改善が達成できた。本章では、フラボノイド類であり、難溶性を示す Ipriflavone をモデル化合物として用い、溶解性改善に加え吸収性改善が可能か検討した。

## 2.2 試料ならびに実験方法

### 2.2.1 試料

難溶性フラボノイドのモデル化合物として選択した Ipriflavone (Figure 14)は、東和薬品株式会社より提供された。糖転移化合物である、Rutin-G (Figure 5a)、Hsp-G (Figure 5b) および Stevia-G (Figure 5c)は東洋精糖株式会社より提供された。Polyvinylpyrrolidone K-30 (PVP) は BASF ジャパン株式会社から提供された。



**Figure 14 Chemical structure of ipriflavone (M.W. = 280.31).**

### 2.2.2 実験方法

#### 2.2.2.1 噴霧乾燥粒子および物理混合物の調製

Ipriflavone の噴霧乾燥粒子を以下のように調製した。Ipriflavone 50 mg をエタノール 200 mL に、糖転移化合物または PVP 500 mg を精製水 300 mL にそれぞれ溶解した後混合した。この混合溶液を 1.2.2.1 と同様の条件で噴霧乾燥した。また、Ipriflavone と糖転移化合物または PVP の物理混合物は 3 分間、ボルテックスミキサーで単純混合し調製した。調製したすべての試料はシリカゲルと共にデシケーターで保存した。

#### 2.2.2.2 走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: SEM)

各試料の外観は、走査型電子顕微鏡 (SEM) (VE-7800, Keyence)を用いて評価した。測定前に各試料をサンプル台上に添加し、真空条件下で白金を用いて蒸着させ、(E-1045, 株式会社日立製作所)加速電圧 5 keV から 20 keV の範囲で撮影した。

### 2.2.2.3 粉末 X 線回折測定 (Powder X-ray Diffractometry: PXRD)

粉末 X 線回折測定は Miniflex powder X-ray diffractometer (MiniFlex 600, Rigaku)を用いて行った。電圧 30 kV、電流 15 mA、ステップサイズは 0.02、 $2\theta$  が 5-35° の範囲で 4°/min の速度で測定した。

### 2.2.2.4 溶解度測定

Ipriflavone 原末、物理混合物、噴霧乾燥粒子からの Ipriflavone の溶解度の測定では、60 mg の Ipriflavone を含むそれぞれのサンプルに 30 mL の精製水を加え、37°C、100 strokes/min の条件でバスシェイカー (ML-10, Taitec, Co. Ltd.)を用いて攪拌した。2 時間、6 時間および 24 時間後のサンプルを孔径 0.2  $\mu\text{m}$  の PVDF フィルターに通し、Ipriflavone の濃度を Table 3 に示す条件で、HPLC (SPD-10A, 株式会社島津製作所)を用いて測定した。

**Table 3 HPLC conditions of Ipriflavone.**

	Ipriflavone
Detector	UV
Wavelength	254 nm
Column	COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS-II 4.6 × 150 mm
Column temperature	40°C
Injection volume	10 $\mu\text{L}$
Mobile phase	Acetonitrile/0.1% phosphoric acid = 30/70 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min

### 2.2.2.5 溶出試験

溶出試験はパドル法で行った。薬物量として 20 mg を仕込み量とし、溶出試験液には精製水 900 mL を用い、水温 37°C、攪拌速度 50 rpm の条件下で所定の時間 (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) に各 2 mL のサンプリングを行った。サンプリング溶液を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  の PVDF フィルターでろ過し、HPLC にて溶解した Ipriflavone 濃度を測定した。HPLC 条件は

2.2.2.4 の Table 3 に示した。

#### 2.2.2.6 吸収性試験

体重約 350 ± 50 g (10~12 週齢、日本 SLC)の雄性 Sprague-Dawley ラットを、飼料と水を自由に摂取させ、一定の温度 (24±1°C)と湿度 (55±5%)の条件下で飼育した。ラットは水を自由に摂取させたが、薬物投与の約 12 時間前から 24 時間時点まで絶食させた。本研究で使用されたすべての手順は、静岡大学の施設内動物管理および倫理委員会によって承認されたガイドラインに従って行われた。

Ipriflavone 原末と Ipriflavone/Rutin-G の噴霧乾燥粒子を 10 mg/mL になるように 2 mL の蒸留水に懸濁させ、Ipriflavone が 10 mg/kg となるよう、約 350 μL 経口投与し、その後、各時間 (0.25、0.5、1、3、6、12 及び 24 時間)に無麻酔ラットの尾静脈から 400 μL の血液サンプルを採取した。各血液サンプルを 10,000 G で遠心分離して血清を採取し、。分析まで 80°C 以下で保存した。血清中の Ipriflavone 濃度は UPLC/ESI-MS により測定した。血清サンプル 50 μL に内部標準 (Midazolam)のメタノール溶液 (1 μg/mL)を 100 μL 添加し、10,000 rpm で 10 分間遠心処理した。その後上清を採取し、孔径 0.2 μm の PVDF フィルターでろ過することで定量サンプルを調製した。Ipriflavone の血中濃度は、UPLC/ESI-MS (Acquity UPLC、Waters)を用いて Table 4 及び Table 5 に示す条件で定量した。

**Table 4 UPLC/ESI-MS conditions of ipriflavone.**

Ipriflavone	
Detector	ESI-MS
Column	Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> column 1.7 μm, 2.1 × 50 mm
Column temperature	40°C
Injection volume	1 μL
Mobile phase	A: 5 mM ammonium acetate, B: methanol
Flow rate	0.25 mL/min
Precursor ion (m/s)	Ipriflavone: 281, Midazolam: 326

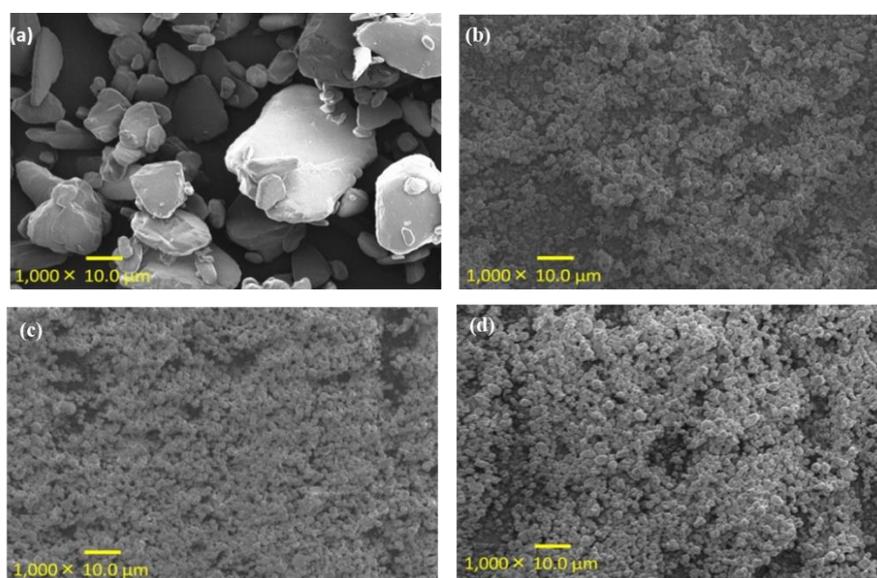
**Table 5 Gradient mobile phase composition for the UPLC method.**

Time (min)	A (%)	B (%)
Initial	40	60
0.5	40	60
3	10	90
4	5	95
4.5	40	60

## 2.3 結果と考察

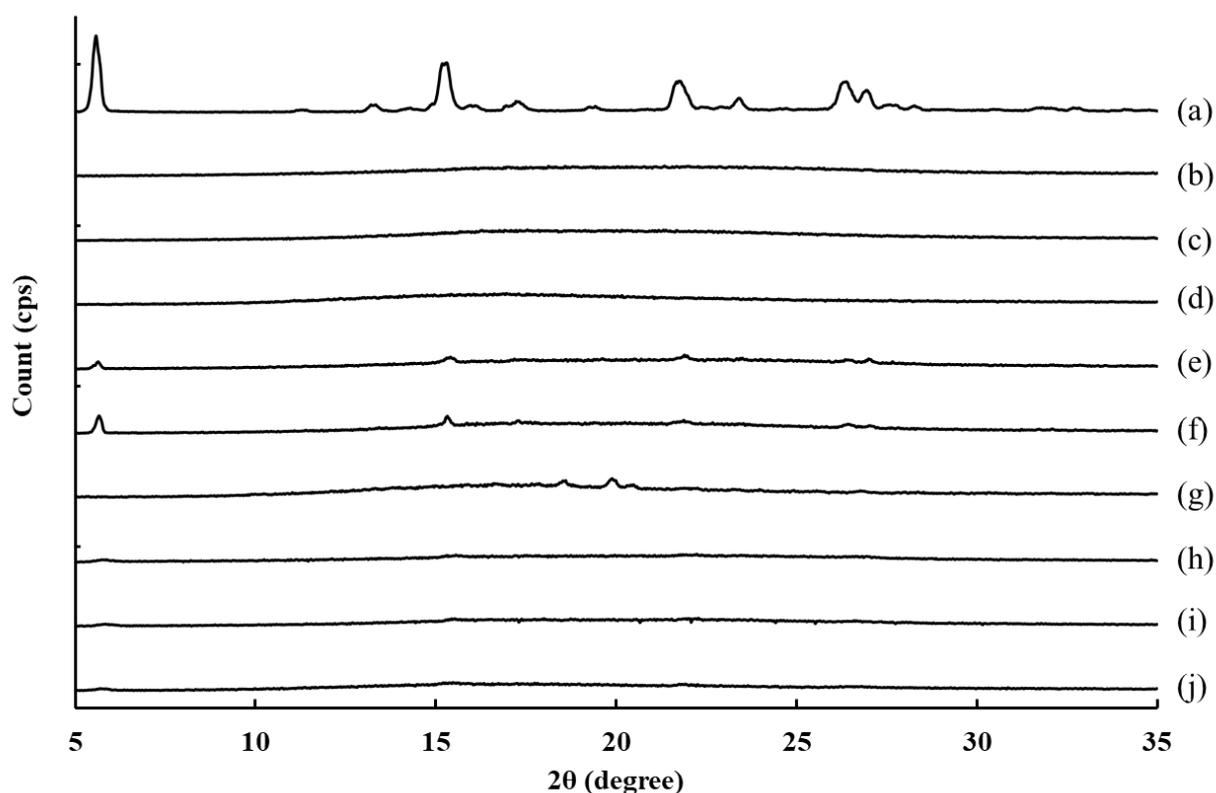
### 2.3.1 噴霧乾燥粒子の物理化学的性質

Ipriflavone 原末および各糖転移化合物との Ipriflavone 噴霧乾燥粒子の SEM 画像を Figure 15 に示す。糖転移化合物を用いた Ipriflavone の噴霧乾燥粒子は、大きさの揃った球状粒子であり、Ipriflavone 原末に比べて粒子径が小さくなっていることが確認された。



**Figure 15 Scanning electron microscope images of (a) untreated ipriflavone, (b) spray dried particles (SDPs) of ipriflavone with  $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G), (c) SDPs of ipriflavone with  $\alpha$ -Glucosyl hesperidin (Hsp-G) and (d) SDPs of ipriflavone with  $\alpha$ -Glucosyl stevia (Stevia-G).**

Ipriflavone 原末、3 種の糖転移化合物原末、物理混合物および噴霧乾燥粒子の PXRD の測定結果を Figure 16 に示した。Ipriflavone 原末は、 $5.60^\circ$ 、 $15.3^\circ$ 、 $21.8^\circ$  付近に Ipriflavone の結晶に由来する特徴的なピークを示した。一方、全ての糖転移化合物はハローパターンを示した。また全ての物理混合物において、Ipriflavone 結晶に由来するピークが確認されたが、噴霧乾燥粒子はいずれもハローパターンを示し、X-ray amorphous の状態を示すことが確認された。



**Figure 16 Powder X-ray diffraction patterns of (a) untreated ipriflavone, (b) Rutin-G powder, (c) Hsp-G powder, (d) Stevia-G powder, (e) Physical mixture (PM) of ipriflavone /Rutin-G (1/10), (f) PM of ipriflavone/Hsp-G (1/10), (g) PM of ipriflavone /Stevia-G (1/10), (h) SDPs of ipriflavone /Rutin-G (1/10), (i) SDPs of ipriflavone /Hsp-G (1/10) and (j) SDPs of ipriflavone/Stevia-G (1/10).**

### 2.3.2 溶解度測定

精製水 30 mL 中に各試料を分散させ、2、6、24 時間時点でサンプリングを行い、Ipriflavone の溶解度を測定した。その結果を Figure 17 に示す。Ipriflavone 原末の溶解度は、約 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。物理混合物からの Ipriflavone の溶解度は、Rutin-G を添加した際に最も高い値を示した。噴霧乾燥粒子からの Ipriflavone の溶解度は、物理混合物の場合と同様に Rutin-G を用いた際に最も高い値を示し、Ipriflavone の溶解度は原末に比べ約 3 倍に向上していた。

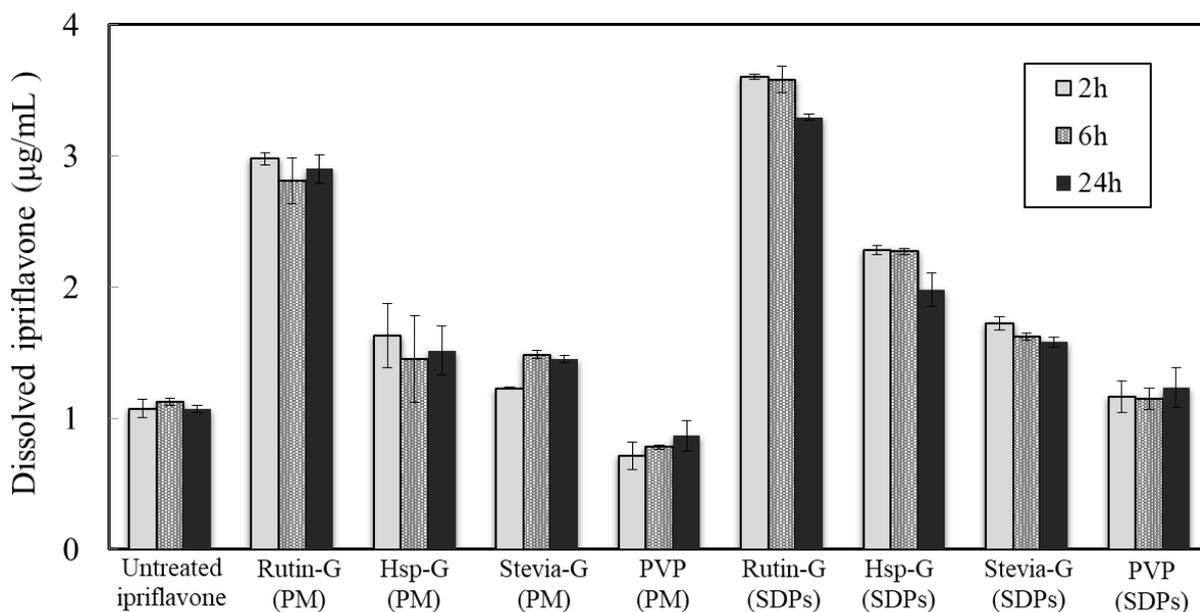
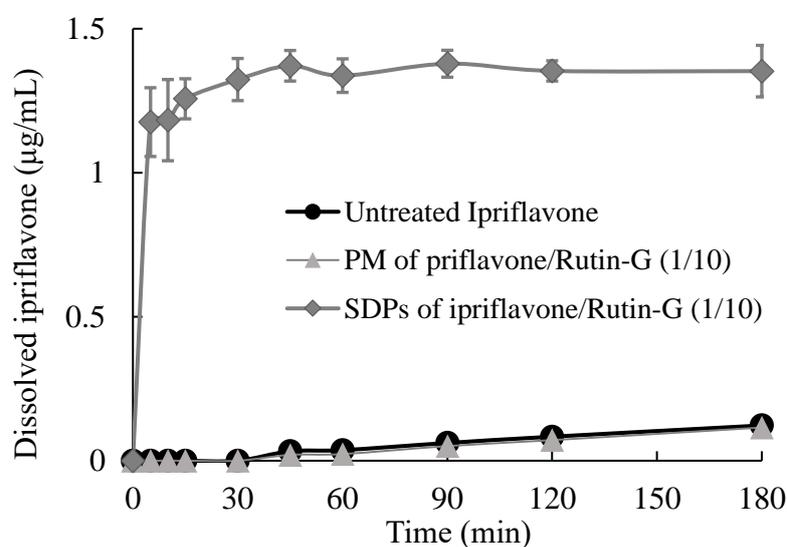


Figure 17 Solubility of ipriflavone in the aqueous solutions.

### 2.3.3 溶出試験

Ipriflavone 原末と Ipriflavone/Rutin-G (1/10)の物理混合物、および噴霧乾燥粒子において、パドル法を用いて溶出試験を行った。その結果を Figure 18 に示す。Ipriflavone 原末及び物理混合物は溶解性が低く、180 分後において、原末、物理混合物ともに約 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶出量しか認めなかった。一方、噴霧乾燥粒子では試験直後に急速な溶出を認め、約 1.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶出を示した。

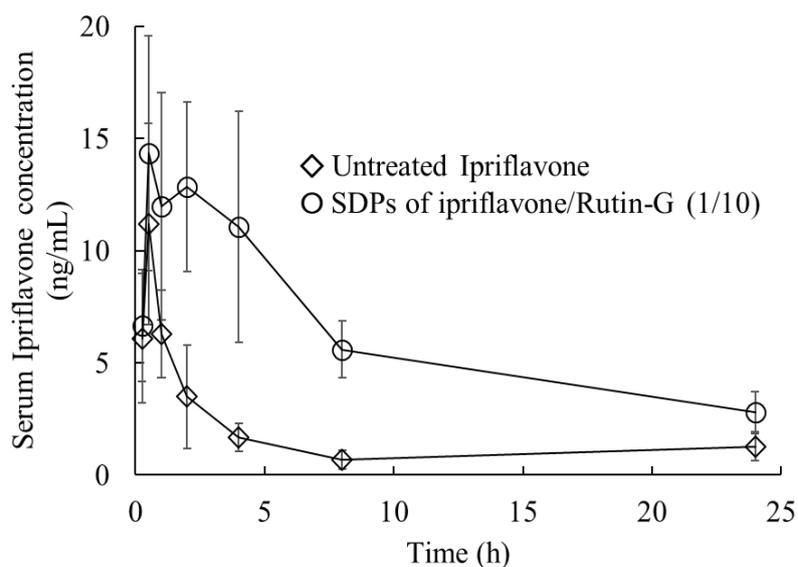


**Figure 18** Dissolution profiles of ipriflavone in distilled water. (●, SDPs of ipriflavone with Rutin-G; ▲, PM of ipriflavone with Rutin-G; and ◆, untreated ipriflavone. Each bar represents the means  $\pm$  SE of 3 experiments.)

### 2.3.4 Ipriflavone の吸収性試験

Ipriflavone は難溶解性を示し、Bioavailability は 25% と低い値を示すことが報告されている [74, 75]。Ipriflavone 原末と Ipriflavone/Rutin-G (1/10) の噴霧乾燥粒子をラットに経口投与した後の、血中濃度プロファイルを図 19 に示す。Ipriflavone 原末を経口投与した結果、Maximum drug concentration ( $C_{max}$ ) が  $11.2 \pm 4.48$  ng/mL、Area Under the Curve ( $AUC_{0-24}$ ) が  $30.6 \pm 6.12$  ng·h/mL であった。一方で Ipriflavone/Rutin-G (1/10) の噴霧乾燥粒子をラットに経口投与したところ、 $C_{max}$  が  $14.4 \pm 5.23$  ng/mL、 $AUC_{0-24}$  が  $149.5 \pm 36.2$  ng·h / mL であった。 $C_{max}$  は、Ipriflavone 原末と Ipriflavone/Rutin-G (1/10) の噴霧乾燥粒子の間に有意な差はなかったが、これは懸濁液として投与したことによると考えられた。一方で AUC は、噴霧乾燥粒子投与群は Ipriflavone 原末投与群に比べ有意に高い値を示した。Ipriflavone 原末は、経口投与後 1 時間で最も高い血中濃度を示し、その後低下した。一方で Ipriflavone/Rutin-G (1/10) の噴霧乾燥粒子では、4 時間まで高い血中濃度を維持した。Figure 19 から、Ipriflavone は Rutin-G の形成する分子集合体構造中に可溶化され、溶解度が向上する。消化管内では、

Rutin-G が形成する会合体内に可溶化している化合物とフリー体として溶解している化合物との間に平衡関係が成り立ち、吸収にはフリー体のみが寄与する。Ipriflavone 吸収性の向上は Rutin-G による可溶化によって Ipriflavone の溶解度が向上し、消化管内で Ipriflavone が持続的に放出されることが要因であると考えられた。



**Figure 19 Serum concentration-time profiles in rats after oral administration of untreated ipriflavone and ipriflavone/Rutin-G (1/10) SDPs. Data represent the means  $\pm$  SE**

## 2.4 結論

Rutin-G を使用して噴霧乾燥処理を行うことで、最も高い Ipriflavone の可溶化効果が得られた。Rutin-G を用いて調製した噴霧乾燥粒子をラットに経口投与したところ、Ipriflavone 原末と比較して約 5 倍の吸収性改善が得られた。本研究の結果より、Rutin-G を用いて難溶性フラボノイドの噴霧乾燥粒子を調製することにより、溶解性および吸収性を高めることができた。本研究で得られた知見は、その他の難溶性フラボノイドに対して利用できる可能性があるため、今後の機能性食品開発への応用が期待できる。

## 第3章

# 糖転移ステビアと界面活性剤の複合体による難溶性化合物の溶解性改善

### 3.1 序論

$\alpha$ -Glycosyl stevia (Stevia-G)はキク科植物であるステビアの一種、*Stevia rebaudiana* Bertoni の抽出物を酵素処理し、 $\alpha$  グルコースを付加した食品添加剤である。Stevia-G は界面活性作用を有し、溶液中でミセル様の集合体を形成し、難溶性薬物の溶解性及び吸収性を改善することが報告されている [76]。しかし、Stevia-G による臨界ミセル濃度(critical micelle concentration: CMC)は 15 mg/mL であり、薬物の可溶化には非常に多くの添加量が必要である。これまでも難溶性化合物の溶解性改善として界面活性剤は利用されているが、細胞毒性を有するものが多く、使用量の制限がある。そのため、複数の界面活性剤を用いた混合ミセルによる方法が期待されている [34-37]。混合ミセルは、単一の界面活性剤に比べ、CMC 濃度を低下させ、高い可溶化効果を有し、界面活性剤の総量を減らすことが可能である [38]。先行研究において、Stevia-G 溶液へ陰イオン性界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)を少量添加したところ、Flurbiprofen の溶解性を大幅に向上させている [43]。しかし、Stevia-G と界面活性剤との間の相互作用機構は、未だに明らかにされていない。

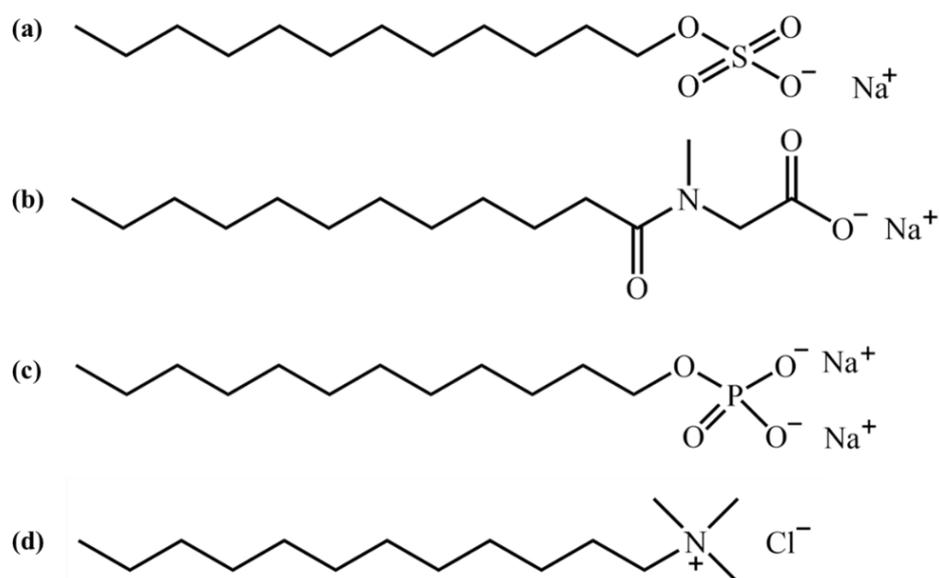
Stevia-G が界面活性作用を有し、疎水性相互作用によって自己会合することから、Stevia-G と界面活性剤による混合ミセルを形成することが考えられる。そこで、Stevia-G と各種イオン性界面活性剤を用いて、混合ミセル形成を評価した。混合ミセルを評価する方法として、相分離モデルに正則溶液論を適用した Rubingh モデルがある。単一の界面活性剤の CMC 濃度から求めた理想値と混合溶液の CMC の実測値との乖離から、界面活性剤間の相互作用を見積もることができるため、本モデルは最もよく使用されている [75]。理想値とは、混合した界面活性剤同士が相互作用せず、それぞれ単一のミセルを形成すると仮定した場合の値である。一方、正則溶液における理想的な混合ミセルの挙動を表す Clint モデルは、理想的な挙動を示す系に適用され、界面活性剤混合溶液が正則溶液であると仮定した場合の CMC をはじめとしたパラメータを算出する方法として使用されてる [76]。

本章では非ステロイド系抗炎症薬である Mefenamic acid (MFA) をモデル難溶性化合物として選択し、Stevia-G と各種イオン性界面活性剤による溶解性改善効果を評価した。界面活性剤として、SDS、sodium N-dodecanoylsarcosinate (SLAS)、sodium monododecyl phosphate (SMP)、lauryltrimethylammonium chloride (LTAC) の 4 種類を使用した。これらの界面活性剤と Stevia-G による MFA の溶解性改善機構を明らかにするために、界面張力を測定し、Rubingh モデルを用いて添加剤間の相互作用評価を行った。さらに、Stevia-G と界面活性剤による混合ミセルと MFA の 3 成分を用いた噴霧乾燥粒子を調製し、粒子物性および溶出速度を評価した。

## 3.2 試料ならびに実験方法

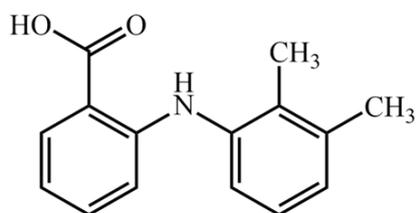
### 3.2.1 試料

糖転移化合物の Stevia-G は東洋精糖から提供された。界面活性剤の SDS はナカライテスク株式会社、SLAS 及び LTAC は和光純薬工業株式会社、SMP は東京化成工業株式会社からそれぞれ購入した。SDS、SLAS、LTAC、SMP の構造式を Figure 20 に示す。



**Figure 20** Chemical structure of (a) sodium dodecyl sulfate (SDS), (b) sodium N-dodecanoylsarcosinate (SLAS), (c) sodium monododecyl phosphate (SMP) and (d) lauryltrimethylammonium chloride (LTAC).

難溶性モデル化合物として選択した Mefenamic acid (MFA, Figure 21)は、東和薬品株式会社から提供された。



**Figure 21 Chemical structure of mefenamic acid (MFA, M.W. = 241.28).**

### 3.2.2 実験方法

#### 3.2.2.1 溶解度測定

MFA/Stevia-G/界面活性剤 (SDS、SLAS、LTAC 及び SMP) (1/10/1, w/w/w)、MFA/Stevia-G (1/10, w/w)、MFA/界面活性剤 (1/1, w/w)を MFA 量が 50 mg となるように 25 mL の精製水を加え、37°C、100 strokes/min の条件でバスシェイカー (ML-10, Taitec, Co. Ltd.)を用いて攪拌した。24 時間振とう攪拌したサンプルを孔径 0.2  $\mu\text{m}$  の PVDF フィルターに通し、MFA の濃度を HPLC (SPD-10A, 株式会社島津製作所)によって Table 6 の条件で測定した。

**Table 6 HPLC conditions of Mefenamic acid.**

	Mefenamic acid
Detector	UV
Wavelength	254 nm
Column	COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS-II 4.6 × 150 mm
Column temperature	40°C
Injection volume	10 $\mu\text{L}$
Mobile phase	Acetonitrile/phosphoric buffer (pH6.8) = 50/50 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min

### 3.2.2.2 動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS)による粒子径分布測定

Stevia-G 及び LTAC を精製水に溶解し、その粒子径分布を DLS (Microtrac UPA , MicrotracBEL 社, 検出範囲: 0.3 nm ~ 6 µm) を使用して測定した。なお、測定は 3 回実施した。

### 3.2.2.3 界面張力測定

各界面活性剤 (SDS、SLAS、LTAC 及び SMP)溶液、Stevia-G 溶液及び Stevia-G と LTAC の混合溶液の界面張力は、最大泡圧法により測定した。各サンプルの界面張力は SITA Science Line t60 (SITA Messtechnik, Germany)を用いて、バブルライフタイム 1000 msec、溶液温度  $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  の条件で測定し、5 回の平均値を使用した。また、表面張力対対数濃度の屈曲点の濃度を CMC とした。

### 3.2.2.4 Stevia-G/LTAC 混合比率の MFA 溶解度への影響

Table 7 に示す添加比率で Stevia-G 及び LTAC の溶液 25 mL を調製した。各比率の界面活性剤溶液に、MFA 50 mg を加え、 $37^\circ\text{C} \cdot 100 \text{ rpm}$  の条件で、24 時間振とう攪拌を行い、3.2.2 に記載した HPLC 条件で、溶解度を測定した。なお、MFA/Stevia-G/LTAC での三成分での MFA 溶解度と、MFA/Stevia-G および MFA/LTAC の二成分での MFA 溶解度の合計と比較した。

**Table 7 Formulation of sample preparation for solubility test.**

	$\alpha_{\text{LTAC}}$	Stevia-G (mM)	LTAC (mM)
MFA/Stevia-G/LTAC	0.05	23.75	1.25
	0.1	22.5	2.5
	0.2	20	5
	0.5	12.5	12.5
	0.8	5	20
MFA/Stevia-G	0	25	-
	0.05	23.75	-
	0.1	22.5	-
	0.2	20	-
	0.5	12.5	-
	0.8	5	-
MFA/LTAC	0.05	-	1.25
	0.1	-	2.5
	0.2	-	5
	0.5	-	12.5
	0.8	-	20
	1	-	25

### 3.2.2.5 噴霧乾燥粒子及び物理混合物の調製

噴霧乾燥粒子を以下のように調製した。MFA 400 mg をエタノール 400 mL に、Stevia-G 4 g と LTAC 400 mg を水 100 mL に溶解し混合した。この溶液を Table 8 の条件で噴霧乾燥 (B-290, Büchi 社) した。この操作は不活性ガス (N<sub>2</sub>) 乾燥を用いて閉鎖系で実施した [77]。また、物理混合物は 3 分間、単純混合し調製した。調製したすべてのサンプルはシリカゲルと共にデシケーターで保存した。

**Table 8 Spray drying conditions**

Inlet temperature	120°C
outlet temperature	70°C
Pump rate	8.0 mL/min
Flow rate	410 L/min

### 3.2.2.6 粉末 X 線回折測定 (Powder X-ray Diffractometry: PXRD)

粉末 X 線回折測定は Miniflex powder X-ray diffractometer (Rigaku) を用いて行った。電圧 30 kV、電流 15 mA、ステップサイズは 0.02、 $2\theta$  が 5-35° の範囲で 4°/min の速度で測定した。

### 3.2.2.7 粉末の粒子径分布測定

乾式分散装置付きのレーザー回折式粒度分布測定装置 (MT3300EXII, MicrotracBEL 社) を用いて、0.20 MPa で試料粉末を分散させ、個数基準の粒子径 ( $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ ) を測定した。

### 3.2.2.8 溶出試験

溶出試験はパドル法にて行った。MFA 5 mg を仕込み量とし、溶出試験液には精製水 900 mL を用い、水温 37°C、攪拌速度 50 rpm の条件下で所定の時間 (0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) に各 2 mL のサンプリングを行った。サンプリング溶液を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  の PVDF フィルターでろ過し、HPLC にて溶解した MFA 濃度を測定した。HPLC 条件は 3.2.2 の Table 9 に示した。

### 3.2.2.9 相互作用パラメータの算出

2 成分の界面活性剤混合溶液の CMC 値 ( $\text{CMC}_{\text{mix}}$ ) 及びミセル中での各界面活性剤 1、2 のモル分率 ( $X_1$ ,  $X_2$ ) は、各界面活性剤溶液の CMC の値 ( $\text{CMC}_1$ ,  $\text{CMC}_2$ )、活量係数 ( $f_1$ ,  $f_2$ ) 及び界面活性剤のモル分率 ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) を用いて、それぞれ以下のように表される [78, 79]。

$$\frac{1}{\text{CMC}_{\text{mix}}} = \frac{\alpha_1}{f_1 \text{CMC}_1} + \frac{\alpha_2}{f_2 \text{CMC}_2} \quad \dots\dots (1)$$

$$X_1 = \frac{\alpha_1 f_2 \text{CMC}_2}{\alpha_1 f_2 \text{CMC}_2 + \alpha_2 f_1 \text{CMC}_1} \quad \dots\dots (2)$$

理想的な混合系では、活量係数を  $f_1 = f_2 = 1$  としたものであり、式 (1)と式 (2)の  $f_1$  及び  $f_2$  に 1 を代入すると、CMC の理想値 ( $\text{idealCMC}_{\text{mix}}$ )とミセル中でのモル分率の理想値 ( $\text{ideal}X$ ) が表され、これが Clint の式である [76]。

$$\frac{1}{\text{idealCMC}_{\text{mix}}} = \frac{\alpha_1}{\text{CMC}_1} + \frac{\alpha_2}{\text{CMC}_2} \quad \dots\dots (3)$$

$$\text{ideal}X_1 = \frac{\alpha_1 \text{CMC}_2}{\alpha_1 \text{CMC}_2 + \alpha_2 \text{CMC}_1} \quad \dots\dots (4)$$

混合ミセル中の界面活性剤による分子間の相互作用については、Rubingh [75]や Motomura [80]の各モデルにおいて報告されている。これらの理論のうち、Rubingh モデルは現在も単一の界面活性剤の CMC から求めた理想値と混合溶液の CMC の実測値との乖離から、界面活性剤間の相互作用を見積もることができるため汎用的モデルとして利用されている [81, 82]。式 (1)と式 (2)において、活量係数である  $f_1$ 、 $f_2$  が求められれば、ミセル中の構成モル分率  $X_1$  は計算より求まる。ここで、Rubingh モデル [75]より  $f_1$ 、 $f_2$  はそれぞれ次のように表される。

$$f_1 = \exp(\beta X_2^2) \quad \dots\dots (5)$$

$$f_2 = \exp(\beta X_1^2) \quad \dots\dots (6)$$

$\beta$  は相互作用パラメータを表しており、式 (5)と式 (6)の対数の比を取り、 $\beta$  を消去し、式

変形すると、以下の2つの式が得られる。

$$X_1^2 \ln \left( \frac{\alpha_1 \text{CMC}_{\text{mix}}}{X_1 \text{CMC}_1} \right) = X_2^2 \ln \left( \frac{\alpha_2 \text{CMC}_{\text{mix}}}{X_2 \text{CMC}_2} \right) \quad \dots\dots (7)$$

$$\beta = \frac{\ln \left( \frac{\alpha_1 \text{CMC}_{\text{mix}}}{X_1 \text{CMC}_1} \right)}{X_2^2} \quad \dots\dots (8)$$

各界面活性剤のモル分率 ( $\alpha$ )における相互作用パラメータ ( $\beta$ )と混合ミセル中の組成 ( $X$ )は、以上の式によって算出することができる。相互作用パラメータ ( $\beta$ )は、過剰ギブス自由エネルギーを表すエネルギーパラメータとして解釈できる。溶液を混合した際の過剰エントロピーがゼロの場合のみ正則溶液と近似できる [83]。つまり、2種の界面活性剤が全く相互作用せず、混合ミセルを形成しないのであれば、理想状態と同じ挙動を示し、相互作用パラメータは 0 を示す。本稿においては、界面活性剤 1 を LTAC、界面活性剤 2 を Stevia-G として相互作用パラメータを算出した。

### 3.3 結果と考察

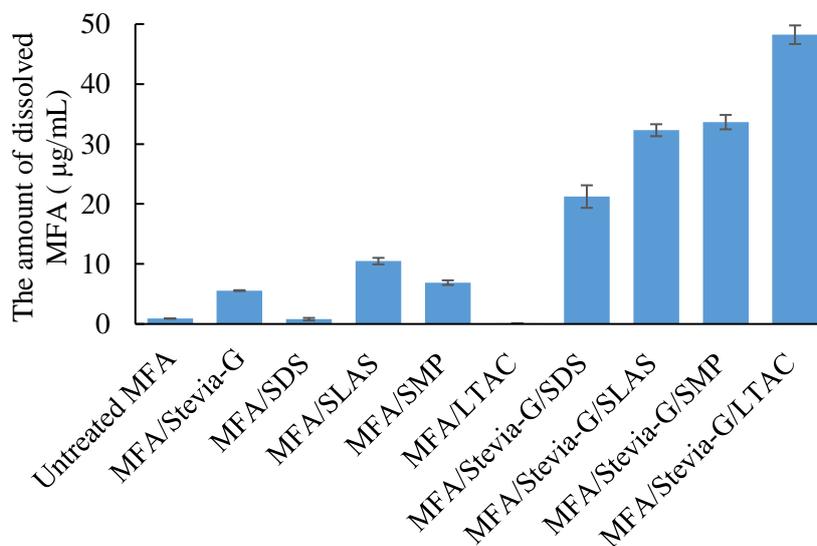
#### 3.3.1 界面活性剤の選択

界面活性剤は、疎水性炭素鎖の長さによって難溶性化合物の溶解度が異なることが確認されている [84]。Stevia-G の場合、疎水性炭素鎖が 12 個の陰イオン性界面活性剤 SDS を用いると、難溶性化合物である Flurbiprofen の溶解性が大幅に改善した [43]。そこで、様々な極性基を持ち、同じ 12 個の疎水性炭素鎖を有するイオン性界面活性剤を用いて MFA の溶解度を測定した。Stevia-G および各界面活性剤の CMC を Table 9 に示す。Figure 22 に、Stevia-G、各種界面活性剤および Stevia-G と界面活性剤に対する MFA の溶解度を示す。MFA 原末の溶解度は、精製水中で約 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。Stevia-G 添加すると、MFA の溶解度は 5.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで上昇した。また各界面活性剤を添加した場合、SLAS 及び SMP を添加すると MFA の溶解度は 11.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 7.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であったが、SDS 及び LTAC を添加した場合 MFA の溶解度に変化がなかった。これは、添加した界面活性剤量が CMC 以下で

あるためであると考えられる (Table 9)。一方、MFA と Stevia-G、界面活性剤の 3 成分の試験での溶解度は、界面活性剤のみ添加の溶解度よりも向上していた。なかでも Stevia-G と LTAC を利用すると、MFA の溶解度は最も改善され、48  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と 50 倍以上の溶解度を示した。

**Table 9 CMC values determined from surface tension isotherms of sodium lauryl sulfate (SDS), sodium N-dodecanoylsarcosinate (SLAS), sodium monododecyl phosphate (SMP) and lauryltrimethylammonium chloride (LTAC) in water at 25 °C (n=3).**

	Stevia-G	SDS	SLAS	LTAC	SMP
CMC (mM)	8.24 $\pm$ 0.08	10.5 $\pm$ 0.04	13.6 $\pm$ 0.13	25.7 $\pm$ 0.16	13.6 $\pm$ 0.06



**Figure 22 The apparent solubility of mefenamic acid, stevia-G, and surfactants in water at 37°C after 24 h (n=3).**

### 3.3.2 Stevia-G の粒子径に及ぼす LTAC の影響

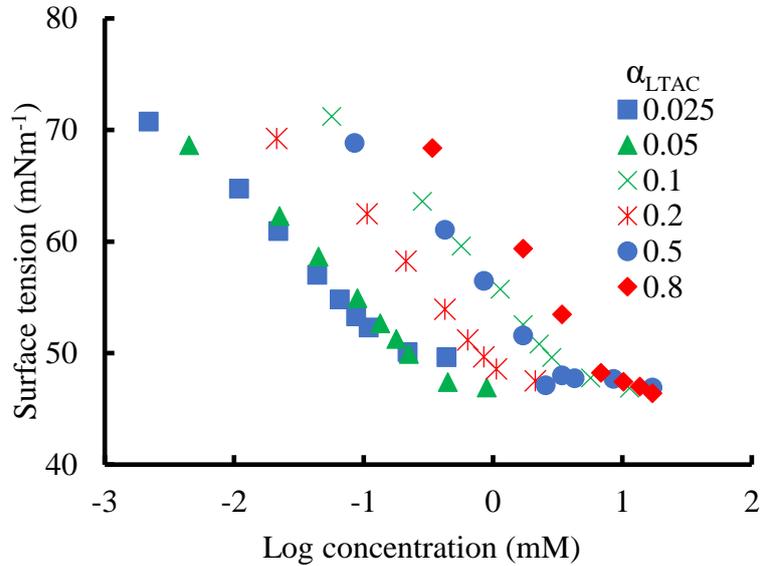
Stevia-G と LTAC を添加した際に MFA 溶解度が最も顕著に増加した。先行研究において、Stevia-G 及び SDS による Flurbiprofen の溶解度向上において、混合ミセル形成が示唆された。そこで、LTAC と Stevia-G の溶液中で形成される構造の大きさを DLS で測定し、その結果を Table 10 に示す。Stevia-G 溶液のメジアン粒子径 ( $D_{50}$ )は、 $3.00 \pm 0.08$  nm であるのに対し、Stevia-G 溶液に LTAC を添加した際の  $D_{50}$  は、 $2.23 \pm 0.05$  nm であった。なお、LTAC 添加濃度は CMC 以下であるため、LTAC は溶液中でミセル形成していないと考えられる (Table 9)。そのため LTAC 溶液の場合、DLS の検出限界以下となるため、測定できなかった。これまでの検討においても Stevia-G は界面活性作用を有しており、自己会合し集合体を形成し、その大きさは約 3 nm であることが報告されている [60]。本研究において、LTAC の添加によって Stevia-G 溶液の  $D_{50}$  低下し、Stevia-G の会合体が小さくなっていることが確認される。

**Table 10 Particle Sizes (D) of Stevia-G and 2:1 Stevia-G/LTAC Measured by DLS (n = 3)**

Sample	$D_{10}$ (nm)	$D_{50}$ (nm)	$D_{90}$ (nm)
Stevia-G	$2.40 \pm 0.16$	$3.00 \pm 0.08$	$3.77 \pm 0.05$
LTAC	ND*	ND*	ND*
Stevia-G with LTAC	$1.90 \pm 0.08$	$2.23 \pm 0.05$	$2.73 \pm 0.05$

\*ND: Not detected.

Figure 23 に LTAC と Stevia-G の混合溶液における各モル分率での界面活性剤濃度に対する界面張力 ( $\gamma$ )変化を示す。ここで、 $\alpha_{LTAC}$  は、溶液中の界面活性剤の総量中の LTAC のモル分率を意味している。Stevia-G および LTAC の CMC の値は、それぞれ 8.24 mM および 25.7 mM であり、LTAC を添加することで CMC 値が減少した。



**Figure 23 Surface tension versus the log of the surfactant concentration for different compositions of stevia-G/LTAC mixtures in water at 25°C.**

3.2.10 の式 (3)から算出した Stevia-G と LTAC 混合溶液の CMC 理想値 ( $^{ideal}CMC_{mix}$ )および実験値 ( $^{expt}CMC_{mix}$ )を LTAC モル分率  $\alpha$  の関数として表し、Figure 24 (a)に示す。式 (4)から算出したミセル中の LTAC モル分率の理想値 ( $X_{ideal}$ )と  $CMC_{mix}$  実験値を用いて式 (7)から算出した  $X$  の実験値 ( $X_{expt}$ )を Table 11 に示す。さらに、Figure 24 (b)に  $\alpha$  と  $X_{expt}$  及び  $X_{ideal}$  との関係を示す。Figure 24 (a)および (b)において、理想値は点線で、実験値は実線で示している。Stevia-G と LTAC の混合溶液の CMC およびミセル中の構成モル分率  $X$  はいずれにおいても実験値と理想値と異なる値を示した。 $X_{expt}$  は、LTAC モル分率  $\alpha$  が 0.05~0.5 では約 0.4、0.8 のとき 0.5 を示した。その  $X_{expt}$  値を式 (8)に代入し得られた相互作用パラメータ ( $\beta$ )を Table 11 に示す。Stevia-G と LTAC 混合溶液において相互作用パラメータ  $\beta$  は全て負の値を示した。

理想溶液では、溶液中の溶媒分子を含む成分間での分子間力が等価であり、それぞれが無秩序な混合状態の液体となっている溶液である。そのため、混合する際の熱量は生じず、疎水性相互作用や水素結合、静電的相互作用などの分子の種類によって大きさの異なる相互作用は加味されない溶液である。実際の混合溶液では、前述した相互作用が存在していると、理想値と実測値は異なる値を示すことが知られている [85, 86]。Figure 24 の結果に

において、Stevia-G と LTAC 混合溶液での実験値は、理想値から乖離していることが確認された。これは、Stevia-G と LTAC の間には疎水性相互作用や水素結合、静電的相互作用などの分子間相互作用が存在し、混合ミセルを形成していることが原因であると考えられる [87, 88]。Stevia-G と LTAC で構成している混合ミセルの構成分子数は明らかではないが、ミセル中の LTAC モル分率  $X_{\text{expt}}$  が約 0.4 であったことから、Stevia-G 分子が 3 分子に対して LTAC が 2 分子の構成になっていることが推測される。理想溶液と実際の溶液の違いを補正するための定数である  $f_1$ 、 $f_2$  は理想溶液では  $f_1 = f_2 = 1$  である。これを式 (5)、(6) に代入すると相互作用パラメータ  $\beta$  は  $\beta=0$  となる。また、 $\beta$  の値が負であれば、2 成分が相互作用していることを示している [89]。Table 11 において、混合溶液ではすべて負の値を示したことから Stevia-G と LTAC 相互作用が示された。

**Table 11 Surface parameters of individual and mixed Stevia-G/LTAC systems at 25°C**

$\alpha_{\text{LTAC}}$	$C_{\text{cmc}}$ (mM)	$\beta$	$X_{\text{ideal}}$	$X_{\text{expt}}$
0	8.24	0.00	0.00	0.00
0.025	0.16	-21.80	0.01	0.40
0.05	0.35	-17.34	0.02	0.39
0.2	2.00	-8.21	0.07	0.38
0.5	2.86	-6.36	0.24	0.43
0.8	8.13	-3.21	0.56	0.52
1	25.75	0.00	1.00	1.00

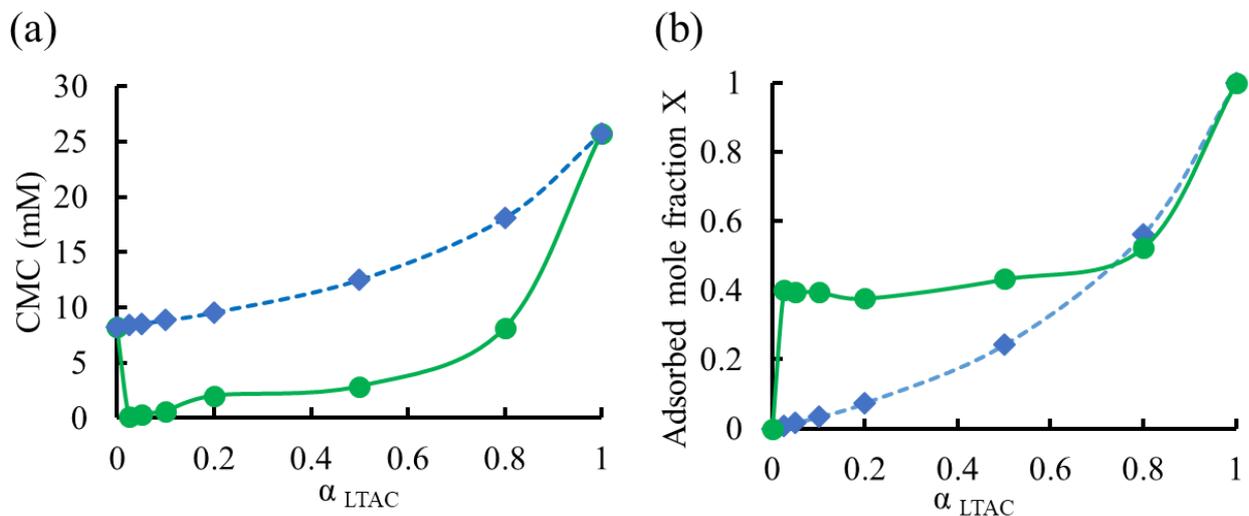
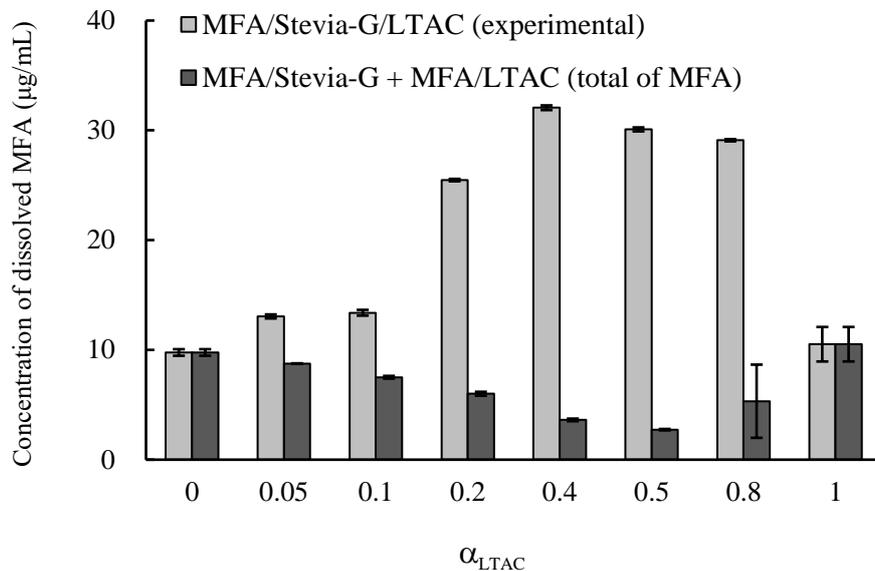


Figure 24 CMC values as a function of the mole fraction of LTAC. ●, experimental CMC data; ◆, ideal case with  $\beta = 0$  (a). Dependence of the mixed adsorbed initial mole fraction of LTAC mole fraction of stevia-G/LTAC mixed system at 25°C (b).

### 3.3.3 Stevia-G と LTAC の混合ミセル形成による MFA 溶解度の変化

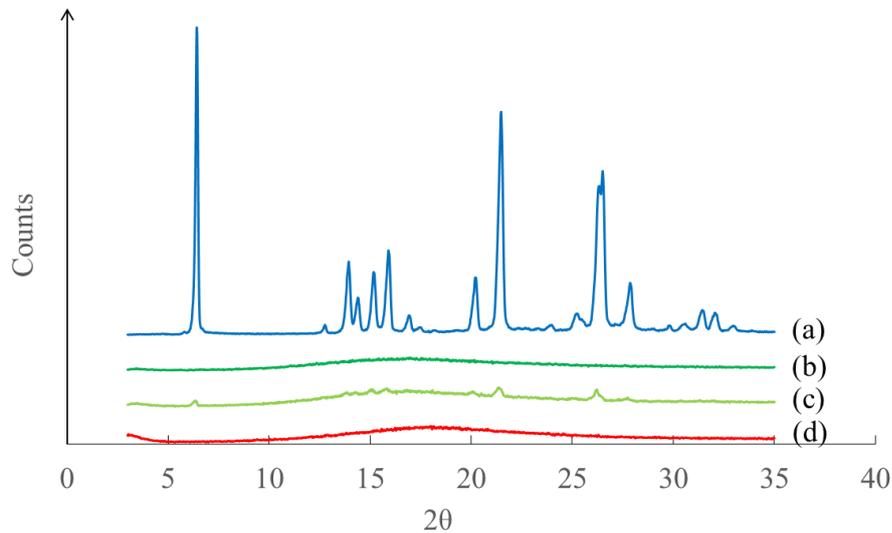
各 LTAC モル分率における MFA の溶解度を測定した。Stevia-G と LTAC をそれぞれ加えた際の MFA 溶解度を測定し、合計の MFA 溶解度 (MFA/Stevia-G + MFA/LTAC) と Stevia-G と LTAC の両方を加えた場合の MFA 溶解度を Figure 25 に示す。Stevia-G と LTAC をそれぞれ MFA に加えた場合と比較して、Stevia-G と LTAC を共存させた条件の方が効果的に MFA の溶解度を向上させた。特に、MFA 溶解度が最も向上したのは LTAC のモル分率が 0.4 のときであった。Figure 24 (b) で示した結果から、Stevia-G と LTAC の混合ミセル構成比は LTAC モル分率が 0.4 であることが示唆され、溶解度が最も向上した添加比率と一致した。つまり、混合ミセルの構成比率で Stevia-G と LTAC を添加することで、いずれの成分も過剰になることなく、MFA を可溶化できたためであると考えられる。



**Figure 25** Difference in concentration of dissolved MFA between ternary system (MFA/stevia-G/LTAC) and the sum of binary system (MFA/stevia-G + MFA/LTAC) as a function of the mole fraction of LTAC ( $n=3$ ).

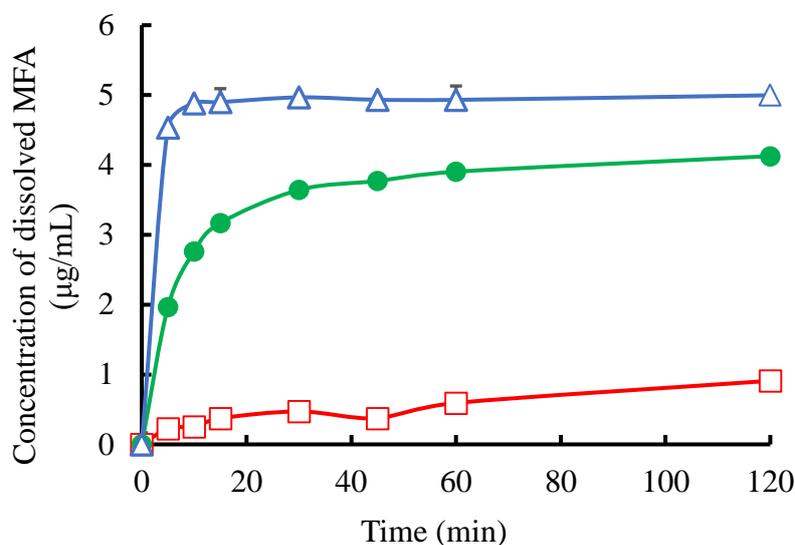
### 3.3.4 Stevia-G/LTAC 混合ミセルの MFA 噴霧乾燥粒子への適用

粉末 X 線回折測定を用いて MFA 原末、Stevia-G 原末、MFA/Stevia-G/LTAC (1/10/1) の物理混合物および噴霧乾燥粒子の結晶性を評価した (Figure 26)。MFA 原末の 6.42°、21.5°、26.5° 付近にみられるピークは MFA の結晶に由来する特徴的なピークである。一方、Stevia-G はハローパターンを示し、非晶質であった。また物理混合物において、MFA 結晶に由来する小さなピークが確認されたが、噴霧乾燥粒子は MFA 結晶由来のピークを示さず、X-ray amorphous の状態を示すことが推察された。



**Figure 26 Powder X-ray diffraction patterns of (a) untreated MFA, (b) stevia-G powder, (c) physical mixture of MFA/stevia-G/LTAC [1:10:1 (wt/wt/wt)], and (d) SDP of MFA/stevia-G/LTAC [1:10:1 (wt/wt/wt)].**

Figure 27 に MFA 原末、MFA/Stevia-G/LTAC (1/10/1)物理混合物および MFA/Stevia-G/LTAC (1/10/1)噴霧乾燥粒子の溶出試験結果を示す。溶出試験の結果、MFA 原末の溶解度は 120 分で約 0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。一方、120 分後における物理混合物から溶出した MFA 濃度は 4.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、3 成分による MFA 溶解度の改善が確認された。さらに、噴霧乾燥粒子は、速やかに溶出し、120 分後には 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の溶出量を示し、MFA 原末の約 6 倍であった。本試験での噴霧乾燥粒子の溶解速度の向上は MFA を噴霧乾燥粒子とすることで非晶質化したことに起因すると考えられる。噴霧乾燥粒子の MFA 溶解度の向上は Stevia-G と LTAC による可溶化効果が要因として考えられる。



**Figure 27** Dissolution profile of MFA in water at 37°C. □, untreated MFA; ●, physical mixture of MFA/stevia-G/LTAC [1:10:1 (w/w/w)]; △, SDPs of MFA/stevia-G/LTAC [1:10:1 (w/w/w)]; ( $n=3$ ).

### 3.4 結論

4種類の界面活性剤において、MFAを用いた溶解度測定により、Stevia-GとMFAとの3成分にした際に最も顕著に溶解性が向上したのはLTACであった。また、Rubinghモデルを用いてLTACとStevia-Gの相互作用による混合ミセル形成を明らかにした。さらに、混合ミセル中のLTACモル分率を算出することで、Stevia-Gと界面活性剤が過不足なく添加できる最適モル比を算出したところ、Stevia-G : LTACが3:2であった。この比を利用し処方設計することでMFAの溶解性を向上することができた。したがって、Stevia-G溶液への界面活性剤の添加は、難溶性化合物の溶解度および溶出挙動を改善することが示唆され、今後の難溶性薬物の製剤開発への応用が期待される。

## 総括

本研究では、機能性食品添加剤である糖転移化合物の会合体形成能を利用し、難溶性モデル化合物である、Quercetin、Ipriflavone、Mefenamic acid (MFA)の溶解性改善に関する研究の成果について述べた。

第1章では、糖転移化合物 ( $\alpha$ -glucosyl hesperidin (Hsp-G)、 $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G)、 $\alpha$ -glucosyl stevia (Stevia-G))の種類間での難溶性化合物への溶解性改善効果の違いを評価した。フラボノイド化合物の一種である Quercetin を難溶性モデル化合物として使用し、溶解性改善効果を検討した。その結果、Rutin-G を用いた際に最も溶解度が向上していた。Quercetin 原末の水への溶解度が  $2.7 \mu\text{g/mL}$  であるのに対し、Rutin-G を用いて調製した噴霧乾燥粒子は溶解度が約  $1500 \mu\text{g/mL}$  であり、原末の 500 倍以上の溶解度を示した。Rutin-G と Quercetin は水中で疎水性相互作用によってナノ複合体を形成すると考えられる。Rutin-G を添加した場合に、最も高い Quercetin 溶解度を示したのは、Rutin-G のアグリコンが Quercetin と同じ構造であり、これが複合体形成における安定性を向上させたことに起因していると推測された。また、Rutin-G を用いて Quercetin 溶解度を増大させた結果、Quercetin の抗酸化作用も増強された。

第2章では、糖転移化合物による難溶性フラボノイド化合物である Ipriflavone への溶解性改善効果が吸収性に与える影響を検討した。3種の糖転移化合物 (Hsp-G、Rutin-G、Stevia-G)を用いて、Ipriflavone の噴霧乾燥粒子を調製し、溶解度を測定した。その結果、Rutin-G を使用した場合に、最も高い Ipriflavone の溶解性改善効果が得られた。Rutin-G を用いて調製した Ipriflavone の噴霧乾燥粒子と Ipriflavone 原末をラットに投与し経口吸収性を評価したところ、噴霧乾燥粒子は原末と比較して約 5 倍の吸収性改善を示した。以上の結果から、Rutin-G が形成する分子集合体に可溶化された Ipriflavone は消化管内で放出され、吸収性の改善に寄与することが明らかとなった。

第3章では、添加剤として糖転移化合物の一種である Stevia-G と 4 種類のイオン性界面活性剤を用いて、難溶性化合物である MFA の溶解性改善効果を検討した。Stevia-G と MFA との 3 成分にした際に最も顕著に溶解性が向上した界面活性剤は Lauryltrimethylammonium chloride (LTAC)であり、MFA 原末の約 50 倍の溶解度を示した。Rubingh モデルを用いて LTAC と Stevia-G の間の相互作用を評価したところ、LTAC と Stevia-G が水溶液中で混合ミセルを形成することが明らかとなった。さらに、混合ミセル中の LTAC モル分率を算出することで、Stevia-G と LTAC が過不足なく相互作用できるモル比率を算出した

ところ、Stevia-G:LTAC が 3:2 であった。LTAC と Stevia-G を用いて MFA の噴霧乾燥粒子を調製し、パドル法により溶出性を評価したところ、溶解速度および溶解度ともに MFA 原末と比較して顕著に改善された。

近年、セルフメディケーションが推進される中、機能性食品に関する研究は今後ますます発展することが予想される。本研究で用いた Rutin-G は難溶性を示すフラボノイド類の溶解性改善において、優れた機能性を示した。さらに、溶出性の向上だけでなく、吸収性が改善された製剤を調製することに成功した。また、本研究で得られた知見の一つに、糖転移化合物とフラボノイド化合物間での構造類似性が挙げられる。第 1 章・第 2 章において、Rutin-G は構造が類似しているフラボノイド化合物に対し、高い溶解性改善効果を示した。今後は Rutin-G だけでなく、アグリコンがフラバノン構造である Hsp-G とフラバノン構造をもつ難溶性化合物の溶解性改善効果を検討していくことで、糖転移化合物の溶解性改善基剤としての有用性を更に拡大できると考えられる。また、糖転移化合物である Stevia-G とイオン性界面活性剤の混合ミセル形成のメカニズムを明らかにし、その結果をもとに最適な処方を出算することに成功した。製品化に必要な溶解性改善効果を得るためには、難溶性化合物に対して十分量の Stevia-G が必要となる場合があるが、その場合に最適な比率でイオン性界面活性剤を添加し、より少ない添加量で溶解性を向上させることが可能である。以上の成果から、本研究で得られた知見を応用することで、糖転移化合物のフラボノイド化合物を含む難溶性化合物の製剤開発への応用が期待できる。

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪薬科大学製剤設計学研究室 戸塚裕一教授に深甚なる謝意を表します。終始有益な御指導、御助言と御協力を賜りました大阪薬科大学製剤設計学研究室門田和紀准教授と内山博雅助教に深甚なる謝意を表します。

また、入学当初からお世話になりました田中麗子元教授に心より感謝いたします。

本論文の作成に当たり、主査・副査として多くの御助言をいただきました永井純也教授、中村任教授に深く感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、援助していただきました、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] 中尾祐輔, 機能性表示食品制度について, *ファルマシア* 51, 688-690 (2015)
- [2] 小田嶋文彦, 機能性表示食品制度の意義と課題, *ファルマシア* 52, 515-519 (2016)
- [3] 消費者庁: 機能性表示食品の届出等に関するガイドライン (2015)
- [4] 山田 和彦, 田中 弘之, 石見 佳子, 梅垣 敬三, 井出 留美, 保健機能食品の課題と展望, *日本栄養・食糧学会誌*, 70, 91-99 (2017)
- [5] 原田勝寿, 食品中の機能性成分解析, *分析化学*, 65, 309-319 (2016)
- [6] P. Knekt, J. Kumpulainen, R. Järvinen, H. Rissanen, M. Heliövaara, A. Reunanen, T. Hakulinen, A. Aromaa, Flavonoid intake and risk of chronic diseases, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 560-568 (2002)
- [7] Y. Chu, C. Chang, H. Hsu, Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 561-566 (2000)
- [8] M. Kfoury, A. L. H. Sahraoui, N. Bourdon, F. Laruelle, J. Fontaine, L. Auezova, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Solubility photostability and antifungal activity of phenylpropanoids encapsulated in cyclodextrins, *Food Chemistry*, 196, 518-525 (2016)
- [9] B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, D. Julian, M. Clements, Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D<sub>3</sub> bioaccessibility, *Food Chemistry*, 187, 499-506 (2015)
- [10] M. Esmaili, S. M. Ghaffari, Z. Moosavi-Movahedi, M. S. Atri, A. Sharifzadeh, M. Farhadi, R. Yousefi, J. Chobert, T. Haertlé, A. A. Moosavi-Movahedi, Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application, *LWT - Food Science and Technology*, 44, 10, 2166-2172 (2011)
- [11] C. Samperio, R. Boyer, W. N. Eigel III, K. W. Holland, J. S. McKinney, S. F. O'Keefe, R. Smith, J. E. Marcy, Enhancement of Plant Essential Oils' Aqueous Solubility and Stability Using Alpha and Beta Cyclodextrin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12950-12956 (2010)
- [12] N. Recharla, M. Riaz, Sanghoon Ko, S. Park, Novel technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review, *Journal of Functional Foods*, 39, 63-73 (2017)
- [13] M. Kfoury, C. Geagea, S. Ruellan, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Effect of cyclodextrin and

- cosolvent on the solubility and antioxidant activity of caffeic acid, *Food Chemistry*, 278, 163-169, (2019)
- [14] C. Lucas-Abella'n, I. Fortea, J. Manuel L. Nicola's, E. Nunez Delicado, Cyclodextrins as resveratrol carrier system, *Food Chemistry*, 104, 39-44 (2007)
- [15] W. L. Chiou, S. Chen, N. Athanikar, Enhancement of dissolution rates of poorly water-soluble drugs by crystallization in aqueous surfactant solutions: sulfathiazole, prednisone, and chloramphenicol, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, 1702-1704, (1976)
- [16] C. Brough, R.O. Williams III, Amorphous solid dispersions and nano-crystal technologies for poorly water-soluble drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 453, 157-166 (2013)
- [17] P.N. Balani, S.Y. Wong, W.K. Ng, E. Widjaja, R.B.H. Tanb, S.Y. Chan, Influence of polymer content on stabilizing milled amorphous salbutamol sulphate, *International Journal of Pharmaceutics*, 391, 125-136 (2010)
- [18] K. Vithani, A. Hawley, V. Jannin, C. Pouton, B. J. Boyd, Solubilisation behaviour of poorly water-soluble drugs during digestion of solid SMEDDS, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 130, 236-246 (2018)
- [19] Y. Xu, Q. Wang, Y. Feng, C. K. Firempong, Y. Zhu, E. Omari-Siaw, Y. Zheng, Z. Pu, X. Xu, J. Yu, Enhanced oral bioavailability of [6]-Gingerol-SMEDDS: Preparation, in vitro and in vivo evaluation, *Journal of Functional Foods*, 27, 703-710 (2016)
- [20] E. C. Gómeza, S. A. Igeaa, J. Luis, G. Amozaa, F. J. Otero Espinar, Evaluation of the promoting effect of soluble cyclodextrins in drug nail penetration, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 117, 270-278 (2018)
- [21] M. Kfoury, C. Geagea, S. Ruellan, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, Effect of cyclodextrin and cosolvent on the solubility and antioxidant activity of caffeic acid, *Food Chemistry*, 278, 163-169, (2019)
- [22] C. Dahlberg, A. Millqvist-Fureby, M. Schuleitc, I. Furó, Relationships between solid dispersion preparation process, particle size and drug releasedan NMR and NMR microimaging study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76 (2), 311-319 (2010)
- [23] H. Ueda, S. Aikawa, Y. Kashima, J. Kikuchi, Y. Ida, T. Tanino, K. Kadota, Y. Tozuka, Anti-plasticizing effect of amorphous indomethacin induced by specific intermolecular interactions with PVA copolymer, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103 (9), 2829-2838, (2014)
- [24] Yang M, Wang P, Huang CY, Ku MS, Liu H, Gogos C. Min Yang, Peng Wang, Chien-Yueh

- Huangc, M. Sherry Ku, Huiju Liu, Costas Gogosa, *International Journal of Pharmaceutics*, 395 (1-2), 53-61 (2010)
- [25] F. Cilurzo, P. Minghetti, A. Casiraghi, L. Montanari, Characterization of nifedipine solid dispersions, *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 313-317 (2002)
- [26] F. Qian, J. Wang, R. Hartley, J. Tao, R. Haddadin, N. Mathias, M. Hussain, Solution Behavior of PVP-VA and HPMC-AS-Based Amorphous Solid Dispersions and Their Bioavailability Implications, *Pharmaceutical Research*, 29, 10, 2766-2776 (2012)
- [27] M. Kim, J. Kim, W. Cho, H. Parkb, S. Hwang, Oral absorption of atorvastatin solid dispersion based on cellulose or pyrrolidone derivative polymers, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 138-142 (2013)
- [28] I. Ghosh, J. Snyder, R. Vippagunta, M. Alvine, R. Vakil, W. T. Tong, S. Vippagunta, Comparison of HPMC based polymers performance as carriers for manufacture of solid dispersions using the melt extruder, *International Journal of Pharmaceutics*, 419, 12-19 (2011)
- [29] K. Six, H. Berghmans, C. Leuner, J. Dressman, K. Van Werde Jules Mullens, Luc Benoist, M. Thimon, L. M. Geert, V. Jef, P. Marcus, B. G. Van den Mooter, Characterization of Solid Dispersions of Itraconazole and Hydroxypropylmethylcellulose Prepared by Melt Extrusion, Part II, *Pharmaceutical Research*, 20, 7, 1047-1054 (2003)
- [30] K. Ueda, K. Higashi, W. Limwikrant, S. Sekine, T. Horie, K. Yamamoto, K. Moribe, Mechanistic Differences in Permeation Behavior of Supersaturated and Solubilized Solutions of Carbamazepine Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Measurements, *Molecular Pharmaceutics*, 9, 3023-3033 (2012)
- [31] S. D. Mithani, V. Bakatselou, C. N. Ten Hoor, J. B. Dressman, Estimation of the Increase in Solubility of Drugs as a Function of Bile Salt Concentration, *Pharmaceutical Research*, 13, 163-167 (1996)
- [32] V. P. Shah, J. J. Konecny, R. L. Everett, B. M. Cullough, A. C. Noorizadeh, Jerome P. Skelly, In Vitro Dissolution Profile of Water-Insoluble Drug Dosage Forms in the Presence of Surfactants, *Pharmaceutical Research*, 6, 612-618 (1989)
- [33] J. Brouwers, M. E. Brewster, P. Augustijns, Supersaturating Drug Delivery Systems: The Answer to Solubility-Limited Oral Bioavailability, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, (2009)
- [34] Hammad MA, Muller BW. Solubility and stability of tetrazepam in mixed micelles. *European*

Journal of Pharmaceutical Sciences, 7, 49-55 (1998)

- [35] C. Rupp, H. Steckel, B. W. Müller, Solubilization of poorly water-soluble drugs by mixed micelles based on hydrogenated phosphatidylcholine. *International Journal of Pharmaceutics*, 395, 272-280 (2010)
- [36] G. Wang, J. Wang, F. Li, S. Tony To, Development and evaluation of a novel drug delivery: pluronics/SDS mixed micelle loaded with myricetin in vitro and in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 1535-1543 (2016)
- [37] M. T. Garcia, I Ribosa, Sanchez J, Comelles F. Monomer-micelle equilibrium in the diffusion of surfactants in binary systems through collagen films., *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 25-29 (1992)
- [38] M. Jan, A. Ahmad, D. Ghulam, M. Rather, Effect of sodium butanoate and sodium hexanoate on micelle formation of model cationic-nonionic and anionic-nonionic surfactant mixtures., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 335, 114-120 (2009)
- [39] M. Yamada, F. Tanabe, N. Arai, H. Mitsuzumi, Y. Miwa, M. Kubota, H. Chaen M. Kibata, Bioavailability of Glucosyl Hesperidin in Rats, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70 (6), 1386-1394 (2006)
- [40] T. Ohara, K. Muroyama, Y. Yamamoto S. Murosaki, Oral intake of a combination of glucosyl hesperidin and caffeine elicits an antiobesity effect in healthy, moderately obese subjects: a randomized double-blind placebo-controlled trial, *Nutrition Journal*, 15, 6 (2016)
- [41] H. Uchiyama, Y. Tozuka, M. Imono, H. Takeuchi, Transglycosylated stevia and hesperidin as pharmaceutical excipients: dramatic improvement in drug dissolution and bioavailability, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76, 238-244, (2010)
- [42] F. Wang, X. Xiao, Y. Yuan, J. Liu, Y. Liu, X. Yi, Solubilization of phloretin via steviol glycoside-based solid dispersion and micelles, *Food Chemistry*, 308, 125569 (2020)
- [43] H. Uchiyama, Y. Tozuka, M. Nishikawa, H. Takeuchi, Nanocomposite formation between alpha-glucosyl stevia and surfactant improves the dissolution profile of poorly water-soluble drug, *International Journal of Pharmaceutics*, 428, 183-186 (2012)
- [44] S. Javadian, H. Gharibi, Z. Bromand, B. Sohrabi, Electrolyte effect on mixed micelle and interfacial properties of binary mixtures of cationic and nonionic surfactants, *Journal of Colloid and Interface Science*, 318, 449-456 (2008)
- [45] K. Mian, S. Mohamed, Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin)

- Content of Edible Tropical Plants, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 3106-3112 (2001)
- [46] T.P. Tim Cushnie, Andrew J. Lamb, Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356 (2005)
- [47] J. V. Formica, W.R. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 1061-1080 (1995)
- [48] A. Ghosh, A.K. Mandal, S. Sarkar, S. Panda, N. Das, Nanoencapsulation of quercetin enhances its dietary efficacy in combating arsenic-induced oxidative damage in liver and brain of rats. *Life Science*, 84, 75-80 (2009)
- [49] K. Srinivas, J. W. King, L. R. Howard, J. K. Monrad, Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water, *Journal of Food Engineering*, 100, 208-218 (2010)
- [50] M.M. Chan, D. Fong, K.J. Soprano, W.F. Holmes, H. Heverling, Inhibition of growth and sensitization to cisplatin-mediated killing of ovarian cancer cells by polyphenolic chemopreventive agents. *Journal of Cellular Physiology*, 194, 63-70 (2003)
- [51] Khaled, K.A., El-Sayed, Y.M., Al-Hadiya, B.M., Disposition of flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29, 397-403 (2003)
- [52] G. L. Liu, G. Wang, X. Liu, F. Xu, Y. Ma J., Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 404, 231-237 (2011)
- [53] Y. Tozuka, M. Imono, H. Uchiyama, H. Takeuchi, A novel application of alphasglucosyl hesperidin for nanoparticle formation of active pharmaceutical ingredients by dry grinding, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79, 559-565 (2011)
- [54] Y. Tozuka, M. Imono, H. Uchiyama, H. Takeuchi, Dry powder formulation with  $\alpha$ -glucosyl transferase-treated stevia for the effective absorption of hydrophobic bioactive compounds in crude drugs. *Powder Technology*, 551 (1-2), 103-110 (2013).
- [55] C. Jullian, L. Moyano, C. Yanez, C. Olea-Azar, Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A*, 67, 230-234 (2007)
- [56] R. Vehring, *Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying*, Pharmaceutical Research,

Vol. 25, 999-1022 (2008)

- [57] A. C. F. Rumondor, I. Ivanisevic, S. Bates, D. E. Alonzo, L. S. Taylor, Evaluation of Drug-Polymer Miscibility in Amorphous Solid Dispersion Systems, *Pharmaceutical Research*, Vol. 26, 11, 2523-2534 (2009)
- [58] P. Varlashkin, Approaches to Quantification of Amorphous Content in Crystalline Drug Substance by Powder X-ray Diffraction, *American Pharmaceutical Review*, 14, 1, (2011)
- [59] J. Zhang, K. Higashi, K. Ueda, K. Kadota, Y. Tozuka, W. Limwikrant, K. Yamamoto, K. Moribe, Drug solubilization mechanism of alpha-glucosyl stevia by NMR spectroscopy, *International Journal of Pharmaceutics*, 465, 255-261 (2014)
- [60] Y. Tozuka, M. Imono, H. Uchiyama, H. Takeuchi, Dry powder formulation with  $\alpha$ -glucosyl transferase-treated stevia for the effective absorption of hydrophobic bioactive compounds in crude drugs. *Powder Technology*, 551, 103-110 (2013).
- [61] H. Uchiyama, Y. Tozuka, F. Asamoto, H. Takeuchi,  $\alpha$ -Glucosyl hesperidin induced an improvement in the bioavailability of pranlukast hemihydrate using high-pressure homogenization, *International Journal of Pharmaceutics*, 410, 114-117, (2011)
- [62] H. Uchiyama, Y. Tozuka, M. Imono, H. Takeuchi, Improvement of dissolution and absorption properties of poorly water-soluble drug by preparing spray-dried powders with  $\alpha$ -glucosyl hesperidin, *International Journal of Pharmaceutics*, 392, 101-106 (2010)
- [63] Y. Tozuka, K. Higashi, T. Morita, M. Nishikawa, H. Uchiyama, J. Zhang, K. Moribe, K. Nishikawa, H. Takeuchi, K. Yamamoto, Transglycosylated rutin specific non-surface-active nanostructure affects absorption enhancement of flurbiprofen, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82, 120-126 (2012)
- [64] M. Kakran, N. G. Sahoo, L. Li, Dissolution enhancement of quercetin through nanofabrication, complexation, and solid dispersion, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88, 121-130 (2011)
- [65] T. Loftsson, M. Másson, M. E. Brewster, Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 5, 1091-1099 (2004)
- [66] Y. Liu, L. Wang, Y. Zhao, M. He, X. Zhang, Mengmeng Niu, Nianping Feng, Nanostructured lipid carriers versus microemulsions for delivery of the poorly water-soluble drug luteolin, *International Journal of Pharmaceutics*, 476, 169-177 (2014)
- [67] S. Tommasini, D. Raneri, R. Ficarra, M. L. Calabrò, R. Stancanelli, P. Ficarra, Improvement in

- solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with effect  $\beta$ -cyclodextrin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 379-387 (2004)
- [68] B. Liu, W. Li, J. Zhao, Y. Liu, X. Zhu, G. Liang, Physicochemical characterisation of the supramolecular structure of luteolin/cyclodextrin inclusion complex, *Food Chemistry*, 141, 900-906 (2013)
- [69] K. Sugano, A. Okazaki, S. Sugimoto, S. Tavornvipas, A. Omura, T. Mano, Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 22 (4), 225-254. (2007)
- [70] A. W. Khan, S. Kotta, S. H. Ansari, R. K. Sharma, J. Ali, Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of the poorly water-soluble grapefruit flavonoid Naringenin: design, characterization, in vitro and in vivo evaluation, *Drug Delivery*, 22(4), 552-561 (2015)
- [71] F. I. Kanaze, E. Kokkalou, I. Niopas, M. Georgarakis, A. Stergiou, D. Bikiaris, Dissolution Enhancement of Flavonoids by Solid Dispersion in PVP and PEG Matrixes: A Comparative Study, *Journal of Applied Polymer Science*, 102, 460-471 (2006)
- [72] J. P. Gleeson, S. M. Ryan, D. J. Brayden, Oral delivery strategies for nutraceuticals: Delivery vehicles and absorption enhancers, *Trends in Food Science & Technology*, 53, 90-101 (2016)
- [73] H. J. Chung, Y. H. Choi, S. H. Kim, M. G. Lee, Effects of enzyme inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous ipriflavone in rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58, 449-457 (2006)
- [74] S. Kim, M. G. Lee, Pharmacokinetics of ipriflavone, an isoflavone derivative, after intravenous and oral administration to rats Hepatic and intestinal first-pass effects, *Life Sciences*, 70, 1299-1315 (2002)
- [75] D. N. Rubingh, Mixed micelle solutions, *Solution Chemistry of Surfactants*, 1, 337-354 (1979)
- [76] J. H. Clint, Micellization of mixed nonionic surface active agents, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 71, 1327-1334 (1975)
- [77] G. Dollo, P. Le, C. Alexis, G. François, C. Jean, L. Burgot, R. Leverage, Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19, 273-280 (2003)
- [78] M. Bakshi, S. Sachar, N. Mahajan, I. Kaur, G. Kaur, N. Singh, P. Sehgal, H. Doe, Mixed-micelle formation by strongly interacting surfactant binary mixtures: effect of head-group modification,

Colloid and Polymer Science, 280, 990-1000 (2002)

- [79] H. Furuya, Y. Moroi, G. Sugihara, Micelle formation of binary mixtures of dodecylammonium perfluoro carboxylates, *Langmuir*, 11, 774-778 (1995)
- [80] K. Motomura, M. Yamanaka, M. Aratono, Thermodynamic consideration of the mixed micelle of surfactants, *Colloid and Polymer Science*, 262 (12), 948-955 (1984)
- [81] H. Matsubara, A. Ohta, M. Kameda, N. Ikeda, M. Aratono, Interaction between ionic and nonionic surfactants in the adsorbed film and micelle. 3. Sodium dodecyl sulfate and tetraethylene glycol mono-octyl ether, *Langmuir*, 17, 7752-7757 (2001)
- [82] A. Lainez, P. d. Burgo, E. Junquera, E. Aicart, Mixed Micelles Formed by n-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside and Tetradecyltrimethylammonium Bromide in Aqueous Media, *Langmuir*, 20 (14), 5745-5752 (2004)
- [83] MA, Hammad, BW. Muller, Solubility and stability of tetrazepam in mixed micelles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 49-55 (1998)
- [84] G. Basu Ray, I. Chakraborty, S. Ghosh, Self-aggregation of alkyltrimethylammonium bromides (C10-, C12-, C14-, and C16TAB) and their binary mixtures in aqueous medium: a critical and comprehensive assessment of interfacial behavior and bulk properties with reference to two types of micelle formation, *Langmuir*, 21, 10958-10967 (2005)
- [85] E. Rodenas, M. Valiente, M. Villafruela, Different Theoretical Approaches for the Study of the Mixed Tetraethylene Glycol Mono-n-dodecyl Ether/Hexadecyltrimethylammonium Bromide Micelles, *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 4549-4554 (1999)
- [86] R. Kakehashi, M. Shizuma, S. Yamamura, T. Takeda, Mixed micelles containing sodium oleate: the effect of the chain length and the polar head group, *Journal of Colloid and Interface Science*, 279, 253-258 (2004)
- [87] H. Matsubara, S. Muroi, M. Kameda, Interaction between ionic and nonionic surfactants in the adsorbed film and micelle. 3. Sodium dodecyl sulfate and tetraethylene glycol mono-octyl ether., *Langmuir*, 17, 7752-7757 (2001)
- [88] R. Kakehashi, M. Shizuma, S. Yamamura, T. Takeda, Mixed micelles containing sodium oleate: the effect of the chain length and the polar head group, *Journal of Colloid and Interface Science*, 279, 253-258 (2004)
- [89] N. A. Negma, M. R. Mishrif, D. E. Mohamed, Vanillin based cationic surfactants mixed systems:

Micellization and interfacial interaction behaviors in presence of nonionic conventional surfactant, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480, 122-129 (2015)

## 論文目録

1. M. Fujimori, K. Kadota, K. Shimono, Y. Shirakawa, H. Sato, Y. Tozuka, Enhanced dissolution of quercetin by forming composite particles with transglycosylated materials, *Journal of Food Engineering*, 149, 248-254 (2015)
2. M. Fujimori, K. Kadota, K. Kato, Y. Seto, S. Onoue, H. Sato, H. Ueda, Y. Tozuka, Low hygroscopic spray-dried powders with trans-glycosylated food additives for enhanced solubility and oral bioavailability of an ipriflavone, *Food Chemistry*, 190, 1050-1055 (2016)
3. M. Fujimori, K. Kadota, Y. Tozuka, Mixed micelle system following interaction between transglycosylated stevia and ionic surfactant improves dissolution profile of mefenamic acid, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 1117-1123 (2017).

## 主査・副査

主査 永井 純也 教授 (大阪薬科大学 薬剤学研究室)  
副査 中村 任 教授 (大阪薬科大学 臨床薬学教育研究センター)  
副査 戸塚 裕一 教授 (大阪薬科大学 製剤設計学研究室)