

各種シクロデキストリン包接によるピペリンの
溶解性・腸管収縮応答性に関する特性変更
のための基礎的研究

恵沢 敏成

目次

略語一覧	4
緒言	5
第1章 混合粉碎法および共沈法による PP/CDs 包接複合体の物理化学的特性	10
第1節 溶解度相図を用いた PP/CD 包接化合物の安定度定数の算出	11
第2節 混合粉碎法による PP/CDs 包接複合体作成および包接化合物の確認	14
2-1 PP/CD 包接複合体における結晶状態の評価	14
2-2 PP/CD 包接複合体における熱的性質の評価	17
2-3 Raman 測定による PP/CD 包接複合体の分子状態の検討	19
2-4 走査型電子顕微鏡による固体表面の観察	22
2-5 PP/CD 包接複合体からの PP の溶出性評価	24
2-6 2次元 NMR を用いた溶液状態における PP/CD 混合粉碎物から生じた包接化合物の分子間相互作用の検討	27
2-7 PP/CD 包接複合体からの PP の溶出性と包接複合体および包接化合物の分子状態の関係に関する考察	32
2-8 固体蛍光測定を用いた PP/CD 包接複合体における PP の分子挙動評価	34
2-9 PP/CD 包接複合体における結晶状態の評価	39
2-10 PP/CD 包接複合体における近赤外線測定による分子状態の評価	43
2-11 PP との比較を目的とした PP 誘導体の合成と単結晶 X 線回折測定による結晶構造の比較	56
2-12 PP 誘導体/CD 包接複合体における結晶状態および熱的挙動の評価	64
2-13 PP 誘導体/CD 包接複合体における近赤外線測定による分子状態の評価	70
2-14 固体蛍光測定を用いた PP 誘導体/CD 包接複合体における PP 誘導体の分	

子挙動評価	77
2-15 2次元 NMR を用いた溶液状態における PP 誘導体/CD 混合粉砕物から生じた包接化合物の分子間相互作用の検討	81
小括	87
第 3 節 共沈法による PP/CDs 包接複合体作成および包接化合物の確認	90
3-1 PP/CD 包接複合体における結晶状態の評価	91
3-2 PP/CD 包接複合体における熱的性質の評価	94
3-3 PP/CD 包接複合体の NMR を用いた包接モル比の決定	96
3-4 走査型電子顕微鏡による固体表面の観察	98
3-5 Raman 測定による PP/CD 包接複合体の分子状態の評価	100
3-6 PP/CD 包接複合体からの PP の溶出性の評価	103
3-7 2次元 NMR を用いた溶液状態における PP/CD 共沈物から生じた包接化合物の分子間相互作用の検討	105
3-8 PP/CD 包接複合体からの PP の溶出性と包接複合体および包接化合物の分子状態の関係に関する考察	109
小括	110
第 4 節 PP/CDs 包接複合体を用いた生体関連媒体における溶解特性の評価	113
4-1 PP/CDs 包接複合体を用いた溶出試験第一液における PP の溶出性評価	114
4-2 PP/CD 包接複合体を用いた FaSSIF における PP の溶出性の評価	116
4-3 FaSSIF 中における PP/CD 包接化合物の溶液蛍光測定の評価	120
小括	127
第 1 章 総括	128

第 2 章 PP/CD 混合粉砕物の味覚応答性の評価	130
第 1 節 PP/CD 混合粉砕物における味覚センサー応答性	132
1-1 PP の味覚センサー応答性の評価	132
1-2 各 GM を用いた PP の味覚センサー応答性の評価	136
第 2 章 小括	142
第 3 章 PP/CD 包接複合体を用いた腸管収縮性の評価	143
第 1 節 マグヌス法による腸管収縮性の評価	144
1-1 CCh 存在下における各 PP 濃度の腸管収縮性の評価	144
1-2 CCh 存在下における CD による PP の腸管収縮性の影響	145
第 3 章 小括	153
結論	158
謝辞	161
実験の部	163
参考文献	179

略語一覧

本論文中で使用した略語について以下に記載する。

Ach	Acetylcholine アセチルコリン
CCh	Carbachol カルバコール
CD	Cyclodextrin シクロデキストリン
CP	Co-precipitate 共沈物
DMSO	Dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド
DSC	Differential scanning calorimetry 示差走査熱量
GM	Ground Mixture 混合粉碎物
NaTC	Sodium Taurocholate タウロコール酸ナトリウム
NIR	Near Infrared spectroscopy 近赤外分光法
NMR	Nuclear magnetic resonance 核磁気共鳴
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
PC1	Principal Component 1 第1主成分軸
PC2	Principal Component 2 第2主成分軸
PM	Physical mixture 物理的混合物
PP	Piperine ピペリン
PPD1	Piperine derivatives no.1 ピペリン誘導体1
PPD2	Piperine derivatives no.2 ピペリン誘導体2
PXRD	Powder X-ray diffraction 粉末X線回折
RH	Relative humidity 相対湿度
SEM	Scanning electron microscopy 走査型電子顕微鏡

緒言

胡椒は世界で最も重要で広く使用されている香辛料である¹⁾。アジア諸国やヨーロッパでは胡椒を家庭料理のほか、解熱や駆風のためとして用いられてきた。近年では、調味料開発の急速化および健康意識の高まりにより、International Pepper Communityによれば胡椒の世界の生産量は2017年から7%増加している。また、今後も毎年、世界の需要は2%、供給は8-10%増加することが予想されている²⁾。胡椒はコショウ科コショウ (*Piper nigrum*) の加工方法により黒胡椒、白胡椒、緑胡椒などに分類される。胡椒のなかでも黒胡椒は白胡椒や緑胡椒と比較して、辛味成分のピペリン (Piperine: PP) を6~9%と多く含有している。生体に対する胡椒の機能性はPPの作用によるとの報告が多くある。PPの機能性は胡椒の主要な作用を多く担っている可能性がある報告が多数存在している。例えば、高脂肪食摂取ラットの体脂肪蓄積抑制作用³⁾、クルクミンに対する消化管吸収促進作用⁴⁾、抗炎症作用⁵⁾ およびMAO阻害作用⁶⁾ などが報告されている。一方、PPは腸管収縮調節作用を有し、ムスカリン性の腸管収縮作用を示す一方、オピオイド μ 受容体活性化、 Ca^{2+} チャネル遮断作用などにより腸管収縮を弛緩させる作用も有することが報告されている⁷⁾。さらに、サイクリックAMP誘発性 Cl^- の分泌抑制、 Ca^{2+} 誘発性 Cl^- の分泌抑制による腸管弛緩作用も報告されている⁸⁾。これらの多様な腸管収縮および弛緩作用によって、PPは、投与量に依存してマウスの湿式排便排出量を変化させるとの報告もある⁷⁾。PPの投与量に対する薬理学的作用の変化や作用点については不明な点があるが、これらの作用は消化管運動障害に対するPPの薬用作用として考えられている。その腸管収縮調節作用に基づき、下剤や止瀉薬、機能性胃腸障害に対する治療としての利用が期待される大変興味深い食品成分である。

PP : (2E,4E)-1-[5-(1,3-benzodioxol-5yl)-1-oxo-2,4-pentadienyl]piperidine の化学的

な特徴として、PP はメチレンジオキシフェニル基、ペンタジエン鎖、第 3 級アミド基、ピペリジン環を有する難水溶性のアミド化合物 ($\log P_{ow} = 2.25$) である (Fig. 1-a)。PP は下痢や止瀉薬、機能性胃腸障害に対する利用価値は高いが、難水溶性であることが、治療薬などの制限となる可能性がある。また、PP はアミド基からメチレンジオキシフェニル基のエーテル酸素にかけて分子内共役を示す。PP のアミド基の立体配座は共役系に影響し、分子エネルギー変化によって溶解性が異なってくるものが推察されている⁹⁾。これらの物理化学的な特性を詳細に理解し、またそれらを変更することができれば、PP の特性である難水溶性および辛味 (味覚) をコントロールできる可能性がある。そこで、毒性が比較的少なく、食品や医薬品の難水溶性薬物の溶解性向上や味のコントロールなどに使用される機能性賦形剤としてシクロデキストリン (CD) に着目することとした。

CD は、D-グルコピラノースが α -1,4 グルコシド結合した環状多糖類である。CD はグルコースのユニット数 (6~8) に応じ α -シクロデキストリン (α CD)、 β -シクロデキストリン (β CD) および γ -シクロデキストリン (γ CD) に分類され、それぞれが包接化合物形成におけるホスト分子として幅広く用いられている (Fig. 1-b-d)。CD は環の入口付近と外側は OH 基が存在するため親水性、内側の空洞内は中心にエーテル基が位置するため相対的に疎水性を示す。CD の OH 基は、グルコース六員環の炭素 (C_2, C_3, C_6) に位置している。CD の環状構造において、 C_2 および C_3 は OH 基が隣接しているため、 C_6 と比較して構造が柔軟となり広い空洞径に、 C_6 は狭い空洞径となる。CD は疎水性相互作用などにより、種々のゲスト化合物を空洞内に封入することで、包接化合物を形成する。また、CD の空洞は種類に応じてサイズが異なり、それぞれの CD のサイズに合う大きさと形のゲスト分子が認識される。そのため、同じゲスト分子を用いた場合でも

CDの種類や調製手法によって包接様式が異なることが知られており、固体として生じた包接複合体の利用において、溶解性向上や味や匂いのマスキングなどの効果が期待されている¹⁰⁻¹⁶⁾。例えば、**coumaric acid**はCDに脂溶性部分を包接させることで、溶解性が向上する。さらに、*p*-**coumaric acid** 同士の水素結合をCDが切断すること(ハイドロトロピー効果)により、フェノール性のフリーのヒドロキシ基の抗酸化能力が向上する¹⁷⁾。包接複合体の調製法には混合粉砕法、共沈法などが存在する。混合粉砕法(GM)はメカノケミカル効果を利用する固体-固体反応により包接複合体を調製する手法である¹⁴⁾。また、共沈法(CP)は薬物とCDとの溶解度の差を利用した溶液反応により包接複合体を析出する手法である¹⁹⁾。これらの調製法の違いは、例えば、カフェ酸と各CDの複合体の形成において、調製手法によって包接様式や溶解性が異なることが報告されており²⁰⁻²¹⁾、CDの応用研究において重要な研究テーマとなり得る。

PPとCDの相互作用としては、混合粉砕法を用いたGM(PP/ β CD=1/1)の包接複合体の形成が確認されており、PPの溶解性の向上も観察されている。上述から、ペペリンの有効性の向上や応用性の拡大を志向して、PPと β CDだけでなく、PPと種々CDを異なる手法を用いて包接複合体を調製し、各種包接複合体の物理化学的特性の違いについて、PPの化学的性質の変化とCDとの包接様式について考察し、溶解性の向上、辛味(味覚)の改善につなげることは研究課題として意義がある。さらに、医薬品への応用につながる薬理作用として、腸管収縮調節作用に着目し、各種包接複合体を比較することは、実用可能なPP/CD包接複合体の選択につながる可能性がある。そこで本研究では、PPが各CDとの包接複合体の形成によりその物理化学的性質においてどのように変化し、PPの溶解性、腸管収縮作用を医薬品として実用に供するように改善することが可能かについて評価した。

第1章では、まずPPの溶解性に対する包接化法の影響として、GMおよびCPにより調製したCD包接体の溶解度を検討した。次に調製した物質の結晶性、熱的挙動、分子間相互作用を評価して、固体の包接複合体形成とその状態の確認を行った。さらに、包接複合体から生じた包接化合物について、溶解性や溶液中の状態を確認した。第2章は、PPの辛味が治療薬などの制限となる可能性があるため、味覚応答性の客観的評価として、味覚センサーを用いてPP単独およびCD包接複合体の応答性について確認した。第3章では、PPの腸管収縮調節作用が下剤や止瀉薬、機能性胃腸障害に対する治療としての利用が期待されているため、CDによってPPの薬理的な作用にどのような変化が生じるかを確認することとした。これらの情報に基づき、CDを用いることでPPの溶解性・腸管収縮応答性を適切に改善可能であるかを評価し、医薬品としての応用のための基礎的研究を実施した。

なお、本研究における固体状態の複合体については「包接複合体」、溶液中での複合体については「包接化合物」として区別して表わすこととする。

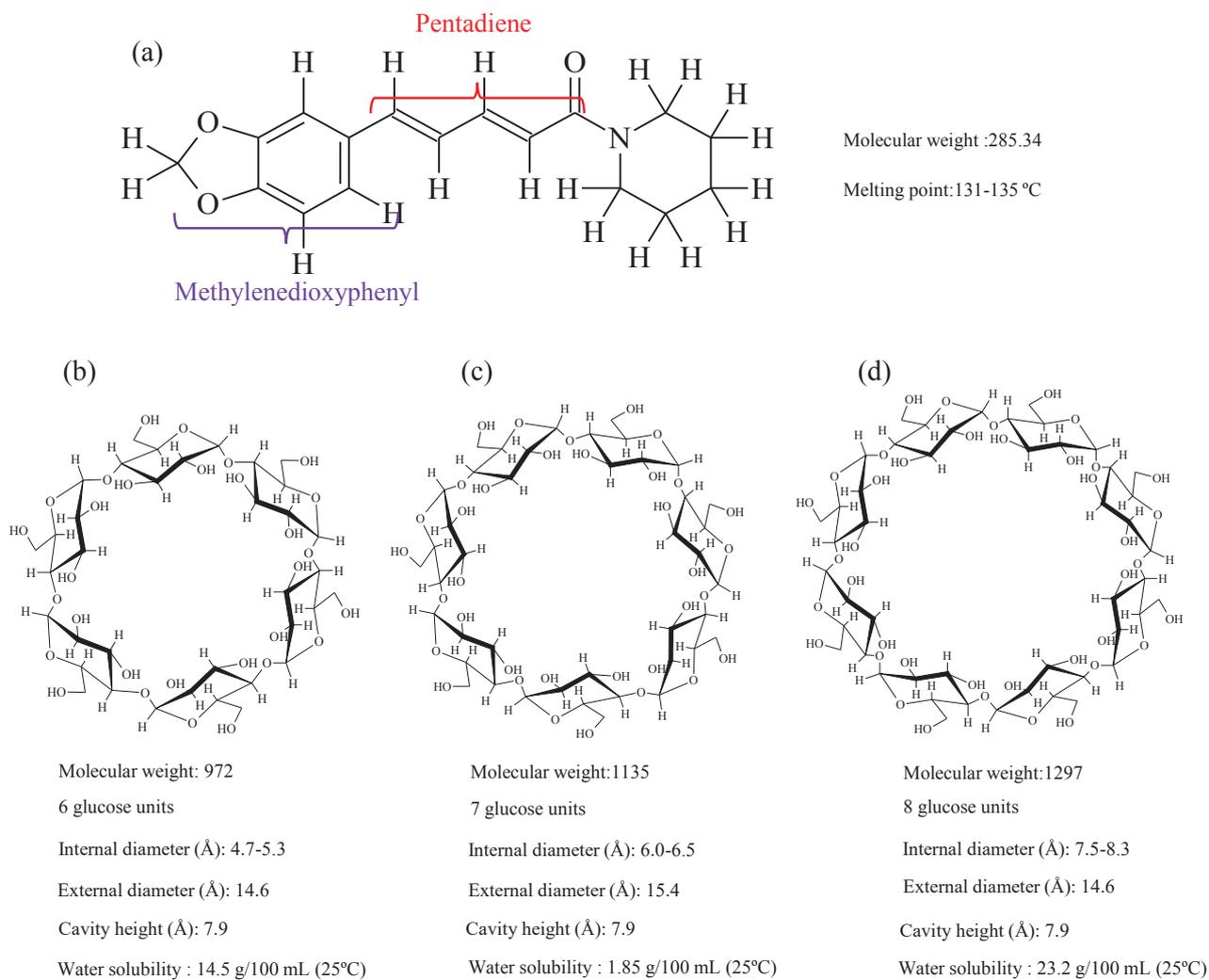


Fig. 1. Chemical structure of (a) Piperine(PP), (b) α -cyclodextrin (α CD), (c) β -cyclodextrin (β CD), (d) γ -cyclodextrin (γ CD).

第 1 章 混合粉碎法および共沈法による PP/CDs 包接複合体の物理化学的特性

ゲスト化合物は CD と包接化合物を形成し、それをを用いることで、ゲスト分子の溶解性や抗酸化力、抗菌力などに多様な影響を及ぼすことが報告されている²²⁻²³)。また、得られるゲスト分子の物理化学的性質は、形成する包接化合物の包接様式に依存するため、用いる CD の特徴および包接複合体の調製方法の選択は重要である。様々な調製法の中でも、GM はメカノケミカル効果を利用した手法であり、有機溶媒を使用せずに固体状態で簡便に調製可能な手法である。一方で CP は、薬物と CD との溶解度の差を利用した溶液反応により包接複合体を析出させる手法である。これら調製方法により得られる包接複合体は結晶性が異なり、CP で得られる結晶性は GM と比較して良い。これらの調製方法の特徴は、ゲスト分子と CD 間における相互作用の違いに影響する可能性があり、この 2 種類の異なった調製方法を用いることで、ゲスト分子と CD 間との間で、PP と各 CD を異なる包接様式を有する包接複合体および包接化合物を形成することが期待できる。

そこで、PP と種々 CD を用いて GM および CP による包接複合体形成を試みた。複数の調製手法を用いて、PP と CD との包接複合体を得ることができ、それらが異なった特徴を示せば、PP の難水溶性を改善し、溶解性を最適化可能な CD の種類と包接複合体調製法を選択することができる。さらに、薬理的視点において、PP の溶解性が向上すれば、腸管内で PP の高濃度が維持され、腸管収縮調節薬として利用拡大も期待できる。そこで本研究では、GM および CP を用いて、PP と各 CD との包接複合体を調製して、それらの特性を評価するとともに、その溶解性を評価した。

第 1 節 溶解度相図を用いた PP/CD 包接化合物の安定度定数の算出

溶液中の PP/CD 包接化合物の溶解性の変化から、安定度定数の算出および包接モル比を簡便に予想できる溶解度相図を作成した (Fig. 2)。溶解度法の結果より、純粋な PP の結晶 (PP intact) の水への溶解度 (S_0) は $2.29 \times 10^{-2} \text{ mM}$ であることが確認された。 βCD および γCD 3 mM 共存下で、PP のモル溶解度は頭打ちを示し、それぞれ 0.23 mM (10 倍)、0.04 mM (1.6 倍) の溶解性向上が確認された (Fig. 2-a)。一方で、 αCD 20 mM 共存下、PP intact と比較して 4.1 mM (179 倍) の溶解性向上が確認された (Fig. 2-b)。溶解度相図には可溶性複合体を示す A 型と難水溶性を示す B 型に分類され、A 型には A_L (liner diagram)、 A_p (positive deviation from linearity)、 A_N (negative deviation from linearity)、B 型には B_S (the complex has some but limited solubility) および B_I (the complex is insoluble) に分けられることが報告されている²⁴⁾。この溶解度法に基づく作図の結果、PP/ βCD および PP/ γCD の相図は CD の一定のモル濃度範囲まで直線性を示したが、複合体形成物質の添加量増加による包接化合物の飽和溶解度に達したことで、溶解性が低下する B_S 型の相図を示した。一方で PP/ αCD は、 αCD のモル濃度に応じて直線線の傾きから正に逸脱する A_p 型の相図を示した (Fig. 2-b)。T. Loftsson 等によれば、直線性を示す B_S 型の傾きが 1 未満の場合では、ゲスト分子と CD の包接モル比が 1/1、 A_p 型を示した場合には 1/1 および 1/2 の包接モル比が溶液状態に存在することを示す²⁴⁾。したがって、包接モル比は PP/ αCD =1/2、PP/ βCD =1/1、PP/ γCD =1/1 であることが推察された。各種 PP/CDs の安定度定数は Higuchi and Connor'式により算出した結果、PP/ αCD の $K_{1/1}=7473 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_{1/2}=47 \text{ M}^{-1}$ 、PP/ βCD の $K_{1/1}=3244 \text{ M}^{-1}$ 、 γCD の $K_{1/1}=248 \text{ M}^{-1}$ であった。安定度定数が低値の場合、ゲスト分子と CD 間の相互作用が弱く、 1000 M^{-1} を超える場合は、相互作用が強く、包接化合物は容易に解離しない²⁵⁻²⁶⁾。例えば、アダマンタン/インスリン結合体-PEG- βCD 複

合体) の安定度定数は $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ という高値を示し、血中で複合体が解離することなく、高い滞留性を示す²⁷⁾。PP/ α CD および PP/ β CD の $K_{1/1}$ は 1000 M^{-1} 以上であるため、水溶液中で比較的安定であることが示唆された。また、PP/ α CD の $K_{1/2}$ の安定度定数は PP/ β CD および PP/ γ CD の $K_{1/1}$ と比較して低値であるため、PP/ α CD はモル比 1/2 の時、1 分子の α CD は PP から解離しやすい特性を有することが示唆された。また、CD 包接化により溶解性が顕著に増大するため、CD 添加量により溶解性を調節でき、製剤化への利用が期待できる。

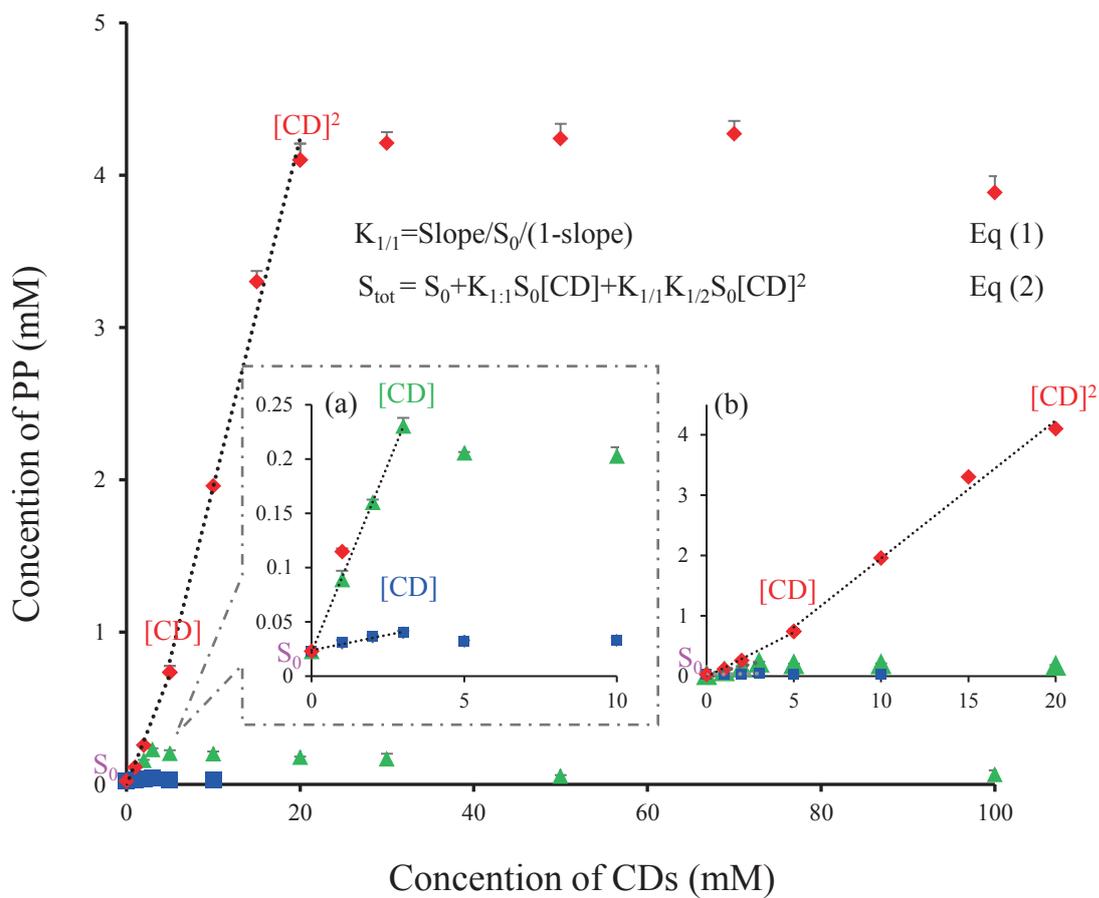


Fig. 2. Phase solubility diagrams of PP with CDs.

(a) CDs concentration is 0-2.5 mM and the PP concentration is 0-10 mM, (b) CDs concentration is 0-2.5 mM and the PP concentration is 0-20 mM.

◆: PP/αCD, ▲: PP/βCD, ■: PP/γCD

Results were expressed as mean ± S.D. (n=3)

第 2 節 混合粉砕法による PP/CDs 包接複合体作成および包接化合物の確認

2-1 PP/CD 包接複合体における結晶状態の評価

PP/CDs との GM における結晶状態の変化および固体状態における複合モル比を予想するために粉末 X 線回折 (PXRD) 測定を行った (Fig. 3)。PP intact および PP に単独粉砕の処理を行った PP ground では、 $2\theta=12.9^\circ$, 19.6° 付近に PP 由来の回折ピーク (●) が認められ、粉砕処理では PP の結晶形は変化しないことが確認された。

α CD 単独では $2\theta=11.9^\circ$, 21.6° 付近に特徴的な結晶回折ピーク (◇) が観測された。 α CD ground は機械的エネルギーにより固有の結晶配列を保てず、非晶質を示した。PM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ α CD=1/1) は $2\theta=12.6^\circ$ 付近に PP 由来の結晶回折ピークが観測された。一方で、GM (PP/ α CD=1/2) 、GM (PP/ α CD=1/3) では PP および α CD 由来の結晶回折ピークが観測されずハローパターンを示した。

γ CD 単独では $2\theta=12.6^\circ$, 18.7° 付近に γ CD 由来の回折ピーク (□) が確認された。 γ CD ground は機械的エネルギーにより固有の結晶配列を保てず、非晶質を示した。PM (PP/ γ CD=1/1) および GM (PP/ γ CD=2/1) では、PP 由来の回折ピークが $2\theta=12.6^\circ$ 、 $2\theta=12.6^\circ$, 18.7° にそれぞれ確認された。GM (PP/ γ CD=1/1) および GM (PP/ γ CD=1/2) では PP 由来の回折ピークは観測されずハローパターンを示した。

Yang LJ 等はヘスペレチンと β CD の複合体形成に結晶回折ピークの消失が寄与したことを報告している²⁶⁾。また、この結晶構造の消失は、以前に報告した GM (PP/ β CD=1/1) と同様に結晶回折ピークがハローパターンを示した²⁹⁾。結晶回折ピークがハローパターンへと変化した理由は、CD 共存下、PP の結晶化度が粉砕エネルギーにより低下し、見かけ上ハローパターンとして観測される微結晶変化または機械的エネルギーにより、PP と CD との間に相互作用が生じた

ことで、PP の結晶格子の規則性が乱れたことで、特有の結晶回折ピークを示さず、アモルファスの状態に変化した可能性がある。αCD では PP と 1/1 の比率で完全な結晶回折ピークの消失が確認されなかったことから、PP/αCD は 1/2、PP/γCD はモル比 1/1 で複合体を形成する可能性が示唆された。

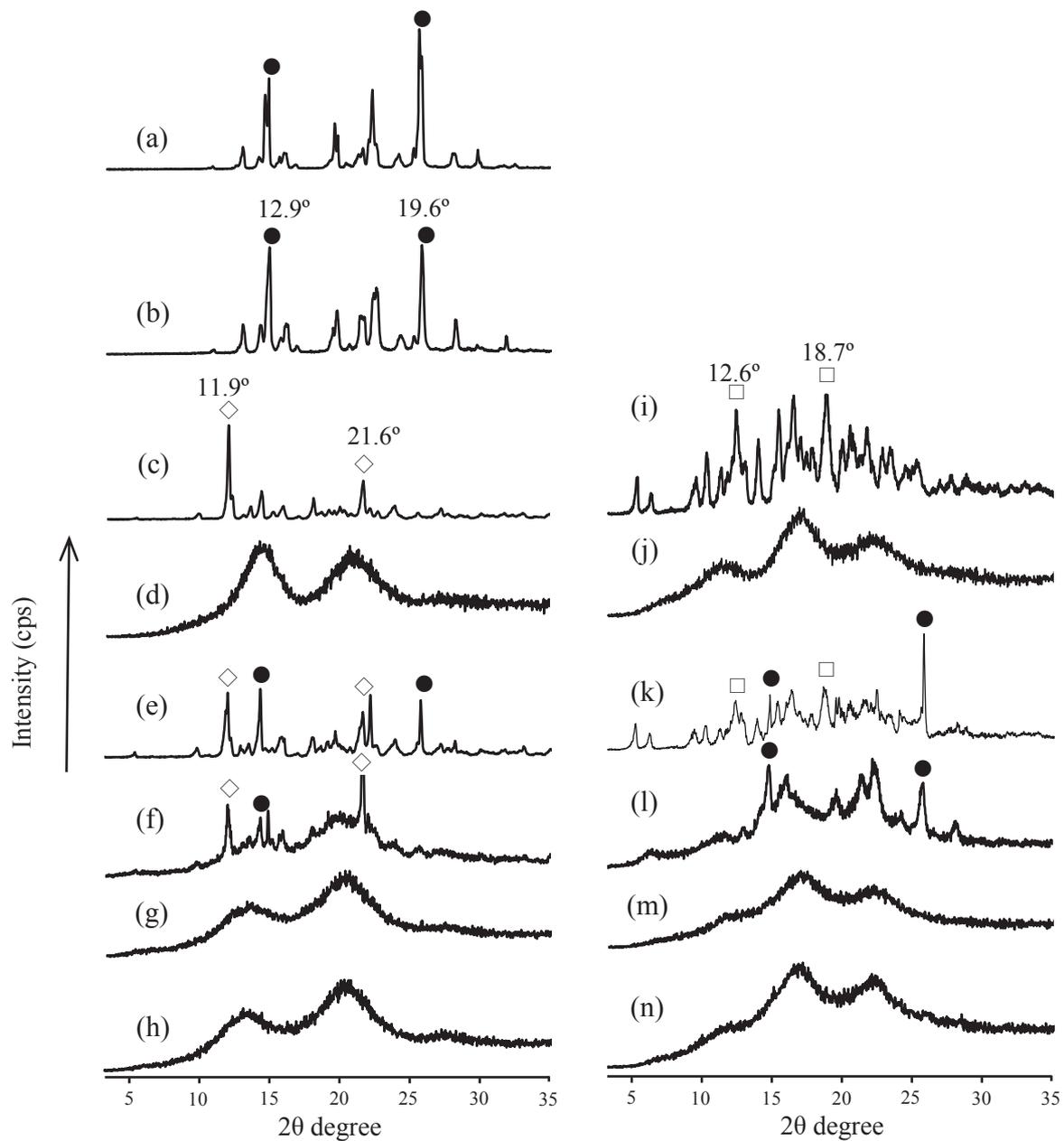


Fig. 3. PXRD patterns of (a) PP intact, (b) PP ground, (c) α CD, (d) α CD ground, (e) PM (PP/ α CD=1/2), (f) GM (PP/ α CD=1/1), (g) GM (PP/ α CD=1/2), (h) GM (PP/ α CD=1/3), (i) γ CD, (j) γ CD ground, (k) PM (PP/ γ CD=1/1), (l) GM (PP/ γ CD=2/1), (m) GM (PP/ γ CD=1/1), (n) GM (PP/ γ CD=1/2).

●:PP original, ◇: α CD original, □: γ CD original

2-2 PP/CD 包接複合体における熱的性質の評価

包接複合体を形成することにより、ゲスト分子の結晶性の変化は、固体の融点、や融解に必要なエネルギー変化として観測される可能性がある。そこで、混合粉砕物の熱的挙動の変化および固体状態における PP/CD の包接モル比を評価するために、示差走査熱量 (DSC) 測定を行った (Fig. 4)。

PP intact および PP ground は 130°C 付近に PP の融解による吸熱ピークが観測された。αCD 系において、PM (PP/αCD=1/2) および GM (PP/αCD=1/1) は 130°C に PP の融解による吸熱ピークが観測された。一方で GM (PP/αCD=1/2) および GM (PP/αCD=1/3) では PP の融解による吸熱ピークが消失していることが確認された。

γCD 系において、PM (PP/γCD=1/1) および GM (PP/γCD=2/1) では 129°C 付近に PP の融解による吸熱ピークが観測された。一方で、GM (PP/γCD=1/1) および GM (PP/γCD=1/2) は PP の融解による吸熱ピークが消失していることが確認された。GM (PP/αCD=1/2) および GM (PP/γCD=1/1) は GM (PP/αCD=1/3) および GM (PP/γCD=1/2) と比較して 50~110°C 付近に水の吸熱ピークが低く現れた (Fig. 4-g, h, m, n)。そのため、GM (PP/αCD=1/2) および GM (PP/γCD=1/1) は、CD が余っておらず、適切な包接モル比で包接複合体を形成したことにより、水の吸熱ピークが低く現れたものと考えられる。ゲスト分子と CD の相互作用によるゲスト分子の吸熱ピークの消失は、非晶質性を有する包接複合体形成が示唆されている。また、ゲスト分子の熱的挙動の変化は、固体分散体中のゲスト分子と CD 包接複合体の形成を示している³⁰⁻³²⁾。すなわち、2-1 の結果と合わせて考えると、PP/αCD では 1:2)、PP/γCD では 1:1 の包接モル比で包接複合体を形成することが示唆される。

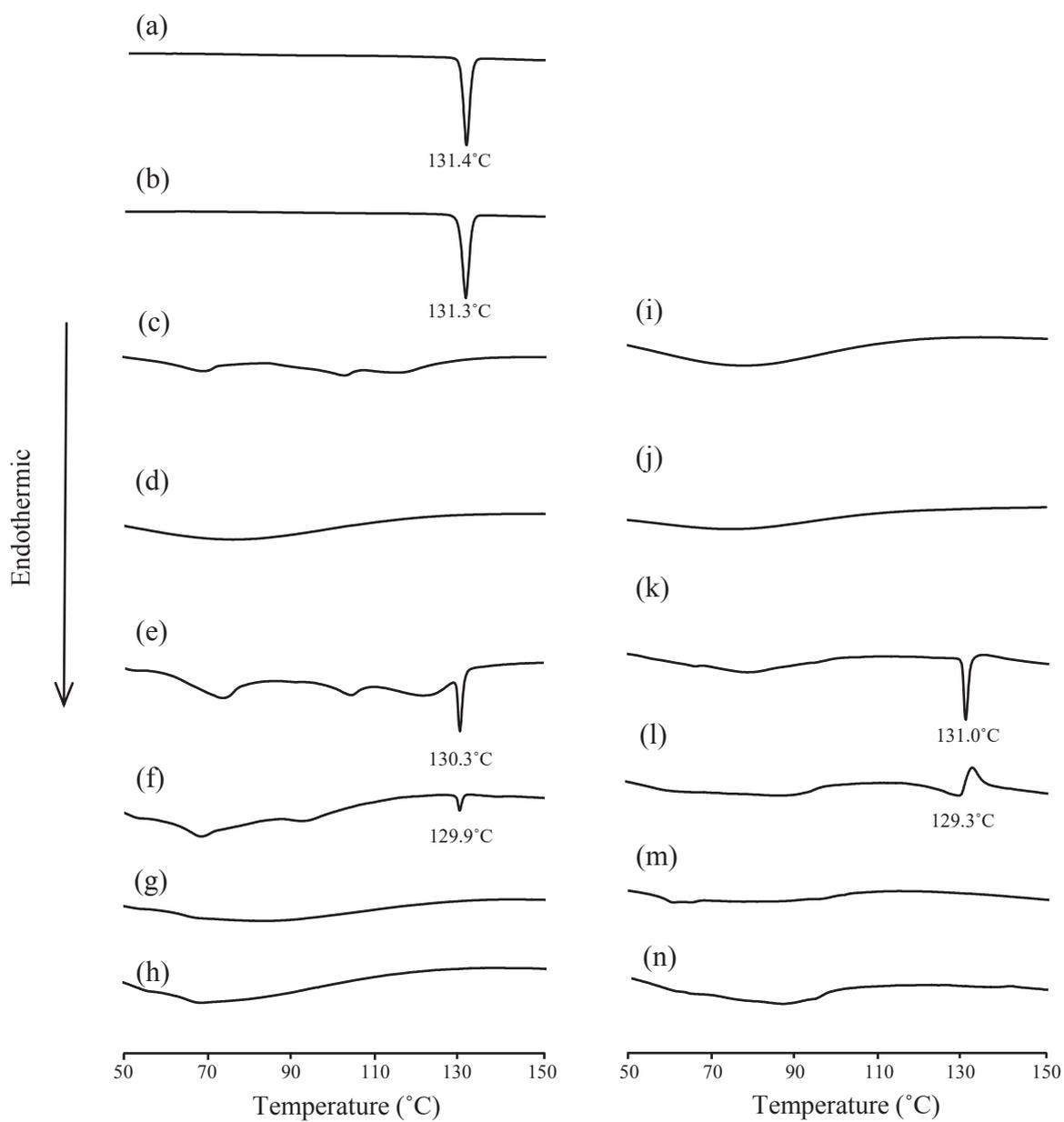


Fig. 4. DSC curves of (a) PP intact, (b) PP ground, (c) αCD, (d) αCD ground, (e) PM (PP/αCD=1/2), (f) GM (PP/αCD=1/1), (g) GM (PP/αCD=1/2), (h) GM (PP/αCD=1/3), (i) γCD, (j) γCD ground, (k) PM (PP/γCD=1/1), (l) GM (PP/γCD=2/1), (m) GM (PP/γCD=1/1), (n) GM (PP/γCD=1/2).

2-3 Raman 測定による PP/CD 包接複合体の分子状態の検討

PXRD 測定および DSC 測定の結果より、GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ γ CD=1/1) の包接複合体形成が推察された。Raman 測定は、PP の炭素間多重結合のピーク (芳香環、ペンタジエン鎖) に基づいて、固体状態の包接複合体形成を確認するために有用な分析法である。そこで、Raman 測定に着目し、包接モル比の違いが及ぼす各種包接複合体の物理化学的性質を評価した (Fig. 5)。

PP intact では芳香環由来の C=C (1584 cm^{-1})、ペンタジエン鎖由来の C=C (1625 cm^{-1})、O=C-N- (1600 cm^{-1})、CH₂ (1203, 1448 cm^{-1})、=C-O-C (1256 cm^{-1})、CH (1104 cm^{-1}) の Raman 散乱に基づくピークが観測された。各 PM においても PP に由来する散乱ピークが同じ波数で確認された。

GM (PP/ α CD=1/1) では、CH₂ および芳香環由来の C=C の散乱ピークのブロード化およびラマン散乱強度の低下を示した。また、PP 由来の CH (1104 cm^{-1}) のピークが 1098 cm^{-1} へシフトしたことが確認された。一方で、GM (PP/ α CD=1/2) は CH₂ および芳香環由来の他にペンタジエン鎖由来の C=C の散乱強度の低下が観測された。GM (PP/ γ CD=2/1) は PM (PP/ γ CD=1/1) と同様のピーク挙動を示し、GM (PP/ γ CD=1/1) は芳香環由来の C=C のブロード化が確認された。

GM (PP/ β CD=1/1) は芳香環由来の C=C、CH、CH₂ の散乱ピークの全対称伸縮振動が抑制し、散乱ピークがブロード化することが報告されている²⁹⁾。この知見と照らすと、GM (PP/ γ CD=1/1) は GM (PP/ β CD=1/1) と比較してペンタジエン鎖由来の C=C の散乱強度が低下していたことから、PP のペンタジエン鎖部分の分子運動性を強く抑制したことが考えられる。PP の芳香環は各 CD との包接複合体形成に密接に関係する構造であり、CD の環状サイズや包接モル比に応じて、GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ γ CD=1/1) の PP のペンタジエン鎖および芳香環の分子運動性が異なることから、PP と各 CD との相互作用は、PP の芳香環、

ペンタジエン鎖、アミド基までの平面構造の共役系に影響したことが示唆された。

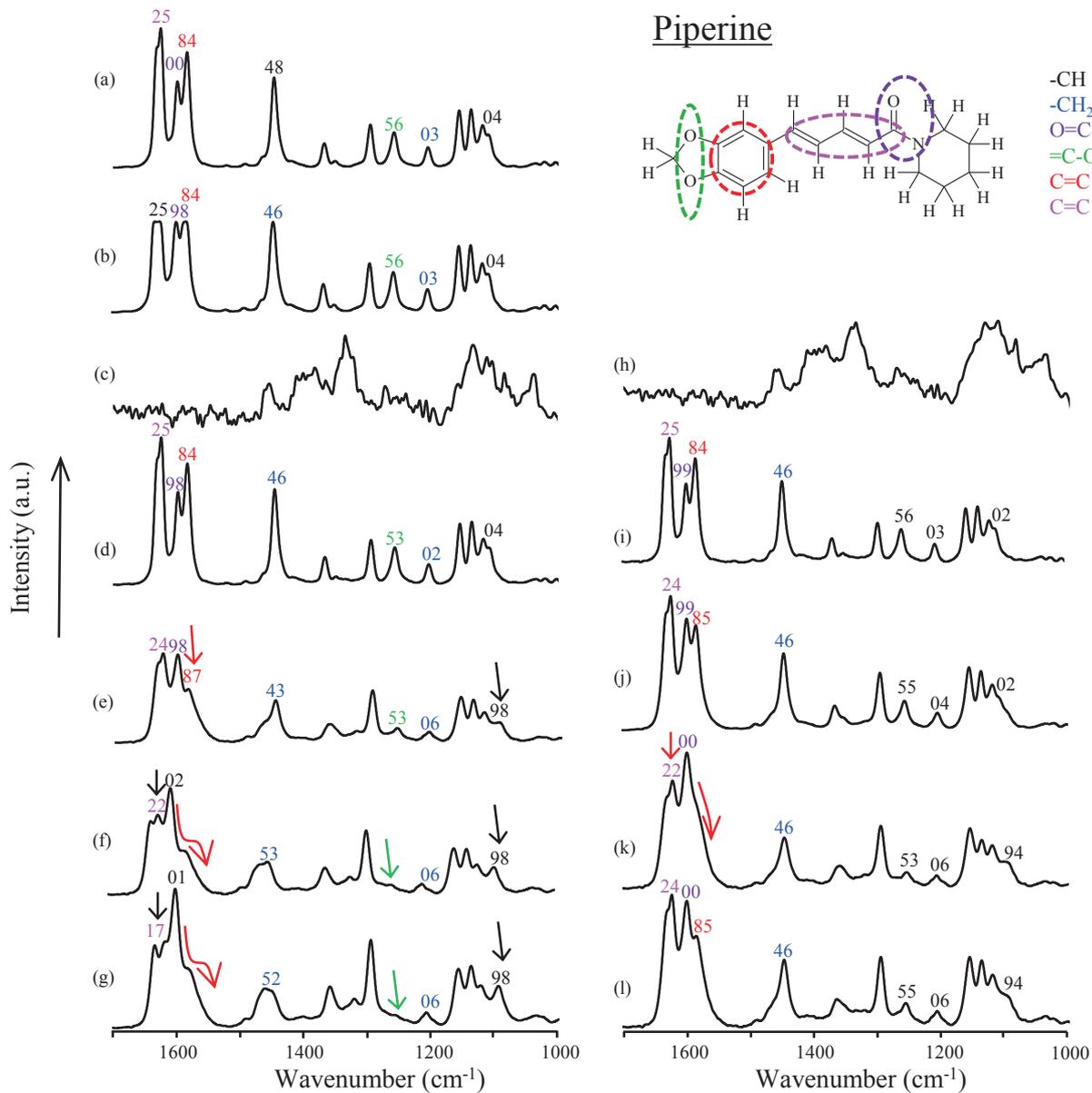


Fig. 5. Raman spectra of (a) PP intact, (b) PP ground, (c) α CD, (d) PM (PP/ α CD=1/2), (e) GM (PP/ α CD=1/1), (f) GM (PP/ α CD=1/2), (g) GM (PP/ α CD=1/3), (h) γ CD, (i) PM (PP/ γ CD=1/1), (j) GM (PP/ γ CD=2/1), (k) GM (PP/ γ CD=1/1), (l) GM (PP/ γ CD=1/2).

-CH: 1104 cm⁻¹, -CH₂: 1203 cm⁻¹, 1448 cm⁻¹, O=C-N-: 1600 cm⁻¹, =C-O-C: 1256 cm⁻¹, C=C (aromatic) : 1584 cm⁻¹, C=C (pentadiene) : 1625 cm⁻¹

2-4 走査型電子顕微鏡による固体表面の観察

固体粉体の粒子表面の微細な構造、形態、組成を観察するために走査型電子顕微鏡 (SEM) 測定を行った。PP intact の粒子表面は平滑であり、粒子径は 200 μm の細長い粒子径が観察された (Fig. 6)。また、PP ground の粒子表面は粗雑であり、約 5 μm 程度の粒子が凝集していることが確認された。PM (PP/ α CD=1/2) および PM (PP/ γ CD=1/1) においては、PP と CD の粒子がただ混在しているように観察された (Fig. 6)。この粒子の形態学的な変化が認められないことから、固体状態で共存するだけでは相互作用が生じないと考えられた¹⁸⁾。一方、GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ γ CD=1/1) では、PP や α CD、 γ CD、単独粉碎物の PP や CD の粒子径が観察されず、それぞれ 100 μm 、30 μm の凝集かつ表面が粗雑な粒子径が観察された。これにより、GM 処理によって、PP と CD での分子間相互作用が新たに生じ、粒子形態にも変化が観察されたと考えられた。

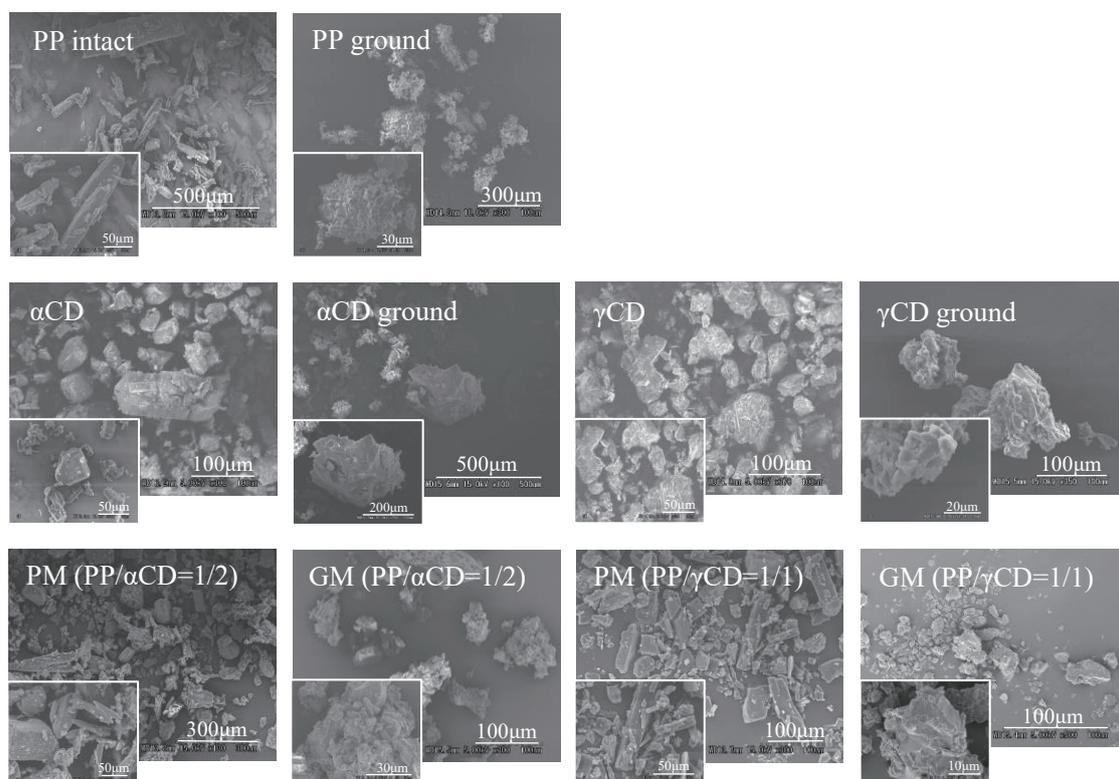


Fig. 6. SEM micrographs of PP/CDs systems.

2-5 PP/CD 包接複合体からの PP の溶出性の評価

各包接複合体を用いた場合の PP の溶解性の変化を確認するために溶出試験を行った (Fig. 7)。比較のため、既に報告している GM (PP/βCD=1/1) および PM (PP/βCD=1/1) の溶出試験データを引用した¹⁸⁾。

PP intact および PP ground の試験開始 5 分後の PP の溶解濃度はそれぞれ 0.838 μg/mL、0.480 μg/mL と低い濃度であった。また、PM (PP/αCD=1/2)、PM (PP/βCD=1/1) および PM (PP/γCD=1/2) での PP の濃度もそれぞれ 0.272 μg/mL、0.729 μg/mL、0.414 μg/mL と低かった。一方で、GM (PP/αCD=1/2)、GM (PP/γCD=1/1)、GM (PP/αCD=1/1) および GM (PP/βCD=1/1) での PP の濃度は、14.6 μg/mL、11.6 μg/mL、5.82 μg/mL および 4.48 μg/mL と各種 PM と比較して増大した。60 分では、GM (PP/αCD=1/2)、GM (PP/βCD=1/1)、GM (PP/αCD=1/1) および GM (PP/γCD=1/1) について、PP の濃度はそれぞれ 20.4 μg/mL、18.9 μg/mL、16.2 μg/mL および 14.7 μg/mL を示した。

試験開始 5 分の溶解性は、GM (PP/αCD=1/2) > GM (PP/γCD=1/1) > GM (PP/αCD=1/1) > GM (PP/βCD=1/1) の順に高い溶解性の向上が確認された。また、試験開始 60 分の溶解性は、GM (PP/αCD=1/2) > GM (PP/βCD=1/1) > GM (PP/αCD=1/1) > GM (PP/γCD=1/1) の順で高い溶解性が確認された。

各種包接複合体で、溶解挙動が異なる理由として、複合体の分散性および溶液中での包接化合物の平衡定数、固体状面への水分子の吸着性³³⁾の違いなどが考えられる。例えば、解熱鎮痛薬として知られているニメスリドと環状サイズの異なる α, β, γCD を用いて、混錬法および溶媒留去法により調製した包接複合体からのニメスリドの溶出性は、包接様式に関わる相互作用および薬物の濡れに関わる粒子形態の違いによって影響を受け、それは包接様式、CD の環状サイズにより異なると報告されている³⁴⁾。

GM間で比べると、GM (PP/βCD=1/1) の5分値の溶解性が最も低い理由は、βCDがαおよびγCDと比較して疎水性を有するため、βCDによりPPの脂溶性部位が強く捕捉されていることが関係すると推察される。溶解度法の結果より、PP/αCDおよびβCDの $K_{1/1}$ の安定度定数は 1000 M^{-1} 以上と安定であり、PP/γCDの $K_{1/1}$ およびPP/αCDの $K_{1/2}$ は 1000 M^{-1} 以下の低値を示した (Fig. 2)。安定度定数が低値である包接化合物 ($K=15.17\text{ M}^{-1}$) ほど解離する速度も速い。また、Jambhekar SSらによれば、 $K_{1/1}$ は薬物とCDとの相互作用の強さに関わるため³⁵⁾、GM (PP/αCD=1/2) およびGM (PP/γCD=1/1) では、5分値までの高い溶解速度が観察されたと推察された。また、Raman測定の結果より、GM (PP/αCD=1/2) およびGM (PP/γCD=1/1) は脂溶性部位であるPPの芳香環およびペンタジエン鎖のC=Cとの相互作用を示すことが明らかになっている。一方でGM (PP/αCD=1/1) およびGM (PP/βCD=1/1) はペンタジエン鎖のC=Cとの相互作用は確認されていない。これらのことから、固体状態における相互作用の違いも立ち上がりの速い溶解性に影響していることが推察された。試験開始60分の溶解性において、GM (PP/αCD=1/2) ではGM (PP/αCD=1/1) と比較して高いPP濃度を示すが、これには2分子のαCDがPPの疎水性部位を包接していることと関係すると推察した。また、GM (PP/γCD=1/1) が各種GMと比較して最も溶解性向上作用が低い理由は、溶液状態における包接様式の違いが影響している可能性も考えられる。

以上の結果から、PPの溶解性の向上を目的として各種包接複合体を調製してそれらと比較する場合、包接複合体の物理化学的性質や溶出の過程で生じる溶液状態における包接化合物の分子間相互作用の状態について、詳細に検討することが、必要と考えられる。

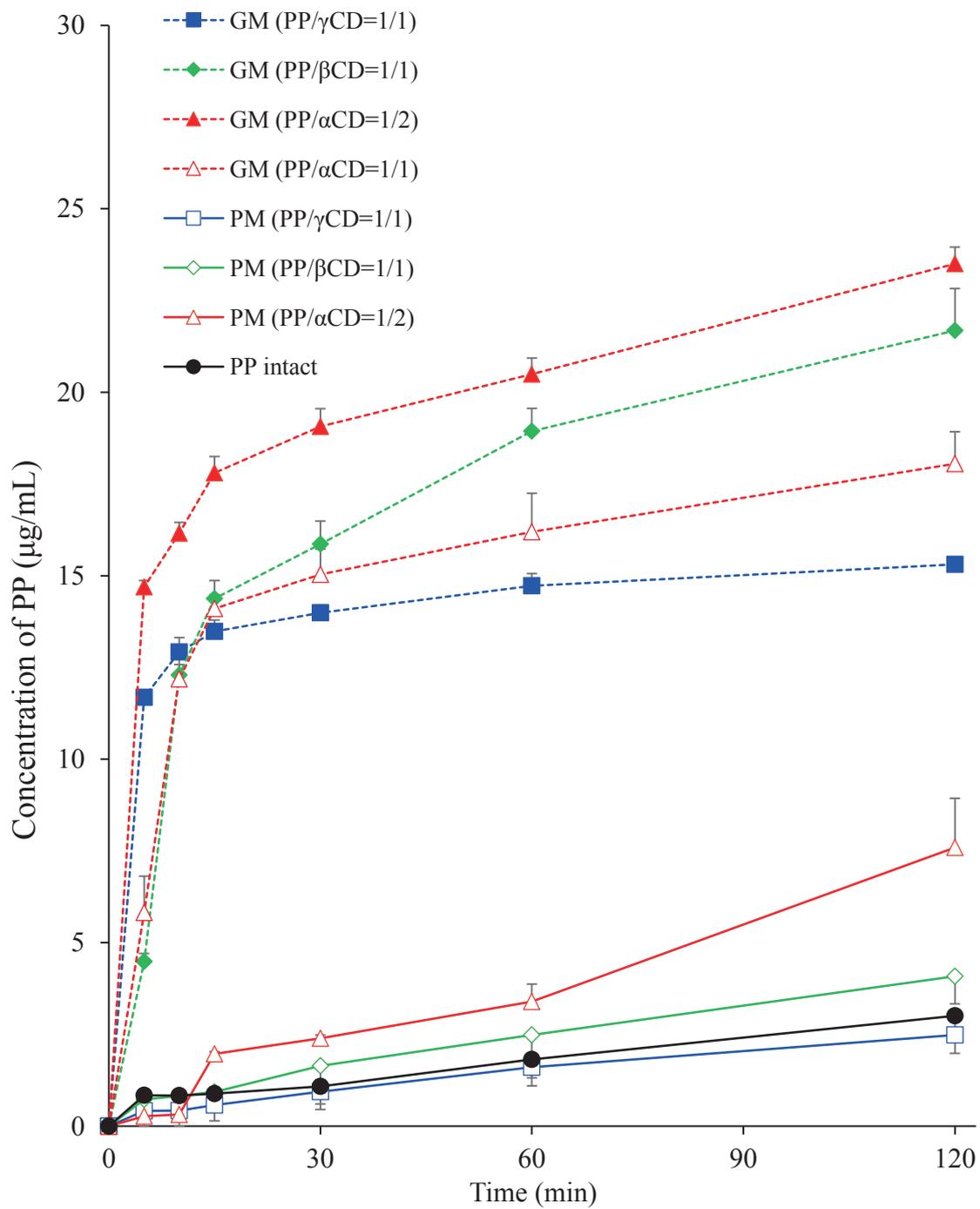


Fig. 7. Dissolution profiles of PP with CDs in distilled water. Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

2-6 2次元 NMR を用いた溶液状態における PP/CD 混合粉砕物から生じた包接化合物の分子間相互作用の検討

溶出試験において PP/CD 混合粉砕物の PP の溶解性向上が確認された。溶解性の向上は、溶液状態での PP と CD との包接化合物が寄与した可能性があるため、PP と CD の分子間距離および相対的位置関係を予想できる ^1H - ^1H NOESY NMR 測定を行った (Fig.8-10)。

GM (PP/ α CD=1/2) において、包接化合物における PP はメチレンジオキシフェニル基に由来する O-CH₂-O (H-J) が 5.93 ppm、CH は 6.77 (H-E), 6.90 (H-D), 6.95 (H-C) ppm 付近に観測された。また、アルケン由来の CH は 6.30 (H-H), 6.72 (H-G), 6.74 (H-F), 7.17 (H-A) ppm 付近に観測された。CD のグルコース 1 分子の C₃、C₅、C₆ に帰属する H-3、H-5、H-6 は、それぞれ 3.69, 3.81, 3.75 ppm 付近に観測された (Fig.8)。H-3 は CD の広い環状の縁、H-5 は中間の高さ、H-6 は狭い環状の縁の内側に位置している。PP のメチレンジオキシフェニル基に由来する H-J のピークと α CD の H-5、H-3、H-6 のプロトン間でクロスピークが観測された。また、PP の脂溶性部位である芳香環の H-C, D, E と CD の広い環状の縁の内側に位置する H-3 においてクロスピークが観測された。NOE によるクロスピークは 0.4 nm 以下のプロトン間の距離を示すことから、1 分子の α CD は広い環状の縁の H-3 から狭い環状の縁の H-6 にかけてメチレンジオキシフェニル基に包接していることが示唆された (Fig.8)。GM (PP/ β CD=1/1) は H-J と CD の狭い環状の縁の H-6 とのクロスピークが観測された (Fig. 9)。また、CD の広い環状の縁の H-3 と PP の芳香環の H-C, D, E においてクロスピークが観測された。一方で、PP と α CD が 1:2 の包接比で複合体形成していると推察される GM (PP/ α CD=1/2) では H-J と α CD の広い環状の縁の H-3 とのクロスピークが確認されたことから、GM(PP/ α CD=1/2) の 1 分子の α CD は β CD と比較して PP を浅く包接して

いることが推察された。また、 α CD の狭い環状の縁の内側に位置する H-6 と PP のアルケン由来のプロトンである H-A においてクロスピークが観測された。PP のアルケン由来の F, G と α CD の環状の中間の高さの内側に位置する H-5 においてクロスピークが観測された。また、PP の芳香環由来の H-C, D, E と α CD の H-3 においてクロスピークが確認された。したがって、もう 1 分子の α CD はアルケン由来の C=C に包接しており、広い環状の縁の H-3 がメチレンジオキシフェニル基の芳香環に向けた形で位置することが示唆された。したがって、GM (PP/ α CD=1/2) は PP のメチレンジオキシフェニル基およびアルケンの C=C を 2 分子の α CD が head to head の様式で、包接していることが推察された。

GM (PP/ γ CD=1/1) では Raman 測定において、芳香環由来の C=C 結合のブロード化が強く確認されていることから、メチレンジオキシフェニル基で包接されていることが予想された (Fig. 10)。しかしながら、メチレンジオキシフェニル基の H-J と狭い環状の縁の H-6 のみクロスピークが確認された。CD の環状サイズはグルコースのユニット数と共に増加するが、空洞の高さは一定である。また、CD の環の柔軟性は γ CD、 α CD、 β CD の順で大きく、柔軟性が高いほど溶解性が高い相関性がある³⁶⁾。この性質から γ CD は環が歪みやすく、PP を浅く包接した要因であると推察した。

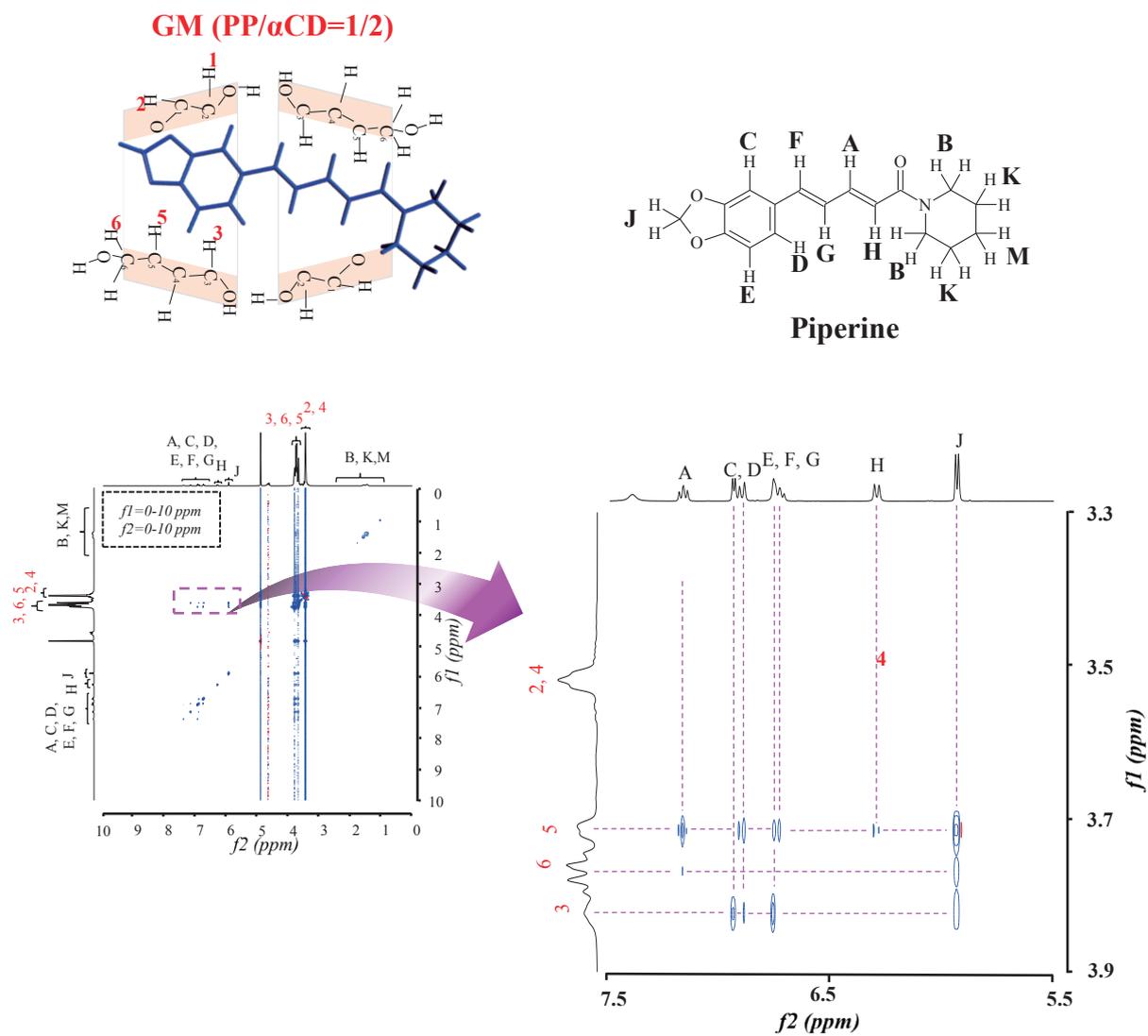
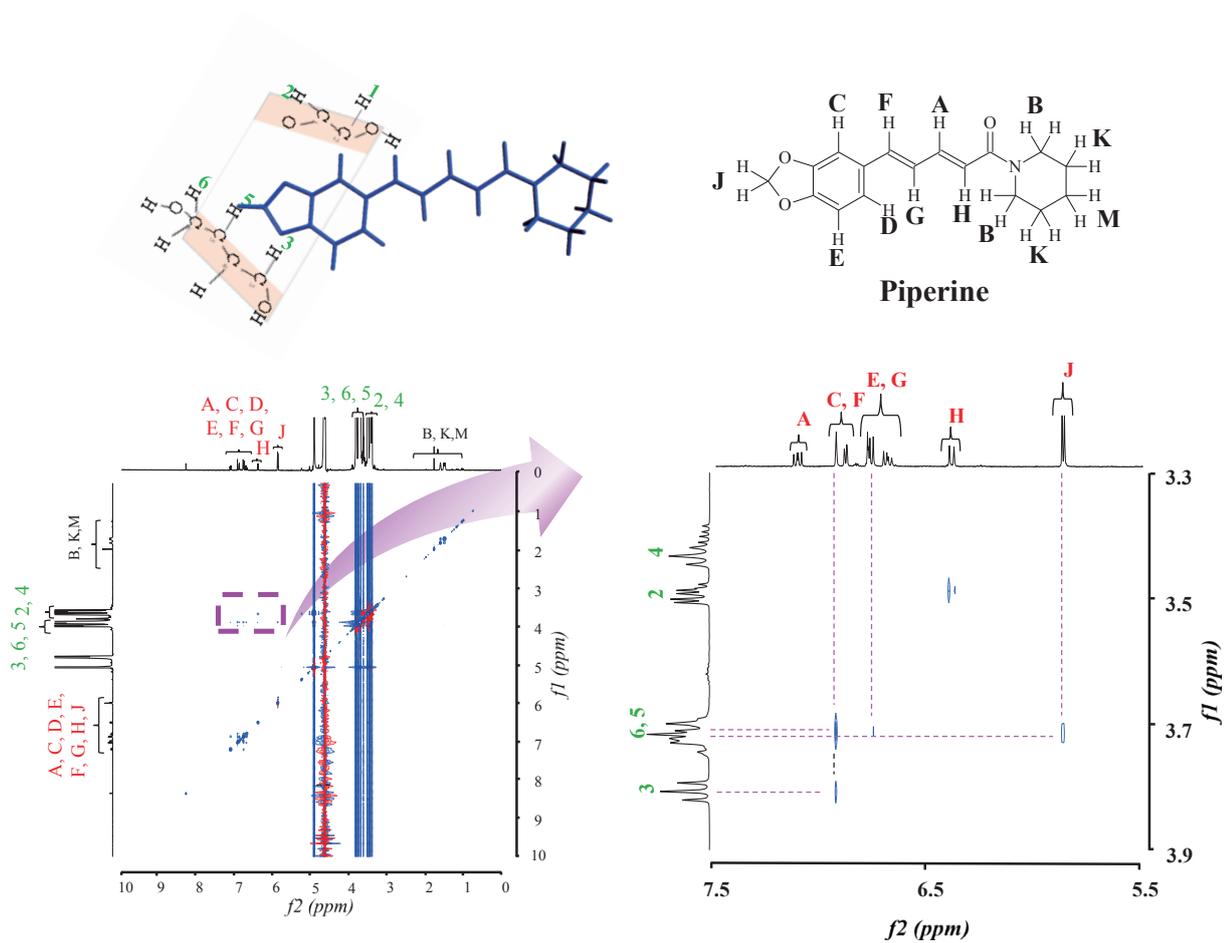
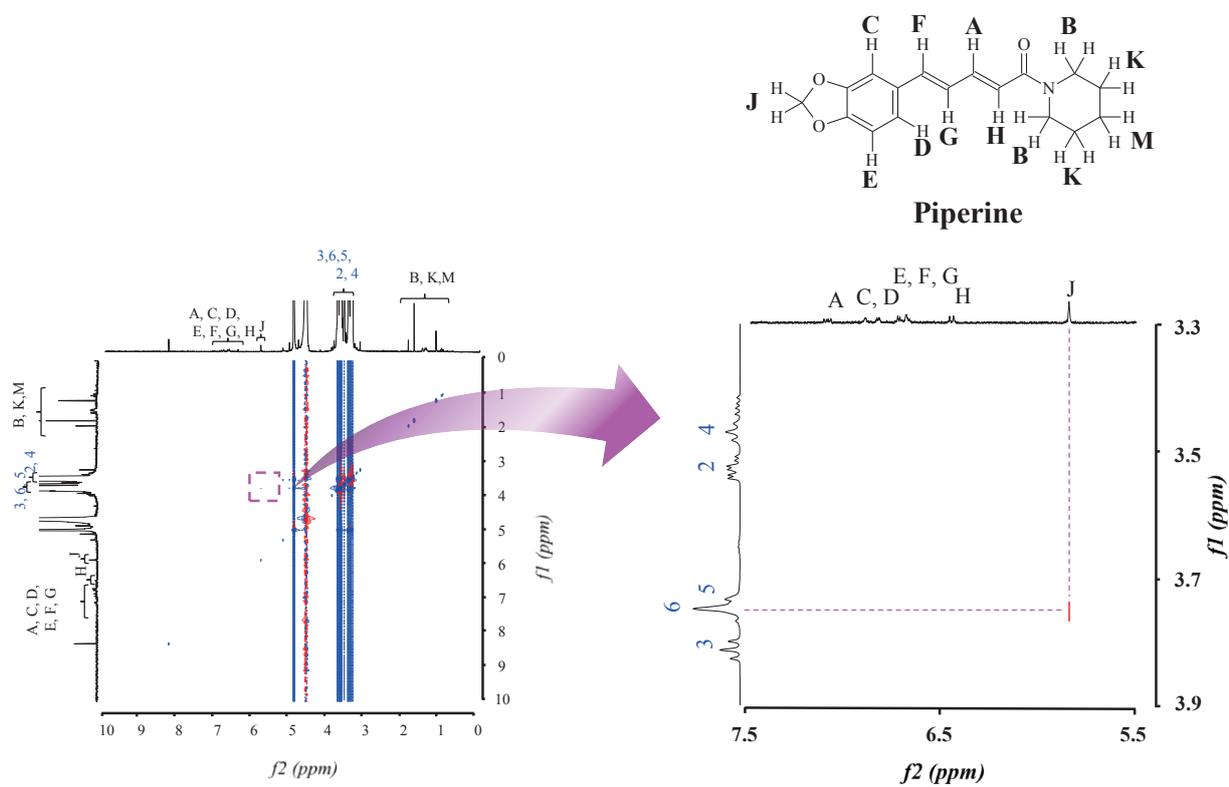


Fig. 8. ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum produced by GM (PP/ α CD=1/2) in D_2O . X is 5.5-7.5 ppm, and Y is 3.3-3.9 ppm.



Ezawa, T., Inoue, Y., Tunvichien, S., Suzuki, R. & Kanamoto, I. Changes in the Physicochemical Properties of Piperine / β -Cyclodextrin due to the Formation of Inclusion Complexes. *Int. J. Med. Chem.* 2016, 1-9, doi:10.1155/2016/8723139

Fig. 9. ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum produced by GM (PP/ β CD=1/2) in D_2O . X is 5.5-7.5 ppm, and Y is 3.3-3.9 ppm.



2-7 PP/CD 包接複合体からの PP の溶出性と包接複合体および包接化合物の分子状態の関係に関する考察

2次元 NMR 測定により、PP の脂溶性部位であるメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖を包接する α CD、PP のメチレンジオキシフェニル基を浅く包接する γ CD の包接化合物の様式の違いが確認された (Fig. 11)。これにより、溶液状態における各種包接化合物の異なる包接様式が PP の溶解性に寄与したものと示唆された。さらに、溶解度相図は α CD 20mM (19.4 mg/mL)、 β CD 3mM (3.4 mg/mL) および γ CD 3mM (3.8 mg/mL) の溶解濃度に対して、PP 4.1mM (1.1 mg/mL)、PP 0.23 mM (6.5×10^{-2} mg/mL)、PP 0.04 mM (1.1×10^{-2} mg/mL) の最大溶解度が確認されている (Fig. 2)。一方で、溶出試験では、蒸留水 900mL に対して、GM で調製された PP/CD の CD 濃度は α CD 0.22 mg/mL (0.22 mM)、 β CD 0.13 mg/mL (0.11 mM)、 γ CD 0.15 mg/mL (0.11 mM) となる。興味深いことに、この溶出試験の CD 濃度を溶解度相図の横軸である CD 添加量に当てはめても、溶出試験の PP は溶解度相図と比較して高い溶解性を示している。これらの結果から、PP/CD 包接複合体を形成した場合、調製方法の違いによって PP の溶解性に違いが生じることが示唆された。

この PP の溶解性の違いは、GM の包接複合体から生じた包接化合物の速度の違いや、2次元 NMR で観測された PP の脂溶性部分を CD が包接する包接化合物の様式が溶出試験における PP の溶解性向上に寄与したことが示唆された。

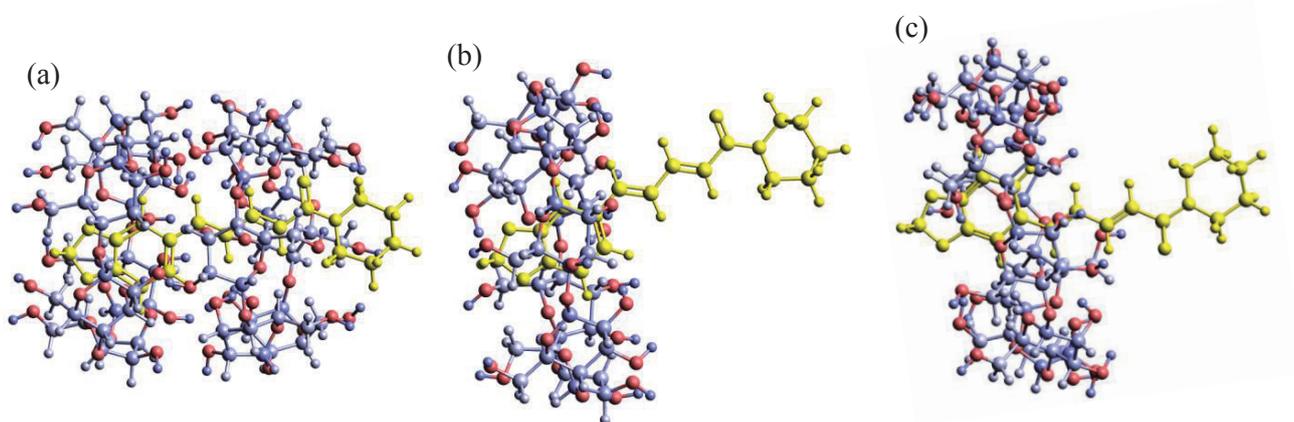


Fig. 11. Structural view of PP/CD complex.
(a) GM (PP/ α CD=1/2), (b) GM (PP/ β CD=1/1), (c) GM (PP/ γ CD=1/1).

2-8 固体蛍光測定を用いた PP/CD 包接複合体における PP の分子挙動評価

PP の分子形態学的な変化は用いる CD や調製方法によって異なる事が予想される。CD への水分子の吸着は、グルコース単位数が異なるため、 α CD や γ CD よりも β CD の方が速い特徴がある³⁸⁾。GM で調製された非晶質の包接複合体は、水分子の吸着状況に応じて、ゲスト分子とのファンデルワールス力や水素結合の環境が変化して、結晶構造が筒状集合体であるチャンネルタイプ（正方晶、六方晶、および単斜晶）、ケージ型など特徴的な結晶回折ピークへと変化することが PXRD 測定により明らかになっている³⁸⁻⁴¹⁾。チャンネルタイプは、CD 分子が互いの水酸基間の水素結合を介して一直線状に並び円筒を形成している。ケージ型は、CD 分子がジグザク状に並んでおり、各空孔の上下の口が隣接する CD 分子によって塞がれている。この組織化状態の変化は、CD 中の PP 分子の包接挙動や水分子など環境要因に影響を受ける。GM で調製された非晶質の PP/CD 包接複合体を水分子の吸着に応じて変化する結晶性および相互作用を評価することができれば、包接複合体中の PP の分子運動性、分子配座、PP の包接複合体形成に関わる重要な包接部位の理解に繋がる。そこで、GM を 40°C、相対湿度 82% の条件下で 1 週間調湿保存した調湿物 (Humidified: hu)、結晶水を取り除くことが可能な 105°C の熱で GM を乾燥させた乾燥物 (Heat: he)、GM を上述の方法で調湿した後、乾燥させた (Humidified-heat: hu-he) の 3 つの水分子の環境が異なるサンプルを用いた。

PP はアミド基、ペンタジエン鎖、芳香環の平面構造の共役系であるため、CD との相互作用により、電子状態が異なることが予想される。固体状態の分子配向性は、励起状態から基底状態へのエネルギー差によって蛍光波長がシフトすると報告されている⁴²⁾。そこで、2-8 では非晶質の包接複合体の水分子の吸着状

況を変化させた包接複合体を用いて、CD 中の PP の分子挙動の違いを評価することを目的として、固体蛍光測定を行った。

PP intact は 459 nm に蛍光極大波長が観測された (Fig. 12-a)。一方で、包接複合体を形成している GM (PP/ α CD=1/2)、GM (PP/ β CD=1/1) および GM (PP/ γ CD=1/1) の蛍光極大波長は 463, 472, 469 nm と PP intact と比較して長波長側へシフトしていることが観測された (Fig. 12-b, c, d)。種々包接複合体の PP の蛍光波長が長波長側へシフトしているのは、CD との相互作用によって、PP の分子内電荷に変化が生じたことが影響している。Pfund らの PP の単結晶データによれば、メチレンジオキシフェニルグループのエーテル基からアミド基にかけて電子が共鳴することが報告されている⁹⁾。また共役系の変化はアミドあるいはカルボニル基のいずれの周りで結合回転が増加することが報告されている⁹⁾。これらの報告から、GM で調製された種々包接複合体は、PP の窒素が供与する電子をエーテル基部分まで受け渡しされず、エネルギー変化が生じたことが推測された。この共役状態の変化は PP のアミドまたはカルボニル基が歪む状態で CD 中に包接された分子挙動を示したものと考えられる。さらに包接複合体形成により、 π 共役平面同士の重なりが小さい分子配列となり、PP 同士の π - π 相互作用が抑制されたことにより、蛍光強度が上昇したものと考えられた。

α CD の系において、GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ α CD=1/2) heated の蛍光極大波長は 463、457 nm に観測された。一方で humidified GM (PP/ α CD=1/2) および humidified-heated GM (PP/ α CD=1/2) は 454, 455 nm に確認され、GM (PP/ α CD=1/2) と比較して短波長側へシフトした (Fig. 12-a)。この短波長側へのシフトは、水の配位状況により、PP 分子が α CD に固定化されることで、PP のアミドまたはカルボニル基が平面構造を維持しやすい特徴であると考えられる。

β CD の系において、GM (PP/ β CD=1/1) および heated GM (PP/ β CD=1/1) の蛍光

極大波長は 472 nm、462 nm に観測された。一方で humidified GM (PP/ β CD=1/1) および humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) は 460、455 nm に確認され、GM (PP/ β CD=1/1) と比較して短波長側へシフトした(Fig. 13-b)。また、humidified GM (PP/ β CD=1/1) ならびに humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) の PP の分子挙動が蛍光消光に寄与する分子挙動であることが推察された。これは GM (PP/ β CD=1/1)、humidified GM (PP/ β CD=1/1) ならびに humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) の PP の蛍光消光は、包接複合体の水の配位状況に応じて PP の分子が固定化され、運動性が低下し、CD 内の PP のアミド窒素の供与性に影響したことが寄与していると考えられる。

γ CD 系において、GM (PP/ γ CD =1/1) 、 heated GM (PP/ γ CD =1/1) および humidified-heated GM (PP/ γ CD =1/1) の蛍光極大波長はそれぞれ 469 nm に観測された。一方で humidified GM (PP/ γ CD =1/1) は 465 nm に観測され、GM (PP/ γ CD =1/1) と比較してわずかに短波長側に蛍光極大波長がシフトしたことが確認された (Fig. 13-c)。GM (PP/ γ CD =1/1) の蛍光波長は humidified GM (PP/ γ CD =1/1) および GM (PP/ γ CD =1/1) humidified-heated は似た蛍光を示すため、PP の分子配座が似ていることが推察された。よって γ CD 複合体中の PP の包接挙動は α CD および β CD 中の PP とは異なる形態で維持され、水の配位状態や CD の環状サイズが寄与したものと考えられる

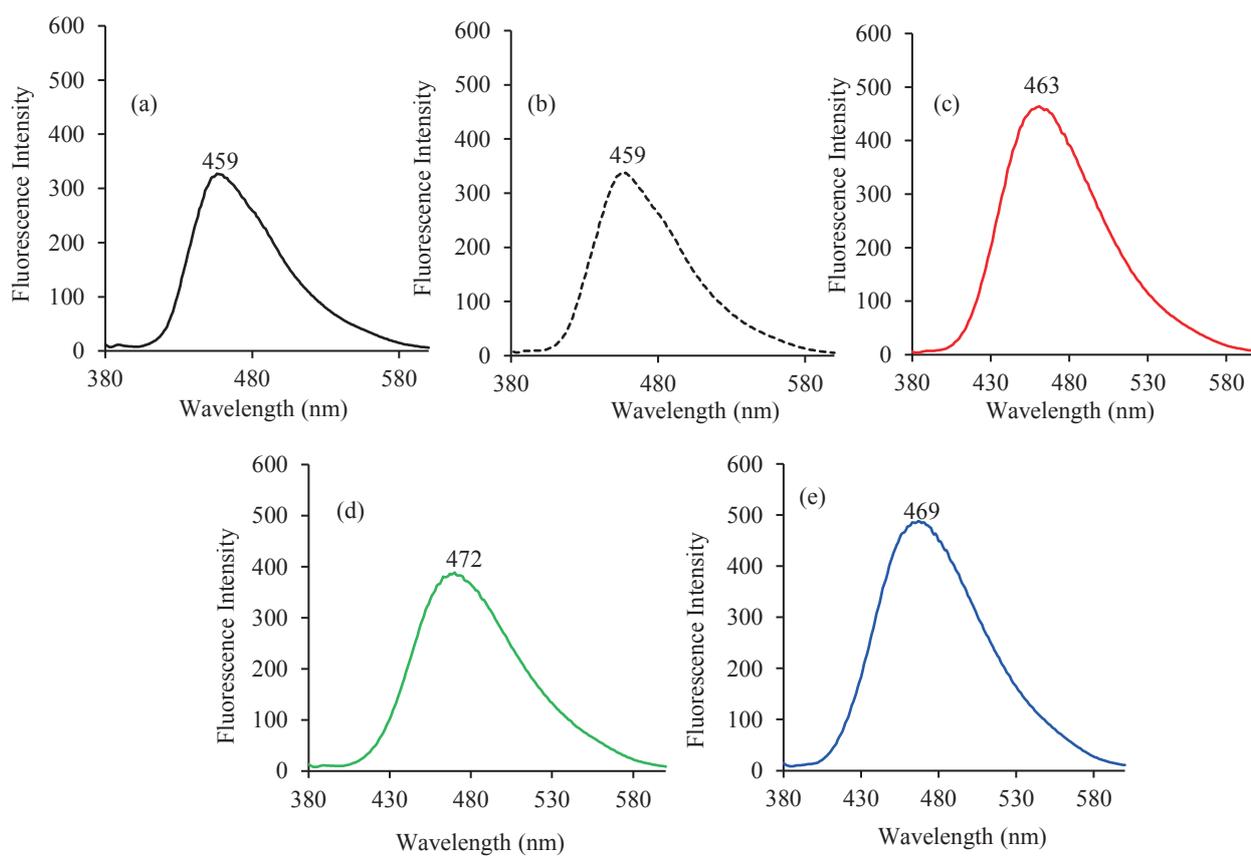


Fig. 12. Emission spectra of unprocessed and ground mixtures of PP with different CDs. ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$): (a) PP, (b) PP ground, (c) GM (PP/ α CD=1/2), (c) GM (PP/ β CD=1/1), and (d) GM (PP/ γ CD=1/1).

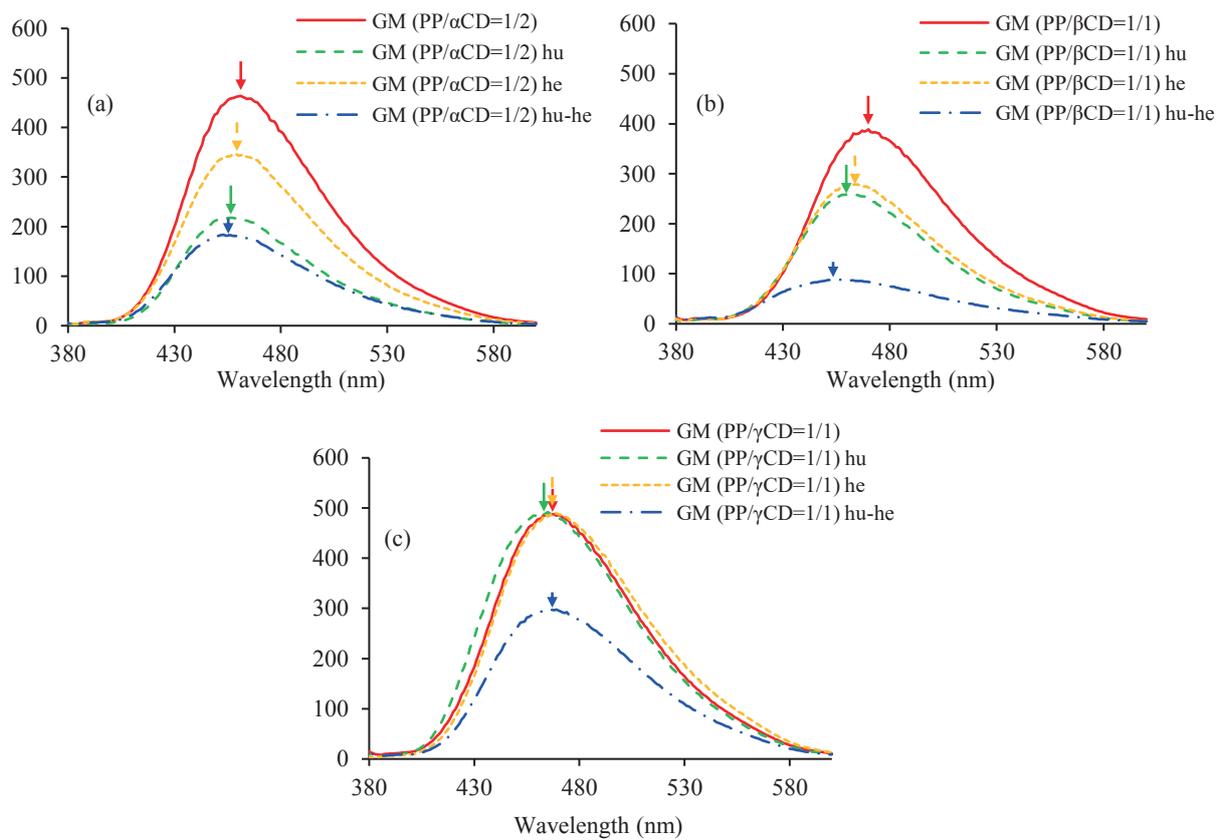


Fig. 13. Changes in the emission spectra of PP/CD complex systems ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$): (a) PP/ α CD, (b) PP/ β CD, and (c) PP/ γ CD. Abbreviations: humidified (hu), heated (he), humidified-heated (hu-he).

2-9 PP/CD 包接複合体における結晶状態の評価

水分子の配位状況が異なる包接複合体を形成した各種 GM の結晶状態の変化を確認するために、PXRD 測定を行った。PP intact は、 $2\theta=14.7^\circ, 25.6^\circ$ 付近に PP 由来の回折ピーク(●)が観測された。GM によって調製した PP/ α, β および γ CD 包接複合体はハローパターンを示す。粉碎物を加熱、調湿および調湿後加熱することで結晶構造が変化するかを確認するために GM (PP/CDs) heated、humidified GM (PP/CDs) および humidified-heated GM (PP/CDs) を用いた (Fig. 14)。

α CD の系において、heated GM (PP/ α CD=1/2) において、ハローパターンを示し、GM (PP/ α CD=1/2)と比較して結晶回折ピークの変化は観測されなかった。GM (PP/ α CD=1/2)を調湿した GM (PP/ α CD=1/2) humidified では $2\theta=10.3^\circ, 12.7^\circ, 19.6^\circ$ 付近に channel type に特徴的な結晶回折ピーク (▲) が観測された。さらにこの調湿した試料に熱を加えた humidified-heated GM (PP/ α CD=1/2) ではチャンネル型が乾燥することで、head-to-head および head-to-tail が混在した状態を示す特徴的な結晶回折ピーク (△) が $2\theta=11.7^\circ$ 付近に観測された(Fig. 14-e, Fig. 15-b, c)。すなわち humidified GM (PP/ α CD=1/2) および humidified-heated GM (PP/ α CD=1/2) の水分子の配位が変化しても、チャンネル構造であれば、PP は似た蛍光スペクトルを示す事が推察された。

β CD の系において、heated GM (PP/ β CD=1/1) において、 $2\theta=14.7^\circ$ 付近に PP 由来の結晶回折ピークが確認された (Fig. 14-g)。これは熱により PP が β CD から解離し、一部の PP が単独で混在している事が示唆された。humidified GM (PP/ β CD=1/1) においては PP 由来の回折ピークは観測されなかった。また、 $2\theta=11.9^\circ, 15.2^\circ, 17.5^\circ$ 付近に β CD の head-to-tail に特徴的な結晶回折ピーク (◆) が観測された (Fig. 14-h)。さらに humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) では $2\theta=11.9^\circ, 17.9^\circ$ 付近に Cage type に特徴的な結晶回折ピーク (◇) が観測された

(Fig. 14-i)。humidified GM (PP/ β CD=1/1) は熱をかけることで head-to-tail から水の水分子の少ない cage type に変化することから、PP/ β CD 複合体は結晶水の状態変化が容易に起こる包接様式であると予想された。

γ CD において、heated GM (PP/ γ CD=1/1) は、PP 由来の結晶回折ピークは確認されず、 $2\theta=5.9^\circ$ 付近に hexagonal type(\square)、 $2\theta=16.7^\circ$ 付近に monoclinic type (\circ)の結晶回折ピークが混在して確認された (Fig. 14-k)。humidified GM (PP/ γ CD=1/1) では $2\theta=7.5^\circ$ 16.6° , 21.4° 付近に Tetragonal type (\blacksquare)、 $2\theta=5.6^\circ$ 付近に monoclinic type、 $2\theta=15.8^\circ$ 付近に hexagonal type の結晶回折ピークが観測された(Fig.14-l, Fig. 15-d, e, f)。さらに humidified-heated GM (PP/ γ CD=1/1)では $2\theta=6.0^\circ$ 付近に Hexagonal type、 $2\theta=7.5^\circ$ 付近に Tetragonal type、 $2\theta=16.7^\circ$ 付近に Monoclinic type に特徴的な結晶回折ピークが観測された (Fig. 14-m)。Tetragonal type は、乾燥し、結晶水が減少すると Hexagonal や Monoclinic type に構造変化が生じることが報告されている³⁷⁾。しかしながら、heated GM (PP/ γ CD=1/1)、humidified GM (PP/ γ CD=1/1) および humidified-heated GM (PP/ γ CD=1/1) は Tetragonal、Hexagonal および Monoclinic type が混在していることが明らかになった。GM から調製された各 PP/CD 包接複合体の PP の蛍光スペクトルは PP 単独と比較して長波長側へ維持していることから、組織化された複合体の中で、 γ CD 複合体中の PP は固定化されず無秩序かつ乱れた状態で、PP の芳香環、ペンタジエン鎖、アミド基までの平面構造までの分子状態が歪む包接様式を形成したことが、 γ CD 同士の上に位置する結晶水が昇華しにくい理由である可能性が考えられた。そこで、2-10 では、GM から調製された各 PP/CD 包接複合体中の PP の分子運動性について評価することとした。

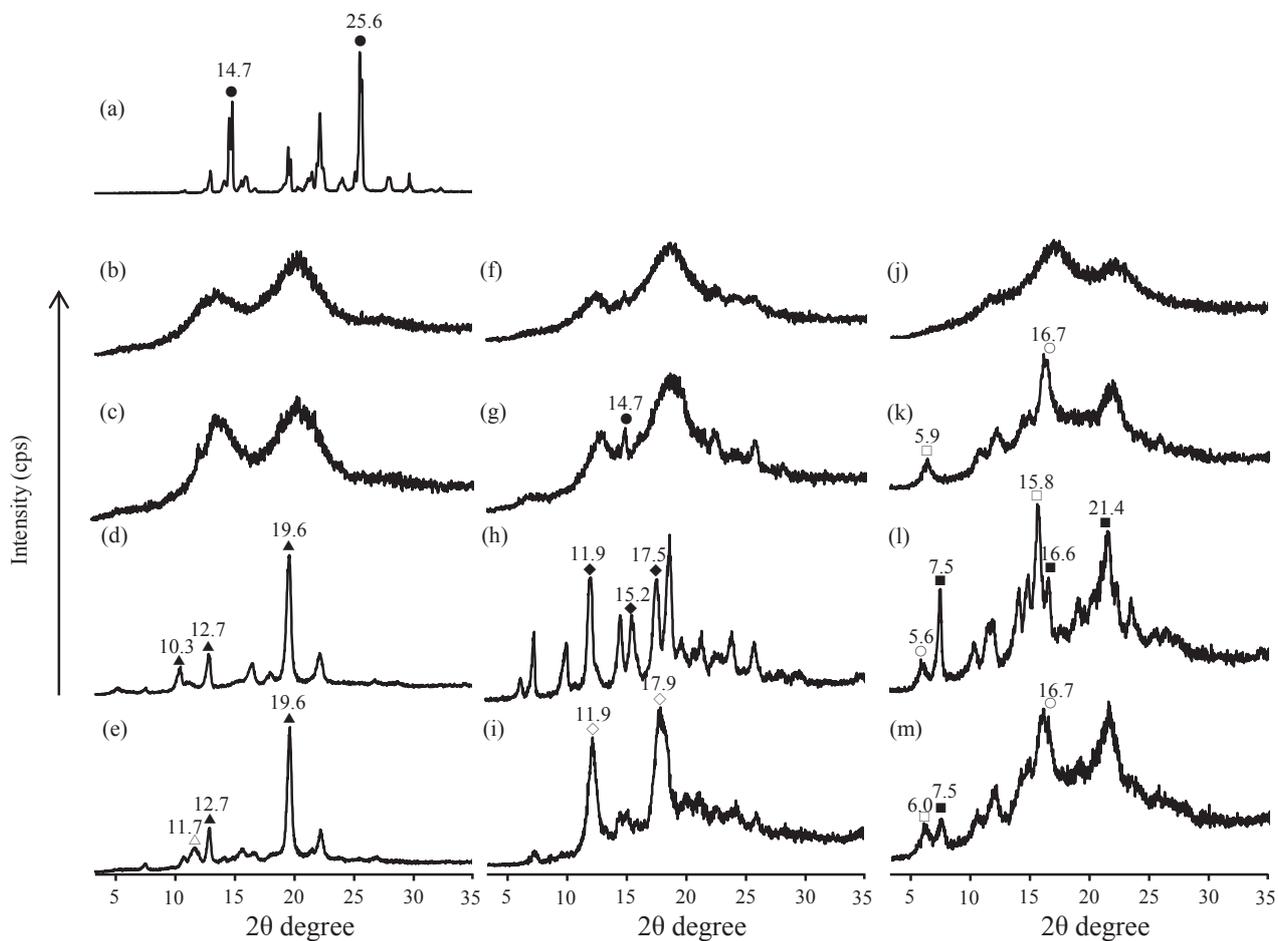


Fig. 14. Changes in the PXRD patterns of PP/CD complex systems: (a) PP, (b) GM (PP/ α CD=1/2), (c) heated GM (PP/ α CD=1/2), (d) humidified GM (PP/ α CD=1/2), (e) humidified-heated GM (PP/ α CD=1/2), (f) GM (PP/ β CD=1/1), (g) heated GM (PP/ β CD=1/1), (h) humidified GM (PP/ β CD=1/1), (i) humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1), (j) GM (PP/ γ CD=1/1), (k) heated GM (PP/ γ CD=1/1), (l) humidified GM (PP/ γ CD=1/1), (m) humidified-heated GM (PP/ γ CD=1/1). (●) PP, (▲) channel (wet), (△) channel (dried), (◆) head-to-tail, (◇) cage type, (○) monoclinic, (□) hexagonal, (■) tetragonal.

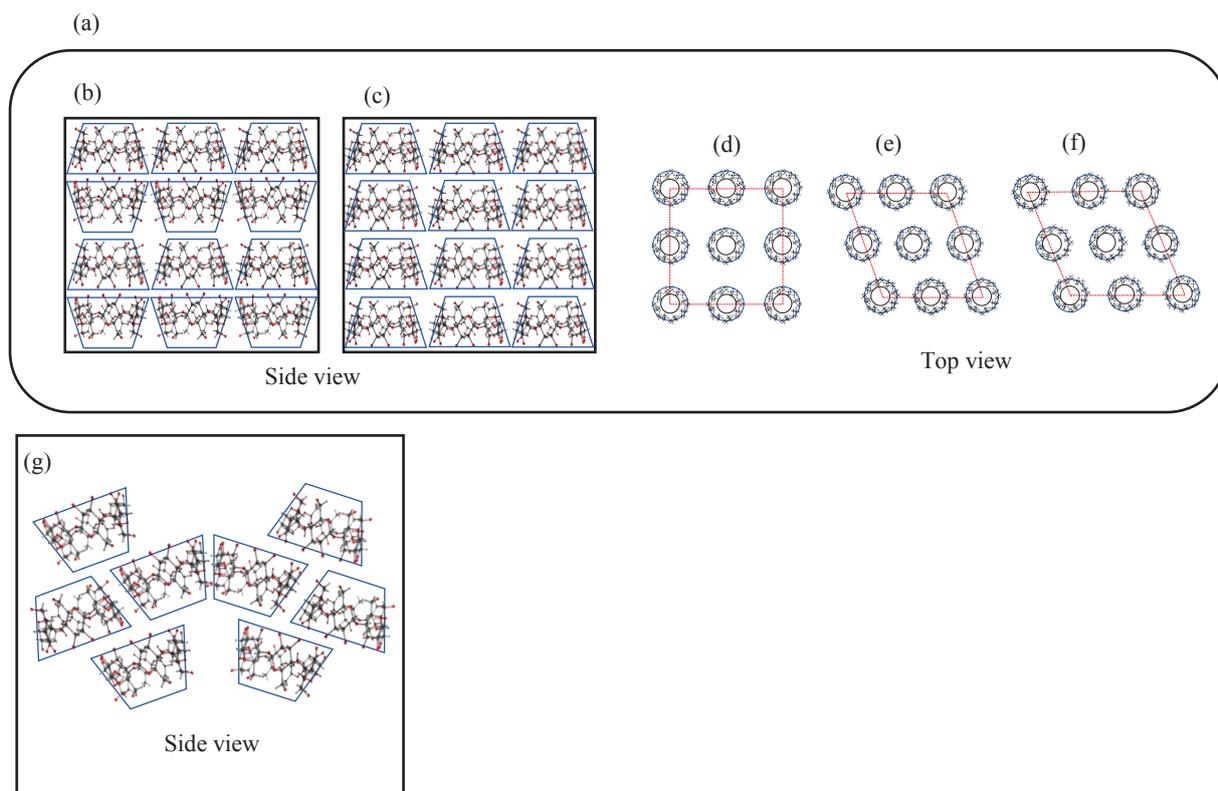


Fig. 15. Structural view of different crystalline arrangements: (a) Chanel-type, (b) head-to-head, (c) head-to-tail, (d) tetragonal, (e) monoclinic, and (f) hexagonal; and (g) cage-type.

2-10 PP/CD 包接複合体における近赤外線測定による分子状態の評価

GM で調製された非晶質の PP/CD 包接複合体を水分子の吸着に応じて変化した結晶状態は、PP と CD 間の相互作用が異なる可能性がある。CD 中に含まれる PP の分子運動性を評価することができれば、2-8 で確認された各種包接複合体中の PP の共役系の違いや 2-9 で確認された調製方法の違いによる結晶性の影響を評価することができ、PP の包接複合体形成に関わる重要な包接部位の理解に繋がる。複合体の組織化と分子の存在状態の関係を明らかにするためには、CH や OH の運動性を確認することが重要であるため、近赤外吸収スペクトル (NIR) 測定を用いて、固体状態の PP 分子の運動性変化について観測した。

PP の CH₂ ピークは 5712, 5920, 8364 および 8668 cm⁻¹ に観測される。また、PP の幾何異性体の共役型二重結合の CH ピークは 5848, 6004 cm⁻¹ および 8456 cm⁻¹ に観測された。また、PP の芳香環 CH は 8816 cm⁻¹ に観測された。次に、PP は構造中に OH 基を有しておらず、脂溶性薬物であることから、5300-5000 および 7200-6900 cm⁻¹ に水分子および OH 基のピークは観測されなかった。(Table 1, Fig. 16-17)。αCD は C₂-OH (5180, 7056 cm⁻¹)、C₆-OH (6984 cm⁻¹)、αCD の free water (5244 cm⁻¹) が観測された (Fig. 16)。βCD の C₂-OH は水分子を吸着しやすい⁴³⁾ ため、5188 cm⁻¹ で観測された。また、βCD の C₆-OH および free water のピークが 6960 cm⁻¹、5256 cm⁻¹ に観測された (Fig. 17)。γCD は分子が同一平面状にあるため、OH 基は柔軟であり水分子に容易に近づく性質を持つ。そのため、C₂-OH (5164, 7024 cm⁻¹)、C₆-OH (6972 cm⁻¹)、γCD の free water (5240 cm⁻¹) のピークが観測された (Fig. 18)。

αCD の系において、GM (PP/αCD=1/2) は PP 単独と比較して CH₂ ピーク (8364 および 8668 cm⁻¹) が低波数側へシフトし、幾何異性体の共役型二重結合および芳香環の CH ピーク (8456 cm⁻¹, 8816 cm⁻¹) の振動性が低下していることから、

複合体形成により PP の分子運動性が固定化されたことにより、共役系に影響し、PP のアミドまたはカルボニル基が歪む状態で CD 中に包接された可能性が示唆された (Fig. 16-a-1)。humidified GM (PP/ α CD=1/2) では GM (PP/ α CD=1/2) と比較して、CH₂ ピーク (5712 cm⁻¹, 5920 cm⁻¹, 8364 cm⁻¹ および 8668 cm⁻¹) の運動性の低下および付近の芳香環 CH ピーク (8816 cm⁻¹) および幾何異性体の共役型二重結合 CH ピーク (6004 cm⁻¹) のブロード化が観測された (Fig. 16-a, c)。この PP の分子運動性の変化は非晶質である GM (PP/ α CD=1/2) が humidified GM (PP/ α CD=1/2) でカラム構造に変化し、 α CD 同士の水素結合を形成しやすい距離にシフトしたことが寄与したものと考えられる。さらに humidified-heated GM (PP/ α CD=1/2) は humidified GM (PP/ α CD=1/2) と比較して、幾何異性体の共役型二重結合の CH(8456 cm⁻¹) がより低波数側へシフトしていることが確認された。humidified GM (PP/ α CD=1/2) は head-to-head の結晶構造を有する。一方で humidified-heated GM (PP/ α CD=1/2) は乾燥した際に現れる head-to-head および head-to-tail が混在した結晶回折パターンが確認される。humidified GM (PP/ α CD=1/2) および humidified-heated は GM (PP/ α CD=1/2) と比較して、CH₂ および芳香環の CH ピークのブロード化が観測されている (Fig. 16-a)。GM (PP/ α CD=1/2) humidified-heated は α CD 同士の水素結合距離が近づき固定化されることで、PP の幾何異性体の共役型二重結合の分子運動性がより低下することが示唆された。すなわち humidified GM (PP/ α CD=1/2) および humidified-heated は PP のメチレンジオキシフェニルグループ (芳香環部分) と α CD との相互作用により、共役系が影響を受けて、アミドまたはカルボニル基が PP 単独と似た歪みに近づいたことにより、蛍光波長が短波長側へシフトしたものと考えられる (Fig. 13)。

次に OH 基の運動性について着目した。GM (PP/ α CD=1/2) は α CD 単独と比較して

α CD の free water (5244 cm^{-1}) が減少したことが観測された (Fig. 16)。 $\text{C}_2\text{-OH}$ ($5180, 7056\text{ cm}^{-1}$) および $\text{C}_6\text{-OH}$ (6984 cm^{-1}) はブロード化し、 7056 cm^{-1} の $\text{C}_2\text{-OH}$ ピークが低波数側へシフトしていることが観測された (Fig. 16)。 α CD 中の 4 ユニットのグルコースは $\text{C}_2\text{-OH}$ と $\text{C}_3\text{-OH}$ 間で水素結合に寄与することが報告されている³⁷⁾。 α CD 中の free water が減少したのにも関わらず、 $\text{C}_2\text{-OH}$ ピークが α CD と比較してより低波数側へシフトしたことから、複合体形成により PP と $\text{C}_2\text{-OH}$ が水素結合に寄与していることが示唆された。humidified GM (PP/ α CD=1/2) では GM (PP/ α CD=1/2) と比較して、 $\text{C}_2\text{-OH}$ 、 $\text{C}_6\text{-OH}$ 、free water のピークがよりブロード化していることが観測された (Fig. 16)。これは α CD が PP のみならず、 α CD 同士の水素結合ネットワークの形成が示唆された。humidified-heated GM (PP/ α CD=1/2) は humidified GM (PP/ α CD=1/2) と比較して、 7056 cm^{-1} 付近の $\text{C}_2\text{-OH}$ ピークがわずかに低波数側へブロード化している。そのため水分子の減少によって α CD 同士の距離は近くなり、水素結合形成が強くなったことが示唆された。

Table 1. Near infrared spectroscopy

	Assignment	Wavenumber (cm ⁻¹)
PP	CH ₂	5712, 5920, 8364, 8668
	Aromatic CH	5848, 6004, 8456
	Conjugated diene CH	8816
αCD	C ₂ -OH	5180, 7056
	C ₆ -OH	6984
	Free water	5244
βCD	C ₂ -OH	5180, 7056
	C ₆ -OH	6984
	Free water	5244
γCD	C ₂ -OH	5180, 7056
	C ₆ -OH	6984
	Free water	5244

α CD

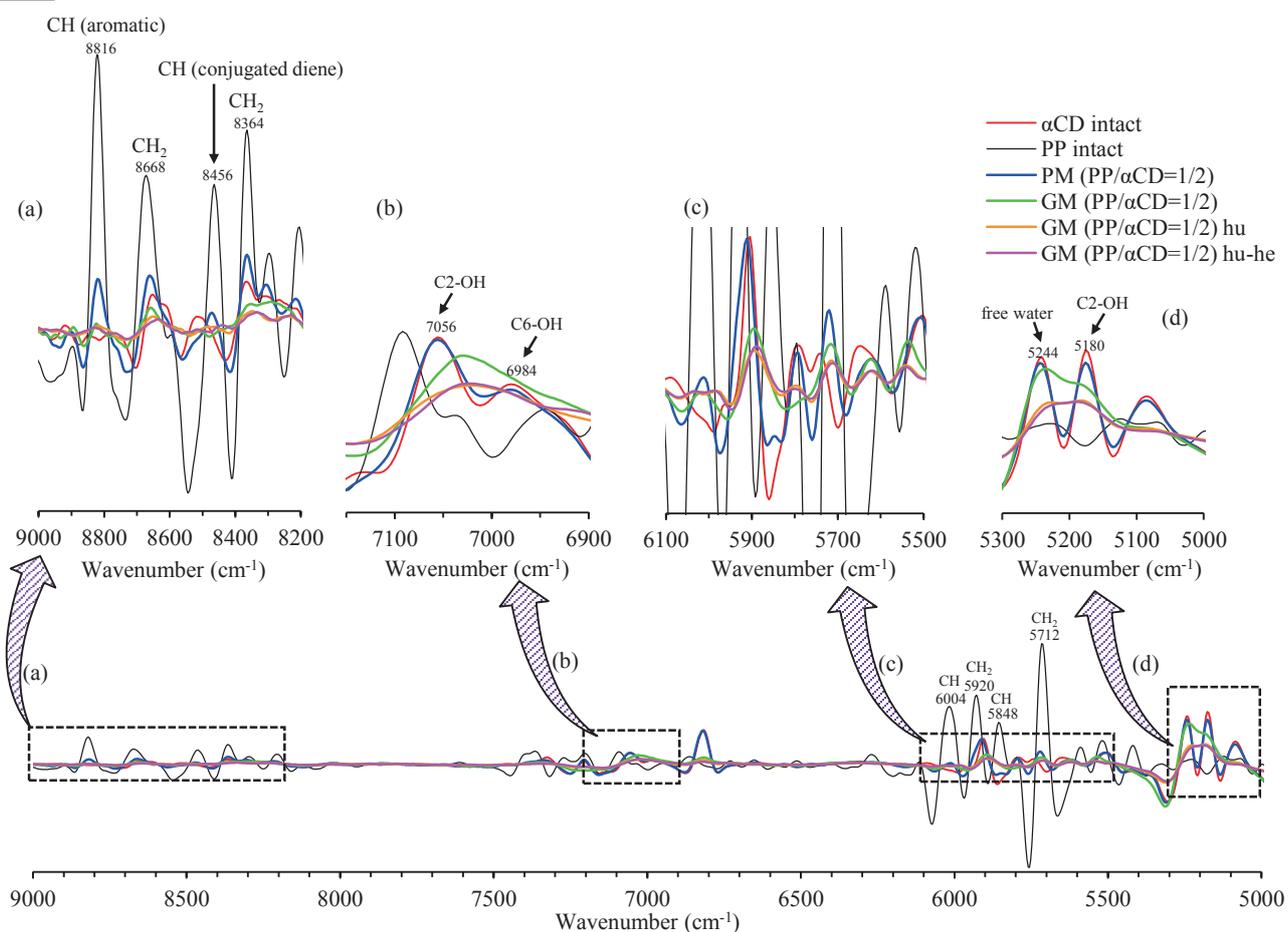


Fig. 16. Second-derivative NIR absorption spectra of PP/ α CD systems: (a), 9000–8200 cm^{-1} ; (b), 7150–6900 cm^{-1} ; (c), 6100–5500 cm^{-1} ; and (d), 5300–5000 cm^{-1} . Abbreviations: humidified (hu), heated (he), humidified-heated (hu-he).

β CD の系において、GM (PP/ β CD=1/1) は、PP 単独と比較して幾何異性体の共役型二重結合 CH ピーク (5848, 6004, 8456 cm^{-1}) が低波数側へシフトしていることが観測された。さらに PM (PP/ β CD=1/1) と比較して、芳香環の CH ピーク (8816 cm^{-1}) の吸収ピークが低下しており、複合体形成によって PP の分子運動性が抑制されたと考えられる (Fig. 17-a, c) 。 humidified GM (PP/ β CD=1/1) は GM (PP/ β CD=1/1) と比較して、 CH_2 ピーク (5712, 5920 cm^{-1}) の吸収強度の低下および芳香環の CH (8816 cm^{-1}) が低波数側へシフトすることが観測されたため、吸収強度の低下やピークシフトから β CD 間の水素結合および van der Waals 力により乱雑性が低下したことが示唆され、カラム型の組織化状態をとっていると考えられた。また、 humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) は humidified GM (PP/ β CD=1/1) と比較して幾何異性体の共役二重結合の CH ピーク (5848 cm^{-1}) がブロード化しているため、 β CD 同士の距離が近くなることで PP の幾何異性体の共役型二重結合の分子運動性が低下し、ケージ型構造への組織化状態をとっていると考えられた。さらに humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) は幾何異性体の共役二重結合の CH ピーク (5848 cm^{-1}) をブロード化することにより、 humidified GM (PP/ α CD=1/2) および humidified-heated の蛍光極大波長に近づく関係であることが示唆された。すなわち、PP のメチレンジオキシフェニルグループならびに共役二重結合 CH の分子運動性を強く抑制させることは、PP を固定化させ、蛍光消光に寄与することが示唆された。

次に OH 基の運動性について着目した。GM (PP/ β CD =1/1) では、 β CD 単独と比較して β CD の free water (5256 cm^{-1}) のピークが減少し、 C_2 -OH のピークが 7032 cm^{-1} に出現し、 C_6 -OH (6960 cm^{-1}) のピークの消失が観測された (Fig. 17)。 β CD はグルコースの C_2 と C_3 -OH で強い水素結合を有し、水分子の吸着および分子運動性の低下により、吸収強度が低下する。これは GM (PP/ β CD =1/1) の C_2 -OH

と水分子との吸着状態は β CD が PP を包接することで低下したと考えられる。humidified GM (PP/ β CD=1/1) は GM (PP/ β CD=1/1) と比較して、 β CD の free water (5256 cm^{-1}) が低下し $\text{C}_2\text{-OH}$ ピーク (7032 cm^{-1}) がよりシャープになることが観測された。すなわち、 $\text{C}_2\text{-OH}$ との水分子吸着が減少し、PP と β CD および β CD 同士の水素結合の形成が示唆された。さらに humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) は humidified GM (PP/ β CD =1/1) と比較して free water (5256 cm^{-1}) が減少し、 $\text{C}_2\text{-OH}$ ピーク (5188 cm^{-1}) が高波数側へシフトすることが観測された。 β CD 複合体の結晶構造である cage 型は CD の外側に位置する水分子が減少することで、CD 間の距離が近くなり、強い van der Waals 力と弱い水素結合を示す。カラム型である head-to-tail は弱い van der Waals 力と中程度の水素結合を示すことが報告されている。したがって、humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) は水素結合の低下により $\text{C}_2\text{-OH}$ ピークが高波数側へシフトしたことが示唆された。

β CD

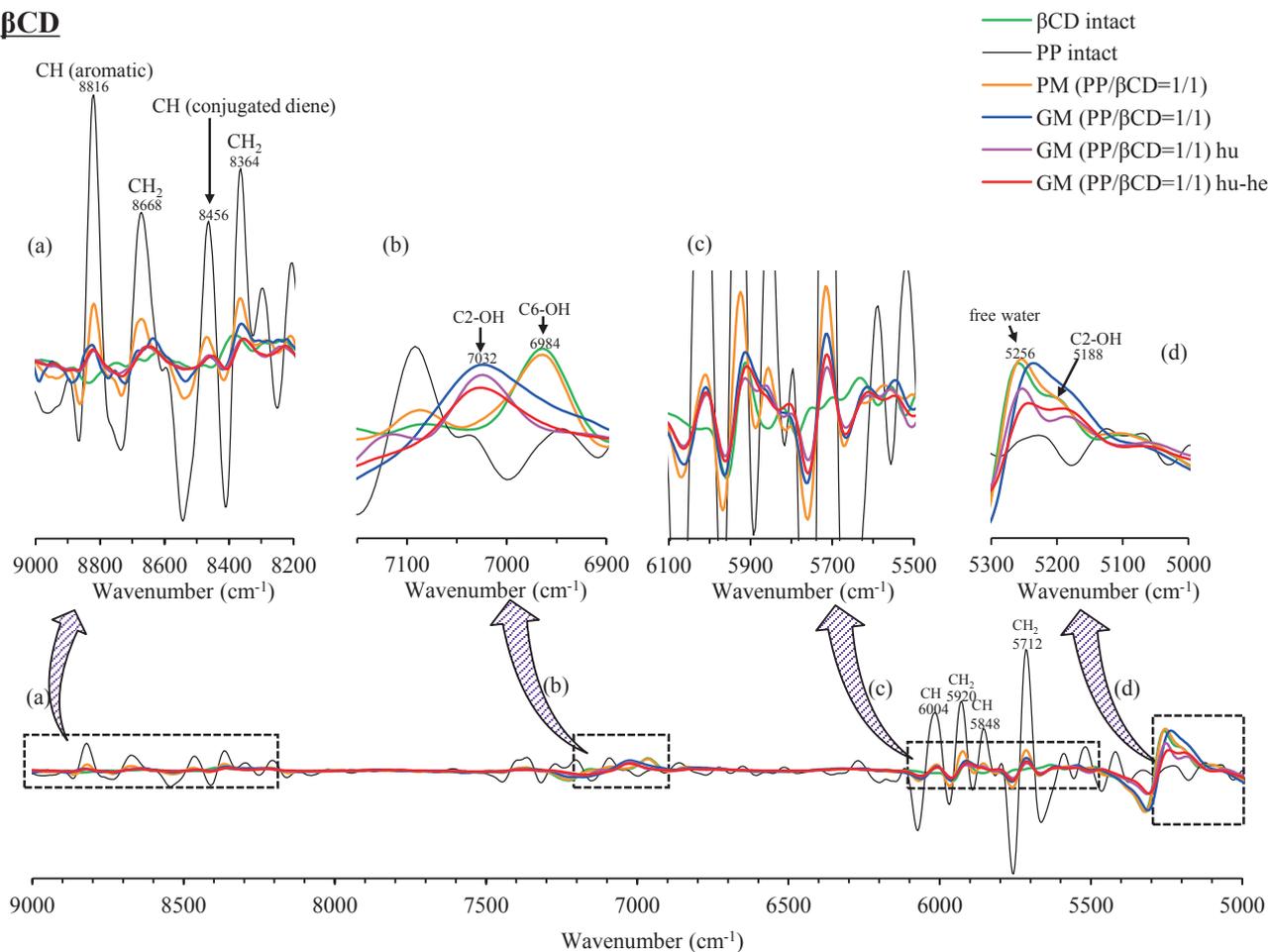


Fig. 17. Second-derivative NIR absorption spectra of PP/ β CD systems: (a), 9000–8200 cm^{-1} ; (b), 7150–6900 cm^{-1} ; (c), 6100–5500 cm^{-1} ; and (d), 5300–5000 cm^{-1} .

Abbreviations: humidified (hu), heated (he), humidified-heated (hu-he).

γ CD 系において、GM (PP/ γ CD=1/1) は、PP 単独と比較して CH₂ ピーク (8364, 8668 cm⁻¹) および幾何異性体の共役型二重結合の CH ピーク (5848, 8456 cm⁻¹) のブロード化および低波数側のシフトが確認された (Fig. 18-a, c)。また、芳香環の CH ピーク (8816 cm⁻¹) が高波数側へシフトすることが観測された (Fig. 18-a)。複合体形成により PP の分子運動性の抑制が示唆された。humidified GM (PP/ γ CD=1/1) では GM (PP/ γ CD=1/1) と比較して、CH₂ ピーク (5712, 8364 and 8668 cm⁻¹) の吸収強度が低下し、また高波数側へシフトすることが観測された (Fig. 18-a, c)。これは GM (PP/ γ CD=1/1) の結晶状態が非晶質状態であるのに対し、humidified GM (PP/ γ CD=1/1) はカラム型構造に変化しているため、 γ CD 同士の水素結合の形成および van der Waals 力の変化により、PP の分子運動性の変化に寄与したものと推察された。humidified-heated GM (PP/ γ CD=1/1) では humidified GM (PP/ γ CD=1/1) と比較して同様のメチル基の相互作用が観測された。すなわち、チャンネル型の結晶状態でも γ CD の環状サイズでは PP の分子挙動を顕著に変化させないことが確認された。これらの結晶構造変化による PP の分子運動性は GM (PP/CDs) の結晶構造が非晶質からカラム型の humidified GM (PP/CDs) へシフトした際に大きく変化する。humidified GM (PP/CDs) から熱をかけた humidified-heated GM (PP/ γ CD) の結晶構造が変化しても PP 運動性は変化しない。一方で、humidified-heated GM (PP/ α CD=1/2) および humidified-heated GM (PP/ β CD=1/1) は容易に PP の運動性が変化することが確認された。PP の芳香環およびペンタジエン鎖の運動性は環状サイズの小さい α CD、次に β CD が抑制しているため、CD の環状サイズに依存していることが明らかとなった。また、PP/CD 包接化合物の平衡定数は PP/ α CD > PP/ β CD > PP/ γ CD の順で高い事が第 1 節にて確認された。これは PP のエーテル基の水酸基と水素結合がしやすい CD の空洞径が寄与している。この結晶構造の変化に依存した相互作用は PP の

分子運動の固定化に適した CD が α CD または β CD であることを示している。

次に OH 基の運動性について着目した。GM (PP/ γ CD =1/1) では、 γ CD 単独と比較して C₆-OH (6960 cm⁻¹) のピークが低波数側へブロード化し、C₂-OH ピーク (5164, 7024 cm⁻¹) はブロード化および高波数側へのシフトが観測された (Fig. 18)。この OH ピークの変化は、包接複合体形成により C₂-OH の水素結合の低下および C₆-OH が PP と水素結合に関与したことが推察された。humidified GM (PP/ γ CD =1/1) では、 γ CD 同士の水素結合ネットワークが形成されたため、GM (PP/ γ CD =1/1) と比較して、 γ CD の free water (5240 cm⁻¹) の低下および C₆-OH (6972 cm⁻¹) および C₂-OH ピーク (5164, 7024 cm⁻¹) のブロード化が観測されたものと考えられる。humidified-heated GM (PP/ γ CD =1/1) は humidified GM (PP/ γ CD =1/1) と比較して free water は変化せず、C₂-OH ピークが高波数側へシフトしたことから、水素結合の低下により、組織化されたカラム型の結晶構造が変化していることが示唆され、Fig. 14 の結晶回折ピークの変化に基づく結果が得られた。humidified GM (PP/ γ CD =1/1) および humidified-heated GM (PP/ γ CD =1/1) の PP の芳香環および幾何異性体の共役型二重結合の CH 基の相互作用に大きな変化は観測されず、 γ CD の C₂-OH の運動性が異なることが観測された (Fig. 18-c)。すなわち、GM (PP/ γ CD =1/1) から humidified GM (PP/ γ CD =1/1) および humidified-heated GM (PP/ γ CD =1/1) へと結晶構造が変化しても PP のメチレンジオキシフェニル基の芳香環 CH の分子運動性が α および β CD 複合体と比較して変化しない特徴は、 α 、 β および γ CD の水分吸着ならびに結晶化のしやすさや、CD の空洞サイズに依存して PP 分子を固定化する相互作用の違いが寄与していると考えられる。

γ CD

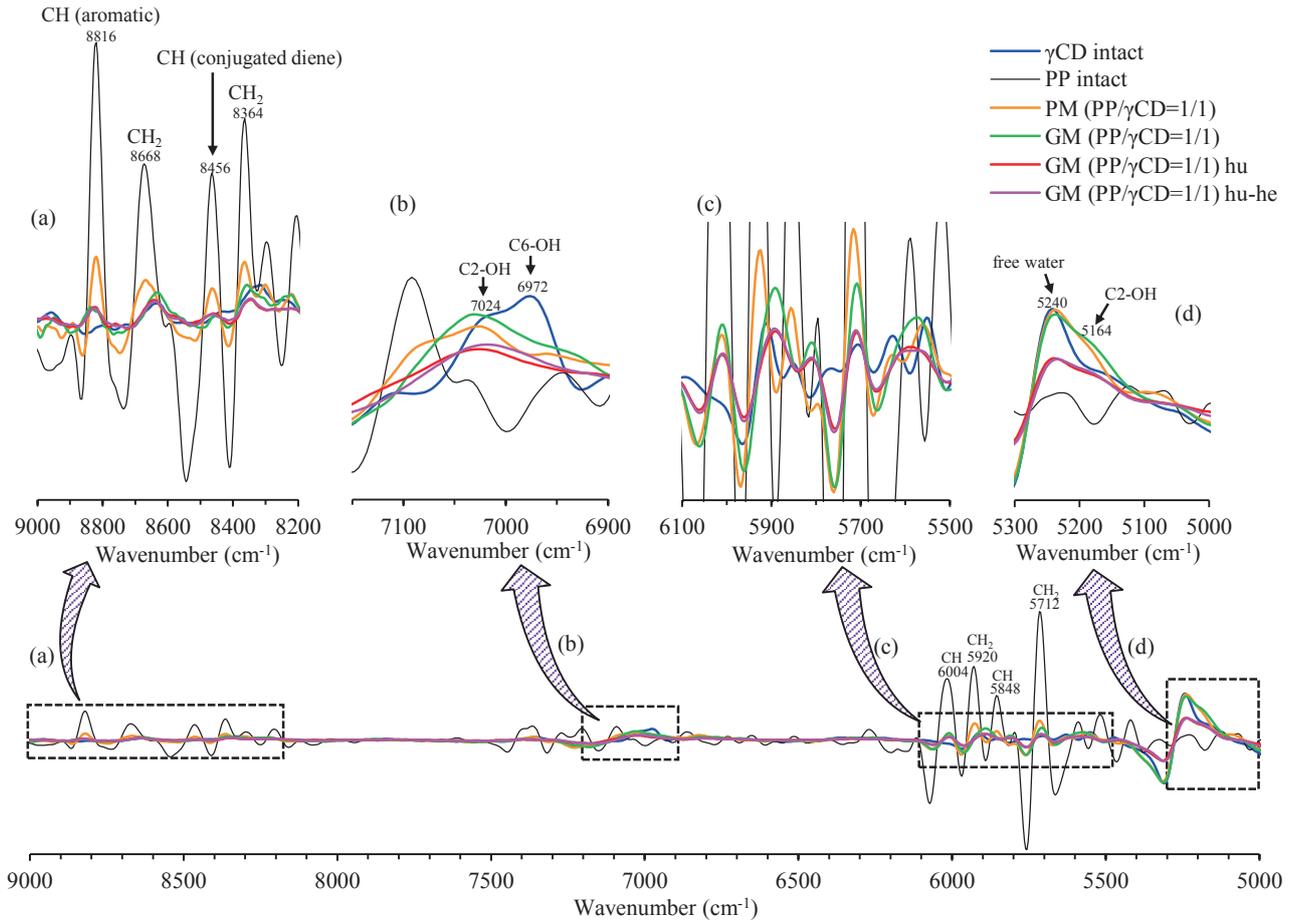
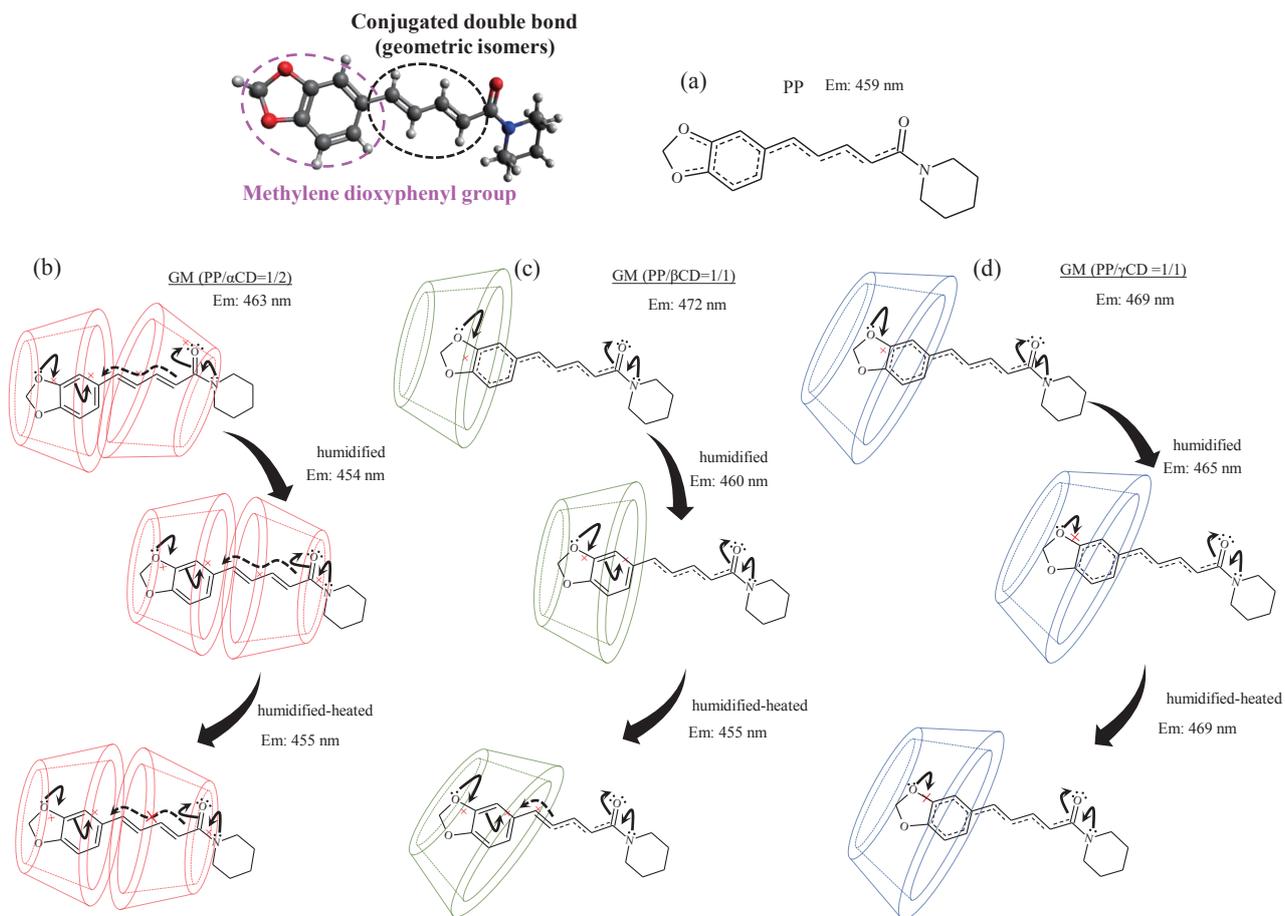


Fig. 18. Second-derivative NIR absorption spectra of PP/ γ CD systems: (a), 9000–8200 cm⁻¹; (b), 7150–6900 cm⁻¹; (c), 6100–5500 cm⁻¹; and (d), 5300–5000 cm⁻¹. Abbreviations: humidified (hu), heated (he), humidified-heated (hu-he).

α CD および β CD 包接複合体中の PP の蛍光極大波長が調湿、調湿後加熱によって PP 単独の蛍光極大波長に近づく理由は、PP のメチレンジオキシフェニル基 (芳香環 CH) を CD が包接することで、分子運動を固定化されて、共役系に寄与したと考えられる (Scheme 1)。これらの結果から、PP の窒素基からエーテル基にかけての共役は、メチレンジオキシフェニル基の芳香環 CH の運動性に依存しており CD の違いによって PP 同士の芳香環部分における π - π 相互作用が抑制される強さが異なり、PP のアミドやカルボニル基にかけての歪みに影響する。しかし、PP の芳香環との密接な相互作用を示す α CD および β CD は水分子の配位などにより組織化された結晶構造の場合、PP 分子の芳香環を密接に固定化するため、アミドやカルボニル基の歪みは非晶質な結晶状態から組織化された結晶構造との PP の分子形態が異なることが予想される。よって、この分子挙動の変化は PP の芳香環の運動性の違いが、共役系に影響することを意味しており、アミド基の電子状態やピペリジンの環の歪みを引き起こしている可能性が示唆された。



Scheme 1. Changes in the molecular state of PP upon ground mixing with different CDs: (a) PP, (b) GM (PP/ α CD = 1/2), (c) GM (PP/ β CD = 1/1), (d) GM (PP/ γ CD = 1/1)

2-11 PP との比較を目的とした PP 誘導体の合成と単結晶 X 線回折測定による結晶構造の比較

2-8 から 2-10 において、PP の窒素基からエーテル基にかけての共役はメチレンジオキシフェニル基の芳香環 CH の運動性に依存しており、CD との包接複合体形成に重要な因子であることが証明された。また、この PP と CD との包接挙動において、アミド基の電子状態やピペリジンの環の歪みが関係している可能性が示唆された。そこで、PP のアミド基の電子密度やピペリジンの環の歪みが CD との包接に影響するのか証明するために、第 1 章 2-11 から 2-15 では、PP 同士の π - π 相互作用や PP のアミドやカルボニル基にかけての歪みの違いを有する可能性のある、PP のピペリジン環をピロリジンやシクロヘキサンに置換させた新規 PP 誘導体を用いて、PP との結晶構造の違いおよび CD との包接複合体および包接化合物形成における相互作用について評価することとした。

PP は芳香環、ペンタジエン鎖、アミド基が平面に位置する場合、PP のペンタジエン鎖には、電子が容易に供与され、アミドカルボニル基の伸縮振動に影響を与える³⁷⁾。この特性は PP の芳香環およびペンタジエン鎖に CD が包接すると、アミドカルボニル基の伸縮性が低下するため、アミド基の電子状態が変化することが予想される。この PP と CD の物理化学的性質から、PP のアミド基が PP と CD との包接複合体を形成する上で重要であることが予想される。

そこで、アミド基の性質の違いが、PP と CD の包接化現象に影響することをより詳細に評価するために、単結晶 X 線回折測定を用いて、PP のアミド基の窒素上の置換基を変化させた PP 誘導体 (PPD1 および PPD2) の構造特性 (結晶構造、形状、分子間相互作用など) を理解することとした。

PPD1 は、単斜晶系空間群 P21/c で結晶化し、単位格子あたり 4 分子 (Z=4) 存在する (Table 2)。C1-C6 シクロヘキサン環は、赤道方向に C5-N1 結合を持つ椅子型立体配座を示している。C7-C12 / O2 / O3 (メチレンジオキシフェニル基)

は平面であり、シクロヘキサン環との二面角 21.57° の範囲内に位置している (Fig. 19)。PPD1 のアミド、ペンタジエン、メチレンジオキシフェニル部分の結合距離と角度は、PP の報告されている 3 つの多形と同等のデータを示したことが確認された (Table 3)。PPD2 は、単位格子あたり 8 分子存在し、斜方晶系空間群 *Pbca* で結晶化することが確認された (Table 2)。C13–C16 / N1 環は、C14 と C15 が C13 / N1 / C16 からそれぞれ 0.205 と -0.382 \AA ずれたねじれた構造が確認された (Fig. 20)。C13–C16 / N1 環と C6–C12 / O2 / O3 (メチレンジオキシフェニル基) のすべての原子間の二面角は 12.29° であることが確認された。これらの結果から、PPD1 および PPD2 は PP と同様にアミド基からメチレンジオキシフェニル基のエーテル酸素まで広がる共役系に関して共通点を確認された。

PP とは異なる化学的な特徴として、PPD1 は、芳香環の π - π 相互作用は確認されず、*a* 軸に沿った結晶のパッキングを示す Fig. 21 では、互いの分子が N1-HO1 間で水素結合を形成していることが確認された (Table 4)。PPD2 は PP と異なる π - π 相互作用が C9-C9 (3.268 \AA)、C9-C12 (3.322 \AA)、C11-C12 (3.287 \AA) に確認された (Fig. 22)。

PPD1 および PPD2 は PP と同様にメチレンジオキシフェニル基、ペンタジエン鎖、アミド基にかけて共役系が存在するが、アミド置換基が PP と異なると、芳香環の π - π 相互作用の性質に影響することが確認された。よって、PP 誘導体を用いて CD と包接複合体を調製することは、PP のアミド基や芳香環の共役系の違いが、包接化に影響するのかを判断できる可能性があることが示唆された。

Table 2. Experimental details of piperine derivatives.

Experimental details	PPD1	PPD2
Crystal data		
Chemical formula	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃
M_r	299.36	271.3
Crystal system, space group	Monoclinic, P2 ₁ /c	Orthorhombic, Pbca
Temperature	90 (2)	90 (2)
a, b, c (Å)	11.4982 (7), 5.0086 (3), 26.7240 (16)	11.8747(10), 7.2485(6), 30.392(2)
V (Å ³)	1525.22(16)	1525.22(16)
Z	4	8
Radiation type	Mo K α	Mo K α
μ (mm ⁻¹)	0.088	0.095
Crystal size (mm)	0.584 × 0.071 × 0.065	0.060 × 0.064 × 0.284 mm
Data collection		
Diffractometer	Bruker D8 goniometer	Bruker D8 goniometer
Absorption correction	Multi-scan (<i>SADABS-2016/2</i>)	Multi-scan (<i>SADABS-2016/2</i>)
T_{\min}, T_{\max}	0.5802, 0.7467	0.6664, 0.7459
No. of measured, independent and observed [$F^2 > 2.0\sigma(F^2)$] reflections	27741, 4862, 4204	41504, 3506, 2193
R_{int}	0.1157	0.1088
$(\sin \theta/\lambda)_{\text{max}}$ (Å ⁻¹)	0.7245	0.6848
Refinement		
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0.0488, 0.1211, 1.066	0.0502, 0.1433, 1.046
No. of reflections	4862	3506
No. of parameters	202	182
No. of restraints	0	0
H-atom treatment	Mixed	Mixed
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0.421, -0.262	0.282, -0.258

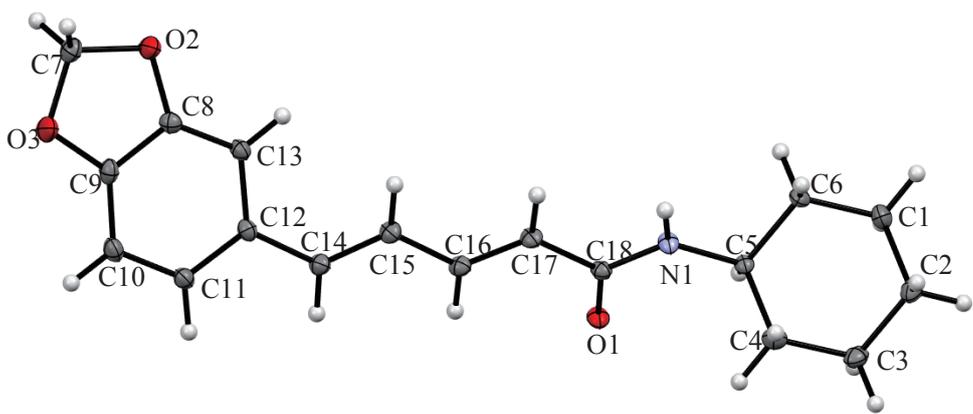
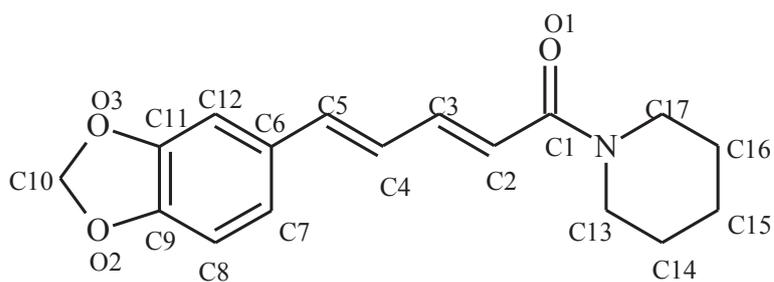


Fig. 19 Displacement ellipsoid drawing at a 50% probability level of the crystallographically independent units of the molecular structure of the PPD1.

Table 3. Key geometrical parameters (Å) for the piperine derivatives and piperine polymorphs.

	PPD1 (C ₁₈ H ₂₁ NO ₃)	PPD2 (C ₁₆ H ₁₇ NO ₃)	PP form I	PP form II	PP form III
Amide	N1-C18 (1.344Å)	N1-C1 (1.350Å)	N1-C1 (1.331Å)	N1-C1 (1.363Å)	N1-C1 (1.353Å)
	O1-C18 (1.242Å)	O1-C1 (1.243Å)	O1-C1 (1.218Å)	O1-C1 (1.235Å)	O1-C1 (1.482Å)
Pentadiene	C14-C15 (1.346Å)	C4-C5 (1.345Å)	C4-C5 (1.312Å)	C4-C5 (1.330Å)	C4-C5 (1.347Å)
	C15-C16 (1.444Å)	C3-C4 (1.441Å)	C3-C4 (1.437Å)	C3-C4 (1.440Å)	C3-C4 (1.442Å)
	C16-C17 (1.342Å)	C2-C3 (1.341Å)	C2-C3 (1.311Å)	C2-C3 (1.332Å)	C2-C3 (1.341Å)
	C17-C18 (1.479Å)	C1-C2 (1.480Å)	C1-C2 (1.473Å)	C1-C2 (1.477Å)	C1-C2 (1.482Å)
Methylenedioxyphenyl	C8-C9 (1.390Å)	C6-C7 (1.397Å)	C6-C7 (1.387Å)	C6-C7 (1.399Å)	C6-C7 (1.403Å)
	C8-C13 (1.371Å)	C6-C12 (1.412Å)	C6-C12 (1.396Å)	C6-C12 (1.414Å)	C6-C12 (1.412Å)
	C9-C10 (1.374Å)	C7-C8 (1.403Å)	C7-C8 (1.393Å)	C7-C8 (1.395Å)	C7-C8 (1.393Å)
	C10-C11 (1.402Å)	C8-C9 (1.369Å)	C8-C9 (1.343Å)	C8-C9 (1.360Å)	C8-C9 (1.371Å)
	C11-C12 (1.399Å)	C9-C11 (1.385Å)	C9-C11 (1.357Å)	C9-C11 (1.377Å)	C9-C11 (1.381Å)
	C12-C13 (1.412Å)	C11-C12 (1.364Å)	C11-C12 (1.364Å)	C11-C12 (1.370Å)	C11-C12 (1.367Å)
	O2-C8 (1.371Å)	O2-C9 (1.378Å)	O2-C9 (1.373Å)	O2-C9 (1.383Å)	O2-C9 (1.378Å)
O3-C9 (1.370Å)	O3-C11 (1.376Å)	O3-C11 (1.362Å)	O3-C11 (1.380Å)	O3-C11 (1.383Å)	
π -stacking close contacts		C9-C11 (3.268Å)		C8-C8 (3.110Å)	C9-C12 (3.327Å)
		C9-C12 (3.322Å)		C8-C8 (3.303Å)	
		C11-C12 (3.287Å)			



Chemical structure of PP

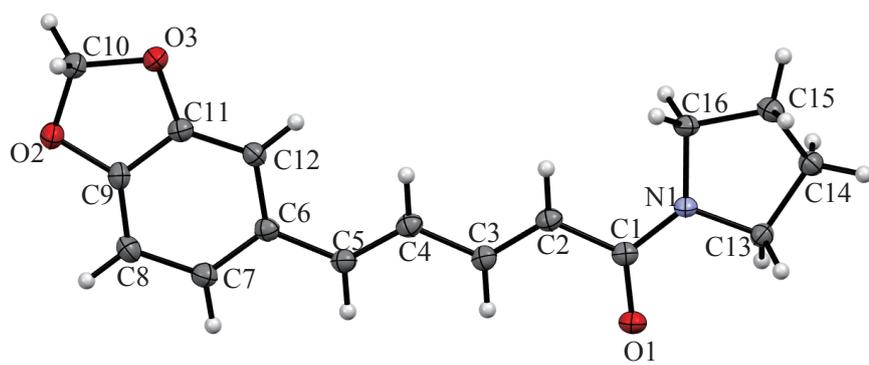


Fig. 20. Displacement ellipsoid drawing at a 50% probability level of the crystallographically independent units of the molecular structure of the PPD2.

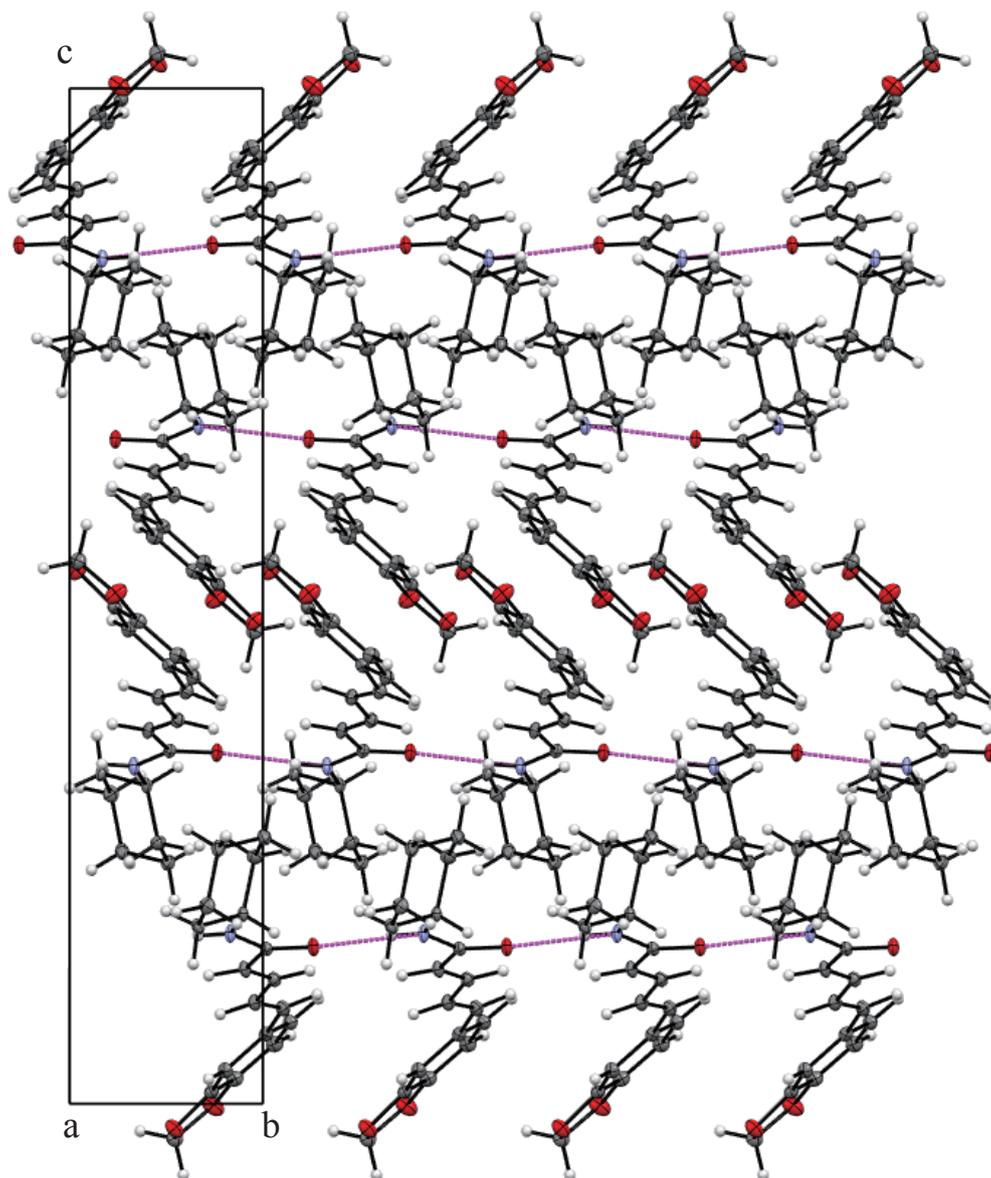


Fig. 21. A view along the *a* axis of the crystal packing of the title compound. The N — H···O hydrogen bonds are drawn as dashed lines (see Table 4).

Table 4. Hydrogen-bond geomet (Å, °)

	N1—H1	H1···O1	N1···O1	N1—H1···O1
N1—H1···O1	0.874(16)	2.086(16)	2.9547(12)	172.8(14)

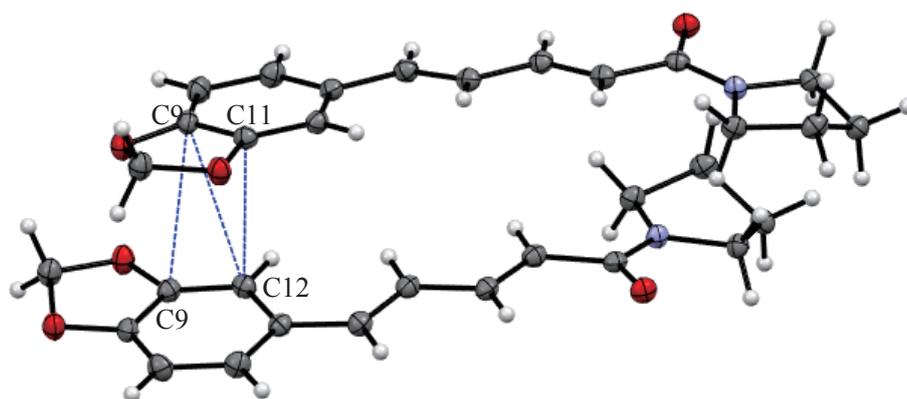


Fig. 22. A view of Piperilyn and Piperilyn π - π stacking (see Table 3) .

2-12 PP 誘導体/CD 包接複合体における結晶状態および熱的挙動の評価

PP 誘導体/CDs との GM における結晶状態の変化を確認するために PXRD を実施した。また、新規化合物は融解温度または分解温度による熱エネルギーの情報が少ないため、熱重量測定と熱エネルギー変化を観測できる熱重量示差熱分析 (TG-DTA) 測定を実施した (Fig. 23-26)。

PPD1 は $2\theta=6.4^\circ, 12.8^\circ, 20.0^\circ$ 付近に特有の結晶回折ピーク、 166°C に融点および 202°C から 350°C にかけて 51%の重量が減少した誘導体の分解が観測された (Fig.23-24)。PPD2 は $2\theta=11.5^\circ, 13.7^\circ, 18.9^\circ$ 付近に特有の結晶回折ピーク、 140°C に融点および重量減少が観測された (Fig. 25-26)。水素結合を形成している PPD1 は PP の融点 (130°C 付近) と比較して融解温度が高く、PPD2 は PP と似た π - π 相互作用を示す特徴があるため、比較的、融解温度は近いことが観測された。それぞれの PP 誘導体は PP 単独と異なる結晶性および熱的性質が観測された。GM によって調製した GM (PPD1/ α CD=1/1)、GM (PPD2/ α CD=1/1)、GM (PPD1/ β CD=1/1)、GM (PPD2/ β CD=1/1) はゲスト分子の特有の結晶回折ピークは観測されず、融点は消失し、熱重量減少開始温度の増加が確認された。これらの物性の変化は PP と CD との包接複合体形成と同様な結果であったことから、 α CD および β CD は 2 種の PP 誘導体とモル比 1/1 で包接複合体の形成が示唆された。しかしながら、包接複合体を形成した

PP/ α CD の場合は包接モル比が 1:2 であったのに対し (Fig. 13, 14)、GM (PPD1/ α CD=1/1) および GM (PPD2/ α CD=1/1) は 1:1 でゲスト分子固有の結晶回折ピークおよび融点が消失したことから、PP/ α CD とは包接モル比が異なるものと考えられ、ゲスト分子のアミド置換基の体積、アミドやカルボニルの歪みおよび電子状態の違いによって PP 誘導体との包接モル比が変化することが示唆された。また、PP/ γ CD はモル比 1:1 で複合体を形成するが、誘導体を用いた GM

(PPD1/ γ CD) および GM (PPD2/ γ CD) とともにゲスト分子特有の結晶回折ピークならびに融点が観測されたことから、アミド置換基の体積変化はメチレンジオキシフェニル基の電子状態に影響し、包接様式に寄与することが示唆された。したがって、第 1 章の 2-8 から 2-10 にかけての考察と同様に共役系によって CD との包接様式に影響することが明らかとなった。

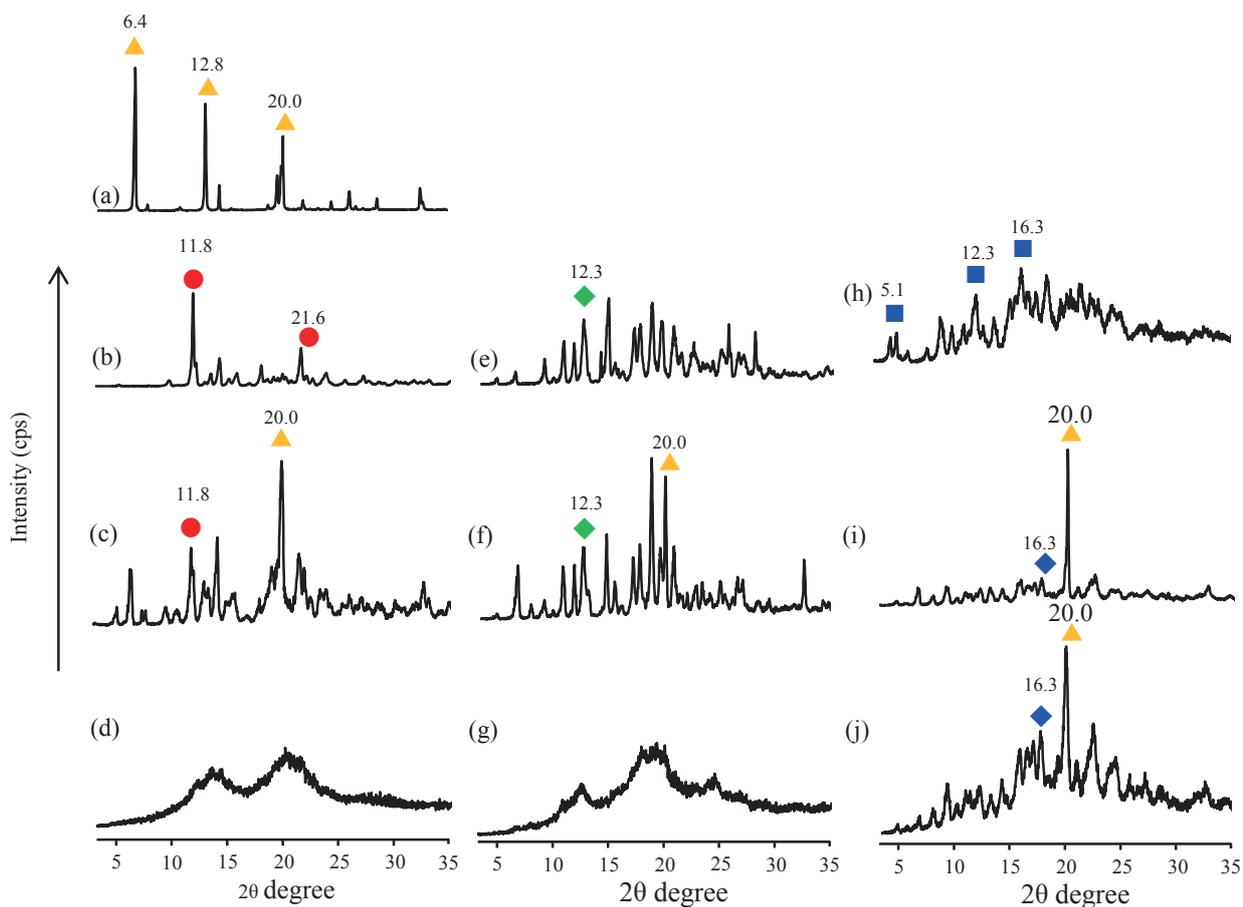


Fig. 23. Change in PXRD patterns of PPD1/CDs complexes systems.

(a) PPD1, (b) α CD, (c) PM (PPD1/ α CD=1/1), (d) GM (PPD1/ α CD=1/1), (e) β CD, (f) PM (PPD1/ β CD=1/1), (g) GM (PPD1/ β CD=1/1), (h) γ CD, (i) PM (PPD1/ γ CD=1/1), (j) GM (PPD1/ γ CD=1/1).
 ▲: PPD1, ●: α CD original, ◆: β CD original, ■: γ CD original

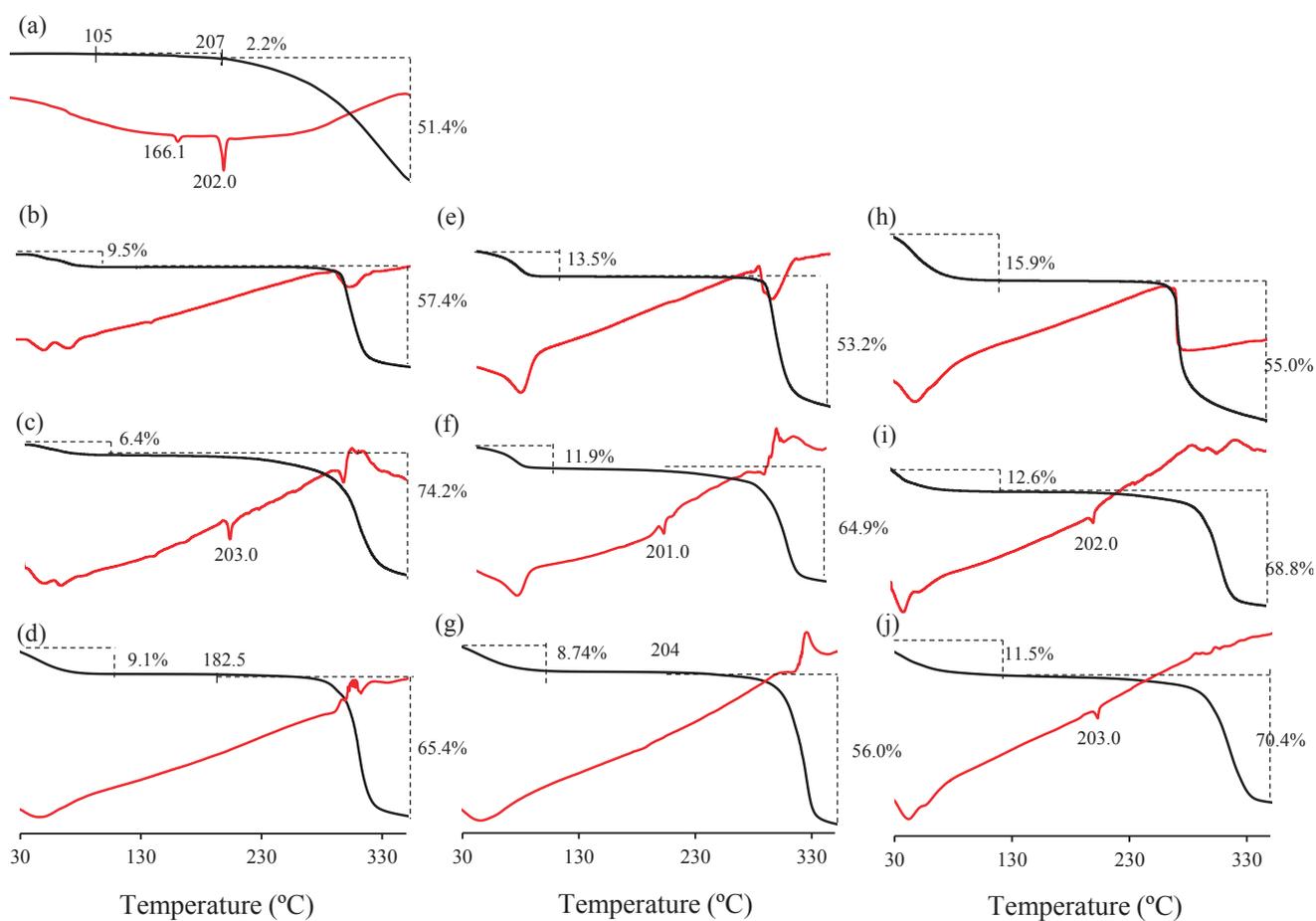


Fig. 24. TG-DTA curves of PPD1/CDs complex systems.

(a) PPD1, (b) α CD, (c) PM (PPD1/ α CD=1/1), (d) GM (PPD1/ α CD=1/1), (e) β CD, (f) PM (PPD1/ β CD=1/1), (g) GM (PPD1/ β CD=1/1), (h) γ CD, (i) PM (PPD1/ γ CD=1/1), (j) GM (PPD1/ γ CD=1/1).

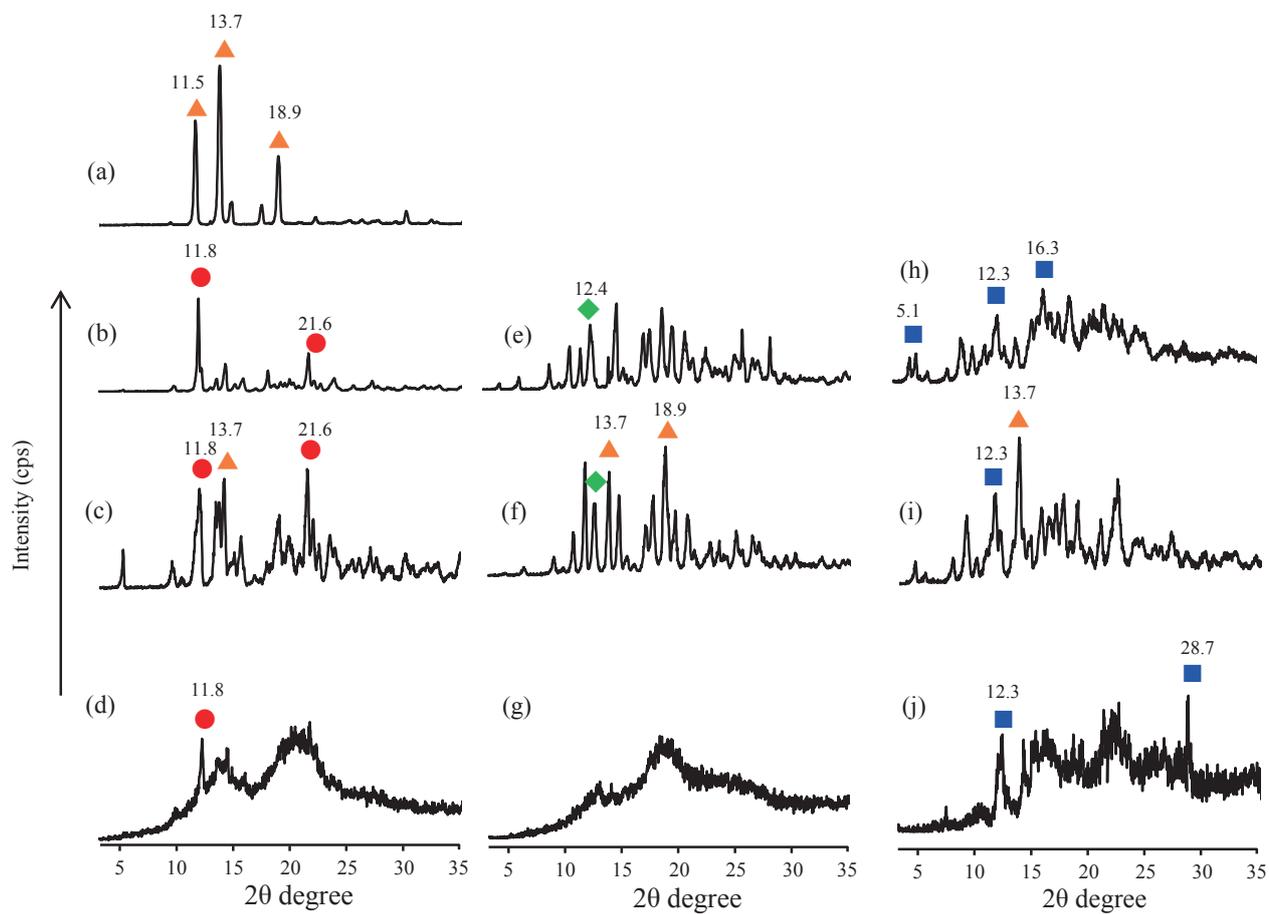


Fig. 25. Change in PXRD patterns of PPD2/CDs complexes systems.

(a) PPD2, (b) α CD, (c) PM (PPD2/ α CD=1/1), (d) GM (PPD2/ α CD=1/1), (e) β CD, (f) PM (PPD2/ β CD=1/1), (g) GM (PPD2/ β CD=1/1), (h) γ CD, (i) PM (PPD2/ γ CD=1/1), (j) GM (PPD2/ γ CD=1/1).
 ▲: PPD1, ●: α CD original, ◆: β CD original, ■: γ CD original

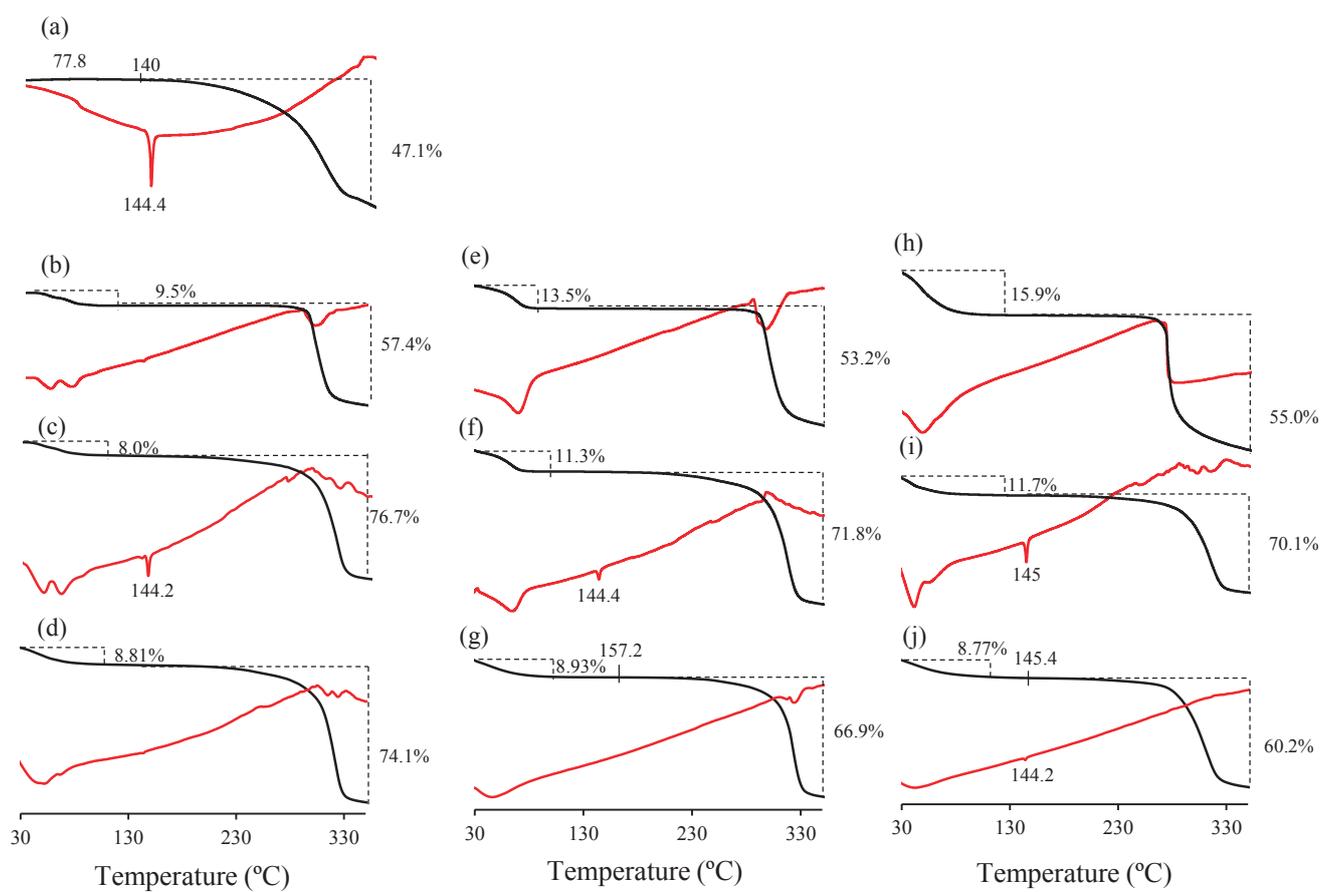


Fig. 26. TG-DTA curves of PPD2/CDs complex systems.

(a) PPD2, (b) α CD, (c) PM (PPD2/ α CD=1/1), (d) GM (PPD2/ α CD=1/1), (e) β CD, (f) PM (PPD2/ β CD=1/1), (g) GM (PPD2/ β CD=1/1), (h) γ CD, (i) PM (PPD2/ γ CD=1/1), (j) GM (PPD2/ γ CD=1/1).

2-13 PP 誘導体/CD 包接複合体における近赤外線測定による分子状態の評価

PXRD、TG-DTA 測定により、GM (PPD1/ α CD=1/1)、GM (PPD2/ α CD=1/1)、GM (PPD1/ β CD=1/1)、GM (PPD2/ β CD=1/1) の包接複合体の形成が示唆された。そこで、包接複合体を形成する α CD 系および β CD 系に着目して、各 PP 誘導体の分子運動性を評価した (Table 5, Fig. 27-30)。

PPD1 の CH ピークは 5698, 5830, 5998 cm^{-1} に、ペンタジエン鎖の CH ピークは 8298 cm^{-1} に、芳香環の CH ピークは 8771 cm^{-1} に確認された。また、NH ピークは 6349, 6493 cm^{-1} に確認された (Fig. 27-28)。GM (PPD1/ α CD=1/1) および GM (PPD1/ β CD=1/1) は PPD1 の芳香環の CH ピーク (8771 cm^{-1}) および NH ピーク (6349, 6493 cm^{-1}) のブロード化が確認された (Fig. 27-28-c)。さらに、 α CD の OH 基ピーク (6802, 6998 cm^{-1}) のブロード化が確認された。また、 β CD の OH 基ピークは高波数側へのシフトし、Free water (5245 cm^{-1}) が減少した。これは複合体形成による結合水の減少によって OH 基ピークがシフトしたことが示唆された。

PPD2 の CH ピークは 5763, 5917, 6042 cm^{-1} に、ペンタジエン鎖の CH ピークは 8510 cm^{-1} に、芳香環の CH ピークは 8771 cm^{-1} に確認された。GM (PPD1/ α CD=1/1) および GM (PPD1/ β CD=1/1) は PPD2 の芳香環の CH ピーク (8771 cm^{-1}) およびペンタジエン鎖のピーク (8298 cm^{-1}) のピークがブロード化した (Fig. 29-30)。さらに、 α CD の OH 基ピーク (6825, 7017 cm^{-1}) のブロード化が確認された。また、 β CD の OH 基ピークは高波数側へのシフトし、Free water (5245 cm^{-1}) の減少が確認された (Fig. 30-d)。これは複合体形成による結合水の減少によって水酸基ピークがシフトしたことが影響したものと推察された。

PP 誘導体/CD 包接複合体は GM (PP/ α CD=1/2)、GM (PP/ β CD=1/1) および GM (PP/ γ CD=1/1) の包接複合体と同様にメチレンジオキシフェニル基の芳香環の分子運動性 (8771 cm^{-1}) を顕著に抑制していることが観測されたことから (Fig,

27-30)、メチレンジオキシフェニル基は CD と包接複合体を形成する重要部分であることを示した。また、PPD1 および PPD2 のシクロヘキサン環、ピロリジン環の CH ピーク (7194 または 7220 cm^{-1}) は CD との直接的な相互作用がなくても、PP と同様に PP 誘導体は共役系に影響して、間接的な分子運動性の抑制を示したことから、PP/CD 包接複合体と同様に、PP 誘導体についても CD との相互作用によって、共役系に影響してシクロヘキサン環、ピロリジン環の歪みを引き起こしたと考えられる。PP と同様な包接部分および共役系の特徴が観測された。

Table 5. Near infrared spectroscopy of PPD1 and PPD2

	Assignment	Wavenumber (cm ⁻¹)
PPD1	CH	5698, 5830, 5998
	CH ₂	7220
	Pentadiene CH	8298
	Aromatic CH	8771
	NH	6349, 6493
PPD2	CH	5763, 5912, 6042
	CH ₂	7194, 7352
	Pentadiene CH	8510
	Aromatic CH	8771
αCD	OH	6802, 6998
	C ₂ -OH	5076
	Free water	5235
βCD	OH	6993
	Free water	5223

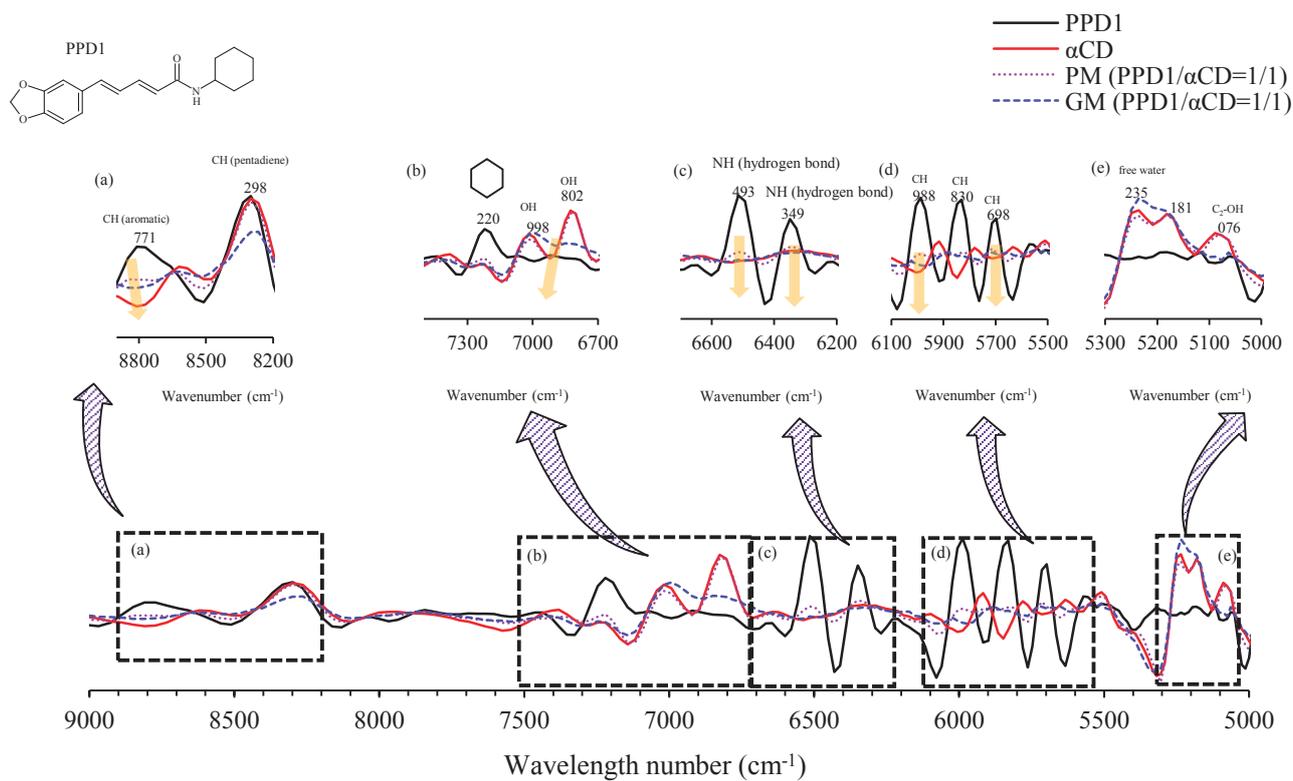


Fig. 27. Second-derivative of PPD1/ α CD systems:
 (a) 8900–8200 cm^{-1} , (b) 7500–6700 cm^{-1} , (c) 6700–6200 cm^{-1} , (d) 6100–5500 cm^{-1} , (e) 5300–5000 cm^{-1} .

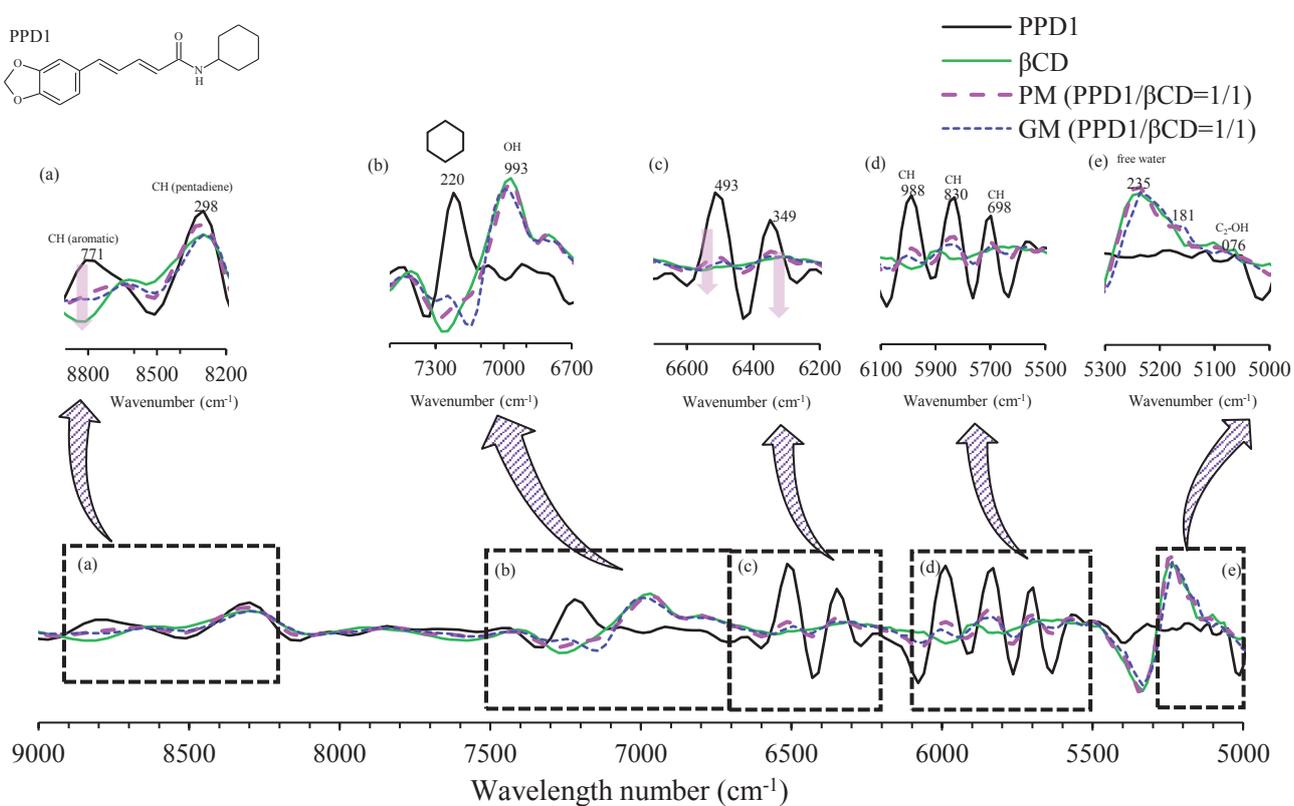
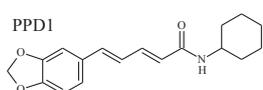


Fig. 28. Second-derivative of PPD1/ β CD systems:

(a) 8900–8200 cm^{-1} , (b) 7500–6700 cm^{-1} , (c) 6700–6200 cm^{-1} , (d) 6100–5500 cm^{-1} , (e) 5300–5000 cm^{-1} .

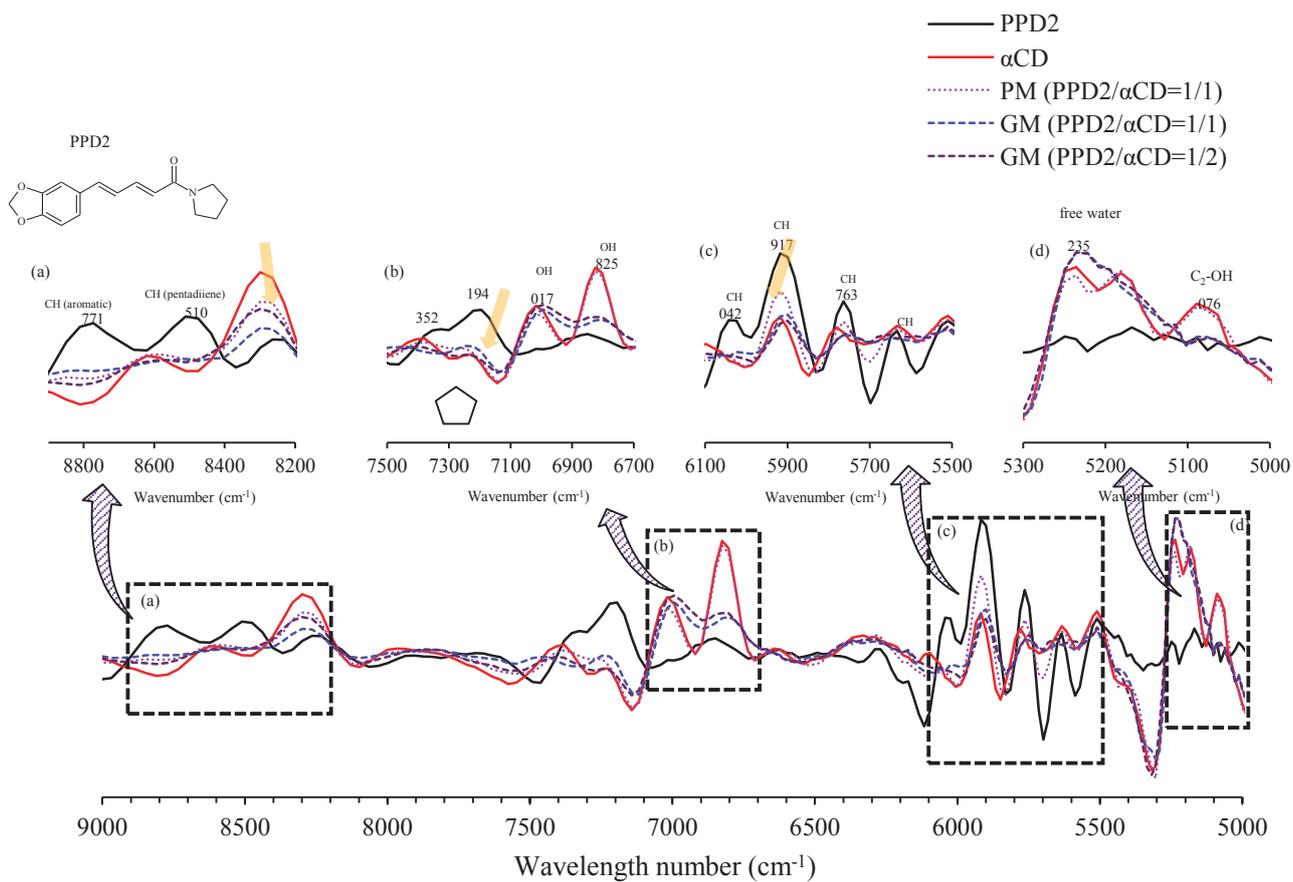


Fig. 29. Second-derivative of PPD2/αCD systems:
 (a) 8900–8200 cm⁻¹, (b) 7500–6700 cm⁻¹, (c) 6700–6200 cm⁻¹, (d) 6100–5500 cm⁻¹, (e) 5300–5000 cm⁻¹.

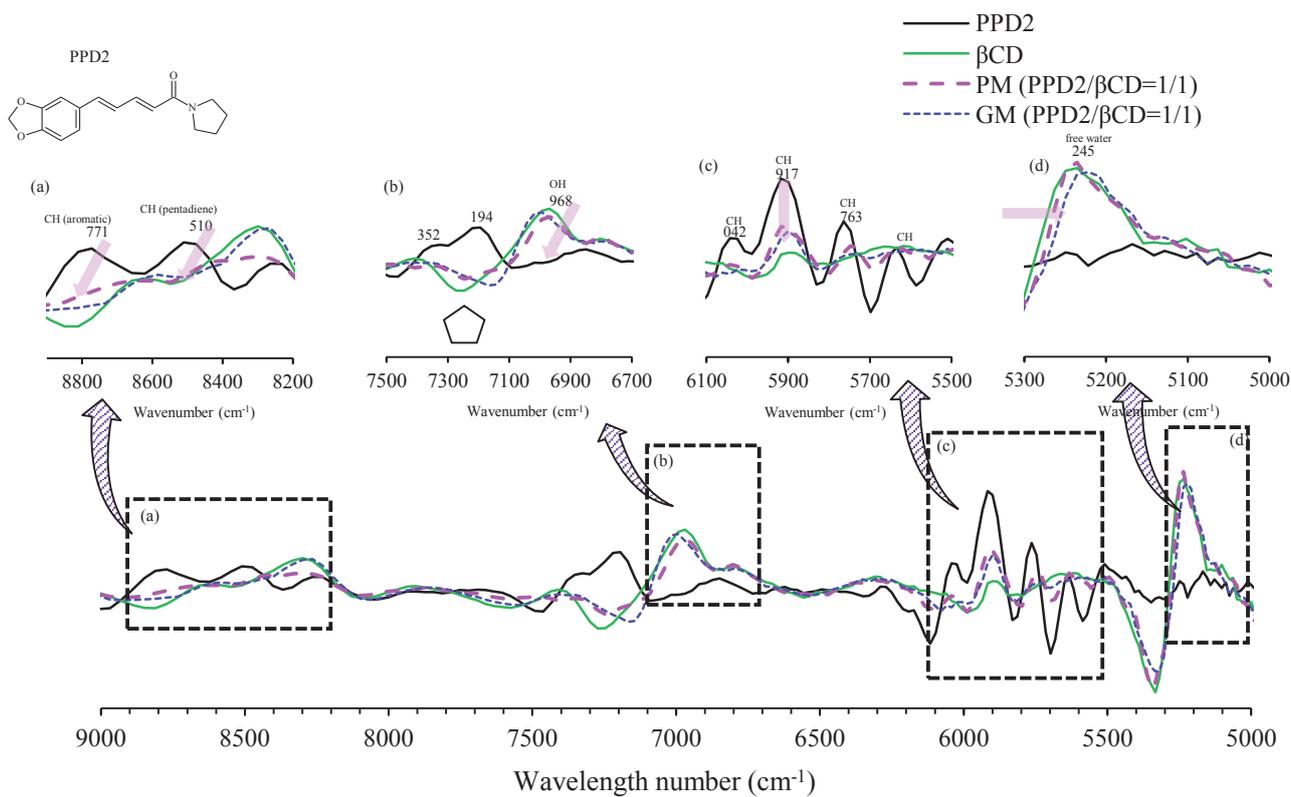


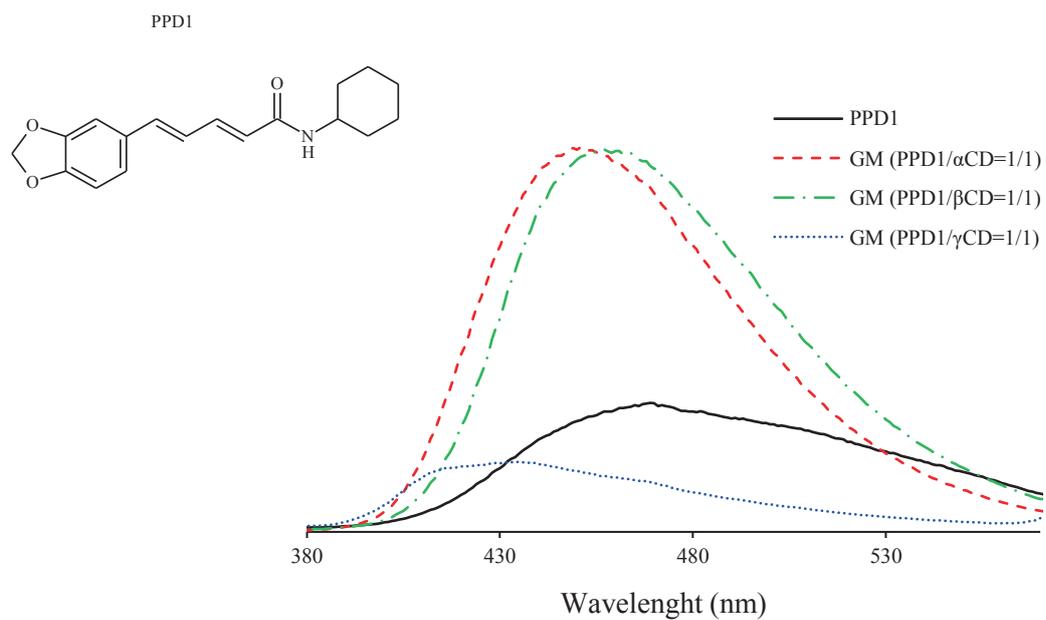
Fig. 30. Second-derivative of PPD2/ β CD systems:
 (a) 8900–8200 cm^{-1} , (b) 7500–6700 cm^{-1} , (c) 6700–6200 cm^{-1} , (d) 6100–5500 cm^{-1} , (e) 5300–5000 cm^{-1} .

2-14 固体蛍光測定を用いた PP 誘導体/CD 包接複合体における PP 誘導体の分子挙動評価

PP 誘導体の電子状態や分子エネルギーの変化を確認するために固体蛍光測定を行った。PPD1 は、N1-H O1 間の水素結合を形成している。一方で PP はアミド窒素がピペリジン環の窒素であるため、シクロヘキサンとピペリジンの構造の違いはアミド基への電子状態に影響することが予想された。そこで、固体蛍光測定を実施した結果、PPD1 は 468 nm と Fig. 12 で観測された PP の蛍光極大波長 (459 nm) と比較して長波長側へシフトしていることが観測された (Fig. 31-31)。これは、PPD1 は PP と比較して NH 基を有しており、 π - π 相互作用を示さない物理化学的性質が寄与している。GM (PPD1/ α CD=1/1)、GM (PPD1/ β CD=1/1) および GM (PPD1/ γ CD=1/1) の蛍光極大波長は 452, 459, 434 nm と PPD1 と比較して短波長側へシフトしていることが観測された (Fig. 31)。この短波長側へのシフトは、459 nm に観測された PP の蛍光極大波長が CD との複合体形成により、PP/ α CD, PP/ β CD, PP/ γ CD の包接複合体が 463, 472, 469 nm と長波長側へシフトした状況と逆であった。包接複合体を形成した場合の GM (PPD1/ α CD=1/1) および GM (PPD2/ β CD=1/1) は包接複合体形成により、芳香環、ペンタジエン鎖の固定化による共役系の変化は、PPD1 同士の N1-H O1 の水素結合ネットワークの切断に影響し、その結果、シクロヘキサンの分子運動性低下を引き起こした。この PPD1 分子の固定化は蛍光極大波長を短波長側へシフトさせたものと考えられる。一方で、GM (PPD1/ γ CD=1/1) は包接複合体を形成していないため、PPD1 単独、GM (PPD1/ α CD=1/1) および GM (PPD2/ β CD=1/1) と比較して蛍光強度が 99.2 と低値を示した (Fig. 31)。

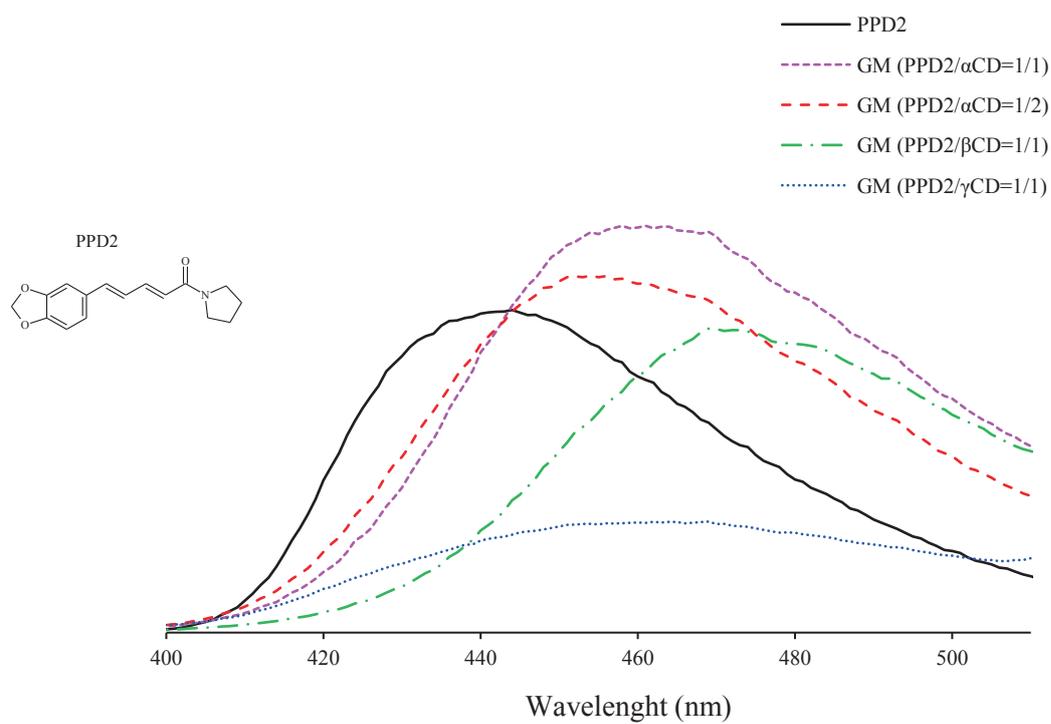
PP と化学的性質が似ている PPD2 は 443 nm に蛍光極大波長が観測された。GM (PPD2/ α CD=1/1)、GM (PPD2/ α CD=1/1)、GM (PPD2/ β CD=1/1) および GM (PPD2/ γ CD=1/1) の蛍光極大波長は 460, 452, 472, 459 nm と PPD2 と比較して長

波長側へシフトしていることが観測された (Fig. 32)。この蛍光波長の変化は、459 nm に観測された PP の蛍光極大波長が CD との複合体形成により、PP/ α CD, PP/ β CD, PP/ γ CD の包接複合体が 463, 472, 469 nm と長波長側へシフトした現象と同様な結果が得られた (Fig. 12)。PPD2 は PP と同様に芳香環部分で π - π 相互作用を示す。 α CD および β CD が π - π 相互作用を示すメチレンジオキシフェニル基付近で相互作用を示すことにより、PPD2 単独の分子の固定化や共役系が変化し、PPD2 分子の歪みを引き起こしたことが考えられる。また、PP のアミドまたはカルボニル基が歪む状態で CD 中に包接された分子挙動を示したものと同様に包接複合体形成により、 π 共役平面同士の重なりが小さい分子配列となり、PP 同士の π - π 相互作用が抑制されたことにより、蛍光強度が上昇したものと考えられた (2-8)。また、芳香環と CD と相互作用が共役系に影響して、PP 誘導体のアミドやカルボニル基の分子配座標に寄与したことが示唆された。一方で GM (PPD2/ γ CD=1/1) は包接複合体を形成していないため、GM (PPD2/ α CD=1/1)、GM (PPD2/ α CD=1/1) および GM (PPD2/ β CD=1/1) と比較して、蛍光強度は 99.2 と低値を示したものと考えられる。



	Fluorescence maxima	Fluorescence intensity
PPD1	468	182.525
GM (PPD1/ α CD=1/1)	452	535.483
GM (PPD1/ β CD=1/1)	459	538.814
GM (PPD1/ γ CD=1/1)	434	99.244

Fig. 31. Solid-fluorescence measurement of PPD1/CDs systems



	Fluorescence maxima	Fluorescence intensity
PPD2	443	486.884
GM (PPD2/ α CD=1/1)	460	627.185
GM (PPD2/ α CD=1/2)	452	551.556
GM (PPD2/ β CD=1/1)	472	467.010
GM (PPD2/ γ CD=1/1)	459	99.244

Fig. 32. Solid-fluorescence measurement of PPD2/CDs systems:

2-15 2次元 NMR を用いた溶液状態における PP 誘導体/CD 混合粉砕物から生じた包接化合物の分子間相互作用の検討

包接化合物の PPD1 はメチレンジオキシフェニル基に由来する O-CH₂-O (H-J) が 5.87 ppm、CH は 6.65 (H-E), 7.38 (H-D), 6.86 (H-C) ppm 付近に観測された。また、ペンタジエン鎖由来の CH は 5.89 (H-H), 6.69 (H-G), 6.8 (H-F), 6.9 (H-A) ppm 付近に観測された。CD のグルコース 1 分子の C₃、C₅、C₆ に帰属する H-3、H-5、H-6 は 3.3 から 3.8 ppm の範囲で観測された (Fig 33-34)。

GM (PPD1/ α CD=1/1)では、PPD1 の H-D が α CD の広い縁である H-3 とのクロスピークが観測された。また、H-E は H-5 よりも H-3 とのクロスピークが顕著に観測された。ペンタジエン鎖の CH である H-F, H-A, H-G, は α CD の環の狭い H-6, H-5 とのクロスピークが詳細に観測された。PP/ α CD では、メチレンジオキシフェニル基の H-J と CD 空洞内のプロトンとのクロスピークが観測されている (Fig. 8)。これらの結果から、 α CD の狭い縁(グルコースの 6 位の H) から広い縁 (グルコースの 3 位の H) にかけて、PPD1 のメチレンジオキシフェニル基からペンタジエン鎖の一部包接されており、置換基が異なることで包接部位が PP/ α CD と異なることが示唆された (Fig. 33)。GM (PPD1/ β CD=1/1) は PCHA の溶解性が低く、溶液状態では解離しやすい可能性がある。そのため、 β CD とゲスト分子である PCHA とのクロスピークは観測されなかった (Fig. 34)。

包接化合物の PPD2 はメチレンジオキシフェニル基に由来する O-CH₂-O (H-J) が 5.87 ppm、CH は 6.7 (H-E), 6.82 (H-D), 6.86 (H-C) ppm 付近に観測された。また、ペンタジエン鎖由来の CH は 5.95 (H-H), 6.69 (H-G), 6.7 (H-F), 7.1 (H-A) ppm 付近に観測された(Fig. 35)。CD のグルコース 1 分子の C₃、C₅、C₆ に帰属する H-3、H-5、H-6 は 3.3 から 3.8 ppm の範囲で観測された (Fig. 35-35)。PPD2 のメチレンジオキシフェニル基である H-C、H-J のプロトンは α CD の H-3 とのクロスピークが観測された。また、ペンタジエン鎖の H-A、H-F、メチレンジオキシフ

フェニル基の H-D が α CD の H-5 とクロスピークを示すことが確認された。しかし、PP/ α CD にて観測された H-H と α CD 空洞内の H-5 のクロスピーク (Fig. 8) は PPD2/ α CD では観測されなかった。これらの結果から、 α CD の広い縁 (グルコースの 3 位の H) から狭い縁 (グルコースの 6 位の H) にかけて、PPD2 のメチレンジオキシフェニル基からペンタジエン鎖の一部包接されており、PP// α CD と比較して、アミド基付近まで CD が包接していないことが示唆された。GM (PPD2/ β CD=1/1) はメチレンジオキシフェニル基の H-J、ペンタジエン鎖の H-A と β CD の中空から狭い環に位置する H-5, 6 とのクロスピークが観測された。また、芳香環部分である H-C, H-D, H-E は H-3, H-5 とのクロスピークが観測された。PPD2 は β CD の狭い縁 (6H) から広い縁 (3H) にかけて、メチレンジオキシフェニル基からペンタジエン鎖を包接していることが観測された (Fig. 36)。一方で、PP/ β CD は、H-F, H-G と CD 空洞内とのクロスピークが観測されない (Fig. 9)。そのため PPD2// β CD は、PP/ β CD と比較して、アミド基付近まで包接した様式を示した。

以上の結果から、GM によって調製された PP/ α CD は PP のメチレンジオキシフェニル基およびアルケンの C=C を 2 分子の α CD が head to head の様式で、包接化合物を形成していることから、PP の CD に包接されないピペリジン部分がピロリジンやシクロヘキサンに変化することで、PP 誘導体と CD の包接モル比や包接様式が異なることから、PP のメチレンジオキシフェニル基だけが包接化合物の形成に重要なのではなく、PP の共役や分子の歪みを影響するアミド置換基も包接化合物を形成するうえで重要であることが明らかとなった。

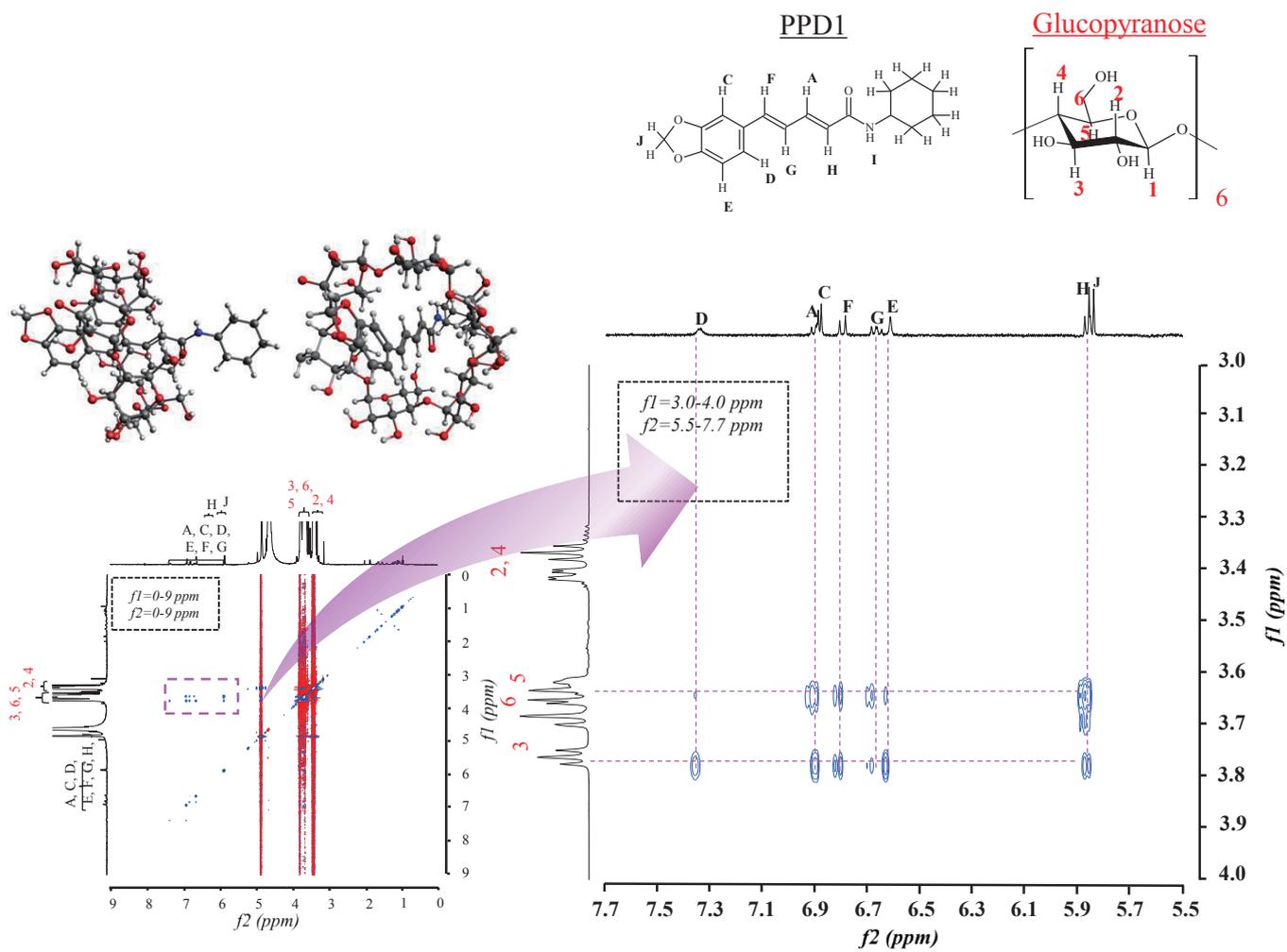


Fig. 33 ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of GM (PPD1/ α CD=1/1) in D_2O

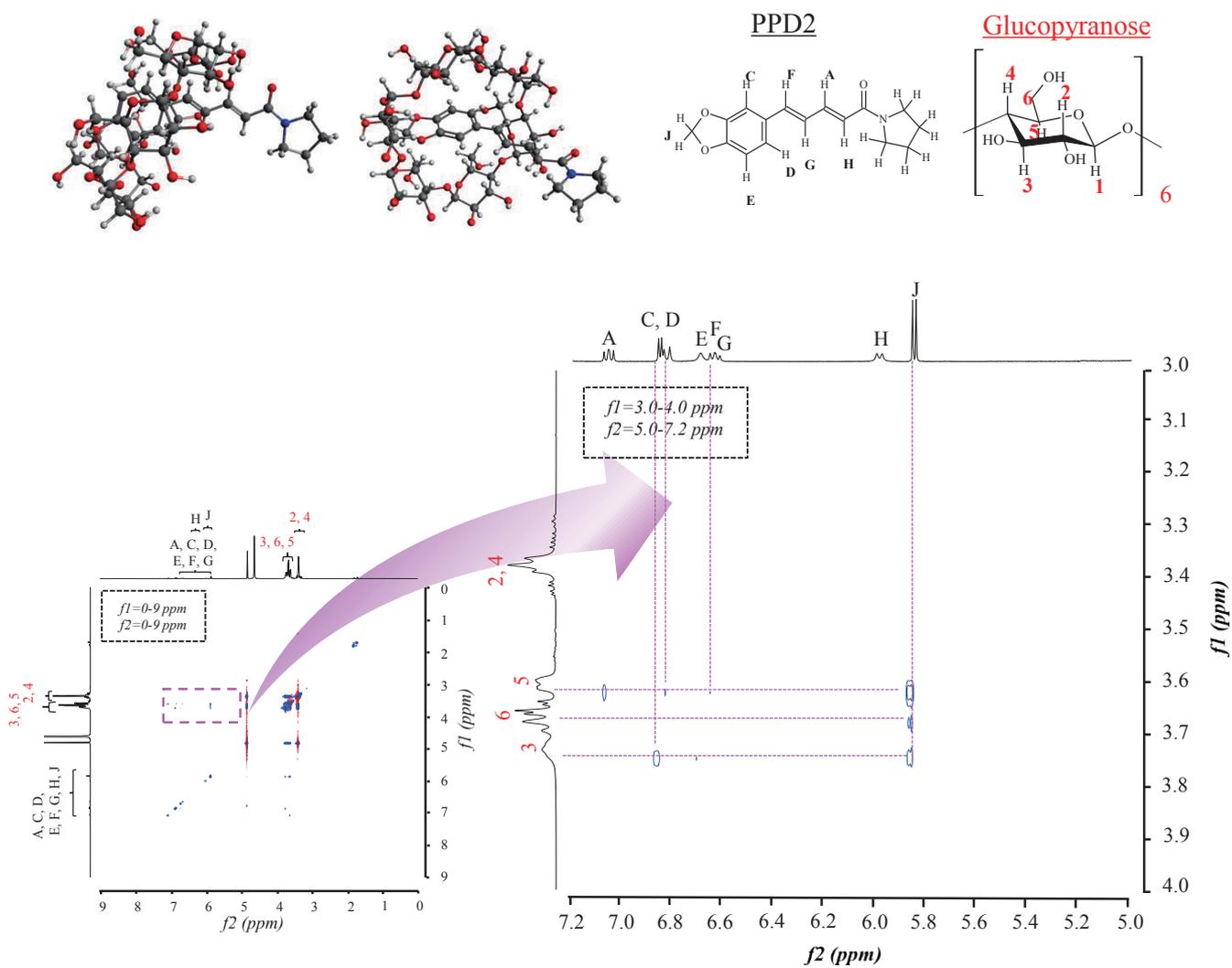


Fig. 35. ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of GM (PPD2/ α CD=1/1) in D_2O

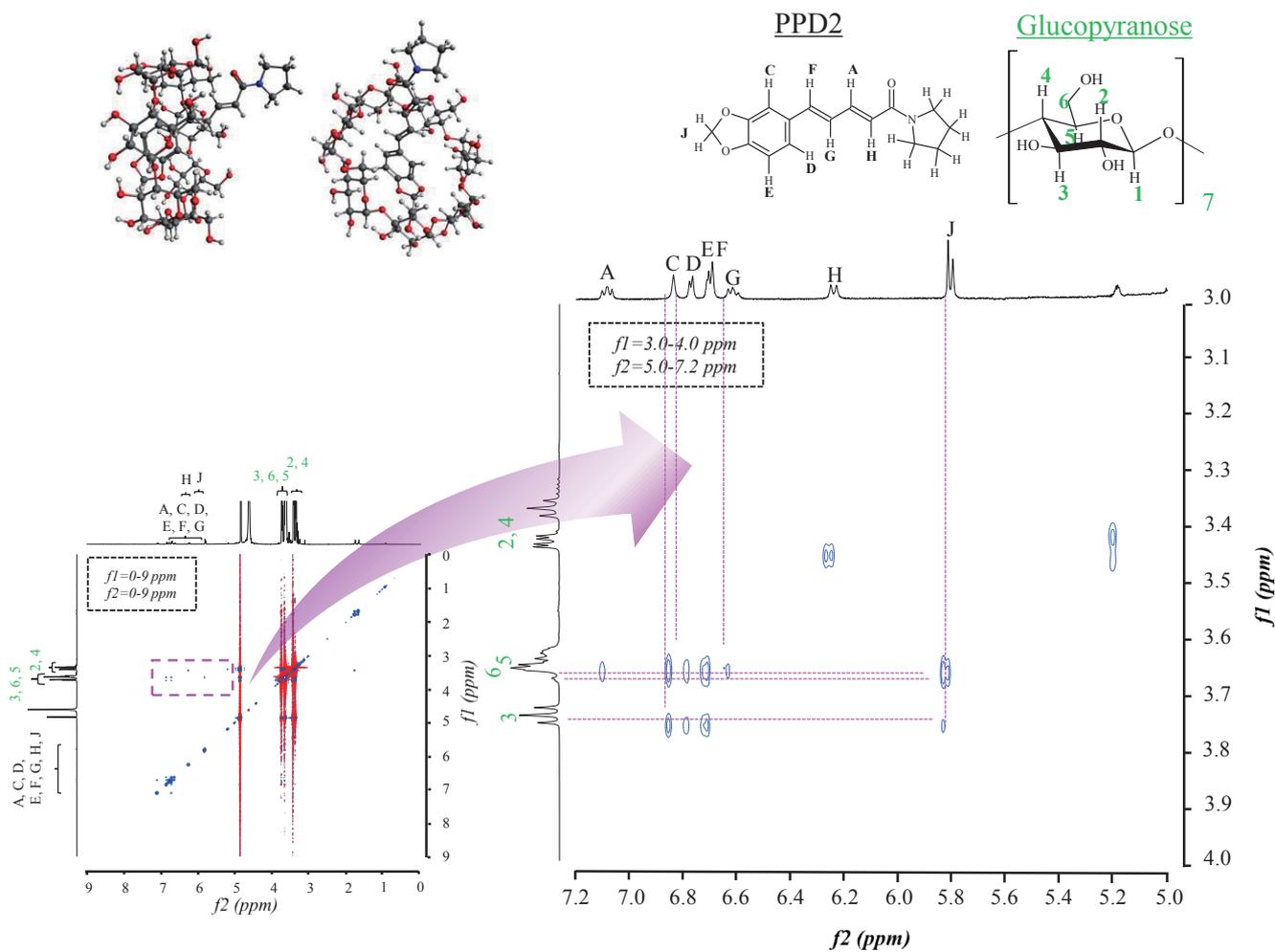


Fig. 36. ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum of GM (PPD2/ β CD=1/1) in D_2O

第2節 小括

第2節において、GMにおけるメカノケミカル効果により、PPとCDのGMは、結晶回折ピークの消失およびPP単独に由来する級別ピークの消失が観測されたことから、PP/ α CD=1/2、PP/ β CD、PP/ γ CD=1/1のモル比で包接複合体を形成することが明らかになった。さらに、Raman測定により、各包接複合体中の、PPのメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖の分子運動性が抑制していることが観測された。得られた各種包接複合体は、PPと比較して溶解性向上が観察された。PPの溶解性の向上は、固体状態におけるPPとCD間との相互作用だけでなく、溶出の過程で生じる溶液状態における包接化合物の分子間相互作用が寄与していると考えられた。そこで、溶液状態の評価として、D₂O溶媒を用いた¹H-¹HNOESY NMR測定を実施した結果、PP/ α CD=1/2は1分子の α CDが広い環状の縁から狭い環状の縁にかけて、PPのメチレンジオキシフェニル基に包接しており、2分子の α CDはペンタジエン鎖由来のC=Cに包接しており、広い環状の縁がメチレンジオキシフェニル基の芳香環に向けた形で2分子の α CDがhead to headの様式で、包接していることが示された。PP/ β CD=1/1は1分子の β CDが脂溶性部位であるPPのメチレンジオキシフェニル基に広い環状の縁から狭い環状の縁にかけて密接に包接していることが示された。PP/ γ CD=1/1は1分子の γ CDがPPのメチレンジオキシフェニル基に浅く包接していることが示された。この包接様式の違いは、CDの空洞径の違いが寄与していることが推察された。

これらの結果から、第一章の目的であるPPの溶解性向上がGMにより可能となった。この要因として、GMの包接複合体から生じた包接化合物の速度の違いや、2次元NMRで観測されたPPの脂溶性部分をCDが包接する包接化合物の様式が溶出試験におけるPPの溶解性向上に寄与したことが示唆された。

ピペリンと CD の包接現象を理解するために PP 誘導体 (PPD1 および PPD2) の合成と GM による PP 誘導体/CD 包接複合体の調製を行った。単結晶 X 線回折測定により、PP のピペリジン部分をピロリジンやシクロヘキサンに誘導体化しても、アミド基、メチレンジオキシフェニル基、ペンタジエン鎖は共役する特徴を示した。しかしながら、CD を用いて GM による包接複合体を調製した結果、PXRD および TG-DTA 測定により、GM (PPD1/ α CD=1/1)、GM (PPD2/ α CD=1/1)、GM (PPD1/ β CD=1/1)、GM (PPD2/ β CD=1/1) はゲスト分子の特有の結晶回折ピークは観測されず、融点は消失し、熱重量減少開始温度の増加が確認された。これにより、 α CD および β CD は 2 種の PP 誘導体とモル比 1/1 で包接複合体の形成が示唆された。しかしながら、GM (PP/ γ CD) はモル比 1/1 で複合体を形成するが、誘導体を用いた GM (PPD1/ γ CD) および GM (PPD2/ γ CD) とともにゲスト成分特有の結晶回折ピーク、融点が観測されなかったため、包接複合体を形成しないことが示唆された。これにより、PP のピペリジン部分がシクロヘキサンやピロリジンに変化することで、 α CD との包接モル比が 1/2 から 1/1 になるだけでなく、 γ CD については包接複合体を形成しないことが確認された。2-8 から 2-10 にかけて、PP のメチレンジオキシフェニル基と CD との包接複合体形成は、PP の共役系に影響し、アミド基やピペリジンの歪みに影響することが、NIR および固体蛍光測定によって明らかとなった。

これらの結果から、PP と PP 誘導体に共通する構造のメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖による共役はアミド置換基と密接な関係を示しており、アミド置換基の体積および CD の環状サイズに依存した相互作用の強さが PP と CD の包接様式を決定づける要因であることが明らかになった。

以上の結果より、PP は α CD、 β CD、 γ CD のサイズ選択的および PP のアミド置換基の体積に依存して、PP の脂溶性部分であるメチレンジオキシフェニル基

およびペンタジエン鎖部分を CD が包接した包接化合物を形成することが明らかになった。PP の溶解性の向上を目的として各種包接複合体を調製してそれらを比較する場合、包接複合体の物理化学的性質や溶出の過程で生じる溶液状態における包接化合物の分子間相互作用の状態について、詳細に検討することが、製品化に向けた CD の種類と複合体調製方法の選択において重要であると考えられた。包接様式の違いによる PP の溶解性向上は、PP の腸管収縮調節作用など利用目的に応じて使用する CD を選択することに繋がる結果が得られた。

第3節 共沈法による PP/CDs 包接複合体形成および包接化合物の確認

第3節 序

第3節において、GMにおけるメカノケミカル効果によって、PPと α CD、 β CD、 γ CDとの包接複合体形成が明らかになった。各包接複合体におけるPPの分子状態はメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖の伸縮変化が確認されたため、CDの空洞径のサイズおよび疎水性相互作用に影響することが確認された。また、包接様式に応じてPPの溶解性が変化することが明らかになった。CPは、薬物とCDとの溶解度の差を利用した溶液反応により包接複合体を析出させる手法である。調製方法により得られる包接複合体は結晶性が異なり、CPで得られる結晶性はGMと比較して良い。これらの調製方法の特徴は、ゲスト分子とCD間における相互作用の違いに影響する可能性があり、この2種類の異なる調製方法を用いることで、ゲスト分子とCD間との間で、PPと各CDを異なる包接様式を有する包接複合体および包接化合物を形成することが期待できる。ゲスト分子とCDとの包接様式は調製方法に応じて、異なる包接モル比および包接形態を得る事が予想されるため、第3節では、GMと異なる調製法でのCPを用いて、PPと α CD、 β CD、 γ CDとの包接複合体形成の検討を行うこととした。CPにより得られた包接複合体はPPとCDとの分子間相互作用を評価した後、包接化合物におけるPPの溶解性を評価した。

3-1 PP/CD 包接複合体における結晶状態の評価

複合体由来の結晶回折ピークを確認するために、PXRD 測定を行った (Fig. 37)。PP intact は、 $2\theta=14.3^\circ, 25.6^\circ$ に PP 由来の回折ピーク(●)が観測された。

ゲスト分子と CD 包接複合体が組織化した結晶構造はチャンネル型、ケージ型などが報告されている。例えば、 α CD/ポリエチレングリコール複合体はチャンネル型、 β CD とプロピレングリコール複合体はチャンネル型 (head-to-head または head-to-tail) およびケージ型、 γ CD とサリチル酸およびフルルビプロフェン複合体はチャンネル型 (tetragonal、hexagonal、monoclinic) の結晶構造を有することが PXRD 測定により明らかとなっている³⁷⁻⁴⁰。これらの結晶構造は 2-9 で確認されたように、CD 間の水分および包接様式により変化するため、CD 間の距離が変化することで、ファンデルワールス力および水素結合に寄与することが報告されている³⁹。

α CD 系において、PM (PP/ α CD=1/2) は $2\theta=14.3^\circ, 25.7^\circ$ 付近に PP 由来の回折ピークが観測された。CP (PP/ α CD) では、回折ピークが $2\theta=10.7^\circ, 12.7^\circ, 19.6^\circ$ を示したため、PP/ α CD は複合体化され、チャンネル型の状態 (▲) をとっていることが示唆された (Fig. 37-e)。

β CD 系において、PM (PP/ β CD=1/1) は $2\theta=25.6^\circ$ 付近に PP 由来の回折ピークが観測された。CP (PP/ β CD) では $2\theta=11.7^\circ, 15.3^\circ$ に head-to-head and head-to-tail の結晶回折ピーク (◆) が観測されたが、 $2\theta=25.7^\circ$ に PP 由来の回折ピークが観測された (Fig. 31-i)。これにより、CP (PP/ β CD) は包接複合体を形成しないことが示唆された。

γ CD 系において、PM (PP/ γ CD=1/1) では回折ピークが $2\theta=25.6^\circ$ に PP 由来の回折ピークが観測された。CP (PP/ γ CD) では $2\theta=5.3^\circ, 7.5^\circ, 12.1^\circ, 16.6^\circ$ を示したため、PP/ γ CD は複合体化され、tetragonal の状態 (■) をとっていることが示唆された

(Fig. 37-m)。このことから、PP が γ CD 内に包接された可能性があり、PP 固有の結晶配列を形成しない状態であることが示唆された。

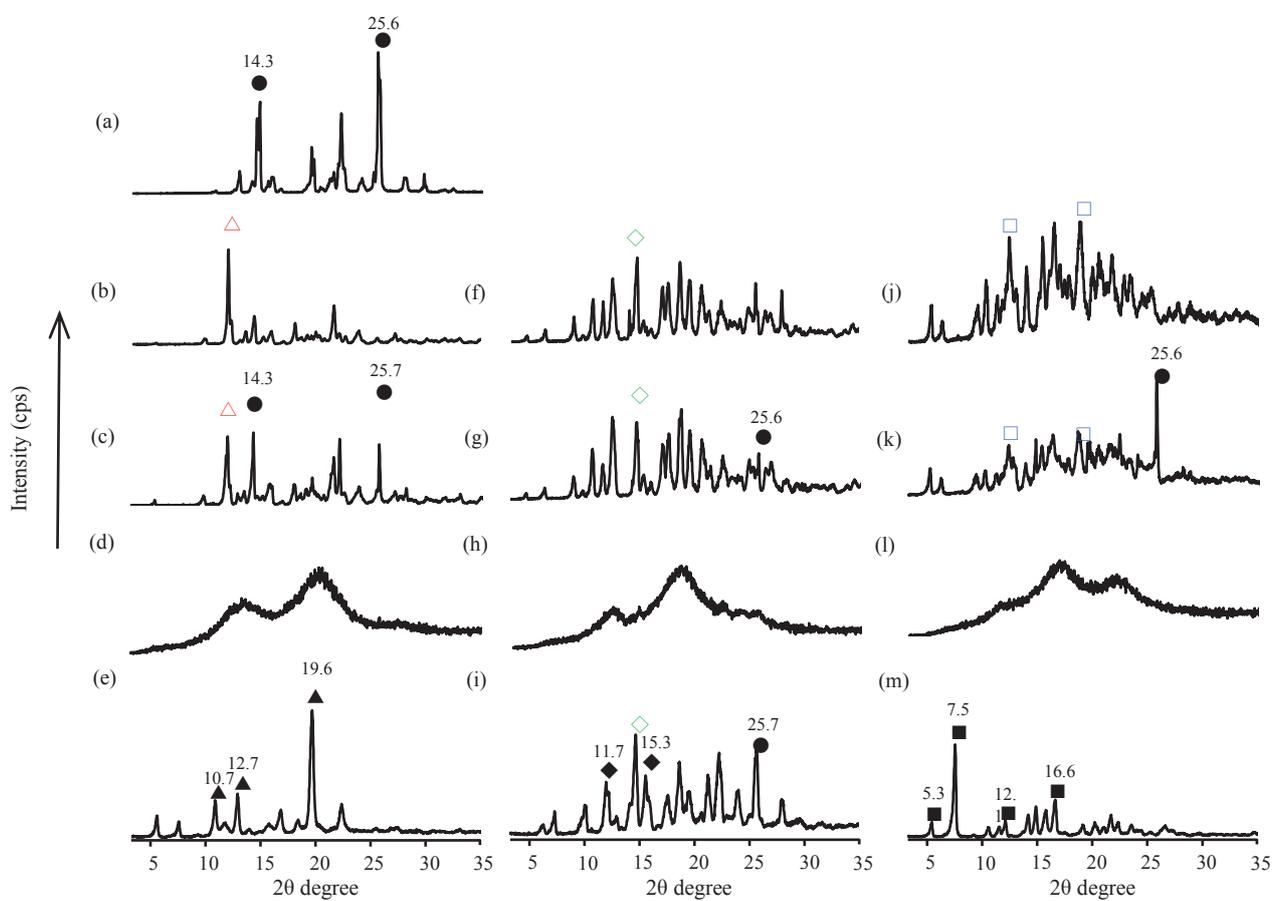


Fig. 37. PXRD patterns of (a) PP intact, (b) α CD, (c) PM (PP/ α CD), (d) GM (PP/ α CD=1/2), (e) CP (PP/ α CD), (f) β CD, (g) PM (PP/ β CD), (h) GM (PP/ β CD=1/1), (i) CP (PP/ β CD), (j) γ CD, (k) PM (PP/ γ CD), (l) GM (PP/ γ CD=1/1), (m) CP (PP/ γ CD).
 ●:PP original, △: α CD original, ◇: β CD original, □: γ CD original, ▲: channel type, ◆: head-to-head and head-to-tail type, ■: Tetragonal type.

3-2 PP/CD 包接複合体における熱的性質の評価

複合体形成による PP の熱的挙動の変化を確認するために DSC 測定を行った (Fig. 38)。PP intact は 131°C に吸熱ピークが観測された。PM (PP/ α CD=1/2) 、PM (PP/ β CD=1/1)、PM (PP/ γ CD=1/1) においても、PP 由来の融点が 130°C 付近にそれぞれ観測された。CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) では、PP の融解による吸熱ピークが消失したことが確認された。一方で、CP (PP/ β CD) は PP 由来の融点が 131°C 付近に観測された。 β CD はグルコースの C₂ と C₃-OH で強い水素結合を示すため、 α CD および γ CD と比較して水への溶解度が低い特徴がある³³⁾。ゲスト分子の吸熱ピークの消失は包接複合体形成に寄与することから、共沈法により、融解による吸熱ピークが消失した PP/ α CD および PP/ γ CD では包接複合体形成が示唆され、PP の吸熱ピークに変化が見られなかった PP/ β CD では、包接複合体を形成しないことが示唆された。CD の物性による違いが CP による包接複合体形成に影響したものと考えられる。

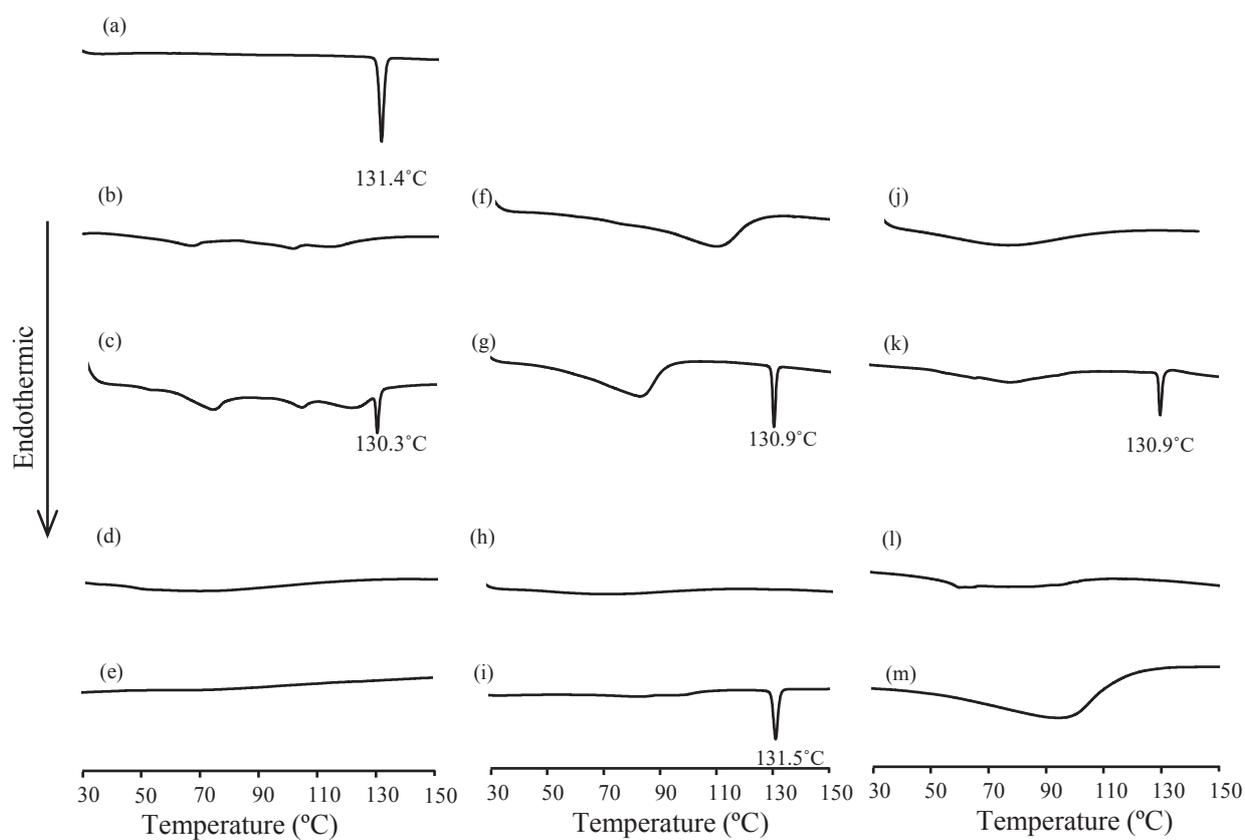


Fig. 38. DSC curves of (a) PP intact, (b) α CD, (c) PM (PP/ α CD), (d) GM (PP/ α CD=1/2), (e) CP (PP/ α CD), (f) β CD, (g) PM (PP/ β CD), (h) GM (PP/ β CD=1/1), (i) CP (PP/ β CD), (j) γ CD, (k) PM (PP/ γ CD), (l) GM (PP/ γ CD=1/1), (m) CP (PP/ γ CD).

3-3 PP/CD 包接複合体の NMR を用いた包接モル比の決定

PXRD 測定および DSC 測定の結果より、共沈法で調製した CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) の包接複合体形成が示唆された。そこで、包接化合物の PP と CD のモル比を検討するために、Dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6) 中での溶媒を用いて、 ^1H -NMR スペクトル測定を行った (Fig. 39)。PP と CD の包接モル比は PP 分子 1H あたりの積分値と CD 分子 1H あたりの積分値の比率で算出した。

PP の H-J の 1H あたりの積分値 (X) と α CD または γ CD の H-1 の積分値 (Y, Z) を求めた。 α CD の 6 つの D-グルコピラノース単位の H-1 の積分値は、PP の H-J の 2H の積分値 1 に対して約 6.41 を示した。PP および α CD の 1H あたりの比率は Eq (1) より PP/ α CD のモル比は 1/2.15 であることが確認された。

$$X = Y/6 \quad \text{Eq (1)}$$

一方で、 γ CD の H-1 の積分値 (Z) は、PP の H-J の 2H の積分値 1 に対して約 4.62 を示した。 γ CD は、8 つの D-グルコピラノース単位がリング状に結合した構造になっているため、PP および γ CD の 1H あたりの比率は Eq (2) より PP/ γ CD のモル比は 1/1.15 であることが確認された。

$$X = Z/8 \quad \text{Eq (1)}$$

したがって、CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) は混合粉碎法で調製された GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ γ CD=1/1) と同様な包接モル比である事が示唆された。

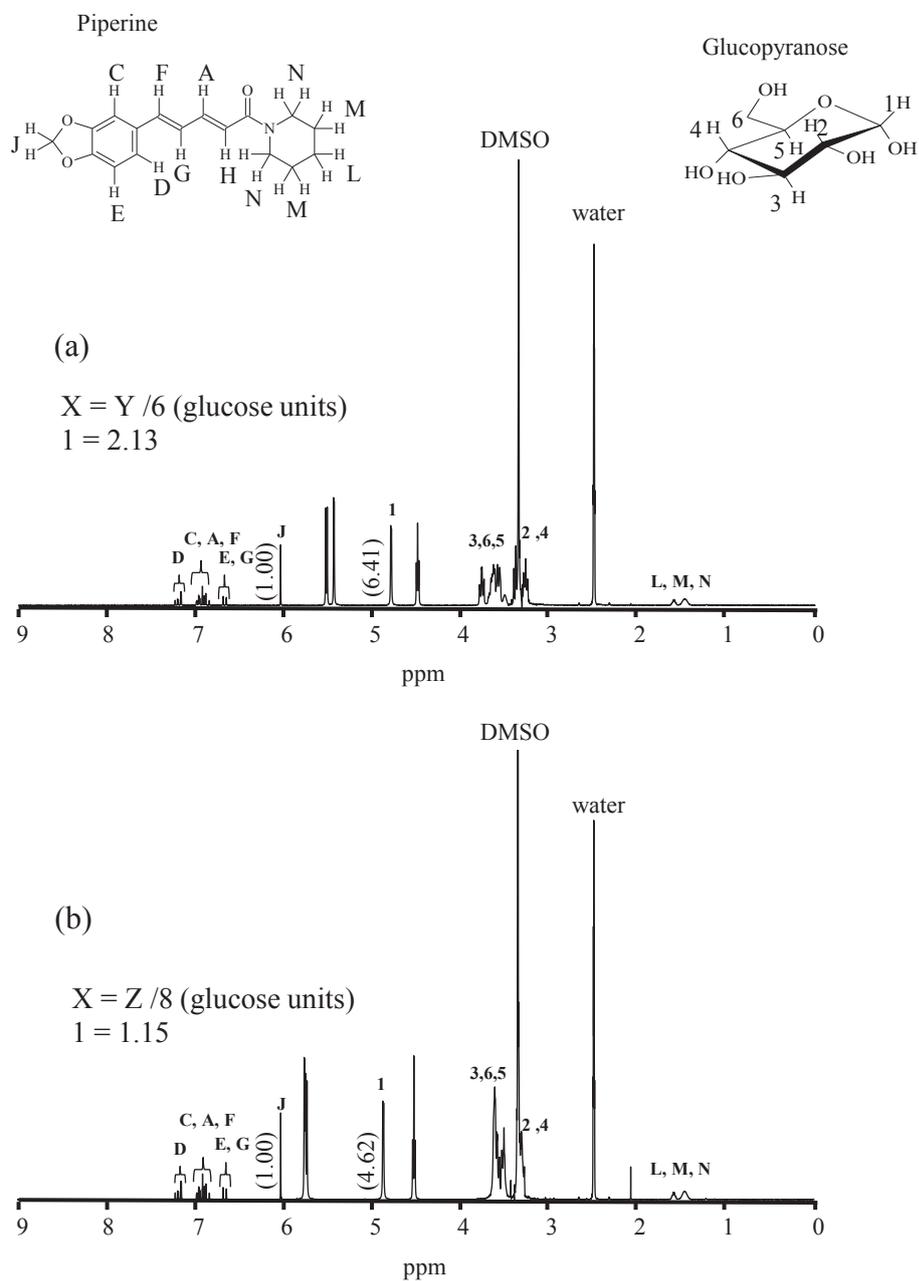


Fig. 39. ^1H -NMR spectra of (a) CP (PP/ α CD) and (b) CP (PP/ γ CD) in DMSO-d_6 . X: integrated intensity of the J (2H) in the 1 PP molecules, Y: integrated intensity of the H-1 in the α CD, Z: integrated intensity of the H-1 in the γ CD,

3-4 走査型電子顕微鏡による固体表面の観察

PP intact の粒子表面は平滑であり、粒子径は 200 μm の細長い粒子径が観察された (Fig. 40)。PM (PP/ α CD=1/2)、PM (PP/ β CD=1/1) および PM (PP/ γ CD=1/1) においては、PP と CD の粒子が混在していることが観察された。粒子の形態学的な変化は観察されていないことから、固体状態における粒子間において見かけの相互作用がない可能性が示唆された。包接複合体を形成している CP (PP/ α CD) は、GM (PP/ α CD=1/2) と比較して 10 μm 程度の表面が滑らかな粒子が凝集した隙間のある粒子径を形成していることが確認された。GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ γ CD=1/1) は PP や α CD、 γ CD の粒子径が観察されず、それぞれ 100 μm 、30 μm の凝集かつ表面が粗雑な粒子径が観察された。CP (PP/ γ CD) は GM (PP/ γ CD=1/1) と比較して 10 μm 以下の表面が滑らかな正方形の粒子が凝集せず散逸した状態で存在していることが確認された。共沈法で調製した PP/CD 包接複合体の粒子径は GM と比較して粒子径が小さいことが確認されたため、表面積が増大する可能性が示唆された。



Fig. 40. SEM micrographs of PP/CDs systems.

3-5 Raman 測定による PP/CD 包接複合体の分子状態の評価

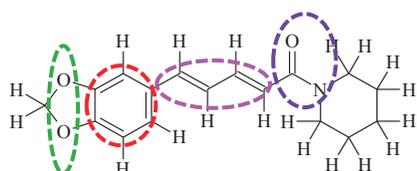
PXRD および DSC 測定の結果より、共沈法を用いて調製した PP と α CD、 γ CD との包接複合体の形成が示唆された。PP は構造中に C-C および C=C 構造を有している。第 2 節にて、GM で調製した PP/ α CD、PP/ β CD および PP/ γ CD 包接複合体は PP の脂溶性部位であるメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖の運動性を顕著に抑制する事が明らかになっている。そのため、固体状態における GM および CP との PP の運動性の違いについて評価した (Fig. 41)。

Raman 測定の結果より、PP 単独では芳香環由来の C=C (1584 cm^{-1})、ペンタジエン鎖由来の C=C (1625 cm^{-1})、O=C-N- (1597 cm^{-1})、CH₂ ($1203, 1448\text{ cm}^{-1}$)、=C-O-C (1256 cm^{-1})、CH (1103 cm^{-1}) の散乱ピークが観測された (Fig. 41-a)。PM (PP/ α CD=1/2) においては、PP に由来する散乱ピークが芳香環由来の C=C (1582 cm^{-1})、ペンタジエン鎖由来の C=C (1625 cm^{-1})、O=C-N- (1598 cm^{-1})、CH₂ ($1203, 1446\text{ cm}^{-1}$)、=C-O-C (1255 cm^{-1})、CH (1103 cm^{-1}) で観測された (Fig. 41-c)。GM (PP/ α CD=1/2) では、CH₂ および芳香環由来の C=C の散乱ピークのブロード化およびラマン散乱強度の低下を示した。また、PP 由来の CH (1103 cm^{-1}) のピークが 1094 cm^{-1} へシフトしたことが確認された (Fig. 41-e)。CP によって調製した CP (PP/ α CD) は芳香環およびペンタジエン鎖由来の C=C の散乱ピークのブロード化、新たに、アミド基の散乱ピークが 1635 cm^{-1} に観測された。また、PP 由来の CH (1103 cm^{-1}) のピークが 1087 cm^{-1} へ大きくシフトしたことが確認された (Fig. 41-d)。したがって、CP (PP/ α CD) は GM (PP/ α CD=1/2) と比較して PP の芳香環およびペンタジエン鎖を固定化することで、共役に影響し、アミド基の運動性が低下したことが示唆された。また、CH 運動性が PP 単独および GM と異なることから、PP のピペリジンの歪みが異なることが示唆された。

γ CD 系において、PM (PP/ γ CD=1/1) は、PP に由来する散乱ピークが芳香環由

来の C=C (1583 cm⁻¹)、ペンタジエン鎖由来の C=C (1624 cm⁻¹)、O=C-N- (1597 cm⁻¹)、CH₂ (1203, 1446 cm⁻¹)、=C-O-C (1257 cm⁻¹)、CH (1105 cm⁻¹) で観測された (Fig. 41-g)。GM (PP/γCD=1/1) は芳香環由来の C=C (1582 cm⁻¹) のラマン散乱強度の低下および CH ピークのブロード化が観測された (Fig. 41-i)。一方で CP (PP/γCD) は芳香環由来の C=C、エーテル基および CH₂ の散乱ピークのブロード化およびペンタジエン鎖由来の C=C の散乱ピーク (1625 cm⁻¹) の強度の低下が確認された。また、アミド基の散乱ピークが 1634 cm⁻¹ に観測された (Fig. 35-h)。これらの結果から、αCD 系は γCD 系と比較して CD の環状サイズに依存して芳香環およびペンタジエン鎖の運動性を顕著に抑制していることが確認された。また、PP はエーテル基からアミド基にかけて共役する化学的特徴がある³⁾。これらの結果から、CP は GM と比較して、CD が PP の芳香環およびペンタジエン鎖を密接に包接することで、PP の共役系に影響を及ぼし、間接的にアミド基の運動性を顕著に抑制する特徴を示した。これらの相互作用の違いは、溶液状態において、包接複合体から包接化合物へ生じる非平衡状態に影響し、PP の溶出性に影響する可能性があると考えられた。

Piperine



-CH
 -CH₂
 O=C-N-
 =C-O-C
 C=C (aromatic)
 C=C (pentadiene)

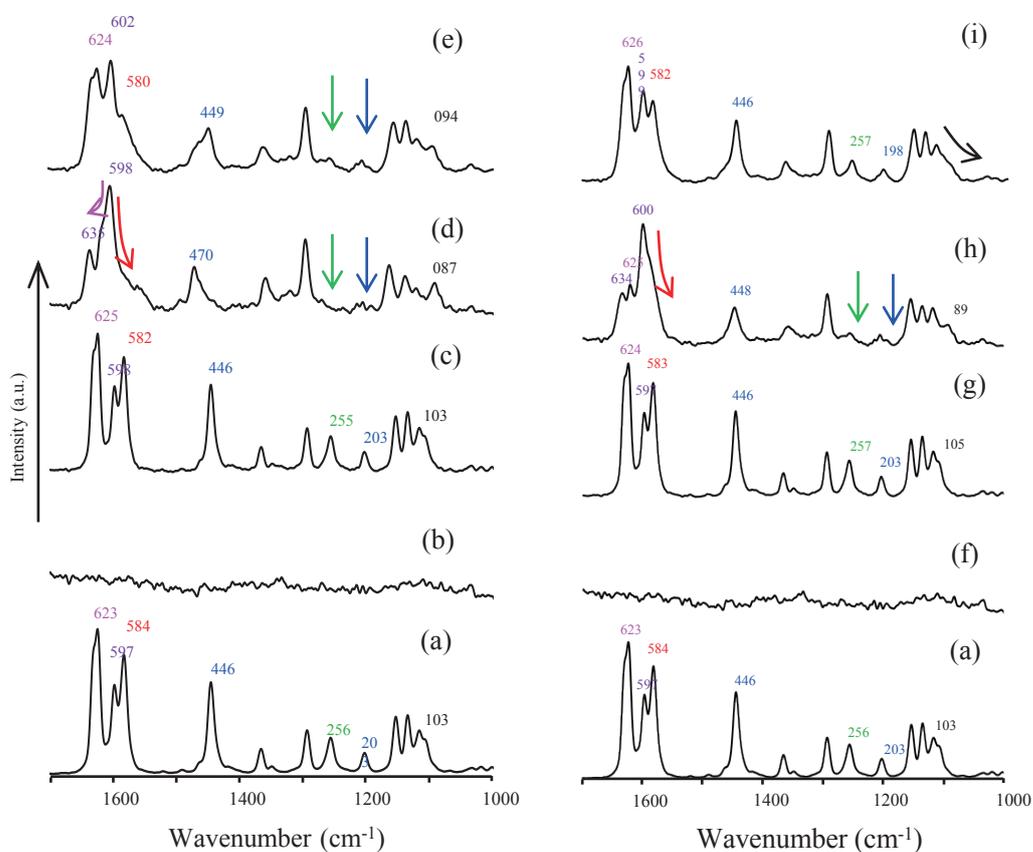


Fig. 41. Raman spectra of (a) PP intact, (b) α CD, (c) PM (PP/ α CD=1/2), (d) CP (PP/ α CD), (e) GM (PP/ α CD=1/2), (f) γ CD, (g) PM (PP/ γ CD=1/1), (h) CP (PP/ γ CD), (i) GM (PP/ γ CD=1/1).
 -CH: 1104 cm⁻¹, -CH₂: 1203 cm⁻¹, 1448 cm⁻¹, O=C-N-: 1600 cm⁻¹, =C-O-C: 1256 cm⁻¹, C=C (aromatic) : 1584 cm⁻¹, C=C (pentadiene) : 1625 cm⁻¹

3-6 PP/CD 包接複合体からの PP の溶出性の評価

固体状態の物性評価により、共沈法で調製した CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) の包接複合体形成が示唆された。そこで、GM と分子間相互作用が異なる CP の PP の溶解性を確認するために、第 2 節で確認された GM で調製した包接複合体との溶出性の比較評価を行った (Fig. 42)。

PP 単独、PM (PP/ α CD=1/2) および PM (PP/ γ CD=1/1) の試験開始 5-120 分後の PP の濃度はそれぞれ 0.83-3.0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.27-7.6 $\mu\text{g/mL}$ 、0.414-2.5 $\mu\text{g/mL}$ と低い濃度であった。CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) の PP の溶解性はそれぞれ 13.9-21.9 $\mu\text{g/mL}$ 、20.1-26.1 $\mu\text{g/mL}$ と高い溶解性向上が確認された。

CP (PP/ α CD) は GM (PP/ α CD=1/2) と比較して 5-120 分値の溶解性に大きな差は確認されなかったが、CP (PP/ γ CD) は GM (PP/ γ CD=1/1) と比較して 5 分および 120 分値の溶解性はそれぞれ 1.8、1.7 倍高い溶解性を示した。この理由として、Raman 測定において CP (PP/ γ CD) は GM (PP/ γ CD=1/1) と比較して、PP のアミド基、共役系に影響する芳香環およびペンタジエン鎖部分の運動性を抑制することが確認されており、PP の脂溶性部分が CD に密接に包接されていることが、PP のみかけの溶解性向上に寄与していることが示唆された。また、CP は GM と比較して密接な相互作用を示すため、包接複合体から包接化合物へ平衡状態が容易に進行した可能性が考えられた。さらに、SEM 測定において、CP (PP/ γ CD) は CP (PP/ α CD)、GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ γ CD=1/1) と粒子形態が異なり、10 μm 以下の表面が滑らかな正方形の粒子が凝集せず散逸な状態で存在している。すなわち、調製法が異なることによる PP と CD の相互作用の違いが、包接複合体から包接化合物へ生じる非平衡状態に影響し、PP の溶解濃度に影響する可能性があると考えられた。また、水と接する粒子の表面積が増大したことが立ち上がりの溶解速度に寄与していることが考えられた。

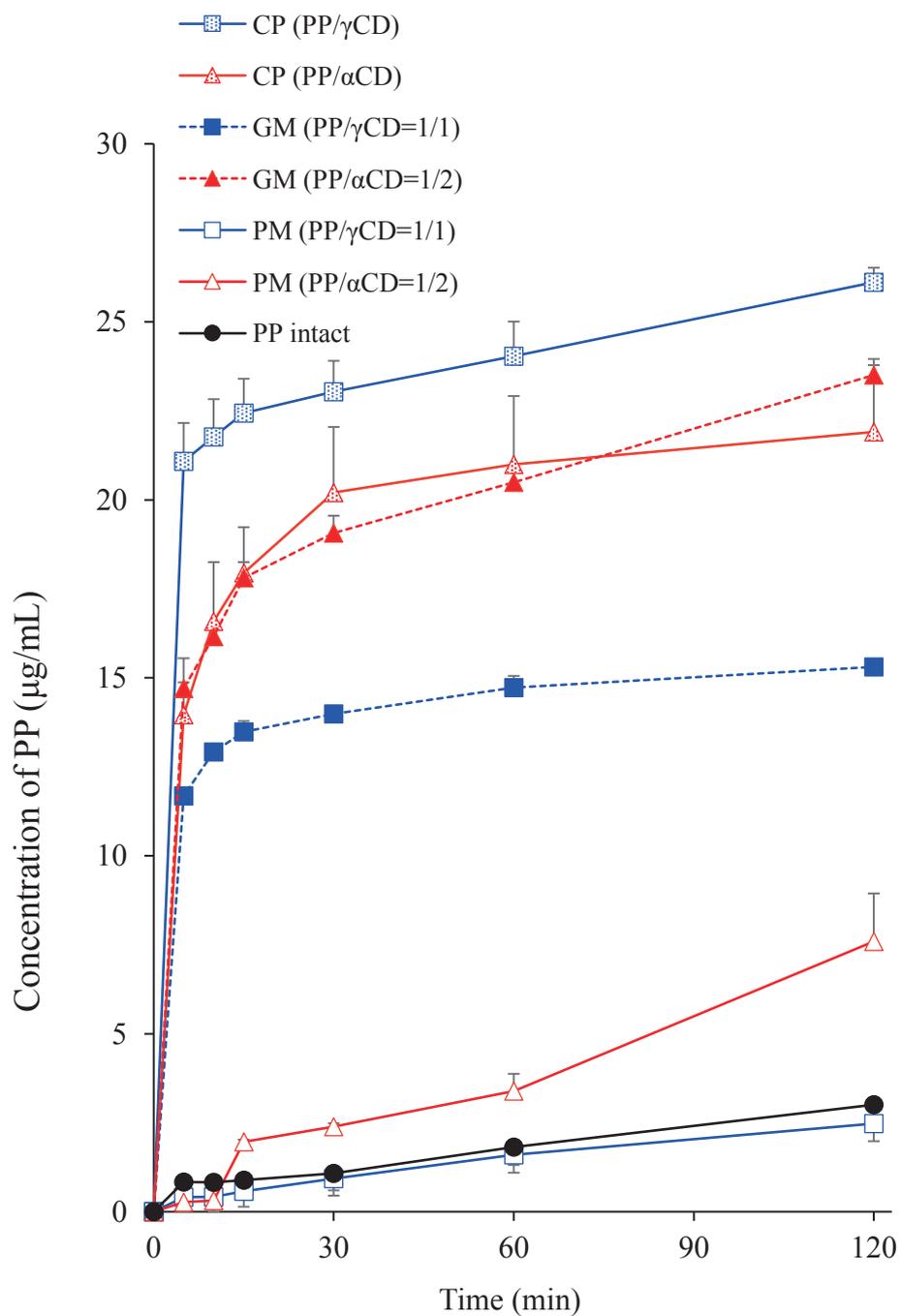


Fig. 42. Dissolution profiles of PP with CDs in distilled water. Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

3-7 2 次元 NMR を用いた溶液状態における PP/CD 共沈物から生じた包接化合物の分子間相互作用の検討

CP(PP/ α CD) において、包接化合物における PP はメチレンジオキシフェニル基に由来する O-CH₂-O (H-J) が 5.83 ppm、CH は 6.66 (H-E), 6.80 (H-D), 6.84 (H-C) ppm 付近に観測された。また、ペンタジエン鎖由来のペンタジエン鎖の CH は 6.22 (H-H), 6.62 (H-G), 6.64 (H-F), 7.07 (H-A) ppm 付近に観測され、混合粉砕物の包接化合物における PP と比較して高磁場側に位置していた。これにより、固体だけでな溶液状態においても、包接化合物中の PP は GM および CP で異なる事が示唆された。CD のグルコース 1 分子の C₃、C₅、C₆ に帰属する H-3、H-5、H-6 は、それぞれ 3.69, 3.81, 3.75 ppm 付近に観測された (Fig. 43)。PP のメチレンジオキシフェニル基に由来する H-J のピークと α CD の H-5、H-3、H-6 のプロトン間でクロスピークが確認された。また、PP の脂溶性部位である芳香環の H-C と α CD の広い環状の縁の内側に位置する H-3 においてクロスピークが確認された。また、H-D と α CD の中間に位置する H-5 においてクロスピークが確認された (Fig. 43)。NOE によるクロスピークは 0.4 nm 以下のプロトン間の距離を示すことから、1 分子の α CD は広い環状の縁の H-3 から狭い環状の縁の H-6 にかけてメチレンジオキシフェニル基に包接していることが示唆された。また、PP の H-E, F, G と α CD の H-5、H-3、H-6 のプロトン間でクロスピークが確認された。特に H-E と α CD の広い環状の縁の内側に位置する H-3 において強い NOE が観測された (Fig. 37)。PP のペンタジエン鎖由来のプロトンである H-A については α CD の狭い環状の縁の内側に位置する H-6 とクロスピークが確認されたことから、もう 1 分子の α CD はペンタジエン鎖由来の C=C に包接しており、広い環状の縁の H-3 がメチレンジオキシフェニル基の芳香環に向けた形で位置することが示唆された。したがって、CP(PP/ α CD) は PP のメチレンジオキシフェニル

ル基およびペンタジエン鎖の C=C を 2 分子の α CD が head to head の様式で、包接していることが推察された。固体状態の相互作用を確認する Raman 測定において、CP (PP/ α CD) は GM (PP/ α CD=1/2) と比較して PP の芳香環およびペンタジエン鎖を顕著に抑制する (Fig. 35)。一方、溶液状態においては、CP (PP/ α CD) は GM (PP/ α CD=1/2) と似た包接様式を形成しているが、PP のペンタジエン鎖を α CD がより密接に包接した包接化合物を形成していることが示唆された。

CP (PP/ γ CD) は GM (PP/ γ CD=1/1)と同様に PP と γ CD のプロトン間において NOE が観測されなかった (Fig. 44)。第 1 節の溶解度相図にて、PP と γ CD の安定度定数 $K_{1/1}$ は 248 M^{-1} と低値を示すことが確認されたことから、包接複合体が溶液中で解離しやすく、包接化合物としての溶解度を維持しにくい特性が NMR 測定に影響したものと考えられる。

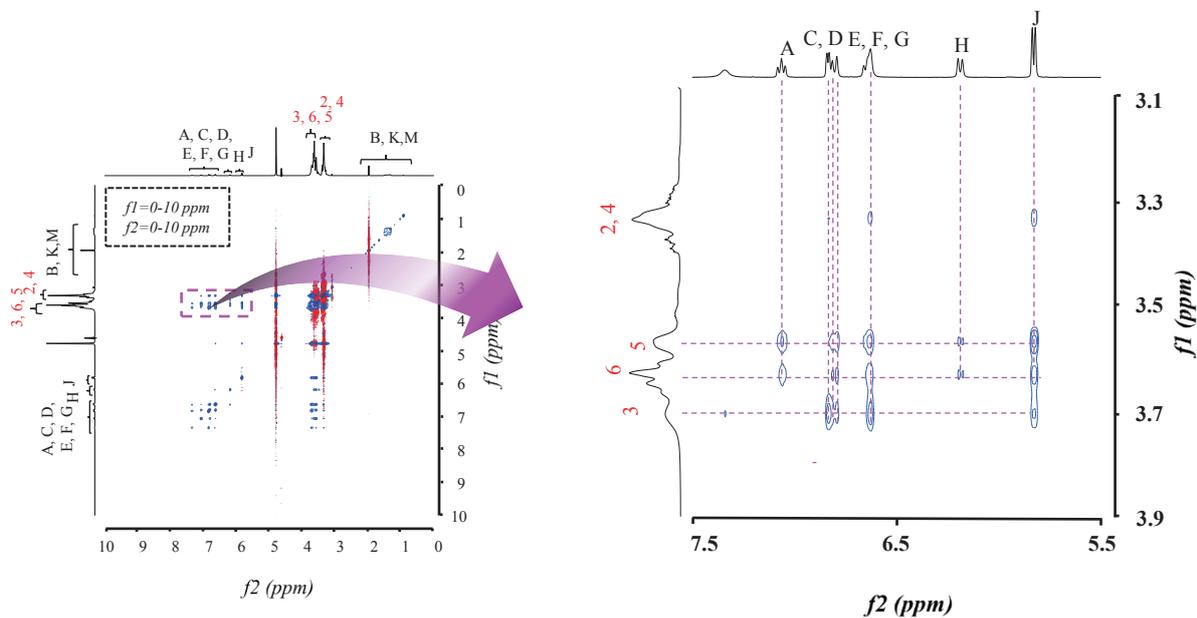
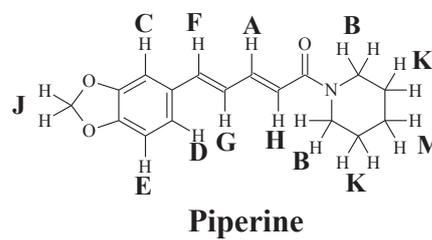
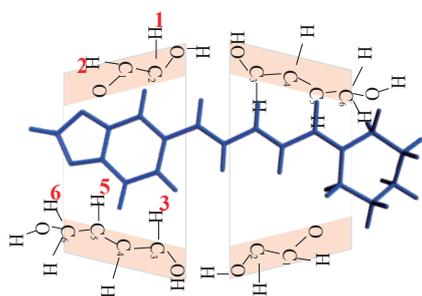


Fig. 43. ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum produced by CP (PP/ α CD) in D_2O . X is 5.5-7.5 ppm, and Y is 3.1-3.9 ppm.

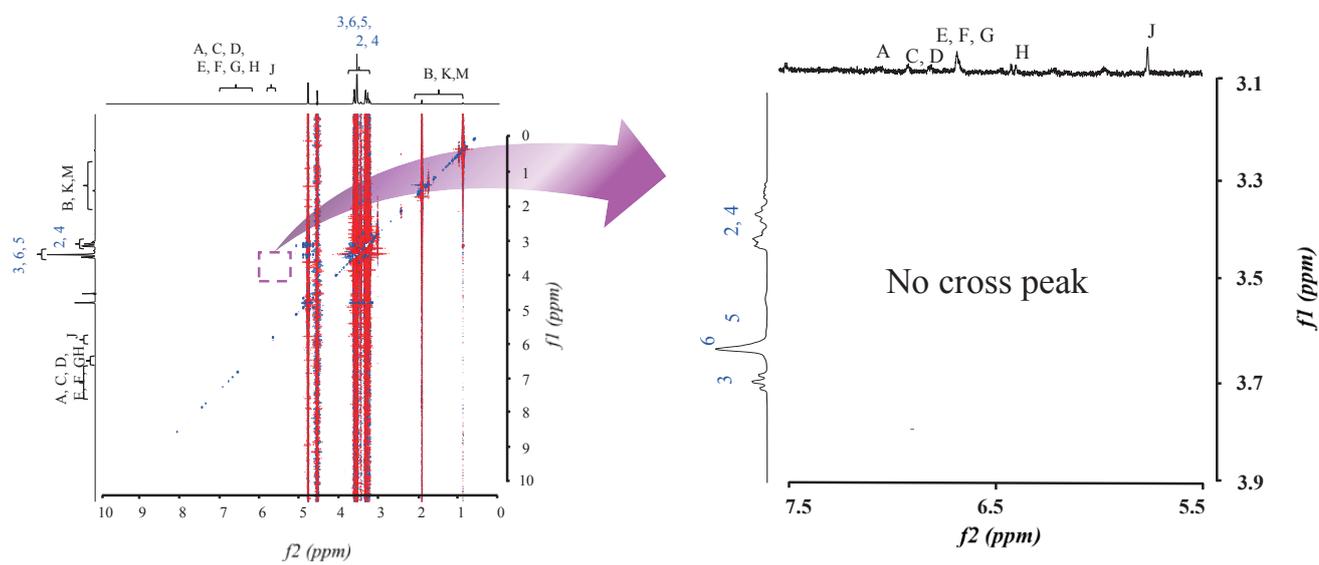


Fig. 44. ^1H - ^1H NOESY NMR spectrum produced by CP (PP/ γ CD) in D_2O . X is 5.5-7.5 ppm, and Y is 3.1-3.9 ppm.

3-8 PP/CD 包接複合体からの PP の溶出性と包接複合体および包接化合物の分子状態の関係に関する考察

α CD および γ CD の空洞径はそれぞれ 4.7-5.3 Å、7.5-8.3 Å である。PP のメチレンジオキシフェニル基に付属する O-CH₂-O の O-O 距離および芳香環炭素間で最も距離の長い対角線距離は 2.27 Å、2.79 Å である⁹⁾。そのため、PP のメチレンジオキシフェニル基は CD 空洞内と密接な距離に位置することで、O-CH₂-O は CD の OH 基と水素結合を形成しやすい距離になる。CD が PP を包接する狭い環状の縁と広い環状の縁の選択は相互作用を示す分子間距離が寄与している。また、この溶出試験の CD 濃度を溶解度相図の横軸である CD 添加量に当てはめても、溶出試験の PP は溶解度相図と比較して高い溶解性を示している。特に注目すべき点として、溶解度相図の PP/ γ CD 包接化合物は γ CD 3mM で PP 0.04 mM (1.1×10^{-2} mg/mL) の最大溶解度が確認されているが、CP (PP/ γ CD) は 120 分で 2.6×10^{-2} mg/mL と 2 倍以上の溶解性を示している。さらに、GM (PP/ γ CD=1/1) と比較しても、高い溶解性を示している。このように、包接複合体から生じた相互作用が溶液状態における包接化合物に影響していることが示唆された。

以上の結果より、固体状態の相互作用および SEM 測定において確認された 10 μ m 以下の粒子径が凝集せず散逸な状態で存在していることなど、調製方法に応じて異なる PP の溶解性を示すことが確認された。

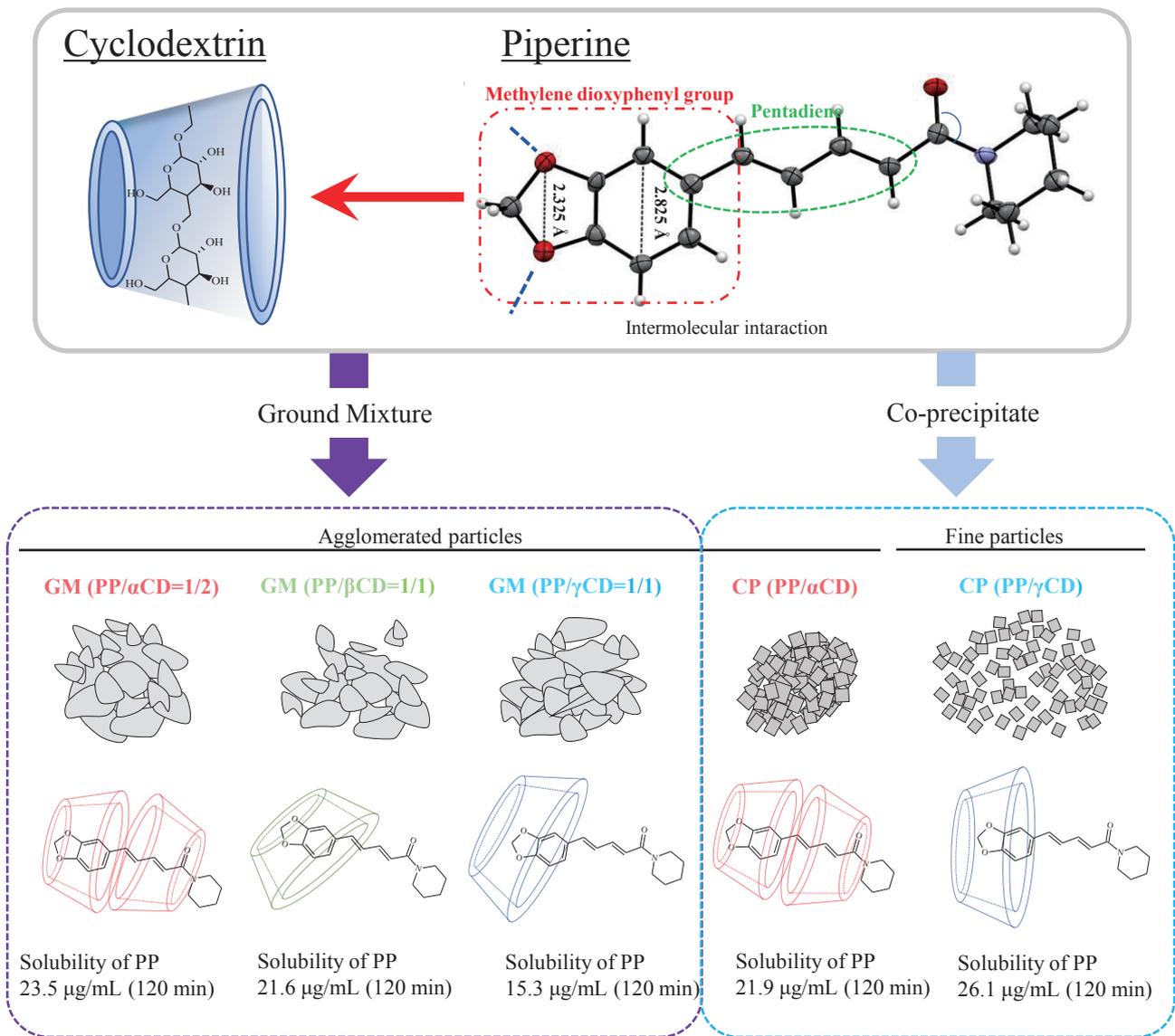
第3節 小括

第2節において、CPを用いた溶液反応によって、PP/ α CD=1/2、PP/ γ CD=1/1のモル比で包接複合体を形成することが明らかになった。 β CD単独の溶解度は α CDおよび γ CDと比較して低いため、PPとの包接複合体を形成しなかったことが示唆された。さらに、第1章の目的であるPPの溶解性向上について、CPがGMと比較してPP/ α CD=1/2、PP/ γ CD=1/1の高い溶解性が確認された。

溶液状態の評価としてD₂O溶媒を用いた¹H-¹H NOESY NMR測定を実施した結果、CP (PP/ α CD) はGM (PP/ α CD=1/2) と同様に2分子の α CDがPPのメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖をhead to headの包接様式で包接する特徴が確認された。また、CPはGMと比較して、ペンタジエン鎖を密接に包接する特徴が観測された。一方で、CP (PP/ γ CD) はGM (PP/ γ CD=1/1) と同様にPPと γ CDのプロトン間におけるNOEが観測されなかった。Raman測定による固体状態の評価において、CP (PP/ α CD) およびCP (PP/ γ CD) はGM (PP/ α CD=1/2) およびGM (PP/ γ CD=1/1) と比較して、PPのメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖に密接な相互作用を示すことが確認された。PPのメチレンジオキシフェニル基のO-O距離、芳香環のC-C距離はそれぞれ、2.3、2.8Åを示すため、 α CDの空洞径はPPの分子サイズと近い特徴を示す。PPのO原子とCDのOH基間で水素結合を形成しやすい距離を示す。したがって、 α CDは密接に包接複合体を形成することが可能であると考えられた。また、CP (PP/ γ CD) の粒子径はCP (PP/ α CD)、GM (PP/ α CD=1/2) およびGM (PP/ γ CD=1/1) と比較して、10 μ m以下の粒子径が凝集せず散逸な状態で存在していることが確認された。

CP (PP/ γ CD) は混合粉碎法によって調製されたGM (PP/ α CD=1/2) と比較して高い溶解性を示しており、包接複合体中のPPの物理化学的性質 (PPの芳香環、

ペンタジエン鎖、アミド基の運動抑制) や溶出の過程で生じる溶液状態における包接化合物の分子間相互作用の状態が、PP の溶解性に寄与することが明らかになった。また、溶出試験は溶解度相図と比較して少ない CD 量で高い PP の溶解性を示しており (Fig.2, 41)、PP と CD の平衡定数だけが溶解性向上に寄与したのではないことが示唆された。したがって、各 PP/CD における PP の溶解濃度の違いは固体状態における PP と CD との相互作用および粒子径が影響していることが確認された (Scheme 2)。これらの溶解性の変化は、PP の溶解性をコントロールすることが可能になり、腸管収縮調節作用としての利用に期待される特異的な PP/CD 包接複合体を選択できる可能性がある。



Scheme 2. Physicochemical properties that contribute to improving the solubility of PP.

第4節 PP/CDs 包接複合体を用いた生体関連媒体における溶解特性の評価

第4節 序

第1節から第3節において、PPと各CDとの包接複合体調製はGMおよびCPによって可能となり、PPの包接化現象および物理化学的性質について明らかとなった。

第1節および2節からPPの疎水性部位であるメチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖にCDが包接する程度に応じて、PPの水への溶解性が向上することが確認された。PPの水への溶解性向上はPPの主要な作用である腸管収縮調節作用に影響することが予想された。そこで、水への溶解性だけでなく、生体関連媒体を用いたPPの溶解特性および物理化学的性質について評価することとした。

第4節では、PPおよび各種包接複合体を用いて、溶出試験第一液 (pH1.2)、空腹時人工腸液 (Fasted state-simulated intestinal fluid, FaSSIF, pH6.5) の溶解性について評価した。ヒトの消化管内は胆嚢からNaTCが十二指腸に向けて分泌されるため、脂溶性化合物をミセル形成による可溶化を可能としている。ヒト空腹時の消化管上部における水分情報を基にリン酸緩衝液にNaTCとリン脂質を加えたFaSSIFは難水溶性化合物のヒト経口吸収率の予測に使用されている⁴⁴⁻⁴⁵⁾。

FaSSIF溶液からタウロコール酸 (Sodium taurocholate, NaTC) およびレシチンを除いた溶媒を調製して、FaSSIFとのPPの溶解特性を比較評価することとした。さらに、溶液中のPPの分子挙動を溶液蛍光にて確認することで、PPの溶解性変化に関わる化学的性質を評価することとした。

4-1 PP/CDs 包接複合体を用いた溶出試験第一液における PP の溶出性の評価

酸性条件下における PP および各種包接複合体の溶解性を評価するために溶出試験を実施した (Fig. 45)。溶出試験第一液 (pH 1.2) において、PP は 120 分で 4.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示した。GM で調製されたサンプルにおいて、GM (PP/ α CD=1/2) は 15 分値で 19 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と最も溶解性が高く 15 分から 120 分にかけて変化は確認されなかった。また、GM (PP/ β CD=1/1) は β CD が α CD および γ CD と比較して溶解性が低く、また CD の空洞内の一部はエーテル結合の酸素原子と水素結合があるため、疎水性となっており、水に溶解した状態で存在する β CD の疎水性領域が PP との疎水性相互作用を示すため、徐放性の溶解挙動を示した。一方、CP で調製した CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) の PP の溶解性は各種 GM と比較して高いことが確認された。CP (PP/ γ CD) は 15 分で一過的に最大溶解度 (40.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示し、その後低下しても 120 分で 31.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶解性が確認された。CP (PP/ α CD) は過飽和の影響を受けずに 120 分で 38.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最大溶解度を示した。共沈法で調製された CP (PP/ α CD) は各 GM および CP (PP/ γ CD) と比較して密接に PP が包接されている。このことから、CD 内の PP の分子配置および分子形態が PP の溶解性向上に寄与していることが示唆された。

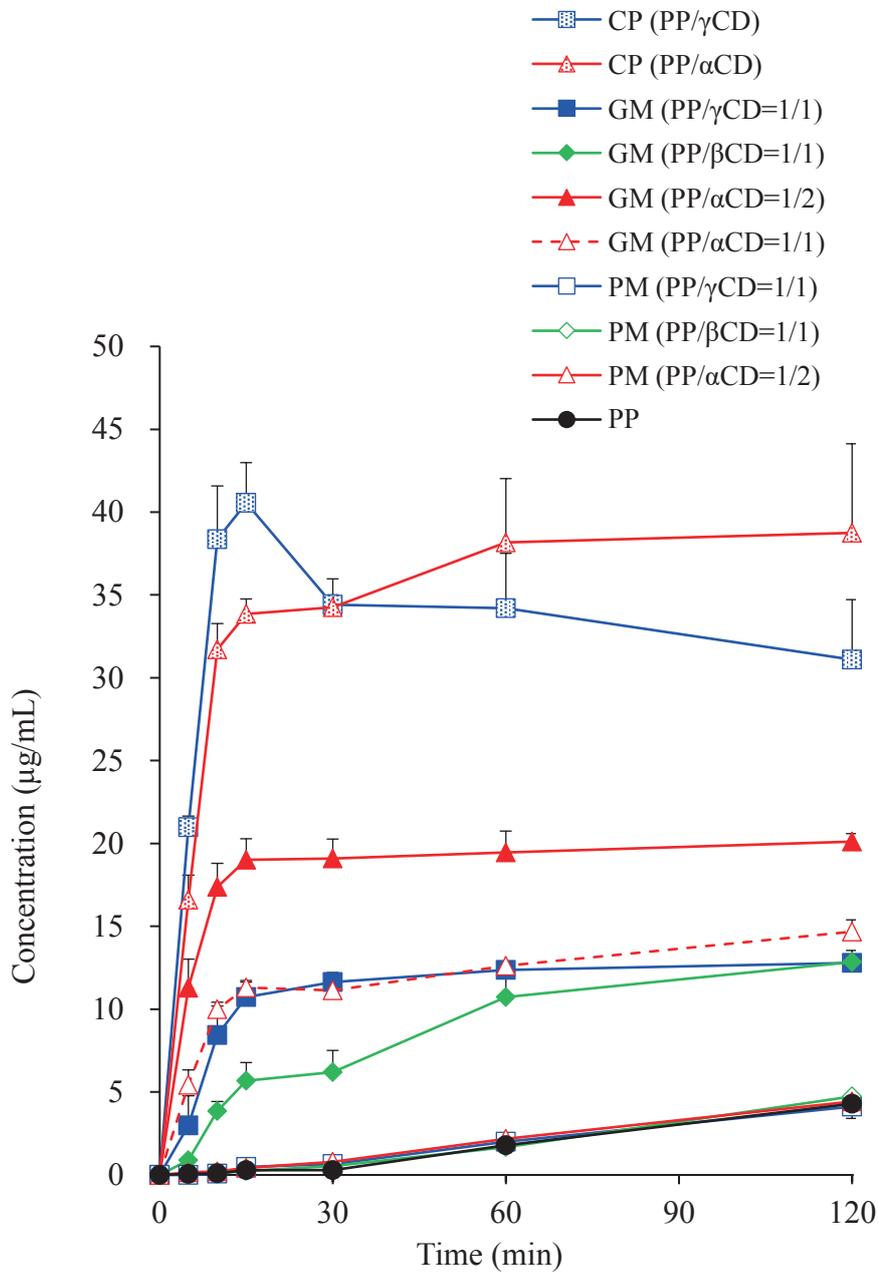


Fig. 45. Dissolution profiles of PP with CDs of in First liquid of the Pharmacopoeia (900 mL). Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

4-2 PP/CD 包接複合体を用いた FaSSIF における PP の溶出性評価

腸に到達した各種包接化合物の PP の溶解性を評価するために、空腹時人工腸液 (FaSSIF) を用いた溶出試験を実施した (Fig. 46)。FaSSIF 条件下において PP の溶解性は試験開始 120 分で 11.6 $\mu\text{g/mL}$ の PP 濃度を示した。GM (PP/ αCD =1/2) は試験開始 15 分で 18.4 $\mu\text{g/mL}$ との最も高い PP 濃度を示し、試験開始 120 分では αCD 系の GM (PP/ αCD =1/1)、GM (PP/ αCD =1/2)、PM (PP/ αCD =1/2) と同等の溶解度を示した。 αCD 系の PP の溶解度は GM で調製された βCD および γCD 包接複合体と比較して高いことが確認された。 αCD はリン脂質と複合体を形成しやすい特徴が報告されている⁴⁶⁾。 αCD 系の溶解性が 120 分で同等になる理由として、第 1 章の第 1 節より、PP に包接する PP/ αCD = 1/2 の 2 分子目の αCD の安定度定数 ($K_{\alpha 1/2} = 47\text{M}^{-1}$) が低いことが確認された。このことから、溶液中の αCD がレシチンと包接複合体を形成することで αCD を消費し、溶液中の PP/ αCD =1/1 包接化合物の割合が高くなることで溶解性に寄与した可能性が考えられる。また、FaSSIF に含まれるタウロコール酸 (NaTC) は溶液中の包接化合物中の薬物を取り込む (交換現象) により薬物の溶解性を向上させる特徴が報告されている⁴³⁾。すなわち、CD の環状サイズに依存した PP の分子配置による可溶化と PP/ αCD の安定度定数および NaTC の交換現象が溶解性に寄与していることが考えられた。

一方で、共沈法で調製された複合体に着目した場合、CP (PP/ αCD) の溶解性は混合粉砕物および CP (PP/ γCD) と比較して 15 分での溶解性 (52.7 $\mu\text{g/mL}$) が最も高く、過飽和現象により溶解性が低下したが、120 分では 34.5 $\mu\text{g/mL}$ と高い溶解性を維持していた。CP (PP/ γCD) の溶解性は 15 分で 41.1 $\mu\text{g/mL}$ を示し、過飽和により溶解性が 120 分で 36.8 $\mu\text{g/mL}$ まで低下し、CP (PP/ αCD) と同等の溶解性を示した。CP (PP/ αCD) および CP (PP/ γCD) の 15 分の溶解度が高い理由とし

て、Raman 測定により、CP は GM と比較して PP の芳香環およびペンタジエン鎖を顕著に抑制しているため、密接に包接複合体を形成している特徴が確認されている (Fig. 37)。また、NaTC およびレシチンは胆嚢胆汁中に見られる主要な脂溶性成分の可溶化剤であり、混合ミセルを形成し、小腸内腔からのコレステロール吸収を高めるプロセスが報告されている⁴⁴⁾。NaTC およびレシチンが存在しない溶媒では、CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) の溶解性は 15 分で等しく、120 分では CP (PP/ γ CD) が CP (PP/ α CD) と比較して、過飽和現象の影響を受けており、pH の影響や PP と CD との平衡定数により、解離しやすい PP/ γ CD は特に溶解性が 10 μ g/mL 以上低下した理由であると考えられる (Fig. 47)。一方で、NaTC およびレシチンが存在することで、CP によって調製された溶液中の包接化合物は PP の更なる可溶化に寄与したものと示唆された。通常、安定度定数が低値の包接複合体の場合、NaTC やレシチンによる影響が予想されるが、CP や GM で調製された PP/ α CD および PP/ γ CD 包接複合体は組成が同じであるにもかかわらず、溶解濃度が大きく異なる。これらは、単に PP と CD の化学平衡だけでなく、包接複合体の物理化学的性質や包接複合体から生じた包接化合物の高い溶解性が FaSSIF 中における NaTC およびレシチンによって、更なる溶解性向上に寄与したものと考えられる。

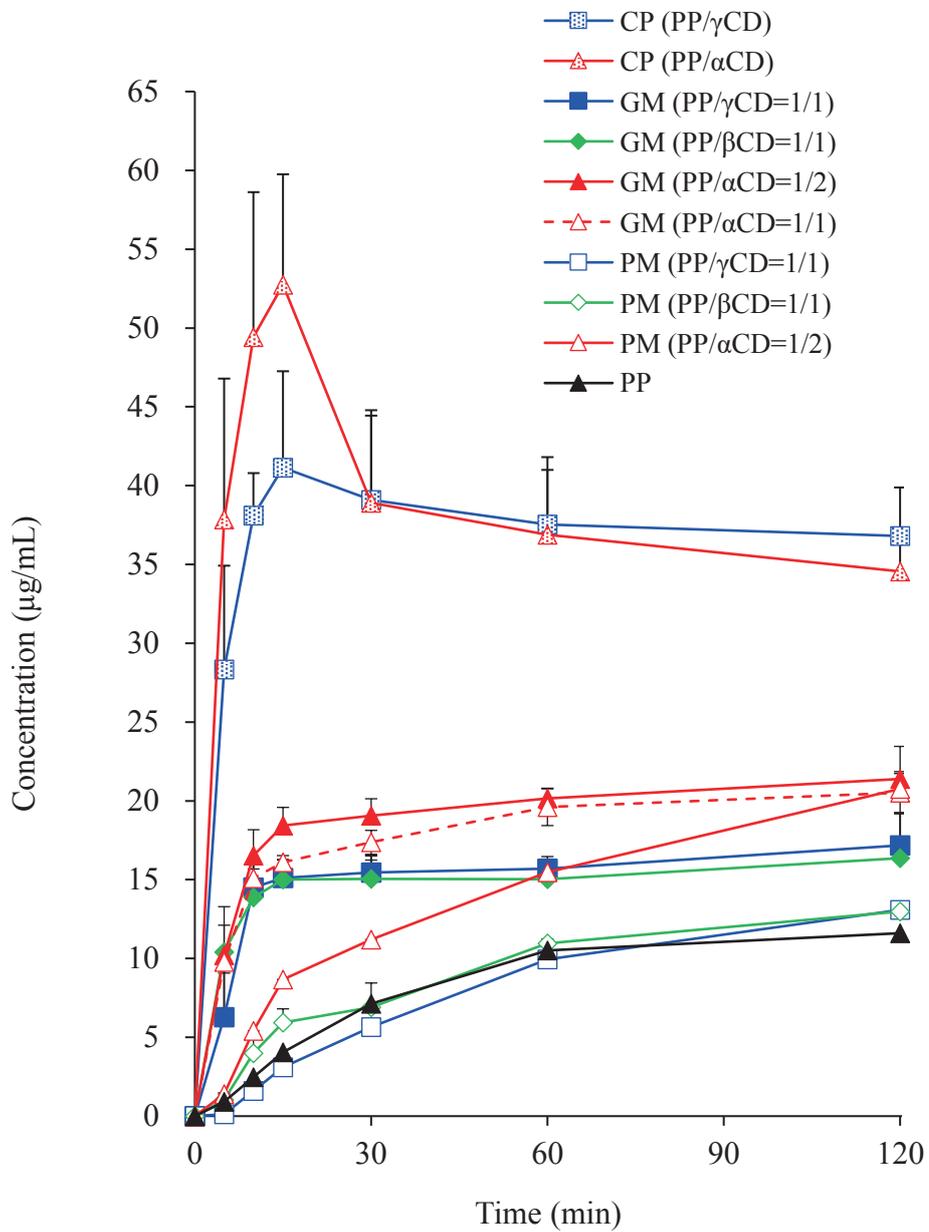


Fig. 46. Dissolution profiles of PP with CDs of in FaSSiF (300 mL). Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

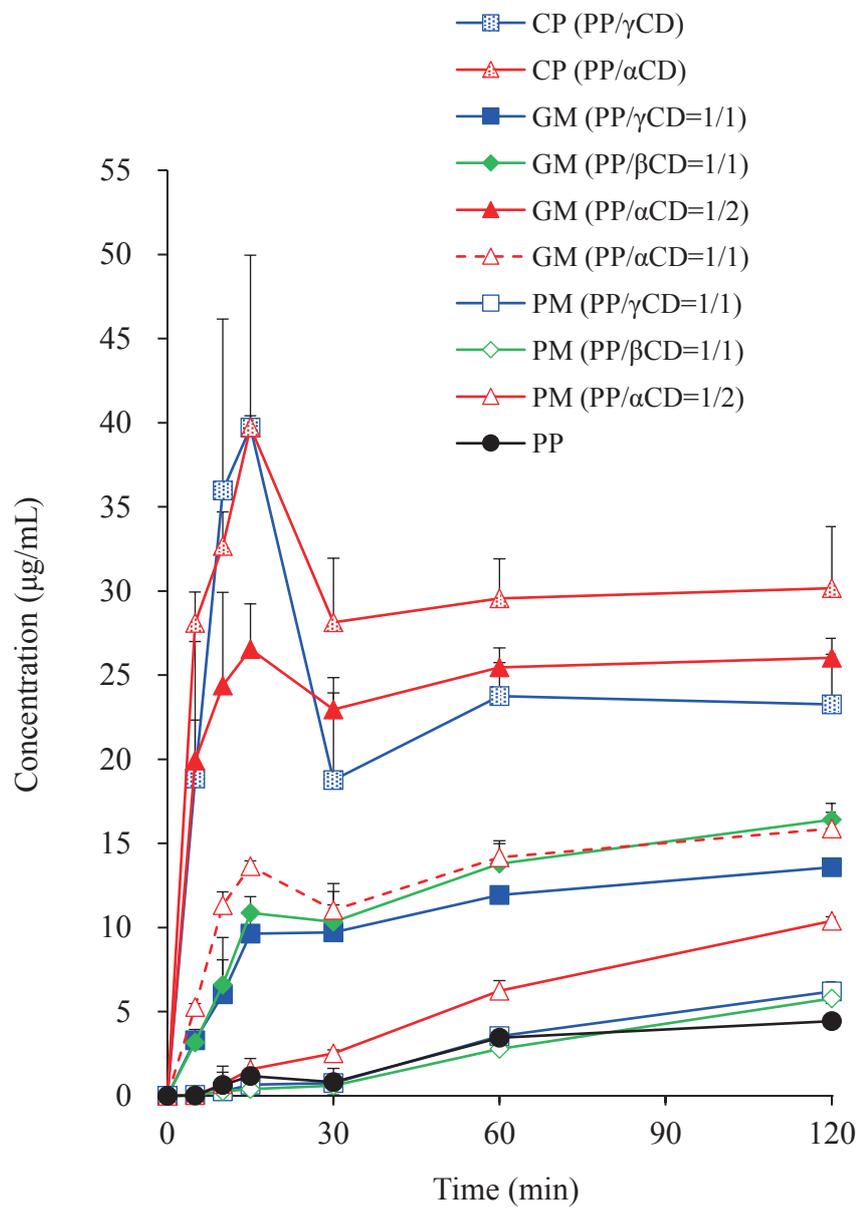


Fig. 47. Dissolution profiles of PP with CDs in in Fasted State Simulated Intestinal Fluid (Sodium taurocholate and lecithin are not included, 300 mL). Results were expressed as mean \pm S.D. (n=3)

4-3 FaSSIF 中における PP/CD 包接化合物の溶液蛍光測定の評価

PP および各種包接複合体が FaSSIF 溶液中で著しい溶解性の向上が示したため、NaTC およびレシチンによる影響を確認するために、溶液蛍光測定を実施した。分子配向性は、励起状態から基底状態へのエネルギー差によって蛍光波長がシフトすると知られている⁴⁸⁾。また、CD の可溶化による蛍光度の増加は包接複合体の形成を示すことが報告されており、疎水性相互作用は PP の蛍光極大波長を低波長側へシフトさせる⁴⁹⁻⁵⁰⁾。そこで、PP の溶解性が人工腸液中において、どのような分子挙動を示すかを評価するために、蛍光スペクトル測定を実施した。FaSSIF 中に含まれるレシチンは NaTC とミセル形成をすることで、脂溶性物質を取り込む性質を有する。そのため、レシチンの有無は PP の溶出性に影響することが予想される。また、レシチンの物理化学的性質として、NaTC では観測されない蛍光極大波長を有することから、CD または PP 添加による高次ミセル凝集体形成の影響をレシチンの蛍光波長の変化から評価することが可能である。

FaSSIF 溶液は 399 nm にラマン散乱光、540 nm に励起光の二次性散乱光が確認された (Fig. 48-50 a-d)。FaSSIF のレシチン溶液は 362 nm に蛍光極大波長が観測された (Fig 48-50-c)。タウロコール酸およびレシチンが存在していない溶液において、PP、PM および包接化合物の蛍光スペクトルが異なる蛍光極大波長、強度で確認された (Fig. 48-50-b)。これにより、混合粉砕物および共沈物から生じた包接化合物は化学平衡状態の包接化合物と状況が異なることが示唆された。レシチン溶液に各 CD を添加すると、レシチンの蛍光極大波長は 362nm から 359 nm へと短波長側にシフトしたことが観測された。短波長側へのシフトは CD との相互作用が寄与したものと考えられる。NaTC およびレシチン存在下の FaSSIF 溶液では 352 nm に蛍光極大波長が観測されたことから、ミセル形成が示唆され

た。NaTC およびレシチン存在下の FaSSIF 溶液に α CD または γ CD を添加した場合、レシチン/NaTC 溶液の蛍光極大波長の変化は観測されなかった (Fig 48-a, 50-a)。 β CD を添加すると、蛍光強度の増加が確認された (Fig. 49-a)。PP 単独、PM (PP/ α CD=1/2)、PM (PP/ β CD=1/1) または PM (PP/ γ CD=1/1) を添加すると、382 nm, 478 nm, 378 nm, 380 nm に蛍光波長が確認された (Fig. 48-50 -a)。NaTC 存在下における PP の放出挙動について、380 nm 付近の蛍光極大波長は高次ミセル凝集体の形成を示し、NaTC はモノマー単位から一次凝集体、二次凝集体、二次凝集体から高次凝集体へと疎水性相互作用と水素結合によって凝集することが報告されている⁵¹⁾。PP は水素結合などの相互作用により、リン脂質の多層ベシクルを不安定化させる作用や PP が NaTC に取り込まれた場合、蛍光強度が増加する報告がある。⁵¹⁾。このことから、FaSSIF 溶液中に NaTC/レシチンのミセル、NaTC、レシチンが存在している状態で、PP 単独または PM (PP/ α CD=1/2) を添加した場合、一次凝集体、二次凝集体を経て、高次ミセル凝集体を形成していることが示唆された。一方、GM (PP/ α CD=1/1) および GM (PP/ α CD=1/2) は PP および PM (PP/ α CD=1/2) と比較して 380 nm 付近の蛍光強度が低下し、470 nm 付近の蛍光強度が増加した。興味深いことに、FaSSIF 溶液中で最も溶解性が高い CP (PP/ α CD) は GM で調製した包接複合体と比較して、高次ミセル凝集体を形成しにくい特性が示唆された。これにより、調製方法の違いが、高次ミセル凝集体を形成に寄与し、PP の溶解性に影響することが示唆された。また、高次凝集体の形成は、PP と CD の包接複合体の物理化学的性質や包接化合物の溶解性が寄与している可能性がある。また、CP は GM と比較して、粒子径が小さいため、溶解速度が形成に影響している可能性がある。したがって、CP から生じた包接化合物から遊離した PP は高次ミセル凝集体を形成せずに、NaTC/レシチンまたは NaTC に取り込まれたことが溶解性の向上および維持に寄与した可能性がある。

る。GM (PP/ β CD=1/1) は 380 nm 付近の蛍光強度が低下し、470 nm 付近の蛍光強度は PP 単独と同等であることが確認された (Fig. 49-a)。GM (PP/ β CD=1/1) は FaSSIF 溶液中で影響を受けずに包接複合体として可溶化していることが示唆された。GM (PP/ γ CD=1/1) は 369 nm 付近の蛍光極大波長が観測された (Fig. 50-a)。FaSSIF のレシチン溶液においても、PP 単独を添加すると、高次ミセル凝集体の特異的な蛍光極大波長に近づく蛍光極大波長が 367 nm に観測されている (Fig. 48-50-c)。このことから、FaSSIF の NaTC/レシチン溶液における GM (PP/ γ CD=1/1) の蛍光極大波長は高次ミセル凝集体であることが示唆された。一方で、CP (PP/ γ CD) は他のサンプルと比較して 380 nm 付近の蛍光強度が顕著に低下し、480 nm 付近に蛍光極大波長が観測された (Fig. 49-a)。これらの結果から、CP と GM との溶解性の違いは PP と CD との密接な包接様式、SEM 測定による凝集系と散逸系の粒子径の違い (Fig. 34)が溶解性に寄与している。また、 α CD はレシチンと 4/1 または 5/1 で包接複合体を形成しやすい特徴がある⁴⁶⁾。また、その特徴は NaTC ミセルからレシチンの沈殿を介して、脂溶性物質の溶解度を低下させる⁴⁶⁾。すなわち、これらの要因によって、CP (PP/ α CD) で可溶化した一部の PP は NaTC に取り込まれた後、 α CD がレシチンと包接複合体を形成することにより、過飽和現象が誘発され、可溶化剤である NaTC によって一定の溶解性に維持したものと考えられる。一方で、 γ CD は γ CD 包接複合体の薬物と NaTC との交換現象が起きやすい性質を有する⁴⁷⁾。そのため、CP (PP/ γ CD) の場合、過飽和によって溶解性が低下する PP が NaTC との交換現象によって、溶解性維持に寄与したものと考えられた (Scheme 3)。

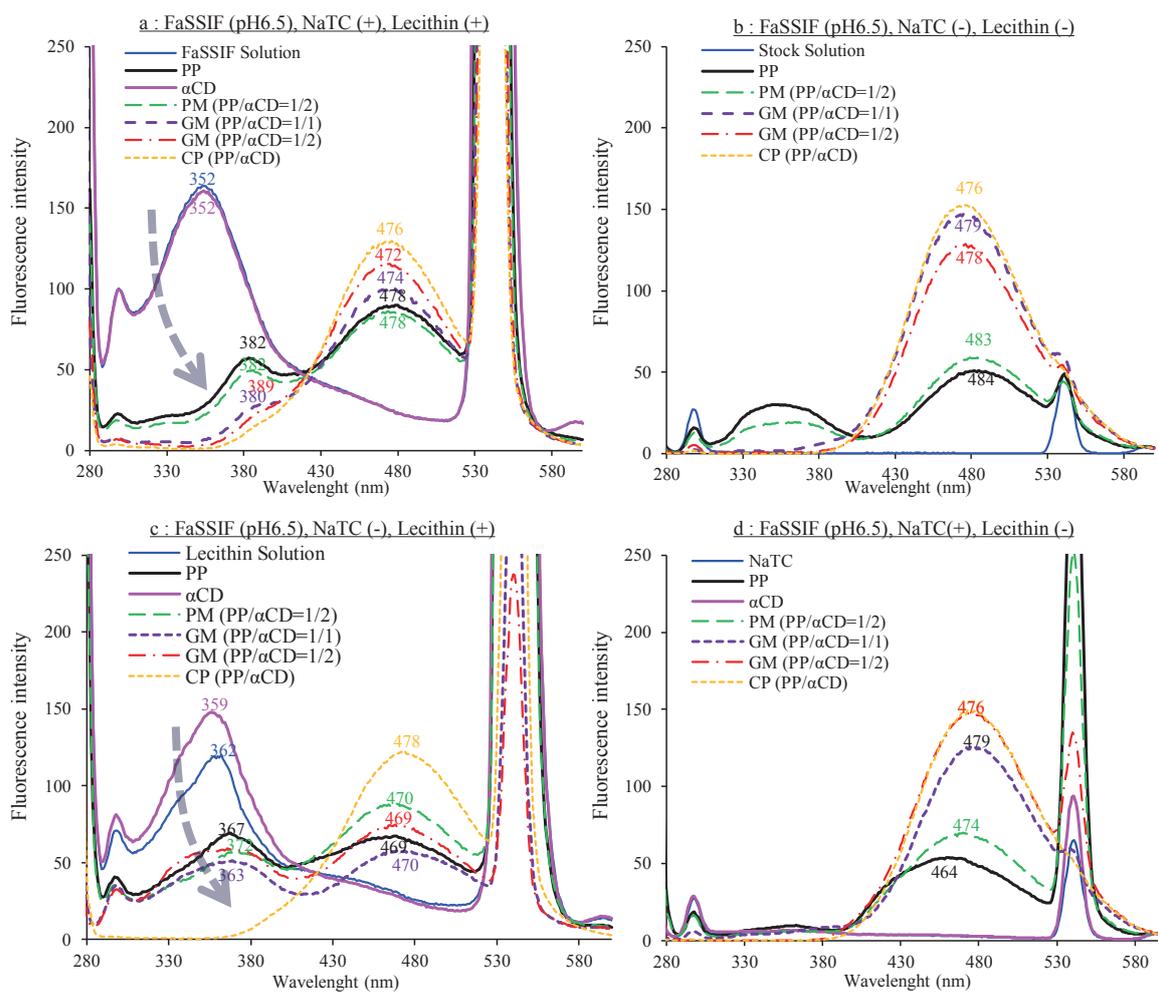


Fig. 48. Changes in the emission spectra of PP/ α CD complex systems ($\lambda_{\text{exc}} = 270 \text{ nm}$)
 (a) NaTC (+), Lecithin (+), (b) NaTC (-), Lecithin (-)
 (c) NaTC (-), Lecithin (+), (d) NaTC (+), Lecithin (-)

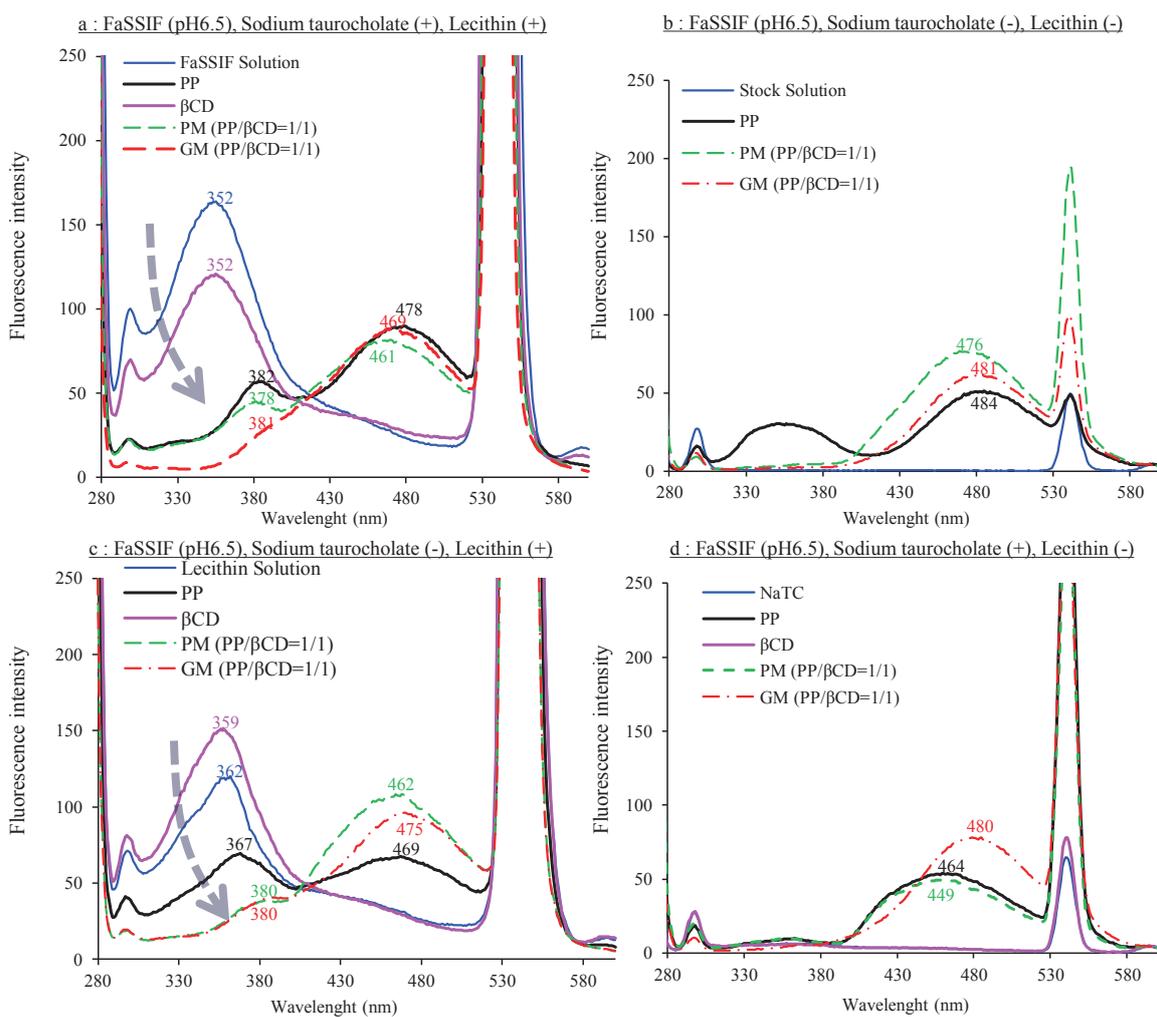


Fig. 49. Changes in the emission spectra of PP/βCD complex systems ($\lambda_{ex} = 270$ nm)
 (a) NaTC (+), Lecithin (+), (b) NaTC (-), Lecithin (-)
 (c) NaTC (-), Lecithin (+), (d) NaTC (+), Lecithin (-)

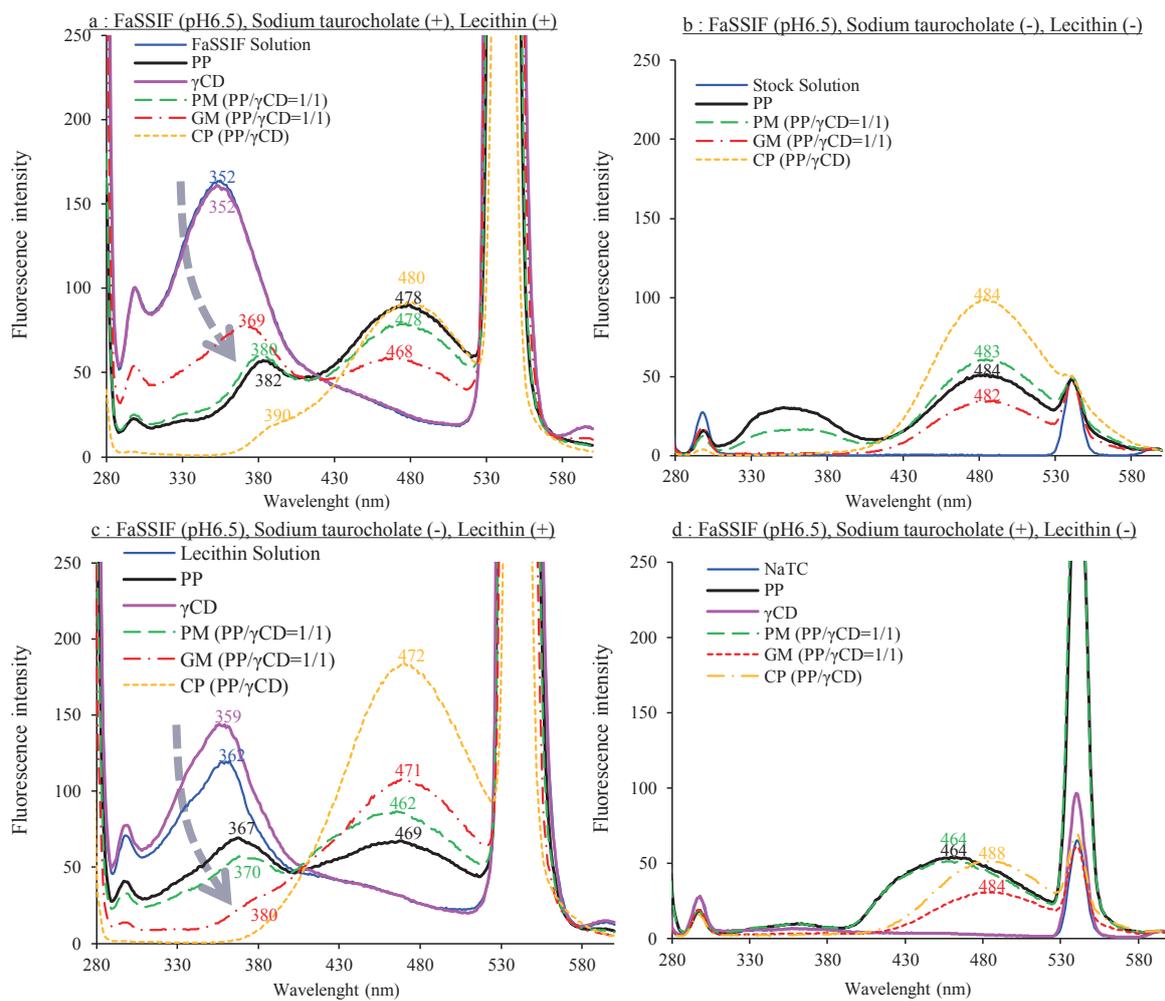
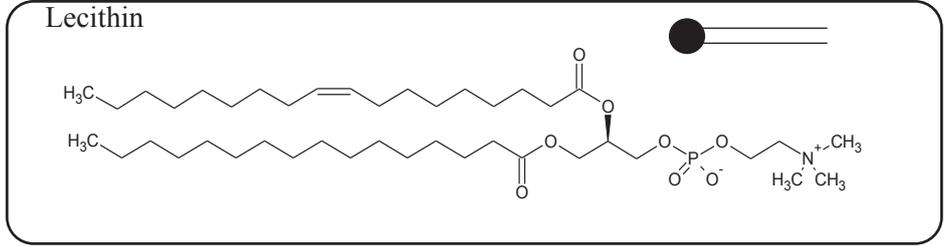
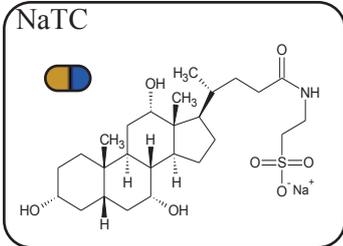
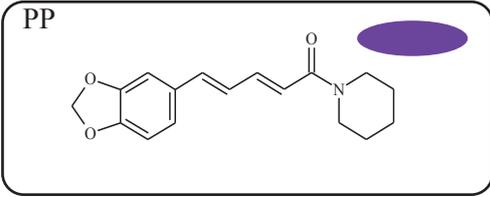
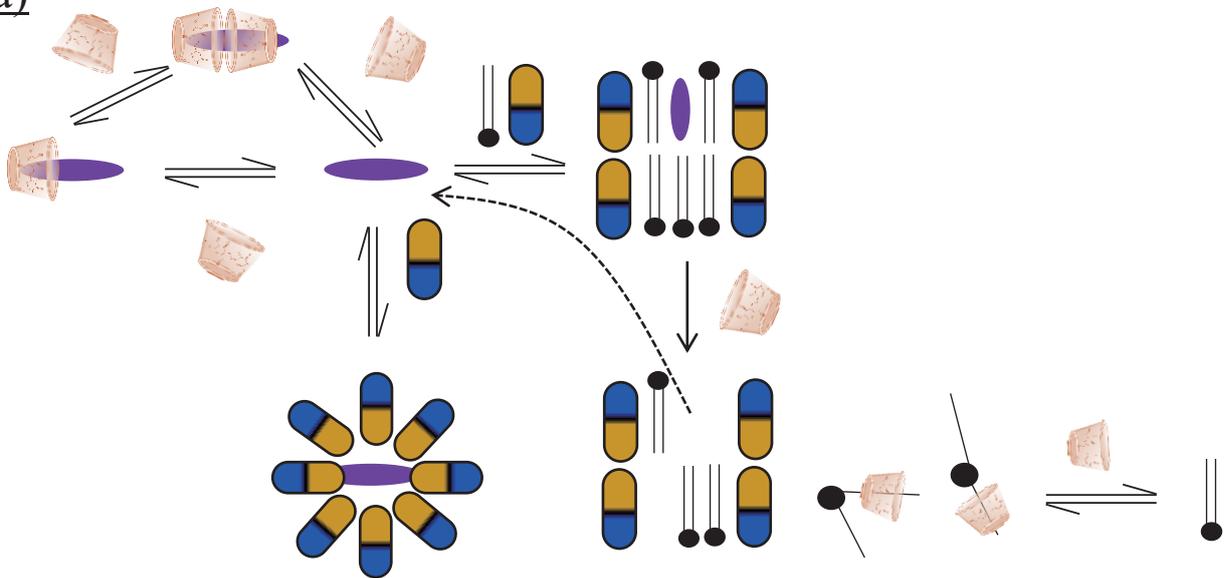


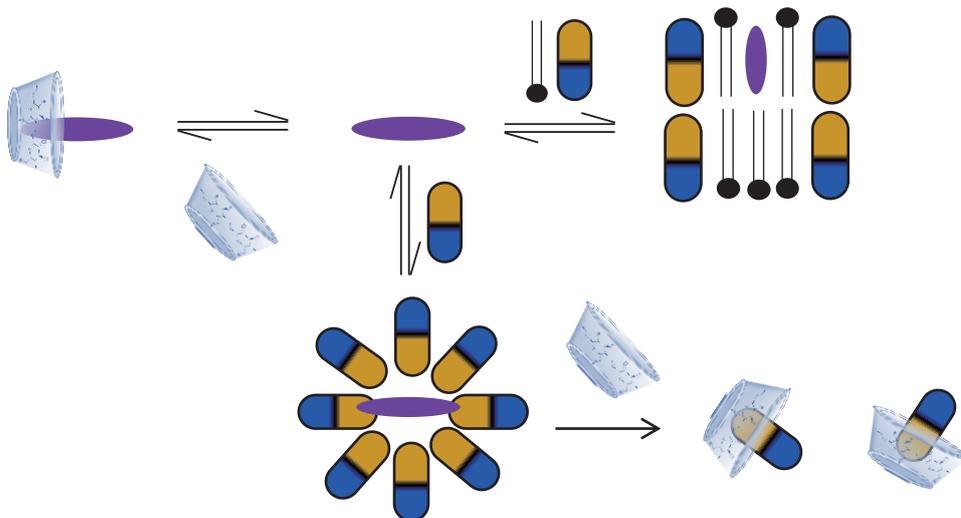
Fig. 50. Changes in the emission spectra of PP/ γ CD complex systems ($\lambda_{exc} = 270$ nm)
 (a) NaTC (+), Lecithin (+), (b) NaTC (-), Lecithin (-)
 (c) NaTC (-), Lecithin (+), (d) NaTC (+), Lecithin (-)



(a)



(b)



Scheme 3. Physicochemical properties of PP/CDs inclusion complex in FaSSIF.
 (a) CP (PP/αCD), (b) CP (PP/γCD)

第4節 小括

溶出試験第一液 (pH1.2) および FaSSIF 溶液 (pH6.5) において、CP および GM から生じた各種 PP/CD 包接化合物の溶解性は PP 単独と比較して著しく向上した。また、共沈法で調製された CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) の溶解性は GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ γ CD=1/1) と比較して5分から120分にかけて高い溶解性を維持していた。これらは、PP の芳香環、ペントジエン鎖およびアミド基の運動性を顕著に抑制している包接複合体の物理化学的性質が寄与していることが示唆された。さらに、FaSSIF 溶液 (pH6.5) において、CP は高次ミセル凝集体形成しにくく、PP の溶解性向上および維持に寄与したことが溶液蛍光測定により明らかとなった。

これらの結果から、消化管環境が pH1.2 あるいは pH6.5 の条件下においても、CP から生じた包接化合物は PP 単独および GM と比較して、腸管収縮調節作用を示す部位まで溶解性を維持できる可能性がある。

したがって、第1章の目的である PP の溶解性は CD との複合体調製により向上し、PP の溶解性をコントロールすることに繋がったため、腸管収縮調節作用としての医療分野への応用が期待された。

第1章 総括

第1節により α CD、 β CD、 γ CD 添加量の調節などにより、PP の著しい溶解性向上が確認されたことから、製剤化への利用が期待された。調製方法により、得られる包接複合体のゲスト分子と CD 間における相互作用や結晶性は調製方法により異なる可能性があるため、そこで、第2節および3節において GM および CP を用いて、医療分野への応用に期待できる溶解性向上に期待できる包接複合体の調製を実施した。

第2節および3節により、PXRD 測定による PP 固有の結晶回折ピークの消失、熱分析による PP 由来の吸熱ピークが消失したことから、GM は $PP/\alpha CD=1/2$ 、 $PP/\beta CD=1/1$ 、 $PP/\gamma CD=1/1$ 、CP では $PP/\alpha CD=1/2$ 、 $PP/\gamma CD=1/1$ のモル比で包接複合体を形成することが明らかとなった。また、CP は GM と比較して、PP の芳香環、ペンタジエン鎖、アミド基の運動性を顕著に抑制していることが、Raman 測定により示唆された。2-10 から 2-15 により、PP のアミド置換基が異なるだけで、2種類の誘導体 (PPD1 および PPD2) と CD との包接様式は PP/CD 化合物と比較して、CD の向や包接モル比などが異なるため、メチレンジオキシフェニル基およびペンタジエン鎖の共役性が PP/CD の包接複合体形成に寄与していることが明らかとなった。得られた包接化合物の水への溶解性は、CP ($PP/\gamma CD$) が最も高く、次に GM および CP により調製された $PP/\alpha CD > GM (PP/\beta CD=1/1) > GM (PP/\gamma CD=1/1)$ の順であることが確認された。溶解性向上が確認されたため、溶液状態における包接化合物の相互作用を評価した結果、 $PP/\alpha CD$ は 1 分子の αCD が広い環状の縁から狭い環状の縁にかけて、PP のメチレンジオキシフェニル基に包接しており、2 分子の αCD はペンタジエン鎖由来の C=C に包接しており、広い環状の縁がメチレンジオキシフェニル基の芳香環に向いた形で 2 分子の αCD が head to head の様式で、包接していることが示された。また、CP は GM

と比較してペンタジエン鎖と密接に包接されていることが観測された。GM で調製された PP/ β CD=1/1 は1分子の β CD が脂溶性部位である PP のメチレンジオキシフェニル基に広い環状の縁から狭い環状の縁にかけて密接に包接していることが示された。また固体状態において、CP は GM と比較して、PP の芳香環、ペンタジエン鎖、アミド基の分子運動性を顕著に抑制しており、さらに粒子が散逸した状況であることから、固体状態および溶液状態の違いによって、異なる溶解性を示した。

第4節では、溶出試験第一液 (pH1.2) および FaSSIF 溶液 (pH6.5) において、CP および GM から生じた各種 PP/CD 包接化合物の溶解性は PP 単独と比較して著しく向上した。また、共沈法で調製された CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) の溶解性は GM (PP/ α CD=1/2) および GM (PP/ γ CD=1/1) と比較して5分から120分にかけて高い溶解性を維持していた。これらは、PP の芳香環、ペンタジエン鎖およびアミド基の運動性を顕著に抑制している包接複合体の物理化学的性質が寄与していることが示唆された。さらに、FaSSIF 溶液 (pH6.5) において、CP から生じた包接化合物から遊離した PP は高次ミセル凝集体を形成せずに、NaTC/レシチンまたは NaTC に取り込まれたことが溶解性の向上および維持に寄与した可能性がある。

これらの結果から、消化管環境が pH1.2 あるいは pH6.5 の条件下においても、CP から生じた包接化合物は PP 単独および GM と比較して、腸管収縮調節作用を示す部位まで溶解性を維持できる可能性がある。

したがって、第1章の目的である PP の溶解性は CD との複合体調製により向上し、PP の溶解性をコントロールすることに繋がったため、腸管収縮調節作用としての医療分野への応用が期待された。

第2章 PP/CD 混合粉砕物の味覚応答性の評価

第2章 序

PP は胡椒の主要な辛味成分として食を支えている。しかし、味の嗜好性には個人差があるため、PP の強刺激性はその有効性を期待して摂取する上で制限となり、治療薬への応用の妨げになる可能性がある。PP の主要な作用である腸管収縮調節作用を医療目的で利用するためには、PP の味覚応答性について CD の影響を評価する必要がある。PP の化学的な特徴として、メチレンジオキシフェニル基、ペントジエン鎖、第三級アミド基を有する。アミド基からメチレンジオキシフェニル基のエーテル基にかけて分子内共役を示すため、CD による PP の電子状態や分子エネルギーの変化に応じて、PP の溶解性が向上することが第1章にて明らかとなった。この包接化合物中の PP の分子状態は、辛味応答性、腸管収縮調節作用に影響する可能性がある。そこで、第2章では、PP の味覚応答性が包接によりどう影響するのかを客観的に評価することにした。

ヒトは舌の味細胞の膜表面に基本五味 (苦味、甘味、塩味、酸味、旨味) を示す呈味物質が吸着すると、細胞膜に電位変化が生じる。この電位応答性は味によって異なる信号を脳に伝達されることで味として認識する。味細胞の表面は脂質膜で覆われているため、味の受容に脂質膜は重要な役割を示す。

近年、味覚評価を行う方法として、官能試験だけではなく、味センサーを用いた報告がされている。味センサーは、その脂質膜に味物質が吸着することで電圧変化を生じるように設計されている⁵²⁻⁶⁴⁾。この脂質膜は、人工の脂質と可塑剤をポリ塩化ビニルに組み込む事で、メンブラン部分を形成している。代表的な報告として、味認識装置⁵²⁻⁵⁵⁾、および電子味覚システム^{56-60, 64)}を用いたものがある。味認識装置は、五味を示す呈味物質を選択的に相互作用して応答する特徴がある。一方で、電子味覚システムは基本の五味に応答するセンサーではなく、溶液

中の多様な有機、無機成分と相互作用して応答する 7 本のセンサーを有している。各センサーの脂質膜電極はあらゆる複合的な味物質に応答して、味物質の種類ごとに各センサーの感度比率が特異的に異なる。また、センサー応答性の傾向は相互に補完して機能する特徴がある。そのため、基本五味以外を含めた広範囲な味覚評価が可能であり、ヒュウガナツ果汁による味の違いや苦み成分のカフェイン、キニーネ、酸味成分の酒石酸、リンゴ酸、クエン酸などの評価に利用されている⁶⁵⁻⁶⁶⁾。果汁に含まれる甘味、苦味、渋味、苦味に関する官能試験の結果とセンサー応答値との直線関係から人の味覚とセンサー応答性との相関係数が算出され、その有効性が確認されている⁶⁶⁻⁶⁷⁾。センサーの検出誤差は塩味 (0.73%)、酸味 (0.65%)、苦味 (2.4%) であり、ヒトは 2 つの味の濃度差 20%未満を正確に区別することが難しいことが報告されていることから、感度は十分である⁶⁸⁾。また、本研究で用いる辛味成分のピペリンについては、舌の疲労感や個人の感受性の違いが味覚応答性評価に影響する可能性があるため、ヒトによる官能試験よりも客観的に評価できる方法として、電子味覚システムを用い津ことにした。そこで、PP および各種 GM から生じる包接化合物の味覚応答性を評価した。そして、統計学的手法である主成分分析を実施することで、味覚応答性の違いを特徴づけした⁶⁹⁾。

第 1 節 PP/CD 混合粉砕物における味覚センサー応答性の評価

1-1 PP の味覚センサー応答性の評価

電子味覚システムは辛味や渋味に対する評価を含めて広範囲の味に対して使用される。CD は医薬品などの呈味改善に使用されており⁷⁰⁻⁷³⁾、例えば、ファモチジンと CD を併用した場合の苦味について官能試験の結果とセンサー応答性との相関性が評価されている⁷¹⁾。また、 α -リポ酸の辛味に対する CD の影響について、電子味覚システムを用いた辛味強度評価が行われている⁷⁴⁾。

PP の味覚応答性の特徴を確認するために、PP を飽和濃度から 1/2 (x2), 1/3 (x3), 1/4 (x4), 1/5 (x5), 1/10 (x10) 倍までの希釈したサンプル溶液を用いて評価した (Fig. 51)。すべてのセンサー応答値を変数として、主成分分析により各ピペリン濃度の相対的な位置関係を確認した。主成分分析とは、多変量に存在する情報を低次元に圧縮する分析方法である。主成分分析により各 PP 濃度をマッピングした結果、第一主成分軸 (Principal component 1, PC1) は 89.65%、第二主成分軸 (Principal component 2, PC2) は 9.19%を示した。主成分軸は PC1 および PC2 の順に全データの分散が最大となるようにデータが反映されており、PC1 および PC2 で全体の 98%以上の情報が縮約されていることが確認された。グラフの X および Y 座標の数値は 7 つの味覚センサーから得られた変数を相対値として表現している。主成分分析に観測される黒矢印は各説明変数 X の PC1 と PC2 に対する方向性、原点からの長さは影響度の高さを示す。そのため、寄与率の高い PC1 軸方向にベクトルが長いものは、何かしらの説明変数 X に対して影響が大きいことを示す。今回の結果では、各 PP 濃度のセンサー応答性は濃度依存的に PC1 軸上で移動したマッピングを示した (Fig. 51)。そのため、説明変数 X は PP の濃度であることが示唆された。また、図で観測されるように、各センサー名を示す AHS、CPS、SCS は PC1 軸上にベクトルが向いていることが観測された。また、

各7つのセンサー (CPS, AHS, SCS, CTS, NMS, PKS, ANS) を応答値と PP 濃度での関係性を分析した結果、主成分分析で確認された PP に特異的に応答性を示す CPS, AHS および SCS と PP 濃度間の決定係数は $R^2 = 0.72$ 、 0.67 、 0.63 と高い応答性を示すことが確認された (Fig. 52)。これにより、PP に特的敵な応答性を示すセンサーは、AHS、CPS、SCS であることが示唆された。

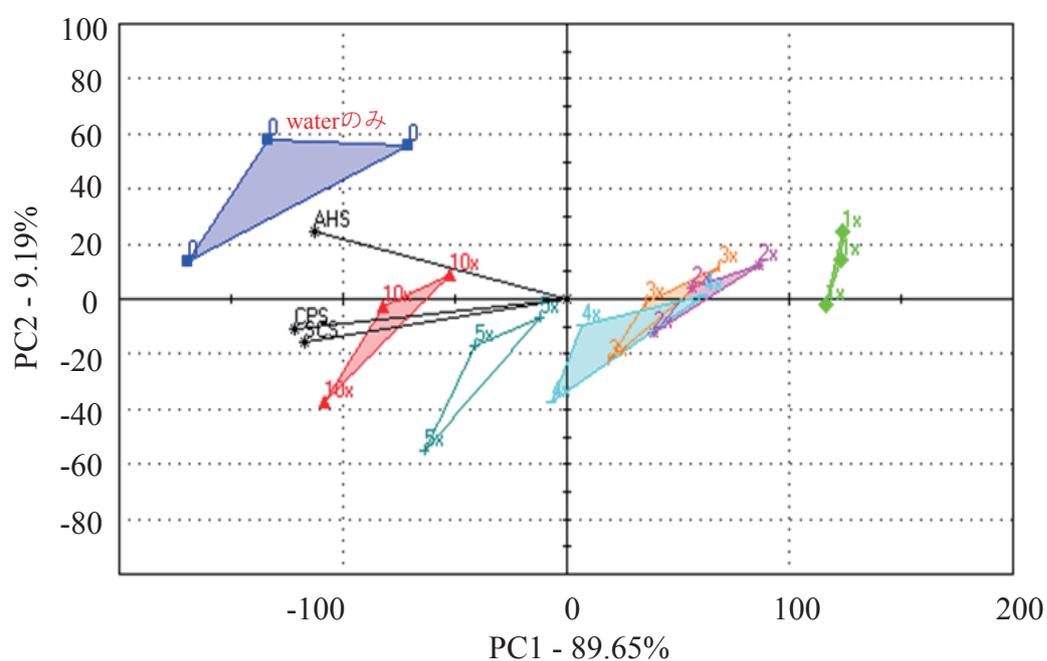


Fig. 51. Principle component analysis of taste sensor measurements (Liquid sample) by each concentration of PP. The largest and second largest relative contribution factors, PC1 and PC2, from all the sensor data. The relative contributions of PC1 and PC2 are 89.65% and 9.19%, respectively. Samples are displayed as points, while variables are displayed as vectors on the biplot. The arrows represent the sensor.

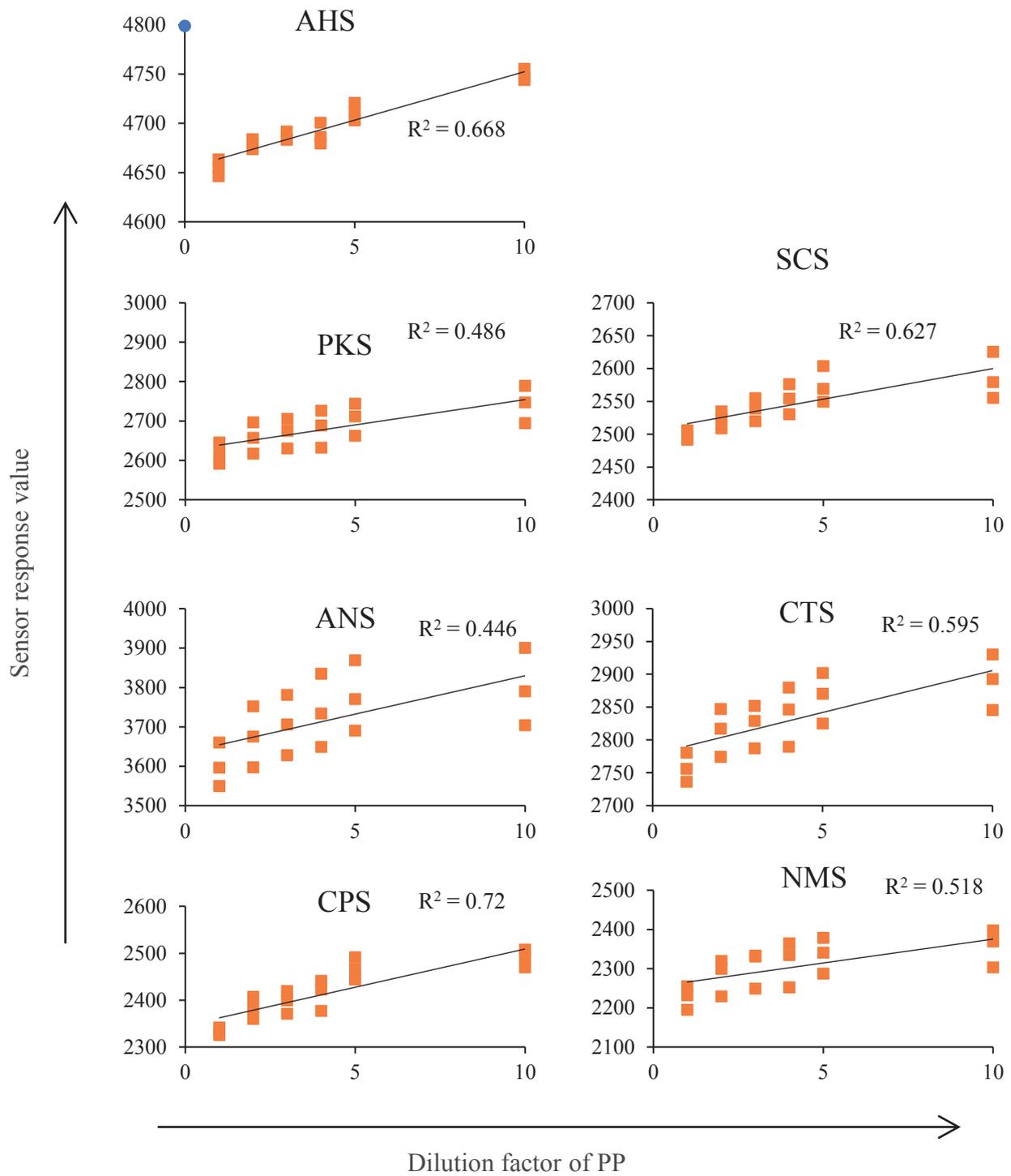


Fig. 52. Correlation coefficient between dilution factor of PP and sensor response value.

1-2 各 GM を用いた PP の味覚センサー応答性の評価

各種 GM から生じた包接化合物の特異的なセンサー応答性を特徴づけるために、全センサー応答性を 10 段階スケール化して示した (Fig. 53)。PP 単独と GM から生じた包接化合物は溶解性や物理化学的性質が異なるため、同一添加量でのにおける包接化合物と PP の比較はデータの信頼性を損なう可能性があると考えた。そこで、主成分分析およびスケール分析は、PP を組み込まず、包接化合物間で比較した。GM (PP/ α CD=1/1) および GM (PP/ α CD=1/2) は、SCS と CPS に、GM (PP/ β CD=1/1) は AHS に特異的な反応性を示すことが確認された。すなわち、PP/ α CD および PP/ β CD の包接複合体は PP と類似したセンサー応答傾向を示した。一方で、GM (PP/ γ CD=1/1) は PP に特異的な AHS, CPS, SCS への反応性が低く、PKS, NMS に反応することが確認された。このことから、PP/ γ CD は、官能試験において PP と味覚が異なる事が推察された。

各包接化合物のセンサー応答性を用いて主成分分析を実施した結果、PC1 は 81.56%、PC2 は 9.19%を示し、PC1 および PC2 は全体の 90%以上の情報が集約されていることが確認された。各包接複合体は PC1 および PC2 の 2 次元上で重ならないことから、これら複合体のセンサーは同じ味覚応答性の範囲の強弱で示されるものではないことが示唆された (Fig. 54)。次に、CD による PP の味覚変化を考察するため、包接モル比 1/1 の GM を用いた場合について、各センサーの応答値と第 1 章 1 節にて確認された安定度定数を用いて回帰分析を行った。その結果、決定係数は PKS、NMS、CPS は $R^2=0.89$ 、 0.94 、 0.83 と高い値を示した (Fig. 55)。一方で、各種包接複合体のセンサー応答性と PP の溶解性との相関性は認められなかった (Fig. 56)。このことから、PP と CD の味覚センサー応答性は単純に溶解している遊離形 PP の存在に起因するものではなく、各種包接化合物または包接化合物に共存している遊離形 PP の分子状態の変化が味覚センサ

一応答性に寄与することが示唆された。これらの PP の分子状態変化は、PP が CD と相互作用することによる分子内の共役系の変化による電子密度の偏りが味覚センサー応答性に関係していることが推察される。

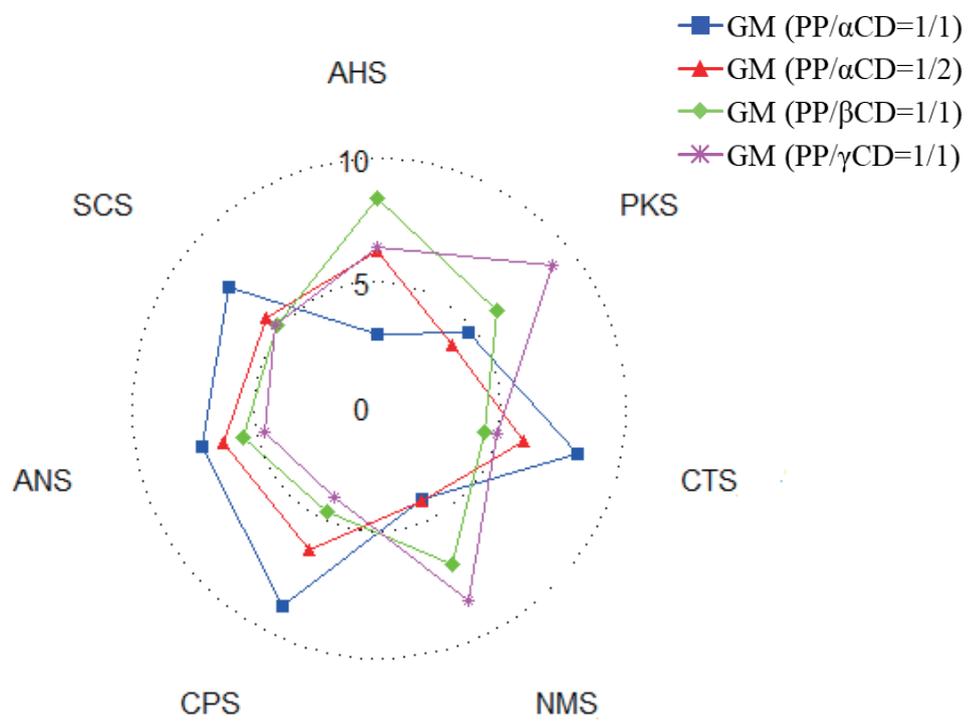


Fig. 53. Response of each sensor in various inclusion complexes.

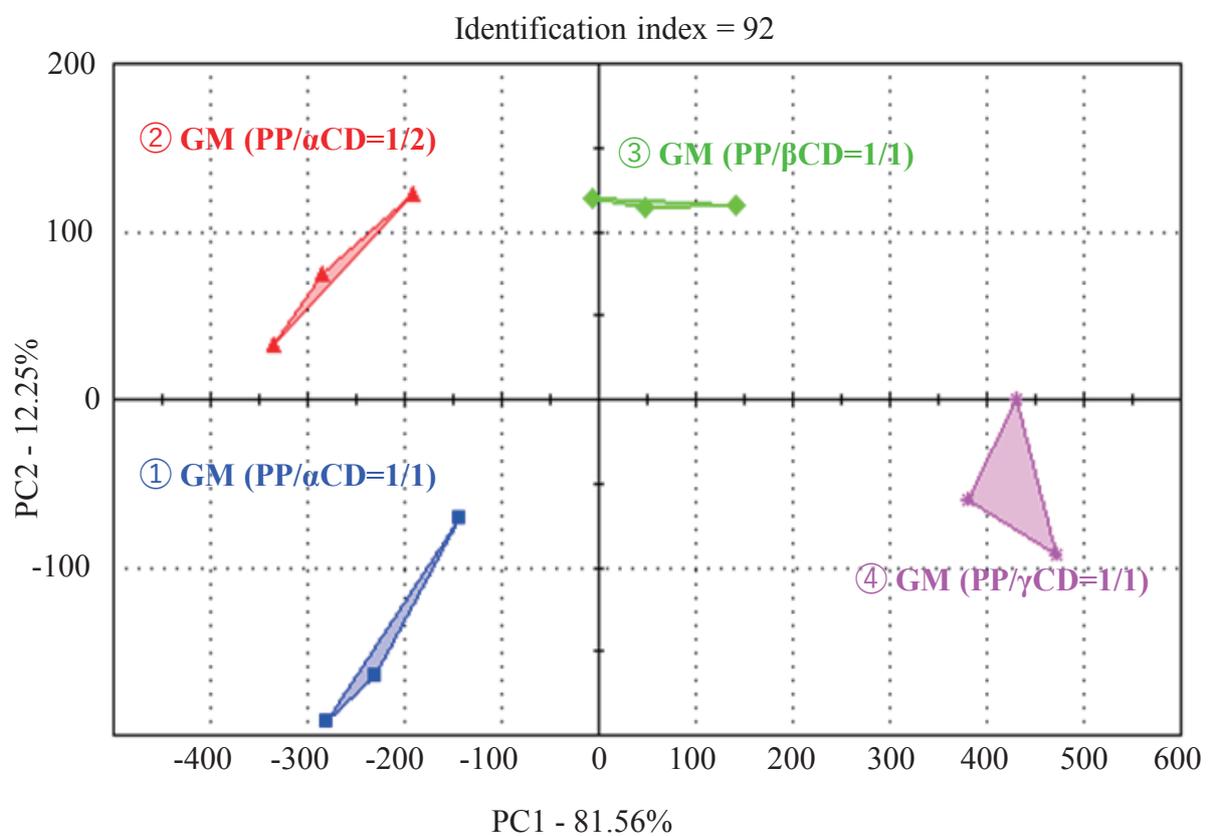


Fig. 54. Principle component analysis of taste sensor measurements (Liquid sample) by inclusion complex. The largest and second largest relative contribution factors, PC1 and PC2, from all the sensor data. The relative contributions of PC1 and PC2 are 81.56% and 12.25%, respectively. Samples are displayed as points.

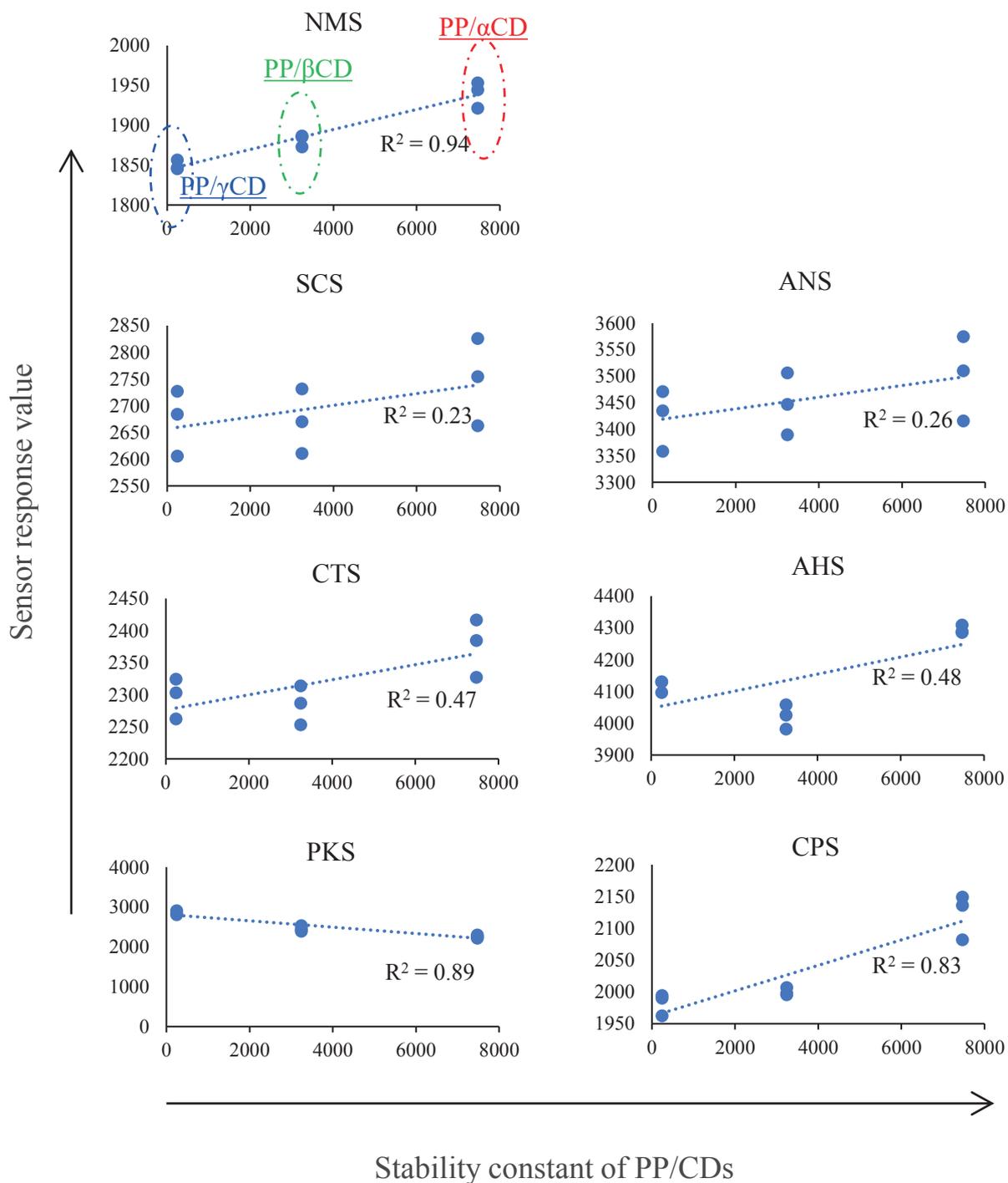


Fig. 55. Correlation coefficient between solubility of PP and sensor response value.

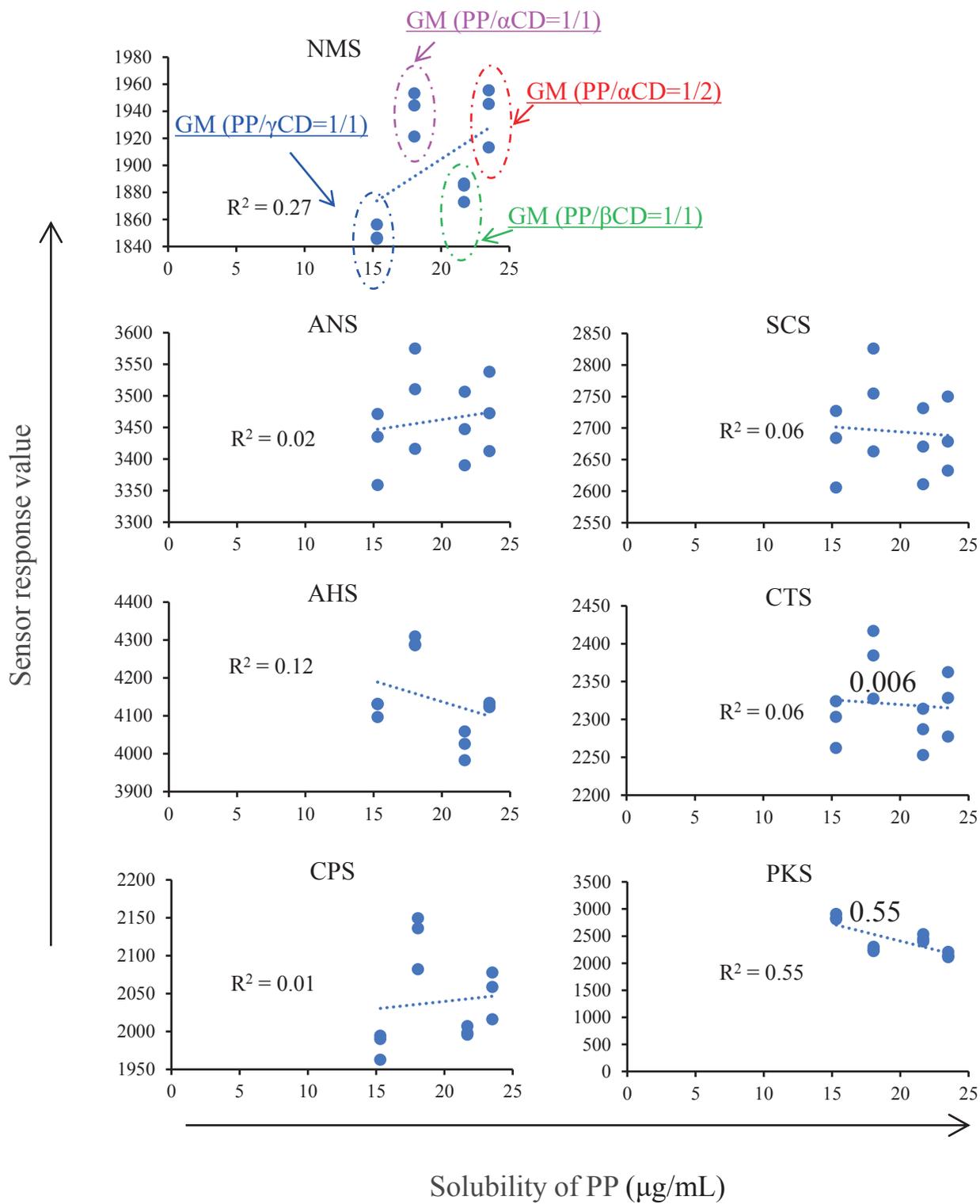


Fig. 56. Correlation coefficient between solubility of PP and sensor response value.

第2章 小括

PP は、電子味覚センサー7種の中で、AHS、CPS、SCS と濃度依存的なセンサー応答性を示した。各種 GM から生じた包接化合物のセンサー応答性は、GM の種類で異なったが、PP の溶解性の改善効果には依存せず、PP と CD 間で形成される包接化合物の安定度定数の値と関係が認められた。PP と CD の安定度定数は PP/ α CD の $K_{1/1} = 7473 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_{1/2} = 47 \text{ M}^{-1}$ 、PP/ β CD の $K_{1/1} = 3244 \text{ M}^{-1}$ 、 γ CD の $K_{1/1} = 248 \text{ M}^{-1}$ であることから、PP の free 体濃度は PP/ γ CD が最も多く、PP/ α CD が最も少ないことが予想される。すなわち、GM (PP/ α CD) および GM (PP/ β CD) は、安定度定数が比較的高く、PP のセンサー応答特性とその応答性が類似していた。一方、PP/ γ CD 包接化合物は、PP/ α CD および PP/ β CD と比較して解離しやすい特徴があり、包接化合物が解離して PP 単独として存在する量が溶液中で多くなり、そのことにより PP のセンサー応答性と類似することが予想されたが、結果は異なって PP とは異なる PKS、NMS のセンサー応答性が示された。すなわち、これら包接化合物の味覚センサー応答性は、単純に遊離の PP の存在に起因するものではなく、各包接化合物自体の味覚応答特性もしくは包接化合物と共存している遊離型 PP における分子状態の変化が関係している可能性が示唆される。味覚センサーを用いた評価は有用であることが示唆されるが、本検討では相対的な関係としての評価のみであるため、今後は官能試験に基づきヒトが感じる実際の味覚との関係を対応させることにより客観的評価法として確立することができる。

第3章 PP/CD 包接複合体を用いた腸管収縮性の評価

第3章 序

PP の主要な機能性として腸管収縮調節作用が報告されている⁷⁻⁸⁾。PP の腸管収縮効果はムスカリン性の腸管収縮作用を示す一方、オピオイド μ 受容体活性化、 Ca^{2+} チャネル遮断作用などの腸管収縮を弛緩させる作用を有する。また、サイクリック AMP 誘発性 Cl^- の分泌抑制、 Ca^{2+} 誘発性 Cl^- の分泌抑制による弛緩作用が報告されている⁷⁻⁸⁾。腸管収縮と弛緩作用の両方を有することで、PP は投与量に依存してマウスの湿式排便排出量を変化させる報告もある⁷⁾。これらの作用は消化管運動障害に対する PP の薬理作用として利用可能と考えられおり、PP は下剤、止瀉薬や機能性胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待されている。

第1章では、PP と各 CD との包接複合体調製によって、PP の溶解性向上に CD が寄与することを示した。第1章の結果から、複合体の調製方法や種類によって包接化合物が多様な状態で存在することが示され、この変化が PP の腸管収縮応答性に影響する可能性がある。そのため、CD の併用によって PP の薬理的な作用にどう影響するのかを検討することとした。すなわち、腸管収縮調節作用について、異なる方法で調製した PP/CD 包接複合体の作用の違いを比較した。

第 1 節 マグヌス法による腸管収縮性の評価

1-1 CCh 存在下における各 PP 濃度の腸管収縮性の評価

第 1 章において、CD の種類や包接複合体の調製手法によって、PP の溶解性が変化するだけでなく、包接化合物中の PP の包接様式も異なることが確認された。そこで、薬理的視点として、PP の代表的な機能である腸管収縮調節作用に着目し、CD 併用による PP の薬理的な影響を評価した。合成コリンエステル類のカルバコール (CCh) はムスカリン作用およびニコチン様作用を示す薬物である。これらの作用は腸管の自発性興奮を増強して収縮をもたらす。PP の腸管収縮効果はムスカリン性の腸管収縮作用が報告されていることから、CCh の収縮刺激に対して、PP 包接複合体が拮抗または促進するのかを作用に基づいて、マグヌス法を用いて検討した⁸⁾。

各種 PP 濃度共存下における CCh による回腸収縮率を示した (Fig. 57)。CCh 単独では、CCh 1.0×10^{-10} M から腸管が収縮し始め、 1.0×10^{-7} M で最大反応を示した。これに対し、CCh 単独の最大収縮率を 100%とした時、PP が 10^{-6} M~ 6.67×10^{-6} M の共存下で CCh の腸管収縮作用の最大反応の有意差は認められないものの、120~140%と最大収縮率の上昇が確認された。これは PP のムスカリン作用が寄与している可能性が示唆された。一方、PP 2.0×10^{-5} M では CCh 単独の腸管収縮とほぼ同じ挙動を示し、最大反応も 100%となった。これは、PP の腸管収縮作用と弛緩作用の両方が生じたことによると考えられる。これらの結果より、CD 併用の実験において、PP 濃度は 2.0×10^{-5} M をとすることとし、CD による影響を評価した。

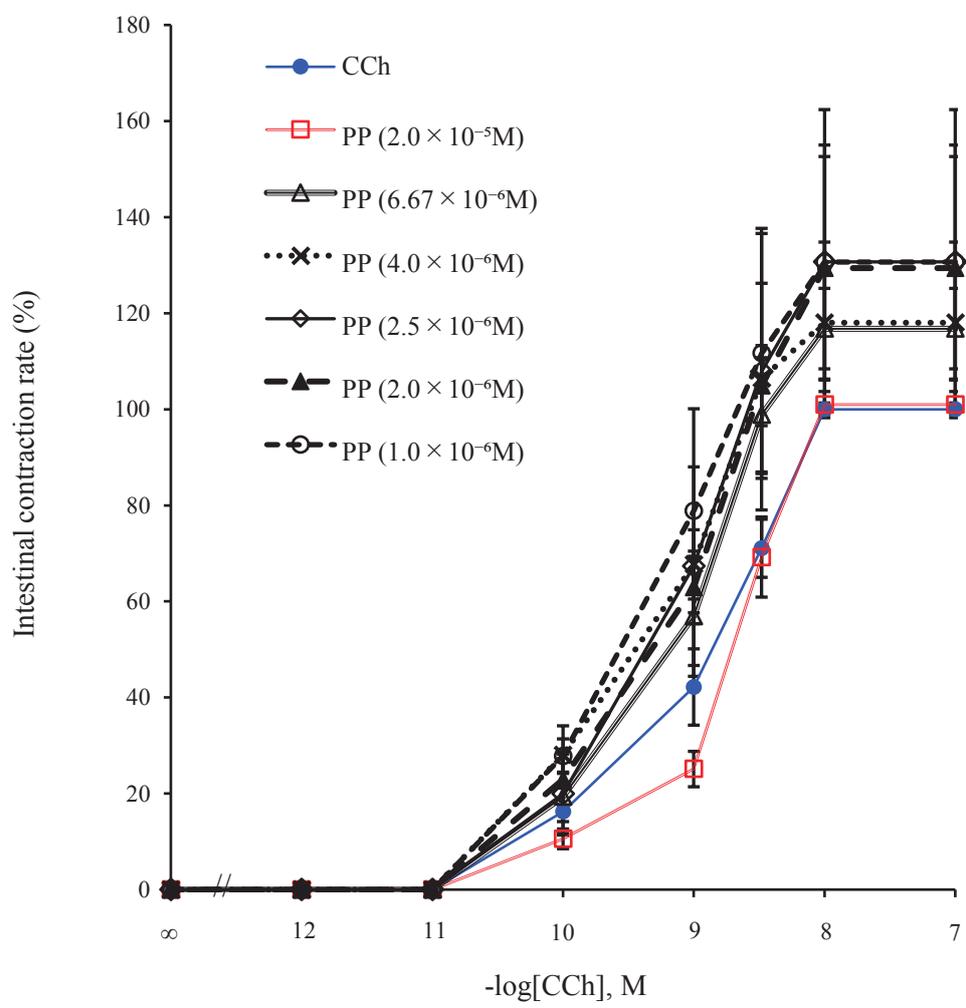


Fig. 57. Concentration–response curves of CCh in the absence and presence of increasing concentrations of piperine.

By one-analysis of variance followed by Dunnett’s test, * : $p < 0.05$ vs. CCh.

1-2 CCh 存在下における CD による PP の腸管収縮性の影響

1-1 の PP の用量反応曲線から、CD 併用の実験において、PP 濃度は 2.0×10^{-5} M をとしている。

α CD 系において (Fig. 58 (a))、CCh 添加に α CD を単独併用した系では CCh 1.0×10^{-8} M で最大 114% の腸管収縮率を示したが、それに加えて PP 単独併用、PM (PP/ α CD=1/2) 存在下でも CCh の回腸収縮促進作用に対して有意な効果は認められなかった。GM (PP/ α CD=1/1) では 1.0×10^{-8} M で最大は 58% であり、PP 単独併用との間に有意な差は確認されないものの、CCh の回腸収縮促進作用に対して抑制傾向が確認された。一方で、GM (PP/ α CD=1/2) および CP (PP/ α CD) では PP 単独併用と比較して、CCh による腸管収縮促進作用の最大反応の有意な抑制が観察された。さらに、腸管収縮最大反応の 50% (EC_{50}) を示す GM (PP/ α CD=1/2) および CP (PP/ α CD) 併用時の CCh 濃度は、PP 未添加や PP 単独併用と比較して高濃度側にシフトしていることが確認された。

β CD 系においても (Fig. 58 (b))、 β CD 単独併用では CCh 1.0×10^{-8} M で最大 115% の腸管収縮率を示したが、PP 単独併用、PM (PP/ β CD=1/1) 存在下を加えて、CCh の回腸収縮促進作用に対して有意な効果は認められなかった。一方で、GM (PP/ β CD=1/1) の併用では PP 単独併用と比較して 30.6%、PM 併用と比較して 31.6% の腸管収縮促進作用が観察され、PP 単独併用と比較して有意に最大反応が抑制されていた。さらに、 EC_{50} が PP 単独併用時で CCh $1.0 \times 10^{-10} \sim 1.0 \times 10^{-9}$ M の間に位置するのに対して、GM 存在下では CCh $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-8}$ M の間にシフトすることが観察された (Fig. 58

-b)。

γ CD 系においては (Fig. 58 (c))、 γ CD 単独併用では CCh 1.0×10^{-8} M で最大 82% の回腸収縮率で α CD、 β CD 併用時と傾向が異なった。 γ CD 単独併用、PP 単独併

用、GM (PP/ γ CD=1/1) および CP (PP/ γ CD) 存在時、CCh の回腸収縮促進作用に対して有意な効果は確認されなかった。すなわちこの結果においても、 γ CD 単独併用は α CD、 β CD 併用時と傾向が異なった。

PP/ γ CD 包接化合物は水素結合や分子間力が弱く、平衡定数が小さいため PP との相互作用が弱い傾向にある。すなわち、PP と PP/ γ CD 包接化合物の存在比やその存在状態の違いが、 γ CD において異なった結果が観察された理由と考えられる。

最大収縮反応を示す CCh 1.0×10^{-7} M において、PP/CD 系を比較した結果、PP 単独併用 vs 包接複合体存在時で有意な腸管収縮抑制作用が確認されたのは GM (PP/ α CD=1/2)、CP (PP/ α CD)、GM (PP/ β CD=1/1)であった (Fig. 59)。これら 3 つの包接化合物は、EC₅₀ 値の上昇も確認されていることから、ムスカリン M₃ 受容体の競合阻害が示唆された。また、第一章にて、PP のエーテル基から芳香環に属するメチレンジオキシフェニル基は CD に包接される性質を確認している。さらに、PP と CD との 1/1 の水溶液中での安定度定数は PP/ α CD=7473 M⁻¹, PP/ β CD=3244 M⁻¹, PP/ γ CD=248 M⁻¹ と α CD が最も PP との包接能が高く、 γ CD が最も包接能が低い特徴が確認された。Raman 測定の結果からも PP/ α CD 系において PP の運動性を顕著に抑制することが第一章にて確認されている。 α CD との物理的混合物では、腸管収縮抑制効果が混合粉砕物および CP と比較して顕著には観察されないことから、固体状態における包接複合体形成が溶液状態に反映されていることが示唆された。このことから、PP の芳香環部分を CD が包接することにより、CCh の腸管収縮性を抑制する抗ムスカリン作用として機能したことが推察された。しかし、最大収縮反応も顕著に抑制されていることから、ムスカリン M₃ 受容体に対する競合的な阻害だけではなく、PP/CD 包接複合体特有の非競合的作用も寄与していると考えられ、これらの多様な作用の変化から、包

接化合物自体が作用に寄与していることが示唆される (Scheme 4)。すなわちこれらの結果から、CD を用いて調製された混合粉碎物および共沈物の包接複合体から生じる PP は、PP 単独とは状態や特徴を有する包接化合物としての異なった薬理作用を示す新規化合物としても機能しており、CD の利用によって PP の薬理的な作用に変化が生じていることが明らかとなった。詳細な作用機序については不明であるが、PP/CD 包接化合物によって、CCh のムスカリン M₃ 受容体を介する腸管収縮作用に対して、受容体上の競合阻害だけでなく、作用点の異なる cAMP 誘発性プロテインキナーゼ A 活性化や、IP₃ 誘発性 Ca²⁺ の放出制御などにより、腸管収縮が抑制されたと考えられる。

In silico 研究において、PP の芳香環はムスカリン性アセチルコリン受容体のタンパク質のポケットに存在する TRP503 と水素結合を示す特徴が報告されている⁷⁵⁾。また、PP のピペリジン部分および類似構造を有するロペラミドはオピオイド μ 受容体のタンパク質ポケットにおいて、ピペリジン環のプロトン化窒素と ASP のカルボン酸基間で水素結合を示す特徴が報告されている⁷⁶⁾。第 1 章にて確認された PP/CD 包接化合物は PP のエーテル基から芳香環 (メチレンジオキシフェニル基) を CD が包接する性質があり、PP のピペリジン部分が CD から露出している。これらの結果から、包接されている PP の芳香環部分はムスカリン性アセチルコリン受容体のタンパク質のポケットに存在する TRP503 と結合しにくく、包接化合物から露出されたピペリジン部分はオピオイド μ 受容体のタンパク質ポケットに結合しやすい可能性も考えられる。

また CD において、FAO (アメリカ食品医薬品局) /WHO (世界保健機関) 合同食品添加物専門委員会 (JECFA) の安全性評価によれば、βCD には 5 mg/kg/day の許容一日摂取量 (ADI) が定められている。γCD は腭アミラーゼによって迅速かつ完全に消化される特徴がある⁷⁷⁾。これらの知見から、各種 PP/CD 包接複合

体をのうち、GM (PP/ α CD=1/2) および CP (PP/ α CD) は止瀉薬や機能性胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待される。しかし、これらは PP とは異なる新規包接化合物として働いている可能性があるため、腸管収縮性を評価する際に用いた CCh だけでなく、オピオイド系のロペラミドや Ca^{2+} を添加することで、非競合阻害として働いた作用について十分理解する必要があると考える。そのためには、蛍光標識されたリガンドを用いて受容体への包接複合体の結合や動態を評価する実験系を確立することも、包接化合物特有の薬理学的作用の理解に必要と考える。食品成分を用いた医薬品への応用研究であるが、各包接化合物は新規包接化合物であるため、PP とは異なる予期せぬ作用を示す可能性を考え、慢心せずに安全性、毒性評価も行っていく必要がある。

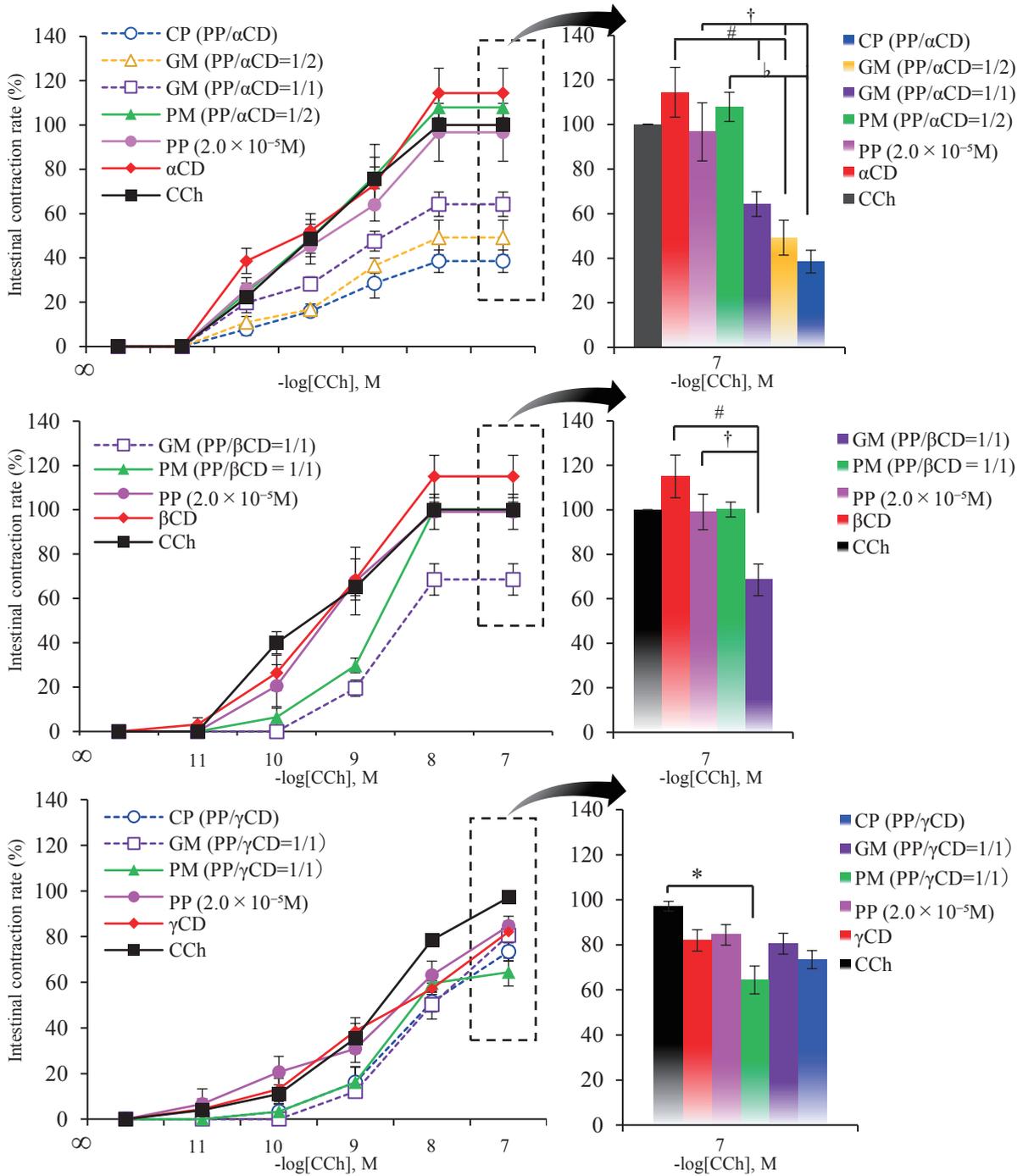


Fig. 58. Change in the contractile response of the ileum by PP/CDs inclusion complexes. Values are shown as mean \pm SEM, (respectively n=5).

(a) PP/αCD systems, (b) PP/βCD systems, (c) PP/γCD systems

By one-analysis of variance followed by Tukey's test, * : $p < 0.05$ vs. Cch, # : $p < 0.05$ vs. CD, † : $p < 0.05$ vs. PP, ‡ : $p < 0.05$ vs. PM

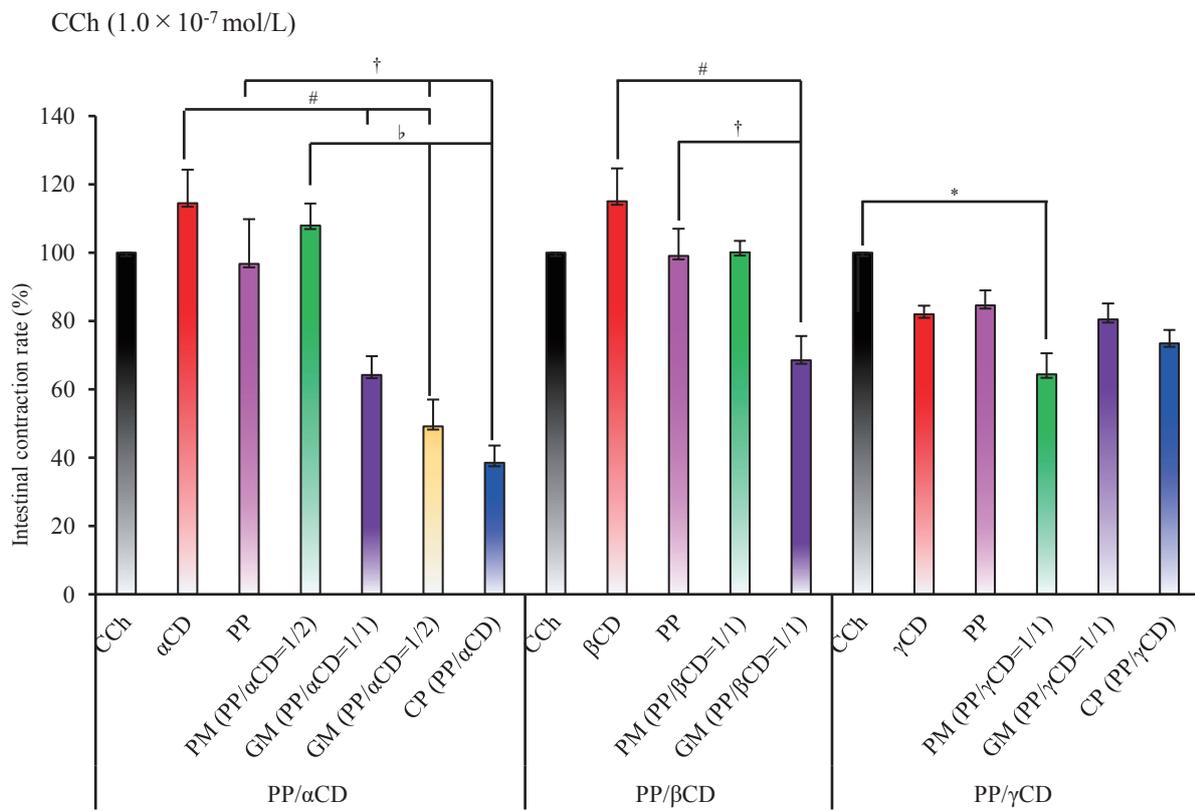
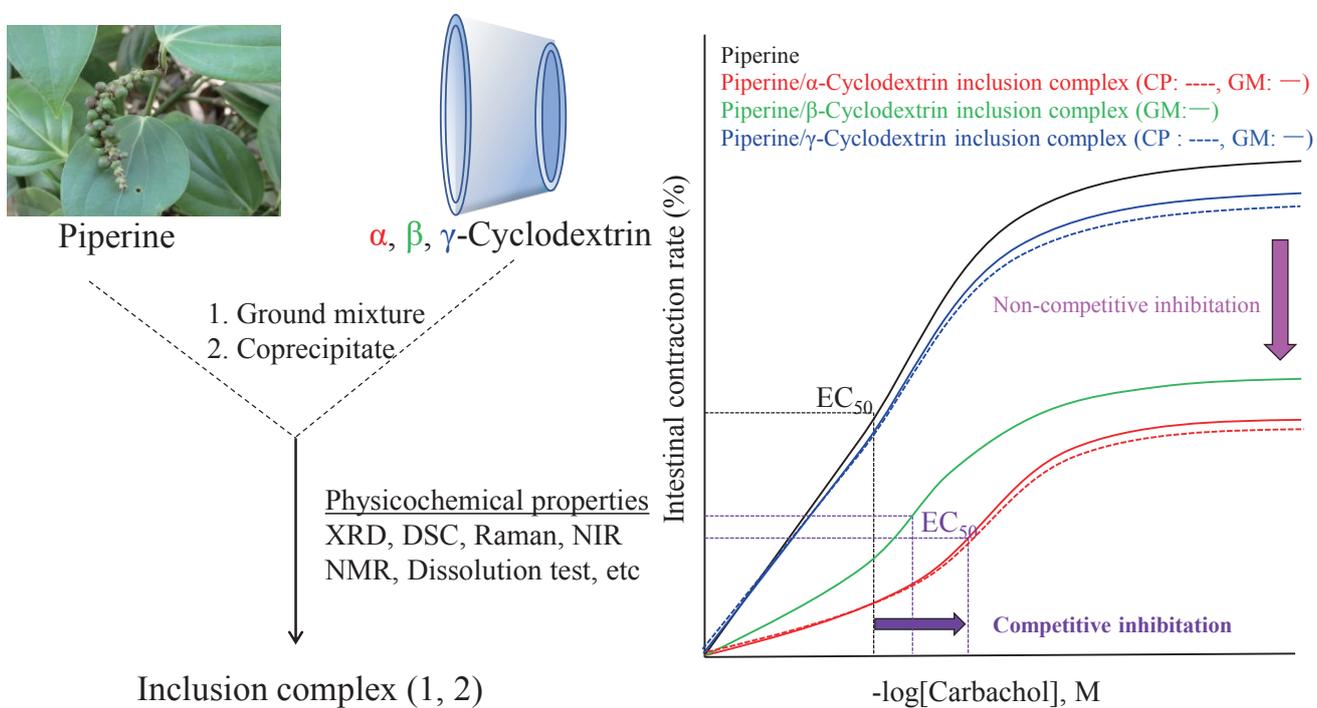


Fig. 59. Change in the contractile response of the ileum by PP/CDs inclusion complexes. Values are shown as mean \pm SEM, (respectively n=5). Concentration of CCh is 1.0×10^{-8} mol/L. By one-analysis of variance followed by Tukey's test, * : $p < 0.05$ vs. Cch, # : $p < 0.05$ vs. CD, † : $p < 0.05$ vs. PP, ‡ : $p < 0.05$ vs. PM



Scheme 4 Change in the contractile response of the ileum by PP α /CD and PP/ β CD inclusion complexes.

第3章 小括

CCh を用いた腸管収縮試験において、CD を用いて調製された混合粉碎物および共沈物の PP は PP を単独で併用した場合と CCh の作用に対する影響が異なり、包接化合物としても薬理作用を示すと考えられ、CD によって PP の薬理学的な特性に大きな変化が生じていることが一連の実験から明らかとなった。

CP および GM で調製した PP/ α CD 包接複合体および GM で調製した PP/ β CD 包接複合体を用いることで、CCh の回腸収縮抑制作用に顕著な抑制が確認された。これら回腸収縮抑制作用は競合阻害および非競合阻害として観測され、PP の単独併用とは異なる PP/CD 包接化合物特有の薬理学的作用的がそれに関わっていると考えられた。

第1章において、空腹時人工腸液を想定した溶出試験では共沈法で調製した CP (PP/ α CD) および CP (PP/ γ CD) が GM で調製した包接複合体と比較して、高い濃度で溶解している状態を維持していることが確認されている。この濃度は収縮抑制作用を示す PP 濃度 2.0×10^{-5} M (5.7 μ g/mL) 以上であることから、各種包接化合物は容易に PP の溶解性をコントロールすることが可能であり、腸管に対する作用を調節できる可能性がある。また、各種包接化合物の中でも、CP で調製した PP/ α CD 包接複合体は止瀉薬や機能性胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待できる。

しかし、これら CD を併用した場合の薬理作用には、包接化合物が直接関わっている可能性があり、PP とは異なる新規化合物としてその有効性と安全性についてさらに詳細に評価していくことが必要である。今後は腸管収縮性評価に用いた CCh だけでなく、オピオイド系のロペラミドや Ca^{2+} を添加することで、非

競合阻害として働いた作用について理解する必要がある。すなわち、食品成分を用いた医薬品への応用研究であるが、PPとは異なる化合物として作用する可能性も考え、多様な実験方法を用いてその薬理作用を理解し、その結果の蓄積により慢心せずに安全性、毒性確認していくことが必要であると考え。

総括

本研究では、PP が各 CD との包接複合体の形成によりその物理化学的性質においてどのように変化し、PP の溶解性、腸管収縮作用を医薬品として実用に供するように改善することが可能かについて評価した。

第 1 章では、まず PP の溶解性に対する GM および CP により調製した CD 包接化の影響について検討した。次に調製した物質の結晶性、熱的挙動、分子間相互作用を評価して、固体の包接複合体形成とその状態の確認を行った。さらに、包接複合体から生じた包接化合物について、溶解性や溶液中の状態を確認した。第 2 章は、PP の辛味が治療薬などの制限となる可能性があるため、基礎的評価として、PP 単独および CD との包接複合体を用いた場合の味覚応答性について確認した。第 3 章では、PP の腸管収縮調節作用が下剤や止瀉薬、機能性胃腸障害に対する治療としての利用が期待されているため、CD によって PP の薬理的な作用にどのような変化が生じるかを確認することとした。すなわち、第 1 章から第 3 章の一連の評価により、CD を用いることで PP の溶解性・腸管収縮応答性を適切に改善可能であるかを評価し、医薬品としての応用のための基礎的研究を実施したため、以下に得られた知見を総括する。

第 1 章

第 1 章において、GM では $PP/\alpha CD=1/2$ 、 $PP/\beta CD=1/1$ 、 $PP/\gamma CD=1/1$ 、CP では $PP/\alpha CD=1/2$ 、 $PP/\gamma CD=1/1$ のモル比で包接複合体を形成することが明らかになった。PP の溶解性は混合粉碎物および共沈物から生じた包接化合物により向上した。包接化合物の PP の溶解性は、用いた CD の環状サイズおよび複合体の調製方法に応じて CD 分子中に位置する PP の包接様式が起因していることが確認された。GM は溶媒を用いずに、物質に機械的エネルギーを加えるメカノケミカル反応を利用しているため、アモルファスとなり、ゲスト分子や CD 同士の水素

結合の切断が誘発される。一方で、CPはゲスト分子を水に混ざる有機溶媒に溶解させた後、水に溶解させたCDと混合することで沈殿物を調製する溶液反応を利用しているため、ゲスト分子は水素結合によりCD中で固定化しやすい特徴を有する。これらの調製方法の違いがCD空洞内とPPとの分子空間との親和性に影響した可能性がある。

PPとPP誘導体に共通する構造のメチレンジオキシフェニル基およびペントジエン鎖による共役系はアミド置換基と密接な関係を示しており、直接、CDがアミド基に相互作用を示さなくても、平面構造であるメチレンジオキシフェニル基およびペントジエン鎖に包接することで、アミド基に間接的な相互作用を示す特徴が確認された。この間接的な相互作用は α CD、 β CD、 γ CDの環状サイズによって異なり、最も環状サイズが大きい γ CDはPP分子をより歪んだ構造に、 α CDおよび β CDは固定化する違いが確認された。この相互作用の違いは、GM(PP/ α CD)、GM(PP/ β CD)、GM(PP/ γ CD)の包接様式を決定する化学的根拠の1つであることを示した。

生体関連媒体における各種包接化合物のPPの溶解性は、PPの包接構造だけでなく、タウロコール酸やレシチンなどの可溶化剤との高次ミセル凝集体形成による影響がPPの溶解性に寄与していることが明らかになった。

以上の結果より、PP/CD包接化合物は、CDの特性、調製方法に応じて包接様式が変化した。そして、第1章の目的であるPPの難水溶性を改善する化学的特性やPPの溶解性をコントロールすることに繋がった。これにより、腸管収縮調節作用としての医療分野への応用が期待された。

第2章

各種包接化合物のセンサー応答性はPPの溶解性に依存せず、PPとCDとの包接様式が寄与していることが示唆された。PP/ γ CD包接化合物はPP/ α CDおよ

び PP/ β CD と比較して解離しやすい特徴がある。複合体が解離した場合は PP 単独としての量が溶液中で多くなるため、PP の特異的なセンサー応答性に依存することが予想されたが、GM (PP/ α CD) および GM (PP/ β CD) は PP 特有のセンサー応答性を示す一方で、PP/ γ CD は PP とは異なる PKS、NMS のセンサー応答性を示した。すなわち、これら包接化合物の味覚センサー応答性は PP と CD との包接様式および解離後に CD、包接化合物と共存している PP は PP 単独を溶解させた状態とは異なる分子状態として存在していることが示唆された。これらの結果より、各包接化合物の PP は PP 単独の味覚応答性と異なる性質を得ていることが明らかとなった。

第3章

腸管収縮試験において、CD を用いて調製された混合粉碎物および共沈物の PP は PP 単独とは異なる包接化合物としての薬理作用を示した新規化合物としての可能性があり、CD によって PP が包接されることにより、PP 単独とは異なる薬理学的作用を示すことが示唆された。

包接化合物は PP 単独と比較して腸管収縮抑制作用が確認されたため、止瀉薬や機能性胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待された。しかし、これらは PP とは異なる新規包接化合物であるため、今後は腸管収縮性評価に用いた CCh だけでなく、オピオイド系のロペラミドや Ca^{2+} を添加することで、非競合阻害として働いた作用について理解することで、ムスカリン受容体以外の収縮、抑制メカニズムの寄与など評価する必要があると考える。また、食品成分を用いた新規包接化合物であるが、PP とは異なる薬理学的作用を有するため、慢心せずに安全性、毒性評価が必要であると考ええる。

結論

本研究において、GM および CP を用いた PP/CDs 包接複合体は PP のメチレンジオキシフェニル基、ペンタジエン鎖を CD が包接することで、共役系に影響して、アミド基やピペリジンの分子運動性を抑制させた。PP の脂溶性部分が CD に包接されるため、密接に包接されている CP および PP/ α CD 包接複合体は、蒸留水や生体内関連媒体である FaSSIF においても、高い溶解性を維持することが可能になった。また、PP の辛味応答性については、各包化合物の辛味の強度を比較評価することは、PP と包接化合物の物理化学的性質が大きく事なるため、実施不可能であった。しかし、CD を用いることで、PP に特的に反応する味覚センサーが異なり、溶解性と味覚センサー応答性質との相関性は得られなかったことから、単に PP の味覚応答性は PP のフリー体の量に影響するのではなく、各包接化合物自体の味覚応答特性もしくは包接化合物と共存している遊離型 PP における分子状態の変化が関係している可能性が示唆される。これらの現象には、PP が CD と相互作用することによる分子内の共役系の変化による電子密度の偏りが関係していることが推察された。これにより、各包接化合物は少なくとも PP の辛味に反応するセンサーとは異なる味覚応答性を示すことが明らかとなった。本検討では相対的な関係としての評価のみであることや、包接化合物が PP とは異なるセンサー応答性を示していることから、今後は官能試験に基づきヒトが感じる実際の味覚との関係を対応させることにより客観的評価法として確立することができ、辛味の強度について評価する必要があると考えられた。次に、PP の腸管収縮調節作用は、各種包接化合物を調製することで、PP 濃度 2.0×10^{-5} M (5.7 μ g/mL) 以上の濃度で収縮抑制作用を示す特徴が PP/ α CD および PP/ β CD 包接化合物で確認された。この腸管収縮抑制作用を示す PP 濃度は各種包接化合物にて、容易に PP の溶解性をコントロールすることができ、腸管に対する作用

を調節できる可能性がある。また、各種包接化合物の中でも、CP で調製した PP/ α CD 包接複合体は、止瀉薬や機能性胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待できる。包接化合物は容易に PP の溶解性をコントロールすることが可能となったが、これら CD を併用した場合の薬理作用には、PP とは異なる新規包接化合物として、その有効性と安全性について、詳細に評価していくことが必要である。今後は腸管収縮性評価に用いた CCh だけでなく、オピオイド系のロペラミドや Ca^{2+} を添加することで、非競合阻害として働いた作用について理解する必要がある。

第 1 章から 3 章を通じて、新規包接化合物の安全性や毒性に対する課題はあるが、止瀉薬や機能性胃腸障害に対する治療薬としての利用が期待された。

論文目録

- 1) Toshinari Ezawa, Yutaka Inoue, Koichi Takao, Yoshiaki Sugita and Ikuo Kanamoto, Characterization of the dissolution behavior of piperine/cyclodextrins inclusion complexes. *AAPS PharmSciTech*, 19:923-933 (2017).

- 2) Toshinari Ezawa, Yutaka Inoue, Isamu Murata, Koichi Takao, Yoshiaki Sugita and Ikuo Kanamoto, Evaluation of the Molecular State of Piperine in Cyclodextrin Complexes by Near-Infrared Spectroscopy and Solid-State Fluorescence Measurements. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2019:1-14 (2019).
doi: 10.1155/2019/7530480

- 3) Toshinari Ezawa, Yutaka Inoue, Isamu Murata, Mitsuaki Suzuki, Koichi Takao, Yoshiaki Sugita and Ikuo Kanamoto, Syntheses and crystal structures of two piperine derivatives. *Acta Crystallographica. Section E, Crystallographic Communications*, 76:646-650 (2020).

謝辞

本研究に際し、終始懇切なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部栄養治療学講座教授 井上 裕 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始懇切なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました城西大学薬学部栄養治療学講座准教授 谷川 尚 先生に感謝の意を表します。

本研究を遂行するに際して、数々の有益なるご指導ならびに御助言を賜りました元城西大学薬学部医薬品安全性学講座教授 金本 郁男 先生に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に関して、終始御親切な御指導、御協力を賜りました城西大学薬学部薬物治療学講座教授 宮本 嘉明 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し、数々の有益なるご指導ならびに御助言を賜りました城西大学薬学部薬物治療学講座助教 村田 勇 先生に謹んで御礼申し上げます。

本論文作成、学位論文審査にあたり、御教授と御校閲を賜りました城西大学薬学部薬剤学講座教授 関 俊暢 先生、病院薬剤学講座教授 上田 英雄 先生、医薬品化学講座教授 坂本 武史 先生に感謝の意を表します。

本研究に関して有益なる御助言と御校閲を賜りました城西大学薬学部教授 木村 光利 先生、教授 杉田 義昭 先生、准教授 高尾 浩一 先生、助授 茂木 肇 先生、城西大学理学部助教 鈴木 光明 先生に深く感謝の意を表します。

本研究に際し、胡椒の写真を提供して戴きました城西大学薬学部客員教授 白瀧 義明 先生に感謝の意を表します。

NMR スペクトル測定に労をとられた元城西大学機器分析センター 山口 貞樹 技術官ならびに城西大学機器分析センター 富田 惇輝 技術官に深く感謝いたします。

シクロデキストリンを提供して戴きました株式会社シクロケムに深く感謝いたします。

Raman 測定をして下さいましたテックアナリシス株式会社に深く感謝いたします。

電子味覚システムについて終始ご親切な御指導を賜りましたアルファ・モス・ジャパン株式会社に御礼申し上げます。

本研究における実験の遂行にあたり、励ましと御協力を下さいました城西大学薬学部医薬品安全性学講座諸氏または卒業生、城西大学薬学部栄養治療学講座諸氏、城西大学薬学部薬物治療学講座諸氏、城西大学薬学部生物有機化学諸氏に心より感謝致します。

最後に、私の長きにわたる学生生活を温かく見守り、励まして下さいました家族に深く感謝致します。

実験の部

試薬

Piperine (PP)	富士フィルム和光純薬株式会社
α -Cyclodextrin (α CD)	株式会社シクロケム
β -Cyclodextrin (β CD)	株式会社シクロケム
γ -Cyclodextrin (γ CD)	株式会社シクロケム
Lecithin, from Egg (for Biochemistry)	富士フィルム和光純薬株式会社
Sodium Taurocholate	富士フィルム和光純薬株式会社

その他の試料については、富士フィルム和光純薬株式会社製の試薬特級を用いた。

第 1 章

1. 試料の調製

1-1. PP/CDs 物理的混合物 (PM) の調製

PP と α CD をモル比 1/1、1/2 および 1/3 で秤量し、褐色のスクリー管瓶に入れ、Vortex Mixer (Model TM-151, IWAKI) を用いて 1 分間混合した。

PP と CD (β CD、 γ CD) をモル比 2/1、1/1 および 1/2 で秤量し、褐色のスクリー管瓶に入れ、Vortex Mixer (Model TM-151, IWAKI) を用いて 1 分間混合した。

1-2. PP/CDs 混合粉碎物 (GM) の調製

PM (PP/ α CD=1/1、1/2 および 1/3) 1g をアルミナセルに充填後、振動型ロッドミル(CMT 社製 TI-500ET 型)を用いて、回転数 1440 rpm、振幅 7 mm の条件下で 60 分間混合粉碎した。

PM (PP/ β CD、PP/ γ CD =2/1、1/1 および 1/2) 1g をアルミナセルに充填後、振動型ロッドミル (CMT 社製 TI-500ET 型) を用いて、回転数 1440 rpm、振幅 7 mm の条件下で 60 分間混合粉碎した。各試料の調製方法を Scheme 5 に示した。

1-3. PP/ γ CD 共沈物 (CP) の調製

PP (160 mg, 0.56 mmol) をアセトン 5 mL に溶解した PP 溶液を CD (0.56 mmol) を蒸留水 5 mL に溶解した CD 溶液に滴下することで調製した。溶液を 60°C で 1 時間攪拌した後、室温で 24 時間静置した。サンプルをろ紙で濾過した後、沈殿物を 5 mL のアセトンで洗浄し、デシケーターで 24 時間真空乾燥した。各試料の調製方法を Scheme 6 に示した。

1-5. 各種包接複合体である GM (PP/CDs) を一週間加湿 (40°C, RH = 82%) することで、Humidified GM を調製した。また、GM または Humidified GM を真空検

体乾燥機 (VSD-95, ISHII SHOTEN Co.) を使用して、真空下 (100 mbar abs)、105°C で 24 時間乾燥させた dry GM および Humidified-dry GM を調製した。

1-6. PP 誘導体の合成

PP をエタノールに溶解させた後、水酸化カリウム存在下で 22 時間攪拌による加水分解処理を行った。溶媒留去後、得られた反応混合物を水に懸濁し、4 mol/L HCl にて pH を 1 以下の酸性に調製した。得られた淡褐色沈殿物をろ取し、冷水で洗浄、メタノールによる再結晶化することでピペリン酸を得た。ピペリン酸 (1.0 mmol) を CH₂Cl₂ (5 mL) に溶解させた後、oxalyl chloride (10 mmol) を加えて 3 時間室温で攪拌させた。次に、溶媒および過剰の oxalyl chlorid を減圧下で蒸発させた。生成された crude acid chloride を CH₂Cl₂ (2 mL) に溶解し、シクロヘキシルアミン (1.2 mmol) またはピロリジンどちらか一方と Triethylamine (8 mmol) を加えて氷冷下で 5 時間攪拌した。混合物に氷水を加え、CHCl₃ (5 mL) で抽出した。有機層を Na₂SO₄ で乾燥させた。ろ紙で Na₂SO₄ を取り除いた溶媒を減圧下で蒸発させた。残渣に celite とエチルアセテートを加えて分散させた後、溶媒を減圧下で蒸発させた。得られた残渣を silica gel column chromatography (hexane : ethyl acetate =1/1) で精製し、PP 誘導体である PPD1 および PPD2 を得た。

1-7. PP 誘導体/CDs 物理的混合物 (PM) の調製

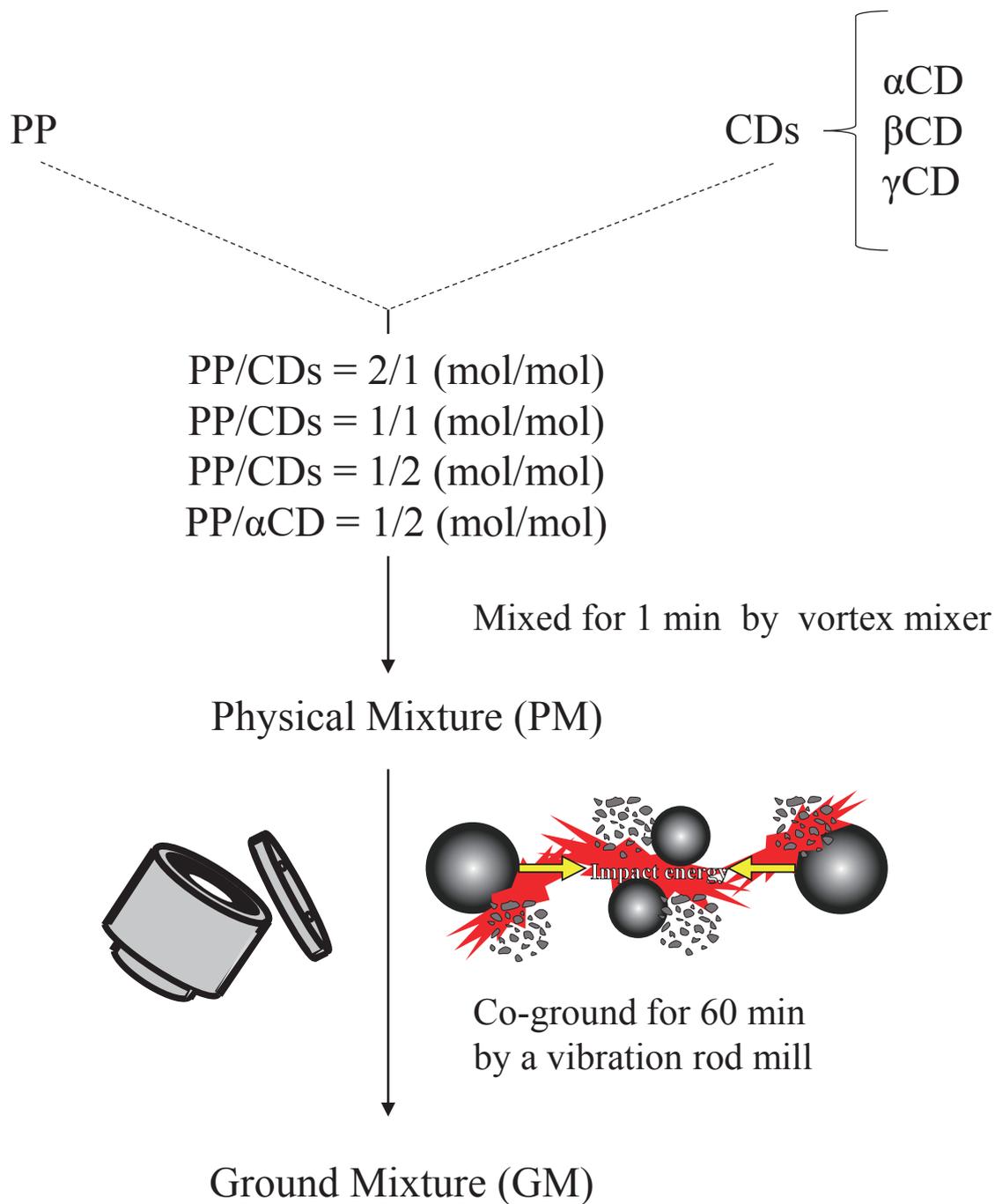
PP 誘導体と αCD をモル比 1/1、1/2 で秤量し、Vortex Mixer を用いて 1 分間混合した。

PP 誘導体と CD (βCD、γCD) をモル比 1/1 および 1/2 で秤量し、Vortex Mixer を用いて 1 分間混合した。

1-8. PP 誘導体/CDs 混合粉砕物 (GM) の調製

PM (PP 誘導体/ α CD=1/1、1/2 および 1/3) 1g をアルミナセルに充填後、振動型ロッドミル (CMT 社製 TI-500ET 型) を用いて、回転数 1440 rpm、振幅 7 mm の条件下で、60 分間混合粉砕した。

PM (PP 誘導体/ β CD、PP/ γ CD =2/1、1/1 および 1/2) 1g をアルミナセルに充填後、振動型ロッドミル (CMT 社製 TI-500ET 型) を用いて、回転数 1440 rpm、振幅 7 mm の条件下で、60 分間混合粉砕した。各試料の調製方法を Scheme 7 に示す。



Scheme 5. Ground Mixture method of PP/CDs systems.

PP solution
(Solvent: Acetone) 5 mL

CDs solution
(Solvent: Disteilled water) 5 mL

PP/CDs = 1/1 (mol/mol)

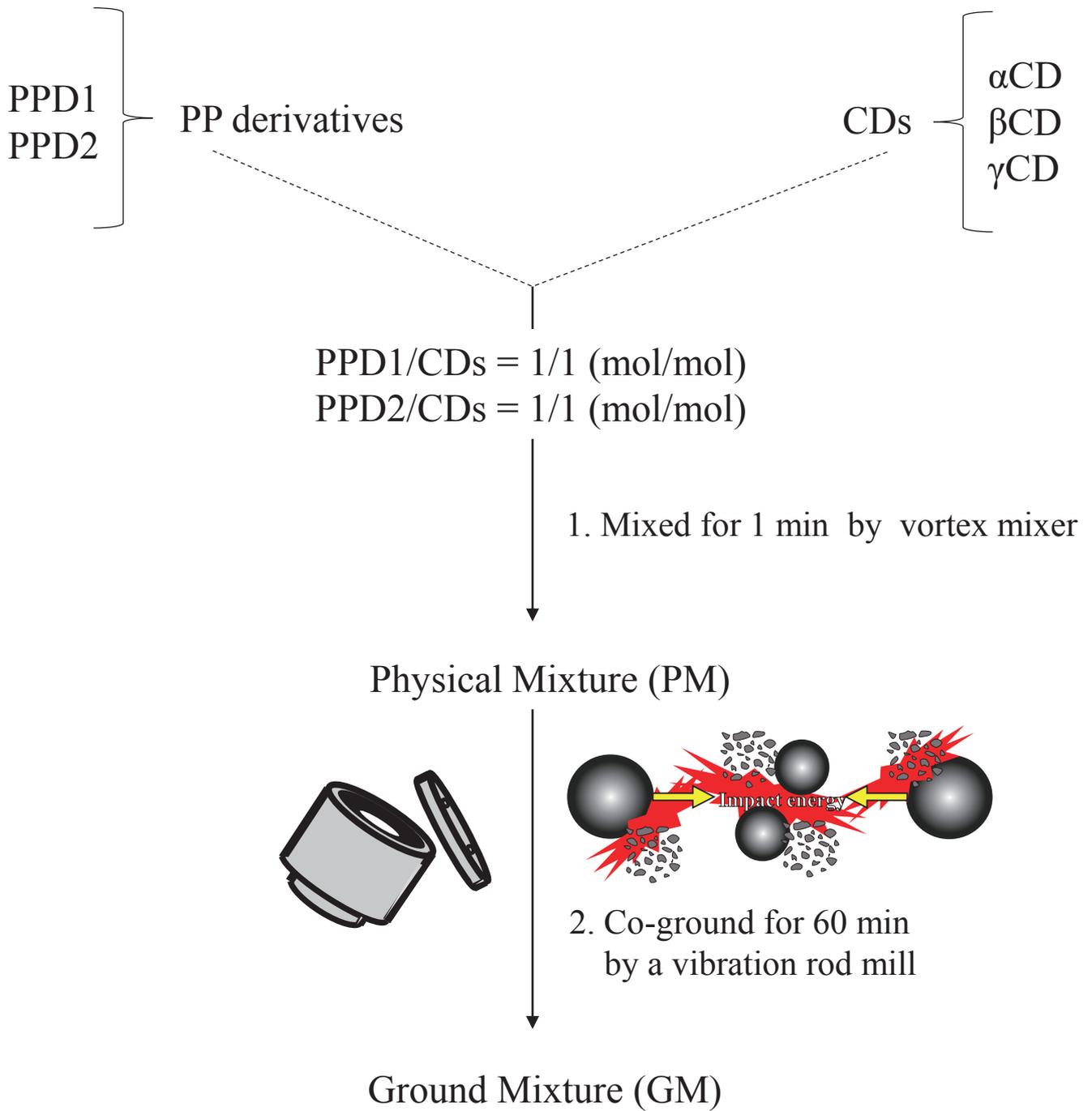
1. Stirred for 1 hr (60°C)

Precipitate

2. Filtration (filter paper)
3. Washed by acetone (5 mL)
4. Dried under reduced for 24 hr

Co-Precipitate (CP)
PP/CDs

Scheme 6. Co-precipitate method of PP/CDs systems.



Scheme 7. Ground Mixture method of PP/CDs systems.

2. 測定方法

2-1. Phase solubility test

PP50 mg を各濃度の CD 溶液 10 mL に加えた後、中型恒温振とう培養機(BR-43FL, TAITEC 社製) を用いて、48 時間 100 rpm (25±5°C) で振盪を行った。サンプル液は振盪して得た分散液を回転数 1440 rpm, 振幅 7 mm の条件下で、0.45 μm 孔径の混合セルロースエステルメンブランフィルター (DISMIC-25AS, Toyo Roshi Kaisha) で濾過した後、希釈して得た。PP の定量は、紫外可視分光光度計 (UV-2500PC, SHIMAZU 社製) を用いて 345 nm の吸収波長で吸光度を測定した。得られた吸光度から PP の溶解度を算出した。相溶解度相図を用いて下記の Higuchi and Connor の式 (1) および式 (2) に従って、PP/CD の見掛け安定性定数 (モル比 1/1 および 1/2)、 $K_{1/1}$ および $K_{1/2}$ を算出した。

$$K_{1/1} = \text{Slope} / S_0 / (1 - \text{slope}) \quad \text{Eq (1)}$$

$$S_{\text{tot}} = S_0 + K_{1:1} S_0 [\text{CD}] + K_{1/1} K_{1/2} S_0 [\text{CD}]^2 \quad \text{Eq (2)}$$

S_0 は CD が非存在下の PP の溶解度、 S_{tot} は PP の総濃度、 $[\text{CD}]$ は CD の遊離型濃度である。

2-2. 粉末 X 線回折 (PXRD) 測定

MinFlexII型粉末 X 線回折装置 (Rigaku 製) を使用し、回折強度は NaI シンチレーションカウンターにより測定した。X 線としては Cu 線 (30kV, 15mA) を用い、X 線回折測定には 4 °/min のスキャン条件を用い、測定範囲は $2\theta = 3^\circ - 35^\circ$ とした。粉末試料をガラスプレートに試料平面が平坦になるように充填して測定した。

2-3. 示差走査熱量 (DSC) 測定

Thermo plus Evo 高感度示差走査熱量計 (Rigaku 製) を使用した。測定は試料約 2 mg をアルミニウム製パンに充填し密封したのち、窒素ガス気流下 (60 mL/min) 、昇温速度 5°C /min で行った。

2-4. Raman スペクトル測定

Raman スペクトルメーター (Cart-Mountable RamanRxn2™ Analyzer-1000 nm、カイザー社製) を用い、励起レーザー (1000 nm) を照射し、スペクトル分解能 5 cm⁻¹、200~2400 cm⁻¹ の測定波数領域の条件下において、分光器 (f/1.8 Imaging Spectrograph with a Holographic Transmission Grating)、検出器 (TE-Cooled, 1024 Array Detector) にて測定を行った。

2-5. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 測定

SEM は、S3000N 走査型電子顕微鏡 (Hitachi High-Technologies Corporation) を用いて加速電圧 10 kV で測定した。試料をアルミニウム SEM に載せた。これらの試料スタブは、70 秒間薄い金の層で被覆して導電性とした。

2-6. ¹H-核磁気共鳴(NMR)スペクトル測定

Varian NMR System 400 MHz (アジレントテクノロジー社製) を使用した。Dimethyl sulfoxide-d₆ (DMSO-d₆) を溶媒に用い、室温において積算回数 128 で測定した。

2-7 ¹H-¹H 2D-NOESY NMR スペクトル測定

Varian NMR System 700 MHz (アジレントテクノロジー社製) を使用した。D₂O を溶媒に用い、共鳴周波数は 699.6 MHz、緩和時間は 1.5 s、25 °C において積算回

数 256 で測定した。

2-8. 熱重量 (TG) 測定

Thermo plus Evo 高感度示差走査熱量計 (Rigaku 製) を使用した。測定は試料約 10 mg をアルミニウム製パンに充填し、窒素ガス気流下 (200 mL/min)、昇温速度 5 °C /min で行った。

2-9. 固体蛍光スペクトル測定

蛍光分光光度計 (RF-5300PC, Shimadzu) を使用した。光路長が 5 mm の四面透明石英ガラスセルを用いて、スリット幅を 5 nm で励起波長を 360 nm とし、測定蛍光波長範囲を 380-600 nm とした。PP 誘導体の場合は、PPD1 の蛍光波長 295 nm、PPD2 の蛍光波長 260 nm に設定した。

2-10. 近赤外吸収スペクトル (NIR) 測定

近赤外吸収スペクトルは、フーリエ変換近赤外分光器 (NIRFlex N-500, Buchi) を用いて測定しました。測定範囲を 10000~4000 cm^{-1} とした。分解能 8 cm^{-1} 、測定温度は 25°C とした。スペクトルは二次微分に変換した。

2-11. 溶液蛍光スペクトル測定

蛍光分光光度計 (RF-5300PC、Shimadzu 社製) を使用した。光路長が 5 mm の四面透明石英ガラスセルを用いて、スリット幅を 5 nm で励起波長を 270 nm とし、測定蛍光波長範囲を 280-600 nm とした。

2-12 溶出試験における試験液の調製

空腹時人工腸液 (Fasted State Simulated Intestinal Fluid : FaSSIF) は胃腸環境の

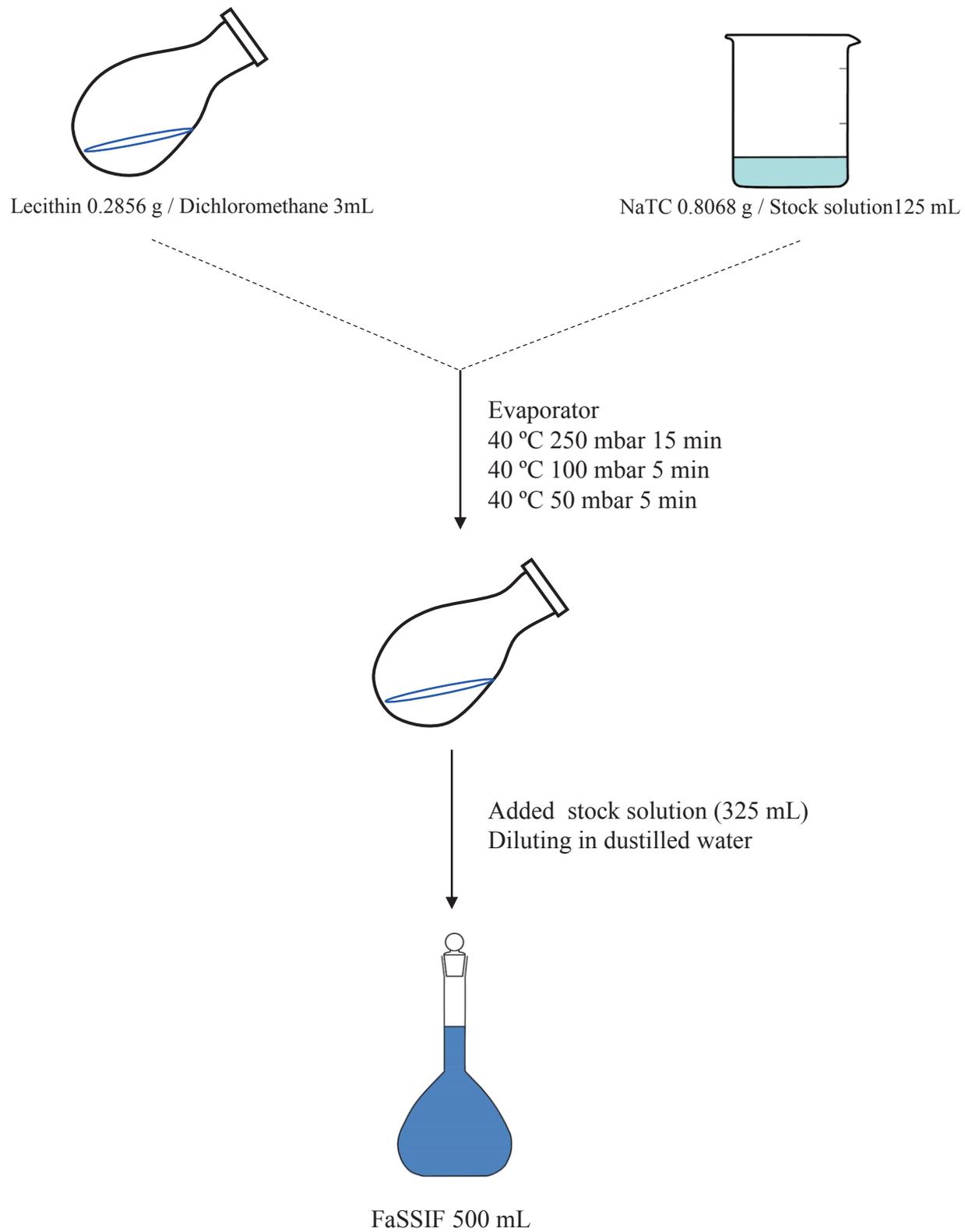
小腸上部における水分情報を基に調製された溶媒であり、欧州薬局方および米国薬局方に収載されている。FaSSIF の調製として、リン酸二水素ナトリウム (3.7824 g)、塩化ナトリウム (6.814 g)、水酸化ナトリウム (0.385 g) をメスフラスコ (1000 mL) に加え、蒸留水で溶解させた。その後、溶解液を 1mol/L NaOH で pH 6.5 に合わせたストック溶液を調製した。タウロコール酸ナトリウム (NaTC) を 0.8068 g 秤量し、ストック溶液 125 mL で溶解させた NaTC 溶液を調製した。一方、生化学用レシチン 0.2856 g を 10 mL ビーカーに秤量し、ジクロロメタン 3 mL を加えて溶解させた。レシチン溶液をメスフラスコに移した後、超音波をかけながら NaTC 溶液を混合させた。白濁溶液をロータリーエバポレーター (Rotavapor R-215, Buchi) で 40 °C、250 mbar (15 min)、100 mbar (5 min) の順で減圧を行った。白濁の溶液が澄明になってもジクロロメタンの臭気を感じた場合には、さらに 50 mbar (5 min) の減圧を行った。5. メスフラスコ (500 mL) に先ほど減圧をした溶液 125 mL とストック溶液 325 mL を加えた。蒸留水でメスアップすることで FaSSIF 溶液を調製した (Scheme 8)。

溶出試験第 1 液 (pH 1.2) は 17 局改正に準拠し、塩化ナトリウム 2.0 g を 1N 塩酸 7.0 mL および蒸留水 1000 mL に溶解して調製した。

2-13. 溶出試験

溶出試験器 (NTR-593, Toyama Sangyo) を用い、日本薬局方 17 局改正溶出試験法 (パドル法) に準じて実施した。試験液は蒸留水 (900 mL)、溶出試験第 1 液 (900 mL)、空腹時人工腸液 (FaSSIF, 300 mL)、FaSSIF 溶液から NaTC およびレシチンを除いた FaSSIF (ストック溶液) 300 mL を用いた。試験液に投入する PP 量は蒸留水、FaSSIF、ストック溶液で 30 mg、溶出試験第 1 液は 50 mg とした。粉末試料を試験液に投入後試験を開始し、0、5、10、15、30、60 および 120

分ごとの 10 mL の試料液を採取した。採取した試料液を 0.45 μm 孔径の混合セルロースエステルメンブランフィルター (DISMIC-25AS, Toyo Roshi Kaisha) で濾過した。濾液は試験液/メタノール=1/1 溶液で希釈し、定量は高速液体クロマトグラフ (HPLC: LC-20ADvp, Shimazu 製) および Inertsil[®] ODS-3 HPLC Column (ϕ 5 μm , 150 mm \times 4 mm) を用い、345 nm の吸収波長で測定した。サンプル注入量は 30 μL 、カラム温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。移動相はアセトニトリル/水/酢酸 (60/39.5/0.5) を用いた。PP の保持時間が約 6 min になるように流速を設定した。



Scheme 8. Preparation method of FaSSIF

第 2 章

1. 測定方法

1-1. 味覚応答値の評価

サンプルの味の評価は味覚応答性を評価する電子味覚システム (ASTREE V5) を用いた。オートサンプラーとして LS48 を使用した。ヒトの味受容体に 관련된センサーアレイ 7 本として AHS, CTS, NMS, PKS, CPS, ANS, SCS を使用した。7 種のセンサーは基本五味を評価する味認識装置ではなく、有機物、無機物など広範囲の味を評価することが可能である。渋味や辛味などの応答性を評価可能であり、複合的な味の応答性を評価することが可能である。AHS, CTS, NMS は酸味、塩味、うま味などに特異的に応答しやすい特徴がある。各センサーアレイはポリマー (ヒトの舌の脂質膜) によってカプセル化した内部で反応する味受容体 (センサー応答化合物) を含有した味応答性として機能する。測定原理は pH センサーと同様であり、イオン種の存在によるイオン結合、中性物質の分子間力や水素結合、サンプルと膜のタイプに基づく相互作用によって、センサーアレイの Ag/AgCl 電極とサンプル間との電位差を利用して、味の応答性を評価した。試料はサンプルを蒸留水に分散させた後、120 秒間測定を行った。電位が安定する 100~120 秒の応答平均値をデータとして用いた。サンプルとサンプルの間に蒸留水単独を挟むことでクリーニングを行った。味の違いは主成分分析により評価した。また、味の違いの因子は多変量解析によるセンサー応答性と PP 溶解度、安定度定数を用いて相関係数を算出して評価した。

第3章

1. 測定方法

1-1. 腸管収縮性の評価 (マグヌス試験)

本研究における動物実験は、城西大学全学動物実験管理委員会による承認を得て、動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに従って実施した (動物試験承認番号 : JU19033)。

1-2. 試薬の準備

腸の収縮反応はカルバコール (CCh) 濃度 (5.0×10^{-2} mol/L) で誘導し、CCh の腸管収縮性に対する PP または PP 包接複合体の添加した際の収縮反応を腸管収縮率として評価した。PP および PP/CD 複合体の添加濃度は CCh の腸管収縮率と同等である 2.0×10^{-5} mol/L を基準に設定する。PP、PM および各包接化合物はタイロード液 50 mL に直接溶解させた。

1-3. タイロード溶液の調製

NaCl (80 g)、KCl (2 g)、 $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ (2 g)、 $NaHCO_3$ (10 g)、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (1 g) を 500 mL の蒸留水で溶解させた A 液、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (2.6 g)、Glucose (10 g) を 50 mL の蒸留水で溶解させた B 液を調製した。その後、A 液 50 mL と B 液 5 mL を 1000 mL のメスフラスコに加えて蒸留水でメスアップを行った。

1-4. 摘出回腸標本の作成

一昼夜絶食させた ddy 系マウス (5 週齢、雄) を、頸椎の脱臼により安楽死させた。直ちにマウスの腹壁を切開し、盲腸側から 10 cm 程度小腸を摘出し、速や

かにタイロド液の入ったシャーレへ移した。そのうちの回腸部分を約 1.5 cm に切断し標本とした。

1-5. マグヌス実験摘出

回腸標本を 50 mL タイロド液を入れたオルガンバス内に懸垂し、約 3 分間放置することで馴化させた。条件として、恒温槽は 37°Cとし、酸素供給量は 1 秒間に 3 つ程度の泡 (酸素) が放出するように設定した。

1-6.回腸収縮測定

記録計の振り幅が安定し基線が取れたら、 5.0×10^{-2} mol/L CCh を 10^{-5} 希釈した薄い濃度から 100 μ L ずつ 20 秒間隔で累積添加した ($5.0 \times 10^{-5} \sim 5.0 \times 10^{-8}$ mol/L)。ただし、1 点目は control として水を添加した。収縮能を確認した回腸を 50 mL タイロド液で 3 回洗浄し、再び馴化させた。PP や包接化合物溶出液の測定を行う際は、直接 50 mL タイロド液に溶解しているため、振り幅の安定した腸管に PP や包接化合物溶出液含有の 50 mL タイロド液を入れ、約 3 分間静置した後、上記の手順で CCh を累積添加した。これらの腸管収縮反応は、記録計にて測定した。

1-7. データの統計処理

各群間は一元配置分散分析を行った後、Tukey's Test で各群を比較した。危険率 0.05 未満 ($p < .05$) を統計上有意とみなした。なお、全ての薬物測定は $n=5$ で実施した。

参考文献

- 1) Ravindran PN, Kallapurakal JA, 6-Black papper. Handbook of Herbs and apices. 86-115 (2012).
- 2) Vietnam pepper association not hopeful of global price recopery. Vietnam. 2020, Available from:<https://en.vietnamplus.vn/vietnam-pepper-association-not-hopeful-of-global-price-recovery/152500.vnp>
- 3) Dawid C, Henze A, Frank O, Glabasnia A, Rupp M, et al. Structural and Sensory Characterization of Key Pungent and Tingling Compounds of Black papper (piper nigrum L.). J Agric Food Chem. **60**(11), 2884-2895 (2012).
- 4) Rauscher FM, Sanders RA, Watkins JB. Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J Biochem Mol Toxicol. **14**(6), 329–334 (2000).
- 5) Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, , et al. Influence of piperine on the harmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. Planta Med. **64**(4), 353-356 (1998).
- 6) Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur B-J, Lim S-J, et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. Arthritis Res.**11**(2), 1–9 (2009).
- 7) Mehmood MH, Gilani AH. Pharmacological Basis for the Medicinal Use of Black Pepper and Piperine in Gastrointestinal Disorders. J. Med. Food. **13**(5), 1086–1096 (2010).
- 8) Pongkorpsakol P, Wongkrasant P, Kumpun S. Inhibition of intestinal chloride secretion by piperine as a cellular basis for the anti-secretory effect of black peppers. Pharmacol. Res. **100**, 271–280 (2015).

- 9) Pfund LY, Chamberlin BL, Matzger AJ. The Bioenhancer Piperine is at Least Trimorphic. *Cryst. Growth Des.* **15**(5), 2047-2051 (2015).
- 10) Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Delivery Rev.* **59**(7), 645-666 (2007).
- 11) Del Valle E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* **39**(9),1033-1046 (2004).
- 12) Tan Q, Zhang L, Zhang L, Teng Y, Zhang J. Design and evaluation of an economic taste-masked dispersible tablet of pyridostigmine bromide, a highly soluble drug with an extremely bitter taste. *Chem. Pharm.* **60**(12), 1514-1521 (2012).
- 13) Martin A, Tabary N, Leclercq L. Multilayered textile coating based on a β -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs. *Carbohydr. Polym.* **93**(2), 718-730 (2013).
- 14) Cappello B, Di Maio C, Iervolino M, Miro A. Improvement of solubility and stability of valsartan by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Incl. Phenom.* **54**, 289-294 (2006).
- 15) Szente L, Szejtli J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* **15**(3-4), 137-142 (2014).
- 16) Shen C, Yang X, Wang Y, Zhou J, Chen C. Complexation of capsaicin with β -cyclodextrins to improve pesticide formulations: effect on aqueous solubility, dissolution rate, stability and soil adsorption. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **72**, 263-274 (2012).
- 17) Andrens S, Andrej S. Effect of β -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. *Food Chem.*, **110**(3), 636–642 (2008).
- 18) Inoue Y, Suzuki K, Ezawa T, Murata I, Yokota M, Tokudome Y. Examination of the physicochemical properties of caffeic acid complexed with γ -cyclodextrin. *J. Incl.*

- Phenom. Macrocycl. Chem., **83**, 289–298 (2015).
- 19) Mangolim CS, Moriwaki C, Nogueira AC, Sato F, Baesso ML, Neto AM. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. Food Chem. **153**, 361–370 (2014).
- 20) Inoue Y, Suzuki K, Ezawa T, Murata I, Yokota M, Tokudome Y, Kanamoto I. Examination of the physicochemical properties of caffeic acid complexed with γ -cyclodextrin. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem., **83**, 289-298 (2015).
- 21) Shiozawa R, Inoue Y, Murata I, Kanamoto I. Effect of antioxidant activity of caffeic acid with cyclodextrins using ground mixture method. Pharm. Sci., **13**(1), 24-33 (2018).
- 22) Cui H, Siva S, Lin L. Ultrasound processed cuminaldehyde/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: Preparation, characterization and antibacterial activity. Ultrason Sonochem. **56**, 84-93 (2019).
- 23) Inoue Y, Suzuki R, Murata I, Nomura H, Isshiki Y, Kanamoto I. Evaluation of Antibacterial Activity Expression of the Hinokitiol/Cyclodextrin Complex Against Bacteria. ACS Omega. **5**(42), 27180-27187 (2020).
- 24) Loftsson T, Másson M, Brewster ME. Self-Association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes in aqueous solutions. J Pharm Sci. **560**, 228-234 (2019).
- 25) Iacovino R, Rapuano F, Caso JV, Russo A, Lavorgna M, et al. β -cyclodextrin inclusion complex to improve physicochemical properties of pipemidic acid: Characterization and bioactivity evaluation. Int J Mol Sci. **14**(7), 13022-13041 (2013).
- 26) Yang LJ, Xia S, Ma SX, Zhou SY, Zhao XQ et al. Host-guest system of hesperetin and β -cyclodextrin or its derivatives: Preparation, characterization, inclusion mode,

- solubilization and stability. *Mater Sci Eng C*. **59**, 1016-1024 (2016).
- 27) Hirotsu T, Higashi T, Hashim IIA, Misumi S, Wada K, et al. Self-assembly PEGylation retaining activity (SPRA) technology via a host-guest interaction surpassing conventional PEGylation methods of proteins. *Mol Pharm*. **14**(2), 368-376 (2017).
- 28) Ficarra R, Tommasini S, Raneri D, Calabro ML, Di Bella MR, et al. Study of flavonoids/ β -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *J Pharm Biomed Anal*. **29**(6), 1005-1014 (2002).
- 29) Ezawa T, Inoue Y, Tunvichien S, Suzuki R, Kanamoto I. Changes in the physicochemical properties of piperine/ β -cyclodextrin due to the formation of inclusion complexes. *Int J Med Chem*. **2016**, 1-9 (2016).
- 30) Cabral Marques H.M, Hadgraft j, Kellaway I.W. Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol-cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *Int J Pharm*. **63**(3), 259-266 (1990).
- 31) Chadha R, Arora P, Bhandari S. Effect of hydrophilic polymer on complexing efficiency of cyclodextrins towards efavirenz-characterization and thermodynamic parameters. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. **72**, 275-287 (2012).
- 32) Li S, Lin X, Xu K, He J, Yang H, Li H. Co-grinding Effect on Crystalline Zaltoprofen with β -cyclodextrin/Cucurbit[7]uril in Tablet Formulation. *Sci Rep*. **7**, 1-10 (2017)
- 33) Naidoo KJ, Chen JY, Jansson JLM, Maliniak A. Molecular properties related to the anomalous solubility of beta-cyclodextrin. *J Phys Chem B*. **108**(14), 4236-4328 (2004).
- 34) Nalluri BN, Chowdary KPR, Murthy KVR, Hayman AR, Becket G. Physicochemical characterization and dissolution properties of nimesulide-cyclodextrin binary systems.

- AAPS PharmSciTech. **4**(1), 6-17 (2003).
- 35) Jambhekar SS, Breen P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency. *Drug Discov Today*. **21**(2), 363-368 (2016).
- 36) Naidoo KJ, Chen JY, Jansson JLM, Maliniak A. Molecular properties related to the anomalous solubility of beta-cyclodextrin. *J Phys Chem B*. **108**(14), 4236–4328 (2004).
- 37) Higashi K, Waraya H, Lin LK, Namiki S, Ogawa M, et al. Application of intermolecular spaces between polyethylene glycol/ γ -cyclodextrin-polypseudorotaxanes as a host for various guest drugs. *Cryst Growth Des*. **14**(6), 2773-2781 (2004).
- 38) Christy AA. Insights into the Chemistry of Adsorption of Water Molecules by Cyclodextrins as Studied by Near Infrared Spectroscopy. **9**(14), 7-13 (2015).
- 39) Topchieva IN, Tonelli AE, Panova IG, Matuchina E V, Kalashnikov FA, et al. Two-phase channel structures based on alpha-cyclodextrin-polyethylene glycol inclusion complexes. *Langmuir*. **20**, 9036-9043 (2004).
- 40) Xue Q, Le X, Dang Z, Du FY. A Comparative Study on the Formation and Spectral Properties of the Polypseudorotaxanes of β -Cyclodextrin and Poly (propylene glycol) under Different Conditions. **82**(9), 1209-1213 (2009).
- 41) Li N, Liu J, Zhao X, Gao Y, Zheng L, et al. Complex formation of ionic liquid surfactant and β -cyclodextrin. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. **292**(2-3), 196-201 (2007).

- 42) Vajda S, Jimenez R, Rosenthal SJ, Fidler V, Fleming GR, et al. Femtosecond to nanosecond solvation dynamics in water and inside the gamma-cyclodextrin cavity. *J Chem Soc Trans.* **91**, 867-873 (1995).
- 43) Orstan A, Ross JBA. Investigation of the beta-cyclodextrin-indole inclusion complex by absorption and fluorescence spectroscopies. *J Phys Chem.* **91**(11), 2739-2745 (1987).
- 44) Galia E, Nicolaidis E, Hörter D, Löbenberg R, Reppas C, et al. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs, *Pharm Res* **15**(5), 698-705 (1998).
- 45) Takano R, Sugano K, Higashida A, Hayashi Y, Machida M, et al. Oral absorption of poorly water-soluble drugs: computer simulation of fraction absorbed in humans from a miniscale dissolution test, *Pharm Res.* **23**(6), 1144-1156 (2006)
- 46) Furune T, Ikuta N, Ishida Y, Nakata D, Terao K, et al. A study on the inhibitory mechanism for cholesterol absorption by α -cyclodextrin administration. **10**, 2827-2835 (2014).
- 47) Uekaji Y, Jo A, Ohnishi M, Nakata D, Terao K. A new generation of nutra-ceuticals and cosme ceuticals complexing lipophilic bioactives with γ -cyclodextrin. *Procedia Eng.* **36**, 540-550 (2012).
- 48) Vajda S, Jimenez R, Rosenthal SJ, Fidler V, Fleming GR, et al. Femtosecond to nanosecond solvation dynamics in water and inside the γ -cyclodextrin cavity. *J. Chem. Soc. Faraday Trans,* **91**(5), 867-873 (1995).
- 49) Massin J, Dayou W, Mulatier J-C, Aronica C, Bretonni`ere Y, et al. Near-infrared solid-state emitters based on isophorone: Synthesis, crystal structure and spectroscopic properties. *Chem. Mater.* **23**(3), 862-873 (2011).

- 50) Thomas SW, Joly GD, Swager TM. Chemical sensors based on amplifying. Fluorescent conjugated polymers. *Chem. Rev.* **107**(4), 1339-1386 (2007).
- 51) Debnath S, Mishra J. Understanding the intrinsic fluorescence of piperine in microheterogeneous media : partitioning and loading studies. *New J. Chem.*, **44**, 8317-8324 (2020).
- 52) Guhmann M, Preis M, Gerber F, Pöllinger N, Breitzkreutz J, et al. Development of oral taste masked diclofenac formulations using a taste sensing system. *Int. J. Pharm.*, **438**(1-2), 81-90 (2012).
- 53) Harada T, Uchida T, Yoshida M, Kobayashi Y, Narazaki R, et al. A new method for evaluating the bitterness of medicines in development using a taste sensor and a disintegration testing apparatus. *Chem. Pharm. Bull.*, **58**(5), 1009-1014 (2010).
- 54) Takeuchi Y, Usui R, Ikezaki H, Tahara K, Takeuchi H. An advanced technique using an electronic taste-sensing system to evaluate the bitterness of orally disintegrating films and the evaluation of model films. *Int. J. Pharm.*, **531**(1), 179-190 (2017)
- 55) Wu X, Onitake H, Uchida T, Ikezaki H, Toko K, et al. Quantitative prediction of bitterness masking effect of high-potency sweeteners using taste sensor. *Sens. Actuators B Chem.*, **235**, 11-17 (2016).
- 56) Tokuyama E, Matsunaga C, Yoshida K, Misfud J, Irie T, et al. Famotidine orally disintegrating tablets: Bitterness comparison of original and generic products. *Chem. Pharm. Bull.*, **57**(4), 382-387 (2009).
- 57) Ito M, Ikehama K, Yoshida K, Haraguchi T, Yoshida M, et al. Bitterness prediction of H1-antihistamines and prediction of masking effects of artificial sweeteners using an electronic tongue. *Int. J. Pharm.*, **441**(1-2), 121-127 (2013).
- 58) Wang Y, Feng Y, Wu Y, Liang S, Xu D. Sensory evaluation of the taste of berberine

- hydrochloride using an electronic tongue. *Fitoterapia*, **86**, 137-143 (2013).
- 59) Haraguchi T, Yoshida M, Uchida T. Evaluation of ebastine-loaded orally disintegrating tablets using new apparatus of detecting disintegration time and e-tongue system. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **24**(6), 684-688 (2014).
- 60) Rachid O, Simons FER, Rawas QM., Simons KJ. An electronic tongue: Evaluation of the masking efficacy of sweetening and/or flavoring agents on the bitter taste of epinephrine. *AAPS PharmSciTech*, **11**(2), 550-557 (2010).
- 61) Khaydukova M, Kirsanov D, Pein HM, Immohr LI, Gilemkanova V, et al. Critical view on drug dissolution in artificial saliva: A possible use of in-line e-tongue measurements. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **99**(1), 266-271 (2017).
- 62) Ciosek P, Wesoly M, Zabadaj M, Lisiecka J, Sołohub K, et al. Towards flow-through/flow injection electronic tongue for the analysis of pharmaceuticals. *Sens. Actuators B Chem.*, **207**, 1087-1094 (2015).
- 63) Wesoly M, Zabadaj M, Amelian A, Winnicka K, Wróblewski W, et al. Tasting cetirizine-based microspheres with an electronic tongue. *Sens. Actuators B Chem.*, **238**, 1190-1198 (2017).
- 64) Alpha M.O.S., Astree electrochemical sensor technology. Technical note, T-SA, S-S04 (2004)
- 65) 高橋克嘉, 杉本未奈子, 柚木崎千鶴子, 官能評価と味覚センサーとの相関, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, No. 58 (2013).
- 66) Uchida T, Tanigake A, Miyanaga Y, Matsuyama K, Kunitomo M, et al. Evaluation of the bitterness of antibiotics using a taste sensor. *J Pharm Pharmacol.* **55**(11), 1479-1485 (2003).
- 67) Miyanaga Y, Inoue N, Ohnishi A, Fujisawa E, Yamaguchi M, et al. Quantitative

- prediction of the bitterness suppression of elemental diets by various flavors using a taste sensor. *Pharm Res.* **20**(12), 1932-1938 (2003).
- 68) Toko, K. (1998b) A taste sensor. *Meas. Sci. Technol.* **9**, 1919-1936 (1998).
- 69) Alpha MOS, Technical Note N-DT-01: Statistical Analysis, released 1-5 (2002).
- 70) Mady FM, Abou-Taleb AE, Khaled KA, Yamasaki K, Uekama K, et al. M. Evaluation of carboxymethyl-beta-cyclodextrin with acid function : improvement of chemical stability, oral bioavailability and bitter taste of famotidine. *Int. J. Pharm.*, **397**(1-2), 1-8 (2010).
- 71) Mady FM, Abou-Taleb AE, Khaled KA, Yamasaki K, Uekama K, et al. Enhancement of the aqueous solubility and masking the bitter taste of famotidine using drug/SBEbeta-CyD/povidone K30 complexation approach. *J. Pharm. Sci.*, **99**(10), 4285-4294 (2010).
- 72) Woertz K, Tissen C, Kleinebudde P, Breitzkreutz J. Rational development of taste masked oral liquids guided by an electronic tongue. *Int. J. Pharm.*, **400**(1-2), 114-123 (2010).
- 73) Ono N, Miyamoto Y, Hirayama K, Arima H, Uekama K, et al. Reduction of bitterness of antihistaminic drugs by complexation with β - cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.*, **100**(5), 1935-1943 (2011).
- 74) 高橋英樹, 文後有里, 三國克彦, α -リポ酸の辛味に対するサイクロデキストリンの影響, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **58**(12), 583-590 (2011)
- 75) Haque T, Shams R, Tahsin F, Haque M, Al Hasan Z, et al. Antidiarrheal activity of methanol extract of *Piper sylvaticum* (roxb.) stem in mice and in silico molecular docking of its isolated compounds. *Discovery Phytomedicine.*, **6**(3), 92-98 (2019).
- 76) Mazzella A, Grieco P, Diurno MV, Campiglia P, Novellino E, et al. Binding Site of

Loperamide : Automated Docking of Loperamide in Human l-and d-Opioid Receptors. *Chem. Biol. Drug Des.* **71**(4), 328–335 (2008).

77) Marshall JJ, Miwa I. Kinetic difference between hydrolyses of gamma-cyclodextrin by human salivary and pancreatic alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta.* **661**(1), 142-147 (1981).