

# ケルセチン含有化粧品の最有効使用のための有機ナノコンポジット設計

大阪薬科大学

戸塚 裕一

We investigated the formulation design of nanocomposite structure for the effective cosmetic utilization of quercetin. Especially, we focused on the improvement of water solubility of quercetin (QUE) by preparing amorphous solid dispersion of ternary dispersed system with transglycosylated rutin (Rutin-G) and isoquercitrin (IQC). The solubility enhancement effect of IQC addition on QUE solubility was investigated. Evaporated particles (EVPs) were prepared by rotary evaporator with QUE, Rutin-G, and IQC. Differential scanning calorimetry and powder X-ray diffraction analysis indicated the amorphization of QUE and IQC by evaporation with Rutin-G. No characteristic diffraction peaks were observed in EVPs even after storage in sealing condition for 8 weeks at 40°C. The amount of dissolved QUE from the physical mixture was enhanced according to the increase of Rutin-G ratio because QUE was solubilized in the aggregated structure of Rutin-G, an associated nanocluster of Rutin-G, formed in proportion to Rutin-G concentration. The concentration of dissolved QUE from the EVP samples increased when IQC was added in QUE/Rutin-G binary formulation. The concentration of dissolved QUE from EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3, w/w/w) and QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5, w/w/w) was much higher than that with QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0, w/w/w). These results suggested that IQC inhibit the re-crystallization from an amorphous QUE in dissolution medium, resulted in the enhancement in stability of an amorphous QUE in the supersaturated state. In conclusion, the addition of IQC into QUE/Rutin-G binary system could obviously improve the water solubility of QUE by forming nanocomposite structure.

## 1. 緒言

化粧品への天然物の有効利用を考慮したとき、食品成分中には有用な化合物が多く存在する。そのうち、安価でかつ有効利用可能な化合物として、難水溶性ポリフェノールが挙げられる。ポリフェノールは抗酸化作用を有するものが多く、食品などから簡単に抽出可能である。ところが、ポリフェノールには水中への溶解度が低いものも多く、化粧水などの水系に溶解させる場合にはハンドリングに問題があり、界面活性剤などを用いて難水溶性のポリフェノールを溶解させることが必要となる。しかし、界面活性剤には細胞毒性などの問題から使用上限が設けられる。本研究の目的は、界面活性剤を用いることなく難水溶性のポリフェノールを可溶化させることであり、化粧品開発時に難水溶性化合物を水系に溶解させる新しい技術を提案することにある。

今回は難水溶性ポリフェノールのターゲットとして、野菜や果物中に存在する身近なフラボノイドであるケルセチン (quercetin : QUE) に着目した。ケルセチンには様々な効果が期待されており、抗炎症作用や抗酸化作用などがその代表的な効能と考えられている<sup>1)</sup>。そのうち、特に抗酸

化作用は化粧品開発において興味深い性質である。現在、化粧品などに使用されている紫外線吸収剤は、光毒性や累積刺激性などの問題や、物性および安全性の面での懸念があるものも存在するが、ケルセチンは、化粧品に有効でかつ食品加工にも使用できる、安全で効果的な紫外線防御物質として効果が期待される化合物である。ケルセチンは化粧品に配合して日焼け止め効果のある化粧品を作ることなどにも有用な化合物と考えられるが、前述したように、最大の問題点は水に極めて溶けにくい点にあり、その溶解度は、水中では0.4 µg/mLと報告されている<sup>2)</sup>。したがって、ケルセチン含有化粧品の開発を試みた場合には、安全な手法で水系に溶解させる技術が必要となる。

これまで、我々はRutinに対して酵素処理によって糖を付加した糖転移化合物(transglycosylated rutin : Rutin-G)を添加剤として用い、ナノコンポジット形成現象により、難水溶性のフラボノイドの溶解度を飛躍的に改善することを報告してきた<sup>3-9)</sup>。本研究ではRutin-Gに加え、QUEに単糖が付加されたイソケルセチン(isoquercitrin : IQC)をさらに処方中に添加することで複合粒子を作製し、更なる溶解性の向上を検討した。

## 2. 方法

### 2.1. 使用物質

ケルセチン水和物(QUE, Figure 1(a))、イソケルセチン(IQC, Figure 1(b))および $\alpha$ -グルコシルルチン(Rutin-G, Figure 1(c))は東洋精糖株式会社から供与いただいたものを使用した。用いたそれぞれの添加物の構造式および構造類似性に関してFigure 1に示した。



Evaluation of nanocomposite structure for the effective cosmetic utilization of quercetin

Yuichi Tozuka

Osaka University of Pharmaceutical Sciences

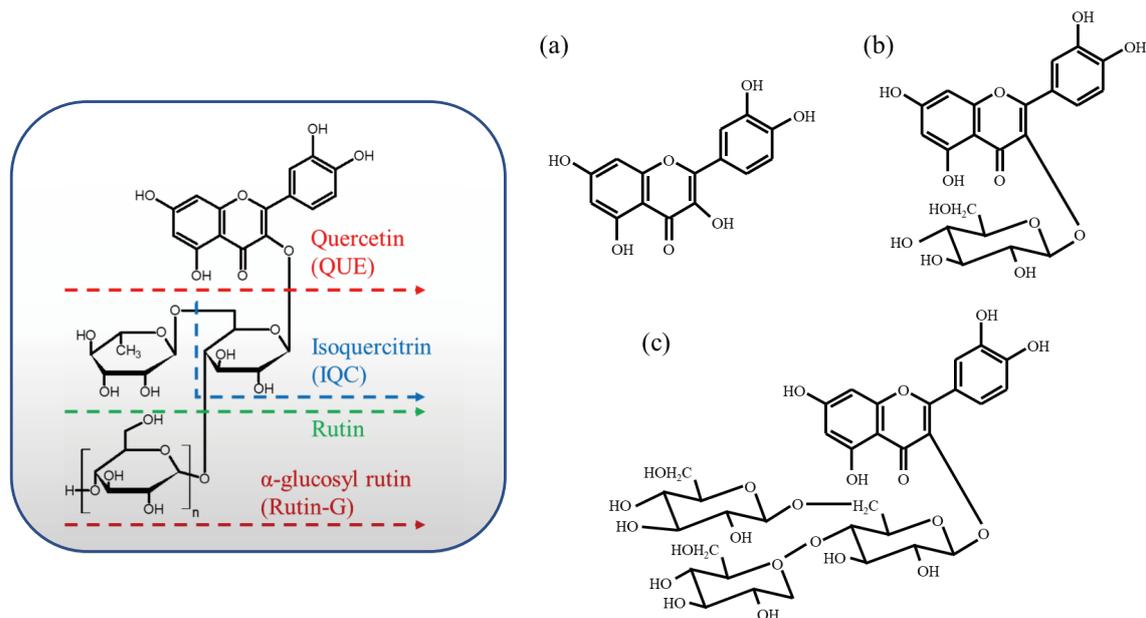
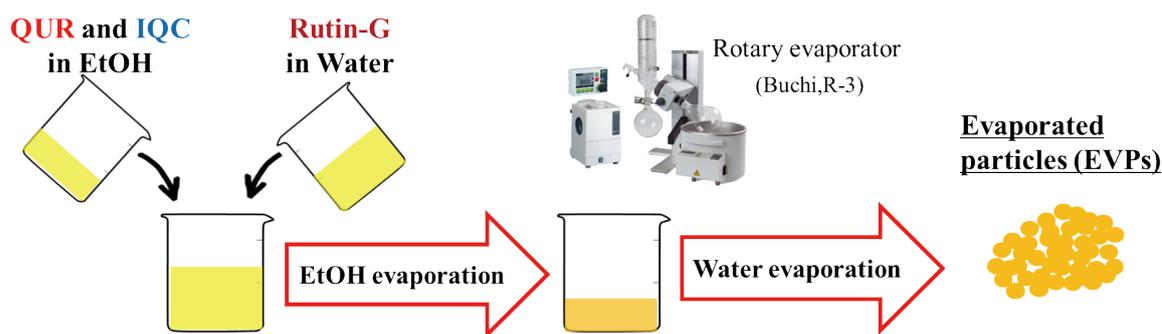


Figure 1 Chemical structure of (a) quercetin (QUE), (b) isoquercitrin (IQC), and (c)  $\alpha$ -glucosyl rutin



QUR/Rutin-G/IQC (w/w/w)	1/10/0	1/9/1	1/8/2	1/7/3	1/6/4	1/5/5	1/1/9
<b>QUR (mg)</b>				<b>200</b>			
<b>Rutin-G (mg)</b>	<b>2000</b>	<b>1800</b>	<b>1600</b>	<b>1400</b>	<b>1200</b>	<b>1000</b>	<b>200</b>
<b>IQC (mg)</b>	<b>0</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>600</b>	<b>800</b>	<b>1000</b>	<b>1800</b>
<b>Water (mL)</b>				<b>175</b>			
<b>EtOH (mL)</b>				<b>75</b>			

Figure 2 Preparation method of QUR involved evaporated samples (EVPs)

## 2.2. 溶媒留去物 (Evaporated samples: EVPs) の調製法

QUEとIQCは超音波照射下でエタノール溶媒中に完全に溶解させ、精製水中に添加剤(糖転移化合物:Rutin-G)を溶解させた後、混合させ、ロータリーエバポレーター(R-3;Buchi, Tokyo, Japan)を用いてエタノール溶媒を留去し(102 mbar, at 50°C)、その後(20 mbar, at 50°C)で全残留溶媒を留去することにより溶媒留去物を調製した。調製した試料中に含まれる化合物の存在割合はFigure 2に示すとおりである。

## 2.3. 溶媒留去物の形状観察

調製した試料の形状観察は走査型電子顕微鏡(Scanning electron microscopy:SEM:TM3030, HITACHI, Japan)を用いて行った。減圧下で白金蒸着させた試料を用いて、加速電圧:15kV条件で測定した。

## 2.4. 溶媒留去物の結晶性の評価

溶媒留去物の結晶性の評価に関しては、粉末X線回折測定(Powder X-ray diffraction:PXRD, Miniflex600 powder X-ray diffractometer, Rigaku Corporation,

Japan) および示差走査熱分析装置 (Differential scanning calorimetry : DSC : Diamond DSC, Perkin Elmer, USA) を用いて評価した。それぞれの測定条件は下記のとおりである。

PXRD : Scanning rate 4°/min, 2θ range of 5° - 35°.

DSC : 10 mg of sample powder was placed in aluminum open-pan. Heat from 35°C to 200°C at 20°C/min, a nitrogen flow rate of 40 mL/min.

### 2.5. 溶媒留去物からのケルセチンの溶解性の評価

溶解度試験は蒸留水中で 37°C 条件において振とう速度 100 s/min で行った。QUE 原末、物理的混合物 (PM) および調製した各複合粒子製剤 (QUE 量 20mg) (EVPs) に対して精製水 10mL を加え、1 時間および 4 時間振とう後 (37°C) における溶解度を HPLC (SPD-10 A, Shimadzu co., Ltd., Japan) により定量した。HPLC 測定条件は以下のとおりである。

Mobile phase : 0.1 (w/w) % acetic acid and acetonitrile (65 : 35 v/v), Flow rate : 1.0 mL/min, Column Temperature : 40°C, UV : 254 nm, Injection volume : 10 μL

## 3. 結果

### 3.1. 溶媒留去物の物理化学的特性 (QUE/Rutin-G/IQC : 3 成分混合系)

Figure 3 には、未処理の QUE、IQC、Rutin-G、および QUE/Rutin-G/IQC の 3 成分系の溶媒留去物についての SEM 写真を示す。未処理の QUE は針状の形状を示し、Rutin-G は球状の形状を示している。また、未処理の IQC は微細粒子が凝集している様子が観察された。調製したすべての溶媒留去物は、滑らかな表面を有する凝集塊を形成しており未処理の QUE の形状とは異なることが確認された。

DSC および PXRD 測定により溶媒留去物の結晶性について検討した結果を、それぞれ Figure 4 および Figure 5 に示した。DSC による分析の結果、未処理の QUE および IQC においては、結晶の融解に伴う吸熱ピークが観察されるのに対し、溶媒留去物においては、融解に伴う吸熱ピークが観察されなかった (Figure 4)。一方、PXRD 測定においても、未処理の QUE および IQC においては、結晶性の回折ピークが認められるのに対し、溶媒留去物においては、いずれの試料においても QUE および IQC の結晶由来

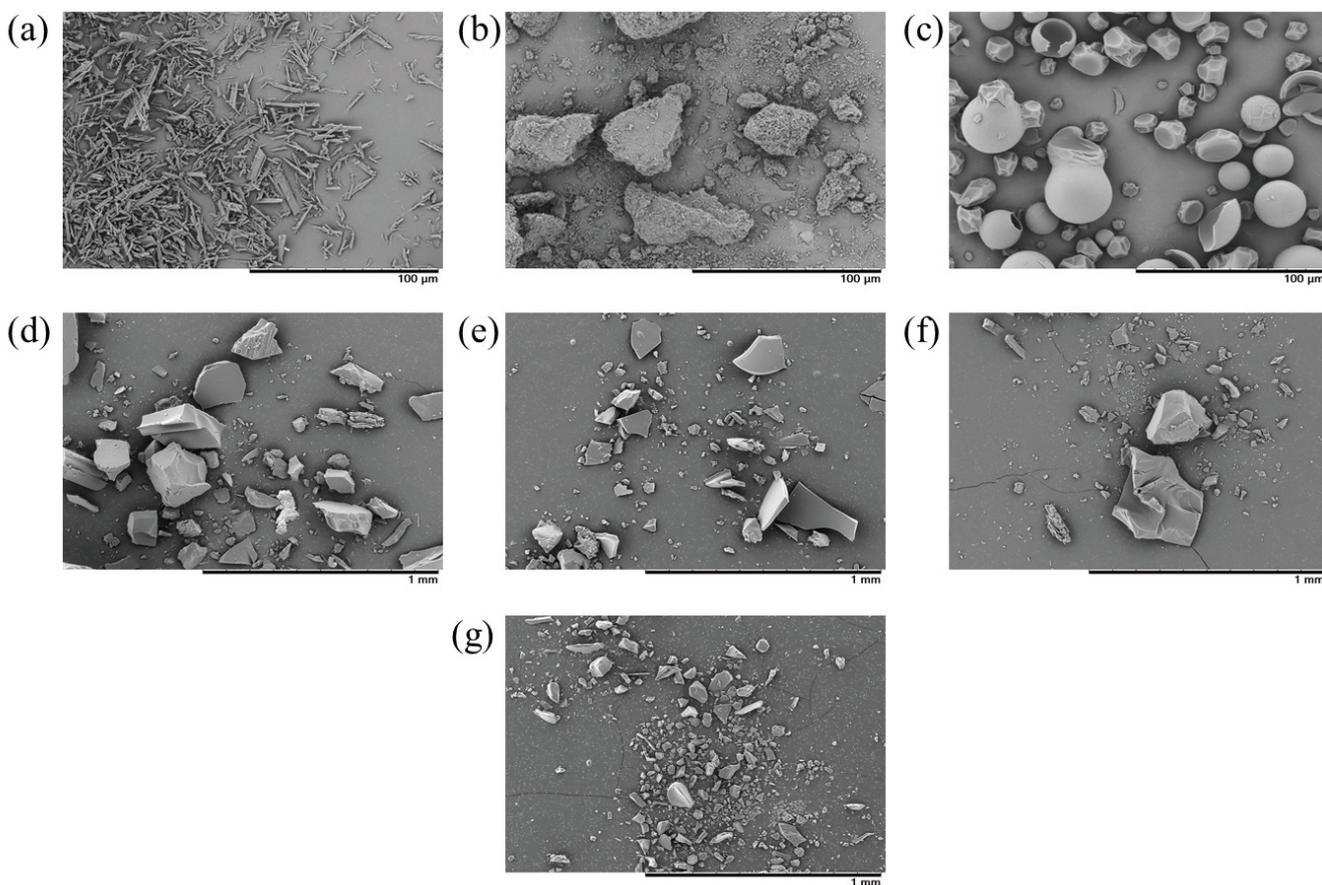


Figure 3 Scanning electron microscope (SEM) photographs of evaporated particles (EVPs). (a) untreated quercetin (QUE), (b) untreated isoquercitrin (IQC), (c) α-glucosyl rutin (Rutin-G), (d) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0), (e) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1), (f) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3) and (g) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)

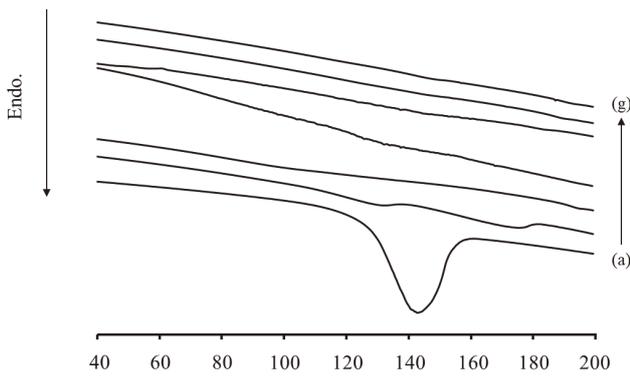


Figure 4 Differential scanning calorimetry (DSC) plots of evaporated particles (EVPs). (a) untreated quercetin (QUE), (b) untreated isoquercitrin (IQC), (c)  $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G), (d) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0), (e) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1), (f) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3) and (g) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)

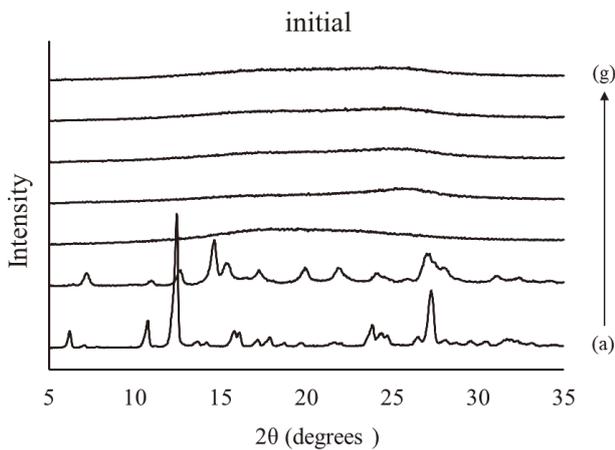


Figure 5 Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns of evaporated particles (EVPs) after preparation. (a) untreated quercetin (QUE), (b) untreated isoquercitrin (IQC), (c)  $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G), (d) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0), (e) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1), (f) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3) and (g) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)

の回折ピークは認められなかった (Figure 5)。したがって、DSCおよびPXRD測定の結果から、QUE/Rutin-G/IQCの3成分混合系の溶媒留去物において、QUEおよびIQCは非晶質状態で存在することが示唆され、非晶質の粒子として存在しているか、あるいは分子分散した状態で系中に存在することが考えられた。

Figure 6には閉鎖系で40℃・8週間保存した試料のPXRDパターンを示した。いずれの試料においてもQUEおよびIQCの結晶由来の回折ピークは認められず、ハローパターンを維持したまま、結晶析出は起こっていないことが示唆された。

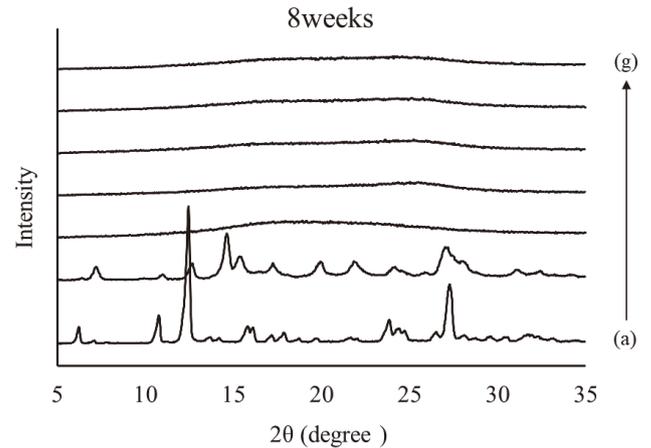


Figure 6 Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns of evaporated particles (EVPs) after storage in sealing condition for 8 weeks at 40°C. (a) untreated quercetin (QUE), (b) untreated isoquercitrin (IQC), (c)  $\alpha$ -glucosyl rutin (Rutin-G), (d) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0), (e) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1), (f) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3) and (g) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)

### 3. 2. 溶媒留去物からのケルセチンの見かけの溶解度の評価

物理的混合物におけるQUEの溶解度変化、および溶媒留去物におけるQUEの溶解度変化についての結果を、Figure 7およびFigure 8にそれぞれ示した。なお、ケルセチンの見かけの溶解度の評価は37℃の蒸留水中でのQUE/Rutin-G/IQCの3成分混合系からのQUEの溶解度変化の結果であり、今回の検討においては、in vitroの胃内条件、腸内条件や模擬消化管を用いた検討は行っていない。

物理的混合物は、一定割合のQUE/Rutin-G/IQCを単純にvortex mixerを用いて1分間混合したものを使用した。Figure 7の一番左のデータに示すように、37℃・水中での4時間振とう後のQUEの溶解度は、およそ1.4 $\mu$ g/mLであり、水への溶解度が極めて低いことが確認された。前述したように、QUEは極めて疎水性が高い化合物であり、消化管内での溶解度も極めて低いため、消化管からの吸収性も乏しいと考えられる。そのため、もし経口摂取したQUEを体内で有効に活用するためには、溶解性を改善してバイオアベイラビリティを改善する必要がある。Figure 7に示すように、37℃で4時間インキュベートしたときの物理的混合物におけるQUEの溶解度は、QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0)、QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1)、QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3)およびQUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)の値がそれぞれ、101.5  $\pm$  2.6, 69.1  $\pm$  2.6, 73.4  $\pm$  3.4 および 56.3  $\pm$  4.6  $\mu$ g/mLであり、Rutin-Gの存在によって、単純混合操作のみでも見かけの溶解度の上昇が認められた。

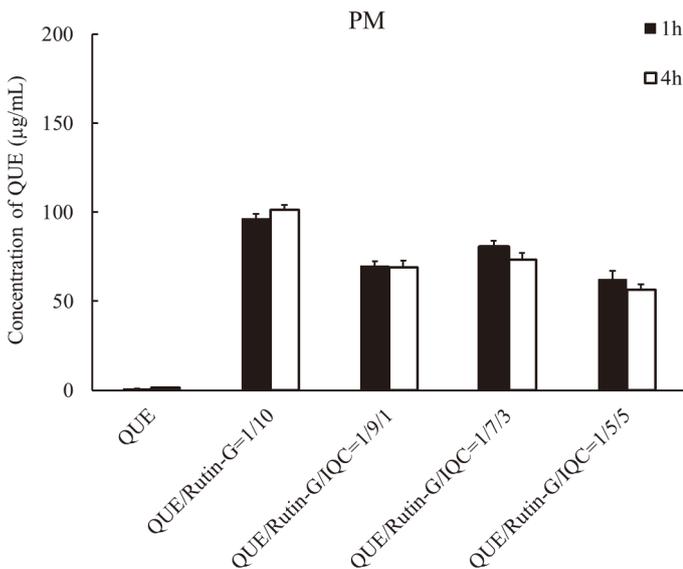


Figure 7 The solubility study of quercetin from physical mixtures (PMs) at 37°C in distilled water. Each data represents the mean ± S.E. (n=3). Solubility study was performed in distilled water at 37 degrees C under shaking at 100 s/min. Samples at a QUE concentration of 20mg were added in 10 mL distilled water.

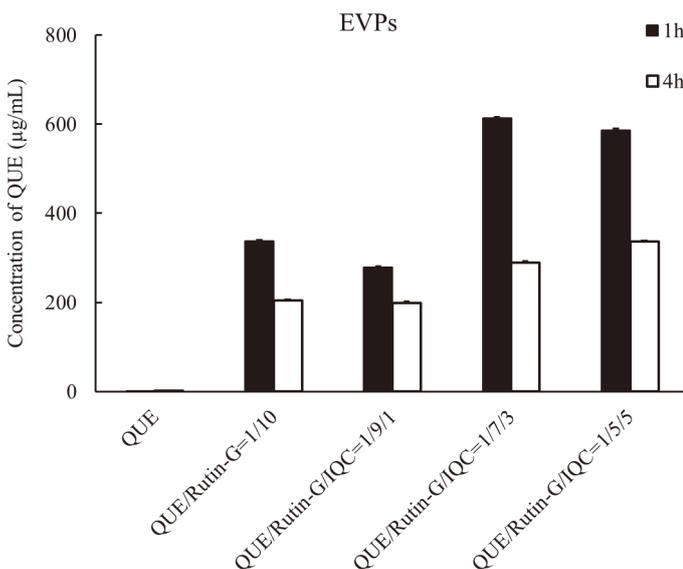


Figure 8 The solubility study of quercetin from evaporated particles (EVPs) at 37 degrees C in distilled water. Each data represents the mean ± S.E. (n=3). Solubility study was performed in distilled water at 37 degrees C under shaking at 100 s/min. Samples at a QUE concentration of 20 mg were added in 10 mL distilled water.

Figure 8には、QUE/Rutin-G/IQCの3成分混合系の溶媒留去物からのQUE見かけの溶解度変化の結果を示した。Figure 7と比較すると明らかのように、溶媒留去物からのQUE見かけの溶解度は、物理的混合物と比較して顕著な上昇が認められている。溶媒留去物からのQUE見かけの溶解度は、物理的混合物のケースとは異なり、Rutin-G

の存在割合との相関は認められなかった。また、溶媒留去物からのQUE見かけの溶解度は、QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3)、QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)においては、QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0)に比べて明らかに高い溶解度上昇効果が認められている。これらの結果は、非晶質状態からの溶出によってQUEが過飽和の状態で液中に存在していることに起因すると考えられた。

#### 4. 考察

非晶質状態は結晶状態と比較して、熱力学的なエネルギー状態が高く不安定であるので、薬物が保存中に非晶質状態で保存したい場合には、非晶質から結晶へと変化してしまう結晶転移が起こらないようにしなければならない。非晶質状態からの薬物の水中への溶出は、結晶状態と比較して溶出性に優れるため、保存中に結晶転移が起こることは溶出性が変化してしまう、すなわち水中で薬物が溶けにくくなってしまふことを意味している<sup>10)</sup>。本研究では、非晶質QUEの皮膚への塗布を想定した応用を目指しているため、QUEの非晶質状態の維持は大事な課題である。非晶質が結晶化する現象、すなわち非晶質状態の安定性に影響する因子としては、保存温度が大きな要因となり得る。非晶質状態にある物質が高温条件にさらされたときには、分子運動性が上がることにより結晶化が促進される<sup>11)</sup>。Figure 6に示すように、本研究においては40°C・8週間の保存においても、PXRD測定においてQUEの再結晶化に伴うピークは観察されておらず、溶媒留去法によって、比較的安定な非晶質固体分散体が調製できたと考えられる。しかしながら、非晶質固体分散体の安定性に関して、三成分目として添加したIQCが固相中でどのような効果をもたらしているのかは不明であり、今後の課題として検討が必要である。

本研究の最も興味深い点は、Figure 7およびFigure 8に示されるように、QUEを含有する溶媒留去物が非晶質固体分散体を形成し、QUEの見かけの溶解度を最大で数百倍まで上昇させることに成功している点である。この現象には2つの要因が影響しているものと考えられ、一つはRutin-Gが水中で形成するナノ集合体の存在であり、もう一つがIQCを含む非晶質固体分散体が過飽和状態を保持することが推察される。Figure 9に示すように、QUEはRutin-Gの添加量に応じて直線的に見かけの溶解度が向上する。我々はこの現象がRutin-Gが水中で5mg/mLの濃度でナノ集合体を形成することに関連することを報告しており<sup>3)</sup>、Figure 10に模式図として示すように、そのナノ集合体構造内に難水溶性の化合物を取り込むような形で、ナノコンポジット構造(<5nm)を形成することを報告している。したがって、Figure 7のQUE/Rutin-G/IQC(1/10/0)において、単純に物理的混合を行ったのみでQUEの溶解

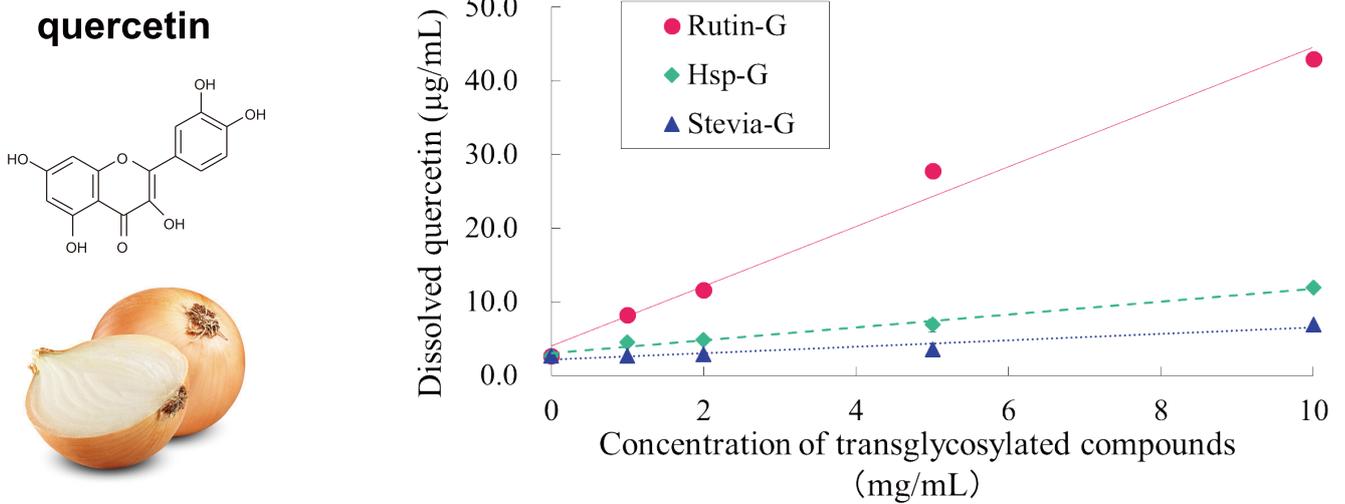


Figure 9 Relationship between the amount of quercetin dissolved and transglycosylated additives

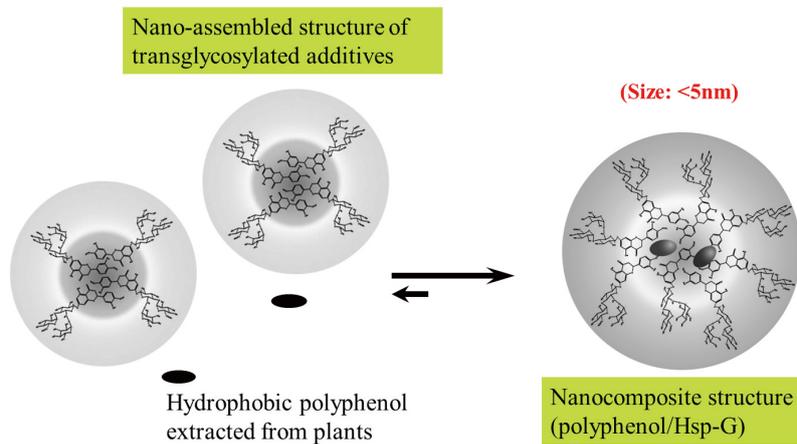


Figure 10 The plausible scheme of solubilization mechanism of poorly water soluble compound by a nanocomposite formation of Rutin-G

度が大きく向上した現象は、Rutin-Gの存在による水中でのナノコンポジットの形成に起因することが考えられる。

一方、Figure 4およびFigure 5のDSCおよびPXRDの結果から、QUEは溶媒留去物中では非晶質状態で存在していると推察される。非晶質状態は熱力学的に不安定であり、結晶のような長秩序の規則性を持つ構造もなく、結晶と比較して、水への高い溶解度と水への高いぬれ性を示すことが報告されている<sup>12)</sup>。しかしながら、非晶質からの薬物の溶解度は一旦上昇するが、水中での再結晶化により薬物溶解度は大きく減少することがしばしば認められる。この再結晶化は、水溶性高分子の添加によって抑制されることなども報告されている。Figure 8の結果に示すように、今回の我々の結果において、QUEの溶解度が大きく上昇した現象は、Rutin-Gのナノコンポジット形成と、非晶質状態からのQUEの過飽和状態がIQCの添加によって維持

されていることが関与していると推察される。この要因の一つは、Figure 1に示すように、IQCとRutin-Gの化学構造がQUEと類似していることにも起因すると考えられる。詳細な相互作用様式や、水中での3成分のそれぞれの状態は明らかにはなっていないが、3成分目に添加したIQCがQUEもしくはQUEとRutin-Gの両者と比較的強い相互作用で水中に存在し、結晶化の抑制に働いているのではないかと推察している。

## 5. 総括

今回の研究結果から、従来報告してきたナノコンポジット形成現象は、3成分目に結晶化を抑制するような化合物を添加することにより、難水溶性化合物の溶解度の向上と維持に関して発展的な成果を出せることが示唆された。QUEを化粧品中の紫外線防御物質として活用するために

は、Rutin-GとIQCを添加して、一旦全成分が溶解した状態から、溶媒留去して非晶質状態を形成させればよいことがわかり、また、今回の3つの成分は、それぞれが抗酸化作用を有する物質で、かつ食品添加剤であるため応用性が期待される結果が得られたと確信している。

なお、今回の助成により得られた成果はEnvironmental Control in Biology, 56, 161-165, 2018に掲載されており、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝します。

(引用文献)

- 1) A.W. Boots, G.R. Haenen, A., Bast, A., Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol.*, 585, 325-337, 2008.
- 2) Y. Zheng, I.S. Haworth, Z. Zuo, M.S.S. Chow, A.H.L. Chow, Physicochemical and Structural Characterization of Quercetin- $\beta$ -Cyclodextrin Complexes. *J. Pharm. Sci.* 94, 1079-1089, 2005.
- 3) Y. Tozuka, K. Higashi, T. Morita, M. Nishikawa, H. Uchiyama, J. Zhang, K. Moribe, K. Nishikawa, H. Takeuchi, K. Yamamoto, Transglycosylated Rutin-Specific Non-Surface-Active Nanostructure Affects Absorption Enhancement of Flurbiprofen, *Euro. J. Pharm. Biopharm.*, **82**, 120-126 (2012)
- 4) M. Fujimori, K. Kadota, K. Shimono, Y. Shirakawa, H. Sato, Y. Tozuka, Enhanced dissolution of quercetin by forming composite particles, *J. Food Eng.*, 149, 248-254, 2015
- 5) H. Sato, M. Fujimori, H. Suzuki, K. Kadota, Y. Shirakawa, S. Onoue, Y. Tozuka, Absorption improvement of tranilast by forming highly soluble nano-size composite structures associated with  $\alpha$ -glucosyl rutin, *Euro. J. Pharm. Biopharm.*, 92, 49-55, 2015
- 6) M. Fujimori, K. Kadota, K. Kato, Y. Seto, S. Onoue, H. Sato, H. Ueda, Y. Tozuka, Low hygroscopic spray-dried powders with trans-glycosylated food additives for enhanced solubility and oral bioavailability of a ipriflavone, *Food. Chem.*, 190, 1050-1055, 2016
- 7) K. Kadota, S. Otsu, M. Fujimori, H. Sato, Y. Tozuka, Soluble hydrolysis-resistant composite formulation of curcumin containing  $\alpha$ -glucosyl hesperidin and polyvinylpyrrolidone, *Adv. Powder Tech.*, 27, 442-447, 2016
- 8) K. Kadota, K. Semba, R. Shakudo, H. Sato, Y. Deki, Y. Shirakawa, Y. Tozuka, Inhibited photodegradation of highly-dispersed folic acid nanoparticles by antioxidant effect of transglycosylated rutin, *J. Agr. Food. Chem.*, 64, 3062-3069, 2016
- 9) K. Kadota, H. Arima, R. Shakudo, K. Semba, H. Uchiyama, K. Sugiyama, Y. Tozuka, Emergent composite structures following the amorphization of itraconazole with transglycosylated rutin by over-grinding, *Powder Technol.*, 323, 69-75, 2018
- 10) S.M. Wong, I.W. Kellaway, S. Murdan, Enhancement of the dissolution rate and oral absorption of a poorly water-soluble drug by formation of surfactant-containing microparticles, *Int. J. Pharm.* 317, 61-68, 2006.
- 11) B.C. Hancock, S.L. Shamblin, G. Zografi, Molecular Mobility of Amorphous Pharmaceutical Solids Below Their Glass Transition Temperatures. *Pharm. Res.*, 12, 799-806, 1995.
- 12) B.C. Hancock, M. Parks, What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res.*, 17, 397-404, 2000.