エゴマの機能性成分の効率的抽出方法ならびに

それらを高含有した中空カプセル作製法の開発

武井 孝行、吉田 昌弘

鹿児島大学大学院 理工学研究科 化学生命・化学工学専攻
〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-40
TEL：099-285-3283

要旨

ロスマリン酸は抗酸化作用のみならず抗動脈硬化作用を有することが示唆されている物質である。エゴマの葉からロスマリン酸を抽出し、それを機能性食品として摂取できれば、動脈硬化の予防に有効であると考える。しかし、エゴマ中のその成分が特定されたのは最近のことであり、その効率的な抽出法は未だ確立されていない。また、ロスマリン酸は酸化しやすく、機能性食品として摂取するためには、それをカプセルに封入し、その酸化を防止することが求められる。そこで本研究ではまず、ロスマリン酸の抽出溶媒としてエタノールが有効であることを示した。さらに、カルナウバワックスの温度による相転移を利用したカプセル調製法により、効率よくカプセル内にロスマリン酸を包括でき、さらにそのカプセルはロスマリン酸の酸化防止に効果があることを証明した。

1. 緒言

日本は超高齢化社会を迎えようとしている。鹿児島市では、2040 年までに、おおよそ 10 人中 4 人が高齢者になる予測である。その高齢化に伴い、動脈硬化症の増加が見込まれる。日本人の死因第 1 位は悪性新生物（いわゆる“がん”）であるが、動脈硬化が原因とされる心疾患、脳血管疾患の合計数はがんと同水準にある。つまり、動脈硬化は、がんとともにその予防が切望されている疾患である。ロスマリン酸は抗酸化作用のみならず抗動脈硬化作用を有することが示唆されている物質である（Fig. 1）[1]。エゴマの葉には、そのロスマリン酸が豊富に含まれている[2,3]。したがって、エゴマの葉からその機能性成分を抽出し、それを機能性食品として摂取できれば、動脈硬化の予防に有効である。しかし、エゴマ中のその成分が特定されたのは最近のことであり、その効率的な抽出法は未だ確立されていない。また、ロスマリン酸は酸化しやすく、機能性食品として摂取するためには、それらをカプセルに封入し、その酸化を防止することが求められる。そこで本研究では、(i) エゴマから効率良くロスマリン酸を抽出する手法の確立、および (ii)ロスマリン酸を効率よくカプセルに封入できるカプセル調製法の開発を目的とする。

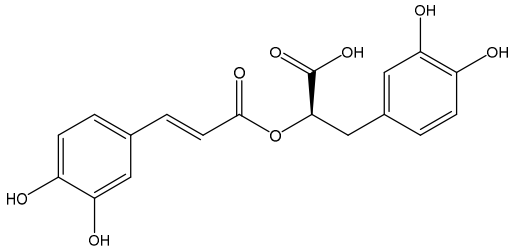


Fig. 1 Chemical structure of rosmarinic acid.

2 実験

2.1 エゴマ葉からのロスマリン酸の抽出

茎部分を取り除いたエゴマ葉を、70%、80%、90%、100%(v/v)のエタノール水溶液に添加し混合した後、高速ホモジナイザーを用いて、10,000 rpm　3 分間撹拌することによってエゴマ葉を摩砕した。摩砕したエゴマ葉を遠心分離し、上清液を回収し孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過した。ろ過した液をエゴマ抽出液とし、液体クロマトグラフ（HPLC）にてロスマリン酸の検出を行った。

2.2 ロスマリン酸包括カプセルの調製

カゼインカプセルの作製（以降、図表では“Method 1”と表記）

0.85 g のカゼインを 1.25 g の 0.5M NaOH 水溶液に溶解した後、7.65 g の水、5 mg のロスマリン酸を添加し水相を調製した（Fig. 2a）。また、65.5 g の n-ヘキサンに 0.66 g の界面活性剤である span 80 を溶解させることで有機相を調製した。これらを 200 ml 容ジャケット付き三口セパラブルフラスコ内において、200 rpm、25℃の条件で 3 分間撹拌を行うことによって W/O（water-in-oil）エマルションを形成した。その W/O エマルションに、添加相として 25%(w/w) グルタルアルデヒド水溶液を添加し、200 rpm、25 ℃で 1 時間撹拌した。カプセルを回収し、蒸留水で洗浄した後、凍結乾燥を 24 時間行った。

液中乾燥法によるカルナウバワックスカプセル作製（以降、図表では“Method 2”と表記）

1.72 g のカルナウバワックス、17.17 g のトルエン、0.17 g の span 80 を混合し、50℃に熱することによってカルナウバワックスをトルエンに溶解させ有機相を調製した（Fig. 2b）。1.72 g の蒸留水に 5 mg のロスマリン酸を添加し、50℃に熱し内水相とした。300 g の蒸留水と界面活性剤である 0.9 g の Tween 80 を混合し、外水相とした。内水相と有機相を混合し、高速ホモジナイザーを用い、5000 rpm、90℃の条件で 3 分間撹拌することによって、W/O エマルションを調製した。その W/O エマルションを外水相に添加することによって、W/O/W（water-in-oil-in-water）エマルションを形成した。これを 500 ml 容ジャケット付きセパラブルフラスコ内において 300 rpm、60℃の条件で 3 時間撹拌を行った。なお、トルエン除去のために減圧下で撹拌した。カプセルを回収し、凍結乾燥を 24 時間行った。

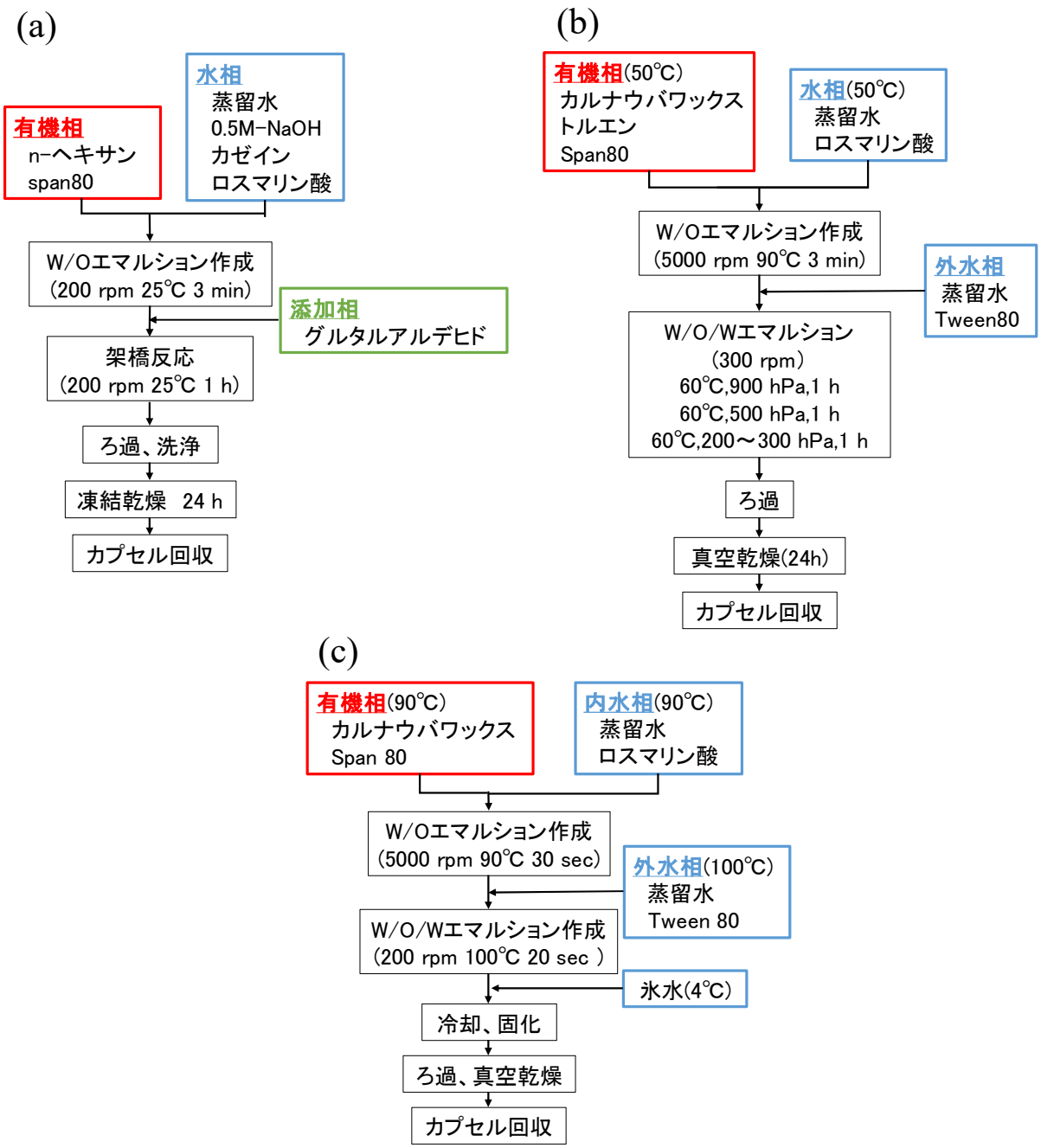


Fig. 2 Procedure to prepare casein capsules in Method 1 (a), carnauba wax capsule in Method 2 (b) and Method 3 (c).

相転移を利用したカルナウバワックスカプセル作製（以降、図表では“Method 3”と表記）

6.64 g のカルナウバワックスと 0.07 g の span 80 を混合し、90℃に熱することによって有機相を調製した（Fig. 2c）。2 g の蒸留水と 2 mg のロスマリン酸を混合し、90℃に熱し内水相とした。これらを混合し高速ホモジナイザーを用いて、5000 rpm、90℃の条件で 30 秒間撹拌することによって W/O エマルションを作製した。その W/O エマルションを 150 g の蒸留水および 1.5 g の tween 80 からなる 100℃に熱した外水相に添加し、200 rpm で 20 秒間撹拌し、

W/O/W エマルションを作製した。その W/O/W エマルションに氷水を添加し、カルナウバワックスを固化させた。カプセルを回収し、凍結乾燥を 24 時間行った。

2.3 ロスマリン酸の内包効率測定

調製したカプセル 0.25 g を測りとり、すり鉢を用いて粉砕した。それにエタノールを加え、冷却しながら、2 時間超音波を照射し、エタノール中にロスマリン酸を抽出した。抽出液中のロスマリン酸濃度を HPLC にて測定した。

2.4 カプセル化されたロスマリン酸の抗酸化活性の測定

ABTS（2-2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)）水溶液 0.5 mL と 2.45 mM の過硫酸カリウム水溶液 0.5 mL を混合し、常温、暗所で 12 時間反応させることで ABTS ラジカル水溶液を調製した。酸化処理は、その ABTS ラジカル水溶液 0.8 mL に対しカプセルまたはロスマリン酸水溶液を添加し 10 分間静置することで行った。ロスマリン酸の抗酸化活性は以下の手順で測定した。ABTS ラジカル水溶液 1 ml に対し、カプセル抽出液または未包括ロスマリン酸水溶液 10 μL を添加し、5 分後に吸光度の減少量を測定した。

3 結果と考察

3.1 エゴマ葉からのロスマリン酸の抽出

ロスマリン酸は水に難溶であることが報告されているため、エゴマ葉からの抽出溶媒としてエタノールと水の混合液を選択した。統計的有意差はないものの、80%(v/v) エタノール水溶液が最もロスマリン酸の抽出能力が高い傾向があった（Fig. 3）。

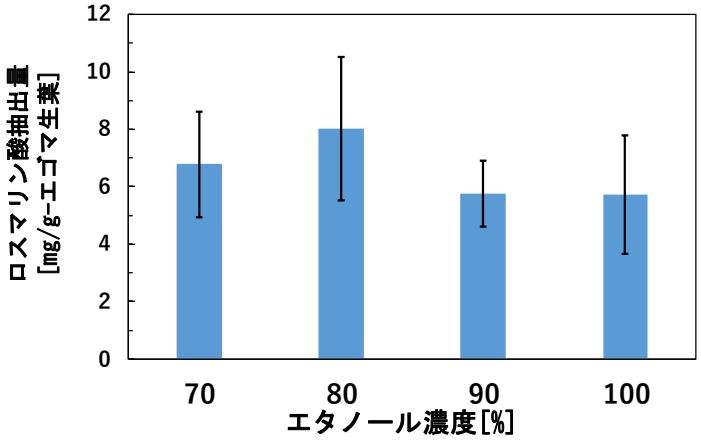


Fig. 3 Relationship between ethanol concentration and amount of rosmarinic acid extracted from perilla leaves.

3.2 ロスマリン酸内包カプセル調製

はじめに、可食性タンパク質であるカゼインを壁材としたカプセル内部にロスマリン酸を包括することにした（Fig. 2a）。本カプセル作製法では、ヘキサン中に分散されたロスマリン

酸を含むカゼイン水溶液液滴がグルタルアルデヒドにより固化されることにより、カプセルを調製できると考えた。実際に、カプセルを調製することができた（Fig. 4a）。しかし、ほとんどのロスマリン酸をカプセル内に包括することができなかった（Table 1）。本法では、調製直後のカプセル内部に未反応のグルタルアルデヒドが残留するため、その除去のために多量の水でカプセルを洗浄しなければならない。ロスマリン酸をほとんど包括できなかった理由は、その洗浄操作によりロスマリン酸がカプセル外に放出されたためであると考えられる。

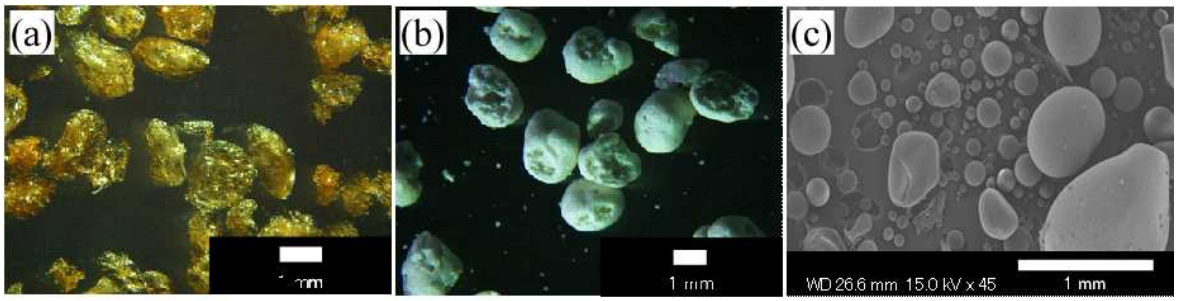


Fig. 4 Capsules prepared in Method 1 (a), Method 2 (b) and Method 3 (c).

Table 1 Encapsulation efficiency of rosmarinic acid and diameter of capsules.

	Method 1	Method 2	Method 3
Encapsulation efficiency (%)	< 0.1	0.1	70.6
Diameter of capsules	1.47 ± 0.32 mm	2.06 ± 0.40 mm	112 ± 116 μm

次に液中乾燥法によってカルナウバワックスカプセルを作製することを試みた（Fig. 2b）。カルナウバワックスは、カルナウバヤシの葉から抽出される、融点が約 80℃の蝋である。その主成分は飽和脂肪酸であり、人体への悪影響が少ないと考えられることからカプセル材料として採用した。本カプセル作製法では、有機相中のトルエンを蒸発除去することにより、カルナウバワックスが析出し、それが球状のカプセルになることを期待した。実際に、カプセルを調製することができた（Fig. 4b）。しかし、本法においても、ほとんどのロスマリン酸をカプセル内に包括することができなかった（Table 1）。これは、トルエンを蒸発除去する前に、ロスマリン酸がトルエンに分配し、それが外水相に移行した結果であると考えられる。

最後に、カルナウバワックスの温度による相転移を利用してカプセルを作製した。具体的には、暖めることで液体にしたカルナウバワックスを温水中に分散させ、それを冷却することにより固化させることでカプセルを作製した（Fig. 4c）。前法と違って、本法ではトルエンを使用しておらず、それにより高効率でロスマリン酸を包括できると期待した。実際に高効率（約 71%）でロスマリン酸を包括できた（Table 1）。さらに、そのカプセルを酸化処理したところ、未包括のロスマリン酸よりも酸化を防止できた（Fig. 5）。これは、カルナウバワックスが酸化物質のカプセル内部への透過を防いだためであると考える。

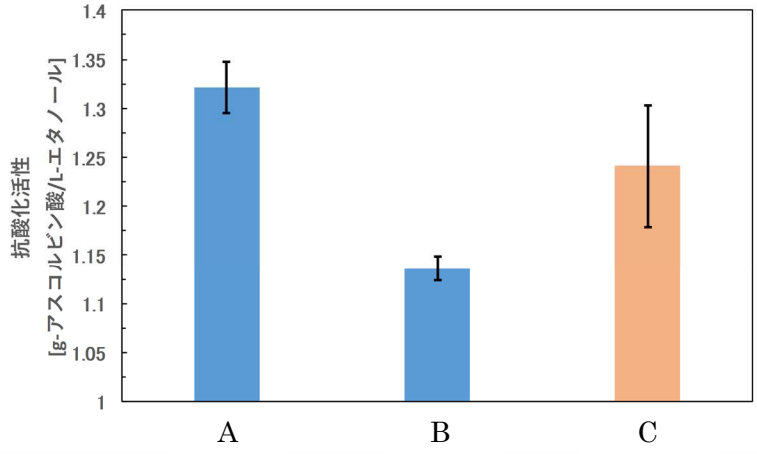


Fig. 5 Antioxidant activities of non-encapsulated rosmarinic acid before oxidative treatment (A), after oxidative treatment (B) and encapsulated in Method 3 after oxidative treatment (C).

4 結論

本研究では、エゴマから効率良くロスマリン酸を抽出する方法を見出した。また、カルナウバワックスの温度による相転移を利用してカプセル調製法により、効率よくカプセル内にロスマリン酸を包括でき、さらにそのカプセルはロスマリン酸の酸化防止に効果があることを証明した。

5 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いたサンケイ科学振興財団に厚く感謝申し上げます。

6 引用文献

1. Petersen M. and Simmonds M. S. J.: Rosmarinic acid, Phytochemistry, 62, 121-125 (2003).
2. 鈴木 寿、今泉 茂巳: 地域資源を活用した食品加工技術に関する研究 －地域特産品(エゴマ)の有効利用に関する研究(第2報)－, 岐阜県産業技術センター研究報告, No.7 (2013).
3. 及川 和志、遠山 良: エゴマ種子に含まれる栄養成分および機能性成分, 岩手県工業技術センター研究報, No.15 (2008).

Efficient method for extracting rosmarinic acid and fabrication of capsule with high content of the ingredient

Takayuki Takei, Masahiro Yoshida

Department of Chemical Engineering, Graduate school of Science and Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

TEL: +81-99-285-3283

Abstract

Rosmarinic acid is suggested to have anti-oxidant and anti-atherogenic activities. If rosmarinic acid is extracted from perilla leaves with high efficiency, the ingredient can be used in the prevention of arteriosclerosis. However, efficient method for extracting rosmarinic acid have not been developed yet. Moreover, because rosmarinic acid is susceptible to oxidation, it is better to be enclosed in capsules to prevent the oxidation. Here, we showed that (i) ethanol was adequate solvent for extracting rosmarinic acid from perilla leaves and (ii) carnauba wax was suitable as a capsule shell material to achieve high encapsulation efficiency. Furthermore, it was showed that the carnauba wax capsules could prevent oxidation of enclosed rosmarinic acid.