

報告番号	※ 甲 第11028号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目

Extraction of carotenoids from natural products and nanoparticle formation using supercritical fluid

(超臨界流体を用いた天然物からのカロテノイド抽出およびナノ粒子調製)

氏 名 根路銘葉月

論 文 内 容 の 要 旨

1. 緒言

現在、消費者の健康に対する意識の向上に伴い、機能性食品の需要が増加しており、食品産業では安心安全であること、迅速に効率よく効果を表すことが求められている。しかし、機能性成分の抽出では有機溶媒が用いられることが多く、抽出溶媒の毒性や残留、抽出工程での劣化、得られた製品の吸収率の低さなどが懸念されている。

本研究では機能性成分として強い抗酸化作用を有するカロテノイドに着目した。カロテノイドは緑黄色野菜に多く含まれる脂溶性植物色素で、lycopeneや β -caroteneなどが良く知られている。これらのカロテノイドは強力な抗酸化作用や抗炎症作用、抗がん作用など、多くの機能性を有することから、高品質な天然着色料や健康補助食品として注目されている。しかし、多くのカロテノイドは植物から有機溶媒で抽出されており、さらに疎水性のため、体内に吸収されにくいという点が懸念されている。

それらの背景から、安心安全な手法での機能性成分の抽出および吸収率向上を目指した微粒子化が求められており、高圧流体を溶媒として用いることでそのプロセスが達成できるのではないかと考えた。さらに、抽出および微粒子化を連続プロセス化することで目的成分の抽出・濃縮・吸収率向上・液体への分散性向上・輸送性や保存性の向上を可能にすると考えた。使用する高圧流体としては、無害であり、大気圧下で容易に揮発分離が可能、有機溶媒と類似の性質を有するものとして、超臨界二酸化炭素(SC-CO₂)に着目した。SC-CO₂はグリーン溶媒として注目を集めている高圧流体であり、従来抽出によく用いられるヘキサンと類似の性質を有するため、これまでに無極性成分の抽出が多く行われている。さらに近年では、SC-CO₂を良溶媒・貧溶媒として用いた粒子製造法も注目されている。

SC-CO₂を用いた抽出・微粒子化の連続プロセスを達成するためには、抽出および微粒子化のそれぞれのデータが必要となる。本研究では(1) SC-CO₂を用いた天然物からのカロテノイド抽出の挙動把握および最適条件決定、(2) SC-CO₂を用いたカロテノイドの微粒子製造における粒子形状および粒子径の把握、ナノ粒子を得るための最適条件決定を主な目的として研究を遂行した。

2. SC-CO₂を用いた天然物からのカロテノイド抽出

まず、SC-CO₂を用いてガックフルーツ(*Momordica cochinchinensis*)からの lycopene と β -carotene の抽出を行った。ガックフルーツは東南アジア原産の果実で、カロテノイドと不飽和脂肪酸をバランスよく豊富に含むことで着目されており、ジュースやサプリメントとしても用いられている。本研究では半流通式の SC-CO₂ 抽出装置を用いて、様々な温度条件(50-90 °C)、圧力条件(20-40 MPa)でのカロテノイド抽出を検討した。またクロロホルムを抽出溶媒としたソックスレー抽出を行い、SC-CO₂ 抽出との比較も行った。SC-CO₂ 抽出の結果、操作条件によって lycopene と β -carotene の含有量は変化したが、90 °C/40 MPa の条件下で抽出を行うことで、最も高い収率が得られた。しかし、これらの抽出物はカロテノイドに加えて油脂を含有していたため、抽出物を連続的に微粒子化処理することは難しいことが分かった。このことから、天然物を対象とした有効成分の抽出および微粒子化の連続プロセスでは、抽出物から油脂を除去し、有効成分を濃縮させる必要があることが示唆された。今後の展望としては、SC-CO₂ 抽出後、異なる圧力を使用した二段減圧による油とカロテノイドの分離や、分取クロマトグラフィーを用いたカロテノイドの精製の検討、ポリマーやシクロデキストリンなどの添加物を用いた、油脂や脂溶性物質のコーティングの検討を行うことで、抽出物の粒子製造を試みたい。

また、スパイスサフラン(*Crocus sativus* L)からのカロテノイドを含む色素や精油成分、その他の有効成分の抽出も検討した。スパイスサフランは食品の着色料や染色剤として広く用いられてきたが、近年ではサフランに含まれる色素成分が有するアルツハイマー病や大腸ガンなどの予防・抑制効果が注目されている。しかし、ISO3632 で定義された低グレードのサフランは、色味の悪さや香りの弱さのため商品にならず、含有される有効成分の抽出も確立されていないことから、その多くが廃棄されている。また、サフランの代表的な有効成分である picrocrocin, safranal, HTCC(4-hydroxy-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde), crocin, および crocetin などの成分は、化学的・酵素的反応性や熱不安定性を有している。本研究では、このような有効成分を効率的に抽出する最適抽出条件を決定するために、様々な温度条件(40-80 °C)、圧力条件(20-40 MPa)、溶媒種(SC-CO₂+水, SC-CO₂+メタノール, 水, メタノール)での抽出を検討した。SC-CO₂ 抽出に助溶媒(エントレーナー)として水を用いることで、親油性分である safranal だけでなく、水溶性成分の picrocrocin, HTCC, クロシンも抽出することができた。温度圧力条件の依存性試験では、80 °C/30, 40 MPa において、水やメタノールと同等またはそれ以上の picrocrocin, safranal, HTCC, crocin, および crocin 分解物を抽出することができた。また、これらの抽出物には SC-CO₂ 抽出の際にエントレーナーとして添加した水が含まれているため、スプレードライ法やスプレードライ法に SC-CO₂ を添加噴霧する手法を適用することで抽出物の微粒子化ができると考えられる。

3. SC-CO₂を用いたカロテノイドの微粒子製造

SC-CO₂を用いた β -carotene のナノ粒子調製において、様々な操作条件が粒子形成に与える影響を検討し、ナノ粒子を得るための条件決定を行った。 β -carotene をヘキサン、酢酸エチル、ジクロロメタン(DCM)、ジメチルホルムアミド(DMF)に 0.5 mg/ml で溶解し、温度圧力条件を 40 °C、12 MPa、CO₂ および溶液流量を 20, 0.5 ml/min に設定して超臨界貧溶媒法を用いて微粒子化を行い、適した溶媒を検討した。実験の結果、ヘキサン、DCM、DMF ではより大きなブロックプレート状粒子が得られ、酢酸エチルを用いた系のみで不定形ナノ粒子を得ることができた。得られた粒子の形状やサイズは溶媒の粘性や沸点、カロテノイドに対する溶解度、SC-CO₂ に対する溶解度の差により変化したと考えられる。次に、ナノ粒子が得られた酢酸エチルを用いて、操作温度・圧力条件の最適化を行った。温度圧力依存性試験の条件範囲(40-60 °C、8-12 MPa)では低温および高圧条件で、中位径 138 nm の粒子が得られた。温度圧力によって粒子径が変化する要因

として、SC-CO₂の密度変化が親密に関与していると考えられる。また、密度が高い条件では、SC-CO₂と有機溶媒の溶解度が高いことから、有機溶媒とSC-CO₂が接触した際に、短時間で貧溶媒化が起き、SC-CO₂によってカロテノイド粒子から有機溶媒が急速に除去されるため、粒子径が小さくなったと考えられる。

さらに、カロテノイドの生体への吸収能向上、および水溶性付加を図った lycopene およびシクロデキストリン包接複合体のナノ粒子の形成実験では、温度・圧力・CO₂流量・溶液流量の最適化を検討した。lycopene とβ-シクロデキストリンを溶解する溶媒としてジメチルホルムアミド(DMF)を用い、モル比を1:1として溶液を調整した。操作は40-50°C、10-14 MPa、CO₂および溶液流量を15-25、0.25-0.75 ml/minの範囲で行った。結果として、操作温度50°C、圧力14 MPa、CO₂および溶液流量をそれぞれ25、0.25 ml/minに設定することで中位径50 nmの球形ナノ粒子を得ることに成功した。

最後にカロテノイドの粒子形成において微粒子化槽が与える影響を検討した。通常微粒子化槽には円柱型の槽が用いられるが、チューブ型の微粒子化槽に変更することで、粒子形状や粒子径にどのような影響が出るのかを確認した。そこで、β-caroteneの酢酸エチル溶液を微粒子化溶液として調整し、CO₂流量(0.31-1.26 kg/h)及び溶液流量(0.25-1.0 mL/min)の最適条件を検討した。その結果、低CO₂流量・高溶液流量では不規則な形状のマイクロ粒子(14.05-22.59 μm)が得られた。一方、高CO₂流量および低溶液流量(1.26 kg/h, 0.25 mL/min)に設定することで220 nmの球形ナノ粒子の調整に成功した。

4. 結言

本研究では、SC-CO₂を用いて天然物からの機能性成分の抽出および抽出物の微粒子化を行うと同時に、それらの連続プロセス化を検討した。連続プロセス化を達成するためには、抽出と微粒子化のそれぞれのデータの構築が必要となるため、今回はカロテノイドを対象として抽出と微粒子化を検討し、抽出挙動や微粒子調製傾向の把握、および最適処理条件の決定を行った。

抽出のセッションでは、SC-CO₂を抽出溶媒として用いることでガックフルーツとスパイスサフランからの機能性成分の抽出に成功した。ガックフルーツからは lycopene およびβ-carotene、スパイスサフランからは picrocrocin, safranal, HTCC, crocin, および crocetin が抽出され、温度、圧力、溶媒種が抽出量に与える影響を検討し、最適抽出条件を決定した。また、微粉化のセッションでは、超臨界貧溶媒法を用いて微粒子化処理することで、β-carotene, lycopene/β-シクロデキストリン複合体のナノ粒子の調整に成功した。乾燥状態でのカロテノイドのナノ粒子化は世界でもまだ報告の無い事例であり、極めて新規性の高い研究成果を得ることができた。また、ナノ粒子調製において、有機溶媒種、温度、圧力、流量および微粒子化槽が粒子形成に与える影響を検討し、最適操作条件を決定した。

また、抽出物中の目的物質の濃縮・精製を行い、油脂や水分の除去を行うことが連続プロセス化を達成するための第一課題であることを見出した。

超臨界二酸化炭素を用いた天然物からの機能性成分の抽出および微粒子化の連続プロセス化は、本研究の最終目標である。超臨界二酸化炭素を溶媒として抽出・微粒子化に用いることで、有機溶媒に頼ることなく、安心・安全かつ生物学的利用能の向上が期待できる。また、効率の良い機能性成分の加工法を確立することで、得られた機能性成分を、食品分野だけではなく、製薬の分野にも展開できることが期待できる。