

**Separation of functional ingredients from  
*Angelica furcijuga* using green solvent and  
empirical research on cultivation**

グリーン溶媒を用いたヒュウガトウキ  
(*Angelica furcijuga*) からの機能性成分の分離  
及び栽培に関する実証研究

**Yuriko HOSHINO**

星野 有理子

**Separation of functional ingredients from  
*Angelica furcijuga* using green solvent and  
empirical research on cultivation**

グリーン溶媒を用いたヒュウガトウキ  
(*Angelica furcijuga*) からの機能性成分の分離  
及び栽培に関する実証研究

**March 2022**

**2022年3月**

**Yuriko HOSHINO**

星野有理子

**Department of Materials Process Engineering  
Graduate School of Engineering Nagoya University**

名古屋大学大学院工学研究科

物質プロセス工学専攻

# 目次

## 第1章

### 序論と目的

- 1.1 生薬の生産動態
- 1.2 トウキ（当帰）について
  - 1.2.1 トウキの種類
  - 1.2.2 わが国のトウキの生産状況
- 1.3 グリーンケミストリーに則った生薬の抽出技術の必要性
  - 1.3.1 グリーンケミストリーの概説
  - 1.3.2 持続可能な開発目標との関連性
  - 1.3.3 グリーン溶媒を用いた抽出技術
    - 1.3.3.1 超臨界二酸化炭素（SC-CO<sub>2</sub>）の特性
- 1.4 本研究の目的

## 第2章

### 生薬「ヒュウガトウキ(*Angelica Furcijuga*)」の栽培に関する実証実験

- 2.1 はじめに
- 2.2 ヒュウガトウキの特徴及び臨床的作用
- 2.3 農作物を通じた地域活性化への取り組み
  - 2.3.1 ヒュウガトウキの栽培準備
  - 2.3.2 試験栽培結果
  - 2.3.3 ヒュウガトウキの搾汁を用いた商品への応用例
- 2.4 小括

## 第3章

### ヒュウガトウキからの機能性成分の抽出に関する有機溶媒抽出法を用いた予備的実験

- 3.1 はじめに
- 3.2 目的とした機能性成分
  - 3.2.1 ケンフェロール (Kaempferol)

- 3.2.2 フェルラ酸 (Ferulic acids)
- 3.2.3 リグスチリド (Ligustilide)
- 3.2.4 ブチリデンフタライド (Butylidenephthalide)
- 3.3 実験方法
  - 3.3.1 試料
    - 3.3.1.1 試料の計測
    - 3.3.1.2 試料の前処理
  - 3.3.2 有機溶媒の選定
  - 3.3.3 高速液体クロマトグラフィーを用いた機能性成分の定量法
- 3.4 結果と考察
  - 3.4.1 葉に含有される機能性成分
    - 3.4.1.1 ケンフェロール (Kaempferol)
    - 3.4.1.2 フェルラ酸 (Ferulic acids)
    - 3.4.1.3 リグスチリド (Ligustilide)
    - 3.4.1.4 ブチリデンフタライド (Butylidenephthalide)
  - 3.4.2 根に含有される目的成分
    - 3.4.2.1 ケンフェロール (Kaempferol)
    - 3.4.2.2 フェルラ酸 (Ferulic acids)
    - 3.4.2.3 リグスチリド (Ligustilide)
    - 3.4.2.4 ブチリデンフタライド (Butylidenephthalide)
- 3.5 小括

## 第4章

### 天然物からの精油抽出のための超臨界二酸化炭素抽出に係る段階的な圧力制御アプローチの影響

- 4.1 はじめに
- 4.2 実験方法
  - 4.2.1 試料と化学材料
  - 4.2.2 精油抽出実験
    - 4.2.2.1 水蒸気蒸留法
    - 4.2.2.2 半連続超臨界二酸化炭素抽出
    - 4.2.2.3 段階的な圧力制御による超臨界二酸化炭素抽出
    - 4.2.2.4 精油のガスクロマトグラフィー分析

## 4.3 結果と考察

### 4.3.1 精油成分

### 4.3.2 半連続超臨界二酸化炭素抽出による予備的研究

### 4.3.3 段階的な圧力制御による超臨界二酸化炭素抽出

#### 4.3.3.1 抽出に及ぼす保持時間の影響

#### 4.3.3.2 抽出に及ぼす圧力と温度の影響

#### 4.3.3.3 バッチごとの抽出最適条件

#### 4.3.3.4 半連続超臨界二酸化炭素抽出法と段階的なある力制御による超臨界二酸化炭素抽出法の比較

## 4.4 小括

## 第5章

### 超臨界二酸化炭素抽出法によるヒュウガトウキの葉からの機能性成分の抽出

## 5.1 はじめに

## 5.2 実験方法

### 5.2.1 試料

### 5.2.2 抽出手順

### 5.2.3 Hansen の溶解度パラメーターの計算

### 5.2.4 分散分析 (ANOVA) による統計分析

## 5.3 結果と考察

### 5.3.1 抽出に及ぼす抽出時間の影響

### 5.3.2 抽出に及ぼす抽出圧力の影響

### 5.3.3 HPS 値の計算

### 5.3.4 分散分析 (ANOVA) による統計的知見

## 5.4 小括

## 第6章

### 結論

# 第 1 章

## 序論と目的

## 1.1 生薬の生産動態

わが国では古くから民間伝承の治療薬として、その効能や健康促進効果を期待して生活に生薬<sup>1</sup>が取り入れられてきた。また、生薬の原料となる作物は薬用作物と呼ばれており、漢方薬等に使用されるのはもちろんのこと、最近では生産面において「複合経営の一品目として経営の安定化や効率化に役立ち、地域農業の振興を図るために必要な作物」（農林水産省 2021, 1）と位置付けられている。

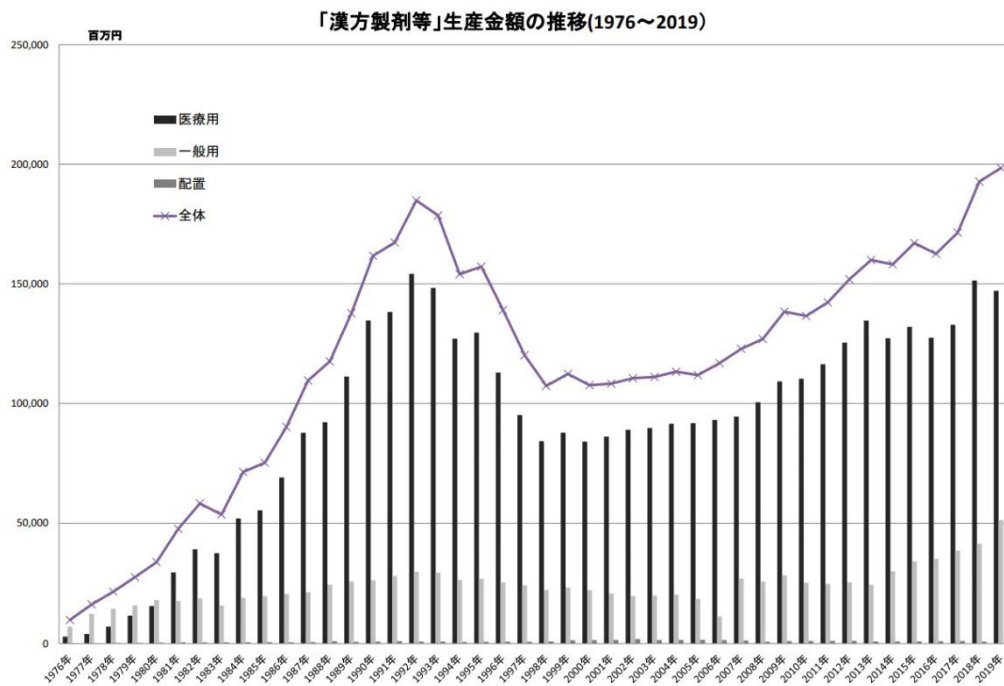
日本漢方生薬製造協会（2021, 2）によれば、生薬は、「漢方製剤」、「その他生薬及び漢方処方に基づく医薬品」と共に「漢方製剤等」として農林水産省の管轄で取扱われている。漢方製剤等の統計については、2018年まで「医療用医薬品」と「その他医薬品（一般医薬品・配置用家庭薬）」に分類され行われていた。2019年からは「医療用医薬品」と「要指導医薬品・一般用医薬品」に分類されることとなり、さらに「要指導医薬品・一般用医薬品」は、「セルフメディケーション税制対象医薬品」と「配置用家庭薬」が別に集計され、生産動態を把握するための重要な統計データとなっている。

2020年における日本国内の医療用漢方製剤の生薬の種類は136種類<sup>2</sup>あり、これら生薬を原料に構成された漢方薬は148種類となっている（医薬品医療機器総合機構 2020；日本漢方生薬製剤協会 2020）。そして、Fig. 1.1 に示す漢方製剤等の生産金額の推移をみていくと、統計が始まった1976年以来、最高水準を示しており、更に Table 1.1 に示すように直近6年では約25%増加していることがわかる。次に、Fig. 1.2 はわが国における漢方製剤等の原料使用料及び原産国を示したものである。そのうちの多くは中国からの輸入生薬であるが、近年は COVID-19 の影響による輸入産業の遅れや、物価の高騰などで入手が難しくなっている。したがって、日本国内で生薬を生産し、安定確保することが直近の課題である。

---

<sup>1</sup> 生薬は漢方薬と混同されやすいが、植物由来・鉱物由来・動物由来の天然物の中でそのまま薬品として用いるものや製剤の原料となるものを生薬といい、理論や経験に基づいて生薬を定められた組み合わせと量で構成したものが漢方薬である（日本漢方生薬製剤協会 2017, 4）。

<sup>2</sup> 日本漢方生薬製剤協会医療用漢方製剤委員会有用性部会が独立行政法人医薬品医療機器総合機構の「医薬品医薬品添付文書情報」について医療用漢方製剤に関する添付文書の情報をとりまとめている。



出所：日本漢方生薬製剤協会（2021）

Table1.1 Changes in production value of Kampo Products (Latest 6 years)

(Unit : 100 million yen)

	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Product value	1,581	1,671	1,625	1,714	1,927	1,984

出所：厚生労働省（2019）を参考に筆者作成

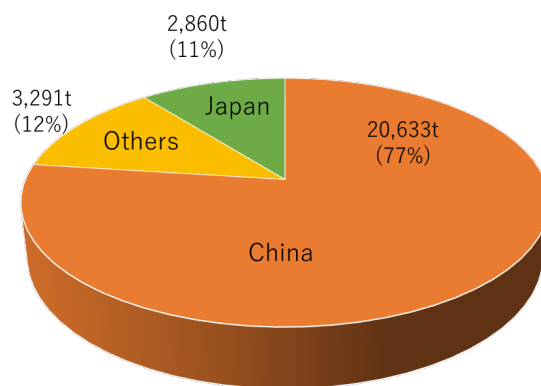


Fig. 1.2 The amount of Kampo Products usage and the country of origin in Japan

出所：山本他（2016）を参考に筆者作成



次に、Table1.2 に日本国内で栽培されている薬用作物のうち上位 10 作物を示し、これらの特徴や効能等について簡単に紹介する。

Table1.2 Status of cultivation of the top 10 medicinal crops in Japan (2019)

Rank	Name of crops	Cultivated area (ha)	Cultivation period (years)
1	<i>Bupleurum Root</i>	141	1~2
2	<i>Cnidium Rhizome</i>	97	1
3	<i>Japanese Angelica Root</i>	58	2
4	<i>Processed Aconite Root</i>	34	1~2
5	<i>Phellodendron Bark</i>	31	15~20
6	<i>Saposhnikovia Root and Rhizome</i>	29	1
7	<i>Peony Root</i>	28	5
8	<i>Rhubarb</i>	23	4~5
9	<i>Coptis Rhizome</i>	20	6
10	<i>Lindera Root</i>	17	5~

出所：公益財団法人日本特産農産物協会（2021）；農林水産省（2021）を参考に筆者作成

1. ミシマサイコ（生薬名：柴胡，英名：*Bupleurum Root*）はセリ科ミシマサイコ属の多年草であり、主要産地は群馬県，愛媛県，高知県，熊本県である。効能は食欲不振，胃炎，かぜ，中耳炎，解熱，鎮痛，解毒として抗炎症作用がある。
2. センキュウ（生薬名：川芎，英名：*Cnidium Rhizome*）はセリ科ハマゼリ属の多年草であり、主要生産地は北海道や岩手県である。効能は血行促進，駆瘀血<sup>3</sup>（くおけつ），鎮静，鎮痛，補血，強壮がある。
3. トウキ（生薬名：当帰，英名：*Japanese Angelica Root*）はセリ科シシウド属の多年草であり、主要生産地は北海道，群馬県，長野県，奈良県である。効能は冷え性，婦人科系の疾患の改善，貧血，鎮静，鎮痛，強壮，便秘がある。
4. トリカブト（生薬名：烏兜，附子，英名：*Processed Aconite Root*）はキンポウゲ科トリ

<sup>3</sup> 血流不全を治す作用。

カブト属の多年生草本であり、トリカブト全体に毒があるので劇物指定の生薬である。主要生産地は北海道、岩手県である。効能は非麻薬性鎮痛薬<sup>4</sup>、強心薬、利尿薬などがある。

5. キハダ（生薬名：黄柏，英名：*Phellodendron Bark*）はミカン科キハダ属の落葉高木樹であり、主要生産地は福井県、奈良県、島根県である。効能は胃腸炎、腹痛、黄疸、下痢などに加えて外用薬として打撲傷などがある。
6. ボウフウ（生薬名：防風，英名：*Saposhnikovia Root and Rhizome*）はセリ科ボウフウ属の多年生草本であり、主要生産地は新潟県である。効能は発汗、解熱、感冒による頭痛、悪寒等の予防がある。
7. シャクヤク（生薬名：芍薬，英名：*Peony Root*）はボタン科ボタン属の宿根草<sup>5</sup>であり、主要生産地は北海道、長野県、新潟県、富山県、奈良県である。効能は鎮痛作用、鎮痙作用、腹痛、腹満、身体手足の疼痛、下痢、冷え性などである。
8. ダイオウ（生薬名：大黄，英名：*Rhubarb*）はサルゲントドクサ科ダイオウ属の多年生草本であり、主要生産地は長野県<sup>6</sup>である。効能は瀉下、清熱、活血、駆瘀血の作用がある。
9. オウレン（生薬名：黄蓮，英名：*Coptis Rhizome*）はキンポウゲ科オウレン属の多年草であり日本固有種である。主要生産地は北海道であるが、九州地方まで幅広い分布がみられる。効能は消炎、健胃、鎮静などがある。
10. テンダイウヤク（生薬名：天台烏薬，英名：*Lindera Root*）はクスノキ科クロモジ属の常緑低木であり、主要生産地は本州や九州のうち温暖な気候の地域である。効能は温中散寒、理気<sup>7</sup>、止血などがある。

ここに示すような生薬は日本薬局方<sup>8</sup>に登録されており、その薬効が明らかになっている。その一方で、使用部位に着目すると、主に根・茎等の取扱いのみとなっており、生薬の全体の効能が明らかとなっているわけではなく、未知の効能も多くあるものと考えられる。

---

<sup>4</sup> 麻薬性鎮痛薬（モルヒネなど）に準ずる強力な鎮痛剤の総称。

<sup>5</sup> 宿根草とは多年草の一種で、根は通年残存するが生育期が終わると地上部が枯れる植物を指す。

<sup>6</sup> 1965年頃までは奈良県で栽培されていたが、現在は長野県での栽培が主である（武田薬品工業株式会社，2013）。

<sup>7</sup> 気の巡りをよくする作用。

<sup>8</sup> 厚生労働省ホームページより『日本薬局方』ホームページ参照。

## 1. 2 トウキ (当帰) について

わが国の漢方製剤等の基準は日本薬局方に示されていることは前述の通りである。厚生労働省 (2016) によれば「日本薬局方は、『医薬品, 医療機器等の品質, 有効性及び安全性の確保等に関する法律』の第 41 条により, 医薬品の性状及び品質の適正を図るため, 厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を聴いて定めた医薬品の規格基準書」としており, 100 年有余の歴史がある。初版は 1886 (明治 19) 年 6 月に公布され, 医薬品の開発や試験技術の向上に資するよう今日に至るまで改訂が繰り返されている。

前節にてわが国の生薬について概説したが, 本研究ではその中でもトウキ (当帰) に着目している。トウキはセリ科シシウド属の多年草本であり, 生薬英名の *Japanese Angelica Root* にもあるとおり根が日本薬局方に登録されている。その種類は様々で所説あるが, 本研究では日本国内において基原植物<sup>9</sup>を有するものを対象とする。

日本薬局方では, トウキについて以下のように記載している (厚生労働省, 2016)。

### 1. トウキ (*Japanese Angelica Roots*)

本品はトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa 又はホッカイトウキ *Angelica acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino(*Umbelliferae*)の根を, 通例, 湯通したものである。

### 2. 生薬の性状

本品は太くて短い主根から多数の根を分枝してほぼ紡錘形を呈し, 長さ 10~25cm, 外面は暗褐色~赤褐色で, 縦じわ及び横長に隆起した多数の細根の跡がある。根頭に僅かに葉鞘を残している。折面は暗褐色~黄褐色を呈し, 平らである。

本品は特異なおいがあり, 味は僅かに甘く, 後にやや辛い。

本品の横切片を鏡検するとき, コルク層は 4~10 細胞層からなり, その内側に数細胞層の厚角組織がある。皮層には分泌細胞に囲まれた多数の油道及びしばしば大きな隙間がある。皮層と木部の境界は明らかで, 木部では多数の道管と放射組織とが交互に放射状に配列し, 外方の道管は単独又は数个集まってやや密に配列してくさび状を呈し, 中心部付近の道管は極めてまばらに存在する。でんぷん粒は単粒又はまれに 2~5 個の複粒で, 単粒の径は 20 $\mu$ m 以下, 複粒は 25 $\mu$ m に達することがある。でんぷん粒はしばしば糊化している。

### 3. 確認試験

本品の粉末 1.0 g にメタノール 5 mL を加えて 10 分間振り混ぜた後, 遠心分離し, 上澄液を試料溶液とする。別に 薄層クロマトグラフィー用(Z)ーリグスチリ

<sup>9</sup> 基原植物は, 日本薬局方の中で, 生薬のもととなる植物の薬用部位を表す言葉である。植物生薬の場合の基原は, 植物の学名と薬用部位で表す。生薬原料の多くを占める薬用植物においては, 薬効を示す成分 (薬用成分) の組成や含量は, 部位(花, 葉, 種子, 果実, 茎, 根, 根茎など)によって異なる。したがって, 生薬の基原は, 医薬品としての生薬の適否を判断する基準の 1 つとされている (吉松, 2021)。

ド試液を標準溶液(1)とする。また、薄層クロマトグラフィー用スコポレチン 1 mg をメタノール 10 mL に溶かし、標準溶液(2)とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィーにより試験を行う。試料溶液 10  $\mu$ L, 標準溶液(1)及び標準溶液(2) 5  $\mu$ L ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調した薄層板にスポットする。次にヘキサン/アセトン/酢酸(100)混液(30 : 25 : 1)を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに紫外線(主波長 365 nm)を照射するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 2 個のスポットは、標準溶液(1)及び標準溶液(2)から得た青白色の蛍光を発するスポットと色調及び R 値が等しい。

#### 4. 純度試験

- (1) 重金属 本品との粉末 3.0g をとり、第 3 法により操作し、試験を行う。比較液には鉛標準液 3.0mL を加える (10ppm 以下)。
- (2) ヒ素 本品の粉末 0.40g をとり、第 4 法により検液を調製し、試験を行う (5ppm 以下)。
- (3) 葉鞘 本品は、異物に従い試験を行うとき、葉鞘 3.0%以上を含まない。
- (4) 異物 本品は葉鞘以外の異物 1.0%以上を含まない。

5. 灰分 7.0%以下。

6. 酸不溶性灰分 1.0%以下。

7. エキス含量 希エタノールエキス 35.0%以上。

8. 貯法 容器 密閉容器。

### 1. 2. 1 トウキの種類

トウキは日本のみならず近隣諸外国において古くから用いられてきた生薬のひとつである。中国産当帰の基原植物はカラトウキ (*Angelica sinensis*) であり、見た目や味、芳香などが僅かに異なる。次に韓国産当帰はアンジェリカギガス (*Angelica gigas Nakai*) を基原植物とし、別名オニノダケと呼ばれる。

一括りに生薬の「当帰」といっても国によって原料となる植物が異なっているため、取り扱いには注意が必要である。Fig. 1.2 に示したように、わが国の生薬の多くは中国などからの輸入に頼っているが、中国産当帰や韓国産当帰を生薬として扱うことはできない。輸入品のトウキは中国や韓国などへ日本から種子や苗を持ち込み現地栽培し、収穫したものである。

日本薬局方に登録されているのはトウキもしくはホッカイトウキの根であるが、わが国で栽培されているトウキはこの限りではなく、様々な種類がある。Table 1.3 に日本で栽培されているトウキとその産地を示す。ホッカイトウキ及びヤマトトウキは総称してトウキと呼ばれ、同じ種のトウキとして扱われている。

また、イヌトウキ及びヒュウガトウキは総称して日本山人参と呼ばれているが、これらは似て非なるものである。イヌトウキは薬用植物ではないが薬草として知られ、朝鮮人参と似た薬効をもっている。ヒュウガトウキは2002（平成14）年11月15日に厚生労働省が公表した「医薬品の範囲に関する基準<sup>10</sup>の一部改正について」においてその根が新たに追加された。また、イヌトウキは多年草本であるが花が咲き実がつくと、それらが枯れたときに葉も根も同様に枯れてしまう。一方でヒュウガトウキは地表部が収穫や枯渇によりなくなっても根は健在であるので年に数回収穫することができる。このように、同じ日本山人参と呼ばれている2種のトウキは公的な取り扱いが異なることはもちろんのこと、生育上の特徴も異なっている。

Table1.3 List of Japanese Angelica roots cultivated in Japan

Type of Japanese angelica roots	The place of origin
<i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa, <i>Angelica actiloba</i> Kitagawa var. <i>Sugiyamae</i> Hikino (ホッカイトウキ及びヤマトウキ)	Hokkaido (北海道), Gunma (群馬県), Nara (奈良県), Iwate (岩手県), Nagano (長野県) etc.
<i>Angelica sikokiana</i> (イヌトウキ)	Shikoku, Kyushu etc. (四国・九州地方など)
<i>Angelica furcijuga</i> <sup>11</sup> (ヒュウガトウキ)	Miyazaki (宮崎県), Oita (大分県), Kochi (高知県), Fukuoka (福岡県) etc.

出所：日本特産農産物協会（2021）等を参考に筆者作成

## 1. 2. 2 わが国のトウキの生産状況

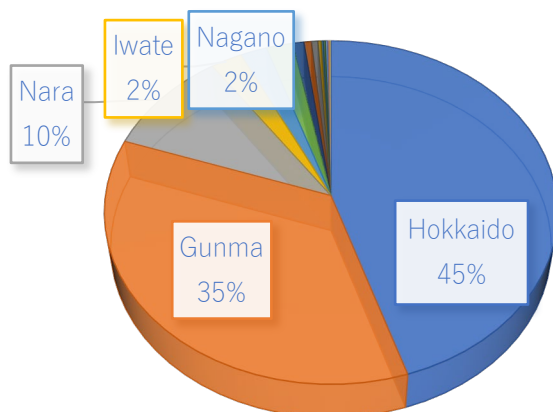
次に、トウキの生産の現状について示す。Fig. 1.3は2019（令和元）年におけるトウキの栽培面積と生産量をまとめたものである。(a)は都道府県別の栽培面積の割合を示したものであり、北海道、群馬県、奈良県が栽培面積全体の約9割を占めている。次に(b)は生産量の割合を示したものであるが、栽培原産地と同様の3道県が上位であり、生産量全体の9割強を占めている。このうち奈良県では「漢方のメッカ推進プロジェクト」を立ち上げ産学官が連携して漢方の生産に取り組んでおり、なかでもトウキは最重要作物と位置付け

<sup>10</sup> 「医薬品の範囲に関する基準」は厚生省薬務局長通知「無承認無許可医薬品の指導取締りについて」において別紙として示された指針である。これの別添2「専ら医薬品として使用される成分本質（原材料）リスト」にヒュウガトウキが登録されている。

<sup>11</sup> 日本特産農産物協会（2020）にヒュウガトウキの生産地として記載されているのは福岡県田川郡川崎町（以下、川崎町）に所在するマルボシ酢株式会社（以下、当社）のみである。その他の生産地については当社調べによる。

られている<sup>12</sup>。

(a) Percentage of Japanese Angelica Roots cultivated area (2019)



(b) Percentage of Japanese Angelica Roots production (2019)

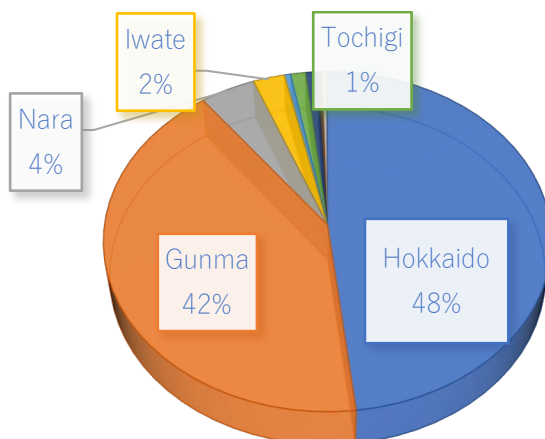


Fig. 1.3 Current production status of Japanese Angelica Roots (by prefecture)

出所：日本特産農産物協会（2021）を参考に筆者作成

Table1.4 は Fig. 1.3 (a)及び(b)について上位 10 道府県を数値で示したものである。この表から、九州地方や四国地方では主だった生産は行われていないことがわかる。また栽培面積が大きいからといって生産量がそれに比例しているとは限らず、逆に山口県のように栽培面積はさほど大きくはないものの生産量が安定している地域もある。

<sup>12</sup> 奈良県ホームページ「県民だより奈良 平成 30 年 8 月号」より「奈良の漢方 根は薬・葉は栄養」参照。

Table1.4 トウキの栽培面積及び生産量上位 10 道府県の現状

Prefecture	Hokkaido	Gunma	Nara	Iwate	Nagano	Tochigi	Yamaguchi	Hyogo	Ibaraki	Akita
(ha)	2,681	2104	598	146	125	123	53	35	30	15
生産量 (kg)	67,129	57,933	6,108	3,453	700	1,641	1,338	50	254	63

出所：日本特産農産物協会（2021）を参考に筆者作成

### 1. 3 グリーンケミストリーに則った生薬の抽出技術の必要性

#### 1. 3. 1 グリーンケミストリーの概説

グリーンケミストリー（Green Chemistry：以下、GC）は米国環境保護局（Environmental Protection Agency：EPA）の Paul T. Anastas らにより提唱され、その定義を「物質を設計し、合成し応用するとき有害物をなるべく使わない、出さない化学」としている。Table1.5 に示すグリーンケミストリー12 箇条はその基本理念として周知されている<sup>13</sup>。

日本では 1998 年に OECD の「サステイナブルケミストリープログラム」が提案されたことを受け、同年に通商産業省（現在の経済産業省）が中心となり、グリーンケミストリー連絡会が発足した。その後「環境負荷低減」及び「持続可能社会」を合わせた意味を持つグリーンサステイナブルケミストリー（Green and Sustainable Chemistry：以下、GSC）がわが国の GC であると名付けられた。そして 2000 年により強力に GSC への取り組みを行うため、グリーンケミストリー連絡会を発展させた産学官によるグリーン・サステイナブルケミストリーネットワーク（以下、GSCN）が発足し現在でも活動が行われている。北村（2010）によれば、GSC の技術体系と研究領域について、経済産業省の「平成 11 年度循環型基礎素材産業構築対策調査グリーンケミストリー調査報告書」をもとに Fig. 1.4 のようであるとしている。

<sup>13</sup> P. Anastas et al. (1999) 参照。

Table 1.5 Twelve Principles of Green Chemistry

---

**1. Prevention**

It is better to prevent waste than to treat or clean up waste after it has been created.

**2. Atom Economy**

Synthetic methods should be designed to maximize the incorporation of all materials used in the process into the final product.

**3. Less Hazardous Chemical Syntheses**

Wherever practicable, synthetic methods should be designed to use and generate substances that possess little or no toxicity to human health and the environment.

**4. Designing Safer Chemicals**

Chemical products should be designed to effect their desired function while minimizing their toxicity.

**5. Safer Solvents and Auxiliaries**

The use of auxiliary substances (e.g., solvents, separation agents, etc.) should be made unnecessary wherever possible and innocuous when used.

**6. Design for Energy Efficiency**

Energy requirements of chemical processes should be recognized for their environmental and economic impacts and should be minimized. If possible, synthetic methods should be conducted at ambient temperature and pressure.

**7. Use of Renewable Feedstocks**

A raw material or feedstock should be renewable rather than depleting whenever technically and economically practicable.

**8. Reduce Derivatives**

Unnecessary derivatization (use of blocking groups, protection/ deprotection, temporary modification of physical/chemical processes) should be minimized or avoided if possible, because such steps require additional reagents and can generate waste.

**9. Catalysis**

Catalytic reagents (as selective as possible) are superior to stoichiometric reagents.

**10. Design for Degradation**

Chemical products should be designed so that at the end of their function they break down into innocuous degradation products and do not persist in the environment.

**11. Real-time analysis for Pollution Prevention**

Analytical methodologies need to be further developed to allow for real-time, in-process monitoring and control prior to the formation of hazardous substances.

**12. Inherently Safer Chemistry for Accident Prevention**

Substances and the form of a substance used in a chemical process should be chosen to

---



minimize the potential for chemical accidents, including releases, explosions, and fires.

出所 : Anastas et al. (1998) を参考に筆者作成

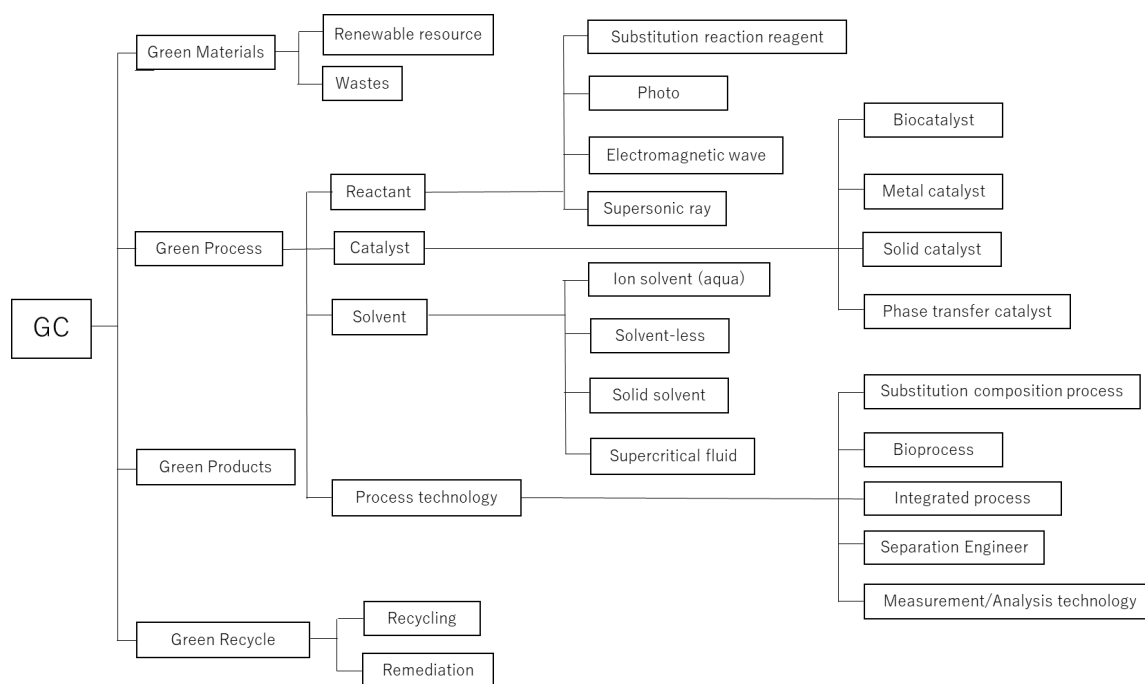


Fig. 1.4 Systematized techniques of GC

出所 : 北村 (2010) を参考に筆者作成

### 1. 3. 2 持続可能な開発目標との関連性

持続可能な開発目標 (Sustainable Development Goals : 以下, SDGs) は, 2015 年にニューヨークの国際連合本部で開催された国連サミットにて採択された「持続可能な開発のための 2030 アジェンダ」に記載されている 2030 年までに「誰一人取り残さない多様性で包摂性のある社会の実現」のために持続可能でよりよい世界を目指す国際的な目標である (外務省, 2021)。図 1.5 に示すような 17 の国際目標が設定されており, その下に 169 のターゲットと 232 の指標が定められている。



Fig. 1.5 17 goals of SDGs

出所：外務省（2021）

化学工学の分野においては、化学工学会が2019年に「一人々の『健康、安心、幸福』のための化学工学―」として国連持続可能な開発目標に関する18項目からなる札幌宣言を発表した。そのうち、「Efficiency から Sufficiency へ：効率性を追い求める社会から充足性を感じられる社会へ」において、「人々の『健康、安心、幸福』を達成するために、物質とエネルギーの使用強度を下げ、プロセスの効率性を高めることに加えて、充足性という本質的概念を取り入れ、人々の労働環境と地球環境を改善することを提言する。」及び「我々は、持続可能な社会の構築の基本的な要素となるグリーン・サステイナブル ケミストリーを実現する技術を見定めることによって、従来の工学を再評価し、充足性を達成するための新たな枠組みを創造する。」とグリーンケミストリーの重要性について再度唱えている。化学工学やそれに伴う技術はすべての産業に精通しており、SDGsの目標達成への影響力は大きいものと考えられる。

生薬の製造法に関しても化学技術が重要で、特にエキス分の製造についてその手法により分類されている。Table1.6にエキス分とその製造手法について示す。なかでも単味生薬エキスには、水による煎じ法以外に有機溶媒による抽出で製造されている。更に「生薬のエキス製剤の製造販売承認申請に係るガイダンス」（以下、ガイダンス）にその製造方法や規格等についての基準が定められており（厚生労働省、2015）、ガイダンスの「規格及び試験項目に関する事項」では、エキス含量を定量する手法の一つとしてメタノールや希エタノール等の有機溶媒を用いた試験が認められている。しかしながら有機溶媒は抽出後の溶媒の除

去や残留溶媒が人体や環境に与える影響への懸念があり、可能な限りこれに頼らない手法での製造が望まれている。

Table1.6 Production method of crude drug

Type of crude drug	Production method
Extract (エキス剤, エキス製剤)	生薬の浸出液を濃縮して制した中間製剤で, viscous extracts (軟エキス剤) と dry extracts (乾燥エキス剤) がある (JP)。
Kampo extract (漢方エキス)	漢方処方エキスで, Kampo preparation の一種である。抽出液, それを濃縮したもの, 完全に乾燥したものまで全ての意味を含む。状態によりそれぞれ concentrated, viscous, dry など適切な言葉を付けて表す。
Kampo concentrated extract (漢方濃縮エキス)	Kampo extract の中で, 抽出液を濃縮したものの (濃縮の程度は問わない) を表す場合に用いる。
Kampo viscous extract (漢方軟エキス)	Kampo extract の中で, 抽出液を濃縮して水飴様の稠度としたもの (JP)。
Kampo dry extract (漢方乾燥エキス)	Kampo extract の中で, 抽出液を乾燥し, 砕くことができる固塊, 粒状又は粉末としたもの (JP)。
Bulk extract (原薬エキス)	漢方製剤の原薬に相当するものは生薬ではなく中間製剤のエキスを表現するとき用いる。
Single crude drug extract (単味生薬エキス)	単一の生薬を水または有機溶媒で抽出したエキスを表す場合に用いる。

※JP (Japan Pharmacopoeia) : 日本薬局方

出所 : 日本漢方生薬製剤協会ホームページを参考に筆者作成

### 1. 3. 3 グリーン溶媒を用いた抽出技術

近年, 天然に存在する資源を原料とするグリーン溶媒の一つで, 水や二酸化炭素からなる超臨界流体による抽出技術が注目されていることは既に周知のとおりである。なかでも, 超臨界二酸化炭素 (以下, SC-CO<sub>2</sub>) は幅広い極性の成分を天然物から分離抽出することが可能な溶媒である。従来の溶媒抽出の課題とされていた抽出後の溶媒除去の工程を必要としないことなどからも, 人体及び環境に対して安全な抽出物を得られることが大きな利点で

ある。

### 1. 3. 3. 1 超臨界二酸化炭素 (SC-CO<sub>2</sub>) の特性

SC-CO<sub>2</sub> は、「密度ゆらぎ」を有する溶媒である<sup>14</sup>。「密度ゆらぎ」とは多くの物質における超臨界状態の分子の分布の不均一さを表したものの<sup>15</sup>で、SC-CO<sub>2</sub>においても、液体様の密度の高い部分及び、気体様の密度の低い部分が混在しており、これらが時々刻々と変化している。西川（1996）は、超臨界流体の構造の模式図を Fig. 1.6 のように示しており、ここに示す分子は集合と離散を繰り返し、この集合した部分はクラスターと呼ばれる。

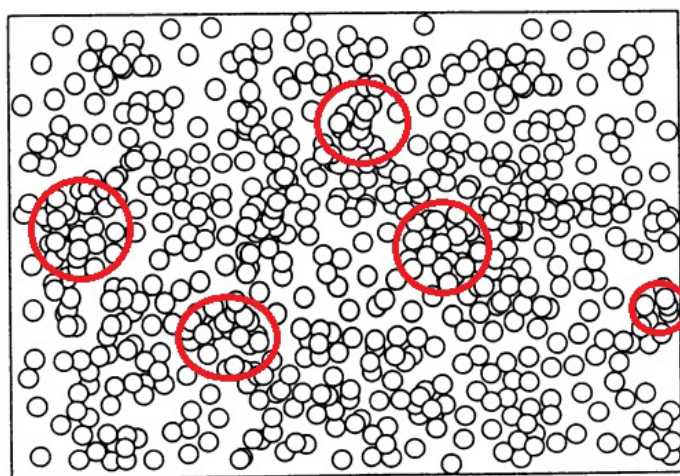


Fig. 1.6 Schematic diagram of molecular clusters of supercritical fluid

出所：西川（1996）に筆者加筆修正

クラスターの形成は、Kim and Johnston (1987)や Younker and Smith (1988)らによって、紫外可視分光法や赤外分光法といった分光学的手法により明らかとなった。また、内田（2001）はクラスターの溶解度などの物性への影響について先行研究を基礎として解説し、超臨界流体に対する溶解特性や芳香族化合物異性体の高度分離技術に関して、超臨界流体の抽出能力には限界があると結論付け、他の分離手法との複合的手法の開発が課題であると指摘している。

ここまで述べたような超臨界状態における分子分布の極めて大きな不均一性は、分子間の凝集力と拡散力の均衡の釣り合いにより説明づけられる。流体の密度（圧力）が大きくなるにしたがって、分子間距離が短くなり、それが起因して分子間の相互作用が働くようになる。その様子を Fig. 1.7 に示す。

<sup>14</sup> C. Cagniard de la Tour（1822）参照。

<sup>15</sup> 西川（1996）参照。

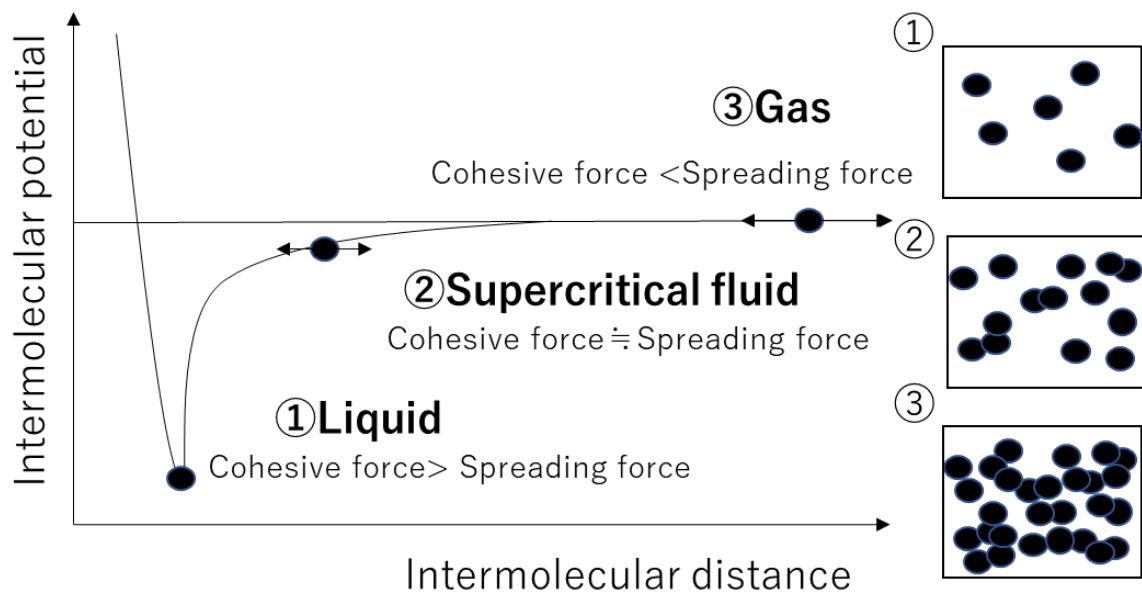


Fig. 1.7 Effects of intramolecular interaction and intramolecular kinetic energy on fluid behavior

出所：岩井（2012）を参考に筆者作成

流体の挙動は、分子間ポテンシャル（凝集力）及び分子の運動エネルギー（拡散力）によって決定される。固体状態にあるクラスターの温度が上昇すると、運動エネルギーも同時に大きくなり液体状態に移行する。Fig. 1.7 に示すように、液体の場合は分子間の凝集力が拡散力よりも優位であるため分子同士は分子間ポテンシャルの谷に入りやすくなる。これにより液体の分子はある一定の距離で結びつくのである。次に分子間の拡散力が凝集力よりも優位になると気体状態に移行していき、このとき分子は分子間相互作用に束縛されずに自由に運動する。ところが液体と気体の中間点（いわゆる臨界点近傍）においては分子の凝集力と拡散力が同程度になるため分子同士は分子間ポテンシャルの谷の入り口付近で不均一な運動をする。つまり、超臨界状態にある分子は非常に大きな密度ゆらぎを有することとなる。

このとき、密度ゆらぎは臨界点から温度を上昇させると分子の運動エネルギーが大きくなるため、徐々に小さくなっていくのであるが、臨界点付近では流体と気体の双方の物性をもつ気体となる。Fig. 1.8 に超臨界流体の相図を示す。純物質は固有の臨界温度と臨界圧力を有しており、それらを超えた状態の流体を超臨界流体という。臨界点は蒸気圧曲線の高温側の上方にみることができる。超臨界流体の特徴として、高い密度を有し、なおかつ圧縮性も高いことから温度と圧力の条件を変化させることで流体の密度を容易に変化させることができる点が挙げられる。したがって、気体に比べて溶解力が高く、溶質に対する選択性を持っている流体であるといえる。更に粘性が低く拡散性が高いことから輸送能力が高い。なお、

二酸化炭素の臨界温度  $T_c$  は  $31.1^\circ\text{C}$ ，臨界圧力  $P_c$  は  $7.38\text{MPa}$  である。

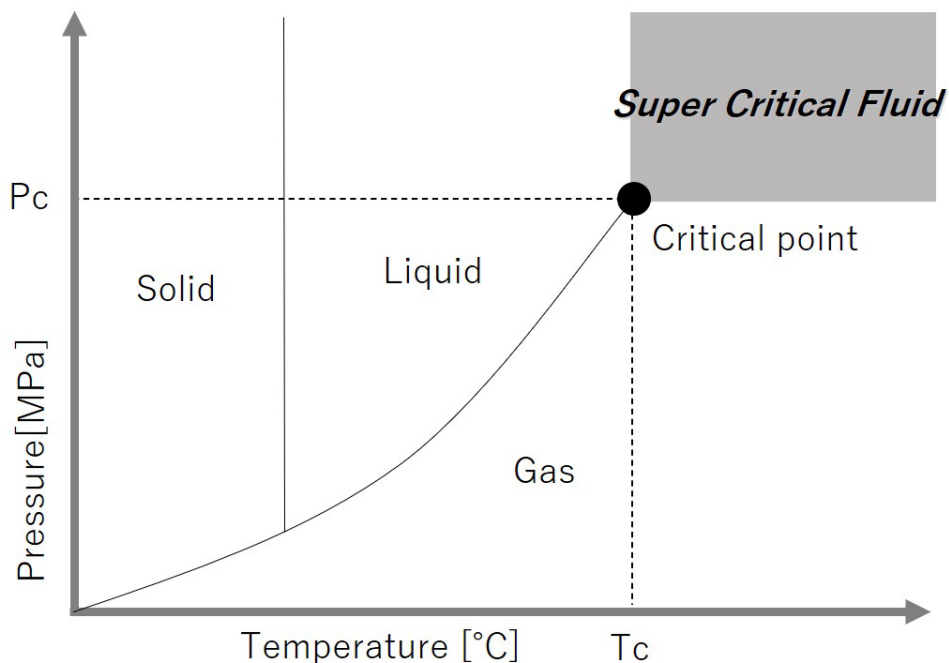


Fig. 1.8 Phase diagram of supercritical fluid

出所：筆者作成

これらの性質を踏まえ、以下に超臨界二酸化炭素の利点をまとめる。

1. 温度・圧力を変数として密度を制御することで、流体の密度に依存する種々の溶媒特性の調整が可能となる。
2. 熱的不安定な物質に対してその低い臨界温度から比較的低温での処理が可能であり、このことから熱変性を避けることができる。
3. 低い粘性と高い拡散性を兼ねることで固体試料への浸透性に優れ、高い物質移動速度が期待できる。
4. 臨界点近傍では熱伝導率が極大を示し、そのことから高い熱移動速度を得ることができ、反応熱の除去や熱交換などを効果的に行うことができる。
5. 動粘度が気体や液体と比較して小さいため、自然対流が発生しやすいため物質及び熱移動に関して液体より有効である。
6. 抽出物からの溶媒除去について、抽出後大気中に自然排出されるため、残留溶媒の懸念が少ない。

以上のような事柄から、天然物の中でも特に食品分野に関連する研究において活用されているのが現状である。

#### 1. 4 本研究の目的

本研究の目的は、近年のわが国における生薬の生産動態や社会的背景を鑑み、国産生薬の栽培を産業に直結させるための基礎的な実証研究を行うこと及び栽培生薬の機能性成分を環境負荷低減に寄与するグリーン溶媒を用いて抽出する技術を開発することである。

研究目的薬用植物であるヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*) は民間伝承の薬として九州地方を中心に小規模に栽培されてきた。ヤマトトウキやホッカイトウキと同様に、その根部は厚生労働省により生薬として登録されている。そのため医薬品と同等物であるため、一般には取り扱うことができない。その一方で、ヒュウガトウキの葉はお茶やサプリメントなどの健康食品として製品化されており、根部と同程度の機能性成分が含有されていることが先行研究などにより明らかになっている。そのうち代表的なものが YN-1 であり、血糖値の上昇を抑える作用や高血圧を下げる作用がある。その他にもヒュウガトウキ含有成分を経口摂取した結果、症状が改善されるなどの健康効果が報告されていることから、まだ明らかにはなっていない、未知の機能性成分が含有されている可能性が高い。したがって、ヒュウガトウキの地表部(葉・茎・花)の中でも特に葉に着目し、含有される機能性成分について調査することにした。

従来の生薬からの成分抽出は熱水抽出によるものが中心であったが、親水性成分に対しては高い抽出挙動を示し環境にも良い抽出法であるが、抽出できる成分の選択性が低いことや、熱分解及び加水分解による成分の変質などの懸念がある。したがって、これを改善するような抽出法を選択しなければならない。

そこで、グリーン溶媒である SC-CO<sub>2</sub> を抽出溶媒とした抽出法を用いて機能性成分の分離を試みることにした。前述のとおり、SC-CO<sub>2</sub> は比較的低温で臨界状態となることから熱的不安定な成分に対して適した溶媒であるといえる。これを応用し最適な抽出条件を明らかにすることで効率的な抽出が可能となり、ヒュウガトウキのみならず生薬に含有される薬理成分を最大限に利活用するための基礎的研究になるものと期待される。

## 第2章

# 生薬「ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*)」の 栽培に関する実証実験



## 2. 1 はじめに

ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*) は、宮崎県や大分県などの九州南部の山地に自生する生薬の一種である。1945 年頃に朝鮮人参の株として大分県別府市に数株持ち込まれ、それを買い取った個人の自宅庭で「日本山人参」として栽培された。その後約 20 年で数百株にまで増えたとされる。栽培された株を煎薬とし飲用したところ優れた健康効果を発揮したとされるが、当時はまだ未解明の薬草であった。これに着目し、宮崎大学農学部の志田らが 1950 年頃にイヌトウキ (*Angelica sikokiana Makino*) に属することを明らかにした。更に 1970 年頃に北川は宮崎県中北部から大分県南部にかけて自生していたウヅという植物について、ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga Kitagawa*) という新種のトウキであったことを示した。そこで、前述の志田らは、イヌトウキとヒュウガトウキを試験栽培しその効能等について比較した結果、戦後から人工栽培されてきた「日本山人参」はヒュウガトウキに近い種であるという結論に達した (水野, 2008)。

2002 年にヒュウガトウキはその効能から根が「専ら医薬品として使用される成分本質 (原材料) リスト」に追加された。さらに、ヒュウガトウキ茶などの葉の部分に特化した製品も販売されており、根のみならず葉にも高い効能が期待されているが、これについては先行研究が過少である。また、人工栽培を行っている地域は少なく、生薬の需要が高まっている昨今においては大規模な栽培を行うことが求められる。これが広がれば、わが国の生薬産業に寄与するものと考えられる。したがって本研究ではヒュウガトウキについて、これらの課題を改善するための基礎的知見を明らかにすべく栽培に関する実証実験を行った。

## 2. 2 ヒュウガトウキの特徴及び臨床的作用

ヒュウガトウキは、宮崎県宮崎市加江田地域を南限として、県中、北部地域にかかる山地に自生する生薬で、宮崎県の固有種として認識されている (志田, 2003)。先行研究では、ヒュウガトウキの DNA 多型解析による系統分類を行った結果、宮崎県でヒュウガトウキとして栽培されている種とニホントウキ (ヤマトウキ) について、系統が全く異なる植物であることが確認されている (熊本・米良他, 2004)。

また、ヒュウガトウキには様々な薬効成分が含有されており、水野 (2008) によれば次のような臨床的な効能が確認されているとする<sup>16</sup>。

### 1. 過酸化脂質による肝障害の抑制

脂肪肝のラットに対して 100~200mL/kg のヒュウガトウキを投与すると血清 GOT の低下傾向及び肝臓の過酸化脂質、コレステロールの低下がみられる。このことから

---

<sup>16</sup> ヒュウガトウキの先行研究については、日本固有の生薬であること、また未だ研究が発展途上であることなどが起因して、論文化している参考資料が過少である。

過酸化脂質による肝障害をヒュウガトウキが予防する可能性が示唆される。

## 2. 血圧降下作用

ヒュウガトウキに含有されるノルアドレナリン（交感神経末梢の伝達物質）の作用を抑制し、細動脈の収縮を抑える働きがある物質が含有されている。この物質は末梢組織におけるインシュリンの作用を阻害せず、更に脂肪組織内においてグルコースからの脂肪合成を増強する。

## 3. インシュリンの作用増強効果

マウスの副睾丸から脂肪組織を分離精製したものに放射活性をもつブドウ糖を加え、脂肪組織内に取り込まれた放射性グルコースを測定することでインシュリンの作用を明らかにする実験において、インシュリンの添加下ではヒュウガトウキを添加した部分に脂肪合成の増加がみられた。このことから末梢組織内でインシュリンの作用を増強する働きのある生理活性物質がヒュウガトウキに含有されていることが示唆された。

## 4. 性機能の活発化

性交不能性マウスに対して飼料にヒュウガトウキを加え、1か月飼育したのち屠殺し、睾丸組織内のテストステロンを測定したところ、通常の飼料を与えられたネズミよりも1.65～2.66倍多い結果となった。このことからヒュウガトウキが睾丸内の男性ホルモンの量を増加させ、男性の性機能を活発化させる作用があることが示された。

## 5. 気管支喘息・アレルギー性皮膚炎、肝炎、ガンに対する有効性

Fig. 2.1 及び Table 2.1 はオータコイド<sup>17</sup>の合成について示したものである。オータコイドの代表的な物質としてプロスタグランディン(Prostaglandin)があり、これにはいくつかの種類がある。これらはアラキドン酸(arachidonic acid)から出発し、様々な形へと合成されていく。この代謝の過程を「アラキドン酸カスケード(arachidonic acid cascade)」といい、これによりトロンボキサン(Thromboxane)やロイコトリエン(Leukotriene)などが合成される。ロイコトリエンが生成されると、その部分に強い炎症が起こる。このとき静脈血から分離された多核白血球にカルシウムイオノフォア(Ca<sup>2+</sup>+ionophore)を加えてロイコトリエン B<sub>4</sub> と C<sub>4</sub> を生合成し、そこにヒュウガトウキのエタノール及びメチルアルコールを用いて抽出された抽出物を作ると、ロイコトリエン B<sub>4</sub> と C<sub>4</sub> の生成を抑制することが明らかとなった。このことから、ヒュウガトウキに含有される物質が、気管支喘息やアレルギー性皮膚炎及び肝炎等に有効であることが示唆された。

## 6. ガンへの応用

ガン患者にみられる体重減少の原因は、ガン細胞から分泌される「ガン毒素」

---

<sup>17</sup> 1930年代からその存在が知られており、ホルモンとは異なる生理活性物質のことを総称して「オータコイド」という。

(水野, 2008) を持った「トキシホルモン L(Toxohormone L)<sup>18</sup>」という物質によるものである。トキシホルモン L は、脂肪組織に作用してその分解を促し、更に脳の視床下部にある食欲中枢に働きかけて食欲低下を招く。これに対してヒュウガトウキの水抽出液がトキシホルモン L の活性を阻害することが認められている。

また, Okuyama et al. (1991) は、トウキ類と同様にセリ科のアシタバ (*Angelica keiskei*) の根に含有されるカルコン (chalcone) がネズミの皮膚ガンに対する抗腫瘍促進活性があることを示した。西野 (1998) は緑黄色野菜に含有されるカロテノイド ( $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene) や、トマトに含有されるリコピン(Lycopene), そして生薬の甘草に含有される活性成分のグリチルリチン(Glycyrrhizin)などがネズミの自然発症肝ガンを抑制する作用があることを明らかにした。これらのような作用を発ガンプロモーター抑制作用<sup>19</sup>といい、ヒュウガトウキに含有される YN-1 にも発ガンプロモーター抑制物質として同様の作用があるとされる。

#### 7. 肝細胞内のインスリンによる糖消費の亢進作用

二宮 (2011) は、ヒュウガトウキの根のメタノール抽出物について、インスリン共存下における糖消費が亢進したことを明らかにした。更に、インスリン非共存条件下ではヒュウガトウキの根に含有される khellactone 型クマリン hyuganin A や、クマリン配糖体 apiosylskimmin などに糖消費亢進活性が認められ、インスリン共存条件下では khellactone 型クマリン hyuganin A 及びイソプテリキシンについて有意な糖消費亢進活性が認められた。

---

<sup>18</sup> トキシホルモンは中原・福岡 (1949) が提唱したガン (病的組織) が生産する特殊な毒作用を持った一種の内分泌物である。

<sup>19</sup> Berenblam (1941) は、化学発癌はイニシエーション(Initiation)とプロモーション(Promotion)の2つの異なったプロセスが関与することを明らかにした。例えばマウスの皮膚に発癌剤(7,12-dimethylbenz [a]anthracene : DMBA)を1回だけ塗布し、その箇所に蓮の種子から採取したクロトン油を週2回のペースで塗布し続けるとガン性の腫瘍が発現する。これはそれぞれのみでは腫瘍は発現しない。つまり DMBA がイニシエーター (発癌剤に起因する遺伝的変化を引き起こす物質) でありクロトン油がプロモーター (イニシエートされた細胞が腫瘍を作るように促進する物質) となる。

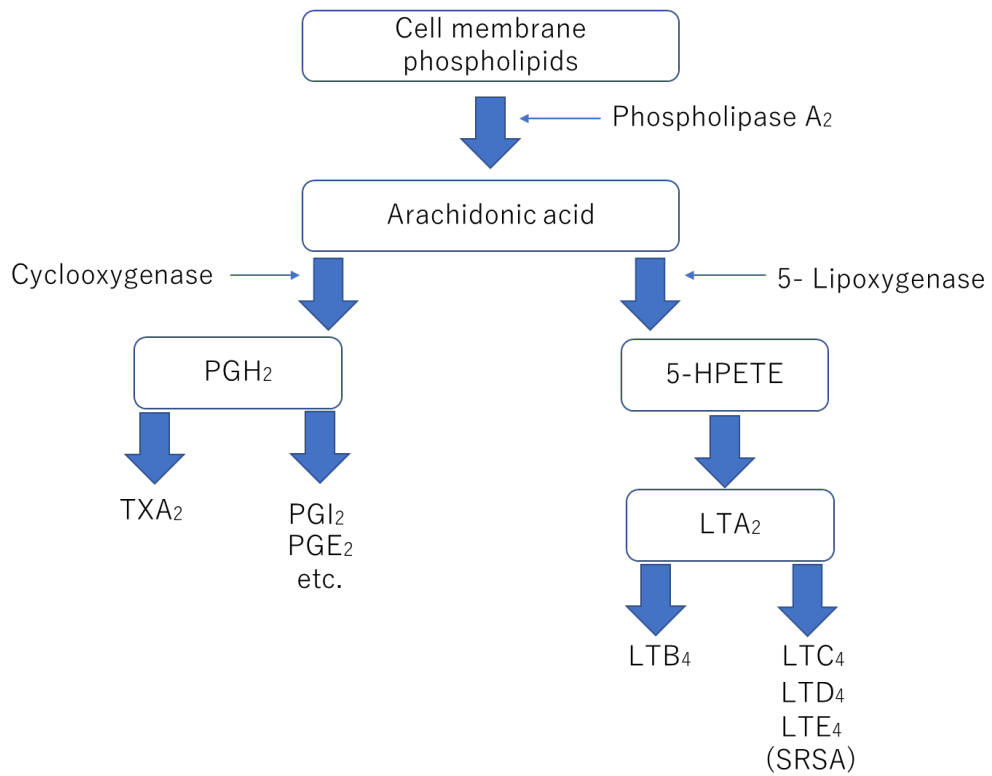


Fig. 2.1 Synthetic process of arachidonic acid cascade

水野 (2008, 83) を参考に筆者作成

Table2.1 Products produced by the synthesis of arachidonic acid cascade

PG (Prostaglandin)	TX (Thromboxane)	LT (Leukotriene)
Vasodilation, Smooth muscle contraction, Uterine muscle contraction, Bronchial muscle relaxation, Inhibition of platelet aggregation	Smooth muscle contraction,  Platelet agglutination,  Vasoconstriction	Smooth muscle contraction, Vascular hyperpermeability, Vasoconstriction, Increased mucus secretion, LH secretion

水野 (2008, 83) を参考に筆者作成

## 2. 3 農作物を通じた地域活性化への取り組み

近年、わが国では少子高齢化による人口減少に伴い、特に地方では過疎化が進行している。その結果、東京や大阪などの都市部への若年層人口の一極集中に拍車がかかり、地域の経済が低迷することによって雇用創出が困難になる事態を招いている。

特に農業においてはその傾向が強く、生産年齢人口は年々低下の一途を辿っている。農業従事者の減少は、雇用の減少を招くのみならずその源泉である畑の機能を停止させ、その結果増加した休耕地が放置され始めている。Table2.2は農林水産省（2021）が公表した直近7年間の基幹的農業従事者の推移である。これをみると、農業従事者の減少に伴い従事者の平均年齢が少しずつ高齢化していることがわかる。この事態は更に加速することが予想され、Fig. 2.2に示すように、日本全体の生産年齢人口と高齢化率が反比例することにより、一層の農業従事者の減少と農業そのものの衰退が懸念される。そのため、高齢化が進行する現在において、高齢者のみならず若者が生活することができるような地域づくりが急務となっている。

当社が所在する福岡県田川郡川崎町（以下、川崎町）も同様の状況が問題視されている地方都市のひとつである。かつては炭鉱で栄えた町で、戦後にかけて炭田としての石炭産出量はわが国で最も多かったが、1950年以降のエネルギー革命などにより徐々に衰退し、1976年にはすべての炭鉱が閉山した。その後の主な産業は農業であり、現在では町の南部に果樹園や農地が分布している。

当社の関連会社である株式会社アスキー（以下、(株)アスキー）は、地元の農家を対象に、農業活性推進事業の一環として、官公庁と連携し2003（平成15）年からユズの苗木を川崎町の農家の方へ配布している。ユズの栽培を委託し、生産したユズを製品として流通させることで雇用と産業を創出することができる。この取り組みにより、ユズは川崎町の特産品のみならず、福岡県の特産品として認知されるようになった。この例に挙げるような、産官が連携を取り、農業活性を推進するプロジェクトは日本全国の過疎地域を中心に広がりつつある。

当社においても、この経験と実践例に倣い、生薬を通じた地域活性事業を立ち上げ、試験研究を行うため、実際にヒュウガトウキを生産し実証実験を行った。

Table2.2 Changes in key agricultural workers

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Key agricultural workers	175.7	158.6	150.7	145.1	140.4	136.3	130.2
Over 65 years old	114.0	103.1	100.1	98.7	97.9	94.9	90.5
Average age	67.1	66.8	66.6	66.6	66.8	67.8	ND

ND: Not announced as of January 2022

出所：農林水産省（2021）を参考に筆者作成

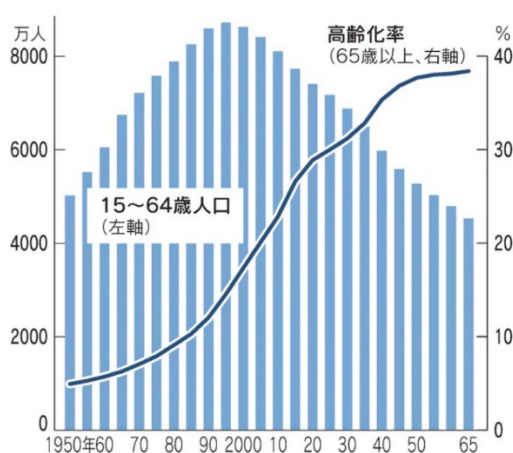


Fig. 2.2 Forecast of changes in the working-age population and aging rate in Japan

出所：国立社会保障・人口問題研究所（2017），日本経済新聞（2021年5月12日付）

### 2. 3. 1 ヒュウガトウキの栽培準備

本研究では、2013年よりヒュウガトウキ栽培のための実地調査に着手した。実際にヒュウガトウキの生産を行っている地域を独自調査し、訪問して現地の農家の方と意見交換会を行った。栽培は山地が中心であり低地栽培を行っているところはなかったようである。

また、薬用植物の栽培に関する研究を事業として行っている高知県立牧野植物園を訪問し、薬草学の講義を受け、当時園長であった水上元博士に助言頂きながらヒュウガトウキの栽培方法及び商品への応用、販売に至るまで、一連の流れについてディスカッションを行った。このような経験的知見及び植物学的知見をまとめると、ヒュウガトウキの栽培には次のような特徴があることが明らかとなった。

1. 自生の個体があることから無農薬での栽培が可能である。
2. 土壌の保水性が高いと根腐れしやすく、山地のように高低差があり水捌けのよい土地での発育が良好である。

3. ミネラル分が豊富な土壌が適している。
4. 冬期には低温や霜・雪などが原因で枯れるが温暖になると新芽が出る。
5. 地表部は枯れても根は健在であるため、繰り返し成長する。
6. 株分け<sup>20</sup>が可能である。

これらを参考に、Fig. 2.3 に示すような栽培歴を作成した。栽培初年度のヒュウガトウキの苗は、福岡県朝倉市の山地でヒュウガトウキを栽培している個人農家の方と生産業務提携契約を取り決め、280株を入手した。Fig. 2.4 は福岡県朝倉市の農場で栽培されているヒュウガトウキの様子である。(a)は山地に定植され、収穫可能な状態まで成長したものであり、(b)は種から発芽させ、定植後成長初期段階の苗である。

月	1			2			3			4			5			6			7			8			9			10			11			12		
旬	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下	上	中	下
生育相と作業	栽培1年目												定植																							
作業の内容	定植 ・基肥  ・条間：55～65cm ・株間：80cm						収穫 ・地表部を根に近い部分で刈り取る。根はそのまま植えておく。そうすることで年に2回収穫が可能。												株分け ・冬場には低温や霜が原因で根ごと枯れる株もある。 発育良好な株1つから約30株ほど苗として分けることが出来るので再度それを定植し栽培する。																	
	栽培2年目												収穫①						収穫②																	

Fig. 2.3 Cultivation method of *Angelica furcijuga* on company farmland<sup>21</sup>

出所：筆者作成

<sup>20</sup> 株分けをすることで一つの株から複数の苗を作ることができ、株分けされた個体も株が小さくなることで隙間があき、再び生育が良好となる。

<sup>21</sup> 年度毎の気候によって収穫の時期が前後する場合があるため、基本的には栽培歴の通りであるが変則的なものである。

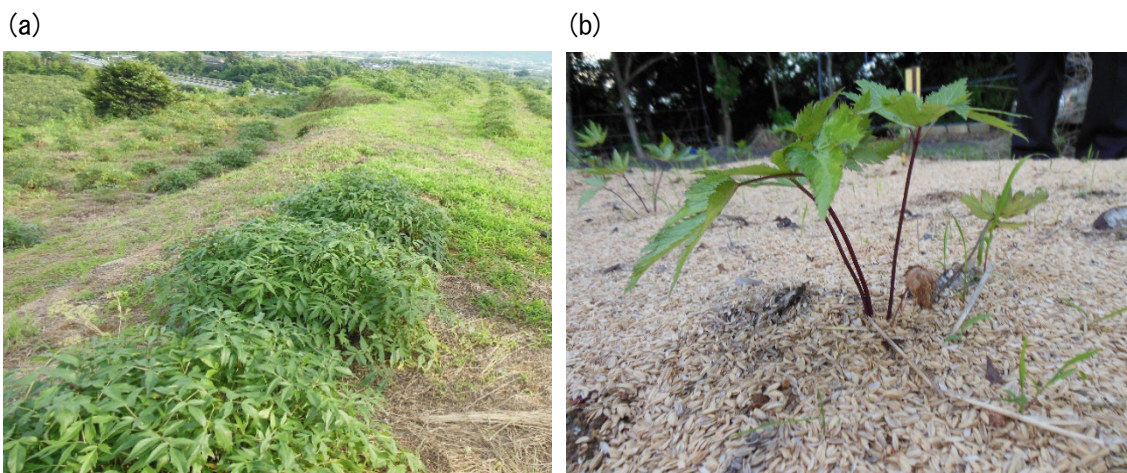


Fig. 2.4 *Angelica furcijuga* Farm (Asakura City, Fukuoka )

(a) State of mountain cultivation

(b) Seedlings immediately after sowing in the nursery

出所：マルボシ酢株式会社社内資料（2013年8月撮影）

次に、自社農地に定植する前段階の予備実験として、川崎町の気候におけるヒュウガトウキの発育状態を調査するため、小規模の実験用薬草園で試験栽培を行った。Fig. 2.5 に実験用畑の様子を示す。訪問した農地ではマルチをかけていなかったが、川崎町の気温は夏季の日中には $35^{\circ}\text{C}$ 近くまで上昇し、冬季の夜間には $-3^{\circ}\text{C}$ 程度まで下降することを考慮すると、Fig. 2.5 に示すような白黒マルチシートを用いることが適当であった。白黒マルチシートを季節ごとに適した使い方をすることで、害虫予防や高い遮光性による雑草抑制効果を呈するだけでなく、夏場は地温の上昇を抑制し、冬場は地温を確保することが可能である。ヒュウガトウキは元来、九州南部の比較的温暖な環境で良好に生育することから、通年の寒暖差による発育不良を懸念しての対策である。

Fig. 2.4(b)に示す程度の苗の状態から、収穫可能な大きさ（全重量約10kg）に成長するまでの期間は18か月ほどであった。





Fig. 2.5 当社付属研究所裏の実験用薬草園

出所：マルボシ酢株式会社社内資料（2014年10月撮影）

以上の結果から、実験用生薬園の近隣に位置し、土壌環境がおよそ同じ自社農地への本格的な試験栽培が可能であると判断し、農地整備を行った。Table2.3はヒュウガトウキの栽培農地に関する主要値であり、Fig. 2.6はその概略図である。自社農地は山地ではなく平地に立地しているため、水捌け対策を行う必要があった。したがって、農地全体の高さを25cm高くし、その上に畝を形成した。

次に、定植用の苗を作成した。前述の通りヒュウガトウキは280株であったため、一株当たり約30株に株分けし、定植用の苗を約8400株まで増やした。また、無農薬栽培を行うため、基肥に動物由来の肥料（牛糞・鶏糞）及びミネラル分を補充するため貝の粉末を使用した。その後約7800株を定植し、栽培を開始した。

Table2.3 Key values for cultivated farmland design

Width (m)	Vertical (m)	Number of ridges	Seedlings/ single row	Planting distance (cm)	Real number of planted seedlings
94	61.5	64	120	80	7788

出所：筆者作成

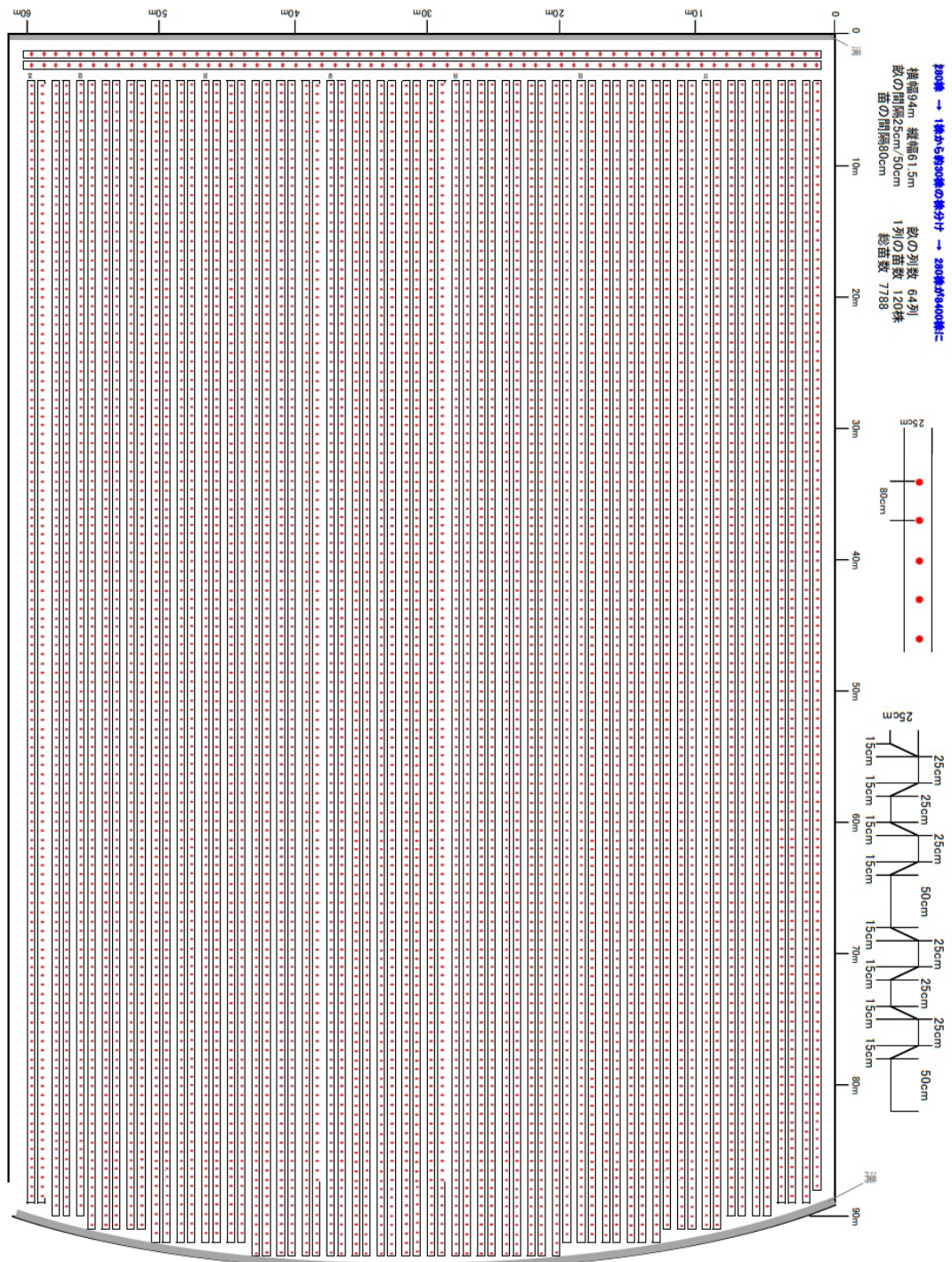


Fig. 2.6 Schematic diagram of *Angelica furcijuga*'s farmland

出所：マルボシ酢株式会社社内資料



### 2. 3. 2 試験栽培結果

試験栽培の結果、ヒュウガトウキは図 2.7 のように収穫可能な株へと生育した。Fig. 2.7(a)は自社農地を山側から撮影したもので、(b)はその逆側（町側）から撮影したものである。これを比較すると、山側に位置する畝ではヒュウガトウキの株は大きく生育しており、町側に位置する畝では個体差はあるものの山側よりは小さい株がみられた。この原因としては、栄養分の偏りよりも、水捌けや日照の当たり方などが場所により異なるため、地中の水分量に左右されたものと推察される。

(a)



(b)



Fig. 2.7 *Angelica furcijuga* cultivated on a trial basis at company farmland  
(a) Mountain side (b) City side

出所：マルボシ酢株式会社社内資料（2017年4月撮影）

次に、Fig. 2.8 は収穫したヒュウガトウキの個体の全体像である。最も生育している状態のものであり、平均して縦 50cm、横は広がった葉の端から端までを測定して 85cm 程度、重量は  $10.2 \pm 0.3$  kg であった<sup>22</sup>。

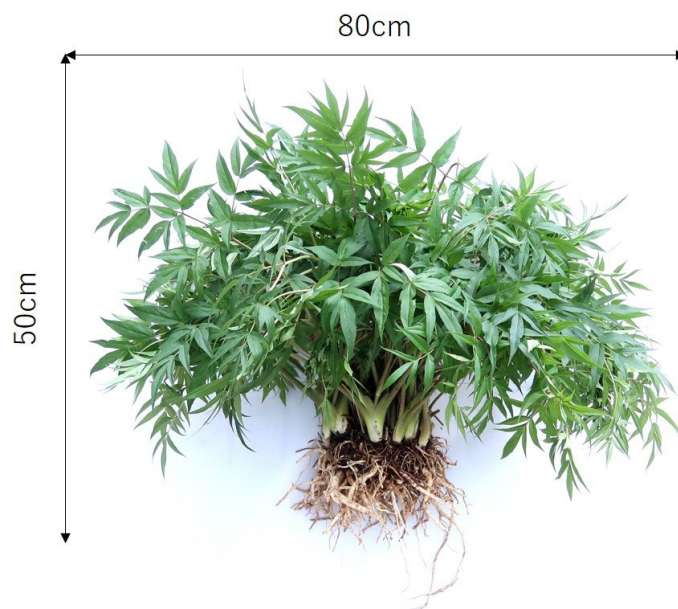


Fig. 2.8 *Angelica furcijuga* (grown in company farmland)

出所：マルボシ酢株式会社

自社農地のヒュウガトウキは年に2回、葉の収穫を行うことが可能であった。根は前述の通り生薬として認定されているので取り扱うことができない。しかしながらこの根が枯れない限り地表部の葉・茎・花は生育し、これらの部位にも薬効を持った機能性成分が含有されているため、生薬に近い健康食品として加工することが可能である。試験栽培では一度の収穫で約 3000kg のヒュウガトウキの葉等を収穫することができ、搾汁により収穫量の 10 分の 1 程度がヒュウガトウキの搾り汁として得られる。これを製品の原料として、商品開発をおこなった。

### 2. 3. 3 ヒュウガトウキの搾汁を用いた商品への応用例

近年、少子高齢化や新型コロナウイルスによる在宅ワークなどの社会環境の影響を受け、健康に気遣う人が増加している。ヒトの健康は睡眠や運動、そして食生活により保たれている。したがって、当社では、健康食品としての食酢に着目した製品開発をおこなった。

ビタミンやフラボノイドは酸性下において安定することから製品にした時の品質劣化防

<sup>22</sup> 生育したヒュウガトウキ 150 株の平均値である。

止に役に立つ。また、食酢成分の酢酸は特定保健用食品で知られるように血圧を下げる作用や、血糖値の上昇を抑える作用があることから、ヒュウガトウキの品質劣化による効能の低下を防ぎながら相乗効果による健康効果を発現することが期待される。

Fig. 2.9 は実際に当社で製造販売している、ヒュウガトウキが含有される製品である。図 2.9(a)は黒酢と山人参、(b)は黒酢ロイヤルである。この製品による健康効果について臨床的に明らかにすることが今後の課題であり、その基礎研究として原料に用いたヒュウガトウキの葉に含有される機能性成分について調査する必要があると考えられる。

(a)



(b)



Fig. 2.9 Products using *Angelica furcijuga*

(a) Kurozu to Yamaninjin (b) Kurozu Royal

出所：マルボシ酢株式会社ホームページ

## 2. 4 小括

本章ではヒュウガトウキの試験栽培に関する実証実験を行い、その結果について考察した。ヒュウガトウキは前述のとおり九州南部の温暖な山地で自生する薬用植物であり、人工的に栽培している地域や農家は未だ少ない。特定の環境でないと発育しない場合もあることが実際に栽培している農家の方からのインタビュー調査からも明らかになり、川崎町の気候でいかに条件を克服しながら栽培するかが課題であった。

まず水捌けの問題であるが、元々ヒュウガトウキは山地で良好に発育するという事は、水捌けが良い環境が好ましいと考察した。その環境を平地で再現するため自社農園の畝の基礎地盤を高くし、その上に通常の畝を作ることでこれを改善した。次に年間を通じた寒暖差の問題であるが、川崎町は盆地であり夏冬の寒暖差が大変大きい。したがってその影響を

最小限にするため通常は用いられていない白黒マルチを活用して季節ごとの気温に対する対策を講じた。その結果、およそ1年半で製品レベルのヒュウガトウキを栽培することに成功した。これを用いて製品の開発を行うと同時に、化学的アプローチからヒュウガトウキの葉の機能性成分を明らかにするため、葉を試料として様々な実験を行った。

## 第3章

# ヒュウガトウキからの機能性成分の抽出に関する 有機溶媒抽出法を用いた予備的実験

### 3. 1 はじめに

天然物の分離プロセスは、適当な溶媒による抽出から出発して、可能な限り不純物を取り除き目的の成分を濃縮しておくことから始まる（津田，1972）。有機溶媒抽出は分離技術の中でも古くから用いられてきた手法の一つである。近年は有機溶媒の持つ毒性や高い揮発性による大気汚染問題などの懸念から、極力これ以外の環境負荷低減に寄与する溶媒を用いた抽出技術の開発が進められているところである。

その一方で、天然物の精油抽出に関する分野では、有機溶媒を用いて抽出された製品が未だに存在している。例えば、業務用ユズ精油は高知県の販売業者の製品が市場の多くを占めているが、それらはヘキサンにより抽出されているものがスタンダードである。参考に当社が独自に調査した業務用ユズ精油の製造法や価格帯に関する情報を Table3.1 に示す<sup>23</sup>。ヘキサン抽出精油でもよいという顧客からは、水蒸気蒸留法やコールドプレス法により抽出された精油は費用対効果から受け入れがたく、逆に天然物の香りをほぼ損なわず品質が良いという理由からアロマオイルの原料ではコールドプレスによる製品の人気が高い。

食品に係る抽出の分野では、有機溶媒を用いることはほぼないが、低濃度のエタノールを溶媒とする場合もある。

Table3.1 The actual market of Yuzu essential oil for commercial use

	Hexane extraction	Steam distillation	Cold press
Quality	△	△	○
Yield	Almost 100%	Almost 100%	Less than 10%
Price/1kg	50,000～	60,000～	150,000～

出所：高水（2010）を参考に筆者作成

### 3. 2 目的とした機能性成分

#### 3. 2. 1 ケンフェロール (Kaempferol)

ケンフェロール (Kaempferol :  $C_{15}H_{10}O_6$ ) は図 3.2 に示すような天然フラボノールの一種である。疎水性物質であり、水にはほぼ溶解しないがエタノールやジメチルエーテルには可溶である。ケンフェロールの効能については、疫学的知見による先行研究が多数存在<sup>24</sup>し、ケンフェロールを摂取することでガンや糖尿病の疾患の発現リスクを低減することや、ケ

<sup>23</sup> 高水（2010）参照。

<sup>24</sup> Calderon-Montaño et al. (2011) 参照。



ンフェロール配糖体が抗炎症作用<sup>25</sup>や抗酸化作用<sup>26</sup>、抗うつ作用<sup>27</sup>を呈することなどが明らかになっている。

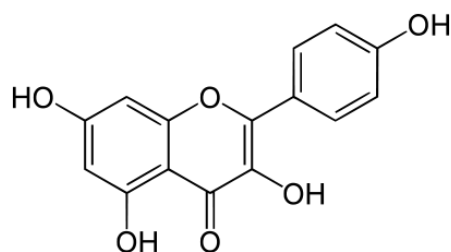


Fig. 3.1 Structural formula of kaempferol

### 3. 2. 2 フェルラ酸 (Ferulic acid)

フェルラ酸 (Ferulic acid :  $C_{10}H_{10}O_6$ ) はモノフェノールのフェノール性化合物である桂皮酸誘導体である。Fig. 3.2 にその構造式を示す。また、ワインやビール等の酒類の芳香性化合物の合成前の前駆体として知られている。Table3.2 は酒類中のフェノール化合物の香りを示したものである。これらはフェルラ酸から出発して酵素による脱炭素反応後 4VG になり、更に還元酵素の作用で 4EG 等に変化する (酒類総合研究所, 2015)。

フェルラ酸はフェノール類と同様に抗酸化作用があり、その他にも癌に対する抗腫瘍活性作用などがある<sup>28</sup>。

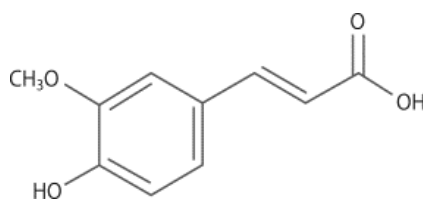


Fig. 3.2 Structural formula of ferulic acid

<sup>25</sup> Park et al. (2009) など参照。

<sup>26</sup> Ozgová et al. (2003) など参照。

<sup>27</sup> Hou et al. (2010) など参照。

<sup>28</sup> Giacomazza et al. (2015) など参照。

Table3.2 Aroma of phenolic compounds in alcoholic beverages (beer and wine)

	Concentration[ppm] (Red wine)	Concentration [ppm] (Beer)	Sensory descriptor
4-Vinylphenol	8.8-43	ND-69	Phenolic, medicinal (フェノール, 薬品系)
4-Vinylguaiacol(4VG)	0.2-15	ND-258	Clove-like (クローブ様)
4-Ethylphenol	118-3696	63-1130	Medicinal, horsy (薬品系, 馬小屋臭)
4-Ethylguaiacol(4EG)	1-432	427-5770	Spicy, clove-like (スパイシー, クローブ様)
4-Ethylcatechol	27-427	ND	Phenolic, medicinal (フェノール, 薬品系)

出所：酒類総合研究所(2015)；Steese et al. (2015)；Curtin et al. (2006)；  
Witrick et al. (2012) を参考に筆者作成

### 3. 2. 3 リグスチリド (Ligustilide)

リグスチリド (Ligustilide :  $C_6H_{12}O_2$ ) は芳香成分の一種であり、セリ科の植物の精油に含有され、日本薬局方に登録されているトウキの生薬成分のひとつである。リグスチリドの構造式を Fig. 3.3 に示す。化粧品として認定されているトウキ根エキス<sup>29</sup>においてはその主成分である。リグスチリドの代表的な効能として血管拡張作用<sup>30,31</sup>があり、それにより血液循環が上昇することで、冷え性などが改善されることが認められている<sup>32</sup>。また、北野ら(2015)は、トウキ (*Angelica acutiloba*) の葉には根と同様にフタライド類のリグスチリドが含有されていることを明らかにしている。

<sup>29</sup> 化粧品成分オンラインより「トウキ根エキス」参照。

<sup>30</sup> Chan et al. (2007) 参照。

<sup>31</sup> Yorozu et al. (1993) 参照。

<sup>32</sup> 北野・永澤 (2016) 参照。

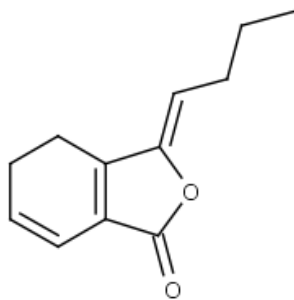


Fig. 3.3 Structural formula of Ligustilide

### 3. 2. 4 ブチリデンフタライド (Butylidenephtalide)

ブチリデンフタライド (Butylidenephtalide :  $C_{12}H_{12}O_2$ ) はリグスチリドと同様に精油成分に含まれるフタライド誘導体である。これもリグスチリドと同様、トウキの生薬成分の一つとして登録されている。ブチリデンフタライドの構造式を Fig.3.4 に示す。ブチリデンフタライドの効能はリグスチリドと類似している。

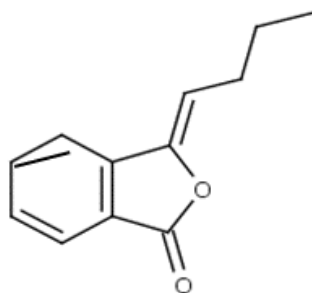


Fig. 3.4 Structural formula of Butylidenephtalide

## 3. 3 実験方法

### 3. 3. 1 試料

本実験ではヒュウガトウキの葉を試料とした。また、実際に製品として取り扱うことはできないが、生薬として用いられている根と機能性成分の含有量を比較するため、根にも同様の実験を行うこととした。

#### 3. 3. 1. 1 試料の計測

Fig. 3.5 の(a)~(e)は自社農園で栽培されたヒュウガトウキを5株収穫したものである。地表部の収穫を行ってから日にちが経過していないため、全長や重量は小さいものである

が、最初の定植から数回収穫を終えた株であるため、根の発育状態は完全に成長した個体と相違はないものと判断した。Table3.3 はそれぞれの重量を示している。

(a)

(b)



(c)

(d)



(e)



Fig. 3.5 Plants of *Angelica furcijuga* (January 2020)

(a) Sample A (b) Sample B (c) Sample C (d) Sample D (E) Sample E

Table3.3 Weight of each sample

Sample name	A	B	C	D	E
Weight (kg)	2.25	1.96	4.75	3.75	2.06

出所：筆者作成

### 3. 3. 1. 2 試料の前処理

各ヒュウガトウキの葉及び根をそれぞれ 48 時間凍結乾燥した。その後ミルを用いて粉碎し、抽出実験用の試料とした。凍結乾燥の装置を Fig. 3.6 に示す。凍結乾燥は、試料の持つ成分を損なうことなく、なおかつ試料の形状を細かくすることが容易であるという利点がある。また、試料を真空保存することで長期間の保存が可能である。したがって収穫当初の試料の状態をできる限り変化させずに保存するには最も適した前処理方法であると考えられる。

次に、Table3.4 は(a)葉及び(b)根の凍結乾燥後の試料の重量を比較したものである。凍結乾燥後の葉の重量は元の重量の 16%程度、根の重量は元の重量の 30%程度まで減少した。

(a)



(b)



Fig. 3.6 lyophilization as pre-treatment

(a) Freeze-drying of the leaves of *Angelica furcijuga*

(b) Vacuum freeze drying equipment FDU-1200 (EYELA, USA)

Table3.4 Weight comparison after freeze-drying

(a) Leaves

Sample Name	A	B	C	D	E
Before drying (kg)	144.75	124.88	135.30	161.10	142.90
After drying (kg)	24.60	19.70	24.00	25.70	21.30

### (b) Roots

Sample Name	A	B	C	D	E
Before drying (kg)	1000.53	981.38	1992.84	1620.45	1028.40
After drying (kg)	302.66	293.43	597.85	405.11	318.80

出所：筆者作成

### 3. 3. 2 有機溶媒の選定

本研究では次の4種類の有機溶媒を用いて抽出実験を行った。

1. Ethanol :  $C_2H_5OH$  (99.5%) (Wako, Japan)
2. Methanol :  $CH_3OH$  (99.5%) (Wako, Japan)
3. Hexane :  $CH_3(CH_2)CH_3$  (96%) (Wako, Japan)
4. Toluene :  $C_6H_5CH_3$  (99.5%) (Wako, Japan)
5. Dimethyl ether :  $C_6H_4(OCH_3)_2$  (99.5%) (Wako, Japan) : Methanol=7 : 3<sup>33</sup>

前述の通り、ヘキサンは天然物からの精油の抽出などに多く用いられている溶媒である。また、エタノールはグリーン溶媒抽出を行った際の共溶媒として使用されることが多く、有機溶媒の中でも比較的毒性が低い。そのため、生薬からのエキス分抽出の溶媒としても認められている。メタノールやトルエンは残留溶媒の除去の煩雑さや毒性などを考慮すると、食品に係る抽出では使用することが想定されない有機溶媒であるが、目的成分の効果的な抽出のため参考試験的に用い、その抽出挙動を観察した。

### 3. 3. 3 高速液体クロマトグラフィーを用いた機能性成分の定量法

有機溶媒抽出後、高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography : HPLC)を用いて目的成分の分析を行った。

抽出物は、フォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M10A) を備えた HPLC LC-10AD グラジエントシステム (SHIMADZU, Japan) を使用して分析した。Fig. 3.7 に HPLC のシステムを示す。カラムは Inertsil ODS-3 カラム(5 $\mu$ m, 4.6mm $\times$ 250mm, GL Science, Japan) を使用した。移動相は、溶媒 A として 0.1%酢酸水及び溶媒 B としてアセトニトリル/水(75/25, v/v)で構成した。グラジエント溶出は、0分 A-B(88:12), 18分 A-B(78:22), 28分 A-B(72:28), 35分 A-B(62:38), 48分 A-B(52:48), 58分 A-B(0 : 100)及び70分 A-B(88:12)であり、流速は1.0ml/分である。標準物質はケンフェロール(K0117, LKT Labs, Inc, USA), フェルラ酸(F1669, LKT Labs, Inc. USA), リグスチリド(L397900, Toronto Research Chemicals

<sup>33</sup> Ito H. and Horie H. (2009)

Inc. , USA)及びブチリデンフタライド(W333301, Sigma-Aldrich Japan, Japan)である。

そして、抽出物中のケンフェロール、フェルラ酸、リグスチリド、及びブチリデンフタライドの含有量測定のため、吸収波長をそれぞれ 367nm, 322nm, 326nm, 及び 310nm に設定した<sup>34</sup>。



Fig. 3.7 HPLC system

### 3. 4 結果と考察

#### 3. 4. 1 葉に含有される目的成分

##### 3. 4. 1. 1 ケンフェロール (Kaempferol)

Fig. 3.8 は葉に含有されるケンフェロールの推移をサンプルごとに示したものである。A においてはどの溶媒においてもケンフェロールが検出されなかった。有機溶媒毎の抽出挙動に着目すると、ヘキサンとメタノール、7:03 溶媒において微量に確認することができたが、全体量としては少ないことが明らかになった。

<sup>34</sup> 国立科学博物館ホームページより「フラボノイドコレクション」, 日光ケミカル (2006), Lee et al. (2010)等参照。



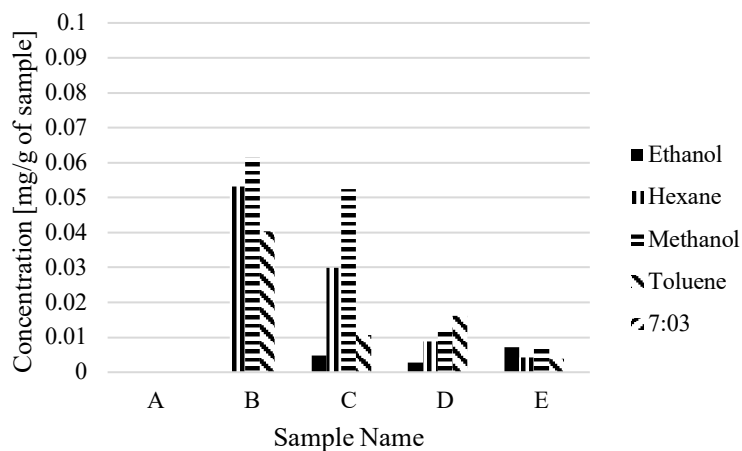


Fig. 3.8 Kaempferol content (leaves)

出所：筆者作成

### 3. 4. 1. 2 フェルラ酸 (Ferulic acid)

Fig. 3.9 は葉に含有されるフェルラ酸の推移をサンプルごとに示したものである。エタノールと 7:03 溶媒では少量の抽出量であったが、ヘキサンやメタノール、トルエンでは一定量含有されていることがわかった。エタノールは親水性の溶媒であり、一方で水と油という言葉がある通り、水とヘキサンの相互溶解度は低いことから、フェルラ酸は疎水性の物質であり親油性の溶媒への溶解度が高いことがうかがえた。

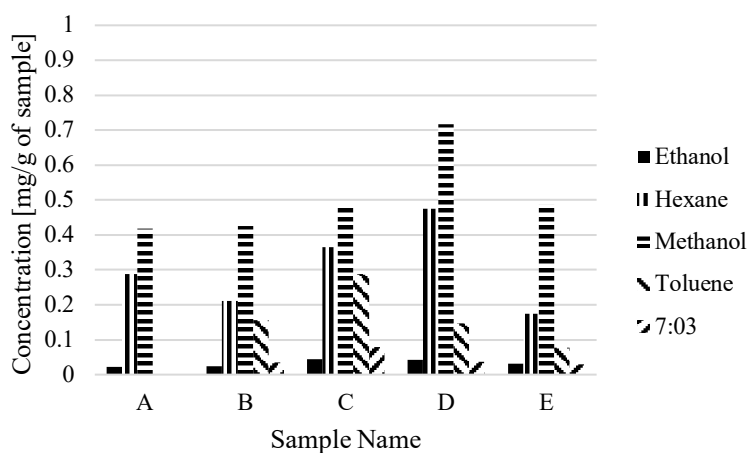


Fig. 3.9 Ferulic acid content (leaves)

出所：筆者作成



### 3. 4. 1. 3 リグスチリド (Ligustilide)

Fig. 3.10 は葉に含有されるリグスチリドの推移をサンプルごとに示したものである。この成分は薬局方に登録されているトウキの主な生薬成分であることは前述のとおりである。この結果から、リグスチリドは根のみならず葉にも多く含有されていることが明らかになった。また、いずれの有機溶媒にもよく溶けることから、溶媒の極性を問わず一定量溶解する成分であることも示唆された。すなわち、二酸化炭素などの無極性分子に対しても溶解することが期待される。特にエタノールに多く溶解していることから、水などの極性が高い溶媒への相互溶解力は高いものと推察される。

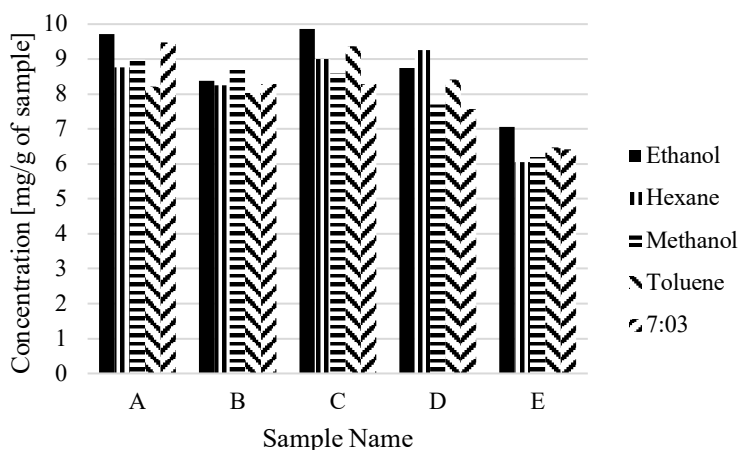


Fig. 3.10 Ligustilide content (leaves)

出所：筆者作成

### 3. 4. 1. 4 ブチリデンフタライド (Butylidenephtalide)

Fig. 3.11 は葉に含有されるブチリデンフタライドの推移をサンプルごとに示したものである。リグスチリドと共にトウキの生薬成分として登録されているが、葉にはリグスチリド程は含有していないことが示された。また、エタノールとトルエンによく溶けており、これら2つの有機溶媒は極性が異なることからブチリデンフタライドもまた、幅広い極性の溶媒に溶解する成分であることが示唆された。

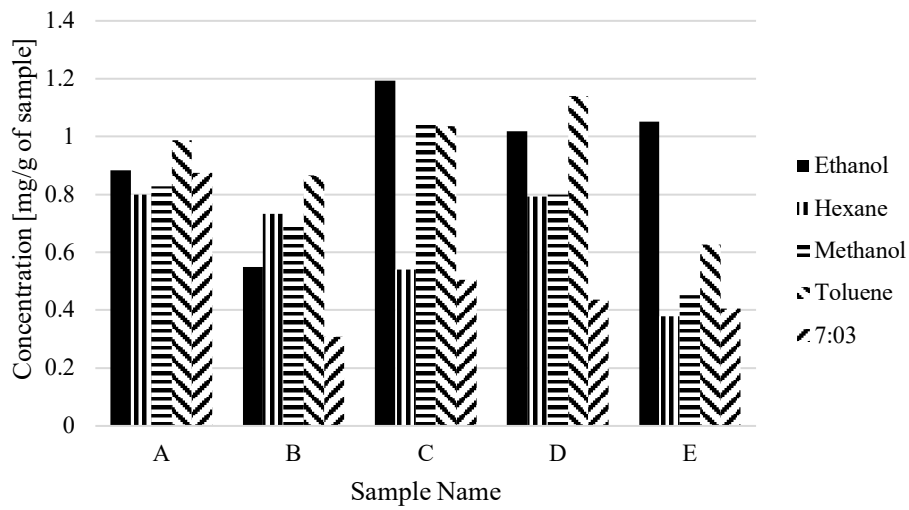


Fig. 3.11 Butylidenephthalide content (leaves)

出所：筆者作成

### 3. 4. 2 根に含有される目的成分

#### 3. 4. 2. 1 ケンフェロール (Kaempferol)

Fig. 3.12 は根に含有されるケンフェロールの推移をサンプルごとに示したものである。これをみると、いずれの試料にもほとんど含有されていないことがわかった。メタノールやトルエンには少しだけ溶解しているがほぼ0に等しいといってよい。

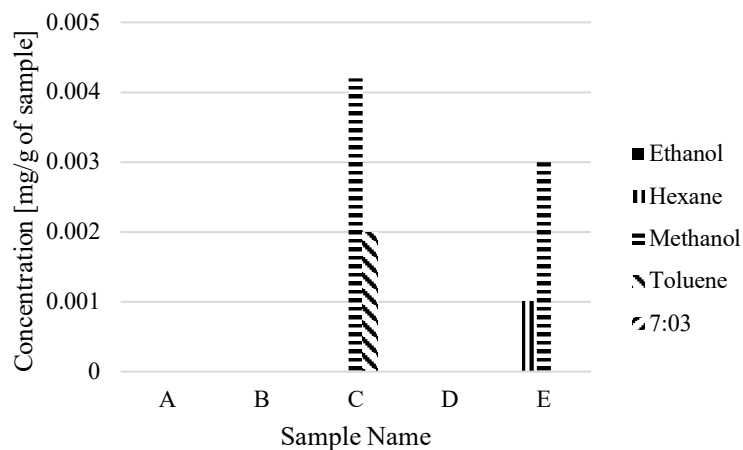


Fig. 3.12 Kaempferol content (Roots)

出所：筆者作成

### 3. 4. 2. 2 フェルラ酸

Fig. 3.13 は根に含有されるフェルラ酸の推移をサンプルごとに示したものである。これをみると、全体的に同程度含有されている様子がうかがえ、ヒュウガトウキの個体差による影響はほとんどみられない。ただし、葉の場合と異なりエタノールに最も溶解していることから、これについては今度再度検討する必要があるものと考えられる。

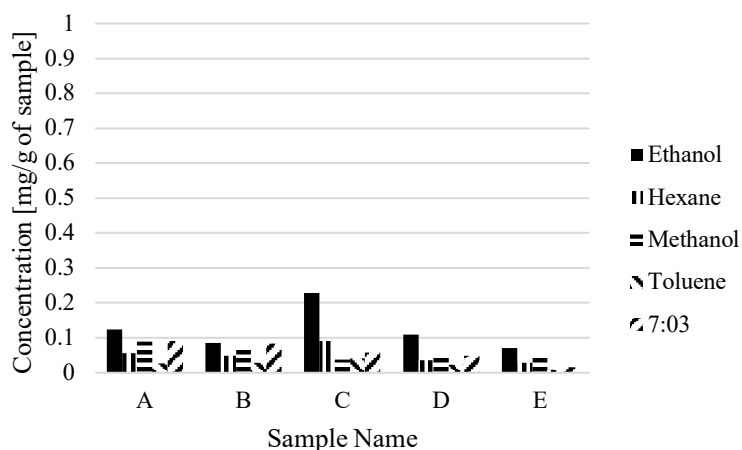


Fig. 3.13 Ferulic acid content (Roots)

出所：筆者作成

### 3. 4. 2. 3 リグスチリド (Ligustilide)

Fig. 3.14 は根に含有されるリグスチリドの推移をサンプルごとに示したものである。生薬主成分であるため、根と同様に最も多く抽出された。有機溶媒の種類を問わず一定量回収できている挙動も葉と同様であった。

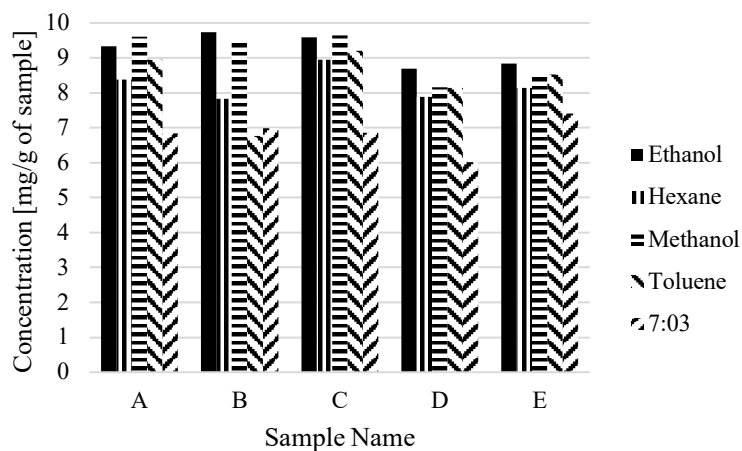


Fig. 3.14 Ligustilide content (Roots)

出所：筆者作成

### 3. 4. 2. 4 ブチリデンフタライド (Butyridenephtalide)

Fig. 3.15 は根に含有されるブチリデンフタライドの推移をサンプルごとに示したものである。この成分についても葉と抽出挙動が類似しており，溶媒の種類を問わず一定量回収できていた。

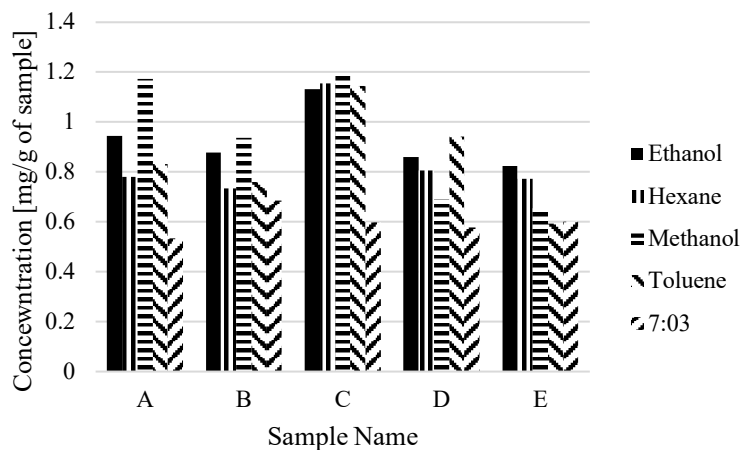


Fig. 3.15 Butyridenephtalide content (Roots)

出所：筆者作成

### 3. 4. 3 葉と根の目的成分の含有量の比較

次に，葉及び根に含有されている目的成分の比較を行った。サンプルは葉においても根においても抽出挙動の著しかったCの値を用いた。Fig. 3.16 にその結果を示す。Fig. 3.16 の(a)はケンフェロール，(b)はフェルラ酸，(c)はリグスチリド，最後に(d)はブチリデンフタライ

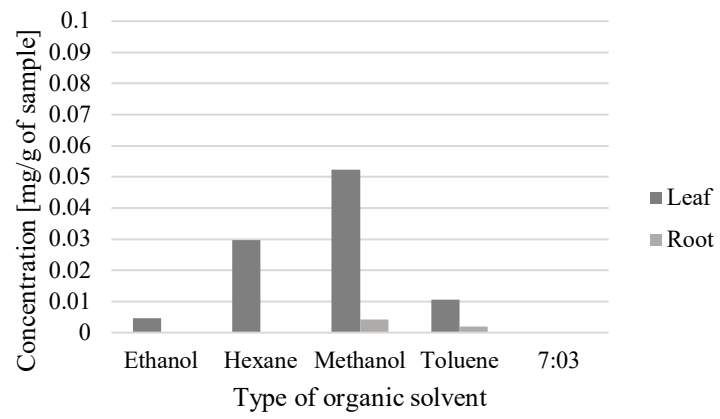
ドである。

まず、(a)のケンフェロールをみてみると、全体量は少ないものの根よりも葉に多く含有されていることがわかる。このことからケンフェロールは葉固有の成分である可能性があり、効率的な抽出法を採用し回収量を向上させていくことでヒュウガトウキの葉の独自成分としての希少価値が高くなることが期待される。これについては今後検討していく必要があると考えられる。

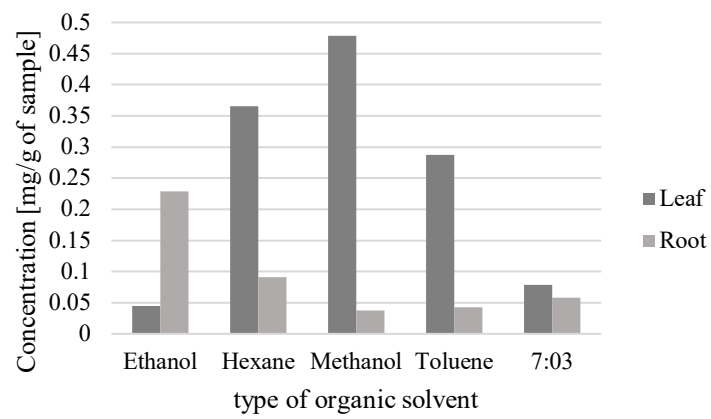
次に(b)のフェルラ酸についてみてみると、根よりも葉に多く含有されていることがわかる。しかしながら極性が低く人体に取り入れると害を及ぼす溶媒による抽出で得られているため、これに代わる人体に無害な溶媒での抽出が望まれる。

そして(c)及び(d)のフタライド類には類似した傾向がみられる。有機溶媒の種類を問わず成分抽出が実現されていることと、根と葉ではその含有量に大きな差がないという点である。つまり、医薬品であるがゆえに取り扱うことができない根と、加工して製品にすることができ、取り扱いの制限がない葉とでは同様の効果が得られる可能性があるということである。したがって、ヒュウガトウキの葉は生薬同等物の効果を持つといえ、人体へ良い影響を与え、生薬のような役割で応用することができることが示唆された。

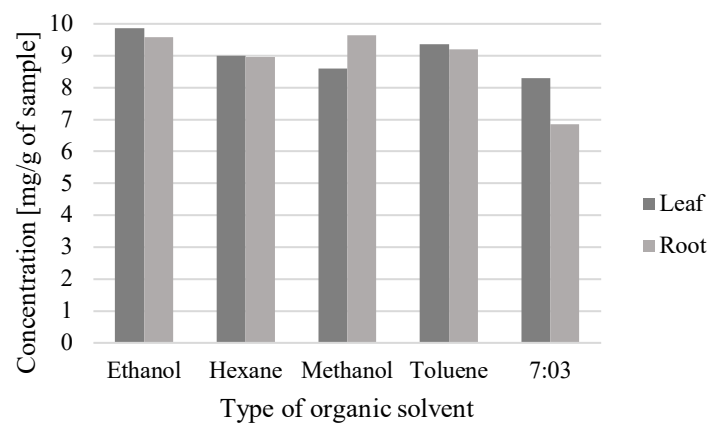
(a)



(b)



(c)



(d)

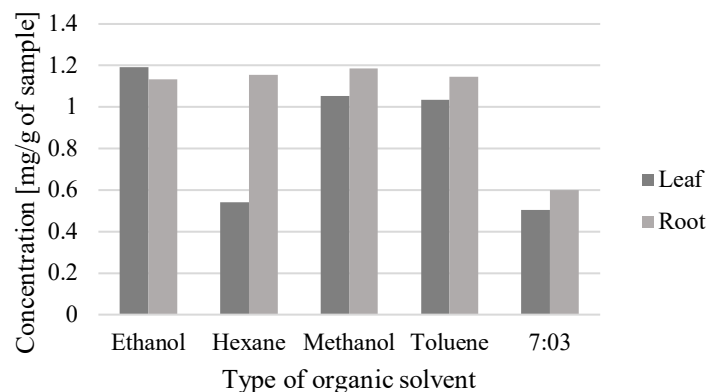


Fig. 3.16 Comparison of functional ingredients contained in leaves and roots  
(a)Kaempferol (b)Ferulic acids (c)Ligustilide (d) Butylidenephthalide

出所：筆者作成

### 3. 5 小括

本章ではヒュウガトウキの葉と根に有機溶媒抽出を行い、目的とする機能性成分がどの程度含有されているのかを明らかにした。その結果、ケンフェロールは葉においても根においても含有量は少なかったものの、根には全くといってよいほど含まれておらず、葉にのみ確認された。したがって、ケンフェロールは葉固有の機能性成分として期待される。次に、フェルラ酸においては、葉に根の約3倍量含有されており、フタライド類については葉も根もほぼ同じ量含有されていた。また、溶媒の極性の異なりによって、目的成分の相互溶解力に偏りがあるものの、主成分であるフタライド類については幅広い極性の溶媒に溶解する可能性が示唆された。

## 第4章

# 天然物からの精油抽出のための 超臨界二酸化炭素抽出に係る 段階的な圧力制御アプローチの影響



#### 4. 1 はじめに

植物の皮，葉，茎は実と比較すると水分量及び糖分が少なく，更に常に外気にさらされているため外的要因から自身を保護するためのフラボノイド類やアルカロイド類などのいわゆる薬効成分が多く含まれている。ヒュウガトウキの茎や葉も同様であり，薬効成分のうち主成分とされているのが精油成分であるフタライド類（リグスチリド，ブチリデンフタライド）である。

生薬の中には，柑橘類の皮を原料としているものも多く存在している。チンピ（陳皮：*Citrus unshiu peel*）は成熟したウンシュウミカン（*Citrus unshiu*）もしくはマンダリンオレンジ（*Citrus reticulata*）の果皮を乾燥させたものであり，トウヒ（橙皮：*Bitter Orange Peel*）はダイダイ（*Citrus aurantium*）の果皮を乾燥させたものである。特にダイダイは柑橘類の中でも果皮が厚く繊維質と細胞壁が硬いことから機能性成分を抽出することが技術的に難しく，更に果皮の周りにペクチンがあるため，油分との分離がしにくい。したがって，ダイダイの果皮から精油成分を抽出する技術はヒュウガトウキの機能性成分の抽出へ応用することができる。したがって本研究ではまずダイダイの果皮に対する抽出実験を行うこととした。図 4.1 はダイダイの冷凍果皮である。



Fig. 4.1 *Citrus aurantium* peel (frozen storage)

ダイダイは広島県，静岡県，和歌山県で主に栽培されており<sup>35</sup>，12月から1月にかけて収穫される。果汁はその独特で風味豊かな香りを有するため，調味料などの食品に使用される。柑橘系の精油のほとんどは，果汁の製造プロセス（搾汁）の副産物として収集されている。ダイダイはウンシュウミカンなどの柑橘に比べて生産量が少ないため，精油を商業規模で回収することはできない。その一方で，実験室規模で水蒸気蒸留法やコールドプ

<sup>35</sup> 農林水産省（2021）参照。

レス法を用いた抽出に関する先行研究がある<sup>36</sup>。柑橘類の精油に含まれる芳香族成分は、モノテルペン(Monoterpene)、セスキテルペン(Sesquiterpene)及び酸素化合物である。リモネンなどのモノテルペンは香りの一部を占め、一方でセスキテルペンやいくつかの酸素化合物は柑橘類の香りや風味に関わる成分である。コールドプレス法により得られたダイダイの精油の特徴的な芳香成分は、GC-olfactometry と官能分析を使用して調査されている。

柑橘類の皮は前述の通り生薬として用いられることから、皮から得られる精油には、薬用効果が期待される<sup>37</sup>。先行研究では、中枢神経系作用、抗不安作用及び鎮静作用、コリンエステラーゼ阻害作用などの薬効に関して考察されている。

精油などの天然化合物について、ここまで述べた手法以外に超臨界流体による抽出が多くなされている。超臨界流体は液体のような密度と気体のような粘度を持つため、高い溶解力及び輸送能力を兼ね備えた環境負荷低減に寄与する溶媒として認識されてきた。特に芳香化合物などの熱的不安定な成分に適した臨界温度であるため、超臨界流体の中でも二酸化炭素が最も好ましい。二酸化炭素は容易に入手可能で無毒である。更に従来の有機溶媒抽出とは異なり、SC-CO<sub>2</sub>は溶媒の除去が容易であるばかりか抽出物に有害な残留溶媒への懸念がない。したがって特に食品や飲料など経口摂取を想定した天然由来の成分について適した溶媒であるといえる。先行研究ではオレンジ<sup>38</sup>、グレープフルーツ<sup>39</sup>、ベルガモット<sup>40</sup>、ウンシュウミカン<sup>41</sup>、ユズ<sup>42</sup>及びユズとカボス<sup>43</sup>などの柑橘の果皮に対し、半連続式フローによるSC-CO<sub>2</sub>抽出を行う前に、乾燥・粉碎などの前処理が施されている。

本章では、段階的な圧力制御アプローチにより、ダイダイの精油を効率的に抽出する手法について検討した。試料として生のダイダイの果皮を前処理せずに使用し、半連続抽出法と比較し、最適な抽出条件について調査した。

## 4. 2 実験方法

### 4. 2. 1 試料と化学材料

試料のダイダイは、以前福岡県で収穫されたものを-20℃で保管していたものである。ダイダイの果皮は冷凍真空保存をしておけば時間の経過に伴う味・香り・油分の劣化・タ

---

<sup>36</sup> Maekawa et al. (1967); S. M. Njoroge et al. (1994); R. Tundis et al. (2012); H. S. Song et al. (2000); S. Deterre et al. (2012); A. Pultrini et al. (2006) 参照。

<sup>37</sup> R. Tundis et al. (2012); A. Pultrini et al. (2006); Carvalho-Freitas et al. (2002) 参照。

<sup>38</sup> B. Mira et al. (1996); A. Berna et al. (2000) 参照。

<sup>39</sup> M. Poiana et al. (1998) 参照。

<sup>40</sup> M. Poiana et al. (1999) 参照。

<sup>41</sup> C. H. Lee et al. (2001) 参照。

<sup>42</sup> M. Sawamura et al. (1989) 参照。

<sup>43</sup> T. Suetsugu et al. (2013a); T. Suetsugu et al. (2013b) 参照。

ンパクの変性などはかなり抑えられる。柑橘果汁専門メーカーの(株)アスキーによれば-20°Cで保存していた場合、少なくとも5年間、製品劣化はないとのことであった。果皮は厚さ約2.4mmのアルベド(果皮の白色部)を含むフラベド(果皮の黄色部)を分離するスキニングマシン(KR-ROBO-03, ミツワ株式会社, 日本)を使用し自動的に削り取った。それを気密包装用ビニール袋に入れ、抽出実験が行われるまで凍結保存した。試料には前乾燥処理を行わず、含水率は約80wt%であった。抽出実験の前に、試料を室温まで自然解凍した。また、溶媒として二酸化炭素(99.9%)(Uchimura Kouso, Japan)を用いた。

#### 4. 2. 2 精油抽出実験

##### 4. 2. 2. 1 水蒸気蒸留法

試料約40gを細かく刻み、1Lの丸底フラスコに500mLの蒸留水と合わせ入れた。その後、リービッヒ冷却器を使用するため、試料入りフラスコを装置に接続した。蒸留は100°Cの温度で24時間行った。水蒸気蒸留によって得られたウェットピールの平均油含有量は1.42%であった。

##### 4. 2. 2. 2 半連続超臨界二酸化炭素抽出

実験装置はFig. 4.2の概略図に示す半連続流SC-CO<sub>2</sub>抽出装置(AKICO Co. Ltd, Japan)を使用した。高さ20cm, 内径7cmの500mL抽出器に約80gのダイダイ果皮を充填した。サイフォンが取り付けられたシリンダーからの液体CO<sub>2</sub>は0°Cに保持された冷却器を通過し、圧縮されたCO<sub>2</sub>を、サーモスタットヒーターで覆われた抽出器に流入させた。液体CO<sub>2</sub>の供給圧力は、背圧弁(Back Preparation Regulator : BPR)1によって制御され、抽出器内の圧力はBPR2によって制御された。抽出器から排出される流体は、BPR3によって2MPa及び0°Cに制御され、分離される。CO<sub>2</sub>流量は、流量計と乾式ガス計で測定した。精油の抽出条件はTable4.1に示すとおりである。分離回収した精油は回収直後に計量した。

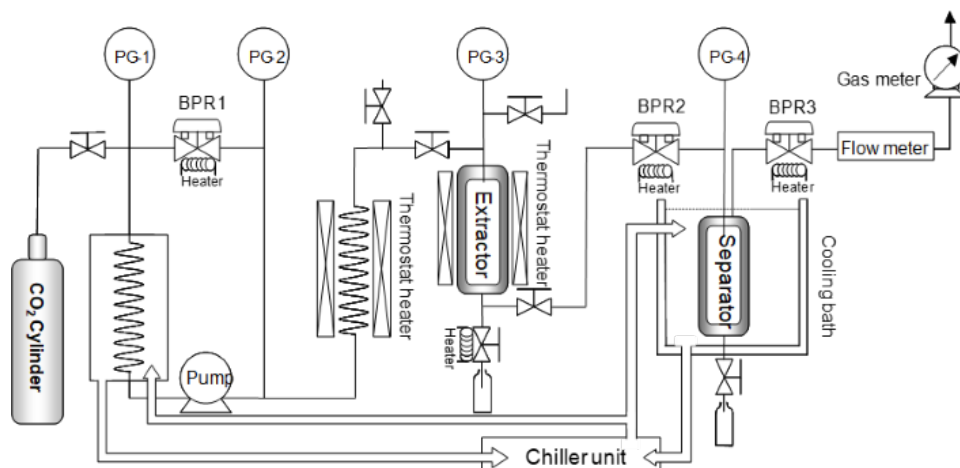


Fig. 4.2 Schematic diagram of semi-continuous SC-CO<sub>2</sub> extractor

出所 : Hoshino et al. (2020)

Table 4.1 Experimental conditions

Temperature [°C]	: 40, 60, 80
Pressure [MPa]	: 10, 20, 30
Reaction time [min]	: 60, 120, 180, 240, 300
CO <sub>2</sub> Flow rate [g/s]	: 0.95~1.05

出所 : 筆者作成

#### 4. 2. 2. 3 段階的な圧力制御による超臨界二酸化炭素抽出

実験装置、実験条件及び試料は 4.2.2.2 と同様である。液体 CO<sub>2</sub> を目的の抽出条件になるまで抽出器に保持した。圧力は、一連の加圧期間、静的な高圧期間、及び減圧期間により段階的に制御し、静的な高圧期間では液体 CO<sub>2</sub> の流れを停止し、その保持時間を 10 分、15 分、30 分、60 分及び 90 分に設定した。CO<sub>2</sub> が抽出器内の試料に浸透するまでの保持時間が経過した後、分離器で精油を収集しつつ、装置の温度及び圧力を減圧させた。これらの一連の段階的な加圧→静的な→減圧行程は実験条件の範囲で 6 回実行した。

精油の回収率 (%) は、以下に示すように、水蒸気蒸留によって得られた精油の重量あたりの抽出された精油の重量として定義した。

$$\text{Yield (\%)} = (\text{Weight of extracted oil}) / (\text{Weight of steam distilled oil}) \times 100$$

#### 4. 2. 2. 4 精油のガスクロマトグラフィー質量分析

SC-CO<sub>2</sub> 抽出と水蒸気蒸留によって得られたエッセンシャルオイルをガスクロマトグラフ

イー(Gas Chromatography-Mass Spectrometry : GC-MS)を用いて分析した。GC-MSは Agilent5975 質量選択検出器と HP-5MS カラム(30 x 0.25 mm(5%-フェニル)-メチルポリシロキサンカラム, 膜厚 x0.25 $\mu$ m)を備えた Agilent 7890N シリーズガスクロマトグラフ(Aglient Technology, USA)を使用した。

### 4. 3 結果と考察

#### 4. 3. 1 精油成分

SC-CO<sub>2</sub>で抽出された精油のGC-MSクロマトグラムから明らかになった成分を水蒸気蒸留で得られた成分と比較した。SC-CO<sub>2</sub>で得られた精油のGC-MSでは約76のピークが観察された。超臨界流体抽出と水蒸気蒸留の間の精油の組成はわずかに異なり、SC-CO<sub>2</sub>抽出によって得られた精油には、リモネンとリナロールが多く含有され、 $\alpha$ -ピネン、ミルセン、 $\gamma$ -テルピネン、及び $\alpha$ -ファルネセンの含有量は低かった。同じ柑橘系の果物について、先行研究で報告されている成分はほぼ同じのものであった<sup>44</sup>。柑橘類の収穫時期、産地、品種、成熟度の違いを考慮したところ、この組成と含有量に大きな違いは確認されなかった。

以前の研究において、Menichini et al.はシトラス(*Citrus medica L.cv*)の亜種であるディアマンテシトラスの水蒸気蒸留、コールドプレス抽出及びSC-CO<sub>2</sub>抽出により得られた精油の比較を行った。その結果、水蒸気蒸留とコールドプレスの間で精油の組成は類似していたが、SC-CO<sub>2</sub>抽出によって得られた精油の成分は他の手法により得られたそれと組成が著しく異なっており、精油の成分がほとんど含有されていなかった。SC-CO<sub>2</sub>抽出の場合、85%はシトロペンであったが、コールドプレスによる精油では2.5%程度であった。この違いの理由として考えられることは、抽出後の精油回収方法の影響である。すなわち、揮発性成分は超臨界状態のCO<sub>2</sub>の流れから収集容器に収集することができなかったということである。そこで本研究においては、回収部分の設計を慎重に行った。

---

<sup>44</sup> Maekawa et al. (1967)によれば、コールドプレス抽出により得られた柑橘の精油にはリモネン86.23%、 $\alpha$ -ピネン5.50%、ミルセン1.60%、カプリルアルデヒド1.93%、リナロール0.52%が含有されている。次にDeterre et al. (2012)はリモネン90.47%、 $\alpha$ -ピネン1.21%、 $\beta$ -ピネン0.21%、ミルセン4.37%、リナロール0.66%含有されているとし、Tundis et al. (2012)は水蒸気蒸留法により得られた精油についてリモネン65.8%、 $\alpha$ -ピネン1.8%、 $\beta$ -ピネン0.3%、ミルセン2.9%、オシメン0.3%、 $\gamma$ -テルピネン0.1%、リナロール1.8%、 $\beta$ -カリオフィレン0.3%が含有されているとした。また、Pultrini et al. (2006)はリモネン97.83%、ミルセン1.43%、オクタナール0.45%が含有されていることを明らかにしている。

#### 4. 3. 2 半連続超臨界二酸化炭素抽出による予備的研究

次に Fig. 4.3 に、様々な温度及び圧力条件下で 300 分間の半連続 SC-CO<sub>2</sub> 抽出法によるダイダイ果皮の精油抽出物の収量を示す。抽出温度の上昇に伴い、収量は増加し、80℃・20MPa の条件下で最も収率が高かった。しかしながら水蒸気蒸留で得られたものと比較するとわずか約 30%の収量であった。この原因としては、ダイダイの果皮の厚みや繊維質や細胞壁が硬く、更にペクチンが含まれていることにより SC-CO<sub>2</sub> が抽出器内の試料を透過して拡散するのが困難であった可能性が考えられる。この実験において SC-CO<sub>2</sub> は試料を通過するだけであり、目的物質がほとんど分離できていなかった。したがって、後続の実験では、これを改善する必要がある。そこで、本研究では段階的な圧力制御による抽出アプローチを検討した。

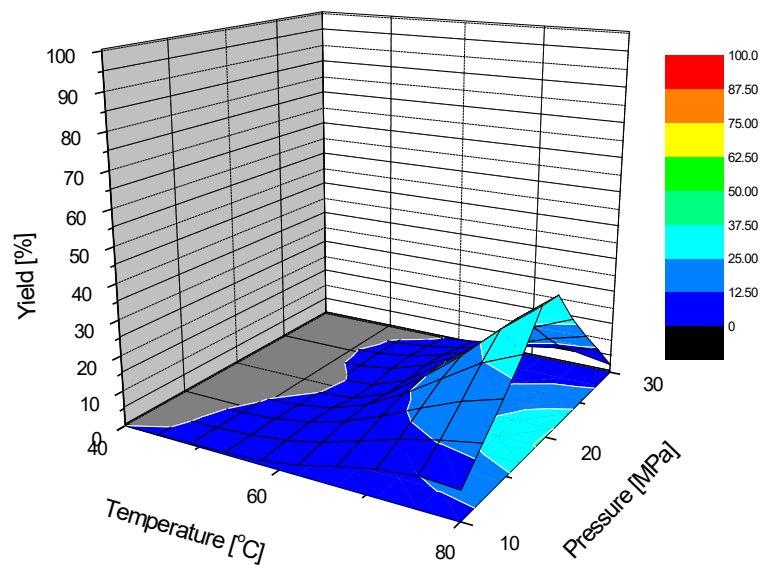


Fig. 4.3 Extraction yield of *Citrus aurantium* in the semi-continuous extraction method

出所 : Hoshino et al. (2020)

#### 4. 3. 3 段階的な圧力制御による超臨界二酸化炭素抽出

##### 4. 3. 3. 1 抽出に及ぼす保持時間の影響

半連続式の抽出手法によるフィードバックから、段階的な圧力制御の手順を追加し実験を行った。まず、静的な高圧期間の保持時間が段階的な圧力制御抽出に及ぼす影響を調査し

た。Fig. 4.4 に 60°C・30MPa の条件下における精油の回収率を示す。これをみると、半連続式の場合と CO<sub>2</sub> の消費量は同等であるにも関わらず、回収率は保持時間が増加するにつれて増加していることがわかる。また、保持時間 60 分及び 90 分の場合では回収率に大きな違いは確認されなかった。このことから静的な高圧期間を設けて加圧処理することにより、厚みのあるダイダイの果皮にも SC-CO<sub>2</sub> が膨潤したことが示唆された。また、SC-CO<sub>2</sub> が試料内の細胞構造に浸透した後拡散し、精油が溶媒中に溶解して減圧段階での密度変化に依存していることも同時に示唆された。更に、抽出管内における SC-CO<sub>2</sub> の保持時間が長くなると、溶媒中に溶解する精油の量が増える可能性がうかがえた。減圧期間では試料に浸透した精油かあ r 溶解している CO<sub>2</sub> が膨張し、対流により液相に流出する。対流による物質移動は、拡散プロセスよりもはるかに高速である。一定圧力での半連続抽出では、物質移動は拡散に制限されるが、圧力制御による抽出プロセスでは、対流と拡散の両方が行われるということである。

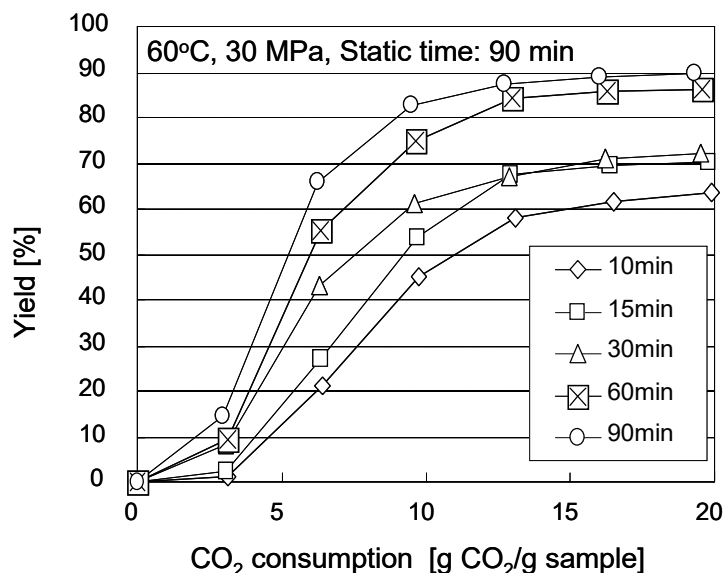


Fig. 4.4 Effect of retention time on the yield of Citrus aurantium essential oil (60 °C, 30MPa)

出所 : Hoshino et al. (2020)

#### 4. 3. 3. 2 抽出に及ぼす圧力と温度の影響

次に精油の回収に対する圧力と温度の影響を調査するため、静的時間の保持時間を 90 分に固定した。Fig. 4.5 に、精油の回収に対する圧力の影響を示す。その結果、等温条件下では抽出される精油の量は圧力の増加とともに増加することが明らかとなった。この結果は CO<sub>2</sub> の密度が精油の抽出に重要な役割を果たすことを示している。高圧化では、より多くの CO<sub>2</sub> が試料に浸透し、それに伴いより多くの精油が CO<sub>2</sub> に溶解する。

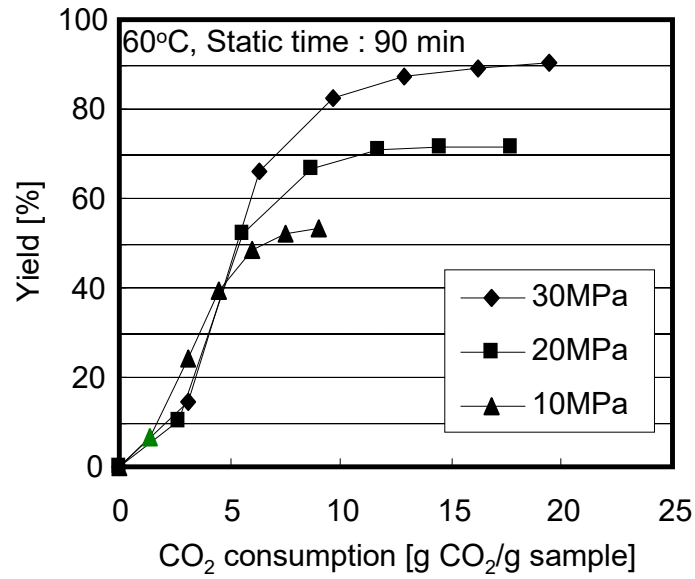


Fig. 4.5 Effect of pressure on essential oil yield

出所 : Hoshino et al. (2020)

そして Fig. 4.6 に、精油の収量に対する温度の影響を示す。Fig. 4.5 に示す圧力の影響とは逆に、等圧条件で CO<sub>2</sub> の密度が減少したにもかかわらず、収量は温度とともに増加した。目的とする化合物と SC-CO<sub>2</sub> の特性に関連する 2 つの要因が、この挙動に寄与することが考えられる。第一の要因は、温度の上昇に伴う精油の蒸気圧効果であり、第二の要因は、試料から SC-CO<sub>2</sub> への精油の物質移動速度であると推察される。

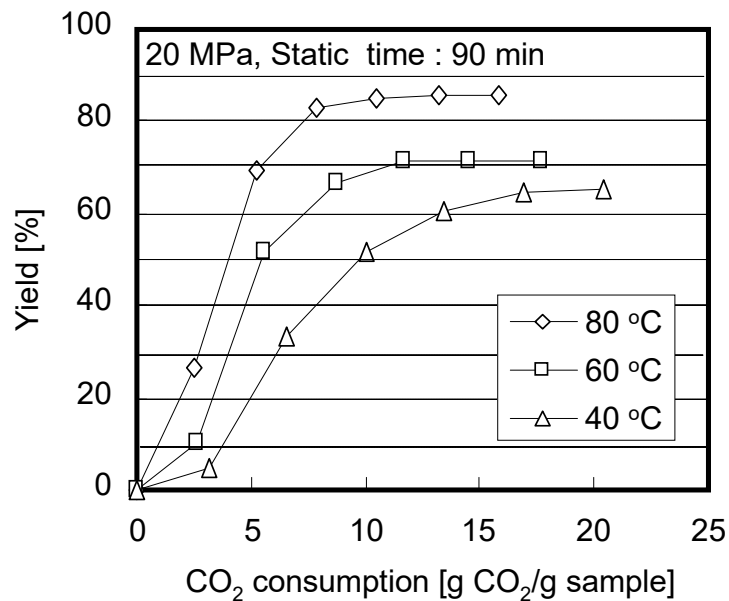


Fig. 4.6 Effect of temperature on essential oil yield

出所 : Hoshino et al. (2020)



### 4. 3. 3. 3 バッチごとの抽出最適条件

静的高圧期間の保持時間を 90 分に固定し、様々な温度と圧力における最適な抽出条件を調査した。Fig. 4.7 にその結果を示す。これをみると、圧力の上昇に伴う SC-CO<sub>2</sub> 密度の上昇は、精油の効果的な回収に明らかに良い影響をもたらしていることがわかる。ただし、図に示すような温度の範囲では SC-CO<sub>2</sub> 密度が低くても 40°C の場合よりも 60~80°C の高温下において回収率が高くなる傾向があることがわかった。80°C・20MPa の圧力で、水蒸気蒸留と比較して 95.4% のかなり高い最大回収率が観察された。これらの抽出挙動は、試料への CO<sub>2</sub> の浸透及び CO<sub>2</sub> への精油の溶解、更に減圧中の CO<sub>2</sub> の対流を伴う抽出精油に関連していると考えられる。

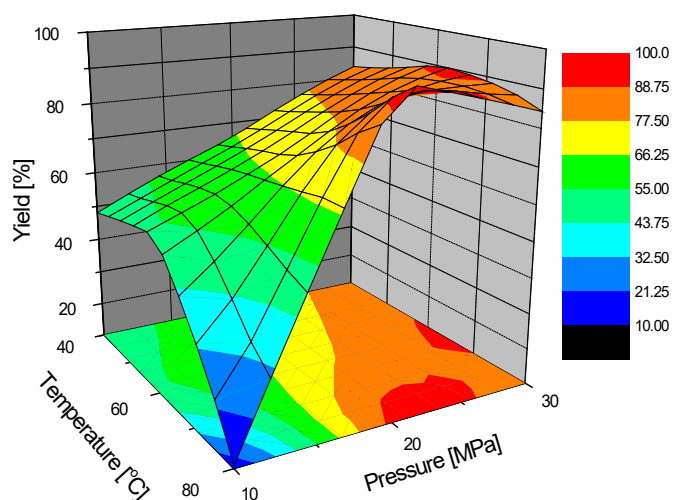


Fig. 4.7 Optimal conditions obtained by batch wise extraction

出所 : Hoshino et al. (2020)

### 4. 3. 3. 4 半連続 SC-CO<sub>2</sub> 抽出法と段階的な圧力制御による SC-CO<sub>2</sub> 抽出法の比較

Fig. 4.8 に、半連続 SC-CO<sub>2</sub> 抽出とバッチワイズ SC-CO<sub>2</sub> 抽出の収量と CO<sub>2</sub> 消費量の比較を示す。段階的な圧力制御アプローチを行った場合、同じ動作条件で半連続 SC-CO<sub>2</sub> 法により得られた精油の回収率の 3.4 倍以上の回収率が得られた。更に CO<sub>2</sub> 消費量は 38% に削減された。この傾向については、ラベージ (*Levisticum officinale*) やセロリ (*Apium graveolens var. dulce*) からの有用な化合物の抽出において圧力変化技術の有効性が報告されている<sup>45</sup>。ここでは SC-CO<sub>2</sub> の急速な減圧が抽出の収量を大幅に増加させる可能性があることが示されている。

<sup>45</sup> Dauksas et al. (2002) 参照。

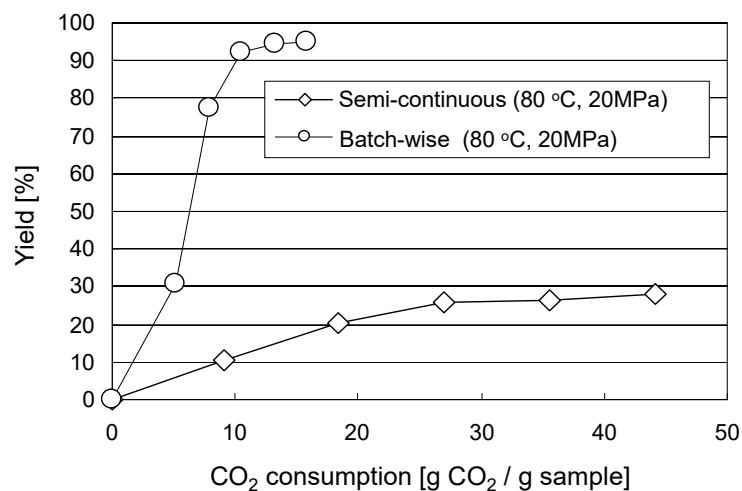


Fig. 4.8 Comparison of essential oil recovery rate and CO<sub>2</sub> consumption between semi-continuous SC-CO<sub>2</sub> extraction method and batchwise SC-CO<sub>2</sub> extraction method  
出所 : Hoshino et al. (2020)

#### 4. 4 小括

段階的な圧力制御による SC-CO<sub>2</sub> 抽出のアプローチは従来から用いられてきた半連続 SC-CO<sub>2</sub> 抽出法と比較して、ダイダイのような柑橘類の中でも特に厚い果皮から精油を抽出する手法として適していることが示唆された。また、前処理をせずに湿った柑橘類の皮から精油を抽出することができた。精油などの揮発性化合物は、乾燥プロセス中に拡散してしまう場合があり、湿ったサンプルからの抽出が本来は望ましいが、揮発性成分は水で簡単に回収することができる。

抽出の最適条件は、通常の半連続 SC-CO<sub>2</sub> 抽出の操作と同様に、80°C・20MPa であった。この状態では精油の回収率は 95.4% とかなり高く、半連続 SC-CO<sub>2</sub> 抽出法で得られた回収率の 3.4 倍以上であった。また、CO<sub>2</sub> 消費量は 38% に削減された。今回得られた知見から、今後は効率的かつ効果的な抽出の半連続 SC-CO<sub>2</sub> 抽出に段階的操作手順の組み合わせを検討する必要があると考えられる。

## 第5章

### 超臨界二酸化炭素抽出法による

### ヒュウガトウキの葉からの機能性成分の抽出

## 5. 1 はじめに

序章で述べた通り、わが国ではトウキの根が日本薬局方に登録されており、生薬として親しまれ、その有効性は様々である。

トウキにはいくつかの亜種があることは既出だが、それぞれに異なる薬理作用がある。先行研究において Kumazawa et al. (1982) は、トウキの根を熱水抽出することで、薬効成分や免疫刺激多糖類 (AIP) を単離した。この AIP を脾臓細胞に組み込むと、エールリッヒ腹水癌細胞のマウスの生存期間が延びることが観察された。同様に、ヤマトトウキの根には抗補体多糖類のアラビノガラクトン (Arabinogalactan) が含まれていることが明らかになっている。Kiyohara et al. (1988) は、根から熱湯で抽出した抽出物から、抗補体活性を持つ 4 つのペクチン多糖類 (AR-2IIa-II d) を単離した。更に、中国産トウキの根の抽出物を動物に繰り返し投与することで、既存研究で報告されていた鎮痛効果に加え抗浮腫及び解熱効果があることを示している。次に Kim et al. (2009) は、トウキの葉が他の葉野菜よりも多くのリンとカリウムを含んでいることに焦点を当て、エタノールによる溶媒抽出でそれらを抽出しその含有量について報告した。

他のトウキと同様に、ヒュウガトウキも固有の薬理成分を持つことが期待される。その根は生薬として公的に認識されており、前述のような効果があることが示唆されているが、根以外の部分、つまりヒュウガトウキの地表部 (葉・茎・花) は生薬としての登録がなく、効能が期待されながらもその取扱いに制限がなく容易である。いくつかの専門企業が健康茶などの加工品として製品を販売しているが、人体の健康に寄与するような効果があり高く評価されている。その一方で、ヒュウガトウキの葉に効能があることはわかっているながらも地表部に含まれている機能性成分に関する研究は過少である。

本章では、第 3 章に示した有機溶媒中修及び第 4 章で示したグリーン溶媒を用いた天然物からの成分抽出の知見を基礎として、ヒュウガトウキの葉から機能性成分の抽出を行った。植物バイオマスの分野において機能性成分を抽出する方法として、溶媒抽出以外の技術にはソックスレー抽出法などがある。しかしこれには大量の有機溶媒の使用や目的成分に対して選択性が低いこと、また残留溶媒によって抽出物が低品質となること及び長時間の処理による機能性成分の変質や分解などの可能性があることなど欠点が多い。したがって高品質の製品を開発に将来的にアプローチするため、より安全な抽出法を模索する必要があった。

そこで、グリーン溶媒の中でも SC-CO<sub>2</sub> 抽出法がヒュウガトウキの葉から機能性物質を抽出するための好ましい溶媒であると判断した。ただし、CO<sub>2</sub> 自体の極性は低く、極性の高い機能性物質を抽出しようとする非効果的な抽出が行われてしまう。この制限を解決するためには共溶媒を用いる必要があると考えられる。共溶媒の添加はより極性の高い機能性物質の抽出を改善し得る。本章では、共溶媒としてエタノールを選択した。この有機溶媒は生薬のエキス分を抽出する際に抽出溶媒として用いることが認められている。エタ

ノールはフェノール化合物などの極性機能性物質の抽出能力を高める可能性がある。

## 5. 2 実験方法

### 5. 2. 1 試料

第3章と同様に、Fig. 5.1 に示す収穫直後に凍結乾燥させたウガトウキの葉を原料として使用した。ヒュウガトウキの葉は、2020年11月に収穫されたものを使用した。



Fig. 5.1 Leaves of *Angelica furcijuga* after freeze-drying used as a sample

### 5. 2. 2 抽出手順

Fig. 5.2 に共溶媒添加オプションを備えた SC-CO<sub>2</sub> 抽出装置を示す。概略図は既出である (第4章 4. 2. 2. 2)。装置の最大動作条件は 200°C 及び 45MPa である。約 1g の試料を 10mL の抽出管 (Thar Technologies, Inc., USA) に充填した。実験条件は表 5.1 に示すとおりである。CO<sub>2</sub> の流量は 3mL/min であり、共溶媒としてのエタノールの比率は CO<sub>2</sub> 流量の 10%であった。抽出物は密閉型のスクリーボトルに収集され、アルミホイルで包んだ後分析まで 6°C未満の冷蔵庫で保管した。また、抽出物に含有される目的成分の分析方法は第3章に示す手法と同様である。

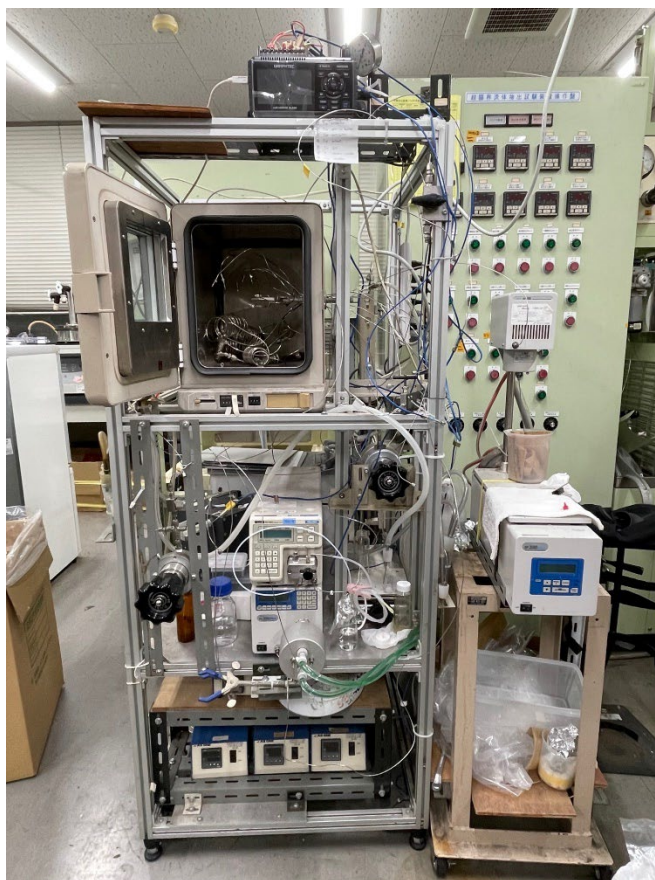


Fig. 5.2 SC-CO<sub>2</sub> extractor

Table 5.1 Experimental conditions

Temperature [°C]	: 40, 60, 80
Pressure [MPa]	: 10, 20, 30
Reaction time [min]	: 15, 30, 45, 60, 90, 120
CO <sub>2</sub> Flow rate [mL/min]	: 3.0

出所：筆者作成

### 5. 2. 3 Hansen の溶解度パラメーターの計算

ヒュウガトウキの葉から選択された機能性成分としてのケンフェロール、フェルラ酸、リグスチリド及びブチリデンフタライドの溶解度理論的知見は Hansen の溶解度パラメーター(Hansen Solubility parameter : HSP)を使用して決定した。HSP 値は HSiP4.1.04 ソフトウェアによって予測され、この予測によれば、選択された機能性成分と溶媒の間の HSP の値が近いときには高い溶解度を示している可能性があるとする。

さまざまな条件下での CO<sub>2</sub> の HSP は、NIST データ

(<https://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>)Williams et al.<sup>23</sup> に従って計算された。式(1)から式(3)に各パラメーターの式を示す。

$$\delta_d = \delta_{dref} \left(\frac{V_{ref}}{V}\right)^{0.5} \quad (1)$$

$$\delta_p = \delta_{pref} \left(\frac{V_{ref}}{V}\right)^{0.5} \quad (2)$$

$$\delta_h = \delta_{href} \times \exp \left[ 0.00132 (T_{ref} - T) + \ln\left(\frac{V_{ref}}{V}\right)^{0.5} \right] \quad (3)$$

$\delta_{dref}$ ,  $\delta_{pref}$ , 及び  $\delta_{href}$  は HSP リファレンス(MPa<sup>1/2</sup>)である。  $V_{ref}$ (39.13 cm<sup>3</sup> / mol)は基準圧力(Pref, 0.1 MPa)及び基準温度(Tref, 25°C)でのモル体積を示す。分散相互作用パラメーター( $\delta_d$ )は温度の関数としての気化エネルギーとモル体積から決定され、極性相互作用パラメーター( $\delta_p$ )は溶媒分子の双極子モーメントに基づいており、水素結合相互作用パラメーター( $\delta_h$ )は気化の全エネルギーから気化の分散と極性エネルギーを軽減するものである。式4及び式5から液体と2つ以上の溶媒の混合物の温度依存性を考慮しHSPを計算した。

$$\delta = \delta_{ref} \cdot \left[ \frac{1 - \frac{T}{T_{c,i}}}{1 - \frac{T_{ref}}{T_{c,i}}} \right]^{0.34} \quad (4)$$

$$\delta_{mixture} = \sum x_i \delta_{T,i}, \quad (5)$$

ここで、Tは特定の温度、Tcは物質iの臨界温度、xiは各物質の組成(CO<sub>2</sub>とエタノールのパーセンテージ)を表している。

#### 5. 2. 4 分散分析 (ANOVA) による統計分析

実験パラメーターを重複/三重測定の平均±標準偏差(SD)として表し、統計計算はMicrosoft Excel for Office 365を使用して実行した。分散分析(Analysis of variance : ANOVA)は統計的仮説検定の一手法であり、これを使用して統計的差異を決定した。ここで得られるP値が<0.05の場合、その差異は有意であるとみなした。

## 5. 3 結果と考察

### 5. 3. 1 抽出に及ぼす抽出時間の影響

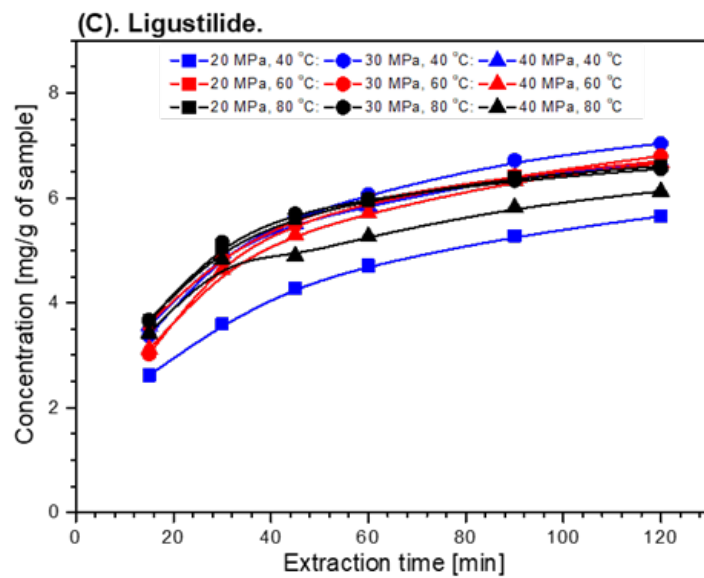
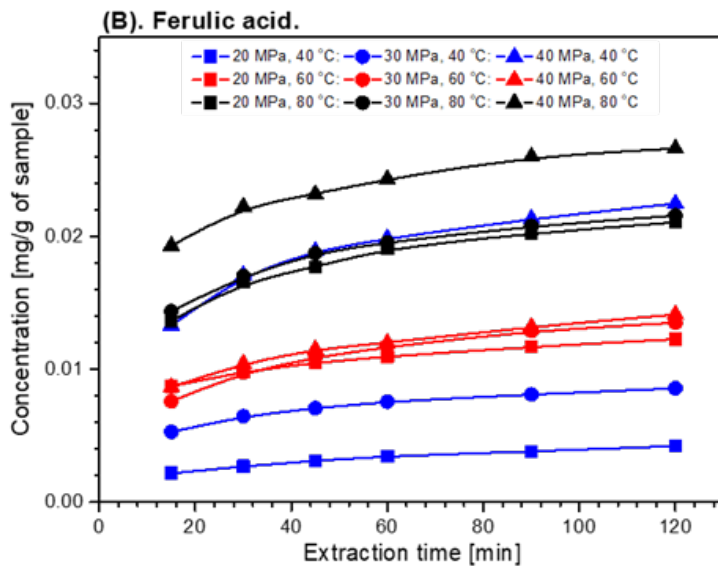
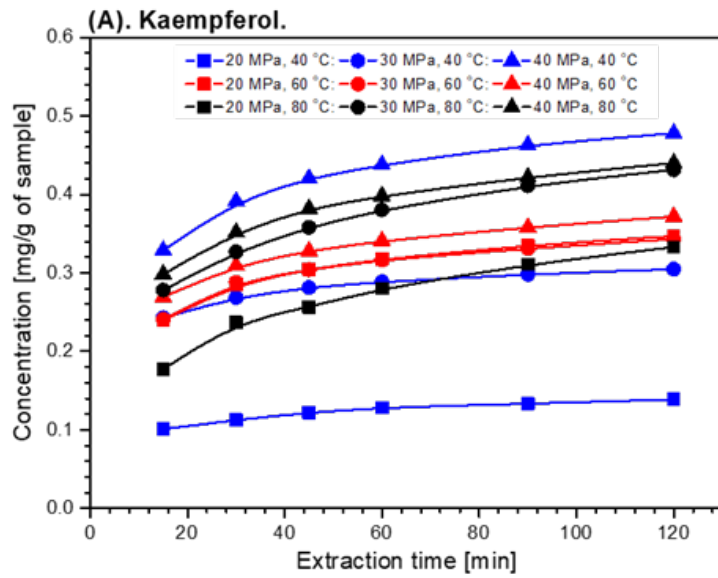
Fig. 5.3 は、(a)ケンフェロール、(b)フェルラ酸、(c)リグスチリド及び(d)Z-ブチリデンフタライドと (e) E-ブチリデンフタライドの抽出時間ごとの抽出結果を示している。ブチリデンフタライドは炭素二重結合により、シス型 (Z) とトランス型 (E) の2種類の幾何異性体がある。これらの機能性成分は共溶媒を添加しなかった場合にはほとんど得られなかった。その理由は恐らく抽出物中の目的機能性成分の極性が高いことにあると考えられる。前述のように、CO<sub>2</sub>は非極性流体であるため、これらの機能性成分の分離に使用される場合の欠点であると再認識した。したがって本章における実験では様々な抽出条件下で共溶媒としてエタノールを添加した SC-CO<sub>2</sub>を使用した抽出プロセスを実行した。

その結果、いずれの機能性成分においても抽出物の収率は抽出時間の経過とともに増加した。超臨界流体抽出技術では、抽出プロセスの分析が抽出曲線全体 (収率対抽出時間) に基づいて行われるため、抽出時間は効率的な抽出プロセスにおいて最も重要なパラメータの1つであるといえ、これは最短時間かつ最高速度での目的成分の回収率を求めるために必要な情報を提供するものである<sup>46</sup>。今回の実験では60分までに大幅に収率が増加し、60分以降は実験終了時間の120分までわずかに増加した。抽出段階の開始時に SC-CO<sub>2</sub>-エタノール溶媒にヒュウガトウキの機能性成分が急速に溶解し流出したことで高い収率が得られたものと考えられる。したがって、60分間の抽出がヒュウガトウキの葉から機能性成分を抽出するのに十分な期間であることが示唆された。抽出時間が短いということは、CO<sub>2</sub>と共溶媒の消費量が減少し、抽出物の熱分解を回避することにも繋がる。

---

<sup>46</sup> Panadare et al. (2021); Ludwig et al. (2021) 参照。





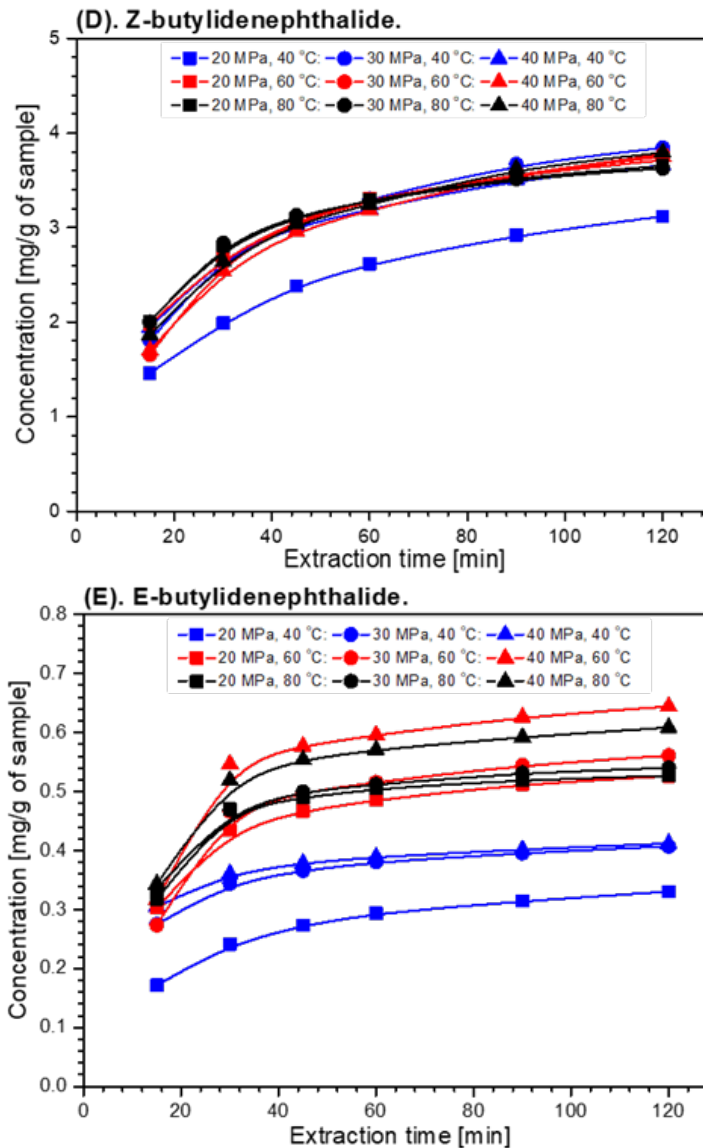


Fig. 5.3 Yield of functional ingredient per extraction time

(a)Kaempferol (b)Ferulic acid (c)Ligustilide

(d)Z-Butylidenephthalide (e) E- Butylidenephthalide

出所 : Hoshino et al. (2021)

### 5. 3. 2 抽出に及ぼす抽出圧力の影響

抽出圧力は、溶媒力を高め抽出目的成分の選択性に大きな影響を与えるものとして温度と同様に重要な要素である<sup>47</sup>。一定の抽出温度下においては、超臨界状態における流体の密度は圧力の増加とともに増加する。溶媒力は流体の密度に依存するため、密度を上げる

<sup>47</sup> Dias et al. (2021); Baeberan et al. (2008); Williams et al. (2004) 参照。

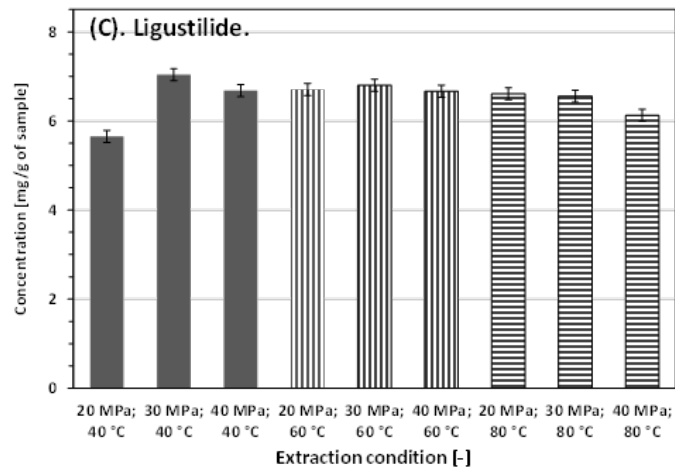
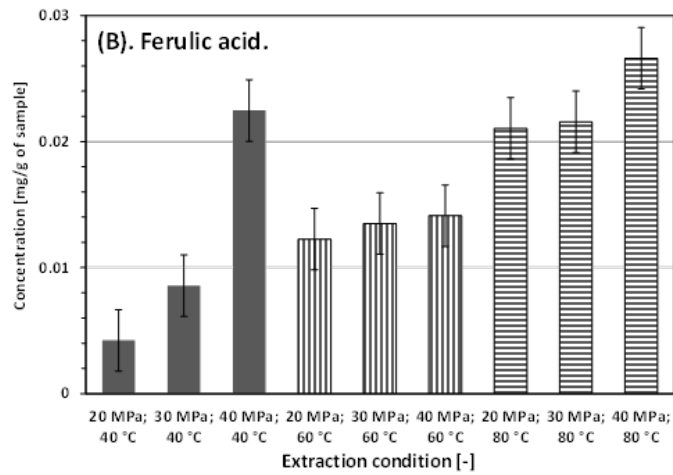
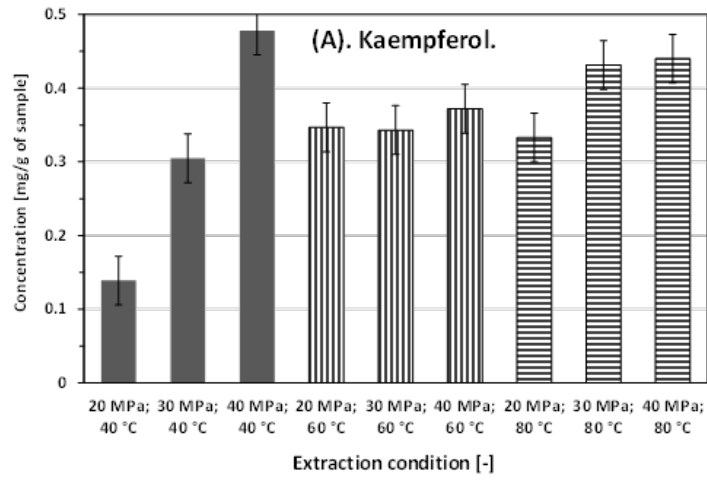
と流体溶媒力が向上し、抽出収率が向上することが示唆される。Fig. 5.4 は、様々な抽出条件下におけるヒュウガトウキの機能性成分の抽出収率を示したものである。抽出収率は、抽出温度が一定であるとき圧力の増加とともに増加した。流体密度の向上によって SC-CO<sub>2</sub> の溶媒出力が加圧と共に増加し、抽出量が増加する性質はこの実験においても明らかであった。

また、機能性成分の抽出収率は抽出圧力 20~30MPa で増加したが、圧力を 40 MPa に上げると減少しているようにもみられる部分がある。これは SC-CO<sub>2</sub> の密度が動作圧力の増加とともに増加し、それにより溶質蒸気圧が減少することを示している。40 MPa ではこの作用の影響で抽出収率が低下したものと考えられる。更に、高い操作圧力により試料が圧縮され溶媒と試料の間の質量移動と相互作用を減少させる偏流が発生する可能性がある。これらの結果を考慮すれば、ヒュウガトウキの葉から機能性成分を抽出するための適切な操作圧力は 30MPa であると判断される。

そして一定の抽出圧力下で抽出温度を上げることで機能性成分の融点を超えると溶解力が向上する可能性があることもわかった。これは抽出温度を上げると物質移動が改善され、機能性成分の全体的な抽出収率が上がるということを意味している。その一方で、超高压下における溶解力の低下による影響が温度にも及ぶ懸念がある。その場合、図 3 に示されているよういくつかの条件の組み合わせにおいて、抽出温度の上昇が溶解プロセスの改善に有利にしている様子がうかがえる。この現象は 30 MPa の抽出圧力と 40~80°C の抽出温度で抽出を行ったときのケンフェロール及びフェルラ酸の全体的な抽出収率から確認することができた。逆に、リグスチリド及び Z-ブチリデンフタライドでは、同じ操作条件下で減少傾向にあった。このとき抽出温度をあげると更に SC-CO<sub>2</sub> の溶媒力が低下し、収率も低下する。その反面、溶質蒸気圧が改善され溶質の抽出が向上する可能性もあることが先行研究では明らかにされている<sup>48</sup>。

---

<sup>48</sup> 前掲注 52 参照。



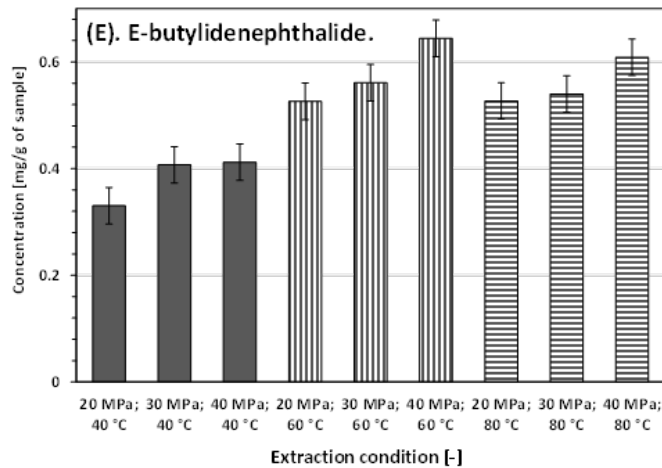
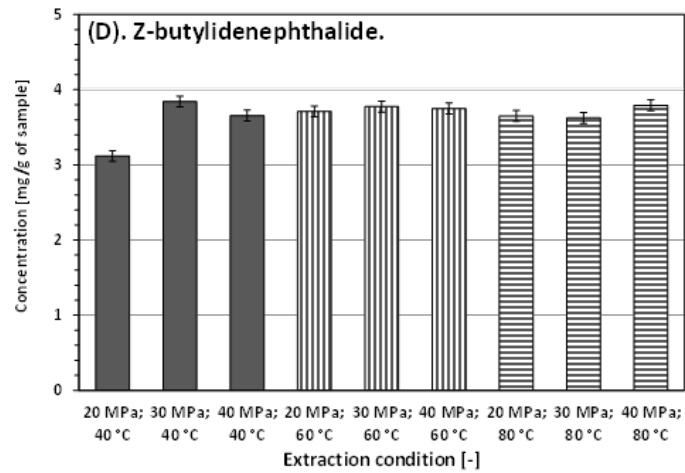


Fig. 5.4 Total extraction yield of functional ingredients under various extraction conditions

- (a)Kaempferol (b)Ferulic acid (c)Ligustilide  
 (d)Z-Butylidenephthalide (e) E- Butylidenephthalide

出所 : Hoshino et al. (2021)

### 5. 3. 3 HSP 値の計算

次に、これらの物質と純粋な溶媒の溶解度パラメーターを決定し、実験結果に基づいて抽出溶媒とヒュウガトウキの機能性成分との間の適合性を調査した。Table5.2 に目的の機能性成分と純粋な溶媒について計算した HSP 値を示す。

Table5.2 HSP of functional ingredients and pure solvent

Substance	Solubility parameter			Conditions
	$\delta_D$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_P$ (MPa <sup>1/2</sup> )	$\delta_H$ (MPa <sup>1/2</sup> )	
Kaempferol	20.3	9.3	17.2	Ordinary
Ligustilide	17.7	9.4	6.6	Ordinary
Ferulic acid	19.3	8.4	15.8	Ordinary
Butylidenephthalide	18.7	5.9	3.8	Ordinary
Ethanol	15.8	8.8	19.4	Ordinary
Methanol	14.7	12.3	22.3	Ordinary
Acetone	15.5	10.4	7	Ordinary
	15.7	6.3	5.7	Ordinary
	10.8	4.5	4.9	20 MPa, 40 °C
	12.0	4.7	5.1	20 MPa, 60 °C
	12.7	4.8	5.2	20 MPa, 80 °C
CO <sub>2</sub>	9.0	4.2	4.6	30 MPa, 40 °C
	10.7	4.5	4.9	30 MPa, 60 °C
	11.6	4.6	5.1	30 MPa, 80 °C
	7.0	3.8	4.1	40 MPa, 40 °C
	9.3	4.2	4.6	40 MPa, 60 °C
	10.6	4.4	4.9	40 MPa, 80 °C
		11.1	4.8	5.9
	12.2	4.9	6.0	20 MPa, 60 °C
	12.9	5.0	6.1	20 MPa, 80 °C
CO <sub>2</sub> + Ethanol	9.4	4.4	5.5	30 MPa, 40 °C
	10.9	4.7	5.8	30 MPa, 60 °C
	11.9	4.8	5.9	30 MPa, 80 °C
	7.5	4.0	5.0	40 MPa, 40 °C
	9.7	4.5	5.5	40 MPa, 60 °C
	10.8	4.7	5.7	40 MPa, 80 °C

\* $\delta_D$ : dispersion force;  $\delta_P$ : dipole force;  $\delta_H$ : hydrogen-bonding force.

出所 : Hoshino et al. (2021)

ケンフェロール, フェルラ酸, リグスチリド及びブチリデンフタライドの HSP 値はエタノール, メタノール, アセトンなどの純溶媒の値と類似していた。したがってヒュウガト

ウキの機能性成分はこれらの有機溶媒への溶解度が高いことがわかる。逆に CO<sub>2</sub> との HSP 値によれば超臨界条件下でも溶解しにくいことが示唆される。抽出プロセスで共溶媒を添加せずに SC-CO<sub>2</sub> のみを抽出溶媒として使用した場合、ヒュウガトウキの葉から機能性成分は抽出されなかったことは前述の通りである。

それとは対照的に、エタノール（10%）を共溶媒として添加した場合には抽出することができたので、共溶媒（エタノール）の添加が超臨界条件下での CO<sub>2</sub> の可溶化能力を向上させる可能性があることが明らかになった。エタノールの分散（ $\delta d$ ）値は超臨界条件下での CO<sub>2</sub> の  $\delta d$  値と有意差はないが、エタノールの極性（ $\delta p$ ）値及び水素結合（ $\delta h$ ）値は超臨界状態における CO<sub>2</sub> の  $\delta p$  及び  $\delta h$  値よりもかなり高くなっている。その結果、SC-CO<sub>2</sub> の可溶化能力が高まるため、極性値の高い機能性成分を抽出することが可能となるのである。

### 5. 3. 4 分散分析 (ANOVA) による統計的知見

今回の実験の結果について、機能性成分の収率に対する実験条件の影響について考察するため、ANOVA による F 検定を行い P 値を決定した。Table 5.3 は F 検定及び P 値に係る有意性をまとめたものである。

表 3.3 実験パラメーターの分散分析 (ANOVA)

Functional substance	Statistical parameter	Extraction parameter	
		Pressure	Temperature
Kaempferol	F-test	2.6591	0.9535
	P-value	0.1842	0.4585
Ferulic acid	F-test	2.8837	5.4213
	P-value	0.1677	0.0726
Ligustilide	F-test	0.8358	0.3844
	P-value	0.4974	0.7036
Z-butylidenephthalide	F-test	1.3591	0.7661
	P-value	0.3545	0.5228
E-butylidenephthalide	F-test	12.354	63.920
	P-value	0.0194	0.0009

出所 : Hoshino et al. (2021)

F 値が高く P 値が低いということは、すべての抽出パラメーターについてヒュウガトウ

キの葉の機能性成分の収率に有意な影響があることを示している。Table5.3において、フェルラ酸の抽出収率は抽出温度の影響を大きく受けたことがわかる。次に、E-ブチリデンフタリドの収率は抽出圧力及び抽出温度に大きく影響されたことが示唆された。抽出圧力と温度はケンフェロール、リグスチリド及びZ-ブチリデンフタリドの抽出収率には大きな影響を与えなかった。リグスチリドを除いて、統計分析はSC-CO<sub>2</sub>抽出システムにおける化合物の溶解度に関連するこれらの機能性成分のHSP値と一致しているようである。これは、抽出プロセス中のリグスチリドが揮発性で不安定な液体であり、異性化、酸化、二量化などさまざまな反応を経て他のフタル化合物に移行する可能性がある。

結果から判断すると、10%エタノールを添加したSC-CO<sub>2</sub>を使用した抽出は、ヒュウガトウキの葉などの様々な植物組織からフラボノイドとポリフェノールを抽出するための実行可能な方法であるといえる。

#### 5. 4 小括

試料のヒュウガトウキの葉について、共溶媒に10%エタノール用いたSC-CO<sub>2</sub>を抽出溶媒として、20~40 MPa及び40~80°Cの圧力と温度の範囲でケンフェロール、フェルラ酸、リグスチリド及びブチリデンフタライドを抽出した。抽出はセミバッチタイプの抽出法により15~120分の抽出時間でおこなった。

HPLCによるこれら機能性成分の分析結果では、抽出収率が抽出の120分まで増加することが明らかになった。ケンフェロール、フェルラ酸、リグスチリド、Z-ブチリデンフタライド及びE-ブチリデンフタライドの最大収率はそれぞれ0.48(40 MPa, 40°C)、0.03(40 MPa, 80°C)、6.68(40 MPa, 40°C)、3.84(30 MPa, 40°C)及び0.64(40 MPa, 60°C)mg/gであった。しかしながら、ヒュウガトウキの葉から機能性成分を抽出するには60分の抽出時間で不足はないようであった。また、一定の抽出圧力で抽出温度を上げると、全体的な抽出収率に悪影響を及ぼしたことも明らかになった。

HSP値とANOVAによる統計分析によると、抽出溶媒として10%のエタノールを含むSC-CO<sub>2</sub>は、ヒュウガトウキの組織を含むさまざまな植物組織からフラボノイドとポリフェノールを分離するための実行可能な抽出溶媒であることが示唆された。



## 第 6 章

### 結論

本研究では、薬用植物のヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*) について栽培実証実験を行い、それを試料として機能性成分を調査するため様々な実験を行った。その狙いは、生薬と同等の効能を持ちながらもその取扱いに制限のない葉の部分を最大限に活用することである。ヒュウガトウキをわが国固有の薬草として周知のものとし、地方産業の衰退した地域で生薬を通じた農業振興による雇用創出を目指し、地域経済に貢献することが最終的な展望であり、本研究はその一連のプロセスをモデリングすることを目的とする。そのなかで、最も重要なことは、含有されている機能性成分を明らかにすることであり、ここに化学的知見による裏付けが必須となる。

第1章では、わが国における生薬の生産動態を調査し、その中でトウキが占める割合を明らかにした。生薬の原料のうち約90%はもっぱら中国をはじめとする近隣諸外国からの輸入に頼っている者の、近年のCOVID19による流通の遅延や物価の上昇などの問題があり、国内産の生薬を栽培することが望まれている。

また、近年はグリーンケミストリーに則った化学技術の開発が推進されており、生薬の生産プロセスについても、環境負荷低減に寄与するような手法であることが望ましい。そこで、天然物からの有価物の抽出に従来から用いられてきた超臨界流体に着目し、特に幅広い極性の成分抽出を可能とするSC-CO<sub>2</sub>に関してその特徴を概観した。

第2章では2002年にわが国におけるヒュウガトウキの歴史を概観し、どのような約四植物であるのかを明らかにした。日本薬局方には亜種であるトウキが登録されているのは周知のことであるが、2002年にヒュウガトウキの根部においても医薬品扱いとなった。その一方でヒュウガトウキの地表部にも高い効能があることが臨床的知見から明らかとなっているものの、これについては未だ先行研究が過少である。

また、地方都市では農業に携わる人口減少が深刻化しており雇用の創出が難しく、これに伴う若者の都市部への一極集中により人口減少ばかりか農業人口の高齢化が問題視されている。そこで、生薬栽培を一つの産業とすることで地域活性に貢献できるという考えから、ヒュウガトウキの栽培実証実験を行った。ヒュウガトウキは元々九州南部の比較的温暖な山地で自生する植物であり、平地での人工栽培は困難であると考えられてきた。そこで、自社農園で水捌けや年間を通じての気候変動による影響を改善しながら栽培を行った結果、約18か月で完全な大きさまで生育した。このことから、栽培環境によるヒュウガトウキの発育不良という課題を解決し、地方の農村などでも産業として栽培することができる可能性を見出した。

また、ヒュウガトウキの葉を利用して実際に製品開発をし、販売することで生産から消費までの具体的なプロセスモデルを構築した。製品の臨床データや経済学的知見による分析については今後の課題である。

第3章ではグリーン溶媒を用いて試験栽培したヒュウガトウキの葉から機能性成分を抽出するための予備的実験として有機溶媒を用いた抽出実験を行った。本来は残留溶媒などの懸念があるため食品に応用するような試料に有機溶媒は用いないが、最大含有量を把握

したいということと、効率的な抽出を行うために当該実験を行った。目的とするヒュウガトウキの機能性成分はケンフェロール、フェルラ酸、リグスチリド、ブチリデンフタライドである。フタライド類は日本薬局方に登録されているトウキの根の主たる生薬成分である。

エタノール、ヘキサン、メタノール、ジメチルエーテルとメタノールの混合溶媒を用いて抽出を行った結果、ケンフェロールは葉においても根においても含有量は少なかったものの、根には全くといってよいほど含まれておらず、葉にのみ確認された。したがって、ケンフェロールは葉固有の機能性成分として期待される。次に、フェルラ酸においては、葉に根の約3倍量含有されており、フタライド類については葉も根もほぼ同じ量含有されていた。また、溶媒の極性の異なりによって、目的成分の相互溶解力に偏りがあるものの、主成分であるフタライド類については幅広い極性の溶媒に溶解する可能性が示唆された。

第4章では、トウキ類と同様に生薬として知られているトウヒ(橙皮: *Bitter Orange Peel*)はダイダイ (*Citrus aurantium*) の果皮である。ダイダイの果皮は橘類の中でも厚みがあり、繊維質と細胞壁が硬いことから機能性成分を抽出することが技術的に難しく、更に果皮の周りにペクチンがあるため、油分との分離がしにくい。したがって、ダイダイの果皮から精油成分を抽出する技術はヒュウガトウキの機能性成分の抽出へ応用することができると考えられた。ヒュウガトウキの主たる生薬成分であるフタライド類も油分に含有されるものである。そこで、半連続SC-CO<sub>2</sub>抽出法に段階的な圧力制御アプローチのプロセスを追加し、ダイダイの精油を効率的に抽出する手法について検討した。試料として生のダイダイの果皮を前処理せずに使用し、半連続抽出法と比較し、最適な抽出条件について調査した。機能性成分の収率は水蒸気蒸留により得られた精油に対する比率で算出した。

その結果、抽出の最適条件は、通常の半連続SC-CO<sub>2</sub>抽出の操作と同様に、80℃・20MPaであった。この状態における精油の回収率は95.4%とかなり高く、半連続SC-CO<sub>2</sub>抽出法で得られた回収率の3.4倍以上であった。また、CO<sub>2</sub>消費量は38%に削減された。この実験結果から残された課題は、半連続SC-CO<sub>2</sub>抽出と段階的操作手順の最適な組み合わせを検討することである。

第5章では、第3章に示した有機溶媒抽出及び第4章で示したグリーン溶媒を用いた天然物からの成分抽出の知見を基礎として、SC-CO<sub>2</sub>抽出によるヒュウガトウキの葉から機能性成分の抽出を行い、HPLCによる成分分析を行った。SC-CO<sub>2</sub>は密度や温度を変化させることで溶解できる成分の選択性が広がるが、CO<sub>2</sub>自体の極性が低いことから、エントレーナーを用いた方が効率的な抽出が可能となると考え、10%のエタノールを共溶媒として用いた。さらに溶媒及び目的成分のHSP値を求め更に結果についてANOVAによる統計分析を行った。

HPLCによる機能性成分の分析では、抽出収率が抽出の120分まで増加することが明らかになった。しかしながら、ヒュウガトウキの葉から機能性成分を抽出するとき抽出開始から60分経過した時点で全体のうちほとんどの成分が得られていたことから、抽出時間は120分より短くてよいと考えられた。また、一定の抽出圧力で抽出温度を上げると、全

体的な抽出収率に悪影響を及ぼしたことも明らかになった。HSP 値と ANOVA による統計分析によると、抽出溶媒として 10%のエタノールを含む SC-CO<sub>2</sub> は、ヒュウガトウキの組織を含むさまざまな植物組織からフラボノイドとポリフェノールを分離するための実行可能な抽出溶媒であることが示唆された。

以上が本研究で明らかになった知見である。有機溶媒を用いなくても機能性成分が抽出されることは明らかになったが、抽出温度や抽出圧力などの実験パラメーターの最適化の手法を開発することが今後の課題である。

# Acknowledgments

I would like to express my sincere gratitude to my supervisors, Professor Motonobu Goto (Department of Materials Process Engineering) And I especially would like to express my deepest appreciation to Dr. Wahyudiono (Department of Materials Process Engineering).

I would also like to thank Munehiro Hoshino, Chairman of Maruboshi Vinegar Co., Ltd., and Takuya Suetsugu, Chairman of the M & A Food Technology and biology of technical center, for giving us such an opportunity. I would also like to thank all the researchers at the institute for their cooperation in my research.

I would also like to take this opportunity to thank the teachers and related parties of the Department of Materials Process Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University for their understanding, consideration, and guidance from beginning to end.

And I wish to thank Professor Koyo Norinaga (Department of Chemical Systems Engineering), Professor Seiichi Takami (Department of Materials Process Engineering), and Professor Armando T. Quitain (Headquarters for Admissions and Education, Kumamoto University) as a thesis examiner.

Yuriko HOSHINO

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、後藤元信教授には多大なご指導賜り、心より厚く御礼申し上げます。また、研究に際し終始お力添え頂きました Wahyudiono さんに深く御礼申し上げます。

また、このような機会を与えて下さった、マルボシ酢株式会社の星野宗広会長、(一財) M&A 食品技術研究所の末次卓也理事長に感謝いたします。そして、研究に関してご協力頂いた同研究所の研究員の皆様に感謝申し上げます。

そして、終始ご理解とご配慮、ご指導を頂きました、名古屋大学大学院工学研究科物質プロセス工学専攻の先生方及び関係者の皆様に、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、論文審査に際しては、則永行庸教授 (化学プロセス専攻)、高見誠一教授 (物質プロセス専攻)、アルマンド・T・キタイン教授 (大学教育統括管理運営機構、熊本大学) に深く感謝申し上げます。

星野 有理子

# References

## 第1章

- [1] 内田博久, 「超臨界二酸化炭素に対する芳香族化合物異性体の溶解特性と高度分離への応用」, 高圧力の科学と技術 11 (2), 2001 : 137-144.
- [2] 尾崎和夫, 「わが国での良質大黃の栽培と育成—長い年月を要した信州大黃の開発と安定供給—」, 武田薬方 470, 2013 : 1-4.
- [3] 外務省, 「持続可能な開発目標 (SDGs) 達成に向けて日本が果たす役割」, 2021.  
[https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/pdf/sdgs\\_gaiyou\\_202108.pdf](https://www.mofa.go.jp/mofaj/gaiko/oda/sdgs/pdf/sdgs_gaiyou_202108.pdf)
- [4] きぐすり.com, 「漢方薬・生薬大辞典」, 2021. <https://www.kigusuri.com/kampo/jiten/>
- [5] 北村義明, 「技術用語解説 グリーンケミストリー」, 日本食品化学工学会誌 57 (12), 2010 : 546-547.
- [6] 公益財団法人日本特産農産物協会, 「地域特産作物 (工芸作物, 薬用作物及び和紙原料等) に関する資料 (令和元年産)」, 2021.  
[http://jsapa.or.jp/pdf/Acrop\\_Jpaper/nousakumotuchousah30.pdf](http://jsapa.or.jp/pdf/Acrop_Jpaper/nousakumotuchousah30.pdf)
- [7] 厚生労働省, 「厚生労働省告示第 64 号 第十七改正日本薬局方」, 2016.  
<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000066530.html>
- [8] 厚生労働省, 「薬事工業生産動態統計調査」, 2019.  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/105-1.html>
- [9] 独立行政法人医薬品医療機器総合機構, 「医療用医薬品の添付文書情報」, 2020.  
[https://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu\\_tenpu\\_base.html](https://www.info.pmda.go.jp/psearch/html/menu_tenpu_base.html)
- [10] 独立行政法人労働政策研究所・研修機構ホームページ, 「新型コロナが雇用・就業・失業に与える影響」, 2021. <https://www.jil.go.jp/kokunai/statistics/covid-19/index.html>
- [11] 奈良県ホームページ, 「県民だより奈良 8 月号『奈良の漢方大和トウキ根は薬・薬は栄養』」, 2018. <https://www.pref.nara.jp/50548.htm>
- [12] 西川恵子, 「超臨界流体の構造とゆらぎ」, 高圧力の科学と技術 5 (1), 1996 : 24-33.
- [13] 日本漢方生薬製剤協会, 「医療品漢方製剤の生薬一覧」, 2020.  
[https://www.nikkankyo.org/seihin/info\\_pi/shouyakuichiran.pdf](https://www.nikkankyo.org/seihin/info_pi/shouyakuichiran.pdf)
- [14] 日本漢方生薬製剤協会, 「I. 漢方製剤・生薬製剤用語 その1」.  
<https://www.nikkankyo.org/seihin/yougo/explanation01.htm>
- [15] 日本漢方生薬製剤協会総務委員会編, 「漢方製剤等の生産動態 令和元年『薬事工業生産動態統計年報』から」, 2021. <https://www.nikkankyo.org/serv/movement/R01/all.pdf>
- [16] 農林水産省, 「薬用作物 (生薬) をめぐる事情」, 2021.  
<https://www.maff.go.jp/j/seisan/tokusan/yakuyou/attach/pdf/yakuyou-18.pdf>

- [17] 山本豊, 黄秀文, 佐々木博, 武田修己, 樋口剛央, 向田有希, 森祐悟, 山口能宏, 白鳥誠, 日本における原料生薬の使用量に関する調査報告, 生薬学雑誌 73 (1), 2019 : 16-35.
- [18] 吉松嘉代, 「基原」, フェルマシア 57 (2), 2021 : 134.
- [19] C.R. Yonker and R.D. Smith, Solvatochromic Behavior of Binary Supercritical Fluids: The Carbon Dioxide/2-Propanol System, The Journal of Physical Chemistry 92, 1988: 2374-2378.
- [20] G. Burnner, Gas extraction, *Springer New York*, 1994.
- [21] Paul TA, John CW, 渡辺正・北島昌夫訳, グリーンケミストリー, 丸善株式会社, 1999.
- [22] S. Kim and K.P. Johnston, Clustering in Supercritical Fluid Mixtures, AIChE Journal 33, 1987: 1603-1611.
- [23] W.L. Marshall, E. U. Franck, Ion product of water substance, 0-1000 °C, 1-10000 bars – new international formulation and its background. A Journal of Physical Chemistry, 10, 1981: 295-304.

## 第 2 章

- [1] 熊本典晃, 米良典雄, 木原教茂, 佐伯雄一, 長友由隆, 赤尾勝一郎, 「ヒュウガトウキの DNA 多型解析による系統分析」, 九州農業研究 66, 2004 : 58.
- [2] 国立社会保障・人口問題研究所, 「日本の将来推計人口—平成 28 (2016) ~77 (2065) 年—」, 人口問題研究資料第 336 号, 2017.
- [3] 志田庄二郎, 「ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga* Kitagawa) の栽培系統について」, 宮崎産業経済大学研究紀要 5 (1), 1993 : 1-10.
- [4] 二宮清文, 「薬用食品から肝糖代謝亢進を機序とした抗糖尿病作用成分の探索」, 科学研究費補助金研究成果報告書, 2001.
- [5] 日本経済新聞, 「生産年齢人口とは 経済・社会保障支える」, 2021 年 5 月 12 日付.
- [6] 農林水産省, 「令和 3 年農業構造動態調査結果」, 2021.
- [7] 水野修一, 「ヒュウガトウキのすべて」, 2008, 文理書院.
- [8] I. Berenblum, The Mechanism of Carcinogenesis. A Study of the Significance of Cocarcinogenic Action and Related Phenomena, Cancer Research 1(10), 1941: 807-814.
- [9] T. Okuyama, M. Tanaka, J. Takayasu, T. Hasegawa, H. Tokuda, A. Nishino, H. Nishino, A. Iwashima, Anti-Tumor-Promotion by Principles Obtained from *Angelica keiskei*, Planta Med 57(3), 1991: 242-246.
- [10] W. Nakahara, F. Fukuoka, TOXOHORMONE: A CHARACTERISTIC TOXIC SUBSTANCE PRODUCED BY CANCER TISSUE, 癌 40 (1), 1949 : 45-71.

### 第3章

- [1] 北野文理, 大住優子, 植山高光, 北田善三, 「HPLC による当帰葉及び茎中のフタライド類及びフロクマリン類成分の同時分析」, 日本食品化学学会誌 22 (1), 2015 : 51-55.
- [2] 北野文理, 大住優子, 植山高光, 北田善三, 「HPLC による当帰葉及び茎中のフタライド類及びフロクマリン類成分の同時分析」, 日本食品化学学会誌 22 (1), 2015 : 51-55.
- [3] 化粧品成分オンライン, 「トウキ根エキス」, 2021.  
<https://cosmetic-ingredients.org/whitening/%e3%83%88%e3%82%a6%e3%82%ad%e6%a0%b9%e3%82%a8%e3%82%ad%e3%82%b9%e3%81%ae%e6%88%90%e5%88%86%e5%8a%b9%e6%9e%9c%e3%81%a8%e6%af%92%e6%80%a7/>
- [4] 国立科学博物館ホームページ, 「フラボノイドコレクション」.  
<https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/flavonoid/guide/index.php>
- [5] 高水新, 熊本大学自然科学研究科平成 24 年度博士論文, 2012.
- [6] 津田
- [7] 日光ケミカルズ株式会社, 「新化粧品ハンドブック」, 2006, 日光ケミカルズ.
- [8] D. Giacomazza and M.D. Carlo, Ferulic Acid: A Hope for Alzheimer's Disease Therapy from Plants, *Nutrients* 7, 2015: 5764-5782.
- [9] H. Ito, H. Horie, *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea* (8), 2009 :165-173.
- [10] H. Yorozu, H. Sato, Y. Komoto, The Effect of Crude Drug Extract Bathing (III) – The effect of phthalides from *Cnidii rhizome*, *The Journal of The Japanese Society of Balneology, Climatology and Physical Medicine* 57(2), 1993: 123-128.
- [11] J.M. Calderón-Montaño, E. Burgos-Morón, C. Pérez-Guerrero, M. López-Lázaro, A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 11(4), 2011: 298-344.
- [12] M.J. Park, E.K. Lee, H.S. Heo, M.S. Kim, B. Sung, M.K. Kim, J. Lee, N.D. Kim, S. Anton, J.S. Choi, B.P. Yu, H.Y. Chung, The anti-inflammatory effect of kaempferol in aged kidney tissues: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factor inducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinase pathways, *Journal of Medicinal Food* 12(2), 2009: 351-358.
- [13] S. Ozgova, J. Hermanek, I. Gut, Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems”, *Biochemical Pharmacology* 66 (7), 2003: 1127-1137.
- [14] S. S. Chan, T.Y. Cheng, G. Lin, Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta, *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 2007: 677-680.
- [15] Y. H. Lee, A. L. Charles, H.F. Kung, C.T. Ho, T.C. Huang, Extraction of nobiletin and tangeretin



from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier, *Industrial Crops and Products* 31(1), 2010: 59-64.

[16] Y. Hou, M.A. Aboukhatwa, D.L. Lei, K. Manaye, I. Khan, Y. Luo, Anti-depressant natural flavonoles modulate BDNF and beta amyloid in neurons and hippocampus of double TgAD mice, *Neuropharmacology* 58(6), 2010: 911-920.

#### 第 4 章

[1] 農林水産省, 「特産果樹生産動態等調査 (平成 30 年産) かんきつ類の果樹」, 2021.

[2] A. Berna, A. Tarrega, M. Blasco, S. Subirats, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed. *The Journal of Supercritical Fluids* 18, 2000: 227-237.

[3] A de M Pultrini, L.A. Galindo, M.Costa, Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sciences* 78, 2006: 1720-1725.

[4] B. Mira, M. Blasco, S. Subirats, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oils from orange peel. *The Journal of Supercritical Fluids* 9, 1996: 238-243

[5] C. H. Lee, Y.W. Lee, J.D. Kim, K.H Row, Separation of perillyl alcohol from the peel of *Citrus Unshiu* by supercritical CO<sub>2</sub> and preparative high-performance liquid chromatography, *Korean Journal of Chemical Engineering* 18, 2001: 352-356.

[6] E. Dauksas, P.R. Venskutonis, B. Sivik, T. Nillson, Effect of fast CO<sub>2</sub> pressure change on the yield of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) and celery (*Aplium graveolens* L.) extracts, *The Journal of Supercritical Fluids* 22, 2002: 201-210.

[7] F. Menichini, R. Tundis, M. Bonesi, B. de Cindio, M.R. Loizzo, F. Conforti, G.A. Statti, Menabeni R, Bettini R, Menichini F. Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction. *Natural Product Research* 25, 2011: 789-799.

[8] H.S. Song, M. Sawamura, T. Ito, A. Ido, H. Ukeda, Quantitative determination and characteristic flavor of daidai (*Citrus aurantium* L. var. *cyathifera* Y. Tanaka) peel oil, *Flavour and Fragrance Journal* 12, 2000: 323-328.

[9] K. Maekawa, M. Kodama, M. Kushii, M. Mitamura, Essential oils of some orange peels, *Agricultural and Biological Chemistry*: 373-377.

[10] M.I.R. Carvalho-Freitas, M. Costa, Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L, *Biological and Pharmaceutical bulletin* 25, 2002: 1629-1633.

[11] M. Poiana, V. Sicari, B. Mincione, Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction of grapefruit flavedo. *Flavour and Fragrance Journal* 13, 1998: 125-130.

[12] M. Poiana, R. Fresa, B. Mincione, Supercritical carbon dioxide extraction of bergamot peels. Extraction kinetics of oil and its components. *Flavour and Fragrance Journal* 14, 1999: 358-366.

- [13] M. Sawamura, T. Kuriyama, F.L. Zhong, K. Hirozo, Comparison of peel oil components of yuzu (*Citrus Junos Tanaka*) extracted by supercritical carbon dioxide and those of traditional ones. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 36, 1989: 34-38.
- [14] R. Tundis, M.R. Loizzo, M. Bonesi, F. Menichini, V. Mastellone, C. Colica, F. Menichini, Comparative Study on the Antioxidant Capacity and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Citrus aurantifolia Swingle*, *C. aurantium L.*, and *C. bergamia Risso and Poit.* Peel Essential Oils, *Journal of Food Science* 71, 2012: H40-H46.
- [15] S. Deterre, B. Rega, J. Delarue, M. Decloux, M. Lebrun, P. Giampaoli, Identification of key aroma compounds from bitter orange (*Citrus aurantium L.*) products: essential oil and macerate–distillate extract. *Flavour and Fragrance Journal* 27, 2012: 77-88.
- [16] S.M. Njoroge, H. Ukeda, M. Sawamura, Volatile components of the essential oils from kabosu, daidai, and yuko, Japanese sour citrus fruits. *Flavour and Fragrance Journal* 9, 1994: 289-297.
- [17] T. Suetsugu, H. Iwai, M. Tanaka, M. Hoshino, A. Quitain, M. Sasaki, M. Goto, Extraction of Citrus Flavonoids from Peel of *Citrus Junos* Using Supercritical Carbon Dioxide with Polar Solvent, *Chemical Engineering Science* 1, 2013: 87-90.
- [18] T. Suetsugu, M. Tanaka, H. Iwai, T. Matsubara, Y. Kawamoto, C. Saito, Y. Sasaki, M. Hoshino, A.T. Quitain, M. Sasaki, J. Sakamoto, M. Goto, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil from Kabosu (*Citrus sphaerocarpa Tanaka*) peel. *Flavour* 2, 2013: 1-8.

## 第 5 章

- [1] A.L.B. Dias, A.C. de Aguiar, M.A. Rostagno, Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liq-uids assisted by ultrasound: Current status and trends. *Ultrasonics Sonochemistry* 74, 2021: 105584.
- [2] A.R. Kim, J.J. Lee, M.Y. Lee, Antioxidative Effect of *Angelica acutiloba Kitagawa* Ethanol Extract. *Journal of Life Science* 19, 2009: 117-122.
- [3] D. Panadare, G. Dialani, V. Rathod, Extraction of volatile and non-volatile components from custard apple seed powder using supercritical CO<sub>2</sub> extraction system and its inventory analysis. *Process Biochemistry* 100, 2021: 224-230.
- [4] E.J. Calabrese, E. Agathokleous, V. Calabrese, Ferulic acid and hormesis: Biomedical and environmental implications. *Mechanisms of Ageing and Development* 198, 2021: 111544.
- [5] E.M. Yahia, *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2018: pp750.
- [6] F. A. Tomas-Barberan, M.I. Gil, *Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products*, 1st Edition, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2008: pp257.

- [7] F. Pena-Pereira, M. Tobiszewski, *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, Elsevier Inc., Amsterdam, 2017: pp192.
- [8] H. Kiyohara, C. Jong-Chol, H. Yamada, Structure and Anti-Complementary Activity of Pectic Polysaccharides Isolated from the Root of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate Research* 182, 1988: 259-275.
- [9] H. Yamada, H. Kiyohara, C. Jong-Chol, Y. Otsuka, Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba* - IV. Characterization of an anti-complementary Arabinogalactan from the Roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Molecular Immunology* 22, 1985: 295-304.
- [10] K. Ameer, H. M. Shahbaz, J.H. Kwon, Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety* 16, 2017: 295-315.
- [11] K.F. Liao, T.L. Chiu, S.Y. Huang, T.F. Hsieh, S.F. Chang, J.W. Ruan, S.P. Chen, C.Y. Pang, S.C. Chiu, Anti-cancer effects of radix *Angelica sinensis* (Danggui) and N-butylidenephthalide on gastric cancer: Implications for REDD1 activation and mTOR inhibition, *Cellular Physiology and Biochemistry* 48, 2018: 2231-2246.
- [12] K. Ludwig, L. Rihko-Struckmann, G. Brinitzer, G. Unkelbach, K. Sundmacher,  $\beta$ -Carotene extraction from *Dunaliella salina* by supercritical CO<sub>2</sub>, *Journal of Applied Phycology* 23, 2021: 1435-1445.
- [13] L.L. Williams, J.B. Rubin, H.W. Edwards, Calculation of Hansen solubility parameter values for a range of pressure and temperature conditions, including the supercritical fluid region. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 43, 2004: 4967-4972.
- [14] L. Zhang, J.R. Du, J. Wang, D.K. Yu, Y.S. Chen, Y. He, C.Y. Wang, Z-ligustilide Extracted from Radix *Angelica Sinensis* Decreased Platelet Aggregation Induced by ADP Ex Vivo and Arteriovenous Shunt Thrombosis In Vivo in Rats, *Yakugaku Zasshi* 129, 2009: 855-859.
- [15] M. Imran, A. Rauf, Z.A. Shah, F. Saeed, A. Imran, M.U. Arshad, B. Ahmad, S. Bawazeer, M. Atif, D.G. Peters, M.S. Mubarak, Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* 33, 2019: 263-275.
- [16] M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2011: pp. 254.
- [17] N. Kitano, T. Nagasawa, Improvement effect of drinking of *Angelica acutiloba* tea on cold sensitivity in young women. *Trace Nutrients Research* 33, 2016: 1-8.
- [18] O. Wrona, K. Rafinska, C. Mozenski, B. Buszewski, Super-critical fluid extraction of bioactive compounds from plant materials, *Journal of AOAC International* 100, 2017: 1624-1635.
- [19] S. Pimentel-Moral, I. Borrás-Linares, J. Lozano-Sanchez, D. Arraez-Roman, A. Martínez-Ferez, A. Segura-Carretero, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Supercritical Fluids* 147, 2019: 213-221.

- [20] T. Arumugham, K. Rambabu, S.W. Hasan, P.L. Show, J. Rinklebe, F. Banat, Supercritical carbon dioxide extraction of plant phytochemicals for biological and environmental applications-A review. *Chemosphere* 271, 2021: 129525.
- [21] T. Fornari, R.P. Stateva, *High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing*, Springer International Publishing Switzerland, 2015: pp. 415.
- [22] W. Tang, G.F. Eisenbrand, *Chinese Drugs of Plant Origin Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992: pp. 118.
- [23] X. Jiang, W. Zhao, F. Zhu, H. Wu, X. Ding, J. Bai, X. Zhang, M. Qian, Ligustilide inhibits the proliferation of non-small cell lung cancer via glycolytic metabolism, *Toxicology and Applied Pharmacology* 410, 2021: 115336.
- [24] Y. Kumazawa, K. Mizunoe, Y. Otsuka, Immunostimulating polysaccharide separated from hot water extract of *Angelica acuti-loba* Kitagawa (Yamato Tohki), *Immunology* 1982, 47, 75-83.
- [25] Y. Hoshino, Wahyudiono, S. Machmudah, S. Hirayama, H. Kanda, M. Hoshino, M. Goto, Extraction of functional substances from freeze-dried *Angelica furcijuga* leaves using supercritical carbon dioxide, *ACS Omega*.