

<平成24年度助成>

親水性抗酸化物質を高濃度で内包した 高安定液体マイクロカプセルの作製と特性評価

マルコス ネヴェス・小林 功*・中嶋 光敏
(筑波大学生命環境系、*(独)農研機構食品総合研究所)

1. はじめに

L-アスコルビン酸(ビタミンC)は食品業界では最も広く利用されている抗酸化物質であるが、長期保存時の安定性が低いことが問題である。ビタミンCはフリーラジカルの中和作用により強力な抗酸化物質である。更に心臓病、白内障、免疫系とがんの様な病気のリスクを治める効果が報告されている¹⁾。ビタミンCの推奨摂取量は成人1日あたりの30~40mgであるが、研究レベルでは1日あたり250~1,000mgの範囲に拡大される。

ビタミンCは多くの果物や野菜に含まれている。但し、貯蔵温度と貯蔵時間または湿気、酸素、pH、および光の影響を受けやすい。なおかつ、ビタミンCは親水系であり、水やアルコールで溶け、溶解すると酸化反応が発生する。特に高温(>50℃)やアルカリ条件下で速やかに酸化が進み、図1に示すように毒性化合物の形成が起こる²⁾。

ビタミンC溶液の低い安定性を踏まえながら乳化及びカプセル化技術の開発が進められている。これらの研究はほとんどの場合、乳化やカプセル化手法を用いて、ビタミンCを1~5%を内包し

ている²⁾。すなわち、ビタミンCの高安定化が可能な技術開発が期待される。互いに混じらない水・油を乳化剤の作用で細かい液滴として分散させたエマルションは化粧品、医薬品、食品など様々な用途に使用されている。

エマルションは、主に水中油滴型(O/W)エマルションと、油中水滴型(W/O)エマルションが挙げられる。例えば食品エマルションでは、油相には脂溶性のビタミン、色素、抗酸化物質等が溶解しており、水相には水溶性の蛋白質、多糖類、糖質、塩類、ビタミン、色素、抗酸化物質等が溶解している。代表として、O/Wエマルションの中ではマヨネーズ、牛乳、スープ、ソース、W/Oエマルションの中ではマーガリンやバターブレッドが挙げられる³⁾。また、多相エマルションの開発が進んでおり、水相にO/Wエマルションを分散したWater-in-Oil-in-Water(W/O/W)型エマルションと、Oil-in-Water-in-Oil(O/W/O)型エマルションの二種類が挙げられる⁴⁾。特に近年は、食品、医薬品、化粧品など様々な用途を踏まえてW/O/Wエマルションに関心が集まっている。しかしながら、多相エマルションは一般に長期安定性が低く、食品産業界でも用途が限られている。

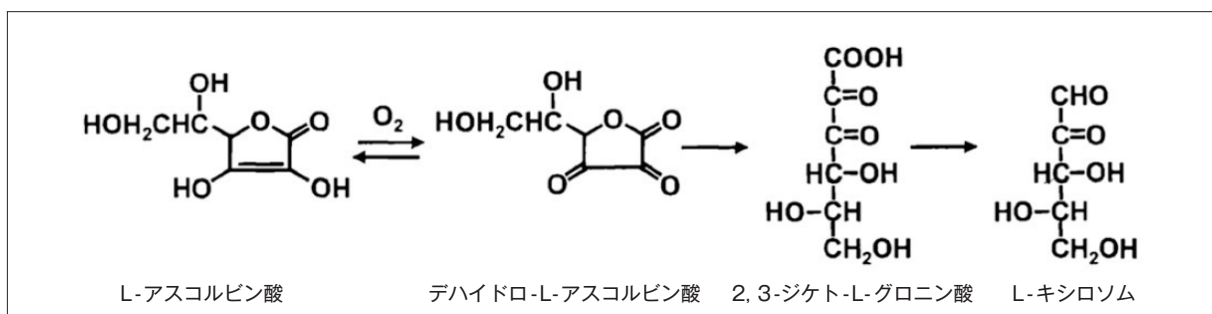


図1 水溶液中におけるビタミンCの分解経路³⁾(一部改変)

特に内水相と外水相の浸透圧平衡状態に到達すること、また油相と外水相の体積割合の決定と、親水性と疎水性乳化剤の選択が重要なファクターである。本研究では親水性のビタミンCが高濃度に内包するW/O/Wエマルションの作製方法を検討した。手法としては図2で示した2段階の乳化プロセスを用いた。一次乳化では疎水性と親水性の乳化剤およびゲル化剤の選択によって、ビタミンCを内包したW/Oエマルション(内水相の体積割合30%)の安定化を検討した。その後、二次乳化ではW/O/Wエマルション作出方法を検討した。

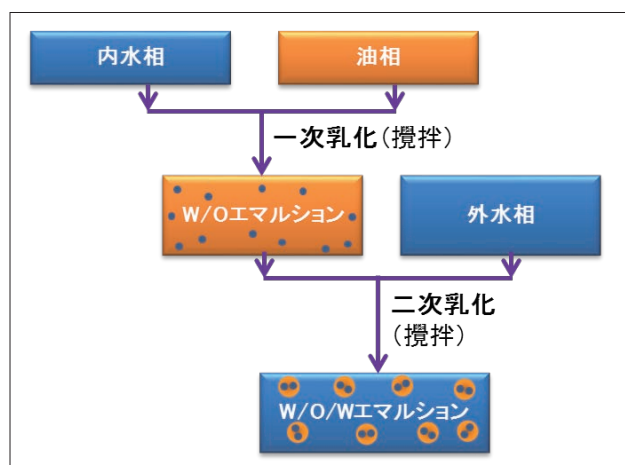


図2 攪拌乳化およびマイクロチャンネル乳化の2段階を含む多相エマルション(W/O/W型)の作製プロセスの模式図

親水性であるビタミンCを30wt%までの高濃度が内包するW/O/Wエマルションの新規な作製方法の開発、さらにW/O/Wエマルションの高安定化およびビタミンCの徐放制御について検討した。また、W/O/Wエマルションの保存温度がビタミンCの保持率に与える影響についても検討した。

2. 実験方法

2.1 一次乳化：ビタミンCを内包したW/Oエマルションの作製および特性評価

連続相には大豆油またはモリンガ油(*Moringa oleifera*)に親油性乳化剤(テトラグリセリン縮合リシノレート、TGCR)を5wt%溶解したもの

を用い、分散相にはビタミンC(5~30wt%)とMgSO₄(1wt%)を溶解したのものを用いた。W/Oエマルションの作製は、攪拌乳化装置(Polytron、7,000rpm、5min)を用いて行った。W/Oエマルションの特性評価に関しては、平均粒子径(d_{av})の測定を行い、なおかつ d_{av} とビタミンCの保持率(r)の経時変化(4℃、25℃)についても検討した。

2.2 二次乳化：W/O/Wエマルションの作製および特性評価

まずは、W/Oエマルションについて、内水相にビタミンC(10-30wt%)、MgSO₄(1wt%)とゼラチン(0~1wt%)を溶解し、油相には疎水性乳化剤(TGCR(5wt%))を溶解し、調製した。内水相の体積割合30%で油相と混合し、上記の一次乳化と同様に予備乳化を行った。その後、二次乳化では外水相に親水性乳化剤であるDGC(デカグリセロールモノラウレート)1wt%、MgSO₄(1wt%)、糖質10~30wt%(グルコースあるいはフルクトース、スクロース)を溶解した。予め調製したW/Oエマルションを体積割合30%になるように外水相と混合し、攪拌装置(5,000rpm、5min)を用いて二次乳化を行った。乳化中に、W/Oエマルションの安定化のため、多糖類であるキサンタンガム(1wt%)を添加した。

2.3 W/OおよびW/O/Wエマルションの平均粒子径の測定

W/OエマルションとW/O/Wエマルションの平均粒子径は画像解析手法により測定した。W/O/Wエマルションのサンプルは連続相で10倍希釈後、粒子径を測定した。平均粒子径の算出には、光学顕微鏡を用い、250の液滴の画像を画像解析ソフト(WinRoof、ver 5.6、株式会社ミタニ)を用いて、マニュアルで粒子径を測定した。また、変動係数(CV)は次のとおり求めた。

$$CV(\%) = (\sigma/d_{av}) \times 100$$

(σ : 粒子径(μm)の標準偏差)

3. 結果

3.1 一次乳化：高濃度のビタミンCを内包したW/O エマルジョンの作製と特性評価

攪拌乳化法において回転数がW/O エマルジョンの作製に与える影響：

異なった回転数を用いた場合、ビタミンC (10wt%) を内包する W/O エマルジョンの平均粒子径 (d_{av}) と変動係数 (CV) の結果を図3に示した。回転数5,000rpm以上とすることで、乳化を行うことができた。回転数増加に伴う W/O エマルジョンの d_{av} は $3.0\mu\text{m}$ から $2.0\mu\text{m}$ まで低下した。なお、CVは13~20%に徐々に増大し、多分散化が進行した。

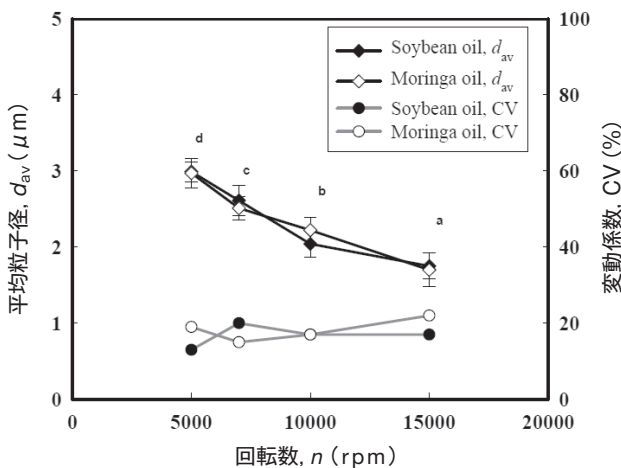


図3 回転数がビタミンCを内包するW/O エマルジョンに与える影響³⁾

記号 (a, b, c, d) は平均粒子径の有意差を示す ($P=0.05$)。

ビタミンCの濃度がW/O エマルジョンの作製に与える影響：

ビタミンCを異なった濃度 (10~30wt%) で内包した W/O エマルジョン (大豆油系またはモリンガ油系) の d_{av} 及び CV を図4に示した。作製されたエマルジョンの d_{av} は $2.2\sim 3.1\mu\text{m}$ であり、油相の種類には依存せずに、ビタミンCの濃度の増加に伴い、少し増加した。ビタミンC内包 W/O エマルジョンの安定性については、4℃で保存した場合は d_{av} が1ヶ月以上に変化せずに安定で

あったが、25℃で保存した場合は d_{av} と CV が経時的に増大して色調の変化が確認された。この色調変化はビタミンCの酸化に起因するものと思われる。また、高濃度 (30wt%) のビタミンCを内包した W/O エマルジョンが、ビタミンC水溶液に比べて保持率を高く維持できること、ならびに W/O エマルジョンへの内包化によるビタミンCの徐放制御が可能であることを見出した。

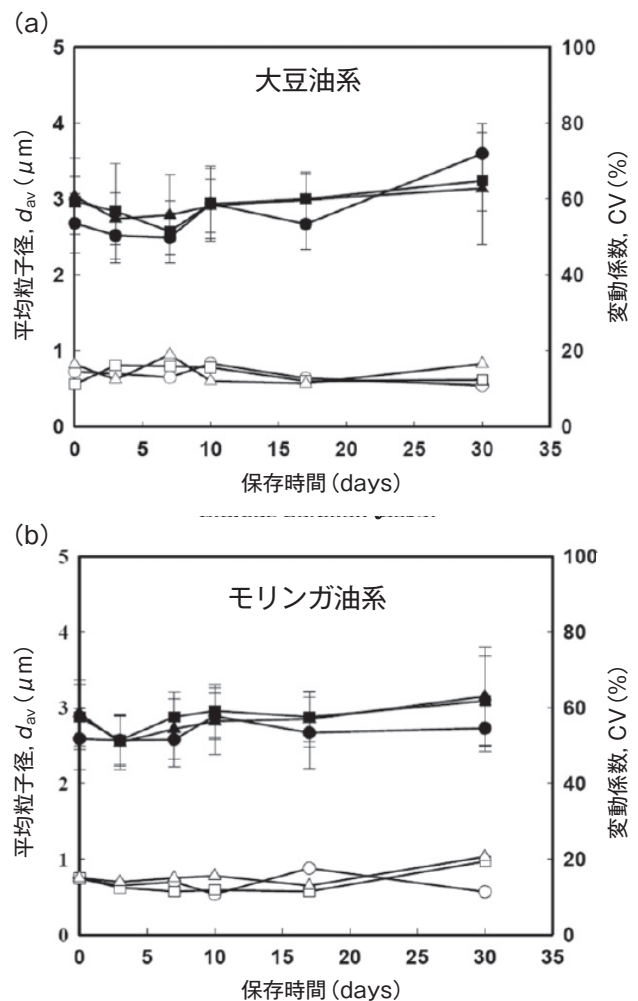


図4 ビタミンCを内包するW/Oエマルジョンの貯蔵安定性 (25℃)³⁾

(a) 大豆油系、(b) モリンガ油系。平均粒子径： d_{av} (黒)、変動係数：CV (白抜き)。ビタミンCの濃度：●○=10wt%、■□=20wt%、▲△=30wt%。

W/O エマルジョンにおけるビタミンC保持率の検討：

図5に貯蔵温度 (4℃、25℃) がビタミンCの保持率に与える影響を示した。ビタミンCを10~30wt%の濃度で内包する W/O エマルジョンについて、4℃で保存した時にビタミンCの保持率は

50%に達した。また、油相の種類にも関わらずビタミンCの保持率に有意差はなかった($P>0.05$)。W/O エマルションの d_{av} はそれぞれ1ヶ月間4℃と25℃で保存した場合、2.6~3.4 μm であった。また、保持率は貯蔵温度に依存していることが分かった。これらの結果はLeeらの文献と一致している²⁾。W/O エマルションにビタミンCを内包することで、保持率の向上が得られた。なおかつ、25℃貯蔵におけるビタミンC水溶液の保持率よりも、W/O エマルションでの保持率の方が顕著に高いことが示された。この結果は、水溶液中においてビタミンCが素早くイオン化するためと考えられる。

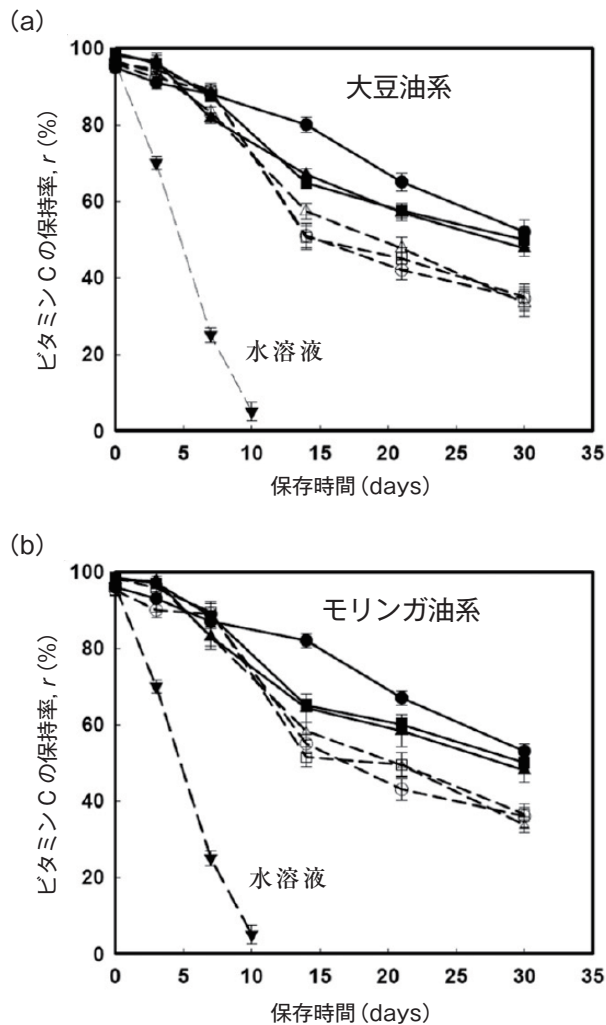


図5 貯蔵温度がW/O エマルションにおけるビタミンCの保持率に与える影響³⁾

(a)大豆油系、(b)モリンガ油系。貯蔵温度:4℃(黒)、25℃(白抜き)。ビタミンCの濃度:●○=10wt%、■□=20wt%、▲△=30wt%。
▼: ビタミンC水溶液の保持率(25℃)

3.2 W/O/W エマルションの安定性

浸透圧はW/O/W エマルション液滴の安定性に重要な役割を果たしている、逆にラプラス圧の影響でエマルションが不安定になる。さらに、分散相に電解質を少量添加することでラプラス圧に対抗する効果を示し、エマルションの安定性向上に繋がると考えられる⁵⁾。そこで次の実験として、外水相に異なる糖質の添加と、内水相にゼラチンの添加の効果について調べた。

ビタミンCを内包するW/O/Wエマルションにおける糖質添加の影響:

図6に糖質の添加がエマルションの作製に与える影響を示した。ビタミンCを内包するW/O エマルションの内水相にゼラチンを添加することにより、CV値の低い単分散液滴の作製ができて、

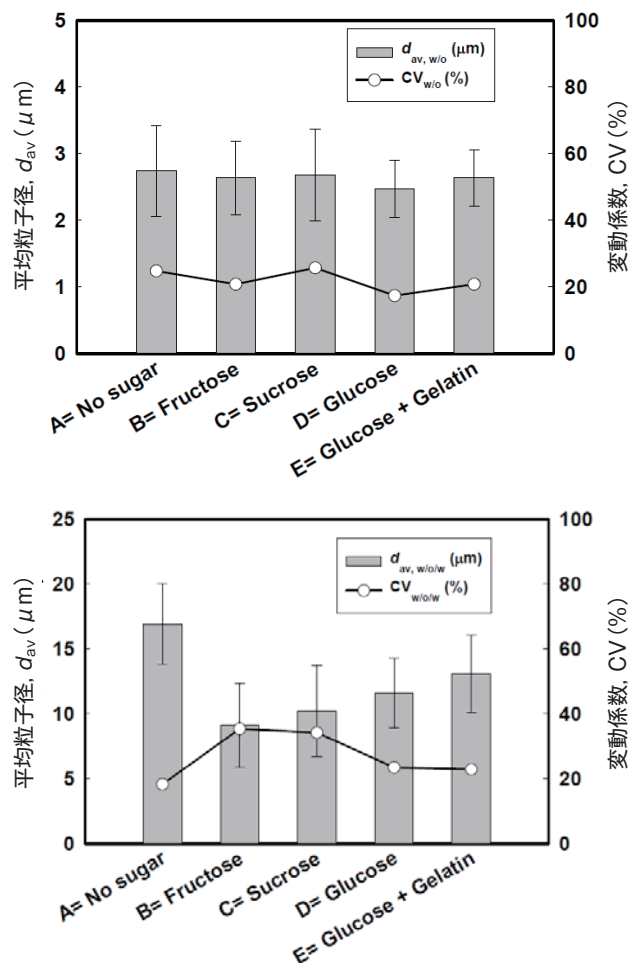


図6 糖質の種類が平均粒子径(d_{av})と変動係数(CV)に与える影響⁵⁾

(上)W/O エマルションの d_{av} と CV、(下)W/O/W エマルションの d_{av} と CV。

エマルション安定性の向上に繋がることわかった。また、ゼラチンのゲル化とキレート作用が安定性の向上に関係するとみなされた。

より安定した W/O/W エマルションを作製するため、各水相のバランスのとれた組成を調べた。一次乳化プロセスで調製した W/O エマルション液滴の d_{av} は $2.5\mu\text{m}$ と、CV は約 20% であった。また、二次乳化プロセスによる調製したエマルション液滴の d_{av} が $12\sim 20\mu\text{m}$ と、CV が約 20% ~ 25% に増大した。さらに、糖質の添加により、 d_{av} 値が 20 ~ 30% 低下した。

内水相にビタミン C を 10% を内包する W/O/W エマルション液滴の顕微鏡画像を図 7 に示した。

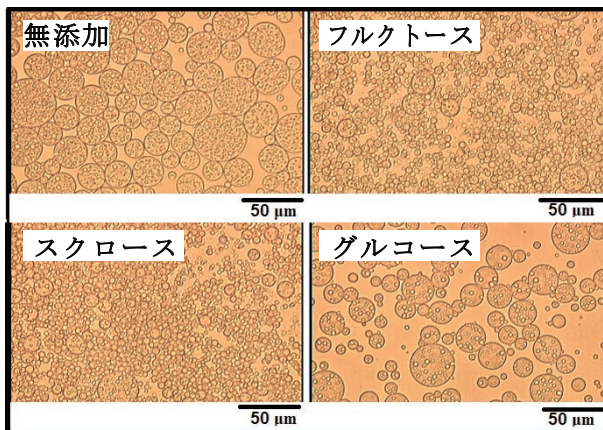


図 7 ビタミン C 内包する W/O/W エマルション液滴の顕微鏡画像：外水相の糖質有無の影響⁶⁾

外水相への糖質添加の結果が、無添加系やグルコース系の場合は 2 日までクリーミングが発生しなかったのに対して、スクロースおよびフルクトースの添加系で急速にクリーミングが発生した。

ビタミン C 保持に関わる動力学解析：

W/O/W エマルションにおけるビタミン C の保持機構について、以下の一次反応速度式で評価した：

$$\ln C_{AA}/C_{AA,0} = -kt$$

(C_{AA} と $C_{AA,0}$ はビタミン C の濃度、 k は速度定数、 t は 4°C での保存時間)

初期過程でビタミン C 保持の動力パラメーターがビタミン C 保持率の実験結果のフィッティングを適用し求めた。その結果を図 8 に示した。すべ

ての W/O/W エマルションについて、相関 (r^2 値) が >0.95 であり、一次速度論が妥当と考えられる。

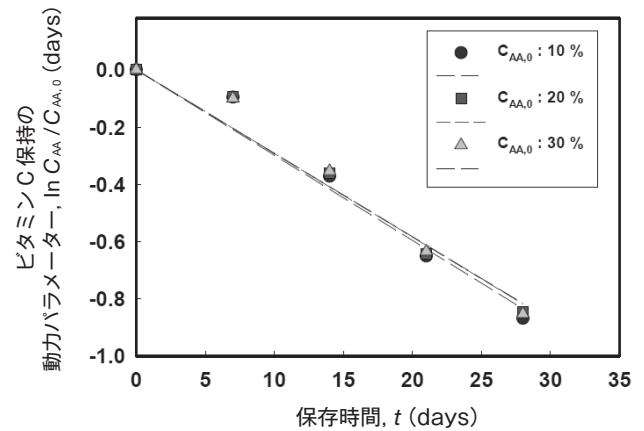


図 8 4°Cにおけるビタミン C 保持動態の経時変化⁶⁾

ビタミン C 濃度：●=10wt%、■=20wt%、▲=30wt%。
 $C_{AA}=0\%$ は内水相中のビタミン C の初期濃度を示す。

本研究では、水中での安定性が低いビタミン C の高安定化を図るため、高濃度のビタミン C を含む内水相を必要に応じてゲル化させて安定化した W/O/W エマルションの作製技術の開発を図ることを目的としている。図 9 に本研究によるビタミン C 安定化の模式図を示した。ビタミン C を高濃度 (30wt% まで) で内包した W/O エマルションが、ビタミン C 水溶液に比べて保持率を高く維持できること、ならびに W/O エマルションへの内包化によるビタミン C の徐放制御が可能であることを示した。

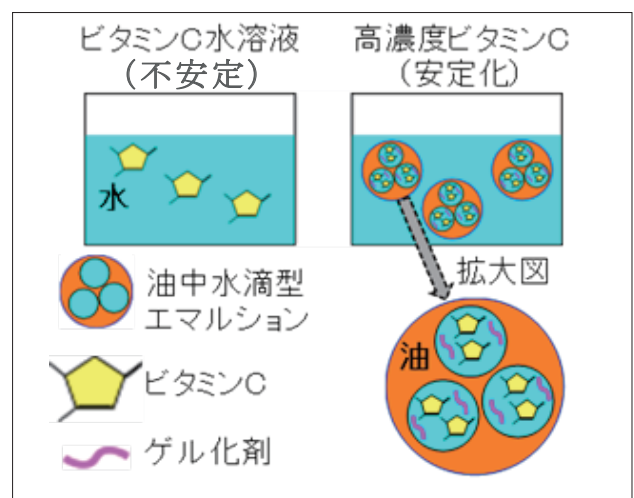


図 9 多相エマルション中への内包によるビタミン C の高安定化の模式図⁶⁾

左側：水中で不安定なビタミン C；右側：内水相のゲル化による高濃度のビタミン C を内包する安定化した W/O/W エマルション

4. まとめ

本研究では、ビタミンCを安定させるためにW/O/W エマルジョンの適用を図った。水溶液中のビタミンCの挙動の基礎的理解、安定化システムの構築が見出された。これらの結果、適切な条件のもとでビタミンCは長期間安定化され、初期の特性を維持できる分散系の開発が可能となった。また、安定したビタミンCの成功例は、皮膚浸透などの最終的な用途の例を挙げることができ、その機能を維持することが期待される。ビタミンCを高濃度で内包するW/O/W エマルジョンを低温貯蔵した場合、検討期間(35日間)中に液滴サイズはほとんど変化せず物理的に安定であった。W/O/W エマルジョンは、貯蔵30日後にビタミンCの比較的高い保持率を示し、その保持率は動力学的に一次反応により解析できた。得られた結果は高濃度ビタミンCなどの重要なビタミンをW/O/W エマルジョン系に利用する技術として、食品業界での用途が期待される。また、多相エマルジョンやマイクロカプセル化によりビタミンCを安定的に内包化する技術の開発により、飲料用途に実用的に応用可能な液体マイクロカプセルの作出が期待される。

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大な研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に心より感謝を申し上げます。また共同研究者としてご尽力いただきましたNauman Khalid氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Bendich, A. (1990) Antioxidant micronutrients and immune responses, in: A. Bendich, R.K.Chandra (Eds.) *Micronutrients and Immune Functions*, New York Academy of Sciences, New York, pp. 168–180.
- 2) Lee, J., Kim, J., Han, S., Chang, I., Kang, H., Lee, O., Oh, S., & Suh, K. (2004) The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling pH and electrolyte concentration. *Journal of Cosmetic Science*, 55, 1-12.
- 3) Khalid, N., Kobayashi, I., Neves, M. A., Uemura, K., Nakajima, M. (2013) Preparation and characterization of water-in-oil emulsions loaded with high concentration of L-ascorbic acid. *LWT- Food Science and Technology*, 51, 2, 448-454.
- 4) McClements, D. J. (2004) *Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques* (2nd ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 233–268.
- 5) Khalid, N., Neves, M. A., 小林功, 植村邦彦, 中嶋光敏. (2013) ビタミンCを高濃度で内包したW/O エマルジョンの作製と特性評価. 日本食品科学工学会, 第60回記念大会, 実践女子大学, 東京, 要旨集 2Fa12, p. 105.
- 6) Khalid, N., Kobayashi, I., Neves, M. A., Uemura, K., Nakajima, M. (2013) Preparation and characterization of water-in-oil-in-water emulsions containing a high concentration of L-ascorbic acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77, 6, 1171-1178.

Preparation and characterization of highly stable liquid microcapsules encapsulating high concentrations of hydrophilic antioxidant substances

Marcos A. Neves, Isao Kobayashi*, Mitsutoshi Nakajima
*University of Tsukuba, *National Food Research Institute, NARO*

Summary

We have investigated a novel approach for encapsulating high concentrations of hydrophilic antioxidants. In particular, the authors have investigated the formulation of Vitamin C into W/O/W emulsions, aiming to increase the dispersion stability, compared to the considerably low stability of such vitamins when dissolved in water. For instance, Vitamin C is well known for its various physiological effects, such as antioxidant activity, enhancement of collagen synthesis, inhibition of melanin synthesis, antiviral activity, and enhancement of immune system, among others. On the other hand, Vitamin C and its derivatives are extremely sensitive to heat, light, and oxidation, mostly due to free radical chain reactions, which may eventually lead to the formation of toxic compounds such as 2,3-diketo-L-gulonic and L-xylosome, especially at a high temperatures. On this concern, we have investigated the formulation of double emulsions encapsulating high concentrations of Vitamin C, foreseeing extended shelf-life stability. The technique of choice was to prepare W/O/W emulsions encapsulating up to 30 wt% Vitamin C in the inner aqueous phase, using soybean oil or moringa (*Moringa oleifera*) oil as the oil phase, by Two-step homogenization process. In the first-step homogenization, an (inner) aqueous phase was prepared by dissolving between 5 to 30 wt% Vitamin C and 1 wt% MgSO₄ in Milli-Q water, followed by dispersion in a continuous oil phase containing 5 wt% tetraglycerol condensed ricinoleate (TGCR) a hydrophobic emulsifier, using a rotor-stator homogenizer (Polytron, 7,000 rpm, 10 min). In some cases, up to 1 wt% gelatin was also included in the inner aqueous phase, prior to homogenization, in order to enhance the stability of the W/O emulsions prepared. The primary W/O emulsions formulated had an average aqueous droplet diameter of 2.0 to 3.0 μm. On the sequence, W/O/W emulsions were prepared in the second-step homogenization, by using a rotor-stator homogenizer (5,000 rpm, 5 min) to disperse the previous W/O emulsion (30% volume ratio) in an outer aqueous phase containing 1 wt% decaglycerol monolaurate (DGM), a hydrophilic emulsifier, 1 wt% MgSO₄, and between 10 to 30 wt% sugar (glucose, fructose or sucrose). The W/O/W emulsions contained oil droplets with an average diameter of 14 to 18 μm, and coefficient of variation (CV) values between 18% to 25%. The results demonstrated that stable food-grade W/O/W emulsions containing a high concentration of L-ascorbic acid were successfully formulated by adding gelatin and magnesium sulfate to the inner aqueous phase and glucose in both aqueous phases, in order to balance the osmotic pressure between the inner and outer phases. Furthermore, the addition of gelatin contributed to higher retention of vitamin C (up to 40%), following a first-order kinetics. Moreover, the resulting W/O/W emulsions containing high contents of Vitamin C were physically stable up to 35 days storage at 4°C. Our results provide a better understanding of the stable formulation of dispersions containing high concentrations of vital vitamins such as vitamin C. In particular, W/O/W emulsions have promising application in food industry, considering the enhanced protection for bioactive compounds while enabling their controlled release, as compared to W/O emulsions.