

抗酸化性乳化剤の機能性化粧品としての利用に関する基礎的研究

近畿大学工学部生物化学工学科

渡 邊 義 之

Octanoyl, lauroyl and palmitoyl ascorbates as antioxidative emulsifier were synthesized by the condensation of ascorbic acid and the corresponding fatty acids in acetone using an immobilized lipase from *Candida antarctica*. The oxidation process of methyl linoleate as an oil droplet in the O/W emulsion with ascorbic acid or acyl ascorbate was measured at 40°C, and their antioxidative properties against the oxidation were examined. Hydrophilic prooxidant, AAPH, or lipophilic prooxidant, AMVN, was added to the water or oil phase to investigate the properties, and the kinetic parameters for the oxidation expressed by the Weibull equation were evaluated.

It was suggested that most of the ascorbic acid molecules in the emulsion would be present in the water phase due to its high hydrophilicity and suppress the AAPH-induced oxidation on the interface between the water and oil phases. Lauroyl and palmitoyl ascorbates would be dissolved in the oil phase and contribute to the suppression of the oxidation in the oil phase rather than on the interface. Octanoyl ascorbate, whose hydrophilic-lipophilic balance number is 11.8, would be in both phases. Regardless of the presence and type of the ascorbate, the rate constant, k , of the Weibull equation decreased as the pH of the water phase increased.

1. 緒 言

脂質は人の食生活に必要不可欠なばかりでなく、化粧品・医薬品・化成品の原料として日常生活に欠くことのできない物質である。しかし、脂質の主要な構成成分である不飽和脂肪酸は酸化安定性が低く、酸化脂質は生体に対して悪影響を及ぼし様々な疾病を引き起こすため、脂質の酸化現象は品質管理の上で大きな問題になっている。特に、近年優れた生理活性が注目されているエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)を構成脂肪酸とする高度不飽和脂質類に対し、効果的な酸化防止策をいかに講ずることができるかは大きな課題である。そこで、我々は酵素を用いて多価不飽和脂肪酸等の各種脂肪酸にビタミンC(L-アスコルビン酸)等の水溶性抗酸化剤を縮合させることによりアシルアスコルビン酸を合成した¹⁾。得られた生成物は、親油性基と親水性基を併せ持つ可食性界面活性剤となり得る。また、アスコルビン酸の抗酸化性の発現に寄与する分子内のエンジオール-ラクトン共鳴構造が特異的に保持されるため、機能性の高い脂質を豊富に含む化粧品に対し酸化防止剤として利用することが可能となる。さらに、酵素合成したアシルアスコルビン酸は、食しても腸管において体内のリパーゼにより基質であるアスコルビン酸と脂肪酸に分解して吸収されるため、可食性であると

考えられる。生体にも環境にも優しい機能性化粧品としての利用が期待される。

本研究は、抗酸化性乳化剤を化粧品での一般的な形態であるエマルション系にて利用した場合のその抗酸化作用および乳化特性を測定し、系内の脂質に対する作用挙動を明らかにすることを目的とする。このことにより、化粧品に代表とされる各種化学製品の化学的および物理的安定性を抗酸化性乳化剤を用いることによって改善・向上させるための一助になるものと考え、アシル鎖長の異なるアシルアスコルビン酸を合成し、それらのO/W型エマルション系での脂質酸化及ぼす影響について二種類の酸化促進剤を用いて検討した。また、アシルアスコルビン酸を使用した際のエマルション中のpHの影響についても併せて検討した。さらに、アシルアスコルビン酸を用いて調製したO/W型エマルション系の外水相に含まれる水溶性物質の安定性についても速度論的解析を行った。

2. 実 験

2.1 材 料

水溶性酸化促進剤として2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩(AAPH)を、油溶性酸素促進剤として2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(AMVN)を使用した。O/W型エマルション系の内油相にはリノール酸メチルを使用し、これを酸化指標物質とした。また、外水相に含まれる水溶性物質の安定性評価には、(+)-カテキンを用いた。アシルアスコルビン酸は、*Candida antarctica*由来の固定化リパーゼChirazyme® L-2 C2の位置特異的触媒作用を利用してL-アスコルビン酸とオクタン酸、ラウリン酸またはパルミチン酸との縮合



Studies on application of antioxidative emulsifier as functional cosmetics

Yoshiyuki Watanabe

Department of Biotechnology and Chemistry, School of Engineering, Kinki University

反応により合成された。これらの精製は、既報のものに一部修正を加えて実施した²⁾。

2.2 O/W型エマルションの調製

1.0% (w/v) のデカグリセリンモノラウリン酸エステル ML-750水溶液 5 ml にリノール酸メチル 5 ml を加え、氷冷しながら、ロータ/ステータ式ホモジナイザを用いて予備乳化した (10,000rpm, 5 分間)。この粗エマルションを孔径 0.8 μm の親水性セルロースアセテート膜に供して膜乳化を実施し、O/W型エマルションを得た。なお、AAPH を使用する場合は ML-750水溶液に、AMVN を利用する際にはリノール酸メチルに、それぞれ 1.0% (w/v) となるように添加した。抗酸化剤を添加する場合、1, 10 または 100 $\mu\text{mol/l}$ のアスコルビン酸、オクタノイル、ラウロイルまたはパルミトイルアスコルビン酸を添加した。また、pH の影響について検討する場合には、塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液を用いて pH 3, 4 または 5 に調整した水相を使用した。得られた O/W型エマルションは、暗所中 40 $^{\circ}\text{C}$ にて 200 rpm で攪拌しながら保存した。

経時的に採取した O/W型エマルションを蒸留水にて 100 から 500 倍に希釈後、遠心沈降式粒度分布測定装置にて油滴粒子径の測定を行った。

2.3 油滴の酸化安定性

O/W型エマルション液 100 μl を採取し、これにクロロホルム/メタノール溶液 (2/1 (v/v)) を 300 μl 加え、よく混ぜた。15,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、油相を 50 μl 取り出し、溶媒を蒸散させた。その後、ヘキサン/ミリスチン酸メチル混合液 (100/2 (v/v)) を 300 μl 添加してガスクロマトグラフィ分析用試料とした。ガスクロマトグラフィ分析には、水素炎イオン化検出器およびキャピラリーカラム (0.32 $\phi\text{mm} \times 15\text{m}$, 0.2 μm ポリエチレングリコール) を用いた。キャリアガスには窒素を用い、流量 1.8 ml/min にて測定した。カラム温度は 180 $^{\circ}\text{C}$ とし、インジェクタおよびディテクタ温度はいずれも 200 $^{\circ}\text{C}$ であった。なお、ミリスチン酸メチルは内部標準物質として利用した。

2.4 外水相カテキンの安定性

O/W型エマルション調製時に所定量のカテキン (1 mmol/l) およびオクタノイルアスコルビン酸またはアスコルビン酸 (1 $\mu\text{mol/l}$ ~ 3.76 mmol/l) を添加して、暗所中 40 $^{\circ}\text{C}$ にて保存した。経時的にサンプリング後、遠心分離にて水相を取り出し、高速液体クロマトグラフィにてカテキン残量を測定した。ODS カラム (4.6 $\phi\text{mm} \times 250\text{mm}$) を用いて 280 nm にて検出した。溶離液にはメタノール/水/リン酸 = 20/80/0.5 (v/v/v) を用い、流量は 1.0 ml/min とした。

3. 結果および考察

3.1 油滴の酸化安定性に及ぼすアシルアスコルビン酸の濃度およびアシル鎖長の影響

親水性酸化促進剤 AAPH または親油性酸化促進剤 AMVN を水相または油相に添加した O/W型エマルション中でのリノール酸メチルの酸化過程に及ぼす 1 $\mu\text{mol/l}$ のアシルアスコルビン酸およびアスコルビン酸の影響を図 1 に示す。同様に 10 および 100 $\mu\text{mol/l}$ の各種抗酸化剤を添加した場合の酸化過程も得た。保存期間中の油滴粒子径の測定結果から、平均粒子径は約 4.5 μm でほぼ一定であった。エマルション中のリノール酸メチルの酸化過程に式 1 に示す Weibull モデル³⁾を適用して速度論的解析を試みた。

$$Y = \exp [-(kt)^n] \quad \text{式 1}$$

ここで Y はリノール酸メチルの未酸化率、 k は酸化速度定数、 t は時間および n は形状定数である。図 1 中の実線は、算出した Weibull パラメータを用いて描いた計算線である。図 2 に酸化速度定数と各種抗酸化剤濃度の関係を示す。図 2 中の点線は、抗酸化剤を含まない場合の酸化速度定数を示している。抗酸化剤を添加した場合の k 値は、いずれも抗酸化剤を含まない場合よりも低かった。これは、AAPH および AMVN 添加に関係なく抗酸化剤がリノール酸メチルの酸化抑制に寄与したことを示している。AAPH 添加系では、アスコルビン酸濃度が増えるに従い k 値は大きく低下した。オクタノイルアスコルビン酸も同様な傾向が認められたが、その程度はアスコルビン酸よりも小さかった。ラウロイルおよびパルミトイルアスコルビン酸を添加した場合、 k 値はそれらの濃度に依存せず、抗酸化剤を含まないコントロールに近い値を示した。我々は、アスコルビン酸と各種飽和アシルアスコルビン酸のラジカル消去活性がほぼ同等である知見を得ている⁴⁾。したがって、親水性の高い抗酸化剤が水溶性酸化促進剤による油相の酸化を抑制し、一方親水性が低い場合には酸化抑制に寄与できなかったものと考えられる。他方、AMVN を含んだエマルションでは、アスコルビン酸濃度の増加により若干 k 値が低下したが、10 および 100 $\mu\text{mol/l}$ の添加では変化がなかった。アシルアスコルビン酸を添加した場合、AAPH 添加系と異なり、それらの濃度が増えると k 値が増大する傾向が求められた。AMVN 添加系では、いずれの抗酸化剤濃度においても k 値は、アスコルビン酸 > オクタノイル > ラウロイル > パルミトイルアスコルビン酸の順に高かった。すなわち、アシル鎖長が長いほど、親油性酸化促進剤により促される油相の酸化に対する抑制効果が大きかった。しかしながら、抗酸化剤濃度の増大に伴い k 値が高くなった。以上の結果から、親水性の高いアスコルビン酸分子の多くは

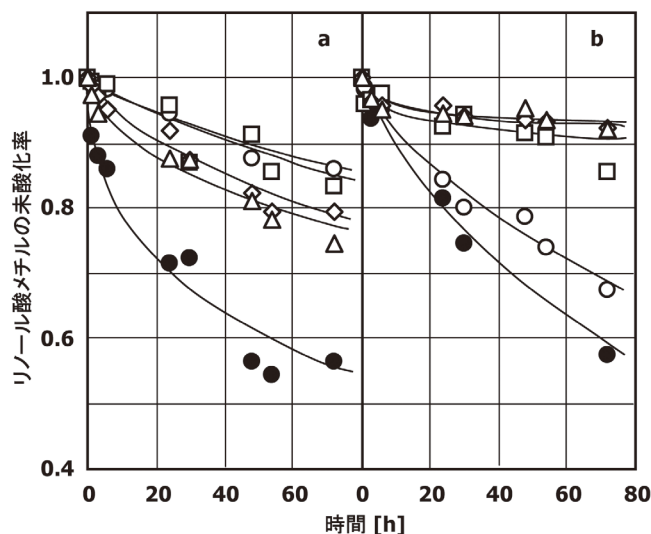


図1 (a) AAPH および (b) AMVN 添加系にて $1\mu\text{mol/l}$ の (○) アスコルビン酸, (□) オクタノイル, (◇) ラウロイルまたは (△) パルミトイルアスコルビン酸を含んだ O/W 型エマルジョン中のリノール酸メチルの 40°C での酸化過程 (●は抗酸化剤を含まないコントロール). 実線は Weibull パラメータを用いて算出された計算線を示す.

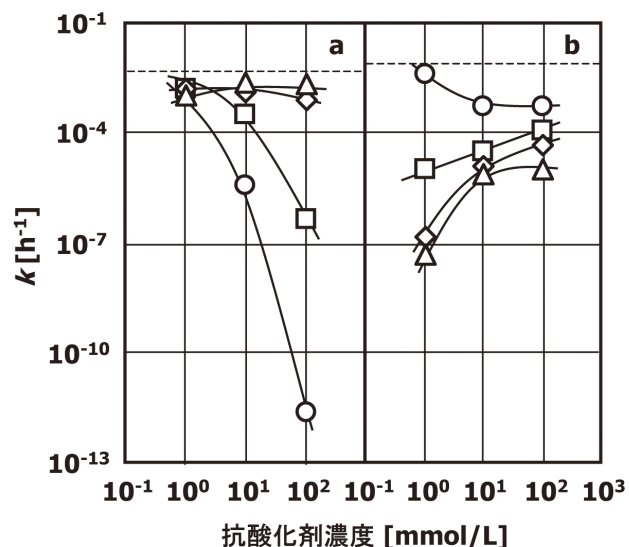


図2 (a) AAPH および (b) AMVN を添加した O/W 型エマルジョン中のリノール酸メチルの酸化速度定数, k , に及ぼす抗酸化剤濃度の影響 (シンボルは図 1 に同じ). 点線は, 抗酸化剤を含まない場合の k 値を示す.

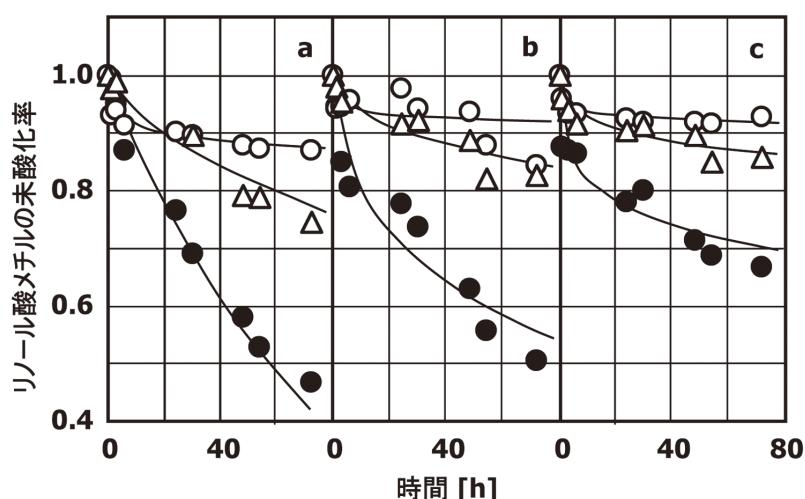


図3 (a) pH 3, (b) pH 4 および (c) pH 5 にて $100\mu\text{mol/l}$ の (○) アスコルビン酸または (△) パルミトイルアスコルビン酸を含んだ O/W 型エマルジョン中のリノール酸メチルの酸化安定性 (●は抗酸化剤を含まないコントロール).

実線は Weibull パラメータを用いて算出された計算線を示す.

エマルジョン中の水相に存在しており, AAPH に起因した油水界面からのリノール酸メチルの酸化を効果的に抑止し, 一方で AMVN による油相内部での酸化には強い抑制効果を示さなかったものと考察される. 対照的にラウロイルおよびパルミトイルアスコルビン酸分子は油相内に溶解し, 油水界面よりも油相内部で生じる酸化に対し抑制効果を示したものと考えられる. 高濃度の抗酸化剤は, 酸化促進作用を示すことが知られている⁵⁾. 油相に溶解した多くのアシルアスコルビン酸分子が部分的に油相内部での酸化を促し, その結果その酸化抑制効果が低下したものと推察

される.

形状定数については, 酸化促進剤の種類, 抗酸化剤濃度およびアシル鎖長との顕著な関係性が認められなかったが, いずれの場合も 1 より小さい値を得た. いずれの系においても誘導期間を経ずに酸化が進行したことが示唆された.

3.2 種々の pH におけるアシルアスコルビン酸とアスコルビン酸の酸化抑制作用の比較

pH 3, 4 および 5 の AAPH 添加エマルジョン系でのリノール酸メチルの酸化過程に及ぼすパルミトイルアスコ

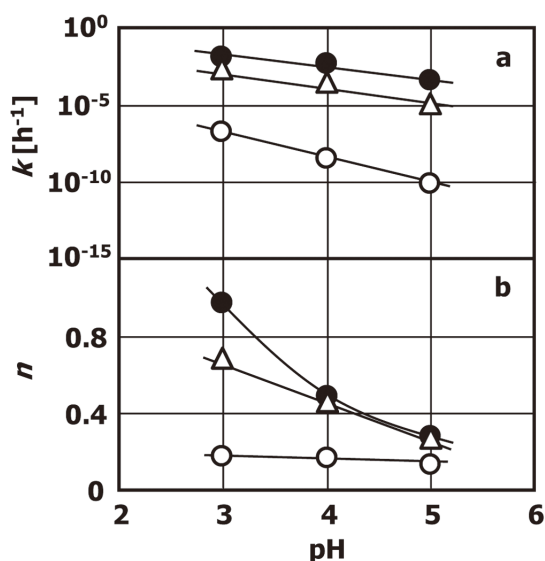


図4 O/W型エマルジョン中のリノール酸メチルの酸化に対する (a) 酸化速度定数, k , および (b) 形状定数, n , の pH 依存性 (シンボルは図3に同じ)。

ルビン酸およびアスコルビン酸の影響を図3に示す。また、得られた結果にWeibull式を適用して算出した k および n 値のpH依存性を図4に示す。いずれの場合も、pHが高くなるにつれ k 値は低下した。いずれのpHにおいてもアスコルビン酸を添加した場合に最も低い k 値が観察され、コントロールで最も高かった。水相中のAAPHにより誘発された酸化はアスコルビン酸により強く抑制され、パルミトイルアスコルビン酸の抑制効果は小さかった。この結果は、前述したアシルアスコルビン酸およびアスコルビン酸の作用挙動についての考察を支持するものと考えられる。図5にpH 3, 4および5の抗酸化剤を含まないエマルジョンの乳化安定性を示す。pH 4および5の場合、エマルジョンは安定であったが、pH 3では時間とともに油滴粒子径が増大した。したがって、pH 3でのリノール酸メチルの低い酸化安定性は、油滴粒子の合一や凝集にともなう乳化安定性の低下に起因したのと考えられる⁶⁾。同様の傾向は抗酸化剤を添加した場合にも観察された。しかしながら、アスコルビン酸を添加した場合の k 値のpH依存性はパルミトイルアスコルビン酸のそれよりも強かった。これは、pHの増大により水相中のアスコルビン酸分子内のエンジオール基の解離を通して、その電子供与能が高まったことに由来したのと考えられる⁷⁾。一方、油相中のパルミトイルアスコルビン酸にはこのような現象が生じなかったと推察される。

パルミトイルアスコルビン酸を添加した場合とコントロールでの n 値はpHに強く依存した。対照的にアスコルビン酸添加系での n 値はほぼ一定であった。これはアスコルビン酸のエマルジョン中での局在化に起因する酸化抑制効

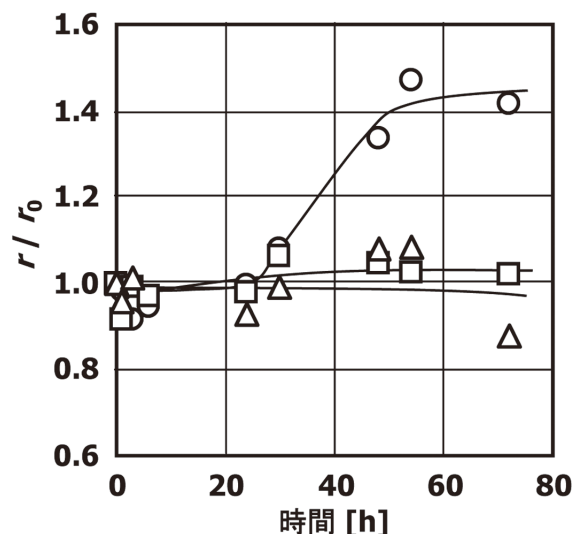


図5 (○) pH 3, (□) pH 4 および (△) pH 5 における O/W 型エマルジョンの乳化安定性。
 r 値は油滴粒子径, r_0 はその初期値を示す。

果が強いため、pHによる直接的な影響が弱かったことによるものだろう。

3.3 外水相成分の安定性に及ぼすアシルアスコルビン酸の影響

O/W型エマルジョン中でのカテキンの安定性に及ぼすアスコルビン酸およびオクタノイルアスコルビン酸の影響について検討した。カテキンの分解過程に式1を適用してその分解速度定数 k を安定性の指標とした。いずれも10 μ mol/l以下の添加でコントロールの k 値よりも低い結果が得られ、カテキンの分解が抑制されたことが示された。一方、1 mmol/l以上の添加では k 値がコントロールよりも高かった。アスコルビン酸とオクタノイルアスコルビン酸の添加による顕著な差異は認められなかった。水溶液中のカテキンの分解は、溶存酸素によるカテキン分子内のB環の一電子酸化から始まり、その結果セミキノラジカルが生成することが知られている⁸⁾。Davies式から算出されるオクタノイルアスコルビン酸の親水性親油性バランスは11.8である⁹⁾。これらの現象についての理由は不明であるが、今後、より親油性の高いアシルアスコルビン酸を用いて実験を進めることにより、O/W型エマルジョン系での水溶性物質に対する抗酸化性乳化剤の作用挙動が解明されるものと考えられる。

4. 総括

O/W型エマルジョン中での油滴酸化に対する抗酸化性乳化剤の作用は、その親水性親油性バランスのような特性により大きな差異を示すことが明らかとなった。また、エ

マルションのpHも乳化および酸化安定性に寄与するだけでなく、抗酸化性乳化剤の酸化抑制効果にも影響を及ぼすことが示唆された。さらに、O/W型エマルション中の水溶性成分の安定性も抗酸化性乳化剤の濃度に依存することが示された。これらのことから、抗酸化性乳化剤の利用には目的に応じた効果的な特性を有する材料とその使用量の選定が肝要であるといえよう。

謝 辞

本研究を実施するにあたりご支援頂いた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝致します。

(参考文献)

- 1) Watanabe Y, Adachi S, Nakanishi K, *et al.*: Condensation of L-ascorbic acid and medium-chain fatty acids by immobilized lipase in acetonitrile with low water content, *Food Sci. Technol. Res.*, 5, 188-192, 1999.
- 2) Yan Y, Bornscheuer UT, Schmid RD: Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters, *Biotechnol. Lett.*, 21, 1051-1054, 1999.
- 3) Cunha LM, Oliveira FAR, Oliveira JC: Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by Weibull probability distribution function, *J. Food Eng.*, 37, 175-191, 1998.
- 4) Watanabe Y, Kuwabara K, Adachi S, *et al.*: Production of saturated acyl L-ascorbate by immobilized lipase using a continuous stirred tank reactor, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4628-4632, 2003.
- 5) Matsui T, Yoshida M, Ifuku T, *et al.*: Preparation of microcapsules containing α -tocopherol as an antioxidant and the application for cosmetics (in Japanese), *The research reports of the Faculty of Engineering, Kagoshima University*, 47, 71-77, 2005.
- 6) Sims R: Oxidation of fats in food products, *Inform*, 5, 1020, 1022-1028, 1994.
- 7) Muzolf M, Szymusiak H, Gliszczynska-Świąło A, *et al.*: pH-Dependent radical scavenging capacity of green tea catechins, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 816-823, 2008.
- 8) Mochizuki, M, Yamazaki, S, Kano, K, *et al.*: Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1569, 35-44, 2002.
- 9) Davies JT: A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent, In: *Proceedings of the Second International Congress of Surface Activity*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, 426-438.