

X線小角散乱法による乳化香料（フレーバー）の相構造解析

Phase structure analysis of emulsified flavor by small-angle
X-ray scattering using synchrotron radiation

藤村 太一郎^{*,**}, 矢追 隆利^{***}, 佐伯 大輔^{****},
FUJIMURA Taichiro YAOI Takatoshi SAEKI Daisuke

松山 秀人^{*****}, 佐藤 眞直^{*****}
MATSUYAMA Hideto SATO Masugu

In order to analyze the interfacial state of micelles in emulsified flavor, small-angle X-ray scattering (SAXS) measurements were performed and directly evaluated. The dynamic light scattering method, when measured in emulsions with various emulsifiers, the determined average particle size ranged from 45 to 453 nm. Meanwhile, using the SAXS method, the particle information was derived from the scattering profile, which was inferred to be a spherical profile with a shoulder at $q = 0.05\text{--}0.2 \text{ nm}^{-1}$ and a wide dispersion width. Guinier analysis of the obtained data showed that the particle sizes ranged from 54 to 135 nm, with a rather large size distribution. Since the difference in film thickness profiles was slight, when the thickness of the film was estimated, according to molecular force field calculations using Materials Studio, the value was about 5–7 nm, suggesting that the film was much thinner than the grain size.

1. 緒言

香料は、食品香料（フレーバー）と化粧品香料（フレグランス）に分類される。なかでもフレーバーは、食品の「おいしさ」にとって非常に重要な役割を果たしている。そのフレーバーを構成する香料は、基本的にオイルであり、油溶性であるため、飲料などの水溶性食品ではオイルを可溶化しなければならない。そのため、乳化によってエマルジョンを形成させたり、アルコールを用いてオイルを水溶性へと移行させたりする製剤化の加工技術が必要となる。本研究で注目するのは、前者の乳化香料であり、フレーバーの一つの形態である。現在まで、X線小角散乱(SAXS)により、乳化剤を用いたミセル構造解析^{1,2)}や、香料を可溶化したミセル構造の状態^{3,4)}に関する報告はされている。また、最近では、大型放射光施設 SPring-8 を食品へ活用し^{5,6)}、界面活性剤が形成する会合構造の評価事例⁷⁾など多々ある。

乳化香料での調製は、主にエマルジョンを構成するミセル粒径とその安定性を制御・維持する技術によって行っている。ミセル粒径は、乳化剤の組み合わせと乳化機によって制御し、動的光散乱測定による粒径を経時的に評価する方法でその安定性を検証してきた。しかし、その粒径評価は、通常の動的光散乱法では、エマルジョンの拡散係数を測定し、得られた係数からアインシュタインーストークス式を用いて算出している。そのため、直接、その粒子を評価しているわけではなく、総じて、経時的に測定しているため、製品開発に時間を要している。また、乳化剤の違いによってミセルにどのような相違が生じ、その安定性にどう影響を及ぼしているのかについても明らかにされていない。一方、SAXS法は、通常の動的光散乱法での解析と異なり、散乱プロファイルから直接、粒子の情報を導くことができるため、乳化香料中のミセルの界面状

* 食物栄養学科 教授, ** 元 塩野香料 (株) 顧問, *** 塩野香料 (株) 研究員, **** 信州大学工学部物質化学科助教, ***** 神戸大学大学院工学研究科 教授, ***** (公財) 高輝度光科学研究センター 室長代理

態をマイクロ解析できると考える。

そこで、本研究では香料化合物について乳化剤の親水性と親油性の比率（親水親油バランス）、すなわち Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB)⁸⁾ を変えた乳化香料について、SAXS 法による粒径、形状、皮膜厚さなどの内部構造計測を行い、解析する。その結果、得られたプロファイルの比較評価からミセルの変化が反映でき、その違いが見られないかを検討する。

2. 方法

(1) 試料

試料は、乳化香料であり、HLB 9~15.59 (図 1) の乳化剤を用いて、2 種類の香料化合物（シトラルールまたはリモネン）を精密乳化分散機クリアミックス CLM-0.8S（スクリーン S1.8-24、ローター R1；エム・テック（株）、大阪府和泉市）15,000 rpm、3 分間で攪拌し、それぞれ製剤化した。なお、乳化剤は、親水性として日光ケミカルズ（株）または阪本薬品工業（株）製ポリグリセリン脂肪酸エステルを、一方、親油性として太陽化学（株）製ポリグリセリン縮合リシノレイン酸エステルを用いた。また、香料化合物は、富士フィルム和光純薬（株）製のシトラルール（アルデヒド化合物）またはリモネン（炭化水素化合物）を用いた。

(2) 動的光散乱測定

得られた乳化香料は、オートサンプラー FP-3000付濃厚系粒径アナライザー FPAR-1000（大塚電子（株）、大阪府枚方市）にて粒径を測定し、その分布を算出した。

(3) SAXS 測定

SAXS 測定は、(公財) 高輝度光科学研究センター大型放射光施設 SPring-8（兵庫県佐用郡佐用町）のビームライン BL19B2 を使用して実施した。

得られた乳化香料は、X 線結晶解析用石英ガラスキャピラリー（直径 2.0 mm；(株) トーホー）に充填し、ビームライン BL19B2 においてカメラ長約 3m の SAXS レイアウトとカメラ長約 42m の極小角 X 線散乱 (USAXS) レイアウトで行った。X 線のエネルギーは、18 keV に調整した。この条件での測定 q レンジは、SAXS レイアウトで $0.06\text{--}3\text{ nm}^{-1}$ 、USAXS レイアウトで $0.05\text{--}0.2\text{ nm}^{-1}$ であった。各レイアウトのカメラ長の較正は、ベヘン酸銀の回折プロファイルを用いて実施した。なお、実験はロボットを使用して自動測定を行った。

同条件で測定したデータは、空気散乱のバックグラウンドを差し引いた後、参照試料のグラッシーカーボンの散乱プロファイルデータを用いて散乱強度を規格化し、SAXS レイアウトの測定データと USAXS レイアウトの測定データをつなげて解析に用いた。

なお、ビームラインの選定は、評価対象のミセルサイズが数 100 nm と想定されたため、このサイズ領域を測定可能な USAXS レイアウトでの測定が可能な BL19B2 で行った。

(4) 粒子径

SAXS プロファイルから近似モデル Guinier 解析⁹⁾ にて平均的な粒子径を算出した。まず、得られたデータを Guinier プロットに変換、すなわち、縦軸を強度の対数 $\ln(I(q))$ に、横軸を q^2 に変換して導いた。その後、ここでの散乱体は球であると仮定し、推定される粒子径 R に対して、 $q < 1/R$ の範囲で直線になる部分に 1 次式でフィッティングした。その結果、得られた Guinier プロットの勾配により Guinier 式 (1) から粒子径 R を求めた。

$$\ln(I(q)) \approx \ln(A \cdot (\Delta\rho \cdot v)^2) - \left(\frac{1}{5}R^2\right) \cdot q^2 \dots\dots\dots (1)$$

(5) 皮膜の厚さ

皮膜の厚さとは、水中油滴 (O/W) 型のエマルジョンであるので、親水性乳化剤 (ポリグリセリン脂肪酸エステル) の各々の親水基 (ポリグリセリン) と疎水基 (脂肪酸) の長さ (体積) の合計を指す。そこで、Materials Studio (ver. 6.0, 2017) を用いた分子力場計算による分子シミュレーションで、各々の親水基部分と疎水基部分の長さを算出し、合わせた。

3. 結果と考察

(1) 乳化と動的光散乱

乳化剤の分子は、水などの溶けやすい親水基部分と、油に溶けやすい親油基部分の組み合わせを持っている。そのバランスを表したのが、HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance)⁸⁾ であり、乳化剤の特性の指標として用いられる。HLB は、0~20 までの値を示し、乳化剤は、その間の値をとる。0 に近いほど親油性 (疎水性) が高く、20 に近いほど親水性が高いことになる。

乳化剤 HLB 9~15.59 を用いて、香料化合物シトラール (アルデヒド化合物) またはリモネン (炭化水素化合物) を乳化し、生成したエマルジョンの粒径等を表 1 に示した。O/W 型のエマルジョンであるため、分散媒は水となり、HLB が高い値となった。乳化によって可溶化できず、水と油が、分離または一部が分離した HLB は、除外した。シトラールの方が、リモネンに比べて乳化しにくく、可溶化も不安定であった。

表 1 各 HLB の乳化剤における乳化香料の動的光散乱測定

| 試料番号 | 香料 | HLB | 平均粒径 (nm) | 分布 | 多分散度指数 |
|------|---------------------|-------|-----------|-------|----------|
| 1 | シトラール (アルデヒド化合物) | 12 | 80 | 正規 | 2.28E-01 |
| 2 | | 15 | 87 | 正規 | 1.88E-01 |
| 3 | | 12.28 | 113 | 正規 | 5.18E-02 |
| 4 | | 14.57 | 測定不能 | — | — |
| 5 | | 9 | 92 | 正規 | 1.93E-01 |
| 6 | リモネン (炭化水素化合物) | 12 | 112 | 正規 | 1.45E-01 |
| 7 | | 15 | 133 | 正規 | 1.34E-01 |
| 8 | | 12.28 | 98 | 正規 | 1.64E-01 |
| 9 | | 14.57 | 101 | 正規 | 1.02E-01 |
| 10 | | 15.59 | 453 | 大粒子あり | 1.94E-01 |
| 11 | | 11.77 | 45 | 正規 | 1.01E-01 |
| 12 | | 9 | 127 | 正規 | 1.42E-01 |
| 13 | | 15.1 | 71 | 正規 | 1.17E-01 |

動的光散乱によって両者の平均粒径を測定すると、シトラールは、80~113 nm であったのに対して、リモネンは、45~453 nm であり、大部分は、正規分布を示した (表 1)。動的光散乱では、エマルジョンの拡散係数を測定し、得られた係数からアインシュタインーストークス式を用いて平均粒径を求めている。そのため、直接、その粒子を評価しているわけではないが、総じて平均粒径は 45~453 nm と広範囲であった。

乳化香料の調製は、主にエマルジョンを構成するミセルの粒径を制御し、その安定性を維持することによって行っている。そのミセル粒径は、乳化剤の組み合わせと乳化機によって制御しており、動的光散乱測定による粒径によって検討してきた。その結果、ミセルの安定性は、乳化剤

の種類によって制御され、その安定性の維持によって乳化している香料化合物の徐放挙動が違い、官能評価も異なっていた。しかしながら、乳化剤の違いによってミセルにどのような相違が生じ、その安定性にどのように影響を及ぼしているかについては解明されていない。乳化剤の種類は親水基と疎水基の比率でHLBの数値としてまとめられる。官能基の異なる2つの香料化合物、すなわち、親水性のアルデヒド基をもつシトラールと疎水性の炭化水素基を持つリモネンを用いた乳化香料の場合、それぞれに適した乳化剤の親水基/疎水基の比率はシトラールでは親水基が多く、リモネンでは疎水基が多い。両者のエマルジョンの安定性を比較すると、シトラールの方がリモネンよりもエマルジョンが不安定で、徐放しやすい。この違いのメカニズムは、疎水基の比率が増すことでミセルの皮膜が厚くなってミセルの安定性が増し、徐放しにくくなることにあると考えている。しかしながら、実際に乳化剤の違いによってミセル粒子の内部構造（粒径、形状、皮膜厚さなど）がどのように変化するかについては実証できていない。

そこで、続いて、散乱プロファイルから直接、エマルジョン粒子の情報を引き出す、SAXS測定を行い、得られたSAXSプロファイルから用いられている乳化剤の親水基/疎水基の比率の違いによって乳化香料のミセル中における可溶化状態の変化を検討した。

(2) SAXS

図1および2に、シトラールとリモネンをそれぞれ香料化合物として用いた乳化香料のSAXSプロファイルを示した。凡例には、用いた乳化剤のHLB値を表している。どの試料においてもその散乱プロファイルは、 $q=0.05\text{--}0.2\text{ nm}^{-1}$ のあたりでショルダーを持ち、ショルダーより高 q 側の散乱強度がおおよそ q^{-4} に比例する傾向を示すことから、ある程度粒径分布の広い、球形の散乱体の存在を反映していると考えられた。また、今回の実験で得られた散乱プロファイルは、いずれも粒径分散が単分散もしくは分散幅の狭い散乱体で示されるような振動パターンは示されていないことから、これら試料の粒径分散幅はかなり広く、皮膜の厚さ以上であることが想定された。

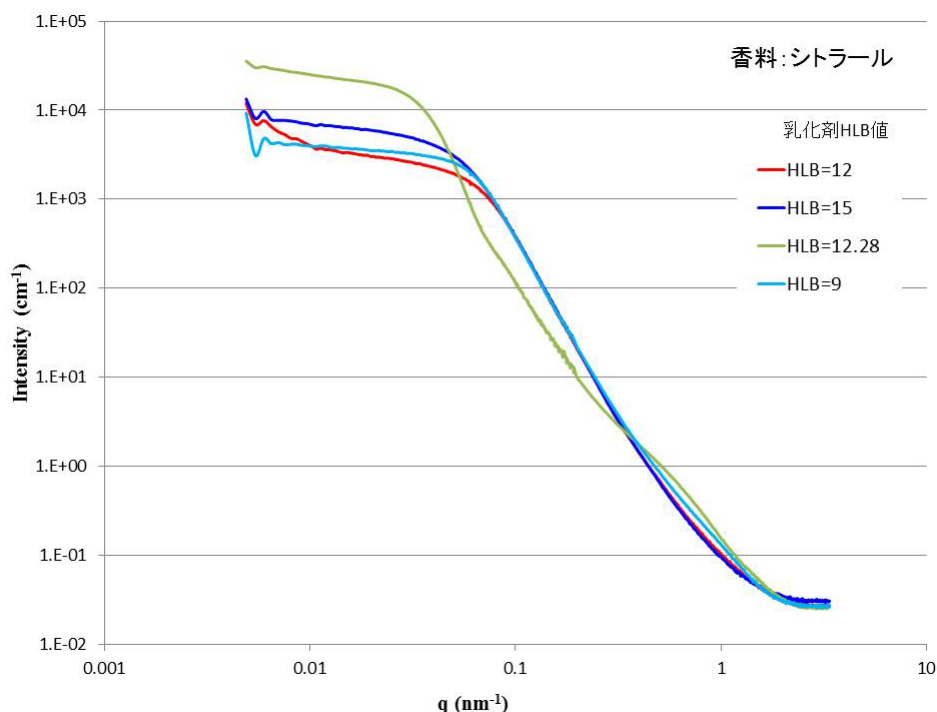


図1 各HLBの乳化剤における乳化香料シトラールのSAXSプロファイル

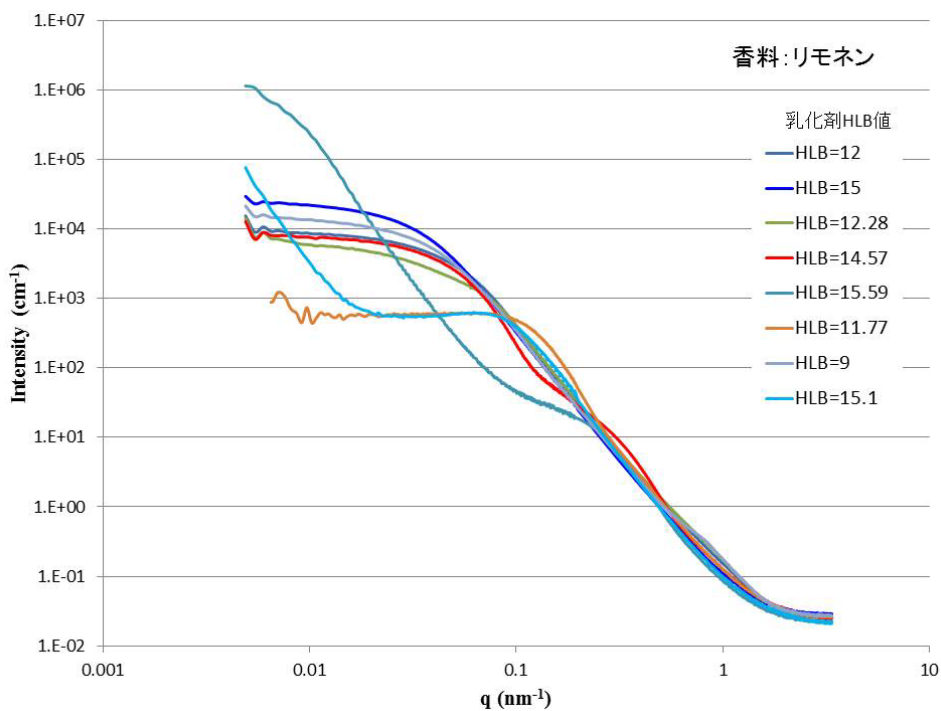


図2 各 HLB の乳化剤における乳化香料リモネンの SAXS プロファイル

次に、得られた散乱プロファイルから詳細な解析（粒子の内部構造など）をするための前提条件として、散乱体の粒子径分布が狭い単分散の試料が必要であったが、そのデータから Guinier 解析を行い、各 HLB の粒子径を算出した結果を表 2 に示した。各々の HLB の粒子径は、総じて 54 ~ 135 nm であった。その粒子径分布は、かなり大きく、Guinier 解析が可能な q 領域を確保できない HLB もあり、その場合は、解析不可能となった。算出した粒子径は、動的光散乱の平均粒径（表 1）と比較すると、リモネンの HLB 12.28 以外は、概ね同等な数値を示した。一方、皮膜の厚さは、試料の粒子径分布が広すぎて、解析モデルとして、皮膜厚さの詳細まで解析することができなかった。

表 2 各 HLB の乳化剤における乳化香料の Guinier 解析

| 試料番号 | 香料 | HLB | Guinier解析の粒子径 (nm) | Guinier領域の q 範囲 (nm^{-1}) | |
|------|---------------------|-------|--------------------|--|----------|
| 1 | シトラール (アルデヒド化合物) | 12 | 72 | 1.88E-03 | 3.59E-03 |
| 2 | | 15 | 85 | 1.40E-03 | 3.05E-03 |
| 3 | | 12.28 | 102 | 1.45E-03 | 2.52E-03 |
| 4 | | 14.57 | 解析不可能 | — | — |
| 5 | リモネン (炭化水素化合物) | 9 | 54 | 1.98E-03 | 4.49E-03 |
| 6 | | 12 | 103 | 1.18E-03 | 2.52E-03 |
| 7 | | 15 | 135 | 1.34E-03 | 1.98E-03 |
| 8 | | 12.28 | 122 | 1.24E-03 | 2.14E-03 |
| 9 | | 14.57 | 99 | 1.40E-03 | 2.68E-03 |
| 10 | | 15.59 | 解析不可能 | — | — |
| 11 | | 11.77 | 解析不可能 | — | — |
| 12 | | 9 | 129 | 1.08E-03 | 1.98E-03 |
| 13 | | 15.1 | 解析不可能 | — | — |

そこで、Materials Studio (ver. 6.0, 2017) シミュレーションソフトを用いた分子力場計算 (表 3) によると、その厚さは、約 5~7 nm と推定され、動的光散乱測定の評価結果から得られた粒径よりも非常に薄いことが示唆された。従って、皮膜は、粒径の分散幅よりも小さいと考えられた。従って、香料のリリースは、皮膜 (厚さ) というよりも、むしろ各々の香料分子と、溶解させたオイルとの電子密度に影響しているのではないかと推察している。

表 3 各 HLB の乳化剤における乳化香料の皮膜の厚さ

| 試料番号 | 香料 | HLB | 親水基(ポリグリセリン)の長さ (Å) | 疎水基(脂肪酸)の長さ (Å) | 皮膜の厚さ (Å) | | |
|------|---------------------|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------|---------------------------|
| 1 | シトラール (アルデヒド化合物) | 12 | max. 50.0, optimized 40.0 | 22.7 | max. 72.7, optimized 62.7 | | |
| 2 | | 15 | | | | | |
| 3 | | 12.28 | | | | | |
| 4 | | 14.57 | | 17.6 | | | |
| 5 | | 9 | | max. 29.9, optimized 27.0 | | 22.7 | max. 52.6, optimized 49.7 |
| 6 | リモネン (炭化水素化合物) | 12 | max. 50.0, optimized 40.0 | 22.7 | max. 72.7, optimized 62.7 | | |
| 7 | | 15 | | | | | |
| 8 | | 12.28 | | | | | |
| 9 | | 14.57 | | 17.6 | | | |
| 10 | | 15.59 | | 15.0 | | | |
| 11 | | 11.77 | | 19.3 | | | |
| 12 | | 9 | | max. 29.9, optimized 27.0 | | 22.7 | max. 52.6, optimized 49.7 |
| 13 | | 15.1 | | max. 50.0, optimized 40.0 | | 12.5 | max. 62.5, optimized 52.5 |

また、小角散乱の考え方には、不均一孤立粒子系、すなわち、粒子内に密度の異なる領域が存在することが報告されている¹⁰⁾。実際の系でも、粒子内では密度が異なる部分が混在していると考えるのが最適である。今回のシトラールまたはリモネンの乳化の場合、球状のコアシェル構造として、粒子内で各々密度が異なると推定した。併せて、水溶液中で形成されるミセルの疎水部/親水部境界付近での電子密度の変化から、ミセルに被可溶化物質が可溶化される部位は、被可溶化物質の分子構造・極性に応じて決定されるという報告もある⁴⁾。

以上から、香料の密度分布は、シトラール (アルデヒド化合物) では、界面の境界線 (皮膜) 付近に、一方、リモネン (炭化水素化合物) では、ミセル中心内部のコア (核) に密集し、可溶化すると示唆される (図3)。この可溶化機構は、リモネンにおいて同様に支持する報告があり、この相挙動の違いは、自己組織体構造への香料のミセル中の可溶化機構が異なるためと考えられている³⁾。従って、シトラールは、界面の境界付近に存在することで徐放ししやすいと考えられ、乳化が不安定であり、一方、リモネンは、内部のコアに存在するため、乳化が安定であると予想され、この機構が官能評価にも影響すると推察する。

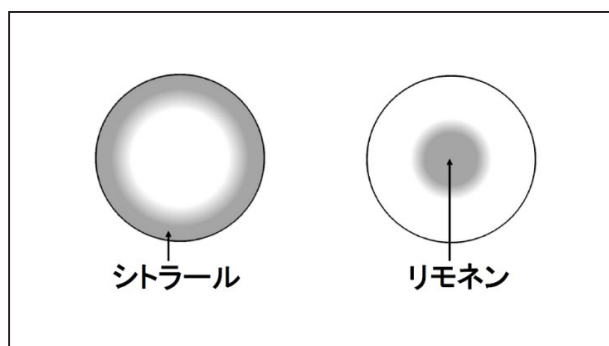


図 3 ミセル中における香料可溶化の密度分布模式図

今後、SAXS 法を用いて電子密度プロファイルの変化によるミセル中の状態（可溶化など）がさらに明らかになれば、その安定性の可視化につながり、客観的評価に貢献できる。今回の手法は、散乱プロファイルから直接、粒子の情報を導いているので、その安定性のシミュレーションが予め測定できるならば、現象に寄与する可視化となり、製品開発の短縮、品質評価の向上、製品の優位性などをアピールできるエビデンスが得られると期待される。

謝辞

本研究は、(公財)高輝度光科学研究センター大型放射光施設 SPring-8 のビームライン BL19B2 (産業新分野支援課題 2017B1750) を利用した結果であり、心より感謝申し上げます。併せて、塩野香料株式会社において実施した内容でもあり、関係各位に厚く御礼申し上げます。また、(地独)大阪産業技術研究所森之宮センター生物・生活材料研究部 静間基博博士には、分子力学計算による皮膜の厚さについてご教示いただき、深謝致します。

参考文献

- 1) 笠間勇輝、岩瀬裕希、柴山充弘、南部宏暢、富永悦子、小林純也、藤井 亘：高分子型界面活性剤系食品添加物 水分媒体のナノ構造解析、平成 26 年度産業新分野支援課題・一般課題（産業分野）実施報告書、2014A1815、2014
- 2) 小林純也、岩瀬裕希、笠間勇輝、藤井 亘、富永悦子、南部宏暢：高分子型界面活性剤系食品添加物水分媒体のナノ構造解析、平成 28 年度産業新分野支援課題・一般課題（産業分野）実施報告書、2016A1786、2016
- 3) 兼井典子、國枝博信：水/ショ糖ドデカン酸エステル/香料系の相挙動、日本油化学会誌、49巻、9号、pp.957-966、2000.9
- 4) 酒井秀樹：界面活性剤が形成するミセルによる難溶性物質の可溶化、化学と教育、69巻、4号、pp.162-165、2021.4
- 5) 佐野則道、佐藤真直、富松亮介：食品産業に役立つ大型放射光施設 SPring-8、日本食品工学会第18回（2017年度）年次大会講演要旨集、関西大学千里山キャンパス（大阪）、IP-13（pp.166）、2017.8.
- 6) 佐藤真直：食品のマイクロ構造解析への放射光X線散乱の応用、日本食品科学工学会第66回大会講演集、藤女子大学（札幌）、pp.64、2019.8
- 7) 吉村倫一、中川真緒、矢田詩歩、岡田 篤、稲岡 享：ポリオキシエチレンセカンダリーアルキルエーテル界面活性剤の SAXS を用いた相挙動の解明（4）、令和 3 年度産業新分野支援課題・一般課題（産業分野）実施報告書、2021B1958、2021
- 8) Griffin W.C.: Classification of surface-active agents by "HLB". J. Soc. Cosmet. Chem. 1: 311-326, 1949 Jan.
- 9) Guinier A., Fournet G., (Translation by Walker C.B.): Small-angle Scattering of X-rays, John Wiley & Sons, New York, 268 pp, 1955 Aug.
- 10) 松岡秀樹：小角散乱の基礎 ～X 線・中性子の小角散乱から何がわかるか～、日本結晶学会誌、41 巻、4 号、pp.213-226、1999.4