

Technical Report

SFE-SFCを用いた機能性成分のオンライン抽出-分取

Extraction and fractionation of functional ingredients with online SFE-SFC

澤田 浩樹¹、松本 恵子¹

Abstract:

超臨界二酸化炭素を抽出媒体として用いる超臨界流体抽出 (SFE)、移動相として用いる超臨界流体クロマトグラフィー (SFC)、および超臨界二酸化炭素に対応した分取用のフラクションコレクター (FRC) を直接接続したオンラインSFE-SFC分取システムについてご紹介します。このシステムを用いることで抽出から分離、分取までを自動化することができ、前処理の簡便化や不安定な成分の分析、高感度分析ができるなど様々なメリットが生まれます。こうしたメリットは、抽出・精製操作が煩雑な機能性成分の分取に活かすことができます。ここではオンラインSFE-SFC分取システムの基本原理と特長、さらに機能性成分の抽出-分取を行った結果についてご紹介します。

Keywords: 超臨界流体クロマトグラフィー、SFC、supercritical fluid chromatography、超臨界流体抽出、SFE、supercritical fluid extraction、オンラインSFE-SFC、分取SFC、フラクションコレクター

1. 機能性成分の分取における課題

生活習慣病予防や、健康増進のため食生活の重要性が広く認識されている昨今において、疾病の予防や老化の防止といった生体調節機能に関与する機能性成分に注目が集まっています。カロテノイドの一種で、トマトに多く含まれるリコペン (Fig. 1) もその一つです。

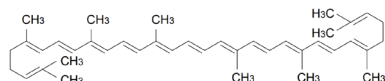


Fig. 1 リコペンの構造式

リコペンの生体に及ぼす影響に関する研究は活発に行われており、その目的で実試料からの精製も行われます。一方、リコペンは熱や光などにより分解や異性化を受けやすいことから、抽出、分離といった操作は40℃以下で、かつ強い光を避けできるだけ速やかに行う必要があります。しかし、従来のLCを用いた手法では、抽出から分離、分取といった一連の操作において別々の器具を使用することが多く、操作が煩雑となるほか、操作の過程で試料が劣化してしまう可能性も危惧されます。さらに、得られた画分に含まれる溶媒量が多い場合、濃縮処理に長時間を要する点も課題として挙げられます。

2. 超臨界二酸化炭素を用いたオンラインSFE-SFC分取システムについて

前章で示した機能性成分の分取における課題に対しては、抽出および分離溶媒として超臨界二酸化炭素を用いることが有効です。超臨界流体は、温度と圧力が臨界点以上にある物質で、気体様の高い拡散性と低粘性、液体様の溶解性を併せ持っています。特に、二酸化炭素は臨界温度が31.1℃、臨界圧力が7.38MPaと臨界点が高いため取り扱いが容易であり、かつ不燃性・不活性・安価であることからコーヒーの脱カフェイン処理など工業的に広く使用されています。また、分析分野においても超臨界二酸化炭素を抽出媒体として用いた超臨界流体抽出 (Supercritical fluid extraction: SFE) や、超臨界二酸化炭素を主な移動相として使用する超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical fluid chromatography: SFC) が使用されています。

超臨界二酸化炭素を用いたオンラインSFE-SFC分取システムは、SFEにより抽出した成分を直接カラムに導入し、SFCで分離を行い、さらに後段に取り付けたフラクションコレクター (Fraction collector: FRC) で回収を行う技術です。流路図をFig. 2に示します。

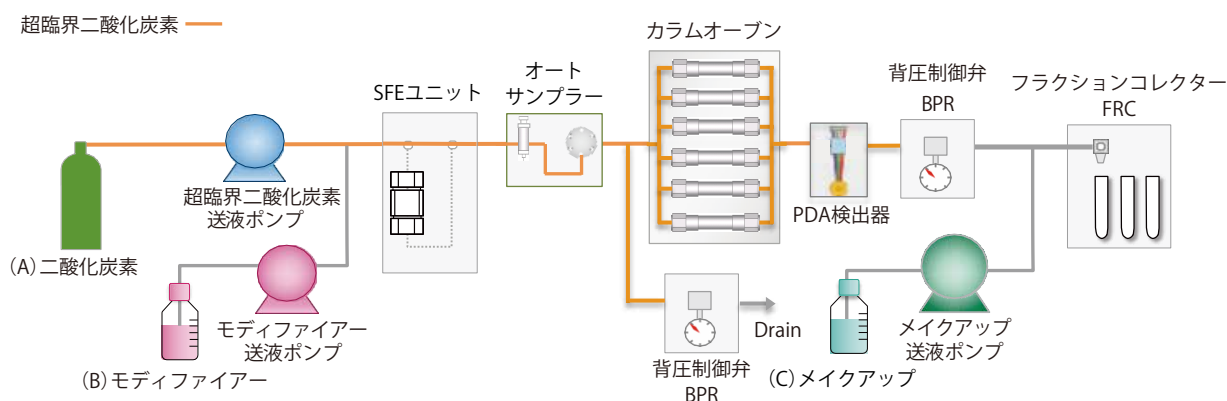


Fig. 2 流路図

オンラインSFE-SFC分取システムでは、試料を入れた抽出容器を装置にセットするだけで、自動で目的成分の抽出、分離精製、回収ができます。光や空気に触れることなく抽出と分離を行うことができるため、カロテノイドのような光に不安定な成分や酸化しやすい成分に有用です。さらに、オンラインで接続したフラクションコレクターにより、特定の成分のみを分取することができます。また、専用の気液分離セパレーターを使用することで、気体の二酸化炭素を排出し、液体だけを効率良く回収します。

システムの原理と特徴は以下の通りです。なお、オンラインSFE-SFCシステムの詳細は、テクニカルレポートC190-0443「オンライン超臨界流体抽出-超臨界流体クロマトグラフィー (online SFE-SFC)」をご参照ください。

(1) 抽出

(1)-1 抽出容器の搬送と温調

指定した抽出容器をSFEユニットに搬送し、設定温度に達するまで温度調節します。

(1)-2 静的抽出 (Static extraction)

抽出容器の温度が設定温度に達すると超臨界二酸化炭素を抽出容器に導入し、その後静置して、試料から目的成分の抽出を行います。

(1)-3 動的抽出 (Dynamic extraction)

静的抽出の後に抽出容器に超臨界二酸化炭素を通過しながら、試料から目的成分を抽出します。抽出物は溶出容器から取り出され、分析カラムへ導入されます。

(2) 分離・検出

抽出が終了した後に、抽出容器を流路から切り離し、カラムを流れる移動相中のモディファイアー濃度を増加させることで抽出物の分離を行います。カラムから溶出した成分は、フォトダイオードアレイ検出器や質量分析計で検出します。

(3) 分取

検出器のシグナルをトリガーとして、目的成分を含む溶液(画分)をフラクションコレクターにより試験管やバイアルに回収します。シグナル強度だけでなく、指定時間で回収箇所を設定することも可能です。

3. メソッドスカウティング

SFCでは順相、逆相、フェニル系など様々な分離モードのカラムが使用可能です。対象成分の分離に最適なカラムと移動相条件の探索には、スカウティングの手法が有用です。

「6本カラムセット」は、多様な分離挙動を示すカラムを組み合わせたパッケージで、分離条件探索のファーストチョイスに最適です。カラムの種類と特長をTable 1に示します。

トマト加工品中からリコペンを抽出・分取する際に用いるカラムの選定のため、リコペンとβ-カロテンの標準品を用いカラムスカウティングを行いました。分析条件をTable 2に示します。

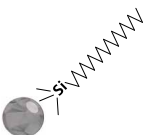

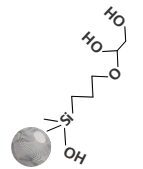
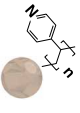
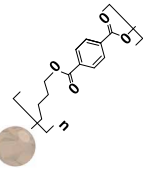
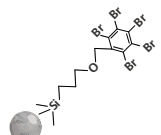
スカウティングの結果をFig. 3に示します。6本のカラムはいずれも異なる分離パターンを示しました。リコペンやβ-カロテンといったカロテノイドは脂肪族炭化水素で比較的極性が低い分子であるため、固定相の極性の高い順相系カラムのUC-Sil IIやUC-Diol IIではほとんど保持されませんでした。一方、UC-PBrでは保持が強く2成分とも溶出しませんでした。さらに、UC-PolyBTではリコペンのピークが低くテーリングする傾向が見られました。リコペン分子の両端の二重結合と固定相が強く相互作用した影響によるものと考えられます。リコペン、β-カロテンの2成分ともピーク形状が良好だったのは、疎水性相互作用による分離挙動を示すUC-ODSとUC-PolyVPでした。ここで、2成分の分離はUC-ODSの方が良好であったため、使用するカラムとしてUC-ODSを選択しました。

さらに、使用するモディファイアーとしてメタノールとアセトニトリルを比較した結果、アセトニトリルの方がシャープなピーク形状が得られました。よって、モディファイアーとしてアセトニトリルを選択しました。

Table 2 カラムスカウティング条件

| | |
|--------------|--|
| Column | : Table 1 参照 (250 mm × 4.6 mmID, 5 μm) |
| Mobile phase | : A; CO ₂ B; Modifier: Methanol, or Acetonitrile |
| Gradient | : 5 - 40 % (0-10 min) → 40 % (10-15 min) → 5 % (15 -20 min) |
| Flow rate | : 3.0 mL/min |
| BPR pressure | : 15 MPa |
| BPR temp. | : 50 °C |
| Column temp. | : 40 °C |
| Detection | : Photo diode array detector (wavelength = 190-800 nm) PDA Chromatogram at 460 nm |
| Cell | : High pressure cell for SFC (analytical) |
| Sample | : Lycopene, β-carotene 500 mg/L each (in CHCl ₃) |
| Injection | : 3 μL |

Table 1 6本カラムセットの種類と特長

| | | 6本カラムセット | | | | | |
|-----------|--|---|---|---|---|---|---|
| | | UC-ODS | UC-Sil II | UC-Diol II | UC-PolyVP | UC-PolyBT | UC-PBr |
| Chemistry | |  |  |  |  |  |  |
| Features | | 分離モードは逆相系。疎水性作用により保持。 | 塩基性化合物の保持・立体構造の認識に優れる。 | 分離モードは順相系。非特異的相互作用を抑制。 | 酸塩基無添加条件でも良好なピーク形状を發揮。 | π-π相互作用により、芳香族化合物の認識性に優れる。 | ODSでは保持が小さい化合物の分離を改善。 |

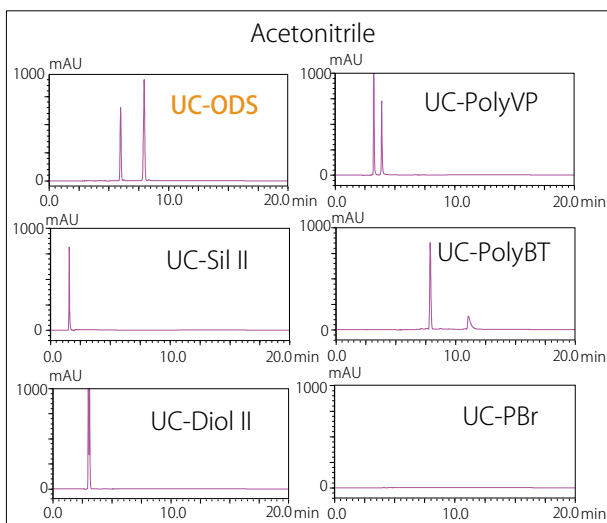
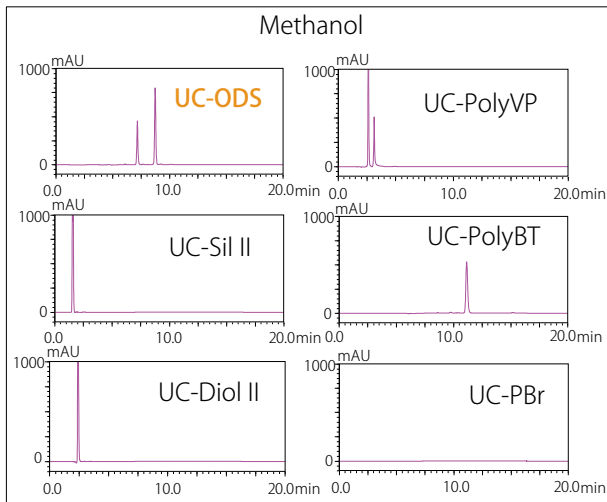


Fig. 3 6本カラムセットによるスカウティング結果

リコペンとβ-カロテンの分離に適したカラムShim-pack™ UC-ODSを用いて、グラジエント条件の最適化を行いました。分析条件をTable 3に示します。分離最適化のためにグラジエント条件を調整し、グラジエント初濃度15%の条件を採用しました(Table 4)。

Table 3 分析条件

| | |
|--------------|---|
| Column | : Shim-pack UC-ODS (250 mm × 4.6 mmI.D., 5 μm) |
| Mobile phase | : A: CO ₂ B; Modifier: Acetonitrile |
| Flow rate | : 3 mL/min |
| Gradient | : 5 or 10 or 15 - 40% (0 - 10 min) → 40% (10-15 min) → Initial ratio (15 - 20 min) |
| Column temp. | : 40 °C |
| BPR pressure | : 15 MPa |
| BPR temp. | : 50 °C |
| Detection | : Photo diode array detector (wavelength = 190-800 nm) PDA Chromatogram at 460 nm |
| Cell | : High pressure cell for SFC (analytical) |
| Sample | : Lycopene, β-carotene 500 mg/L each (in CHCl ₃) |
| Injection | : 3 μL |

Table 4 各グラジエント条件下でのβカロテンの分離度

| 初期濃度 | 5 % | 10 % | 15 % |
|------|------|------|------|
| 分離度 | 10.3 | 10.7 | 11.0 |

4. SFE抽出

リコペンとβ-カロテンの標準品を使用し、SFEによる抽出条件の検討を行いました。標準品を溶解した液体試料を専用の脱水剤(1 g)と混ぜ、ろ紙を配置してSFE専用抽出容器(5 mL)に封入しました。分析条件をTable 5に示します。内径の小さい分析用のカラムでは、抽出物の全量をカラムに導入すると、カラムへの負荷量が大きくなりすぎてピークがブロードになる場合があります。そこで、SFCカラム前で分岐した2つの流路(一方は廃棄側流路、他方はSFCカラム側流路)に各々背圧制御弁(BPR)を設置して、両流路出口に任意の圧力差(差圧)を設けることで試料の一部をカラムへ導入しました。抽出容器へ抽出溶媒を送液し、静的抽出3分、動的抽出6分の抽出を行った後、SFC分析を行いました。その結果、SFE抽出した標準品においてもピークがブロードになることを抑え、リコペンとβ-カロテンのそれぞれのピークを確認することができました。クロマトグラムをFig. 4に示します。

Table 5 分析条件

| | |
|--------|--|
| [SFE] | Extraction vessel : 5 mL |
| | Flow rate : 3.0 mL/min |
| | B. Conc. : 10 % |
| | Extraction temperature : 40 °C |
| | Extraction time : Static (0-3 min) → Dynamic (3-9 min) |
| | BPR pressure : A: 14.8 MPa, B: 15 MPa |
| [SFC] | Column : Shim-pack UC-ODS (250 mm × 4.6 mmI.D., 5 μm) |
| | Mobile phase : A: CO ₂ , B: Acetonitrile |
| | Flow rate : 3.0 mL/min |
| | Gradient program : B. Conc. 15- 40% (0-10 min) → 40% (10-15 min) |
| | Column temp. : 40 °C |
| | BPR pressure : A: 15.0 MPa, B: 40.0 MPa |
| | BPR temp. : 50 °C |
| | Detection : Photo diode array detector (wavelength = 190-800 nm) PDA Chromatogram at 460 nm |
| Cell | : High pressure cell for SFC (analytical) |
| Sample | : Lycopene, β-carotene 56 μg each |

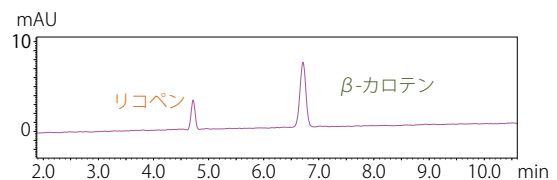


Fig. 4 カロテノイド標準品のSFE抽出後のクロマトグラム

5. トマト加工品からのリコペンの抽出

トマト加工品0.1 gを秤量し、専用の脱水剤(1 g)と混ぜ、ろ紙を配置してSFE専用抽出容器(5 mL)に封入しました。カロテノイドの酸化を抑制するため、計量および封入操作を速やかに行いました。その後、超臨界流体抽出ユニットに抽出容器を配置し、Table 5と同じ条件で分析しました。

クロマトグラムをFig. 5に示します。夾雑成分のβ-カロテンと十分分離して、リコペン単体のピークを得ることができました。また、ピーク形状についても、標準品と同様良好であり、実試料からもリコペンが抽出・分離できることを確認しました。

Fig. 6に示す通り、従来の前処理法では、攪拌や分液および蒸発乾燥など1時間程度の手作業を要しましたが、オンラインSFE-SFCシステムでは試料封入からSFE専用ユニットにセットするまで5分で完了し大幅に時間を短縮できます。

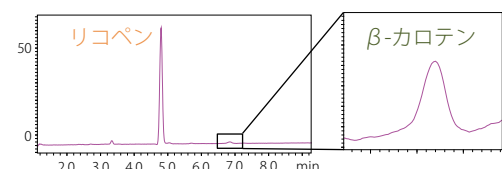


Fig. 5 4.6 mmI.D.カラムにおけるトマト加工品のSFE抽出後のクロマトグラム



Fig. 6 オンラインSFE-SFCを用いた前処理の簡便化

6. スケールアップと機能性成分の分取

抽出・分離条件検討の後に、分取を行うためスケールアップを行いました。トマト加工品0.5 gからリコペンを抽出、回収することを目的として、カラム内径、流量、負荷量、カラムへの導入量を検討しました。抽出および分取条件をTable 6に示します。4.6 mm内径のカラムと異なり、背圧制御弁を用いたスプリットは行わず、抽出した試料の全量をカラムに導入しました。

フラクションコレクターには気液セパレーター“LotusStream™セパレーター”(特許取得済)が搭載されています。通常、SFCを用いた分取では、二酸化炭素が超臨界状態から気体状態になる際の体積膨張により、溶出液が飛散するリスクがありますが、LotusStream™セパレーターを用いることで、飛散を起こすことなく二酸化炭素と液体を分離し、溶出液の適切な回収が可能となります。

Fig. 7にLotusStreamセパレーターのイメージ図と分取時の様子を示します。

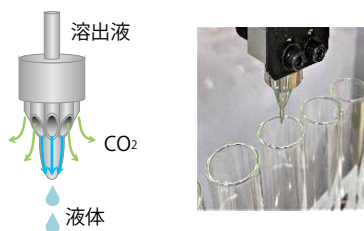


Fig. 7 LotusStream™セパレーターのイメージ図(左)と分取時の様子(右)

トマト加工品を抽出、分離したクロマトグラムをFig. 8に示します。夾雑成分のβ-カロテンなどと分離してリコペンのみを自動で抽出し分取することができました。

Table 6 抽出、分取時の条件

| | |
|------------------------|--|
| [SFE] | |
| Extraction vessel | : 5 mL |
| Flow rate | : 5.0 mL/min |
| B. Conc. | : 10% |
| Extraction time | : Static (0-3 min) → Dynamic (3-9 min) |
| Extraction temperature | : 40 °C |
| BPR pressure | : A: 15 MPa, B: 40 MPa |
| [SFC] | |
| Column | : Shim-pack UC-ODS (250 mm x 10 mmI.D., 5 μm) |
| Mobile phase | : A: CO ₂ , B: Acetonitrile |
| Flow rate | : 5.0 mL/min |
| Gradient program | : B. Conc. 15 - 40 % (0-10 min) → 40 % (10 - 25 min) |
| Column Temperature | : 40 °C |
| BPR pressure | : A: 15.0 MPa, B: 40.0 MPa |
| BPR temp. | : 50 °C |
| Detection | : Photo diode array detector (wavelength = 190-800 nm) PDA Chromatogram at 460 nm |
| Cell | : High pressure cell for SFC (analytical) |
| Make up pump | : 0.5 mL/min (Acetone) |

Shim-pack および LotusStream は、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

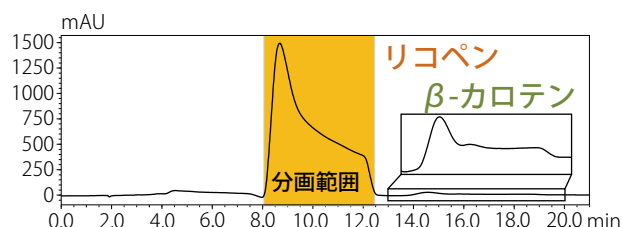


Fig. 8 トマト加工品のSFE抽出後の分取クロマトグラム

得られた画分は20 mLにメスアップし再分析を行いました。再分析条件をTable 7に、クロマトグラムをFig. 9に示します。

さらに、トマト加工品の抽出〜リコペンの回収操作を3回繰り返し、それぞれの画分をSFCで再分析した結果をTable 8に示します。抽出物および得られた画分のリコペンのピーク面積値の再現性は良好でした。

Table 7 リコペン画分の再分析条件

| | |
|--------------------|--|
| Column | : Shim-pack UC-ODS (250 mm x 4.6 mmI.D., 5 μm) |
| Mobile phase | : A: CO ₂ , B: Acetonitrile |
| Flow rate | : 5.0 mL/min |
| Gradient program | : B. Conc. 15 - 40 % (0-10 min) → 40 % (10 - 15 min) → 15 % (15 - 20 min) |
| Column Temperature | : 40 °C |
| BPR pressure | : A: 15.0 MPa, B: 40.0 MPa |
| BPR temp. | : 50 °C |
| Injection | : 20 μL |
| Detection | : Photo diode array detector (wavelength = 190-800 nm) PDA Chromatogram at 460 nm |
| Cell | : High pressure cell for SFC (analytical) |

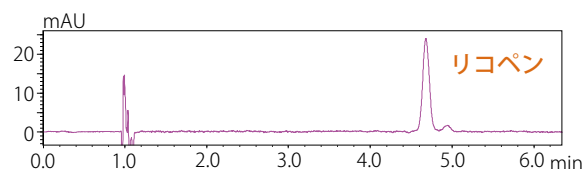


Fig. 9 得られた画分のクロマトグラム

Table 8 リコペンの抽出、回収再現性

| | 抽出時ピーク面積 | 得られた画分のピーク面積 |
|------|-----------|--------------|
| No.1 | 179520263 | 141354 |
| No.2 | 174978002 | 139289 |
| No.3 | 177317967 | 139527 |
| 平均 | 177272077 | 140057 |
| %RSD | 1.05 | 0.659 |

7. 結論

オンラインSFE-SFC分取システムは試料から目的成分をシームレスに抽出、回収するシステムです。食品中機能性成分の抽出、分析、および分取までをシームレスに自動実行できることから、大幅な省力化が期待できます。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2023年3月
© Shimadzu Corporation, 2023