温度勾配を付した超臨界流体抽出塔を用いた魚油脂肪酸モノエステルの濃縮[†]

鈴木康夫・今野政憲

宮城県工業技術センター^{††}

新井邦夫

東北大学工学部 生物化学工学科^{†††}

斎藤正三郎

東北大学工学部 分子化学工学科^{†††}

塔高方向の温度分布の設定が可能なベンチスケールの超臨界流体抽出塔を用い、魚油を構成する脂肪酸のモノエステル中のエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)の工業的な分離の可能性を半回分操作により検討した。二酸化炭素への脂肪酸モノエステルの溶解度が高温ほど減少する領域を実験範囲に選び、温度分布は塔底35°C 塔頂60°Cの余弦波状に設定し、接触方式として充填塔を用いた。その結果、魚油の脂肪酸モノエステルの分画が可能であり、EPA, DHAについては、天然由来の原料でも、その原料組成の選定と尿素処理等の前処理を行うことにより90%以上の濃縮が可能であった。一般に、炭素数が同じで二重結合数の異なる脂肪酸モノエステルの分離は、溶解度の差が小さいため、従来困難とされていたが、本法においてはこれら成分間の留出曲線に有意の差が認められ、その分画の可能性についても示唆された。

緒 言

近年、エイコサペンタエン酸(EPA, C_{20-5}^*)やドコサヘキサエン酸(DHA, C_{22-6}^*)等の高度不飽和脂肪酸の生理活性が注目されている^{5,6)}。しかし、一般にこれらの高度不飽和脂肪酸は物理的性質がきわめて類似した他の脂肪酸と共存しており、しかも化学的・熱的にも不安定で、その工業的分離は容易ではない。従来、脂肪酸の工業的な分離には真空蒸留法¹⁾が用いられているが、EPAやDHAのような炭素数が20以上の脂肪酸では操作温度が高過ぎ、熱的安定性から使用が困難である。一方、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分取法²⁾の工業的な適用が最近かなり発達してきているが、分離液からの溶質の回収や充填物の交換等を要し、必ずしも低濃度

の原料からの濃縮には経済的な方法とは言えない。これに対し、超臨界流体抽出の適用が有望視されており、特に二酸化炭素は臨界温度が31.5°Cで無毒でかつ安価であることから、脂肪酸の分離溶媒として多くの研究がなされている^{4,11)}。工業的な応用研究としては、上部にホットフィンガーを設けたEisenbach³⁾の還流効果を有する半回分超臨界流体抽出塔の適用や、著者ら^{9,10)}およびNilssonら⁷⁾の塔高方向に温度分布を付与した超臨界流体抽出塔に関するものがあげられる。

本研究では、前に報告^{9,10)}した塔高方向の温度分布の設定が可能なベンチスケール充填塔装置を用い、魚油中のEPAやDHAの工業的な分離の可能性を半回分操作により検討した。

1. 実験方法

1.1 実験装置

Fig. 1に実験装置のフローシートを示す。抽出塔①はSUS F 304製で、塔高は約3mである。抽出塔およびサンプリング部の詳細をFigs. 2と3に示す。Fig. 2に示し

[†] 1988年10月6日受理；化学工学協会関東支部大会（新潟，1988年7月）にて発表

^{††} 〒982 仙台市長町8-7-20

^{†††} 〒980 仙台市荒巻字青葉

* C_{m-n} は炭素原子数が m 、二重結合数が n の脂肪酸を表す。

Fig. 1 Flow sheet of supercritical fluid fractionation apparatus

たように塔は二重管式になっており、抽出操作は内筒内部で行われる。外筒（外径 140 mm，内径 80 mm）と内筒の間は常に操作圧と同じ圧力に保持されるため、内筒は耐圧管である必要がなく内筒をかえることにより種々の接触方式に容易に変えられる。さらに内筒は塔高さ方向に 4 つに分割されており（Fig. 3），それぞれの接続部分に超臨界流体相と液相のサンプリング部を設けた。本研究では内筒は内径 20 mm の充填塔を使用した。全充填高さは約 2.5 m である。充填物は東京特殊金網（株）製の呼称 3 mm のステンレス製 DIXON PACKING と 3 mm φ のステンレス球の 2 種類を用いた。塔高方向の温度分布の制御は 17 分割したヒーターを塔外壁に設け、21 個の熱電対と 4 個の抵抗測温体により非干渉制御を行った¹⁰⁾。

1. 2 実験方法および条件

Fig. 1 において、塔底部の液溜槽②（内容積約 1 l）に秤量した試料（多くの実験では約 500 g）を仕込み、槽下部より超臨界二酸化炭素を送入し、塔頂部から抽出相を連続的に流出させる半回分抽出操作を行った。抽出相は減圧弁⑨により常圧まで減圧し、析出した溶質を⑩に捕集し、所定時間毎に分別採取し、重量測定およびガスクロマトグラフィーによる組成分析を行った。二酸化炭素の全流通量は乾式ガスメータ⑪で計量した。また、塔のサイドに付設してある 4 個の超臨界流体相サンプリング部⑦を用いて、塔内の超臨界流体組成分布を調べた。液相のサンプリングも行ったが、サンプリング溜めの液量が不足していると思われ、正確なデータが採取できなかった。

塔に与える温度勾配は、本来、気液平衡に基づいた詳

Fig. 2 Detail of fractionation column and temperature profile

Fig. 3 Detail of sampling section

細なシミュレーションにより決定されるべきものである。しかも、原料組成の変化あるいは本実験での半回分操作のように経時的に塔内の液組成の変化等が存在する場合は、それに対応して最適な温度勾配も変化する。しかし、ここでは簡単のため、全てのケースで一定の温度勾配を付与して実験を行い、EPA, DHA 濃縮分離操作条件の最適化を図るための基礎的な諸条件を検討した。すなわち、本実験範囲では二酸化炭素への脂肪酸モノエステルの溶解度は高温ほど減少することに基づき、塔内各高さにおいて溶質の凝縮による還流を発生させるため、試みに Fig. 2 に示すように、塔底部 35°C，塔頂部 60°C の余弦波状の温度勾配を設定・付与した。この時の操作圧は、12.0 MPa である。ただし一部の実験については塔底部 50°C，塔頂部 100°C，操作圧 15.0 MPa で行った。

本実験に用いる原料魚油は、超臨界二酸化炭素相への溶解を容易にし、また分離後の利用を考慮して、エチルエステル化したものを用いた。原料の脂肪酸組成を

Table 1 Fatty acid composition of fish oil ethyl ester feedstocks

Fatty Acid Carbon Atoms-Double Bonds		C ₁₄₋₀	C ₁₆₋₀	C ₁₆₋₁	C ₁₈₋₀	C ₁₈₋₁	C ₁₈₋₂	C ₁₈₋₃	C ₁₈₋₄	C ₂₀₋₁	C ₂₀₋₄	C ₂₀₋₅ EPA	C ₂₂₋₁	C ₂₂₋₅	C ₂₂₋₆ DHA
Content of Fatty Acids [wt %]	(A)	7.2	18.4	10.2	3.3	13.5	3.1	0.3	3.2	3.5	0.8	15.4	3.1	2.5	12.8
	(B)	6.6	17.4	11.3	2.2	15.1	4.4	0.4	3.5	2.8	0.8	21.3	2.5	2.4	6.0
	(C)	0.6	0.1	5.2	0.0	6.8	4.4	0.6	6.3	0.0	2.1	27.8	0.0	4.8	30.7
	(D)	0.3	0.0	2.8	0.0	2.8	7.4	0.1	3.1	0.0	1.0	61.5	0.0	4.4	11.6
	(E)	0.0	0.0	1.0	0.0	2.5	1.1	0.2	1.7	0.0	4.4	14.6	0.0	5.2	64.7

Table 1 に示す。比較的 DHA に富んだエチルエステル混合物 (A) および EPA に富んだ混合物 (B), (A) を尿素付加⁸⁾により高度不飽和脂肪酸成分を予備濃縮した (C), さらに EPA に富み, C₂₀₋₄ 成分の比較的少ない魚油を尿素付加してあらかじめ濃縮した (D), C₂₂₋₅ 成分が比較的少なく DHA に富んだ魚油を尿素付加して予備濃縮した (E) の 5 種類である。なお, 成分組成は FID ガスクロマトグラフィーで得られたクロマトグラムの面積 % を重量 % として採用した。ガスクロマトグラフは (株) 島津製作所の GC-4C, 充填カラムは信和化工 (株) の Advance-DS (80 ~ 100 mesh) 3.0m × 3.0mm I.D. を使用し, カラム温度は 220°C とした。なお, 面積 % = 重量 % とした時の誤差は最大で 4% と推定される。

2. 実験結果および考察

実験条件とその結果を Table 2 に示す。run 1 は比較のため, 原料 (A) のいわし油エチルエステルの試料 8.9g を 500cc の抽出セル ((株) 圧力機器工業製の超臨界抽出装置 S-05 型) に仕込み, 60°C, 12.0MPa の超臨界二酸化炭素で単抽出した場合である。run 2 以降は Fig. 2 の塔を用い, 温度勾配を付与して実験を行った。run 2 ~ 5 は比較的 EPA に富んだ原料 (B) を, run 6 ~ 8 は DHA に富んだ原料 (A) を使用し, run 2, 3, 6 ~ 11 については充填物に DIXON PACKING を, run 4, 5 はステンレス球を用いた。また, run 8 は温度条件を塔頂 100°C, 塔底 50°C の余弦波状で, 圧力を 15.0MPa に設定した場合である。表中の二酸化炭素の流速のうち右側の数値は, 塔内での二酸化炭素の平均密度と充填物の空隙率から求めた塔内の平均線速度である。一般に, 収率と純度は密接な関係にあるので, ここでは比較を容易にするため収率を 41 ~ 45% に揃えた時の EPA, DHA の濃度で純度を示した。また溶媒比 (S/F) は各留出物中の EPA 濃度が最大になる時点までの溶媒の使用量の目安を示す。

Fig. 4 に, run 1, すなわち単抽出時の留出物組成の経時変化を, 横軸に二酸化炭素の流通量をとって示した。各成分は炭素数 (分子量) 順に留出しているが, Table 2 に示すように EPA, DHA の純度はあまり高くない。

一方, 温度勾配を設定した run 2 における塔頂からの留出物組成の経時変化を Fig. 5 に示す。純度 84.0% の C₂₀ 留分が 56.0g (収率 41.2%), C₂₂ 留分についても純度 80.0% のものが 22.5g (収率 37.8%) 得られ, run 1 の実験に比べて著しく分離性能が向上している。なお, 本実験は EPA, DHA の分離に主眼を置いて温度, 圧力条件を設定したこと, また本操作では還流が定常になるまでにある程度時間を要することから, Fig. 5 のように留出初期における C₁₄ ~ C₁₈ 成分同士の分離は良くない。しかし, その改善は各成分の留出ピーク位置の差が大きいため容易であると言える。同図に示した① ~ ④の各時点での超臨界流体相中の脂肪酸エステルの塔内濃度分布を Fig. 6 に示した。塔上部に向かって溶解量が急激に減少しており, 温度勾配により効果的な還流が発生していることがわかる。また時間とともに全体的な溶解量が減少し, 塔内の液組成が次第に炭素数の多い成分に移行している。

ところで, Eisenbach³⁾は, 塔上部にホットフィンガーを設け, 一端を加熱した抽出装置を用いて実験を行った結果, EPA あるいは DHA を炭素数の同じその他の成分 (本実験では C₂₀₋₁ と C₂₀₋₄ あるいは C₂₂₋₁ と C₂₂₋₅) から分離するのは困難であると指摘している。しかし, 塔全体に温度勾配を付した本実験の場合, 凝縮による還流液と溶質との交換が塔全体において連続的に行われている。そこで Fig. 6 における各成分の留出曲線を詳細に検討した結果を, Fig. 7 に示した。つまり, EPA と DHA に比べて二重結合数の大きく異なる C₂₀₋₁ あるいは C₂₂₋₁ のピーク位置は明らかな相違を示している。さらにそれぞれ二重結合数の 1 つ小さい C₂₀₋₄ あるいは C₂₂₋₅ のピーク位置も若干異なっており, これらの成分の分離も本方法の効率化により原理的には可能であることが示唆される。

次に, Table 2 における run 2 ~ 5 の実験結果を比較する。本実験範囲内では DIXON PACKING (D.P.) あるいはステンレス球 (BALL) の場合についても二酸化炭素の流速が大きくなるに従い, EPA, DHA の純度が低下する結果を得たが, どちらの充填物でも純度にはあまり差が無いように思われる。また, Fig. 8 に, 二酸化炭素の

Table 2 Experimental conditions and results of fractionating of fish oil esters using supercritical fluid CO₂

run No.	FEED(g)	PAC-KING	PRESS. (MPa)	TEMP. GRAD.	CO ₂ FLOW RATE		EPA		DHA		S/F (-)
					(Nm ³ /h)	(cm/s)	PURITY(%)	YIELD(%)	PURITY(%)	YIELD(%)	
1	(A) 8.9	—	12.0	60	0.2	0.02	18.5	41.3	21.2	40.9	350
2	(B) 546	D.P.	12.0	60/35	1.5	0.5	70.8	42.3	43.6	44.6	275
3	" 542	D.P.	"	"	3.0	1.0	56.1	43.6	43.9	45.5	295
4	" 546	BALL	"	"	1.5	1.5	55.4	43.4	39.1	42.7	300
5	" 557	BALL	"	"	3.8	3.8	40.5	43.4	32.1	42.6	230
6	(A) 534	D.P.	12.0	60/35	2.4	0.8	56.3	42.5	63.9	43.3	340
7	" 1081	D.P.	"	"	2.4	0.8	58.5	42.6	70.0	45.0	335
8	" 555	D.P.	15.0	100/50	1.5	0.5	68.4	43.4	68.5	44.2	355
9	(C) 569	D.P.	12.0	60/35	1.5	0.5	72.0	41.1	81.4	45.1	355
10	(D) 646	D.P.	"	"	2.3	0.8	94.4	42.9	—	—	430
11	(E) 665	D.P.	"	"	2.3	0.8	—	—	91.6	43.1	470

(1) (A), (B), ..., or (E) represents each feed stock (see Table 1)

(2) D.P. and BALL stand for Dixon Packing and Stainless Ball packing

(3) S/F stands for solvent-to-feed ratio

Fig. 4 Changes in composition of extract and extraction yield curve for a simple semi-batch wise supercritical CO₂ extraction of fish oil ester (A)
(run 1, 60°C, 12.0 MPa, 0.2 Nm³/h CO₂)
▼ C₁₄ ● C₁₆ ▲ C₁₈ ● C₂₀ ■ C₂₂

Fig. 5 Changes in composition of extract and extraction yield curve for a supercritical CO₂ fractionation of fish oil ester (B)
(run 2, 60/35°C, 12.0 MPa, D.P., 1.5 Nm³/h CO₂)
▼ C₁₄ ● C₁₆ ▲ C₁₈ ● C₂₀ ■ C₂₂ ○ EPA
□ DHA

線速度を大きくした run 5 の留出液の組成変化を示す。run 2 の結果に比べ、留出する全成分とも平坦な重なりが大きなピークとなっている。それに伴い、各成分のピーク位置の出現が早められ、その結果前述の溶媒比 (S/F) は減少している。このように分離性が劣る run 3~5 に対して、Fig. 6 と同様の超臨界流体相の塔内濃度分布を測定したが、その一部のデータにおいてサンプリング中に多量の液ミストの同伴が見られた。このことから分

離性の低下は、還流液の塔内の降下が円滑に行われず、一部液が塔内に滞留し、精留効果が低下したこと、および飛沫同伴によるものと思われる。すなわち、本実験条件下では液相 (溶質相) への超臨界二酸化炭素の溶解量は大きく、しかもそれは液相組成に強く依存するため、操作初期の塔上部において、気液両相の密度差がかなり小さくなることが考えられる。このことは Figs. 5 と 8 の

Fig. 6 Changes in concentration distribution of esters along the column in supercritical CO_2 phase during the fractionation experiment (run 2, FEED (B), $60/35^\circ\text{C}$, 12.0 MPa , D.P., $1.5\text{ Nm}^3/\text{hCO}_2$) For ①, ②, ③ and ④ see Fig. 5

Fig. 7 Changes in composition of extracted C_{20} and C_{22} esters during the fractionation experiment (run 2, $60/35^\circ\text{C}$, 12.0 MPa , D.P., $1.5\text{ Nm}^3/\text{hCO}_2$)
○ C_{20} ▲ C_{20-1} ● C_{20-4} ● EPA
□ C_{22} ▼ C_{22-1} ■ C_{22-5} ■ DHA

各成分の留出曲線の立ち上がり部分の形状の変化からも推察される。本実験で用いた原料のように炭素数の広い分布を有する多成分から成る原料を処理するには、両相の密度差が塔内組成分布に大きく依存するため、相平衡の面のみでなく、溶媒流速に応じた両相の密度差の温度、圧力による調節をも考慮する必要がある。

run 6, 7 は DHA が比較的高濃度な原料 (A) を用い、二

Fig. 8 Changes in composition of extract for a supercritical CO_2 fractionation of fish oil ester (B) (run 5, $60/35^\circ\text{C}$, 12.0 MPa , SUS ball, $3.8\text{ Nm}^3/\text{hCO}_2$)
▼ C_{14} ● C_{16} ▲ C_{18} ● C_{20} ■ C_{22} ○ EPA □ DHA

Fig. 9 Changes in composition of extract for a supercritical CO_2 fractionation of fish oil ester (A) (run 8, $100/50^\circ\text{C}$, 15.0 MPa , D.P., $1.5\text{ Nm}^3/\text{hCO}_2$)
▼ C_{14} ● C_{16} ▲ C_{18} ● C_{20} ■ C_{22} ○ EPA □ DHA

酸化炭素流速を 0.8 cm/sec と低く抑えて、原料仕込み量を変えた実験であるが、DHA 濃度については原料 (B) を用いた場合より数段と濃縮されていることが認められた。一方、run 8 は、塔頂温度を 100°C 、塔底温度を 50°C にし、塔頂における溶解度が run 6, 7 とほぼ等しくなるように圧力を 15.0 MPa に設定したものである。run 6, 7 と比較してみると若干 EPA の純度が高くなっている。run 8 の留出液の組成変化を Fig. 9 に、超臨界流体相の塔内濃度分布を Fig. 10 に示す。また、その時の超臨界流体相の塔内組成分布を Fig. 11 に示す。Figs. 10 と 11 中の記号①～④は Fig. 9 中のそれに対応する。Fig. 10 における時間の経過に伴う超臨界流体への溶解度の減少は、Fig. 11 の各成分の塔内組成分布の時間的な変化に対応する。すなわち、Fig. 11 から、溶解度のもっとも大きな C_{14} 成分は①の段階でもはや塔頂に極在し、②以降では塔内にはほとんど存在しないことがわかる。また、溶解度のもっとも小さい C_{22} 成分についてみると、①では塔底付近のみに現われ、②、③と時間が経過するにつれて徐々に

CONCENTRATION OF ESTERS IN SUPERCRITICAL
CO₂ PHASE (wt %)

Fig. 10 Changes in concentration distribution of esters along the column in supercritical CO₂ phase during the fractionation experiment (run 8, FEED (A), 100/50°C, 15.0 MPa, D.P., 1.5 Nm³/h CO₂)

For ①, ②, ③ and ④ see Fig. 9

塔頂付近にも存在するようになる。④ではもはやC₂₂成分が塔内全体に様に分布している。記号①, ②, ③はそれぞれFig. 9におけるC₁₆成分, C₁₈成分, C₂₀成分のピークにはほぼ対応しており, Fig. 11からピーク位置はその成分が塔底部においてほとんど消失した時点に対応することがわかる。ただし, 最後の留出成分であるC₂₂成分のピーク位置での塔内組成分布は, 塔内での凝縮による還流液の消失が考えられるためその挙動は異なる。以上の塔内組成分布の変化の挙動から, 各成分の収率と純度を上げるためにはピーク位置付近での一時的な外部還流が有効であることが考えられる。

Table 2 中の run 9, 10, 11 はあらかじめ尿素付加法により高度不飽和脂肪酸を予備濃縮した原料を用いた実験である。前に述べたとおり, 本装置および操作条件についてまだ改善の余地があるが, 原料 (D), (E) の結果から, 原料種の選択や尿素付加による前処理により, EPA や DHA を 90% 以上に容易に濃縮することができる。

結 言

(1) 塔高方向に温度分布を付与した超臨界流体抽出塔を用いることにより, いわし油等の魚油の脂肪酸モノエステルの分画が可能である。EPA, DHA については, 天然由来の原料でも種の選定と尿素処理等の前処理を行

Fig. 11 Changes in concentration distribution of each ester along the column in supercritical CO₂ phase during the fractionation experiment (run 8, FEED (A), 100/50°C, 15.0 MPa, D.P., 1.5 Nm³/h CO₂)

For ①, ②, ③ and ④ see Fig. 9

▼C₁₄ ●C₁₆ ▲C₁₈ ●C₂₀ ■C₂₂ ○EPA □DHA

うことにより本法で90%以上の濃縮が可能であった。

(2) 従来, 炭素数が同じで二重結合数の異なる脂肪酸モノエステルの分離は, 溶解度の差が小さいため, 塔頂部に加熱還流部を設けた精留効果のある抽出塔を用いても困難とされていたが, 本実験においてはこれら成分間の留出曲線に有意の差が認められ, その分画の可能性を指摘した。

(3) 溶媒流速や溶媒と還流液との接触方法の決定に際して重要な因子である両相の密度差は, 超臨界流体抽出においては, 温度, 圧力のみならず, 溶質相組成にも大きく依存することを考慮する必要がある。

Literature cited

- 1) Ackman, R.G., P.J. Ke and P.M. Jangaard: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 1 (1973)
- 2) Avelano, M.I., M. Van Rollins and L.A. Horrocks: *J. Lipid Res.*, **24**, 83 (1983)
- 3) Eisenbach, W.: *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **88**, 882 (1984)
- 4) Krukoni, V.J.: Preprints of the 75th Annual Meeting of the American Oil Chemists Society, Dallas, April 29- May 3 (1984)
- 5) Lands, W.E.M.: "Fish and Human Health", Academic Press, Inc., Orlando, FL (1986)
- 6) Murota, S.: *Yukagaku*, **30**, 717 (1981)
- 7) Nilsson, W.B., E.J. Gauglitz Jr., J.K. Hudson, V.F. Stout and J. Spinelli: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 109 (1988)
- 8) Sumerwell, W.N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3411 (1957)
- 9) Suzuki, Y., M. Shimazu, K. Arai and S. Saito: Preprints of the AIChE Annual Meeting, Miami, U-96 (1986)
- 10) Yoshida, M., S. Matsumoto, G. Honda, T. Iwama,

Fractionation of Mono-Esters Derived from Fish Oil Using Supercritical Fluid Extraction Tower

Yasuo Suzuki and Masanori Konno

Miyagi Prefectural Institute of Technology, Sendai 982

Kunio Arai

Dept. of Biochemistry & Engineering, Tohoku Univ., Sendai 980

Shozaburo Saito

Dept. of Molecular Chemistry & Engineering, Tohoku Univ., Sendai 980

Key Words : Supercritical Fluid Extraction, Carbon Dioxide, Fractionation, Fish Oil, Polyunsaturated Fatty Acid, Eicosapentaenoic Acid, Docosahexaenoic Acid

Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) fractionation of fatty acid ethyl esters (FA) derived from fish oil is carried out, using a packed column of 20mm internal diameter and 2.5m total packed height. While the SC-CO₂ phase saturated by a FA mixture flows upward through the column, solutes rich in the heavier components condense because of the longitudinal temperature increase of the column and trickle down countercurrently to the SC-CO₂ phase. This rectification effect promotes the separation efficiency greatly and results in eicosapentaenoic acid (EPA) or docosahexaenoic acid (DHA) purity of over 90wt% with about 40% yield, although the purity depends on the content of other components which have the same carbon number as EPA or DHA. Fractionation curves obtained in this work, however, indicate the possibility of the separation of such components only by SC-CO₂ fractionation.