超臨界ガスクロマトグラフィによる高度不飽和脂肪酸の分取[†]

久保田昌良・松崎晴美・高橋燦吉

(株)日立製作所 日立研究所^{††}

井上節夫

バブcock日立(株) 呉工場^{†††}

超臨界二酸化炭素を移動相に用いた工業規模の超臨界ガスクロマト装置により魚油の脂肪酸メチルエステルから高度不飽和脂肪酸(エイコサペンタエン酸:EPA)の高純度分離について検討した。

充填剤細孔に含浸している水分は超臨界二酸化炭素にほとんど抽出される。クロマト分離に必要な二酸化炭素量は超臨界二酸化炭素密度および充填剤量に依存する。さらに、EPA分取率と濃縮倍率の関係を把握し、分画特性は超臨界二酸化炭素密度と原料負荷値に依存することを明らかにした。これらの基礎的知見より純度90%、収率60%のEPAが得られた。

緒 言

超臨界ガスを溶離溶媒に用いた超臨界ガスクロマトグラフィに関する発表が、近年数多くなされている^{2,4)}。種々のクロマトグラフの中で、超臨界ガスクロマトグラフが注目を集めているのは、他のクロマト法に比べ圧力など分離条件が幅広く選択できる点にあり、分析の他、化学工業、食品、医薬品などの分野における分離精製に活発な適用が行われている^{1,4,6)}。

著者らは、すでに魚油精製プロセスへの超臨界二酸化炭素抽出技術の適用性を検討し、魚油中からコレステリンの高純度分離について報告³⁾した。一方、超臨界ガスクロマトによる魚油脂肪酸エステルからの高度不飽和脂肪酸なかでもエイコサペンタエン酸(EPA)の分離精製の試みが榊ら⁷⁾によって報告されているが、本稿では工業規模の超臨界ガスクロマト装置によるEPAの多量分取について検討した。

1. 実験装置および方法

実験装置は既報で用いた装置にクロマトカラムを追設したものである。そのフローをFig. 1に示す。装置は1 液化器、2 加圧ポンプ、3 熱交換器、4 抽出器(容量4l)、

5 樹脂カラム(樹脂量0.2~4.2l)、6 分取槽(容量2l)、7 低圧分離槽(容量20l)で構成され、二酸化炭素は液化器前段で系内に導入し、上記順序で系内を循環する。超臨界ガスと原料の接触は原料の発泡性を考慮し、表面接触とした。抽出物を含んだ超臨界二酸化炭素は樹脂カラムを流通してクロマト分離される。抽出槽および樹脂カラムの圧力は樹脂カラム後段の保圧弁で制御した。超臨界二酸化炭素は保圧弁を通過直後に減圧(60bar)され、抽出成分は液として分取槽に分離される。二酸化炭素は低圧分離槽(20bar)を経て、ガス流量計を通過し液化器に導入され、循環される。

実験は、1)抽出槽に所定量の原料を投入する。2)空気中での原料の酸化防止等のため、抽出槽内の空気を二酸化炭素でページする。3)バイパス系を用い、原料と接触させることなく超臨界二酸化炭素を循環し、この間に、樹脂カラムをコンディショニングする。4)各槽の温度、圧力が定常になった時点で、バイパス系から主配管に切り換え、クロマト分離実験を開始する。温度は308Kから330Kの範囲に制御した。その後、所定時間毎に分取槽の分離液を内圧を利用してサンプリングした。実験は分離液がサンプリングできなくなる時点を終了とした。なお、抽出量およびその組成分析は、重量法およびガスクロマトグラフィにより行った。

供試原料は、魚油(トリグリセリドと脂肪酸が主成分)をエステル化し、前処理として尿素処理することにより

[†] 1988年7月14日受理

^{††} 〒319-12 日立市久慈町4026

^{†††} 〒737 呉市宝町6-9

Table 1 Ureatreated fatty acid composition of fish oil

Fatty Acid	Composition [wt%]
C ₁₆₋₁	1.7
C ₁₆₋₂	1.0
C ₁₆₋₄	7.7
C ₁₈₋₁	1.4
C ₁₈₋₄	6.5
C ₂₀₋₄	2.2
C ₂₀₋₅ (EPA)	43.6
C ₂₁₋₅	1.2
C ₂₂₋₅	3.1
C ₂₂₋₆	17.7
Ccarbon-double bond	

Table 2 Packing resin

	Polymer resin	Silica
Shape	sphericity	sphericity
Diameter	50 μ m	30~50 μ m
Pore volume	1.077 l/kg	—
Surface area	720 $\times 10^3$ m ² /kg	100 $\times 10^3$ m ² /kg
Pore diameter distribution	160~4000 Å	—

あらかじめEPAを濃縮した脂肪酸メチルエステル油で、その組成のガスクロ分析結果をTable 1に示す。表中C_{m-n}は炭素数m個、二重結合数n個の脂肪酸メチルエステルを表す。EPAはC₂₀₋₅である。

供試充填剤は、ポリマー系樹脂、無機系樹脂シリカの二種で、いずれも液クロ用である。その仕様をTable 2に示す。カラムはSUS製で14.5 ϕ $\times$ 1300mm（充填剤量0.2l）のミニカラムと69 ϕ $\times$ 1300mm（同4.2l=1.2kg）カラムでスケールアップ効果の検討も行った。

操作条件として原料負荷値（樹脂量に対する供試原料量）、超臨界二酸化炭素密度を種々変化させ、EPA分取に必要なクロマト分離性能を検討した。

2. 実験結果と考察

2.1 樹脂のコンディショニング

超臨界二酸化炭素は充填剤担体の微細孔へ迅速に浸入し、細孔内に含有されている水分を容易に抽出する。Fig. 2は超臨界二酸化炭素による樹脂含有水の抽出特性を示す。縦軸は単位樹脂量当たりの抽出液量から算出した抽出率、横軸は樹脂カラムへ流通した二酸化炭素量（標準状態に換算）である。図中、一点鎖線はTable 2に示した樹脂の細孔容積値（1.077 l/kg）から樹脂のカサ比重を用いて算出した樹脂の含水率を示す。樹脂含有液の抽出速度は超臨界二酸化炭素密度に依存する。密度は二酸化

Fig. 1 Flow diagram of supercritical CO₂ chromatography apparatus

炭素純物質の相平衡データ⁵⁾より求めた。回収できなくなる飽和状態での抽出量（単位樹脂量当たりの抽出液量）は、供試樹脂の含水率にほぼ一致する。すなわち、超臨界二酸化炭素により樹脂細孔（径：160~4000Å）内の液相はほとんど抽出され、樹脂はドライ状態でクロマト分離に供試される。

2.2 EPAの分画

2.2.1 抽出およびクロマト分離速度

Fig. 3は、抽出槽の原料を抽出し、樹脂カラムを流通した抽出特性の一例を示す。樹脂カラムのない場合の特性を破線で併記した。縦軸の回収液量は原料量に対する樹脂カラム流出液量、横軸は流通した二酸化炭素量（標準状態に換算）である。回収液量は二酸化炭素に対してS字カーブの特性をもち、樹脂カラムのない特性に対して流出遅れが生じる。流出速度は超臨界二酸化炭素の密度に依存するが、飽和状態の回収量はこれに依存しない。図中の黒スリのデータは、それぞれ回収が飽和した状態において抽出槽に残留した抽残物量を示す。抽残物量も超臨界二酸化炭素密度に依存せず、約10%である。すなわち、原料中には本実験条件の超臨界二酸化炭素では抽出されない物質が10%程度含有されている。さらに、未回収量約10%が存在するが、これは装置配管系に滞留した分である。ここで、それぞれ特性の立ち上がり勾配と回収が飽和し一定となる接点を抽出に要する二酸化炭素量として、これと超臨界二酸化炭素密度の関係を求めた。Fig. 4は、縦軸に必要二酸化炭素量（1lの原料を抽出するために高圧ポンプで送液した液化二酸化炭素量：20 bar, 253 K換算）、横軸は超臨界二酸化炭素密度を示す。エステル油（前処理なし）の特性も併記した。供試原料はエステル油（図中黒スリ）に比べ、多くの二酸化炭素量を要すが、これは原料と超臨界二酸化炭素との接触（図中、破線は

Fig. 2 Conditioning of resin by using supercritical CO₂

Fig. 3 Extraction characteristics of supercritical CO₂ chromatography

液中散気)方式および組成(前処理なしのエステル油は10数%のメタノールを含有)の違いによるものである。流出遅れ等が加算されるためカラム樹脂量とともに二酸化炭素量は増大するが、必要二酸化炭素量と超臨界二酸化炭素密度の特性線は、樹脂量一定の条件であれば、同じ傾きを有し、次式で表すことができる。

$$\text{CO}_2 = A \cdot e^{-9.2 \cdot \rho} \quad \text{ただし, } 0.4 < \rho < 0.8 \quad (1)$$

ここで、係数Aは $\rho = 0$ のときの二酸化炭素量である。係数A値と樹脂量との間にはFig. 5に示したように直線関係が成立し、次式が得られる。

$$A = 10^5 (V + 0.25) \quad (2)$$

これより、Eq. (1)は次式となる。

$$\text{CO}_2 = 10^5 (V + 0.25) e^{-9.2 \cdot \rho} \quad (3)$$

以上の実験式より高压ポンプ容量が決定でき、装置概略設計が可能である。

2.2.2 分画特性 Fig. 6は樹脂カラムを流出し、分取槽から一定時間毎に回収した分離液の組成変化の一例を示す。成分については、原料中の割合が比較的多い

Fig. 4 Required CO₂ volume for super critical CO₂ chromatography

Fig. 5 Factor A as a function of resin volume

C₁₆₋₄, C₁₈₋₄, C₂₀₋₅, C₂₂₋₆を図示した。最初に流出するのは、C₁₆₋₄に富んだ液が、次にC₁₈₋₄, C₂₀₋₅, C₂₂₋₆液と順次流出する。図中には各回収率での組成変化をカーブで示したが、回収率毎の分離液量の組成であるため、C₂₀₋₅に示すようなステップ状の変化である。したがって、複数の分取槽を設け、回収率0.6~0.78の流出液をバルブの切り換え等により分取すれば、90%純度のEPAが得られる。これらの分画性能は超臨界二酸化炭素密度、原料負荷値などの影響をうける。

Fig. 7は、Fig. 6での分取液のガスクロマトグラフィ分析結果である。図中のCONC欄は組成比(wt%)を示す。回収率0.2ではC₁₈₋₄より軽質な成分のみであるが、回収率0.78でEPAは90%に濃縮されている。ここで、EPAとC₂₀₋₄ ω₆, C₂₀₋₄ ω₃との分離性が悪いが、C₂₀₋₄ ω₆は

Fig. 6 Suparation characteristics of supercritical CO₂ chromatography

Fig. 7 Gas chromatography analyses of separated liquid

カラムの充填剤高さを大にすれば分離できると考えられる。しかし、C₂₀₋₄ の₃はEPAと同一に濃縮され分画が困難であり、さらにEPA純度を向上するには限界がある。

Fig. 8 は種々の条件における分取率とEPA濃縮倍率（分取液中のEPA濃度 / 原料中のEPA濃度）の関係を示す。分取率はFig. 6に示すようなEPA組成変化の特性カーブを基に、EPAをもっとも多く含有するように任意に分取したときの分取液量をカラム供給量で除した値である。図中、太い実線は4lカラム、破線は0.2lカラムの特性である。同一カラムの場合、分取率とEPA濃縮倍率の関係は図中の各太線で表されるが、超臨界二酸化炭素密度、原料負荷値の条件によって、上記の特性より外れ、濃縮倍率の変化に伴う分取率は急減する。すなわち、上記太線の特性線上を推移する適正な超臨界二酸化炭素密度、原料負荷値の条件がある。

図中、太い実線と破線との相違は樹脂カラムのスケールアップ効果で、これは本実験方法（単一に分取槽から分離液を回収）に起因し、装置内壁（特に分離槽）等に

Fig. 8 Relation between Take-out ratio and enrichment ratio of EPA

Fig. 9 EPA concentration as a function of density of CO₂

残留する液の影響による。

Fig. 9 は、原料負荷値が0.036~0.074 l/kgの範囲でのEPA純度に及ぼす超臨界二酸化炭素密度の影響を示す。EPA純度は密度の低下にしたがって高くなり、約90%で飽和する。これらの特性は工学的に、カラム容量によらず一本の線で表されるが、詳細には上述した装置内壁等の残留液による影響が出ている。Fig. 8中、矢印の実験点は、純度90%のEPAを収率（分取液中のEPA量 / 原料中のEPA量）63%で分取可能であることを示す。

結 言

超臨界二酸化炭素を移動相に用いた工業規模の超臨界ガスクロマト装置により、魚油脂肪酸メチルエステルから高純度EPAの分取について検討した結果、以下の結論を得た。

1. 超臨界ガスクロマトグラフィによるEPA分画の基礎特性を把握した。

(1) 樹脂細孔内の液相は、ほとんど超臨界二酸化炭素で抽出される。

(2) クロマト分離に必要な二酸化炭素量は超臨界二酸化炭素密度および樹脂量に依存する。

(3) EPA 分取率-濃縮倍率特性を把握し、分画特性は超臨界二酸化炭素密度および原料負荷値に依存する。

(4) 原料負荷値 0.036~0.074 l/kg, 超臨界二酸化炭素密度 0.67 kg/l で EPA 純度 90% が得られる。

2. 上記基礎的知見より、純度 90%, 収率 60% 以上の EPA を得た。

[謝辞] 本研究に際し、原料を提供して頂いた日本化学飼料(株)殿に感謝申し上げます。

Nomenclature

A = Factor	[—]
CO ₂ = CO ₂ volume	[Nm ³]
V = Resin volume	[l]

ρ = Density of CO₂ [kg/l]

Literature cited

- 1) Arai, K and Saito, S: *Kagaku Kougaku*, **50**, 550 (1986)
- 2) Fujita, K: *Bunseki*, **65**, 12 (1985)
- 3) Kubota, M, Matuzaki, H and Takahashi, S: *Kagaku Kougaku Ronbunshu*, **14**, 323 (1988)
- 4) Nagahama, K and Suzuki, Y (ed.): *Kagaku Kougaku*, **52**, 485-518 (1988)
- 5) Nippon Kikai Gakkai (ed.): "Kikai Kougaku Binran", A6-167 (1987)
- 6) Saito, S: *Seibutu to Kagaku*, **24**, 201 (1986)
- 7) Sakaki, K, Sako, T, Sato, S, and Hakuta, T: 20th Autumn meeting of the Society of Chemical Engineers, Japan, Himeji, SH307 (1987)

Separation of High Unsaturated Fatty Acid by Use of Supercritical Gas Chromatography

Masayoshi Kubota, Harumi Matsuzaki and Sankichi Takahashi

Hitachi Research Lab., Hitachi Ltd., Hitachi 319-12

Setsuo Inoue

Kure Works, Babcock-Hitachi K.K., Kure 737

Key Words : Chromatography, Extraction, Fish Oil, Eicosapentanic Acid, Supercritical CO₂

The effects of supercritical CO₂ density, resin volume and injected sample volume on separations of eicosapentanic acid, obtained from fatty acid methyl esters of fish oil, were studied by use of supercritical CO₂ chromatography on an industrial scale. Almost all liquid in resins was extracted, using supercritical CO₂. The CO₂ volume for separation of eicosapentanic acid depended on supercritical CO₂ density and packing resin volume. Product parity depended on supercritical CO₂ density and the injected sample volume. Using the supercritical CO₂ chromatography method, eicosapentanic acid with a concentration of 90% and a yield of 60% was obtained.