薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107(5) 367-371 (1987)

超臨界流体抽出の生薬、植物成分への応用 (第1報) 蛇床子成分の抽出に及ぼす
圧力、温度、時間、エントレーナーの影響¹⁾

宮地 洋,^a 真鍋明義,^a 徳森恒雄,^a 隅田葉子,^a
吉田隆志,^b 小澤 貢,^c 奥田拓男*,^b

クロリンエンジニアズ (株) 岡山研究所,^a 岡山大学薬学部,^b
大阪薬科大学^c

Application of Supercritical Fluid Extraction to Components of Crude Drugs
and Plants. I. Effects of Pressure, Temperature, Time and
Entrainers on Supercritical Fluid Extraction of
Cnidium formosanum YABE Fruits¹⁾

HIROSHI MIYACHI,^a AKIYOSHI MANABE,^a TSUNEO TOKUMORI,^a
YOKO SUMIDA,^a TAKASHI YOSHIDA,^b MITSUGI KOZAWA,^c
and TAKUO OKUDA*,^b

Okayama Laboratory, Chlorine Engineers Co., Ltd.,^a 24-6 Higashitakasaki,
Tamano 706-01, Japan, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Okayama University,^b Tsushima, Okayama 700, Japan
and Osaka University of Pharmaceutical Sciences,^c
Kawai, Matsubara-shi, Osaka, 580, Japan

(Received January 5, 1987)

The supercritical fluid extraction was applied to the components of *Cnidium formosanum* fruits by use of carbon dioxide gas, and the effects of temperature, pressure and time on the extraction were examined to establish the way of applying this new technique to crude drugs. The optimum temperature and pressure for the extraction of furocoumarins such as columbianadin, bergapten, *O*-acetylcolumbianetin, edultin and columbianetin, with supercritical carbon dioxide were 40°C and 400 bar, respectively. Although the amounts of extractives increased with prolonging extraction times, the increments after 80 min were small. Effects of entrainers were examined, and compared with those of the ordinary liquid extraction.

Keywords—supercritical fluid extraction; furocoumarin; *Cnidium formosanum*; columbianadin; bergapten; columbianetin; edultin; *O*-acetylcolumbianetin; entrainer

超臨界流体 (supercritical fluid) とは、臨界温度、臨界圧力を越えた領域で液体と気体とが一相となった流体のことで、液体と比べて粘度が低く、拡散係数は 100 倍近く大きい。また物質の溶解力と密接に関係のある密度が臨界点付近では液体に近くなる、という特徴がある。炭酸ガスの場合、臨界温度は 31.1°C、臨界圧力は 72.8 気圧 (73.8 bar) で、その等密度線は超臨界領域で密であり、中でも臨界点付近に最も集中している。このことは、この領域でのわずかな圧力、温度の変化により流体密度に著しい変化を与え、溶質に対する溶解力に大きな変化をもたらすことが可能であることを意味する。したがってこの流体の溶解力を利用すれば、室温に近い温度での溶質の抽出が可能であり、かつ圧力の変化により完全に炭酸ガスを溶質から分離回収できるため、蒸留のような分離操作を必要としない。超臨界流体抽出のこれらの特性は、熱に不安定な物質の抽出、特定成分の選択的抽出、溶媒の残存による毒性等が問題となる食品、医薬品の抽出分離手段として、広い応用範囲が期待される。超臨界流体抽出によく用いられる溶媒としては、炭酸ガス、エタン、エチレン、プロパン等があるが、このうち不活性ガスである炭酸ガスの利用は溶質の化学的変化を伴わず、また非引火性で、安価に高純度ガスが入手可能である等、安全性、経済性に優れ、これを用いた超臨界流体抽出は工業的省エネルギー抽出法として注目されている。²⁾すでに石油、石炭工業をはじめ、コーヒー豆からの脱カフェイン、ホップエキスの工業的抽出等への応用が実用化さ

れている。³⁾ その他タバコからのニコチンの除去,⁴⁾ スパイス成分の抽出,⁵⁾ 各種生薬成分の抽出挙動等,⁶⁾ 応用範囲の拡大が検討されており, 超臨界流体の相平衡に関する理論的研究等⁷⁾ も近年活発に行われている。しかしその相平衡は単純なものではなく, 溶出物の化学構造と溶解性との関係を予想することは現状ではなお困難で, この面での系統的基礎資料の蓄積が必要である。さらに超臨界流体抽出において, 溶質と親和力の強い第三成分 (エントレーナー entrainer) の使用が, 抽出, 分離効率の向上に影響を及ぼすことが指摘されているが,⁸⁾ その添加の有無, 種類と効果との相関関係についての研究も緒についたばかりであり, 未だ規則性は確立されていない。

我々は超臨界流体抽出法の広範な生薬成分への応用に当たって, まず基本的抽出条件を確立する目的で, 台湾産蛇床子を試料として, そのクマリン成分の抽出に及ぼす圧力, 温度, 時間, エントレーナー等の影響について検討し, 通常の溶媒抽出との比較を行ったので, その結果について報告する。

実 験 の 部

試料 蛇床子 (*Cnidium formosanum* YABE の果実) は台湾高雄市場品を用い, 粉碎後抽出用試料とした。

装置 クロリンエンジニアズ・Nova 社製 TLC 用超臨界ガス抽出分析装置 (HPE/TLC unit)^{2c)} を用い, 超臨界流体として炭酸ガスを用いた。薄層クロマトグラフィー (TLC) による抽出物中の各成分の定量は, 島津二波長クロマトスキャナー CS-900 (バックグラウンド補正装置 BCU-1 付) を用い, 波長 λ_s 330 nm, λ_R 450 nm, スリット幅 1.25×1.25 mm で, ジグザグスキャン法によった。

実験方法 蛇床子 1.0 g をステンレス製抽出槽 (11.5 mm i.d. $\times$ 100 mm) に入れ, 圧力 100, 200, 300, 400 bar, 温度 30, 40, 50, 60°C の各条件において常温, 常圧下, 6 l/min の流速で炭酸ガスを通じて抽出し, 一定時間後噴出口に装着した補集フラスコ中の抽出物を秤量し, 抽出量とした。液体抽出に当たっては, 試料 0.5 g を hexane, MeOH, EtOH (各 10 ml) でそれぞれ 30 分間加熱還流し, ろ過後溶媒を減圧留去した。抽出物中の成分の同定は, precoated Kieselgel F₂₅₄ プレート (Merck) を用い, クロロホルム-アセトン-ベンゼン (40:1:5) で 3 回展開し, 標品の *R_f* 値, 紫外線吸収 (UV) ランプ (254 nm) 下での色調, ケイ光の比較等に基づいて行った。

結 果

抽出温度の影響

温度の違いによる影響については, 圧力を 400 bar に設定し, まず 20 分間炭酸ガスを通じた後の抽出量を比較することにより検討し, Fig. 1 の結果を得た。すなわち臨界点付近及びそれよりやや高い温度 (30—40°C) で最大抽出量を示し, これより高い温度 (50—60°C) では減少する傾向を認めた。これは, この領域で炭酸ガスの密度がやや減少する結果と密接に関係しているものと思われる。

抽出圧力の影響

抽出温度 40°C, 時間 20 分, 炭酸ガス流量 6 l/min における抽出圧力の変化と各抽出量との関係を Fig. 2 に示す。抽出量, 密度共に, 圧力の増加に伴って増大しているが, 抽出量は 200—300 bar で急激な変化を示し, 300

Chart 1

Fig. 1. Effect of Temperature on Supercritical Fluid Extraction

Sample, *Cnidium formosanum*; pressure, 400 bar; time, 20 min; flow rate of CO₂, 6 l/min; ○—○, extract; -----, CO₂ density.

bar 以上では、ほとんど差異が認められなかった。このことは、超臨界流体の抽出力は、流体の密度、拡散速度及び蒸気圧に密接に関係するが、40°Cにおける炭酸ガスの物質特性が、300—400 bar では総体的に大差がないためであると思われる。

抽出成分及びエントレーナーの効果

上記抽出条件の検討の結果に基づいて、超臨界炭酸ガスによる蛇床子中のクマリン成分の抽出に対して最適と考えられる温度と圧力、40°C, 400 bar に設定し、抽出時間を 20 分として、超臨界炭酸ガス単独、エントレーナーとしてエタノール、又は水を添加（バッチ法）した場合等について、各抽出物中の成分の抽出状況を TLC で比較検討した (Fig. 3)。いずれの場合も主抽出物として columbianadin, bergapten, *O*-acetylcolumbianetin, edultin, columbianetin の 5 種のクマリン⁹⁾を同定した。なお TLC において、他の検出法 (I₂ 蒸気による呈色及び 20% 硫酸噴霧後加熱) を適用しても、UV ランプ下で認めたスポット以外のスポットは認めなかった。

一方これら各成分は、比較のために行った有機溶媒による通常の液体抽出物中にも認められたが、超臨界流体による抽出挙動は、総体的に、ヘキサンに

よるそれと類似しており、メタノールやエタノール抽出物中に見られる比較的極性の高い成分 (columbianetin より低 *R_f* の成分) は抽出され難い傾向があることを認めた。

エントレーナーの添加の抽出効率への影響を水とエタノールを用いて比較したところ、あらかじめエントレーナーの一定量 (サンプル重量に対して 10% 量) を添加する方法 (バッチ法) では、両者共、超臨界炭酸ガス単独の場合と比べて大きな差異は認められなかったが、連続的に供給 (炭酸ガス重量に対して 1—2%) する方法 (連続供給法) では、水の場合抽出物が約 2 倍、エタノールの場合は約 2.5 倍に増大した。各抽出物中の columbianetin, *O*-acetylcolumbianetin, 抽出物の総量及び columbianetin より高い *R_f* 値を示す成分 (非極性物質) の総量等を TLC-デンシトメトリーで定量し、エタノールによる液体抽出の結果と比較した。これらのうち前 3 者は Fig. 4 の通りとなる。エタノールをエントレーナーとして連続供給した場合の総抽出量は、液体抽出量の約 60% 程

Fig. 2. Effect of Pressure on Supercritical Fluid Extraction

Sample, *Cnidium formosanum*; temperature, 40°C; time, 20 min; flow rate of CO₂, 6 l/min; ○—○, extract; -----, CO₂ density.

Fig. 3. TLC of Extracts Obtained from *Cnidium formosanum* by Supercritical Fluid Extractions and Ordinary Solvent Extraction

A, extract by supercritical CO₂; B, extract by supercritical CO₂ + EtOH (10% w/w-sample); C, extract by supercritical CO₂ + H₂O (10% w/w-sample); D, extract with hexane; E, extract with MeOH; F, extract with EtOH.

1, columbianadin; 2, bergapten; 3, *O*-acetylcolumbianetin; 4, edultin; 5, columbianetin.

Condition: temperature, 40°C; pressure, 400 bar; time, 20 min; flow rate of CO₂, 6 l/min.

Fig. 4. Effect of Entrainers on the Composition of Extracts from *Cnidium formosanum*

■ columbianetin; ▨ O-acetylcolumbianetin; □ whole extracts.

度ではあるが、その 92% が columbianetin より *R_f* 値の高いクマリン類であり、液体抽出より高い選択性を示すことを認めた。Columbianetin の抽出量はエントレーナーを使用しないときと大差なく、これはエントレーナーとしてのエタノールの効果が、O-acetylcolumbianetin やそれより高 *R_f* 部のクマリン成分の抽出効率増大に寄与していることを示している。

なお蛇床子を粉碎せず、そのまま抽出した場合でも、抽出量 (Fig. 4 の not ground) に大きな違いを認めなかった。

今回検討した各種条件下での抽出量の比較は、20 分間抽出したものについて行ったが、抽出時間を更に長くして、40, 60, 80, 140, 200 分抽出したときの抽出量を調べたところ、時間が長くなるにつれて抽出量の増加が認められた。最初の 20 分間 (炭酸ガス量 120 l) で得られる抽出量は、200 分 (炭酸ガス量 1200 l) 抽出したときに得られる量の約 50% に相当した。Fig. 5 にはその結果と、エントレーナーとしてエタノールを炭酸ガスに対して 1% (w/w) 濃度で連続的に供給した場合の抽出量の経時的変化を示す。

Fig. 5. Effect of Time on Supercritical Fluid Extraction

Sample, *Cnidium formosanum*; pressure, 400 bar; temperature, 40°C; flow rate of CO₂, 6 l/min; ○—○, CO₂; △—△, CO₂ + EtOH.

考 察

以上蛇床子のフロクマリン成分を対象として、超臨界炭酸ガスによる抽出に及ぼす各種要因の影響を検討した結果、columbianetin やそれより極性の低いクマリン類の抽出に際しては、40°C, 400 bar で抽出したとき最も効率がよく、かつエントレーナーとしてエタノールを連続供給することにより、抽出効率を約 2.5 倍程度に増大させることができることを明らかにした。またエントレーナー存在下 20 分抽出での抽出量は、通常の熱エタノールによる液体抽出の場合と比べて、60% 程度であるが、Fig. 5 に見られるように抽出時間を長くすることにより抽出量を 2 倍以上に増加させることができ、上記低極性のクマリン類が選択的に抽出されることを考慮すると、超臨界流体抽出法は充分検討に値する方法であることが示唆された。

引用文献

- 1) 日本生薬学会第 32 回年会で一部発表, 岡山, 1985 年 10 月.
- 2) a) 長浜邦夫, フレグランス ジャーナル, No. 67, 19 (1984); b) 有馬 満, 化学装置, **1985**, 21; c) 真鍋明義, 北澤喜次, 食品機械装置, **11**, 53 (1985).
- 3) 有馬 満, 化学装置, **1984**, 27.
- 4) P. Hubert, O. G. Vitzthm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **17**, 710 (1978).
- 5) 奥村烝司, ケミカル・エンジニアリング, **7**, 36 (1985).
- 6) 渋谷康則, “第 5 回天然物の開発と応用シンポジウム,” 広島, 1984 年, 7 月; 糸川秀治, 生田安喜良, 渡辺勤三, 竹谷孝一, 森田博史, 原 昭二, 真鍋明義, 大石和彦, 日本薬学会第 105 年会, 金沢, 1985 年 4 月.
- 7) G. M. Schneider, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **88**, 841 (1984); M. Radosz, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **88**, 859 (1984); M. A. McHugh, V. J. Krukoni, “Supercritical Fluid Extraction,” Butterworths Publishers, Boston, 1986.
- 8) M. E. Paulaitis, R. G. Kander, J. R. DiAnreth, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **88**, 869 (1984).
- 9) 秦 清之, 小澤 貢, 馬場きみ江, 薬誌, **92**, 1289 (1972); 本多義昭, 田端 守, 馬場きみ江, 小澤 貢, 生薬, **38**, 221 (1984).