

カロテノイドの *cis* 異性化による物性変化を利用した 超臨界流体急速膨張法によるカロテノイドナノ粒子の調製

名古屋大学大学院 工学研究科

神田 英輝

超臨界二酸化炭素 (SC-CO₂) を溶媒として用いる超臨界流体急速膨張法 (RESS) 法でシス体リコピンの微粒子化を行い、生成されるリコピン微粒子の粒径とシス体/トランス体異性化率と結晶性への依存性を検討した。トランス体リコピン (サンプル A) を熱異性化とろ過によってシス異性化した結果、シス異性化率 76.0% (サンプル B) と 97.8% (サンプル C) のリコピンが得られ、このサンプル (A) ~ (C) を実験原料に用いた。(A) では SC-CO₂ への溶解度が小さく、生成物がほとんど確認されなかった。(B) と (C) の場合では、お互いにリコピンナノ粒子を生成し、それぞれ 53 nm と 46 nm であった。生成されたりコピンナノ粒子はシス体で構成されており、アモルファスであることが示された。以上から、シス体を維持したまま最小で 46 nm の微粒子を生成することに成功した。

1. 研究の目的と背景

カロテノイドは天然の脂質で、色鮮やかな野菜に含まれている。カロテノイドには 750 種類以上の種類が存在し、トマトやスイカなどの野菜や果物に含まれる。カロテノイドの一種であるリコピンは、非環式化合物で 11 個の共役二重結合を持っている (Fig. 1)^{1,2}。リコピンは深赤色をしており、従来、薬品や食品、サプリメント業界などで色付きをよくするための天然着色料に使用されてきた^{1,2}。近年、リコピンはその強力な抗酸化作用が発見され、更に抗ガン作用と抗動脈硬化作用があるとの一部の研究もあり、サプリメントなど健康食品などへの利用も念頭に研究がされてきた³⁻⁵。サプリメント利用にはカロテノイドの人体への生物学的利用能を大きくすることが重要な課題であり、解決方法としてナノサイズの微粒子を生成することが効果的な方法だと報告されている^{5,6}。従来は微粒子化の方法として、ミル法やスプレードライ法や化学沈殿法などが用いられてきたが、機械的な摩擦熱や空気中での高温加熱による劣化や、有機溶媒の残留の懸念があった。

これに対して本研究では、超臨界二酸化炭素 (SC-CO₂) をリコピンの溶媒に用いた。CO₂ は臨界温度 (T_c=30.1℃) が低いので低温での微粒子化が可能で、加熱条件下で酸素に容易に劣化されるリコピンを扱うのに最適である。また、CO₂ は人体への毒性が無く、他の有機溶媒よりも安価で、大気圧に解放することで速やかに気体になって生成粒子と分離して CO₂ 自身が粒子に残留する

懸念がないことから、工業的にも CO₂ への利用が期待されている⁷⁻¹⁰。SC-CO₂ については、これまで SC-CO₂ を用いた超臨界貧溶媒 (SAS) 法による微粒子化の製造手法が研究されてきた。SAS 法は一般的なトランスカロテノイドに対して貧溶媒である SC-CO₂ を、カロテノイドを溶解した有機溶媒と混合することで、カロテノイドの過飽和を生じさせて微粒子を析出させる方法である⁹⁻¹¹。ここで、カロテノイド微粒子は、粒径が 150 nm 以下に減少すると、吸収効率が劇的に改善されることが報告されている^{12,13}。

ここでリコピンには長い共役二重結合があるのでシス異性体が多数存在する。シス体は主に (5Z)-, (9Z)-, (13Z)-, (15Z)- などのモノシス体や (9Z,9'Z)-, (9Z,13'Z)-, (5Z,13Z,9'Z)- などのマルチシス体が存在している¹⁴。過去の我々の研究で、トランス体と比べシス体は有機溶媒に対してより高い溶解度をもつことを見いだした。また、結晶性の高いトランス体に対してシス体は結晶性のないアモルファス粒子に変化し、物性が大きく変化することも見いだした¹⁵。そこで、本研究の予備研究では、この特性を用いてシス体含有リコピンを原料にした、150 nm 程度の微粒子の生成を目標にして SAS 法を適用した。その結果、粒径は目標を下回る 75 nm でアモルファス状態の微粒子を生成することに成功した¹⁶。しかしながら、シス体含有リコピンを原料として用いたにもかかわらず回収粒子は主にトランス体リコピンで構成されていた。しかも回収できたりコピン微粒子の収量は 22.2% であり、殆ど回収できなかった。この収量が低い理由は、シス体リコピンは SC-CO₂ に対して可溶になったことで、SC-CO₂ で貧溶媒晶析されることなく、CO₂ とともに大気に放出されたためだと考えられる。またトランス体リコピンで構成されていたのは、加圧と加温雰囲気ですべてトランス体に異性化したりコピンが過飽和を生じたためだと考えられる。

本研究では、さらに小さいアモルファスのリコピン微粒子を得るために、SC-CO₂ をシス体リコピンの良溶媒として用いる急速膨張 (RESS) 法による、シス体のリコピン微粒子の作成を試みた。この手法では溶媒に SC-CO₂ を用いているので残留溶媒の懸念がない。回収された粒子のシス異性化率・粒径・結晶性は SEM・順相 HPLC・粉末 XRD により解析した^{17,18}。

2. 研究の方法

2-1. 使用物質

酢酸エチルおよびヘキサンは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 級を富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) は東京化成工業株式会社 (東京) から入手した。

2-2. 高純度トランス体リコピンの精製

トランス体リコピンは、オレオレジン (Lyc-O-Mato 15%, LycoRed Ltd., Beer-Sheva, イスラエル) から既往研究の方法に沿って精製した¹⁹。簡単に説明すると、5.0 g のオレオレジンは凡そ 15 wt% のリコピンを含有して、これを 50 mL のベンゼンに溶解し 10 分間超音波処理した。この懸濁液を桐山ロート (5B ろ紙) でろ過した。フィルター上の残さを 100 mL のベンゼンで洗い流した。フィルター上の残さを更に 50 mL のアセトンに溶解し、更に 10 分間超音波を当てた。超音波処理後に溶液を吸引ろ過し、100 mL のアセトン、100 mL のエタノール、および 100 mL のヘキサンで順番にすすいだ。最後にろ紙上の残さを真空乾燥させると、357 mg の深赤色のトランス体リコピン (サンプル A) (順相 HPLC, 純度 $\geq 98.0\%$) が得られた。

2-3. シス体含有リコピンの作製

シス体含有リコピンは熱異性化とろ過技術によって、我々の予備研究を元に調整した^{20, 21}。100 mg のトランス体リコピンを 100 mL のジクロロメタン (DCM) に溶かし、80℃の温浴に 8 時間置いて加熱した。8 時間温浴の後、真空中で 40℃に加熱して蒸発させ、シス異性化率 76.0% リコピン (サンプル B) を得た。このシス体リコピンを 10 mL のエタノールに懸濁させた。シス体リコピンはエタノールに溶解するが、トランス体リコピンは溶解度が非常に低いため、エタノールにほとんど溶解しない。これを利用して、高濃度のシス異性化リコピンの溶液をろ過した後、このエタノールを真空中で 40℃に加熱して蒸発させることで、シス異性化率 97.8% リコピン (サンプル C) を得た。

2-4. RESS 法による E/Z リコピンの微粒子化^{22, 23}

実験装置の概略図を Fig. 1 に示す。最初に液化 CO₂ を一定流量で送液した。背圧弁 (BPR) を圧力の調整に用いて、CO₂ を設定圧力まで昇圧させた。恒温槽内で CO₂ を加熱した後、設定温度まで昇温して SC-CO₂ に相変化させる。次に、原料のシス体含有リコピンを溶解させて混合物を BPR に送液した後、混合物を大気圧に解放して、急速に CO₂ の体積が膨張することで気体にした。リコピンの CO₂ への溶解度が急激に減少するので過飽和状態になり、リコピンの一次微粒子を生成させた。その生成微粒子を粒子収集装置にて回収した。

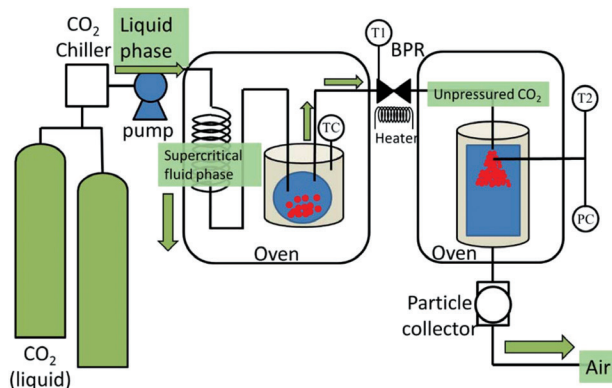


Fig.1 RESS 法によるシス体カロテノイド微粒子化装置の概略図

2-5. 粉末 XRD 分析¹⁵

生成したリコピン微粒子の X 線回折測定値は、リガク (Rigaku) FR-EX 線回折計により分析した。X 線は CuK α 線 ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$) を使用し、ビームサイズは約 $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ であり、カメラ長は 70 mm であった。サンプルをマークチューブ (約 1.0 mm) に充填し、X 線ビームを照射した。

2-6. HPLC 分析

フォトダイオードアレイ検出器 (MD-2010Plus, Jasco 社, 東京) を設置して順相 HPLC 分析を使用して、リコピンのシス体含有率を定量した。リコピン異性体の HPLC による分析方法は、以前に詳細に記載されている¹⁹。HPLC 装置のカラムは 4 つの Nucleosil300-5 を直列に接続している (長さ $4 \times 250 \text{ mm}$, 内径 4.6 mm, 粒径 $5 \mu\text{m}$: GL Science, 東京)。0.0075% DIPEA を含むヘキサンを溶離剤として用い、 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の一定流量に流した。カラム温度は 40℃に設定した。各種のシス体リコピンのモル吸光係数には、それぞれの違いが小さい 460 nm をピーク検出の波長に設定し、そこでのピーク面積積分によって各リコピン異性体の定量分析を行った¹⁷⁻¹⁹。リコピン異性体ピークは、HPLC 保持時間および Z ピークの相対強度 (% DB/Drr) に従って定性分析を行う。シス体含有率 (%) は、トランス体リコピンを含む全てのリコピンの割合から推定した^{17-19, 23}。

2-7. 走査型電子顕微鏡 (Scanning electronic microscope: SEM) による分析

リコピン粒子の形態と粒形を走査型電子顕微鏡 (SEM; JEOL, JSAM-6390 LV, 東京, 日本; 日立ハイテクフィールドイジング, S-5200, 東京, 日本) で観察した。はじめに、RESS 法により作製された粒子を、高真空蒸発器中で金でスパッタコーティングした。これらのスパッタ被覆試料を 15 kV の SEM で分析した¹⁵。各実験で収集された 100 個以上の粒子について、Image J ソフトウェアを使用した画像解析により粒径を求めた⁹。

3. 研究内容と実施経過

3-1. 熱異性化後のリコピン分析

HPLC 分析では, Fig. 2 に示すように 20 個のピークが確認された. それらの中には, トランス体リコピン, (5Z)-, (9Z)-, (13Z)- リコピンのようなモノシス体, および (9'Z,13'Z)-, (9Z,13'Z)- のようなマルチシス体が存在した. NMR, UV-vis 吸収極大および Z ピークの相対強度 (% DB/CH) により, 20 個のピークのうちいくつかはこれまでの研究で同定されている^{15, 21}. モノシス体と (all-E)- については Fig. 2 に表記しており, 残りの (1-15) のピークは Table. 1 に表記した. Fig. 2 からわかるように, (B) 加熱後のリコピンと (C) フィルターでろ過した後のリコピンを比較すると, (5Z)-, (all-E)- のピーク強度は (C) の方が (B) の場合よりも比較的低く, (5Z)-, (all-E) の存在比が低いことを示していた. 温浴後のシス体リコピンをエタノールに懸濁したとき, トランス体リコピンは溶解度が低く, ほとんどエタノールに溶解しない. それ故にこの懸濁液をろ過すると, 不溶のトランス体がフィルターに回収されるために, シス体含有率は 97.8% まで高くなった. しかし, シス体の中では (5Z)- は有機溶媒への溶解度が小さいので¹⁵, (all-E)- と共にフィル

ターで回収された結果, (C) では (5Z)- の存在比が小さくなったと考えられる.

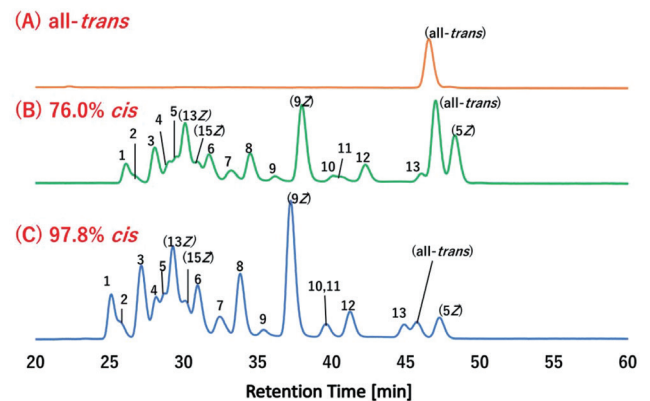


Fig. 2 順送 HPLC 分析による各原料リコピンのクロマトグラム; (A) トランス体リコピン, (B) 76.0% シス体含有リコピン, (C) 97.8% シス体含有リコピン. これまでの研究により (all-trans)-, (5-cis)-, (9-cis)- および (13-cis)- リコピンについては判別可能である^{19-21, 24}. (1-17) のピークのうちいくつか暫定的に特定されている異性体を Table 1¹⁹ に示している.

Table 1. HPLC 分析による吸収極大 ($\lambda_{\max}$) とリコピン異性体の Z ピーク (%DH/DII) 相対強度

Peak	Lycopene isomer ^b	$\lambda_{\max}(\text{nm})$		% DH/DII	
		In-line ^b	Reported ^b	In-line	Reported ^b
1	9Z, 13'Z	359, 431, 455, 487	360, 433, 457, 487	30.8	30.4
2	UZ	359, 431, 455, 487	-	29.4	-
3	9Z, 9'Z	359, 432, 459, 488	360, 433, 459, 490	12	9.5
4	UZ	359, 439, 463, 495	-	67.5	-
5	UZ	359, 427, 455, 483	-	22.5	-
6	UZ	359, 447, 463, 495	-	61	-
	(13Z)	359, 435, 463, 495	361, 437, 463, 494	56.4	52.4
	(15Z)	359, 439, 467, 499	360, 441, 468, 499	72.5	70
7	UZ	359, 427, 455, 483	-	23.4	-
8	(9Z, 13'Z)	359, 431, 455, 487	361, 433, 456, 488	27.7	26.2
9	UZ	359, 439, 459, 491	-	22.9	-
10	UZ	359, 435, 455, 487	-	31.2	-
11	(5Z, 9'Z)	359, 439, 463, 495	361, 438, 464, 495	13.4	13.4
12	UZ	359, 431, 455, 487	-	11.6	-
	(9Z)	359, 439, 463, 495	361, 438, 464, 495	11.2	12.7
13	(5Z, 9Z, 5'Z)	359, 439, 463, 495	361, 438, 463, 495	13	12.6
14	(5Z, 9Z)	359, 439, 463, 495	361, 438, 464, 495	9.6	11.8
15	(5Z, 5'Z)	443, 471, 499	443, 470, 502	ND	ND
	(all-E)	443, 471, 499	444, 470, 502	ND	ND
	(5Z)	443, 471, 499	444, 470, 502	ND	ND

3-2. RESS 法における粒子生成

HPLC 分析から (B) と (C) の条件において, 得られた粒子はほぼ全てシス体カロテノイドで構成されており, シス体の含有率はそれぞれ 98.4% と 97.8% であった. 先行研究¹⁶ では SAS 法により原料のシス体リコピンはトランス体に異性化されてしまい, 原料に 65.3% と 97.8% シス体

含有リコピンを用いた場合で, 微粒子化の結果得られた微粒子はそれぞれ 6.0% と 10.9% までシス体含有率が減少した. (B) の場合ではシス体含有率が大幅に増加したことが分かった. これは, シス体リコピンはトランス体の場合よりも有機溶媒への溶解度が大きく^{19, 24}, SC-CO₂ に溶解したシス体リコピンが微粒子として回収されたためだと

考えられる。逆に、トランス体リコピンはほとんど SC-CO₂ に溶解しなかったため分析できる量のトランス体リコピンは得られなかった。本研究では予備研究の SAS 法の場合のようなトランス体の微粒子ではなく、シス体の微粒子が回収されたが、これは、RESS 法と SAS 法の粒子生成時の違いによるものだと考えられる。SAS 法では、シス体リコピンが加温加圧条件下つまり装置系内に留まって加圧され続け、結晶体の密度が大きいトランス体が高压では熱的に安定であると考えられることから、トランス体に異性化されたと考察した²⁷。一方で本研究の RESS 法では、シス体リコピンは SC-CO₂ に溶解したまま BPR を出て噴霧され、粒子を生成する。そのため生成される粒子は大気圧と同様な条件下（噴霧口から回収口まで CO₂ が満たされている）で回収されるので、熱的に不安定なシス体のまま粒子を回収できたと考えられる。

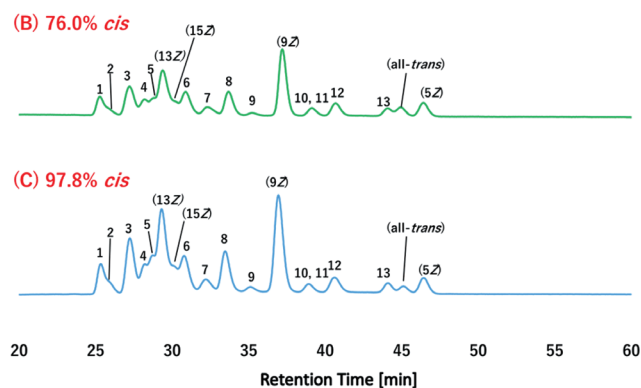


Fig. 3 順送 HPLC 分析による各条件により得られたリコピン粒子のクロマトグラム；(B) 76.0%シス体含有リコピン，(C) 97.8%シス体含有リコピン。以前の研究により判明している (all-trans) -, (5-cis) -, (9-cis) -, and (13-cis) - リコピンを記した^{19-21, 24}

次に、粉末 XRD 分析から (B) と (C) の場合では、ピークの数が増え鋭いピークからブロードなピークに変化したことが確認された。また、HPLC 分析で述べたのと同様にトランス体リコピンは溶解度が非常に小さいために、分析できる量の粒子が得られなかったので、ここでは原料のトランス体リコピンの XRD 分析のパターンを併記した。リコピンがトランス体のとき、鋭く結晶面を表すピークが多数みられる^{15, 25}。これは、トランス体リコピンの結晶性が大きいことを示している。しかし、(B) と (C) の場合、ピークがブロードになりピークの数が減るということは粒子が結晶性を無くしアモルファスになったことを示している。以前の研究より、シス体リコピンはアモルファスになることが示されており¹⁵、本研究でもシス体リコピンで構成された (B) と (C) の微粒子がアモルファスになることが確認できた。

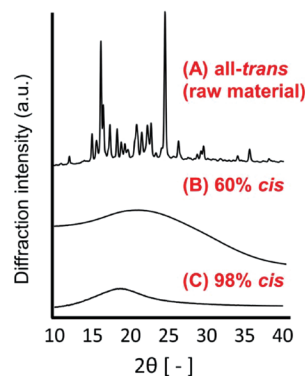


Fig. 4 生成リコピン粒子の粉末 XRD 分析の XRD パターン；(A) 実験試料トランス体リコピン，(B) 76.0%シス体含有リコピン，(C) 97.8%シス体含有リコピン

最後に SEM から、(B) と (C) の場合、粒子はナノサイズまでともに微粒子化されておりそれぞれ 53 nm, 46 nm であることが判明した。(A) ではほとんど SC-CO₂ にトランス体リコピンが溶解しないため、粒子がほとんど回収されなかった。RESS 法では 25 MPa まで加圧された SC-CO₂ を一気に大気圧に解放しているため、超臨界状態では溶解していたリコピンは一気に溶解できなくなり、過飽和状態になる。過飽和状態を解消するために瞬間的に微粒子を析出させることで粒子をより小さくすることができる。我々の予備研究では¹⁶、97.8%シス体含有カロテノイドを用いて微粒子化を行った結果、75 nm のナノ微粒子を生成した。これに対して、本研究では更に小さい 46 nm の粒子を生成できた。これは、RESS 法の方が SAS 法よりも粒子成長する時間が短いため、より微細な粒子が得られたと考えられる。トランス体リコピンは直鎖状の分子構造をしており、分子同士には共役二重結合同士の π - π 相互作用による分子間力がはたらいっている。一方、シス体リコピンは二重結合部分で折れているので分子同士の立体障害のために π - π 相互作用が弱くなる¹⁵。この傾向のために直鎖状の分子同士では π - π 相互作用が強く、粒子成長が促進されるためにトランス体カロテノイドを用いたナノサイズまでの微粒子化が困難であった。実際、我々の予備研究では¹⁶ トランス体リコピンを用いた場合析出した粒子は π - π 相互作用のために粒子成長が促進されて平均粒径が 3.6 μ m とナノサイズより大きい粒子が得ら

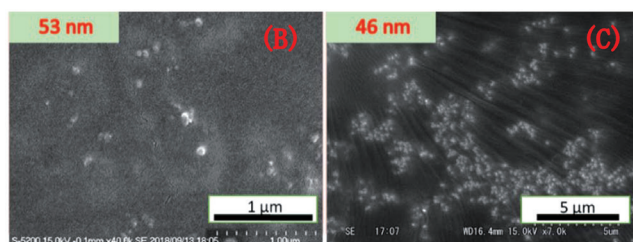


Fig. 5 生成リコピン粒子の SEM 画像；(B) 76.0%シス体含有リコピン，(C) 97.8%シス体含有リコピン

れたが、シス体リコピンを用いた場合ではシス体リコピンの π - π 相互が弱いために最小で平均粒径が75 nmの粒子を得ることに成功した。本研究でも同様に、シス体カロテノイドの π - π 相互が弱いために46 nmのナノ微粒子を生成することに成功したと考えられる。

4. 研究から得た結論・考察

リコピンのシス異性体によるRESS法による微粒子化を検討した。トランス体では、SC-CO₂への溶解度が低いので粒子を作成できなかった。一方、シス体含有率が76.0%と97.8%の場合、SC-CO₂への溶解度が高いため、シス体カロテノイドのみが溶解された結果、得られた粒子はほぼシス体リコピンで構成されていた。また、粉末XRD分析からシス体で構成されており結晶性が無いアモルファス粒子であることが確認された。最後に、SEM画像から最小で平均粒径46 nmの微粒子を生成することに成功した。以上からRESS法を用いた微粒子化はより、生物学的利用能が高いとされているシス体のリコピンにおいて、これまでよりも微細なナノサイズの微粒子を得ることができた。

5. 残された問題、今後の課題

本研究の予備実験であるSAS法においてトランス体カロテノイドの微粒子が得られた原因として、加圧雰囲気によるトランス体への異性化が考えられると記したものの、それが正しい仮説であるかは検討が不十分である。このため、加圧雰囲気下でシス体カロテノイドを保管した際のトランス体への異性化の有無を検証することにより、この仮説が正しいのか明らかにする必要がある。

6. 謝辞

本研究の遂行に対してご支援を賜りました公益財団法人東洋食品研究所の皆さまおよび審査員の先生方に深く感謝いたします。カロテノイドのシス体異性体の特性ならびに液体クロマトグラフィーを用いた分析および精製についてご教授を賜りました名城大学理工学部の本田真己助教と、本研究の遂行と本報告書の作成に協力して下さった当研究室の当時修士二年の児玉智彦さんに心より感謝致します。

7. 参考文献

- 1 Aoki H., Thi Minh Kieu, N., Kuze, N., Tomisaka, K. & Van Chuyan, N., Carotenoid pigments in GAC fruit (*Momordica cochinchinensis* SPRENG), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**(11), 2479-2482 (2002)
- 2 Holden, J. M. *et al.*, Carotenoid content of U.S. foods: an update of the database, *J. Food Compos. Anal.*,

- 12**(3), 169-196 (1999)
- 3 Cooperstone J. L. *et al.*, Enhanced bioavailability of lycopene when consumed as *cis* -isomers from tangerine compared to red tomato juice, a randomized, cross-over clinical trial, *Mol. Nutr. Food Res.*, **59**(4), 658-669 (2015)
- 4 Rao, A. V., Ray, M. R. & Rao, L. G., Lycopene, *Adv. Food. Nutr. Res.*, **51**, 99-164 (2006)
- 5 Ouchi, A. *et al.*, Kinetic study of the quenching reaction of singlet oxygen by carotenoids and food extracts in solution. Development of a singlet oxygen absorption capacity (SOAC) assay method, *J. Agric. Food Chem.*, **58**(18), 9967-9978 (2010)
- 6 Vishwanathan, R., Wilson, T. A. & Nicolosi, R. J., Bioavailability of a Nanoemulsion of Lutein is Greater than a Lutein Supplement, *Nano Biomed. Eng.*, **1**, 38-49 (2009)
- 7 Miguel, F., Martín, A., Gamse, T. & M. J. Cocero, Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters, *J. Supercrit. Fluids*, **36**(3), 225-235 (2006)
- 8 Boonnoun, P. *et al.*, Supercritical anti-solvent micronization of chromatography purified marigold lutein using hexane and ethyl acetate solvent mixture, *J. Supercrit. Fluids*, **80**, 15-22 (2013)
- 9 Nerome, H. *et al.*, Nanoparticle formation of lycopene/ β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent precipitation, *J. Supercrit. Fluids*, **83**, 97-103 (2013)
- 10 Nerome, H. *et al.*, Effect of solvent on nanoparticle production of β -carotene by a supercritical antisolvent process, *Chem. Eng. Technol.*, **39**(10), 1771-1777 (2016)
- 11 Li, S. & Zhao, Y., Preparation of zein nanoparticles by using solution-enhanced dispersion with supercritical CO₂ and elucidation with computational fluid dynamics, *Int. J. Nanomedicine*, **12**, 3485-3494 (2017)
- 12 Affandi, M. M. R. M. M., Julianto, T. & Majeed, A. B. A., Enhanced Oral Bioavailability of Astaxanthin with Droplet Size Reduction, *Food Sci. Technol. Res.*, **18**(4), 549-554 (2012)
- 13 Silva, H. D. *et al.*, Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique, *J. Food Eng.*, **102**(2), 130-135 (2011)
- 14 Takehara, M., Kuwa, T., Inoue, Y., Kitamura, C. & Honda, M., Isolation and characterization of (15Z)-lycopene thermally generated from a natural source, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **467**(1), 58-62 (2015)
- 15 Murakami, K. *et al.*, The thermal Z-isomerization-

- induced change in solubility and physical properties of (all-*E*)-lycopene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **491**(2), 317–322 (2017)
- 16 Kodama, T. *et al.*, Effect of the *Z*-isomer content on nanoparticle production of lycopene using solution-enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS), *J. Supercrit. Fluids*, **133**, 291–296 (2018)
- 17 Türk, M., Hils, P., Helfgen, B., Schaber, K., Martin, H.-J. & Wahl, M. A., Micronization of pharmaceutical substances by the Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents, *J. Supercrit. Fluids*, **22**(1), 75–84 (2002)
- 18 Sane, A., Taylor, S., Sun, Y. P. & Thies, M. C., RESS for the preparation of fluorinated porphyrin nanoparticles, *Chem. Commun.*, **21**, 2720–2721 (2003)
- 19 Honda, M. *et al.*, The *E/Z* isomer ratio of lycopene in foods and effect of heating with edible oils and fats on isomerization of (all- *E*)-lycopene, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **119**(8), 1600389 (2017)
- 20 Honda, M. *et al.*, Isolation and spectral characterization of thermally generated multi-*Z*-isomers of lycopene and the theoretically preferred pathway to di-*Z*-isomers, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**(2), 365–371 (2017)
- 21 Honda, M., Takahashi, N., Kuwa, T., Takehara, M., Inoue, Y. & Kumagai, T., Spectral characterisation of *Z*-isomers of lycopene formed during heat treatment and solvent effects on the *E/Z* isomerisation process, *Food Chem.*, **171**, 323–329 (2015)
- 22 Türk, M., Formation of small organic particles by RESS: experimental and theoretical investigations, *J. Supercrit. Fluids*, **15**(1), 79–89 (1999)
- 23 Bagheri, H., Ali Mansoori, G. & Hashemipour, H., A novel approach to predict drugs solubility in supercritical solvents for RESS process using various cubic EoS-mixing rule, *J. Mol. Liq.*, **261**, 174–188 (2018)
- 24 Hengartner, U., Bernhard, K., Meyer, K., Englert, G. & Glinz, E., Synthesis, isolation, and NMR-spectroscopic characterization of fourteen (*Z*)-isomers of lycopene and of some acetylenic didehydro- and tetrahydrolycopenes, *Helv. Chim. Acta*, **75**(6), 1848–1865 (1992)
- 25 Gamlieli-Bonshtein, I., Korin, E. & Cohen, S., Selective separation of cis-trans geometrical isomers of β -carotene via CO₂ supercritical fluid extraction, *Biotechnol. Bioeng.*, **80**(2), 169–174 (2002)