

明 細 書

発明の名称：高度不飽和脂肪酸エステル組成物の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、カラムクロマトグラフィーを使用して高度不飽和脂肪酸（P U F A）エステルの組成物を製造するための方法に関する。

背景技術

[0002] 高度不飽和脂肪酸は、医薬品や健康食品として利用されている。高度不飽和脂肪酸は、高度不飽和脂肪酸を豊富に含む植物油及び海産油等の天然原料から製造される。天然原料中には、二重結合数が異なる脂肪酸、例えば、飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸や炭素鎖長が異なる脂肪酸等、他の成分も含まれている。天然原料中の高度不飽和脂肪酸の含量は高くない。医薬品や健康食品として高度不飽和脂肪酸を使用するには、目的の高度不飽和脂肪酸を選択的に分離する必要がある（特許文献1）。

[0003] 高度不飽和脂肪酸の分離方法としてカラムクロマトグラフィーが知られている（特許文献2）。一方、連続操作が可能なクロマトグラフィーとして疑似移動床クロマトグラフィーが使用されている（特許文献3～7）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2014／054435号

特許文献2：特表2014－511406号公報

特許文献3：特表平8－512336号公報

特許文献4：特開平8－218091号公報

特許文献5：特表2016－508156号公報

特許文献6：特開2019－207234号公報

特許文献7：特表2013－516398号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 疑似移動床クロマトグラフィーは複雑なシステム、装置を必要とし、単一カラムを使用したクロマトグラフィーに比べて高価である。そのため疑似移動床クロマトグラフィーのような複雑な装置を必要とせずに、目的の高度不飽和脂肪酸エステル組成物を効率的に高純度で製造する方法が依然として求められている。

課題を解決するための手段

[0006] 意外にも、本発明の発明者は、第1のカラムクロマトグラフィーおよび第2のカラムクロマトグラフィーを用いた多段式分離方法により、上記の課題に対応して目的の高度不飽和脂肪酸を効率的に製造し得ることを見出して、本発明を完成させた。

本発明は、以下の油脂組成物から高度不飽和脂肪酸エステル組成物を製造する方法を要旨とする。

[0007] [1-1] 油脂組成物から高度不飽和脂肪酸エステル組成物を製造する方法であって、

(a) 油脂組成物を、第1のカラムを使用する第1のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、第1のカラムクロマトグラフィーにおける目的物である高度不飽和脂肪酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.8~3.5である少なくとも1種の成分の全部または一部を除去して、第1のカラムクロマトグラフィーによって目的物を含む溶出液を得ること、

(b) 第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.90~1.1である少なくとも1種の成分の全部または一部を除去して、第2のカラムクロマトグラフィーによって溶出液を得ること、及び

(c) 第2のカラムクロマトグラフィーで得られた溶出液を濃縮して、目的物を含む組成物を得ること、を含み、

得られた組成物が目的物を95重量%以上含有する、方法。

[0008] [1-2] 1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第1と第2のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、[1-1]に記載の方法。

[1-3] 1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第2のカラムのみを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、[1-2]に記載の方法。

[0009] [1-4] 第1のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.8~3.5である前記少なくとも1種の成分が、油脂組成物中の高度不飽和脂肪酸エステル以外の少なくとも1種の成分である、[1-1]~[1-3]のいずれかに記載の方法。

[1-5] 第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付すことによって全部または一部除去されるのが、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.93~1.09である少なくとも1種の成分である、[1-1]~[1-4]のいずれかに記載の方法。

[1-6] 第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入されるように第1のカラムを第2のカラムに連通可能であり、

第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が1.1以下の範囲である、[1-1]~[1-5]のいずれかに記載の方法。

[1-7] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカ

ラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる前記少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.90～1.1の範囲である、[1-6]に記載の方法。

[0010] [1-8] 第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる前記少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.94～1.1の範囲である、[1-6]に記載の方法。

[1-9] 第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる前記少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.96～1.1の範囲である、[1-6]に記載の方法。

[1-10] 第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる前記少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09の範囲である、[1-6]に記載の方法。

[1-11] 第1のカラムにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の保持時間の相対値が3.5以上である第1のカラムからの溶出液は排出して、第2のカラムには新たな移動相を注入する、[1-6]に記載の方法。

[1-12] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが逆相カラムクロマトグラフィーを用いる、[1-1]～[1-11]のいずれかに記載の方法。

[0011] [1-13] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが固定床カラムクロマトグラフィーである、[1-1]～[1-12]のいずれかに記載の方法。

[1-14] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが同じ移動相を用いる、[1-1]～[1-13]のいずれかに記

載の方法。

[1-15] 第2のカラムが、第1のカラムより充填された固定相の量が多い、[1-1]～[1-14]のいずれかに記載の方法。

[0012] [1-16] 第2のカラムが、第1のカラムと同じ内径を有し、第1のカラムより長さが長い、[1-1]～[1-15]のいずれかに記載の方法。

[1-17] 前記油脂組成物が、魚油、植物油、藻類及び微生物のいずれか由来である、[1-1]～[1-16]のいずれかに記載の方法。

[1-18] 前記目的物が、エイコサペンタエン酸(EPA)、ジホモγ-リノレン酸(DGLA)及びアラキドン酸(ARA)のいずれかのエステルである、[1-1]～[1-17]のいずれかに記載の方法。

[1-19] 前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分が、C22:0、C20:0、C18:0及びC20:1のいずれかのエステルである、[1-1]～[1-18]のいずれかに記載の方法。

[1-20] エステルが、エチルエステルである、[1-18]又は[1-19]に記載の方法。

[0013] [1-21] 第2のカラムクロマトグラフィーに付される目的物を含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される前記少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.3重量%以下である、[1-1]～[1-20]のいずれかに記載の方法。

[1-22] 第2のカラムクロマトグラフィーに付される目的物を含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される前記少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.1重量%以下又は0.05重量%以下である、[1-21]に記載の方法。

[0014] [1-23] (c)で得られた組成物が目的物を96重量%以上含有する、[1-1]～[1-22]のいずれかに記載の方法。

[1-24] 原料組成物から、蒸留により前記油脂組成物を調製することをさらに含む、[1-1]～[1-23]のいずれかに記載の方法。

[1-25] (a)、(b)および(c)を2回以上繰り返す、[1-1]～[1-24]のいずれかに記載の方法。

[1-26] (a)の前に、油脂組成物を、第1のカラムを使用するカラムクロマトグラフィーに付して、目的物のピークトップの保持時間を確認することをさらに含む、[1-1]～[1-25]のいずれかに記載の方法。

[1-27] 第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液が、第1のカラムからの目的物の溶出終了時までの溶出液である、[1-1]～[1-26]のいずれかに記載の方法。

[0015] [2-1] 油脂組成物からエイコサペンタエン酸エステル組成物を製造する方法であって、

(a) 油脂組成物を、第1のカラムを使用する第1のカラムクロマトグラフィーに付することによって、溶出液中に含まれる脂肪酸エステル全体に対してC20:0のエステルを0.3重量%以下含む、エイコサペンタエン酸エステルを含む溶出液を得ること、

(b) 第1のカラムクロマトグラフィーで得られたエイコサペンタエン酸エステルを含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付して溶出液を得ること、及び

(c) 第2のカラムクロマトグラフィーで得られた溶出液を濃縮して、エイコサペンタエン酸エステルを含む組成物を得ること、を含み、

得られた組成物がエイコサペンタエン酸エステルを96.5重量%以上およびエイコサペンタエン酸エステル以外の少なくとも1種の成分を含有し、エイコサペンタエン酸エステル以外の少なくとも1種の成分がステアリドン酸、C19:4、C21:5のエステルをそれぞれ0.2重量%以下含有する、方法。

[2-2] 前記得られた組成物において、ステアリドン酸、C19:4、C21:5のエステルはそれぞれ0.01重量%～0.2重量%含まれる、

〔2－1〕に記載の方法。

[0016] 〔2－3〕1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第1と第2のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、〔2－1〕又は〔2－2〕に記載の方法。

〔2－4〕1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第2のカラムのみを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、〔2－3〕に記載の方法。

[0017] 〔2－5〕第1のカラムクロマトグラフィーにおけるエイコサペンタエン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.8～3.5である少なくとも1種の成分が、油脂組成物中のエイコサペンタエン酸エステル以外の少なくとも1種の成分である、〔2－1〕～〔2－4〕のいずれかに記載の方法。

〔2－6〕第1のカラムクロマトグラフィーで得られたエイコサペンタエン酸エステルを含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付すことによって全部または一部除去されるのが、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるエイコサペンタエン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09である少なくとも1種の成分である、〔2－1〕～〔2－5〕のいずれかに記載の方法。

〔2－7〕第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入されるように第1のカラムを第2のカラムに連通可能であり、

第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるエイコサペンタエン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるエイコサペンタエン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が1.1以下の範囲である、〔2－1〕～〔2－6〕のいずれかに記載の方法。

〔2－8〕第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるエイコサペンタエン酸エステルピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるエイコサペンタエン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.90～1.1の範囲である、〔2－7〕に記載の方法。

[0018] 〔2－9〕第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるエイコサペンタエン酸エステルピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるエイコサペンタエン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.94～1.1の範囲である、〔2－7〕に記載の方法。

〔2－10〕第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるエイコサペンタエン酸エステルピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるエイコサペンタエン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.96～1.1の範囲である、〔2－7〕に記載の方法。

〔2－11〕第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるエイコサペンタエン酸エステルピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるエイコサペンタエン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09の範囲である、〔2－7〕に記載の方法。

〔2－12〕第1のカラムにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の保持時間の相対値が3.5以上である第1のカラムからの溶出液は排出して、第2のカラムには新たな移動相を注入する、〔2－7〕に記載の方法。

[0019] 〔2－13〕第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが逆相カラムクロマトグラフィーを用いる、〔2－1〕～〔2－12〕のいずれかに記載の方法。

〔2－14〕第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグ

ラフィーが固定床カラムクロマトグラフィーである、[2-1]～[2-13]のいずれかに記載の方法。

[2-15] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが同じ移動相を用いる、[2-1]～[2-14]のいずれかに記載の方法。

[0020] [2-16] 第2のカラムが、第1のカラムより充填された固定相の量が多い、[2-1]～[2-15]のいずれかに記載の方法。

[2-17] 第2のカラムが、第1のカラムと同じ内径を有し、第1のカラムより長さが長い、[2-1]～[2-16]のいずれかに記載の方法。

[2-18] 前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分が、C20:0、C18:0及びC20:1のいずれかのエステルである、[2-1]～[2-17]のいずれかに記載の方法。

[2-19] 前記油脂組成物が、魚油、植物油、藻類及び微生物のいずれか由来である、[2-1]～[2-18]のいずれかに記載の方法。

[2-20] エステルが、エチルエステルである、[2-1]～[2-19]のいずれかに記載の方法。

[0021] [2-21] 第2のカラムクロマトグラフィーに付されるエイコサペンタエン酸エステルを含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.3重量%以下である、[2-1]～[2-20]のいずれかに記載の方法。

[2-22] 第2のカラムクロマトグラフィーに付されるエイコサペンタエン酸エステルを含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.1重量%以下又は0.05重量%以下である、[2-21]に

記載の方法。

[0022] [2-23] 前記得られた組成物がエイコサペンタエン酸エステルを96重量%以上含有する、[2-1]～[2-22]のいずれかに記載の方法。

[2-24] 原料組成物から、蒸留により前記油脂組成物を調製することをさらに含む、[2-1]～[2-22]のいずれかに記載の方法。

[2-25] (a)、(b)および(c)を2回以上繰り返す、[2-1]～[2-24]のいずれかに記載の方法。

[0023] [2-26] (b)において、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるエイコサペンタエン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.90～1.1である少なくとも1種の成分の全部または一部が除去される、[2-1]～[2-25]のいずれかに記載の方法。

[2-27] (a)の前に、油脂組成物を、第1のカラムを使用するカラムクロマトグラフィーに付して、エイコサペンタエン酸エステルのピークトップの保持時間を確認することをさらに含む、[2-1]～[2-26]のいずれかに記載の方法。

[2-28] 第1のカラムクロマトグラフィーで得られたエイコサペンタエン酸エステルを含む溶出液が、第1のカラムからのエイコサペンタエン酸エステルの溶出終了時までの溶出液である、[2-1]～[2-27]のいずれかに記載の方法。

[0024] [3-1] 油脂組成物からジホモγーリノレン酸エステル組成物を製造する方法であって、

(a) 油脂組成物を、第1のカラムを使用する第1のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、溶出液中に含まれる脂肪酸エステル全体に対してC22:0のエステルを0.5重量%以下含む、ジホモγーリノレン酸エステルを含む溶出液を得ること、

(b) 第1のカラムクロマトグラフィーで得られたジホモγーリノレン酸エステルを含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマト

グラフィーに付すして溶出液を得ること、及び

(c) 第2のカラムクロマトグラフィーで得られた溶出液を濃縮して、エイコサペンタエン酸エステルを含む組成物を得ること、を含み、

得られた組成物が、ジホモ-γ-リノレン酸エステルを95.0重量%以上、およびジホモ-γ-リノレン酸エステル以外の少なくとも1種の成分を含有し、ジホモ-γ-リノレン酸エステル以外の少なくとも1種の成分がC₂₀:4n-6のエステルを0.60重量%以下含有する、方法。

[3-2] 前記得られた組成物において、C₂₀:4n-6のエステルは0.01重量%~0.2重量%含まれる、[3-1]に記載の方法。

[0025] [3-3]

1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第1と第2のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、[3-1]又は[3-2]に記載の方法。

[3-4] 1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第2のカラムのみを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、[3-3]に記載の方法。

[0026] [3-5] 第1のカラムクロマトグラフィーにおけるジホモ-γ-リノレン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.8~3.5である少なくとも1種の成分が、油脂組成物中のジホモ-γ-リノレン酸エステル以外の少なくとも1種の成分である、[3-1]~[3-4]のいずれかに記載の方法。

[3-6] 第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付すことによって全部または一部除去されるのが、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるジホモ-γ-リノレン酸エステルのピークトップの保持時間を1.

0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09である少なくとも1種の成分である、[3-1]～[3-5]のいずれかに記載の方法。

[3-7] 第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入されるように第1のカラムを第2のカラムに連通可能であり、

第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるジホモγーリノレン酸エステルピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるジホモγーリノレン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が1.1以下の範囲である、[3-1]～[3-6]のいずれかに記載の方法。

[0027] [3-8] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるジホモγーリノレン酸エステルピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるジホモγーリノレン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.90～1.1の範囲である、[3-7]に記載の方法。

[3-9] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるジホモγーリノレン酸エステルピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるジホモγーリノレン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.94～1.1の範囲である、[3-7]に記載の方法。

[3-10] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるジホモγーリノレン酸エステルピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるジホモγーリノレン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.96～1.1の範囲である、[3-7]に記載の方法。

[3-11] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるジホモγーリノレン酸エステルのピー

クトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるジホモγーリノレン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09の範囲である、[3-7]に記載の方法。

[3-12] 第1のカラムにおけるジホモγーリノレン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合の保持時間の相対値が3.5以上である第1のカラムからの溶出液は排出して、第2のカラムには新たな移動相を注入する、[3-7]に記載の方法。

[3-13] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが逆相カラムクロマトグラフィーを用いる、[3-1]～[3-12]のいずれかに記載の方法。

[0028] [3-14] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが固定床カラムクロマトグラフィーである、[3-1]～[3-13]のいずれかに記載の方法。

[3-15] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが同じ移動相を用いる、[3-1]～[3-14]のいずれかに記載の方法。

[3-16] 第2のカラムが、第1のカラムより充填された固定相の量が多い、[3-1]～[3-15]のいずれかに記載の方法。

[0029] [3-17] 第2のカラムが、第1のカラムと同じ内径を有し、第1のカラムより長さが長い、[3-1]～[3-16]のいずれかに記載の方法。

[3-18] 前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分が、C22:0、C20:0、C18:0及びC20:1のいずれかのエステルである、[3-1]～[3-17]のいずれかに記載の方法。

[3-19] 前記油脂組成物が、魚油、植物油、藻類及び微生物のいずれか由来である、[3-1]～[3-18]のいずれかに記載の方法。

[3-20] エステルが、エチルエステルである、[3-1]～[3-19]のいずれかに記載の方法。

[0030] [3-21] 第2のカラムクロマトグラフィーに付されるジホモγーリノレン酸エステルを含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.3重量%以下である、[3-1]～[3-20]のいずれかに記載の方法。

[3-22] 第2のカラムクロマトグラフィーに付されるジホモγーリノレン酸エステルを含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.1重量%以下又は0.05重量%以下である、[3-21]に記載の方法。

[3-23] 前記得られた組成物がジホモγーリノレン酸エステルを96重量%以上含有する、[3-1]～[3-22]のいずれかに記載の方法。

[0031] [3-24] (b)において、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるジホモγーリノレン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.90～1.1である少なくとも1種の成分の全部または一部が除去される、[3-1]～[3-23]のいずれかに記載の方法。

[3-25] (a)の前に、油脂組成物を、第1のカラムを使用するカラムクロマトグラフィーに付して、ジホモγーリノレン酸エステルのピークトップの保持時間を確認することをさらに含む、[3-1]～[3-24]のいずれかに記載の方法。

[3-26] 第1のカラムクロマトグラフィーで得られたジホモγーリノレン酸エステルを含む溶出液が、第1のカラムからのジホモγーリノレン酸エステルの溶出終了時までの溶出液である、[3-1]～[3-25]のいずれかに記載の方法。

[0032] [4-1] 油脂組成物からアラキドン酸エステル組成物を製造する方法であって、

(a) 油脂組成物を、第1のカラムを使用する第1のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、溶出液中に含まれる脂肪酸エステル全体に対してC22:0のエステルを0.5重量%以下含む、アラキドン酸エステルを含む溶出液を得ること、

(b) 第1のカラムクロマトグラフィーで得られたアラキドン酸エステルを含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付して溶出液を得ること、及び

(c) 第2のカラムクロマトグラフィーで得られた溶出液を濃縮して、アラキドン酸エステルを含む組成物を得ること、を含み、

得られた組成物がアラキドン酸エステルを95.0重量%以上、およびアラキドン酸エステル以外の少なくとも1種の成分を含有し、アラキドン酸エステル以外の少なくとも1種の成分がC18:3n-6のエステルを0.25重量%以下含有する、方法。

[4-2] 前記得られた組成物において、C18:3n-6のエステルは0.01重量%~0.2重量%含まれる、[4-1]に記載の方法。

[0033] [4-3] 1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第1と第2のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、[4-1]又は[4-2]に記載の方法。

[4-4] 1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第2のカラムのみを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、[4-3]に記載の方法。

[0034] [4-5] 第1のカラムクロマトグラフィーにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.8~3.5である少なくとも1種の成分が、油脂組成物中の

アラキドン酸エステル以外の少なくとも1種の成分である、[4-1]～[4-4]のいずれかに記載の方法。

[4-6] 第1のカラムクロマトグラフィーで得られたアラキドン酸エステルを含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付すことによって全部または一部除去されるのが、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09である少なくとも1種の成分である、[4-1]～[4-5]のいずれかに記載の方法。

[4-7] 第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入されるように第1のカラムを第2のカラムに連通可能であり、

第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるアラキドン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が1.1以下の範囲である、[4-1]～[4-6]のいずれかに記載の方法。

[4-8] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるアラキドン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.90～1.1の範囲である、[4-7]のいずれかに記載の方法。

[0035] [4-9] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれるアラキドン酸エステル以外の少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.94～1.1の範囲である、[4-7]に記載の方法。

[4-10] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの

保持時間を 1.0 とした場合の前記溶出液に含まれるアラキドン酸エステル以外の少なくとも 1 種の成分のピークトップの保持時間の相対値が 0.96 ~ 1.1 の範囲である、[4-7]に記載の方法。

[4-11] 第 1 のカラムからの溶出液を第 2 のカラムに注入し、第 2 のカラムクロマトグラフィーにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの保持時間を 1.0 とした場合の前記溶出液に含まれるアラキドン酸エステル以外の少なくとも 1 種の成分のピークトップの保持時間の相対値が 0.93 ~ 1.09 の範囲である、[4-7]に記載の方法。

[4-12] 第 1 のカラムにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの保持時間を 1.0 とした場合の保持時間の相対値が 3.5 以上である第 1 のカラムからの溶出液は排出して、第 2 のカラムには新たな移動相を注入する、[4-7]に記載の方法。

[0036] [4-13] 第 1 のカラムクロマトグラフィーと第 2 のカラムクロマトグラフィーが逆相カラムクロマトグラフィーを用いる、[4-1] ~ [4-12] のいずれかに記載の方法。

[4-14] 第 1 のカラムクロマトグラフィーと第 2 のカラムクロマトグラフィーが固定床カラムクロマトグラフィーである、[4-1] ~ [4-13] のいずれかに記載の方法。

[4-15] 第 1 のカラムクロマトグラフィーと第 2 のカラムクロマトグラフィーが同じ移動相を用いる、[4-1] ~ [4-14] のいずれかに記載の方法。

[4-16] 第 2 のカラムが、第 1 のカラムより充填された固定相の量が多い、[4-1] ~ [4-15] のいずれかに記載の方法。

[0037] [4-17] 第 2 のカラムが、第 1 のカラムと同じ内径を有し、第 1 のカラムより長さが長い、[4-1] ~ [4-16] のいずれかに記載の方法。

[4-18] 前記第 1 のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも 1 種の成分が、C22:0、C20:0、C18:0 及び C20:1 のいずれかのエステルである、[4-1] ~ [4-17] のい

ずれかに記載の方法。

[4-19] 前記油脂組成物が、魚油、植物油、藻類及び微生物のいずれか由来である、[4-1]～[4-18]のいずれかに記載の方法。

[4-20] エステルが、エチルエステルである、[4-1]～[4-19]のいずれかに記載の方法。

[0038] [4-21] 第2のカラムクロマトグラフィーに付されるアラキドン酸エステルを含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.3重量%以下である、[4-1]～[4-20]のいずれかに記載の方法。

[4-22] 第2のカラムクロマトグラフィーに付されるアラキドン酸エステルを含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.1重量%以下又は0.05重量%以下である、[4-21]に記載の方法。

[4-23] 前記得られた組成物がアラキドン酸エステルを96重量%以上含有する、[4-1]～[4-22]のいずれかに記載の方法。

[0039] [4-24] 原料組成物から、蒸留により前記油脂組成物を調製することをさらに含む、[4-1]～[4-23]のいずれかに記載の方法。

[4-25] (a)、(b)および(c)を2回以上繰り返す、[4-1]～[4-24]のいずれかに記載の方法。

[0040] [4-26] (b)において、第2のカラムクロマトグラフィーにおけるアラキドン酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.90～1.1である少なくとも1種の成分の全部または一部が除去される、[4-1]～[4-25]のいずれかに記載の方法。

〔４－２７〕（ａ）の前に、油脂組成物を、第１のカラムを使用するカラムクロマトグラフィーに付して、アラキドン酸エステルピークトップの保持時間を確認することをさらに含む、〔４－１〕～〔４－２６〕のいずれかに記載の方法。

〔４－２８〕第１のカラムクロマトグラフィーで得られたアラキドン酸エステルを含む溶出液が、第１のカラムからのアラキドン酸エステルの溶出終了時までの溶出液である、〔４－１〕～〔４－２７〕のいずれかに記載の方法。

〔0041〕〔５－１〕油脂組成物からの高度不飽和脂肪酸エステル組成物の製造におけるカラムクロマトグラフィーに要する時間を短縮する方法であって、

（ａ）油脂組成物を、第１のカラムを使用する第１のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、第１のカラムクロマトグラフィーにおける目的物である高度不飽和脂肪酸エステルピークトップの保持時間を１．０とした場合のピークトップの保持時間の相対値が１．８～３．５である少なくとも１種の成分の全部または一部を除去して、第１のカラムクロマトグラフィーによって目的物を含む溶出液を得ること、

（ｂ）第１のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液を、第２のカラムを使用する第２のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、第２のカラムクロマトグラフィーにおける目的物ピークトップの保持時間を１．０とした場合のピークトップの保持時間の相対値が０．９０～１．１である少なくとも１種の成分の全部または一部を除去して、第２のカラムクロマトグラフィーによって溶出液を得ること、及び

（ｃ）第２のカラムクロマトグラフィーで得られた溶出液を濃縮して、目的物を含む組成物を得ること、を含み、

得られた組成物が目的物を９５重量％以上含有し、

１回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第１と第２のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短

縮される、方法。

[0042] [5-2] 1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第2のカラムのみを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、[5-1]に記載の方法。

[5-3] 第1のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.8~3.5である少なくとも1種の成分が、油脂組成物中の高度不飽和脂肪酸エステル以外の少なくとも1種の成分である、[5-1]又は[5-2]に記載の方法。

[0043] [5-4] 第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付すことによって全部または一部除去されるのが、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.93~1.09である少なくとも1種の成分である、[5-1]~[5-3]のいずれかに記載の方法。

[5-5] 第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入されるように第1のカラムを第2のカラムに連通可能であり、

第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる成分のピークトップの保持時間の相対値が1.1以下の範囲である、[5-1]~[5-4]のいずれかに記載の方法。

[5-6] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる成分のピークトップの保持時間の相対値が0.90~1.1の範囲である、[5-5]に記載の方法。

[5-7] 第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0

とした場合の前記溶出液に含まれる成分のピークトップの保持時間の相対値が0.94～1.1の範囲である、〔5-5〕に記載の方法。

[0044] 〔5-8〕第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる成分のピークトップの保持時間の相対値が0.96～1.1の範囲である、〔5-5〕に記載の方法。

〔5-9〕第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる成分のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09の範囲である、〔5-5〕に記載の方法。

〔5-10〕第1のカラムにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の保持時間の相対値が3.5以上である第1のカラムからの溶出液は排出して、第2のカラムには新たな移動相を注入する、〔5-5〕に記載の方法。

〔5-11〕第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが逆相カラムクロマトグラフィーを用いる、〔5-1〕～〔5-10〕のいずれかに記載の方法。

[0045] 〔5-12〕第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが固定床カラムクロマトグラフィーである、〔5-1〕～〔5-11〕のいずれかに記載の方法。

〔5-13〕第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが同じ移動相を用いる、〔5-1〕～〔5-12〕のいずれかに記載の方法。

〔5-14〕第2のカラムが、第1のカラムより充填された固定相の量が多い、〔5-1〕～〔5-13〕のいずれかに記載の方法。

[0046] 〔5-15〕第2のカラムが、第1のカラムと同じ内径を有し、第1のカラムより長さが長い、〔5-1〕～〔5-14〕のいずれかに記載の方法。

〔5-16〕前記目的物が、エイコサペンタエン酸（EPA）、ジホモ-

γ-リノレン酸（DGLA）及びアラキドン酸（ARA）のいずれかのエステルである、〔5-1〕～〔5-15〕のいずれかに記載の方法。

〔5-17〕前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分が、C22:0、C20:0、C18:0及びC20:1のいずれかのエステルである、〔5-1〕～〔5-16〕のいずれかに記載の方法。

〔5-18〕前記油脂組成物が、魚油、植物油、藻類及び微生物のいずれか由来である、〔5-1〕～〔5-17〕のいずれかに記載の方法。

〔5-19〕エステルが、エチルエステルである、〔5-17〕又は〔5-18〕に記載の方法。

[0047] 〔5-20〕第2のカラムクロマトグラフィーに付される目的物を含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.3重量%以下である、〔5-1〕～〔5-19〕のいずれかに記載の方法。

〔5-21〕第2のカラムクロマトグラフィーに付される目的物を含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0.1重量%以下又は0.05重量%以下である、〔5-20〕に記載の方法。

〔5-22〕高度不飽和脂肪酸エステル組成物が目的物を96重量%以上含有する、〔5-1〕～〔5-21〕のいずれかに記載の方法。

[0048] 〔5-23〕原料組成物から、蒸留により前記油脂組成物を調製することをさらに含む、〔5-1〕～〔5-22〕のいずれかに記載の方法。

〔5-24〕（a）、（b）および（c）を2回以上繰り返す、〔5-1〕～〔5-23〕のいずれかに記載の方法。

〔5-25〕（a）の前に、油脂組成物を、第1のカラムを使用するカラムクロマトグラフィーに付して、目的物のピークトップの保持時間を確認す

ることをさらに含む、〔５－１〕～〔５－２４〕のいずれかに記載の方法。

〔５－２６〕第１のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液が、第１のカラムからの目的物の溶出終了時までの溶出液である、〔５－１〕～〔５－２５〕のいずれかに記載の方法。

[0049] 〔６－１〕油脂組成物から高度不飽和脂肪酸エステル組成物を製造する方法であって、

（ａ）油脂組成物を、第１のカラムを使用する第１のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、第１のカラムクロマトグラフィーにおける目的物である高度不飽和脂肪酸エステルのピークトップの保持時間を１．０とした場合のピークトップの保持時間の相対値が１．８～３．５である少なくとも１種の成分の全部または一部を除去して、第１のカラムクロマトグラフィーによって目的物を含む溶出液を得ること、及び

（ｂ）第１のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液を、第２のカラムを使用する第２のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、第２のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を１．０とした場合のピークトップの保持時間の相対値が０．９０～１．１である少なくとも１種の成分の全部または一部を除去して、第２のカラムクロマトグラフィーによって溶出液を得ること、を含む、方法。

[0050] 〔６－２〕１回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第１と第２のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、〔６－１〕に記載の方法。

〔６－３〕１回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第２のカラムのみを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、〔６－２〕に記載の方法。

[0051] 〔６－４〕第１のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を１．０とした場合のピークトップの保持時間の相対値が１．

8～3. 5である前記少なくとも1種の成分が、油脂組成物中の高度不飽和脂肪酸エステル以外の少なくとも1種の成分である、〔6-1〕～〔6-3〕のいずれかに記載の方法。

〔6-5〕第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付すことによって全部または一部除去されるのが、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09である少なくとも1種の成分である、〔6-1〕～〔6-4〕のいずれかに記載の方法。

〔6-6〕第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入されるように第1のカラムを第2のカラムに連通可能であり、

第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が1.1以下の範囲である、〔6-1〕～〔6-5〕のいずれかに記載の方法。

〔6-7〕第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入し、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる前記少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.90～1.1の範囲である、〔6-6〕に記載の方法。

[0052] 〔6-8〕第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる前記少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.94～1.1の範囲である、〔6-6〕に記載の方法。

〔6-9〕第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる前記少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.96～1.1の範囲であ

る、〔6－6〕に記載の方法。

〔6－10〕第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の前記溶出液に含まれる前記少なくとも1種の成分のピークトップの保持時間の相対値が0.93～1.09の範囲である、〔6－6〕に記載の方法。

〔6－11〕第1のカラムにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合の保持時間の相対値が3.5以上である第1のカラムからの溶出液は排出して、第2のカラムには新たな移動相を注入する、〔6－6〕に記載の方法。

〔6－12〕第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが逆相カラムクロマトグラフィーを用いる、〔6－1〕～〔6－11〕のいずれかに記載の方法。

[0053] 〔6－13〕第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが固定床カラムクロマトグラフィーである、〔6－1〕～〔6－12〕のいずれかに記載の方法。

〔6－14〕第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが同じ移動相を用いる、〔6－1〕～〔6－13〕のいずれかに記載の方法。

〔6－15〕第2のカラムが、第1のカラムより充填された固定相の量が多い、〔6－1〕～〔6－14〕のいずれかに記載の方法。

[0054] 〔6－16〕第2のカラムが、第1のカラムと同じ内径を有し、第1のカラムより長さが長い、〔6－1〕～〔6－15〕のいずれかに記載の方法。

〔6－17〕前記油脂組成物が、魚油、植物油、藻類及び微生物のいずれか由来である、〔6－1〕～〔6－16〕のいずれかに記載の方法。

〔6－18〕前記目的物が、エイコサペンタエン酸（EPA）、ジホモγーリノレン酸（DGLA）及びアラキドン酸（ARA）のいずれかのエステルである、〔6－1〕～〔6－17〕のいずれかに記載の方法。

〔6－19〕前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除

去される少なくとも1種の成分が、C 2 2 : 0、C 2 0 : 0、C 1 8 : 0及びC 2 0 : 1のいずれかのエステルである、[6 - 1] ~ [6 - 1 8] のいずれかに記載の方法。

[6 - 2 0] エステルが、エチルエステルである、[6 - 1 8] 又は[6 - 1 9] に記載の方法。

[0055] [6 - 2 1] 第2のカラムクロマトグラフィーに付される目的物を含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される前記少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0. 3重量%以下である、[6 - 1] ~ [6 - 2 0] のいずれかに記載の方法。

[6 - 2 2] 第2のカラムクロマトグラフィーに付される目的物を含む溶出物における、前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される前記少なくとも1種の成分の含量が前記第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる脂肪酸エステル全体に対して0. 1重量%以下又は0. 0 5重量%以下である、[6 - 2 1] に記載の方法。

[0056] [6 - 2 3] 得られた組成物が目的物を9 6重量%以上含有する、[6 - 1] ~ [6 - 2 2] のいずれかに記載の方法。

[6 - 2 4] 原料組成物から、蒸留により前記油脂組成物を調製することをさらに含む、[6 - 1] ~ [6 - 2 3] のいずれかに記載の方法。

[6 - 2 5] (a)、(b) および(c) を2回以上繰り返す、[6 - 1] ~ [6 - 2 4] のいずれかに記載の方法。

[6 - 2 6] (a) の前に、油脂組成物を、第1のカラムを使用するカラムクロマトグラフィーに付して、目的物のピークトップの保持時間を確認することをさらに含む、[6 - 1] ~ [6 - 2 5] のいずれかに記載の方法。

[6 - 2 7] 第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液が、第1のカラムからの目的物の溶出終了時までの溶出液である、[6 - 1] ~ [6 - 2 6] のいずれかに記載の方法。

発明の効果

[0057] 本発明においては、E P Aエチルエステル、D G L Aエチルエステル及びA R Aエチルエステル等の高度不飽和脂肪酸エチルエステルを高濃度で含有する組成物を、単一のカラムを用いるよりも短い時間でかつ溶媒使用量を少なく効果的に製造できることを見出した。本発明では、C 2 0 : 0エチルエステルなどの脂肪酸を除去することができる。

発明を実施するための形態

[0058] 本発明の一態様において、「組成物」は、P U F Aまたはそのエステル誘導体を一種以上含むことができる。P U F Aまたはそのエステル誘導体を含む組成物は、高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸として含む原料から得ることができる。例えば、適切な油脂組成物は、植物、動物の油及び脂肪を含む天然の油脂をエステル化した原料組成物から、並びに遺伝子組み換え植物、動物及び酵母、糸状菌を含む微生物から得られる油をエステル化した原料組成物から得られてもよい。例えば、糸状菌としてはモルティエレラ (M o r t i e r e l l a) 属微生物から得られる油をエステル化した組成物が挙げられる。例として、魚油、藻類及び微細藻類の油、並びに例えばルリジサ油、シャゼンムラサキ属の油及びマツヨイグサ油といった植物油をエチルエステル化した組成物が挙げられる。一実施形態において、原料組成物は、魚油をエチルエステル化した組成物である。別の実施形態において、原料組成物は藻類の油をエチルエステル化した組成物である。

[0059] 本発明の一態様において、油脂組成物は、原料組成物を蒸留にかけることによって得られる。

本発明の一態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物とは、本発明の方法によって得られる組成物であり、目的物である高度不飽和脂肪酸エステルを含む組成物である。目的物の高度不飽和脂肪酸エステルは、エイコサペンタエン酸 (E P A)、ジホモγーリノレン酸 (D G L A) 及びアラキドン酸 (A R A) のいずれかのエステル、例えばエチルエステル、であることができる。

[0060] 本明細書において用語「脂肪酸」は、約C 1 2 ~ C 2 2 (ここで数字は鎖

中の炭素原子の総数を意味する)の様々な鎖長の長鎖脂肪族系カルボン酸(アルカン酸)を意味する。主な鎖長はC 16 ~ C 22である。脂肪酸の構造は「X : Y」の単純な表記法で表され得る。ここでXは特定の脂肪酸中の炭素原子の総数であり、Yは二重結合の数である。例えば、炭素数20の飽和脂肪酸は「C 20 : 0」と表記され、炭素数18の一価不飽和脂肪酸は「C 18 : 1」等と表記され、アラキドン酸は「C 20 : 4, n - 6」等と表記され得る。「n -」は、脂肪酸のメチル末端から数えた二重結合の始まる位置を示し、例えば「n - 6」であれば、二重結合の始まる位置が脂肪酸のメチル末端から数えて6番目であることを示す。この方法は当業者には周知であり、この方法に従って表記された脂肪酸については、当業者であれば容易に特定することができる。

[0061] 脂肪酸は、長い脂肪族鎖を有するカルボン酸であり、それは、飽和または不飽和のどちらかである。脂肪酸は、通常は天然源由来のトリグリセリドまたはリン脂質の加水分解により産業的に製造される。一部のものは、合成により製造される。製造の方法にかかわらず、精製法が、食品、化粧品または産業的使用のための純粋な製品を得るために必要とされる。

[0062] 本明細書において用語「高度不飽和脂肪酸(P U F A)」は、1つより多くの二重結合を持つ脂肪酸を意味する。本明細書における高度不飽和脂肪酸は、エステル形態である。エステルは、典型的にはアルキルエステル、例えばC₁ - C₆アルキルエステル、又はC₁ - C₄アルキルエステルである。エステルの例としては、エチルエステルが挙げられる。

[0063] 本発明の一態様において、高度不飽和脂肪酸として、エイコサペンタエン酸、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、ジホモγ-リノレン酸、アラキドン酸、ステアリドン酸、C 18 : 3、C 19 : 4、C 20 : 4、C 21 : 5が挙げられる。本発明の一態様において、高度不飽和脂肪酸として、エイコサペンタエン酸、ジホモγ-リノレン酸、アラキドン酸が挙げられる。本発明の一態様において、第2のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分として、C 18 : 3、C 19 :

4、C 2 0 : 4、及びC 2 1 : 5 が挙げられる。第 2 のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも 1 種の成分は、目的の高度不飽和脂肪酸の類縁物質であってもよい。

[0064] 本明細書において用語「エイコサペンタエン酸 (E P A)」は、シス-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸の一般名である。この脂肪酸はC 2 0 : 5 n - 3 脂肪酸である。「E P A - E E」は、具体的にはE P A エチルエステルを指し得る。

本明細書において「ジホモ-γ-リノレン酸 (D G L A)」は、シス-8, 11, 14-エイコサトリエン酸の一般名である；この脂肪酸はC 2 0 : 3 n - 6 脂肪酸である。

本明細書において「アラキドン酸 (A R A)」は、シス-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸の一般名である；この脂肪酸はC 2 0 : 4 n - 6 脂肪酸である。

[0065] 本発明の一態様において、油脂組成物は、典型的には高度不飽和脂肪酸及び少なくとも 1 つの脂肪酸を含む。従って、より典型的には油脂組成物は高度不飽和脂肪酸並びに少なくとも 1 つの脂肪酸及び／又はそのエステルを含む。典型的な脂肪酸エステルは、上記で高度不飽和脂肪酸に対して規定されたものと同様である。好ましくは、油脂組成物は炭素数 2 0 の脂肪酸並びに脂肪酸エチルエステルの少なくとも 1 つを含む。さらに好ましくは、油脂組成物は、高度不飽和脂肪酸、並びにC 1 8 : 0 (ステアリン酸)、C 2 0 : 0 (アラキジン酸)、C 2 0 : 1 (エイコセン酸)、C 2 2 : 0 (ベヘン酸) 並びにそれらのエステルから選択された少なくとも 1 種の脂肪酸を含む。本発明の一つの態様において、第 1 のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも 1 種の成分は、上記された少なくとも 1 つの脂肪酸エステルである。

[0066] 本発明の一態様において、油脂組成物に含まれる目的物（例えば、高度不飽和脂肪酸エステル）以外の少なくとも一つの成分は、目的物より極性が低い。

- [0067] 本発明の一態様において、第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる油脂組成物は、C 1 8 : 0、C 2 0 : 0、C 2 0 : 1、C 2 2 : 0のエステルから選択される少なくとも1つの成分を、第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物に含まれる油脂組成物全体に対して0.5重量%以下、0.3重量%以下、0.1重量%以下、0.05重量%以下、0.03重量%以下又は0.01重量%以下の量で含む。
- [0068] 「カラムクロマトグラフィー」は、本明細書で使用される際、流体が微細に分割された物質および／または毛管路を有する材料で構成された固定相（単数または複数）を含有するカラムを通して流れる際の流体溶液の1種以上の構成要素の選択的な保持または遅延のプロセスを意味する。保持は、固定相およびバルク流体相（例えば移動相）の間の混合物の構成要素の相対的な分配の結果もたらされ、その後者は、固定相を通して移動する。カラムクロマトグラフィーは、2種類以上の物質の混合物の分析および分離に使用される。カラムクロマトグラフィーは、例えば、分取クロマトグラフィー、分析用クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、疑似移動床クロマトグラフィー、実移動床クロマトグラフィーおよび超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）を含む。
- [0069] 移動相または高度不飽和脂肪酸エステルを記載するための「非極性」および「極性」という用語は、互いに対する相対的な用語として使用されることができる。例えば、「非極性」は、最も極性の低い移動相中の溶媒を意味することができ、一方で「極性」は、「非極性」溶媒よりも極性の高い移動相中の溶媒を意味することができる。
- [0070] 本発明の一態様において、カラムクロマトグラフィーは、油脂組成物を、1つ以上のカラムに通過させることを含む。従って、第1のカラムクロマトグラフィーは、第1のカラムに、油脂組成物を通過させること、及び目的物である高度不飽和脂肪酸エステルより遅く溶出する（すなわち、第1のカラムにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.0超である）少なくとも1種の成分の全部ま

たは一部を除去することを含む。第1のカラムは、複数のカラムを縦列および／または並列に組合わせて用いてもよい。第2のカラムクロマトグラフィーは、第2のカラムに、第1のカラムクロマトグラフィーから得られた目的物を含む溶出液を通過させ、類縁物質の成分の全部または一部を除去して目的物を所定量で含む高度不飽和脂肪酸エステル組成物を得ることを含む。第2のカラムは、複数のカラムを縦列および／または並列に組合わせて用いてもよい。任意の既知のカラムが、請求項に係る方法において用いられ得る。

本発明の一態様において、第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液は、第1のカラムからの目的物の溶出終了時までの溶出液である。本発明の一態様において、第1のカラムクロマトグラフィーにおける、目的物以外の少なくとも1種の成分の全部または一部を除去することは、第1のカラムからの目的物の溶出終了時までの溶出液を回収することによって行う。

[0071] 第1のカラムクロマトグラフィーは第1のカラムを用いて実施される。本発明の一つの側面において、第1のカラムクロマトグラフィーは保持時間が目的物よりも長い成分の全部または一部の除去を目的として行われる。本発明の一態様において、第1のカラムクロマトグラフィーにより全部または一部を除去される成分の保持時間は、第1のカラムクロマトグラフィーにおける目的物の保持時間を1とした場合、1.5以上、1.7以上、1.8以上であるか、または1.0以下、8以下、5以下、3.5以下、3.0以下であるか、または1.5～1.0、1.7～8、1.8～5、1.8～3.5、1.8～3.0、もしくは1.8～2.5である。本発明の一態様で、第1のカラムクロマトグラフィーで少なくとも一種類の成分が一部除去される場合、99%以上、95%以上、90%以上の当該成分が除去される。

[0072] 第2のカラムクロマトグラフィーは第2のカラムを用いて実施される。本発明の一つの側面において、第2のカラムクロマトグラフィーは保持時間が目的物と近い成分の全部または一部の除去を目的として行われる。保持時間が目的物と近い成分は、本明細書において、類縁物質と呼ばれることができ

る。本発明の一態様において、第2のカラムクロマトグラフィーにより除去される成分の保持時間は、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物の保持時間を1として場合、0.8以上、0.9以上、または1.5以下、1.3以下、1.2以下もしくは1.1以下、または0.8～1.5、0.9～1.3、0.9～1.2、もしくは0.9～1.1である。本発明の一態様で、第2のカラムクロマトグラフィーで保持時間が目的物と近い成分が一部除去される場合、5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上の当該成分が除去される。

[0073] 本発明の一態様において、第1のクロマトグラフィーの溶出液のうち第2のクロマトグラフィーに付されなかった画分及び第2のクロマトグラフィーの溶出液のうち高度不飽和脂肪酸エステル組成物から除去された脂肪酸エステルを含む画分を回収して第3のカラムクロマトグラフィーに付してもよい。第3のカラムクロマトグラフィーは第3のカラムを用いて実施される。

[0074] 本発明の一態様において、第1のカラムは第1のカラムクロマトグラフィーに用いられるカラムを指し、第2のカラムは第2のカラムクロマトグラフィーに用いられるカラムを指し、第3のカラムは第3のカラムクロマトグラフィーに用いられるカラムを意味する。用いられるカラムの寸法は、特に限定されず、精製されることになる油脂組成物の体積にある程度依存するであろう。各カラムの直径は、1 mm以上、2 mm以上、4 mm以上、8 mm以上、16 mm以上、32 mm以上、64 mm以上、128 mm以上、256 mm以上もしくは500 mm以上、または4000 mm以下、2000 mm以下、1000 mm以下、500 mm以下、または1～4000 mm、2～2000 mm、4～1000 mm、8～1000 mm、16～1000 mm、32～500 mm、30～800 mm、又は400～800 mmである。本発明の一態様において、第1のカラムと第2のカラムは同一又は異なる直径を有することができる。第1及び第2のカラムの直径の比は、第1のカラムを1とした場合、第2のカラムが0.1以上、0.3以上、0.5以上、または10以下、3以下、2以下もしくは1.5以下、または0.1～10

、0.3～3、0.5～2、もしくは、0.5～1.5である。本発明の一つの態様において、直径が同じカラムを第1および第2のカラムとして使用する。本発明の一態様において、第3のカラムクロマトグラフィーを行う場合、第1のカラム～第3のカラムは、同一又は異なる直径を有することができる。第3のカラムは第1のカラム又は第2のカラムのそれぞれと同一又は異なる直径を有することができる。本発明の一態様において、第2のカラムは、第1のカラムと同じ直径を有し、第1のカラムより長さが長い。本明細書において、第1のカラムと第2のカラムが同じまたは同一の直径を有するとは、第1のカラムと第2のカラムの直径の比が0.8～1.2であること、例えば、0.9～1.1または1であることを指す。

[0075] 本発明の一つの態様において、第1および第2のカラムの断面は略円形であり、第1および第2のカラムの断面積の比は、第1のカラムを1とした場合、第2のカラムが0.1以上、0.2以上、または10以下、4以下、2以下、または0.1～10、0.2～4、もしくは0.2～2である。本発明の一つの態様において、断面積が同じカラムを第1および第2のカラムとして使用する。本発明の一態様において、第3のカラムクロマトグラフィーを行う場合、第1のカラム～第3のカラムは、同一又は異なる断面積を有することができる。第3のカラムは第1のカラム又は第2のカラムのそれぞれと同一又は異なる断面積を有することができる。

[0076] 本発明の一態様において、各カラムの長さは、5 cm以上、10 cm以上、20 cm以上、または800 cm以下、400 cm以下、200 cm以下、150 cm、120 cm以下、または5～800 cm、10～400 cm、20～200 cm、20～150 cm、もしくは20～120 cmである。本発明の一態様において、第1のカラムは第2のカラムより短い。第1および第2のカラムの長さの比は、第1のカラムを1とした場合、第2のカラムが0.5以上、1以上、1.1以上、1.5以上、または10以下、7以下、5以下、または0.5～10、1～7、1.1～5もしくは1.5～5である。本発明の一態様において、第3カラムクロマトグラフィーを行う場

合、第3カラムは第1のカラム又は第2のカラムのそれぞれと同一又は異なる長さを有することができる。本発明の一態様において、第2のカラムは、第1のカラムと同じ内径を有し、第1のカラムより長さが長い。第2のカラムは、第1のカラムと同じ内径を有し、例えば、第1のカラムの長さより1.1倍以上、1.5倍以上、または5倍以下、7倍以下、10倍以下の長さを有する。本明細書において、第1のカラムと第2のカラムが同じまたは同一の内径を有するとは、第1のカラムと第2のカラムの内径の比が0.8～1.2であること、例えば、0.9～1.1または1であることを指す。

[0077] カラムは、外径、内径および長さを有する円筒形である。ある態様において、カラムは、分取クロマトグラフィーカラムである。分取クロマトグラフィーカラムは、5 mm以上、10 mm以上、20 mm以上、50 mm以上、又は4 m以下、2 m以下、1 m以下、80 cm以下、または約5 mm～約4 m、約10 mm～約2 m、約20 mm～約1 m、もしくは、約50 mm～80 cmの内径および約100 mm～約5 m、約2 cm～約2 mまたは約10 cm～約1.5 mの長さを含むことができる。ある態様において、カラムは、分析用クロマトグラフィーカラムである。分析用カラムは、約1 mm～約10 cmの内径および約10 mm～約500 mmの長さを含むことができる。寸法は、内径が長さの約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約120%、約140%、約160%、約180%、約200%、約220%、約240%、約260%、約280%、約300%、約320%、約340%、約360%、約380%、約400%、約450%または約500%であるように選択されることができる。外径は、内径よりも約0.1%、約0.5%、約1.0%、約1.5%、約2.0%、約2.5%、約3.0%、約3.5%、約4.0%、約4.5%、約5%、約7.5%、約10%、約15%、約20%、約25%もしくは約30%大きくすることができる。

[0078] 用語「ピーク」は、本明細書で使用される際、クロマトグラム中のピークを意味する。クロマトグラムは、検出された値を経時的に示す図である。溶出物が検出された際に、検出された値は増大し、クロマトグラムは「ピーク」を示す。クロマトグラム中の各ピークは、試料中の成分の存在を示す。各ピークは、保持時間で標識され、クロマトグラム中の時間は、左から右に増加する。

「ピークトップ」は、クロマトグラム中の各ピークの検出値が最大となる点を意味する。

[0079] 「分離」は、本明細書で使用される際、相対運動における相（例えば移動相および固定相）間のそれらの分配差に基づく高度不飽和脂肪酸エステルを含む組成物の構成要素の空間的分離によって特徴付けられるプロセスを意味する。分離は、試料のカラム上への負荷および負荷後のカラムの溶出の結果もたらされる。

「分画」は、ある量の混合物が相転移の間にいくつものより小さい量に分けられる分離プロセスであり、ここで、組成は、勾配に従って変動する。異なる画分が、異なる時点で、個々の構成要素（混合物または試料内の高度不飽和脂肪酸エステル）の特定の特性、例えば固定相および／または移動相に関するその親和性における差に基づいて収集される。

[0080] 「カラムクロマトグラフィーに付す」ことは、本明細書で使用される際、高度不飽和脂肪酸エステルを含有する試料を全試料がカラム内に収容されるまでカラムに負荷することを意味する。本明細書において試料は油脂組成物である。試料は、典型的にはパッキングされたカラムの固定相のトップに負荷される。ここで、「トップ」は、移動相がカラムを通して溶出する際に最初に移動相を受け取る固定相の末端である。油脂組成物は、注入器、ポンプまたは固定相のトップへの試料の直接適用によってカラムクロマトグラフィーに付され得る。試料は、最小量の移動相もしくは負荷のための他の溶媒と混合されることができる。

[0081] 「溶出」は、本明細書で使用される際、カラムに負荷した成分がカラムを

通過して移動相の溶液として流出することを意味する。

「溶出液」(Eluent)は、本明細書で使用される際、カラムから溶出した移動相であって、カラムに負荷した油脂組成物中に含まれる成分を含みうる。一つの態様において、カラムから溶出した移動相中に油脂組成物に含まれる成分を含む溶液である。本発明の一態様において「第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液」とは、第1のカラムを通過した溶出液であって、目的物を含む溶出液を意味する。

[0082] 「溶出物」(Eluate)は、本明細書で使用される際、カラムクロマトグラフィーにおいてカラムから排出される成分を指す。本発明の一態様において、「第2のカラムクロマトグラフィーに付される溶出物」は第1のカラムクロマトグラフィーの溶出物である。

[0083] 「成分」とは、カラムクロマトグラフィーに付される油脂組成物中に含まれる成分であって、高度不飽和脂肪酸エステル及び脂肪酸エステルを含む。本発明の一態様において、「第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分」とは、目的物である高度不飽和脂肪酸エステルよりも保持時間が長い脂肪酸エステル、例えば、C22:0、C20:0、C18:0及びC20:1のいずれかのエステルであることができる。また、「第2のカラムクロマトグラフィーにおける少なくとも1種の成分」とは、油脂組成物から得られた高度不飽和脂肪酸エステル組成物に含まれる、目的の高度不飽和脂肪酸エステル以外の成分であり、ステアリン酸、C19:4、C21:5、C20:4及びC18:3のいずれかのエステルであることができる。

[0084] 本発明の一態様において、「第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分」と「第2のカラムクロマトグラフィーにおける少なくとも1種の成分」は、違ってよい。本発明の一態様において、「第2のカラムクロマトグラフィーにおける少なくとも1種の成分」は「第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分」と同じ成分を含んでもよい。

- [0085] 「ビフェニル」、「C 3 0」、「C 2 2」、「C 1 8」、「C 8」、「C 5」、「C 4」は、本明細書で使用される際、カラムパッキング材料（固定相）上に存在する官能基を意味する。例えば、ビフェニルカラムは、カラムを通して流れる材料を非置換ビフェニル基に曝露し、一方でC 1 8カラムは、カラムを通して流れる材料（例えば移動相および成分）を非置換の直鎖または分枝鎖1 8－炭素アルキル基に曝露する。
- [0086] 「クロマトグラフィー条件」は、カラムクロマトグラフィーが運転されるパラメーターを意味する。例として、パッキング圧、移動相および固定相の組成、スラリー濃度、カラムが運転される圧力、カラム温度、移動相温度、移動相勾配、移動相流速、使用されるカラムタイプ、使用される検出計装およびパラメーター、利用される試料調製プロトコル、沈降時間および沈降が実施される圧力、静置時間および静置が実施される圧力を含む。
- [0087] 「勾配」は、カラムクロマトグラフィーが実施される間の時間の経過に伴う移動相組成における変化を意味する。溶媒がカラムを通して溶出されている間に移動相の組成が変化し得る。溶出の間に経時的に増加する百分率で異なる移動相を添加することができる。
- [0088] 「純度」は、組成物の主成分の含有量を示す比率であり、例えば、内部標準を用いてガスクロマトグラフィー（GC）の測定結果より算出することができる。本明細書の一態様において、主成分は高度不飽和脂肪酸エステル、例えば、E P Aエステル、D G L Aエステル、又はA R Aエステルである。
- [0089] 「目的物」は、溶出および分画によって得られた単一の画分または複数の画分の組み合わせから得られた目的の高度不飽和脂肪酸エステル、例えば、E P Aエステル、D G L Aエステル、又はA R Aエステルを意味する。
- [0090] 本発明の一態様において、濃縮は、目的の高度不飽和脂肪酸エステルを含む溶離液を、減圧および／または加熱して、蒸留により溶媒として回収することを含む。本発明の一態様において、濃縮はエバポレーターを用いて行われる。エバポレーターとしては、溶離液蒸発器および／または薄膜蒸発器が挙げられる。濃縮で任意のタイプのエバポレーターを用いることができるが

、例えば、薄膜蒸発器、単一蒸発装置、多重効用蒸発装置、多室蒸発装置、自然循環型エバポレーター、強制循環型エバポレーター、薄膜流下型エバポレーター、薄膜上昇型エバポレーター、および、これらの組合せを用いることができる。本発明の一側面において、自然循環型エバポレーターの方式としては、例えば、外部加熱方式、カランドリア方式が挙げられる。

[0091] 特定の範囲が、本明細書において、用語「約」により先行されている数値により与えられている。用語「約」は、それが先行する正確な数ならびにその用語が先行する数に近いかまたはおおよそその数である数に関する文言上の支持を提供するために本明細書で使用される。ある数が具体的に記載された数に近いかまたはおおよそその数であるかどうかの決定において、記載された数に近いかまたはそれに接近する記載されていない数は、それが与えられている文脈において具体的に記載された数の実質的な均等量を提供する数であることができる。ある態様において、約は、それが言及する数の $\pm 5\%$ 、 $\pm 2.5\%$ 、または $\pm 1\%$ を指し得る。

[0092] 本明細書と対応する英文明細書において、用語「a」、「an」、および「the」および成分の記載の文脈における同様の指示語は、特に請求項の文脈において、他の限定がない限りまたは文脈によって否定されない限り、単数および複数の両方を包含するものと解釈される。

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者により一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書において記載された方法および材料と類似した、または均等なあらゆる方法および材料も、本発明の実施または試験において使用されることができ、代表的な例示的方法および材料が、ここで記載される。

[0093] 値の範囲が提供されている場合、その範囲の上限～下限の間にあるそれぞれの値（文脈が明確にそうではないことを指示しない限り、下限の単位の10分の1まで）およびその記載された範囲中のあらゆる他の記載された値または間にある値は、本発明の範囲内に包含されることは、理解されている。

これらのより小さい範囲の上限および下限は、独立してより小さい範囲に含まれることができ、それも本発明の範囲内に包含されあらゆる具体的に除外された限界の対象となる方または両方を含む場合、それらの含まれる限界のどちらかまたは両方を除外する範囲も、本発明に含まれる。

[0094] 本発明は、記載された特定の態様に（そのようなものは当然変動し得るため）限定されない。本発明の範囲は添付された特許請求の範囲のみによって限定されると考えられるため、本明細書で用いられる用語法は特定の態様を記載する目的のためだけのものであり、限定することは意図されていないことも、理解されるべきである。

[0095] 本発明の一態様において、油脂組成物から高度不飽和脂肪酸エステル組成物を製造する方法は、第1のカラムクロマトグラフィーを実施する前に、油脂組成物を、第1のカラムを使用するカラムクロマトグラフィーに付して、目的物のピークトップの保持時間を確認することを含む。

本発明の一態様において、第1のカラムクロマトグラフィーで目的物である高度不飽和脂肪酸よりピークトップの保持時間が遅い少なくとも1種の成分の全部または一部が除去される。

「保持時間」とは、成分がカラムに注入された後にカラム内で過ごす時間を示す。典型的には保持時間はピークトップがクロマトグラムに出現する時間を示す。

[0096] 本明細書において、「目的物である高度不飽和脂肪酸のピークトップの保持時間」とは第1及び第2のクロマトグラフィーのクロマトグラムにおいて、目的物が示すピークトップにおける保持時間を意味する。

本発明の一態様において、保持時間の測定結果に基づいて「相対保持時間（ RRT ）」（「相対値」「保持時間の相対値」と互いに置換して使用し得る）を算出することができる。「相対保持時間」は、目的物の保持時間に対する成分の保持時間の関係を示す。

本明細書において、「ピークトップの保持時間の相対値」とは第1及び第2のクロマトグラフィーのクロマトグラムにおいて、目的物が示すピークト

ップにおける保持時間を1とした場合に、目的物以外の成分が示すピークトップの保持時間を目的物のピークトップの保持時間で割った値を意味する。

[0097] [数1]

$$RRT = \frac{\text{成分の保持時間}}{\text{目的物の保持時間}}$$

「保持時間の相対値」が所定の数値以上の溶出液とは、「保持時間の相対値」が当該数値となる時間以後に回収される溶出液を意味する。また、「保持時間の相対値」が所定の数値以下の溶出液とは、「保持時間の相対値」が当該数値となる時間以前に回収した溶出液を意味する。

[0098] 本発明の一態様において、ピークトップの保持時間は、UV検出器で測定することによって決定されることができる。

[0099] 本発明の一態様において、ピークトップの保持時間は、各分画をガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析で測定することによって決定されることができる。

[0100] 本明細書において「1回のカラムクロマトグラフィー」とは、油脂組成物のバッチを1個以上のカラムに通して、目的物を所定の濃度で含む高度不飽和脂肪酸エステル組成物を得る処理を意味する。1回のカラムクロマトグラフィーでは油脂組成物のバッチを1又は2個のカラムに通すことができる。1回のカラムクロマトグラフィーで油脂組成物のバッチを2個のカラムに通す場合、2個のカラムは第1のカラム及び第2のカラムと呼ばれ、直列に繋がれている。1回のカラムクロマトグラフィーで2個のカラムを使用する場合、第1のカラムからの溶出液の一部は、第2のカラムに注入されることなく排出される。本発明の一態様において、第1のカラム及び第2のカラムは、第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入されるように連通可能である。本発明の一態様において「第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入される」とは、第1のカラムからの溶出液に対して第2のカラムに注入することができることを意味する。一態様において、溶出液は濃縮等の処

理をせずに直接第2のカラムに付すことができる。本発明の一態様において、連通可能とは、第1のカラム及び第2のカラムが連通した状態から連通しない状態、またはその逆に切り替え可能であることを意味する。

[0101] 本発明の一態様において、「第1のカラムからの溶出液を排出」とは、第1のカラムからの溶出液を第2のカラムに注入せずに不要物として排出することを意味する。本発明の一態様において、保持時間の相対値が3.5以上は、第1のカラムは第2のカラムと連通されていないことによって第1のカラムからの溶出液は排出される。本発明の一態様において、第1のカラムからの排出された溶出液は第3のカラムに注入することができる。

[0102] 本発明の一態様において「1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔」とは、単一又は2個以上のカラムを使用したカラムクロマトグラフィーにおいて、油脂組成物を第1又は第2のカラムに1回負荷した時間から、再度同一のカラムに油脂組成物の負荷（例えば、2回目の負荷）を開始できるまでの時間を意味する。この場合において、同一カラムへの油脂組成物の再度の負荷は、1回のカラムクロマトグラフィーにおける最後の成分の溶出が完了した後に再度負荷された油脂組成物中の目的物の溶出が開始するように時間間隔をあけて開始される。本発明の一態様において、「1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔」は、第1又は第2のカラムにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分の溶出が完了するまでの時間として計算または測定される。本発明の一態様において、「1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔」は、油脂組成物を第1のカラムクロマトグラフィーに付した時点から目的物が第1のカラムから溶出し終わるまでの時間と第2のカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が第2のカラムから排出され終わるまでの時間との合計の時間として計算される。本発明の一つの側面において、第1のカラム及び第2のカラムが使用され、最後の成分は第1のカラム

又は第2のカラムから溶出する。本発明の一つの態様において、「1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔」は、第1のカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が第1のカラムから排出され終わるまでの時間と等しい時間である。本発明の別の態様において、「1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔」は、油脂組成物を第1のカラムクロマトグラフィーに付した時点から目的物が第1のカラムから溶出し終わるまでの時間と第2のカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が第2のカラムから排出され終わるまでの時間との合計の時間、または第2のカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が第2のカラムから排出され終わるまでの時間と等しい時間である。本発明の一態様において、第1のカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が第1のカラムから排出され終わるまでの時間は、第1と第2のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムによるカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が排出され終わるまでの時間より短い。本発明の一態様において、油脂組成物を第1のカラムクロマトグラフィーに付した時点から目的物が第1のカラムから溶出し終わるまでの時間と第1のカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が第1のカラムから排出され終わるまでの時間との合計の時間、または第2のカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が第2のカラムから排出され終わるまでの時間は、第1と第2のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムによるカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が排出され終わるまでの時間より短い。また、本発明の別の態様において、第1のカラムにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分の溶出が完了するまでの時間は、第2のカラムのみによるカラムクロマトグラフィーにおいて、第2のカラムにおける目的

物の溶出が開始した時点から最後の成分の溶出が完了するまでの時間より短い。また、本発明の別の態様において、油脂組成物を第1のカラムクロマトグラフィーに付した時点から目的物が第1のカラムから溶出し終わるまでの時間と第2のカラムクロマトグラフィーにおいて目的物の溶出が開始した時点から最後の成分が第2のカラムから排出され終わるまでの時間との合計の時間までの時間は、第2のカラムのみによるカラムクロマトグラフィーにおいて、第2のカラムにおける目的物の溶出が開始した時点から最後の成分の溶出が完了するまでの時間より短い。

[0103] 本明細書において、「第1及び第2のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラム」は、例えば、第1および／または第2のカラムと同じ内径、および固定相を有する単一のカラムを意味する。一つの態様において、第1と第2のカラムの長さの合計と等しい長さの単一カラムは、第2のカラムと同じ内径、および固定相を有し、流路方向の長さが第1と第2のカラムの長さの合計と等しい長さである単一のカラムを意味する。

[0104] 本発明の一態様において、カラムクロマトグラフィーとしては、逆相カラムクロマトグラフィーが適している。固定相として逆相分配系の吸着剤であれば特に指定なく用いることができ、例えば、DVB（ジビニルベンゼン）と網状化したポリスチレン等のポリマービーズ、又はC4又はC8又はC18のアルキル基が結合したシリカゲル、特にオクタデシルシリル（ODS）を用いたODSカラムである。各クロマトグラフィーカラムは、同一又は異なる吸着剤を含み得る。典型的には、第1のカラム及び第2のカラムは、同一又は異なる吸着剤を含み得る。本発明の一態様において、第1のカラム及び第2のカラムは、同一の吸着剤を含む。本発明の一態様において、第3のカラムクロマトグラフィーを行う場合、第3のカラムは第1のカラム又は第2のカラムのそれぞれと同一又は異なる吸着剤を用いることができる。

[0105] 固定相は、C30、C22、C18、C8、C4、ビフェニル、フルオロフェニル、親水性相互作用液体クロマトグラフィー（HILIC）固定相、アクリルアミド、シリカ、フェニルヘキシル固定相、極性包埋アルキル、フ

ルオロフェニルプロピルまたはクロマトグラフィーの技術分野で知られているあらゆる固定相から選択されることができる。

ある態様において、キラル固定相が、使用される。固定相の選択は、当業者には明らかであり、クロマトグラフィーによって精製されるべき成分に依存し得る。非極性成分、例えば高度不飽和脂肪酸エステルは、逆相固定相、例えばC18（ODS）の使用を必要とし得る。完全にエンドキャップされたもの、部分的にエンドキャップされたものおよび塩基不活性化されたものを含め、様々な異なる種類のオクタデシルシリカ（ODS）が、使用されることができる。より極性の高い成分は、非結合シリカ、アミノ相またはシアノ相のような順相の固定相を必要とし得る。

[0106] ある態様において、固定相は、 $1\ \mu\text{m}$ 以上、 $20\ \mu\text{m}$ 以上、 $40\ \mu\text{m}$ 以上、 $60\ \mu\text{m}$ 以上、 $80\ \mu\text{m}$ 以上、 $100\ \mu\text{m}$ 以上、 $1000\ \mu\text{m}$ 以上、 $2000\ \mu\text{m}$ 以上、 $3000\ \mu\text{m}$ 以上、 $4000\ \mu\text{m}$ 以上、または $20\ \mu\text{m}$ 以下、 $40\ \mu\text{m}$ 以下、 $60\ \mu\text{m}$ 以下、 $80\ \mu\text{m}$ 以下、 $100\ \mu\text{m}$ 以下、 $1000\ \mu\text{m}$ 以下、 $2000\ \mu\text{m}$ 以下、 $3000\ \mu\text{m}$ 以下、 $4000\ \mu\text{m}$ 以下、 $5000\ \mu\text{m}$ 以下、または約 $1\ \mu\text{m}$ ～約 $20\ \mu\text{m}$ 、約 $20\ \mu\text{m}$ ～約 $40\ \mu\text{m}$ 、約 $40\ \mu\text{m}$ ～約 $60\ \mu\text{m}$ 、約 $60\ \mu\text{m}$ ～約 $80\ \mu\text{m}$ 、約 $80\ \mu\text{m}$ ～約 $1000\ \mu\text{m}$ 、約 $1000\ \mu\text{m}$ ～約 $2000\ \mu\text{m}$ 、約 $2000\ \mu\text{m}$ ～約 $3000\ \mu\text{m}$ 、約 $3000\ \mu\text{m}$ ～約 $4000\ \mu\text{m}$ 、約 $4000\ \mu\text{m}$ ～約 $5000\ \mu\text{m}$ の粒径の中央値を有する粒子を含む。ある態様において、固定相は、 $50\ \mu\text{m}$ より大きい、 $45\ \mu\text{m}$ より大きい、 $40\ \mu\text{m}$ より大きい、 $35\ \mu\text{m}$ より大きい、 $30\ \mu\text{m}$ より大きい、 $25\ \mu\text{m}$ より大きい、 $20\ \mu\text{m}$ より大きい、 $15\ \mu\text{m}$ より大きい、もしくは $10\ \mu\text{m}$ より大きい、かつ／または $5000\ \mu\text{m}$ 未満、 $4000\ \mu\text{m}$ 未満、 $3000\ \mu\text{m}$ 未満、 $2000\ \mu\text{m}$ 未満、 $1000\ \mu\text{m}$ 未満、 $500\ \mu\text{m}$ 未満、 $100\ \mu\text{m}$ 未満、 $80\ \mu\text{m}$ 未満、 $60\ \mu\text{m}$ 未満、または $10\ \mu\text{m}$ ～ $5000\ \mu\text{m}$ 、 $15\ \mu\text{m}$ ～ $4000\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ ～ $3000\ \mu\text{m}$ 、 $25\ \mu\text{m}$ ～ $2000\ \mu\text{m}$ 、 $30\ \mu\text{m}$ ～ $1000\ \mu\text{m}$ 、 $35\ \mu\text{m}$ ～ $500\ \mu\text{m}$ 、 $40\ \mu\text{m}$ ～ $100\ \mu\text{m}$ 、 $45\ \mu\text{m}$ ～ $80\ \mu\text{m}$ 、 $50\ \mu\text{m}$ ～ 60

μm の粒径の中央値を有する粒子を含む。粒径の中央値は、当業者により理解されるように、レーザー回折散乱法によって測定されることができる。

[0107] 本発明の一態様において、固定相は、第1のカラム及び第2のカラムにおいて同一または異なる固定相を用いることができる。異なる固定相を用いる場合、第1のカラムでは、例えば、DVB（ジビニルベンゼン）と網状化したポリスチレン、C8アルキル基、又はオクタデシルシリル（ODS）と結合したシリカゲルを用いることができ、第2のカラムでは、DVB（ジビニルベンゼン）と網状化したポリスチレン、アルキル基、又はオクタデシルシリル（ODS）と結合したシリカゲルから選択される、第1のカラムの固定相と異なる固定相を用いることができる。本発明の一態様において、第3のカラムクロマトグラフィーを行う場合、第3のカラムは第1のカラム又は第2のカラムのそれぞれと同一又は異なる固定相を用いることができる。

[0108] また、第1のカラム、および第2のカラムにおいて同一または異なる粒径の中央値を有する粒子を含む固定相を用いることができる。異なる粒径の中央値を有する粒子を含む固定相を用いる場合、第1のカラムでは、例えば、 $1\mu\text{m}$ 以上、 $20\mu\text{m}$ 以上、 $40\mu\text{m}$ 以上、 $60\mu\text{m}$ 以上、 $80\mu\text{m}$ 以上、 $1000\mu\text{m}$ 以上、 $2000\mu\text{m}$ 以上、 $3000\mu\text{m}$ 以上、 $4000\mu\text{m}$ 以上、または $20\mu\text{m}$ 以下、 $40\mu\text{m}$ 以下、 $60\mu\text{m}$ 以下、 $80\mu\text{m}$ 以下、 $1000\mu\text{m}$ 以下、 $2000\mu\text{m}$ 以下、 $3000\mu\text{m}$ 以下、 $4000\mu\text{m}$ 以下、 $5000\mu\text{m}$ 以下、または約 $1\mu\text{m}$ ～約 $20\mu\text{m}$ 、約 $20\mu\text{m}$ ～約 $40\mu\text{m}$ 、約 $40\mu\text{m}$ ～約 $60\mu\text{m}$ 、約 $60\mu\text{m}$ ～約 $80\mu\text{m}$ 、約 $80\mu\text{m}$ ～約 $1000\mu\text{m}$ 、約 $1000\mu\text{m}$ ～約 $2000\mu\text{m}$ 、約 $2000\mu\text{m}$ ～約 $3000\mu\text{m}$ 、約 $3000\mu\text{m}$ ～約 $4000\mu\text{m}$ 、約 $4000\mu\text{m}$ ～約 $5000\mu\text{m}$ の粒径の中央値を有する粒子を含む固定相を用いることができ、第2のカラムでは、 $1\mu\text{m}$ 以上、 $20\mu\text{m}$ 以上、 $40\mu\text{m}$ 以上、 $60\mu\text{m}$ 以上、 $80\mu\text{m}$ 以上、 $1000\mu\text{m}$ 以上、 $2000\mu\text{m}$ 以上、 $3000\mu\text{m}$ 以上、 $4000\mu\text{m}$ 以上、または $20\mu\text{m}$ 以下、 $40\mu\text{m}$ 以下、 $60\mu\text{m}$ 以下、 $80\mu\text{m}$ 以下、 $1000\mu\text{m}$ 以下、 $2000\mu\text{m}$ 以下、 $3000\mu\text{m}$ 以下、 $4000\mu\text{m}$ 以下、

0 μm 以下、5 0 0 0 μm 以下、または約 1 μm ～約 2 0 μm 、約 2 0 μm ～約 4 0 μm 、約 4 0 μm ～約 6 0 μm 、約 6 0 μm ～約 8 0 μm 、約 8 0 μm ～約 1 0 0 0 μm 、約 1 0 0 0 μm ～約 2 0 0 0 μm 、約 2 0 0 0 μm ～約 3 0 0 0 μm 、約 3 0 0 0 μm ～約 4 0 0 0 μm 、約 4 0 0 0 μm ～約 5 0 0 0 μm から選択される粒径の中央値を有する粒子を含む、第 1 のカラムの固定相と異なる固定相を用いることができる。本発明の一態様において、第 3 のカラムクロマトグラフィーを行う場合、第 3 のカラムは第 1 のカラム又は第 2 のカラムのそれぞれと同一又は異なる粒径の中央値を有する粒子を含む固定相を用いることができる。

[0109] 本発明の一態様において、充填された固定相の量は重量で、1 ～1 0 0 0 k g、1 0 ～9 0 0 k g、2 0 ～8 0 0 k g、3 0 ～7 0 0 k g、4 0 ～6 0 0 k g 又は 5 0 ～5 0 0 k g である。本発明の一態様において、第 1 のカラムの固定相と第 2 のカラムの固定相の量は同一でも異なってもよい。充填された固定相の量が異なる場合、第 1 のカラムの固定相の量は、例えば、1 ～1 0 0 k g、1 0 ～1 0 0 k g、3 0 ～1 0 0 k g である。また、第 2 のカラムの固定相の量は、例えば、1 ～1 0 0 0 k g、1 0 ～8 0 0 g、5 0 ～8 0 0 g である。第 1 及び第 2 のカラムの固定相の量の比は、第 1 のカラムを 1 とした場合、第 2 のカラムが 0. 5 ～1 0、1 ～7、1、1 ～5、2 ～4、5 である。本発明の一態様において、第 3 のカラムクロマトグラフィーを行う場合、第 3 のカラムは第 1 のカラム又は第 2 のカラムのそれぞれと同一又は異なる量の固定相が充填されてもよい。

本発明の一態様において、第 2 のカラムに充填された固定相の量は、第 1 のカラムに充填された固定相の量より多い。第 2 のカラムに充填された固定相の量は、第 1 のカラムに充填された固定相の量に対して、1. 1 倍以上、1. 5 倍以上、2 倍以上、2. 5 倍以上、3 倍以上、3. 5 倍以上、または 4 倍以下、4. 5 倍以下、5 倍以下、6 倍以下、7 倍以下、1 0 倍以下である。

[0110] 本発明の一態様において、カラムクロマトグラフィーが水、有機溶媒また

は超臨界二酸化炭素の1以上を含む移動相を用いる溶出を含む。これらの方法の一部の態様において、移動相は、メタノールを含む。これらの方法の一部の態様において、クロマトグラフィーは、ギ酸、ギ酸アンモニウム、トリメチルアミン、アンモニアおよび水酸化アンモニウムの1以上から選択される添加剤を含む移動相を含む。

[0111] 本発明の一態様において、移動相として用いられる溶媒は有機溶媒であり、アルコール、エーテル、エステル、ケトン、ニトリル、ヘキサン類及びジクロロメタンから選択される。アルコールの例として、メタノール、エタノール、*n*-プロパノール、*i*-プロパノール、*n*-ブタノール、*i*-ブタノール、*s*-ブタノール及び*t*-ブタノールが挙げられる。メタノール及びエタノールが好適である。メタノールがより好適である。エーテルの例として、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、及びメチル*t*-ブチルエーテル(MTB E)が挙げられる。エステルの例として、酢酸メチルエステル及び酢酸エチルエステルが挙げられる。ケトンの例として、アセトン、メチルエチルケトン及びメチルイソブチルケトン(MIBK)が挙げられる。ニトリルの例として、アセトニトリルが挙げられる。

[0112] 本発明の一態様において、移動相は、第1及び第2のカラムクロマトグラフィーにおいて同一でも異なってもよいが、好ましくは同一である。異なる移動相を用いる場合、第1のカラムクロマトグラフィーでは、例えば、メタノール、エタノール、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、メチル*t*-ブチルエーテル、酢酸メチル、酢酸エチル、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン(MIBK)、アセトニトリル、ヘキサン類及びジクロロメタンを用いることができ、第2のカラムでは、メタノール、エタノール、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、メチル*t*-ブチルエーテル、酢酸メチル、酢酸エチル、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン(MIBK)、アセトニトリル、ヘキサン類及びジクロロメタンから選択される、第1のカラムの移動相と異なる移動相を用いることができる。本発明の一態様において、第3のカラムクロマトグラフ

ィーを行う場合、第3のカラムは第1のカラム又は第2のカラムのそれぞれと同一又は異なる移動相を用いることができる。

[0113] 移動相は、さらに、緩衝剤およびpH調整剤を含む添加剤を含むことができる。添加剤の選択は、使用される移動相、使用される固定相および精製されるべき成分に基づいて決定され得る。一部の態様において、移動相は、ギ酸、トリフルオロ酢酸、ヘプタフルオロ酪酸、ギ酸アンモニウム、トリメチルアミン、アンモニアおよび水酸化アンモニウムの1以上から選択される添加剤を含む。一部の態様において、移動相は添加剤を含まなくても良い。

[0114] 本発明の一態様において、カラムクロマトグラフィーは、移動相勾配を含む。本発明の一態様において、カラムクロマトグラフィーは、1種以上の高度不飽和脂肪酸エステルの精製を含む。本発明の一態様において、高度不飽和脂肪酸エステルは、ドコサヘキサエン酸、クロトン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エイコセン酸、エルカ酸、ネルボン酸、リノール酸、エイコサジエン酸、ドコサジエン酸、リノレン酸、ピノレン酸、エレオステアリン酸、ミード酸、ジホモγーリノレン酸、エイコサトリエン酸、ステアリン酸、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、アドレン酸、ボセオペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、オズボンド酸 (ozubondo acid)、イワシ酸 (sardine acid)、テトラコサペンタエン酸 (tetracosapentaenoic acid)、ニシン酸 (herring acid)、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、カプロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデシル酸、ラウリン酸、トリデシル酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ノナデシル酸、アラキジン酸、ヘンイコシル酸、ベヘン酸、トリコシル酸、リグノセリン酸、ペンタコシル酸、セロチン酸、カルボセリン酸 (carboceric acid)、モンタン酸、ノナコシル酸 (nonacosylic acid)、メリシン酸、ヘントリアコンチル酸、ラッセル酸 (lacceroic acid)、シリル酸 (psyll

ic acid)、ゲディック酸(gedd ic acid)、セロプラスチック酸、ヘキサトリアコンチル酸、ヘプタトリアコンチル酸(hept a triaconty lic acid)、オクタトリアコンチル酸(oct a triaconty lic acid)、ノナトリアコンチル酸(non a triaconty lic acid)およびテトラコンチル酸(tet raconty lic acid)の1以上から選択される高度不飽和脂肪酸のエステルである。本発明の一態様において、エステルは、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニルまたはデシルエステルである。本発明の一態様において、カラムクロマトグラフィは、エイコサペンタエン酸エチルエステルの精製を含む。

[0115] 一部の態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、約50%以上、約60%以上、約70%以上、約80%以上、約85%以上、約86%以上、約90%以上、約95%以上、約96.5%以上、約98%以上、約99%以上、約99.5%以上、約99.8%以上、もしくは約99.9%以上、かつ／または約97%未満、約98%未満、約99.0%未満、約99.95%未満、約99.99%未満の純度で目的の高度不飽和脂肪酸エステルを含有する。一部の態様において、歩留まりは、1%以上、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、かつ／または75%未満、80%未満、85%未満、90%未満もしくは95%未満である。一部の態様において、回収率は、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、もしくは99.7%以上、かつ／または95%未満、97%未満、98%未満、99%未満、99.5%未満、99.7%未満もしくは99.9%未満である。

[0116] 移動相は、水、メタノール、エタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ヘキサン類、ジクロロメタン、超臨界二酸化炭素または当該技術で既知のあ

らゆる他の溶媒の1以上を含むことができる。移動相の選択は、精製されるべき高度不飽和脂肪酸エステルおよび使用される固定相の考慮を必要とし得る。非極性高度不飽和脂肪酸エステルに対する逆相固定相において、対象の高度不飽和脂肪酸エステルを溶出するには十分であるが溶出が溶媒先端に近づくほど速すぎないような極性移動相が、選択されるべきである。

[0117] ある態様において、溶媒勾配が、溶出の間に移動相として使用されることができる。勾配溶出の主な目的は、溶出された分析種が検出時に十分に分離したピークを生成するように、カラムに強く保持されている分析種をより速く溶出する一方で弱く保持されている分析種をよりゆっくりと溶出させることである。例えば、逆相クロマトグラフィーでは、溶出液中の非極性溶媒を低い含有量で開始することは、弱く保持された分析種が分離されることを可能にする。強く保持された分析種は、カラムのトップの吸着剤表面上に残るか、または非常にゆっくりと移動するであろう。溶出液中の非極性構成要素（例えばアセトニトリル）の量を増やすことは、非極性溶媒による吸着部位に対する競合の着実な増大のため、強く保持された構成要素がより速く移動することを可能にする。

[0118] 従って、非極性高度不飽和脂肪酸エステルに対して用いられる逆相クロマトグラフィーでは、クロマトグラフィーにおける溶出の開始時の溶媒は、約100%、約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%または約0%から選択される高い百分率の極性溶媒A、例えば水を含み得る。溶媒Bは、溶媒Aよりも非極性の溶媒、例えばメタノール（溶媒Aが水である場合）であることができる。溶媒Bは、移動相の残りの百分率を構成するであろう。カラムが運転され、溶媒が固定相およびカラムを通して溶出される際に、勾配は、結果として時間の経過に伴う溶媒Bの濃度における漸増をもたらすであろう。一部の態様において、単一組成の溶媒が移動相として使用されることもできる。一部の態様において、単一組成の溶媒は、水、メタノール、エタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、ヘキサン類、ジクロロメタン、超臨界二酸化炭素または当該技

術で既知のあらゆる他の溶媒の1つまたはそれ以上が単独または混合して使用されることができる。

[0119] ある態様において、経時的な溶媒Bの増加率は、一定であることができる。ある態様において、勾配は存在せず、移動相は、溶出の間定組成である。ある態様において、クロマトグラフィー法内の異なる時間範囲における溶媒Bの百分率の異なる増加率が、利用されることができる。ある態様において、移動相は、クロマトグラフィー法の特定の時間範囲の間、定組成であることができ、他の時間範囲では、勾配を含む。

[0120] ある態様において、第1のカラムクロマトグラフィー及び第2のカラムクロマトグラフィーはともに定組成であるか、ともに勾配を含むか、ともに特定の時間範囲では定組成で他の時間範囲では勾配を含むことができる。ある態様において、第1のカラムクロマトグラフィーは定組成で、第2のカラムクロマトグラフィーは勾配を含むことができ、又は第1のカラムクロマトグラフィーは勾配を含み、第1のカラムクロマトグラフィーは定組成であることができる。ある態様において、第3のカラムクロマトグラフィーを含む場合、第3のカラムクロマトグラフィーは定組成であるか、勾配を含むことができる。

[0121] 移動相において使用される複数の溶媒は、移動相供給部に別々に貯蔵され、カラムを通した溶出の前にポンプを使用して混合されることができる。移動相供給部は、移動相源および溶媒送達システムを含む。そのような溶媒送達システムは、ポンプデバイス、例えば商業的に入手可能なカラムクロマトグラフィー用ポンプであり、それは、溶媒または移動相をカラムに提供する。そのようなポンプは、一般にパルスフリーな流れ、0.1~100L/分の範囲の流速、流速の正確な制御、高圧（6000psi以下）の生成ならびに耐腐食性かつ耐溶剤性の構成要素を提供する。往復ポンプは、小さいチャンバーからなり、その中に溶媒がモーター駆動ピストンの前後運動によってポンプ注入される。交互に開閉する2つの逆止弁が、シリンダを出入りする溶媒の方向および流れを制御する。シングルピストンポンプは、特別に設

計されたカムを使用して非常に迅速な補充時間を可能にし、より連続的な流れを生み出す。往復ポンプによるパルス化された流れの欠点は、パルスダンパーを用いることによってしばしば克服される。互いに位相を異にして動くピストンで作動するデュアルピストンポンプの使用は、パルスフリーの流体送達のための合理的な解決策を与える。カラムにおける線速度は流体がカラム断面を通過する速度を表す。線速度（線速度（m／時間）＝流量（m³／時間）／カラム断面積（m²））は、約0.2～20.0 m／時間、約1.0～15.0 m／時間、約1.0～10.0 m／時間、約1.5～10.0 m／時間または約2.0～9.0 m／時間であることができる。一態様において、線速度は約4.0～9.0 m／時間である。

[0122] 本発明の一態様において、第1のカラムまたは第2のカラムにおける線速度は同一でも異なってもよい。線速度が異なる場合、第1のカラムにおける線速度は、第2のカラムにおける線速度より速くても遅くてもよい。第1及び第2のカラムにおける線速度の比は、第1のカラムを1とした場合、第2のカラムにおいては0.5～2.0、0.5～1.5、又は1～1.5である。本発明の一態様において第1のカラム及び第2のカラムにおける線速度は同じである。本発明の一態様において、第3のカラムクロマトグラフィーを行う場合、第3のカラムは第1のカラム又は第2のカラムのそれぞれと同一又は異なる線速度で行うことができる。

[0123] 本発明の一態様において、カラムクロマトグラフィーは室温、又は室温より高い温度で実行される。好ましくは、方法は室温より高い温度で実行される。第1及び第2のカラムクロマトグラフィーは、同じ温度、又は異なる温度で実行され得るが、好ましくは同じ温度である。

[0124] 本発明の一態様において、室温より高い温度は、20℃以上、25℃以上、30℃以上、35℃以上、または60℃以下、55℃以下、50℃以下、45℃以下、または20～60℃、25～55℃、30～50℃、又は35～45℃である。

[0125] 本発明の一態様において、カラムクロマトグラフィーは2以上のカラムが

用いられ得る。カラムクロマトグラフィーは、既知の固定床クロマトグラフィー装置を用いて実行され得る。このようなカラムクロマトグラフィーは、固定床クロマトグラフィーと呼ばれる。本発明の一態様において、第1及び第2のカラムクロマトグラフィーは、固定床クロマトグラフィーである。

[0126] 一部の態様において、検出器は、カラムから溶出する移動相を成分（単数または複数）の存在に関してモニターするために使用される。当該技術で既知の検出法（例えば質量分析（MS）、UV/VIS吸光度、蛍光、屈折率または伝導率）が、使用され得る。

[0127] 他の態様において、カラムからの溶出直後の溶出物の検出のために様々な標準的なカラムクロマトグラフィー用検出器のいずれかを使用することができる。

他の態様において、各分画をそれぞれ分析により成分の存在に関してモニターすることができる。一部の態様において、分析はガスクロマトグラフィーを用いた脂肪酸分析である。

[0128] 一部の態様において、カラムからの溶出物は、クロマトグラムにおけるピークとして検出される。ピークの保持時間は、化合物を同定するために使用され、ピークの高さ（または面積）は、油脂組成物中の溶出物の量に比例する。「保持時間」は、溶出物がカラムを通過するために必要とされる時間であり、油脂組成物の注入（または負荷）の時点から溶出の時点まで測定される。理想的には、対象の各溶出物は、特徴的な保持時間を有するであろう。しかし、溶出物の保持は、溶出液、固定相、温度およびカラムクロマトグラフィーの設定条件が変動すると異なる。従って、溶出物の保持時間は、同一条件下で1以上の標準化合物の保持時間と比較される。適切な検出器は、良好な感度、良好な安定性、再現性、数桁にわたる大きさの、定量目的のために使用される場合の線形応答、短い応答時間および操作の容易さを示す。そのような検出器は、UV/VIS吸光度検出器、フォトダイオードアレイ検出器、蛍光検出器、屈折率検出器および伝導率検出器を含むが、それらに限定されない。

- [0129] 格子光学系を有する走査型分光光度計からなるUV/Vis吸光度検出器が、使用されることができる。重水素源（紫外範囲、190～360nm）のタングステン源（可視範囲、360～800nm）との独立した、または組み合わせられた使用は、吸光種がカラムから出てきた時にその検出をする簡単な手段を提供する。
- [0130] フォトダイオードアレイ（PDA）ベースの機器は、選択されたスペクトル範囲にわたるデータの非常に迅速な収集を可能にする紫外／可視吸光度検出器である。各クロマトグラフィーピークに関する吸光度スペクトルデータが、収集および保存されることができる。保存されたデータは、ライブラリーからの純粋な標準のスペクトルと比較され得る。PDA検出器は、分離されない構成要素のそれぞれに関する特徴的なスペクトルが異なる可能性が高いため、分離するのが困難である構成要素（重複しているピーク）の同定において有用である。
- [0131] 蛍光検出器は、蛍光または燐光のような化学発光特性を示す分析種の検出において有用である。それらは、UV吸光度検出器よりも少なくとも1桁感度が高い。蛍光は、典型的には励起ビームに対して90度の角度の、格子で分離された放射輻射（emission radiation）の検出により観察される。蛍光種数は、特別な試薬を用いる溶出された化合物のポストカラム誘導体化（PCD）反応（または試料自体のプレカラム誘導体化反応）によって増強されることができる。
- [0132] 屈折率（RI）検出器は、ほとんど全ての溶質に応答する。カラム流出液に対する参照移動相の屈折率における差は、結果としてクロマトグラム上のピークとしての分離された構成要素の検出をもたらす。移動相に対するその極めて高い感度のため、この検出器は、LCポンプ内での十分なパルス減衰なしでは使用できず、それは、変化する移動相組成のため、勾配適用にも適していない。検出限界は、通常は吸光度検出器で観察される検出限界よりも低い。
- [0133] 伝導率検出器は、全ての荷電種の高感度検出を提供する。この検出器は、

陰イオン、陽イオン、金属、有機酸および界面活性剤のppbレベルに至るまでの簡単かつ信頼できる検出のためにLCシステムと共に用いられることができる。カラムおよび伝導率検出器の間の化学的抑制剤の添加は、溶出液の伝導率を低下させる役目を果たし、勾配溶出の使用および最小限のベースラインドリフトでのppbレベルの決定を可能にする。低レベルの陰イオンの典型的な決定のために、溶出液は、その弱くイオン化された低伝導率の酸に（例えば Na_2CO_3 から炭酸に）変換され、バックグラウンドノイズを低減する。同時に、分析種の陰イオンは、それらの対応する高伝導率の酸に（例えば NaCl から HCl に）変換され、相対的な分析種の信号を増大させる。

[0134] 本発明の一態様において、第2のカラムクロマトグラフィーにおいて得られる高度不飽和脂肪酸エステル組成物に含まれる高度不飽和脂肪酸エステルの純度は、高度不飽和脂肪酸エステル組成物全体に対して93重量%以上、95重量%以上、96重量%以上、96.5重量%以上、97重量%以上、97.5重量%以上、98重量%以上、98.5重量%以上、99重量%以上、又は99.5重量%以上である。

[0135] 目的物の保持時間は、約0.5分～約2分、約2分～約4分、約4分～約6分、約6分～約8分、約8分～約10分、約10分～約12分、約12分～約14分、約14分～約16分、約16分～約18分、約18分～約20分、約20分～約22分、約22分～約24分、約24分～約26分、約26分～約28分、約28分～約30分、約30分～約32分、約32分～約34分、約34分～約36分、約36分～約38分もしくは約38分～約40分、または約0.5分より大きく、約1分より大きく、約1.5分より大きく、約2分より大きく、もしくは約5分より大きく、かつ／または50分未満、40分未満、30分未満もしくは20分未満であることができる。

[0136] 本発明の一態様において、第1のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間は第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間より短い。第1のカラムクロマトグラフィー

における目的物のピークトップの保持時間は、約 0.5 分～約 2 分、約 2 分～約 4 分、約 4 分～約 6 分、約 6 分～約 8 分、約 8 分～約 10 分、又は 10 分未満、9 分未満、8 分未満、7 分未満、6 分未満、5 分未満、4 分未満、3 分未満、2 分未満、1 分未満であることができる。第 2 のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間は、約 6 分～約 8 分、約 8 分～約 10 分、約 10 分～約 12 分、約 12 分～約 14 分、約 14 分～約 16 分、約 16 分～約 18 分、約 18 分～約 20 分、約 20 分～約 22 分、約 22 分～約 24 分、約 24 分～約 26 分、約 26 分～約 28 分、約 28 分～約 30 分、約 30 分～約 32 分、約 32 分～約 34 分、約 34 分～約 36 分、約 36 分～約 38 分もしくは約 38 分～約 40 分、または 40 分未満、38 分未満、36 分未満、34 分未満、32 分未満、30 分未満、28 分未満、26 分未満、24 分未満、22 分未満、20 分未満、18 分未満、16 分未満、14 分未満、12 分未満、10 分未満、8 分未満であることができる。

[0137] 本発明の一態様において、ガスクロマトグラフィー（GC）での分析時に内部標準を使用することができる。内部標準は、内部標準に対する分析種の相対的保持時間を決定するために、または分析種の定量化を助けるために、参照マーカースとして試料に添加され得る。内部標準は、標的分析種と非常に類似しているが同一ではない化合物、例えば標的分析種の重水素化誘導体であるように、当業者によって適切に選択され得る。定量化目的のために使用される場合、内部標準は、次いで分析種の信号の内部標準の信号に対する比を標準の分析種濃度の関数としてプロットすることによって較正のために使用されることができ、ここで、標準は、定量化される未知の分析種試料に対する参照として使用するために当業者によって調製される既知の濃度の試料である。

[0138] ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、ドコサヘキサエン酸、クロトン酸、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、サピエン酸、オレイン酸、エライジン酸、バクセン酸、ガドレイン酸、エイコセン酸、エル

カ酸、ネルボン酸、リノール酸、エイコサジエン酸、ドコサジエン酸、リノレン酸、ピノレン酸、エレオステアリン酸、ミード酸、ジホモγーリノレン酸、エイコサトリエン酸、ステアリドン酸、アラキドン酸、エイコサテトラエン酸、アドレン酸、ボセオペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、オズボンド酸、イワシ酸、テトラコサペンタエン酸、ニシン酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、カプロン酸、エナント酸、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ウンデシル酸、ラウリン酸、トリデシル酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ノナデシル酸、アラキジン酸、ヘンイコシル酸、ベヘン酸、トリコシル酸、リグノセリン酸、ペンタコシル酸、セロチン酸、カルボセリン酸、モンタン酸、ノナコシル酸、メリシン酸、ヘントリアコンチル酸、ラッセル酸、シリル酸、ゲディック酸、セロプラスチック酸、ヘキサトリアコンチル酸、ヘプタトリアコンチル酸、オクタトリアコンチル酸、ノナトリアコンチル酸、テトラコンチル酸またはそのエステルであるか、またはそれらを含む。

[0139] ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、約70%より大きい、約80%より大きい、約85%より大きい、約86%より大きい、約90%より大きい、約95%より大きい、約96.5%より大きい、約98%より大きい、約99%より大きい、約99.5%より大きい、約99.8%より大きい、または約99.9%より大きい純度を有し得る。ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、約100%未満、約99.999%未満、約99.5%未満、99%未満、98.5%未満、または約98%未満の純度を有し得る。ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、70~98%、80~98%、85~98.5%、86~98.5%、90~98.5%、95~99%、96.5~99%、98~99.5%、99~99.5%、99.5~99.9999%、99.8~99.9999%、99.8~100%の純度を有し得る。ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、50%より大きい、55%より大きい、60%より大きい、65%より大きい、70%より大きい、75%より

り大きい、または80%より大きい歩留まりで得られることができる。ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、100%未満、95%未満、90%未満または80%未満の歩留まりを有し得る。ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、50~80%、55~90%、60~90%、65~95%、70~95%、75~100%、80~100%の歩留まりを有し得る。ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、55%より大きい、60%より大きい、65%より大きい、70%より大きい、75%より大きい、80%より大きい、85%より大きい、90%より大きい、95%より大きい、98%より大きい、99%より大きい、または99.7%より大きい回収率を有し得る。ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、100%未満、99.9999%未満の回収率を有し得る。ある態様において、高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、55~99.9999%、60~99.9999%、65~99.9999%、70~99.9999%、75~99.9999%、80~99.9999%、85~99.9999%、90~99.9999%、95~99.9999%、98~99.9999%、99~100%、99.7~100%の純度を有し得る。

[0140] 本発明の一態様において、第2のカラムクロマトグラフィーにおいて得られる高度不飽和脂肪酸エステル組成物に含まれる高度不飽和脂肪酸エステルは、EPAエステル、例えばEPAエチルエステルであり、その純度は高度不飽和脂肪酸エステル組成物全体に対して93重量%以上、95重量%以上、96重量%以上、96.5重量%以上、97重量%以上、97.5重量%以上、98重量%以上、98.5重量%以上、99重量%以上、又は99.5重量%以上である。

[0141] 本発明の一態様において、第2のカラムクロマトグラフィーにおいて得られる高度不飽和脂肪酸エステル組成物に含まれる高度不飽和脂肪酸エステルは、DGLAエステル、例えばDGLAエチルエステルであり、その純度は高度不飽和脂肪酸エステル組成物全体に対して93重量%以上、95重量%

以上、96重量%以上、96.5重量%以上、97重量%以上、97.5重量%以上、98重量%以上、98.5重量%以上、99重量%以上、又は99.5重量%以上の純度である。

[0142] 本発明の一態様において、第2のカラムクロマトグラフィーにおいて得られる高度不飽和脂肪酸エステル組成物に含まれる高度不飽和脂肪酸エステルは、ARAエステル、例えばARAエチルエステルであり、その純度は高く、高度不飽和脂肪酸エステル組成物全体に対して93重量%以上、95重量%以上、96重量%以上、96.5重量%以上、97重量%以上、97.5重量%以上、98重量%以上、98.5重量%以上、99重量%以上、又は99.5重量%以上である。

[0143] 本発明の一態様において、第2のカラムクロマトグラフィーにおいて得られる高度不飽和脂肪酸エステル組成物は、C18:0、C20:0、C20:1、C22:0のエステルから選択される少なくとも1つの脂肪酸エステルを、高度不飽和脂肪酸エステル組成物全体に対して0.6重量%以下、0.3重量%以下、0.2重量%以下、0.1重量%以下、0.05重量%以下、0.03重量%以下、又は0.01重量%以下の量で含む。

[0144] 以下に本発明の実施例を記載するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

実施例

[0145] [実施例1]

本試験では、単一直列カラムと2連直列式カラムとの比較によって、負荷間隔の短縮をカラムモデルで検証した。粗精製のイワシ油からEPA-EE、C20:0エチルエステル、C20:1エチルエステルを含むサンプルを調製した（調製方法は以下実施例2と同様である）。単一直列カラムは内径20mm、長さ300mm、500mm、及び500mmのカラムを直列につなげたものを使用した。2連直列式カラムは内径20mm、長さ300mmの第1のカラムと、内径20mm、長さ500mmの2つのカラムを直列につなげた第2のカラムを使用した。カラム温度は40℃とした。単一直列

カラムの流速は37 mL／分であった。2連直列式カラムにおける第1のカラムの流速は、32 mL／分であり、第2のカラムの流速は37 mL／分であった。固定相はDaisopak SP-120-50-ODS-B（株式会社大阪ソーダ）を使用した。移動相はHPLCグレードのメタノール（関東化学株式会社）であった。検出は、230 nmにおけるUVであった。

単一直列カラムではEPA-EEはカラムクロマトグラフィー開始から13分後に溶出開始し、C20：0エチルエステルの溶出終了時間はEPA-EEの溶出開始から24分後だった。

また2連直列式カラムでは第1のカラムのEPA-EE溶出終了時間はカラムクロマトグラフィー開始から3.5分後だった。第2のカラムではEPA-EE溶出開始がカラムクロマトグラフィー開始から10.5分後であり、C20：1エチルエステルの溶出終了時間はEPA-EE溶出開始から12分後であった。

[0146] 単一直列カラムではEPA-EEから最も離れた脂肪酸がC20：0エチルエステルになる。また2連直列式カラムでは第1のカラムでのEPA-EE溶出終了時間である3.5分までの溶出液を回収して第2のカラムに負荷した場合、第2のカラムでEPA-EEから最も離れた脂肪酸はC20：1エチルエステルになる。C20：0エチルエステルは第1のカラムで取り除かれるためである。単一直列カラムではEPA-EE溶出開始から24分後にC20：0エチルエステルが溶出終了するので、負荷間隔を24分とすることで前回負荷で最後に溶出されたC20：0エチルエステルが次回負荷で検出されるEPA-EEの画分に混入しなくなる。

一方、2連直列式カラムでは第2のカラムでのEPA-EE溶出開始から12分後がC20：1エチルエステルの溶出終了時間となるため、負荷間隔が12分ごとであれば前回負荷で最後に溶出されるC20：1エチルエステルは次回負荷で溶出されるEPA-EEの画分に混入することはない。

つまり、単一カラムでの負荷間隔は2連直列式カラムの導入によって24分から12分と半分に短縮し、使用する溶媒を削減できる効果的な方法だと

ということがわかった。

[0147] [実施例2]

カラムクロマトグラフィーに関する条件は、以下の通りであった。使用したHPLC機器は以下の通りであった。ポンプはNP-KX500（日本精密科学株式会社）、検出器はS-3702（株式会社相馬光学）、カラムオーブンはC0705（ジーエルサイエンス株式会社）であった。使用したODS充填剤は、Daio Pak SP-120-50-ODS-B（株式会社大阪ソーダ）であった。第1のカラムは内径20mm、長さ300mm、第2のカラムは内径20mm、長さ1000mmであった。第1のカラムの流速は、32mL/分であり、第2のカラムの流速は37mL/分であった。溶媒は、HPLCグレードのメタノール（関東化学株式会社）であった。検出は、230nmにおけるUVであった。2.4gのEPA-EE（80%）を負荷した。

[0148] EPA-EE（80%）を以下のように調製した。粗精製のイワシ油に対して短行程蒸留（SPD）を施した。SPD処理油に対してアルカリ触媒の存在下でエチルアルコールとのエタノリシス反応を施して魚油エチルエステルであるEPA-EEを形成した。魚油エチルエステルを精密蒸留により80%EPA-EEを調製した。

[0149] まず第1のカラムの分画試験を行った。第1のカラムにEPA-EE（80%）を2.4g負荷し、画分（Fr. 0）を注入直後からUVの上昇まで分画し、次いでFr. 1～20を10秒毎に分画し、次いでFr. 29を30分間分画した。分取された画分から真空エバポレーターを用いてメタノールを留去し、内部標準物質としてC23:0メチルエステル1mg/mLヘキサン溶液を添加した後、ガスクロマトグラフィー（GC）で分析した。各画分における化合物の溶出の量をGCピーク面積および内部標準の間の面積比から算出した結果、EPA-EE（含有量93%）の溶出開始は3分30秒である、溶出終了は4分20秒であり、その時の類縁物質組成を求めた。そこでカラムクロマトグラフィー開始から3分30秒から4分20秒の間の溶

出範囲を第1のカラムから第2のカラムへ送液すると決定した。

[0150] 次に第1のカラムに2.4 g 負荷後、EPA-EE 93%以上の溶出範囲（3分30秒から4分20秒）を第2のカラムへ送液した。第2のカラムにおけるUVの上昇までをFr. 0とし、Fr. 1～38を10秒毎に分取し、次いでFr. 39を35分分画した。第1のカラムの分画試験同様に、GC分析し、EPA-EEが97%以上の時の類縁物質組成を求めた。

[0151] GC分析に関して用いた条件は、以下の通りであった。機器は、DB-WAX 30m×0.25mm×0.25μmカラムを有する7890AネットワークGCシステム（Agilent）であった。カラム温度は、210℃であった。注入温度は、250℃であり、スプリット率（split rate）は、1:50であり、注入量は、1μLであった。250℃のFID検出器を使用した。31cm/分の線速度を有するヘリウムのキャリアーガスを使用した。

[0152]

[表1]

EPAデータ (QDS-B)									
	%脂肪酸 第1カラム前	第1流出時間(分) (ピークトップ値)	%脂肪酸 第1カラム後	第1流出時間(分) (ピークトップ 値)	第2流出時間(分) (ピークトップ 値)	%脂肪酸 第2カラム後	第2流出時間(分) (ピークトップ 値)	%脂肪酸 第2カラム後	第2流出時間(分) (ピークトップ 値)
C18:4	0.04%	3.7	0.03%	0.94	14.83	0.14%	0.97		
EPA	81.75%	3.9	93.72%	1.00	15.33	97.68%	1.00		
C19:4	0.04%	3.9	0.05%	1.00	15.83	0.03%	1.03		
C21:5	0.09%	4.0	0.07%	1.03	16.67	0.06%	1.09		
C18:0	0.58%	7.3	0.00%	1.89	-	0.00%	-		
C20:1	4.05%	7.3	0.00%	1.89	-	0.00%	-		
C20:0	0.25%	9.0	0.00%	2.32	-	0.00%	-		

[0153] [実施例3]

 DGLA濃縮のためにおこなったカラムクロマトグラフィーに関する条件は、以下の通りであった。

 カラムは、内径600mmのアキシャルコンプレッションカラムLC-600型（栗田工業株式会社）に粒径50μmのODS充填剤（SP-120-50-ODS-B、株式会社大阪ソーダ）を充填圧3.5MPaで第1の

カラムに75kg、第2のカラムに115kgを充填したカラムを用いた。第1のカラムのカラム長は50cm、第2のカラムのカラム長は80cmであった。移動相にはメタノールを用いて流速を第1のカラム、第2のカラム共に28L/分とした。

[0154] 油脂組成物1（DGLA含量、87.7%）は次のように調製した。すなわち、脂肪酸組成物中にDGLAを37.2重量%含有するモルティエレラ属微生物由来の微生物油1を、常法に従ってアルカリ触媒でエチルエステル化し、精密蒸留によってC20画分を濃縮して油脂組成物1を得た。

まず、第1のカラムの分画を行った。第1のカラムに油脂組成物1（DGLA含量、87.7%）8.6kg（第1のカラム及び第2のカラムの吸着材重量に対して4.5%）を負荷し、画分（Fr. 1）を注入終了直後から分画し、Fr. 1を180秒、Fr. 2からFr. 19を各画分30秒、Fr. 20からFr. 33を各画分120秒で分画した。分画した各画分1mLをファルコンチューブに分注し、ホールピペットを用いてトリコサン酸メチル1mg/mLヘキサン溶液を1mL添加し、更に5%NaCl水溶液を5mL添加して激しく攪拌して二層分離をした後で上層をGCバイアルに回収してGC試料としてGC-FID分析に供した。GC条件は以下の通りである。各画分における化合物の溶出の量をGCピーク面積および内部標準の間の面積比から算出した。

[0155] 《GC分析条件》

装置：キャピラリガスクロマトグラフGC-2025 株式会社島津製作所

カラム：DB-WAX（30m×0.25mmID、膜厚：0.25μm）

キャリアーガス：水素、1mL/min

スプリット比：1：30

カラム温度：230℃（30min）

注入口温度：250℃

検出器種類、温度：FID、250℃

注入量：1 μ L

[0156] その結果、第1のカラムにおける目的物であるDGLAの溶出開始は4.5分、溶出終了は30分だったが、第2のカラムへ送液する目的画分（DGLA含量、92.7%）の溶出開始を4.5分、溶出終了を9分に敢えて設定することで溶出に時間がかかるC22:0を0.0%に抑制した。

[0157] 次に第1のカラムに油脂組成物1を8.6kg負荷終了後、第1のカラムから第2のカラムに送液する時間は上述の第1のカラムの分画で特定した範囲（4.5分から9分）とした。第2のカラムの溶出液の分画は、油脂組成物1の第1のカラムから第2のカラムへの送液終了直後に開始し、Fr. 1を360秒、Fr. 2からFr. 24を各30秒、Fr. 25からFr. 34を各120秒で分画した。第1のカラムの分画試験同様にGC分析を行い、回収画分の脂肪酸組成においてDGLAが96.5%以上となるように回収画分を特定し、そのときの回収画分の脂肪酸組成を求めた。

[0158]

[表2]

脂肪酸	油脂組成物1	溶出時間[分] (ピークトップ値 第1)	第1カラム分 取	第2カラムイ ンジェクション	溶出時間[分] (ピークトップ値 第2)	第2カラム 後
DGLA	87.74%	6	92.74%	左記の通り	18	96.54%
C20:4n-6	0.66%	5.5	0.64%	左記の通り	17.5	0.54%
C22:0	1.74%	18	0.02%	左記の通り	-	0

[0159] [実施例4]

ARA濃縮のためにおこなったカラムクロマトグラフィーに関する条件は、以下の通りであった。

HPLCカラム、移動相条件には、実施例2と同じ設備条件を用いた。

[0160] 油脂組成物2（ARA含量、79.4%）は次のように調製した。すなわち、脂肪酸組成中にARAを43.6重量%含有するモルティエラ属微生物

物由来の微生物油 2 を、常法に従ってアルカリ触媒でエチルエステル化し、精密蒸留によって C 2 0 画分を濃縮して油脂組成物 2 を得た。

まず、第 1 のカラムの分画を行った。第 1 のカラムに油脂組成物 2 (A R A 含量、7 9 . 4 %) 1 . 0 k g (第 1 及び第 2 のカラムの合計吸着材重量に対して 0 . 5 5 %) を負荷し、画分 (F r . 1) を注入終了直後から分画し、F r . 1 を 3 6 1 秒、F r . 2 から F r . 1 3 を各画分 3 0 秒、F r . 1 4 から F r . 1 6 を各画分 3 0 0 秒、F r . 1 7 から F r . 2 9 までを各画分 6 0 秒で分画した。分画した各画分については実施例 2 と同じ方法で G C 分析を行い、各画分における化合物の溶出の量を求めた。その結果、第 1 のカラム後の目的成分である A R A の溶出開始は 6 分であり、溶出終了は 4 0 分であったが、第 2 のカラムへ送液する目的画分 (A R A 含量、7 8 . 9 %) を溶出開始は 6 . 5 分であり、溶出終了は 1 2 分に取えて設定することで溶出に時間がかかる C 2 2 : 0 を 0 . 0 % に抑制した。

[0161] 次に第 1 のカラムに油脂組成物 2 を 1 . 0 k g 負荷終了後、第 1 のカラムから第 2 のカラムに送液する時間は上述の第 1 のカラムの分画で特定した範囲 (6 . 5 分から 1 2 分) とした。第 2 のカラムの溶出液の分画は、油脂組成物 2 の第 1 のカラムへの負荷終了後に開始し、F r . 1 を 1 0 5 1 秒、F r . 2 から F r . 3 1 を各 1 0 秒、F r . 3 2 から F r . 3 3 を各 6 0 0 秒で分画した。第 1 のカラムの分画試験同様に前処理を行い調製した G C 試料を下記の G C 条件で分析し、回収画分の脂肪酸組成において A R A が 9 6 . 5 % 以上となるように回収画分を特定し、そのときの回収画分の脂肪酸組成を求めた。

[0162] ≪ G C 分析条件 ≫

装置 : キャピラリガスクロマトグラフ G C - 2 0 2 5 株式会社島津製作所

カラム : D B - W A X (3 0 m × 0 . 2 5 m m I D、膜厚 : 0 . 2 5 μ m)

キャリアーガス : 水素、3 1 . 8 c m / s e c 定線速度制御

スプリット比：1：30
カラム温度：210℃（30min）
注入口温度：250℃
検出器種類、温度：FID、250℃
注入量：1μL

[0163] [表3]

脂肪酸	油脂組成物2	溶出時間[分] (ピークトップ値 第1)	% 第1カラム後	% 第2カラムイン シグナル	溶出時間[分] (ピークトップ値 第2)	% 第2カラム後
ARA	79.42%	8.0	78.86	左記の通り	19.9	97.16
C18:2n-6	2.24%	8.0	2.97	左記の通り	21.2	1.91
C18:3n-6	0.32%	7.5	0.44	左記の通り	18.9	0.19
C18:3n-3	0.14%	7.5	0.21	左記の通り	19.0	0.09
C22:0	0.69%	22.0	0.00	左記の通り	—	0.00

請求の範囲

- [請求項1] 油脂組成物から高度不飽和脂肪酸エステル組成物を製造する方法であって、
- (a) 油脂組成物を、第1のカラムを使用する第1のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、第1のカラムクロマトグラフィーにおける目的物である高度不飽和脂肪酸エステルのピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.8～3.5である少なくとも1種の成分の全部または一部を除去すること、
- (b) 第1のカラムクロマトグラフィーで得られた目的物を含む溶出液を、第2のカラムを使用する第2のカラムクロマトグラフィーに付すことによって、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.90以上、1.1以下である少なくとも1種の成分の全部または一部を除去すること、及び
- (c) 第2のカラムクロマトグラフィーで得られた溶出液を濃縮して、目的物を含む組成物を得ること、を含み、
- 得られた組成物が目的物を95重量%以上含有する、方法。
- [請求項2] 1回のカラムクロマトグラフィー開始後、再度のカラムクロマトグラフィーが開始可能になるまでの負荷間隔が第1と第2のカラムを合わせた長さの単一カラムを使用するカラムクロマトグラフィーの場合よりも短縮される、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 第1のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が1.8～3.5である少なくとも1種の成分が、油脂組成物中の高度不飽和脂肪酸エステル以外の少なくとも1種の成分である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記(b)において全部または一部を除去される少なくとも1種の

成分が、第2のカラムクロマトグラフィーにおける目的物のピークトップの保持時間を1.0とした場合のピークトップの保持時間の相対値が0.93以上、1.09以下である少なくとも1種の成分である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[請求項5] 第1のカラムからの溶出液が第2のカラムに注入されるように第1のカラムを第2のカラムに連通可能である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

[請求項6] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが逆相カラムクロマトグラフィーを用いる、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

[請求項7] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが固定床カラムクロマトグラフィーである、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

[請求項8] 第1のカラムクロマトグラフィーと第2のカラムクロマトグラフィーが同じ移動相を用いる、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

[請求項9] 第2のカラムが、第1のカラムより充填された固定相の量が多い、または第1のカラムと同じ内径を有し、第1のカラムより長さが長い、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

[請求項10] 前記目的物が、エイコサペンタエン酸（EPA）、ジホモγーリノレン酸（DGLA）及びアラキドン酸（ARA）のいずれかのエステルである、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

[請求項11] 前記第1のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分が、C22:0、C20:0、C18:0及びC20:1のいずれかのエステルである、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

[請求項12] エステルが、エチルエステルである、請求項10又は11に記載の方法。

- [請求項13] 高度不飽和脂肪酸エステル組成物が目的物を96重量%以上含有する、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項14] (a)、(b)および(c)を2回以上繰り返す、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項15] 目的物がエイコサペンタエン酸エステルであり、第2のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分がステアリドン酸、C19:4、C21:5のエステルである、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項16] 目的物がジホモγーリノレン酸エステルであり、第2のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分がC20:4n-6エステルである、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項17] 目的物がアラキドン酸エステルであり、第2のカラムクロマトグラフィーで全部または一部を除去される少なくとも1種の成分がC18:3n-6エステルである、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。