(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-504683
(P2017-504683A)
(43)公表日　平成29年2月9日(2017.2.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C11C 1/08	(2006.01)	C11C	1/08		4D017
B01D 15/00	(2006.01)	B01D	15/00	101A	4H059
B01D 15/02	(2006.01)	B01D	15/02	101	
B01D 15/18	(2006.01)	B01D	15/18		
B01D 15/22	(2006.01)	B01D	15/22		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 31 頁）

(21)出願番号　特願2016-539175 (P2016-539175)
(86)(22)出願日　平成26年12月9日 (2014.12.9)
(85)翻訳文提出日　平成28年6月30日 (2016.6.30)
(86)国際出願番号　PCT/EP2014/077036
(87)国際公開番号　WO2015/086591
(87)国際公開日　平成27年6月18日 (2015.6.18)
(31)優先権主張番号　1362443
(32)優先日　平成25年12月11日 (2013.12.11)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(71)出願人　516170820
ノバセップ　プロセス
フランス国　ポンペ　Ｆ－５４３４０，サイト　エッフェル　ブールバール　デ　ラ　モゼル
(74)代理人　110000659
特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
(72)発明者　バレリィ，エリック
フランス国　ソーユール－レ－ナンシー　Ｆ－５４４２０，グランド　リュ　８
(72)発明者　ブレハウト，ジーン
フランス国　ナンシー　Ｆ－５４０００，リュ　デ　メッツ　５８ビス

Ｆターム(参考)　4D017 AA03 BA04 CA01 CA03 CA05 DA02 DA03 DA05 EA05 EB01

最終頁に続く

(54)【発明の名称】クロマトグラフィ法による脂肪酸の精製

(57)【要約】
本発明は、第１脂肪酸、特に第１ポリ不飽和脂肪酸を、第２脂肪酸および第３脂肪酸の少なくとも１つをさらに含む初期混合物を使用して精製するための方法であって、少なくとも、
初期混合物を使用し、一方では第１脂肪酸が濃縮された第１フローを回収し、そして他方では第２脂肪酸が濃縮されたフローを回収することを可能にする、液相における第１クロマトグラフィ分離ステップと、
第１脂肪酸が濃縮された第１フローを使用し、一方では第１脂肪酸が濃縮された第２フローを回収し、そして他方では第３脂肪酸が濃縮されたフローを回収することを可能にする、液相における第２クロマトグラフィ分離ステップであって、固定床クロマトグラフィ分離ユニット中で実施する第２クロマトグラフィ分離ステップと
を含む前記方法に関する。
【選択図】図１

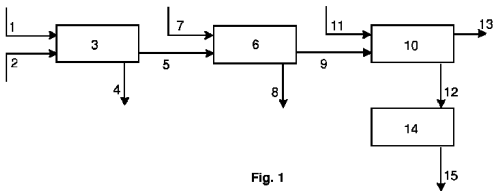


Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１脂肪酸を、少なくとも１つの第２脂肪酸、第３脂肪酸および第４脂肪酸をさらに含む初期混合物を使用して精製する方法であって、前記方法は少なくとも、
前記初期混合物を使用し、第１クロマトグラフィ分離用ユニット中で実施され、一方では第１脂肪酸が濃縮された第１フローを回収し、他方では第２脂肪酸が濃縮されたフローを回収することを可能にする、液相における第１クロマトグラフィ分離ステップと、
第１脂肪酸が濃縮された前記第１フローを使用し、第２クロマトグラフィ分離用ユニット中で実施され、一方では第１脂肪酸が濃縮された第２フローを回収し、そして他方では第３脂肪酸が濃縮されたフローを回収することを可能にし、前記第２クロマトグラフィ分離用ユニットが固定床クロマトグラフィ分離ユニットである、液相における第２クロマトグラフィ分離ステップと、
第１脂肪酸が濃縮された前記第２フローを使用し、第３クロマトグラフィ分離用ユニット中で実施され、一方では第１脂肪酸が濃縮された第３フローを回収し、そして他方では第４脂肪酸が濃縮されたフローを回収することを可能にする、液相における第３クロマトグラフィ分離ステップと、
を含む方法。
【請求項２】
前記第１クロマトグラフィ分離用ユニットは、複数のカラム、ならびに好ましくは擬似移動床もしくは移動床システムまたは前記フローの注入ポイントおよび回収ポイントが非同期方式で周期的に変位されたシステムを備えたクロマトグラフィ分離ユニットである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記第３クロマトグラフィ分離用ユニットが固定床クロマトグラフィ分離ユニットである、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記第１クロマトグラフィ分離用ユニット、前記第２クロマトグラフィ分離用ユニットおよび前記第３クロマトグラフィ分離用ユニットのうちの少なくとも１つは、シングルカラムを備えた固定床クロマトグラフィ分離ユニットであって、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムであり、
好ましくは、前記第１クロマトグラフィ分離用ユニット、前記第２クロマトグラフィ分離用ユニットおよび前記第３クロマトグラフィ分離用ユニットのうちの少なくとも２つは、シングルカラムを有する固定床クロマトグラフィ分離ユニットであって、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムであり、
適用可能ならば、前記第１クロマトグラフィ分離用ユニット、前記第２クロマトグラフィ分離用ユニットおよび前記第３クロマトグラフィ分離用ユニットは、シングルカラムを有する固定床クロマトグラフィ分離ユニットであって、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである、
請求項１から３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記第２クロマトグラフィ分離用ユニットは、シングルカラムを有するクロマトグラフィ分離ユニットであって、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムであり、および／または、
前記第３クロマトグラフィ分離用ユニットが、シングルカラムを有するクロマトグラフィ分離ユニットであって、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである、請求項１から４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記第１クロマトグラフィ分離ステップは、水－有機溶離液である第１溶離液で実施され、および／または、
前記第２クロマトグラフィ分離ステップは、水－有機溶離液である第２溶離液で実施さ

れ、および／または、
前記第３クロマトグラフィ分離ステップは、水－有機溶離液である第３溶離液で実施される、請求項１から５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記第１溶離液は前記第２溶離液とは異なり、前記第３溶離液は前記第１溶離液および前記第２溶離液とは異なり、
好ましくは、前記第１溶離液はケトン／水混合物であり、より好ましくはアセトン／水であり、
好ましくは、前記第２溶離液はアルコール／水混合物であり、より好ましくはメタノール／水であり、
好ましくは、前記第３溶離液はケトン／水混合物であり、より好ましくはアセトン／水である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記第１脂肪酸は第１ポリ不飽和脂肪酸であり、例えば、
前記第１ポリ不飽和脂肪酸は、エイコサペンタエン酸であり、好ましくは前記方法の最後に８０％以上、もしくは９０％以上、もしくは９６％以上の純度で回収され、または、
前記第１ポリ不飽和脂肪酸は、ドコサヘキサエン酸であり、好ましくは前記方法の最後に７０％以上、もしくは８０％以上、もしくは９０％以上、もしくは９５％以上の純度で回収され、または、
前記第１ポリ不飽和脂肪酸は、アラキドン酸であり、好ましくは前記方法の最後に７０％以上、もしくは８０％以上、もしくは９０％以上、もしくは９５％以上の純度で回収され、または、
前記第１ポリ不飽和脂肪酸は、ドコサペンタエン酸であり、好ましくは前記方法の最後に７０％以上、もしくは８０％以上、もしくは９０％以上、もしくは９５％以上の純度で回収される、
請求項１から７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記第１クロマトグラフィ分離ステップは、前記第１脂肪酸と、前記第１脂肪酸よりも保持される少なくとも１つの化合物とを分離するステップであり、および／または、
前記第２クロマトグラフィ分離ステップは、前記第１脂肪酸と、前記第１脂肪酸よりも保持される少なくとも１つの化合物とを分離するステップであり、および／または、
前記第３クロマトグラフィ分離ステップは、前記第１脂肪酸と、前記第１脂肪酸よりも保持されない少なくとも１つの化合物とを分離するステップである、
請求項１から８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
複数のクロマトグラフィ分離ユニットを備えた装置で実施され、前記クロマトグラフィ分離ユニットの少なくとも１つは、５ｃｍ以上、もしくは１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の長さを有する、および／または、１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の直径を有する分離カラムを備える、請求項１から９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
初期混合物を使用して第１脂肪酸を精製するための装置であって、
初期混合物の供給ダクト（１）によって供給され、出口で、一方では第１脂肪酸が濃縮されたフローの第１ダクト（５）が接続され、他方では第２脂肪酸が濃縮されたフローのダクト（４）が接続されている、液相における第１クロマトグラフィ分離用ユニット（３）と、
第１脂肪酸が濃縮されたフローの前記第１ダクト（５）により供給され、出口で、一方では第１脂肪酸が濃縮されたフローの第２ダクト（９）が接続され、他方では第３脂肪酸

が濃縮されたフローのダクト（８）が接続されている、液相における第２クロマトグラフィ分離用ユニット（６）であって、固定床クロマトグラフィ分離ユニットである、第２クロマトグラフィ分離用ユニット（６）と、
第１脂肪酸が濃縮されたフローの前記第２ダクト（９）により供給され、出口で、一方では第１脂肪酸が濃縮されたフローの第３ダクト（１２）が接続され、他方では第４脂肪酸が濃縮されたフローのダクト（１３）が接続されている、液相における第３クロマトグラフィ分離ユニット（１０）と、
を含む装置。
【請求項１２】
前記第１クロマトグラフィ分離用ユニット（３）は、複数のカラムを有するクロマトグラフィ分離ユニットであり、好ましくは擬似移動床もしくは移動床システムまたは前記フローの注入ポイントおよび回収ポイントが非同期方式で周期的に変位するシステムである、請求項１１に記載の装置。
【請求項１３】
前記第３クロマトグラフィ分離用ユニット（１０）は、固定床クロマトグラフィ分離ユニットである、請求項１１または１２に記載の装置。
【請求項１４】
前記第２クロマトグラフィ分離用ユニット（６）は、シングルカラムを有するクロマトグラフィ分離ユニットであり、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである、および／または、
前記第３分離ユニット（１０）は、シングルカラムを有するクロマトグラフィ分離ユニットであり、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである、
請求項１１から１３のいずれか１項に記載の装置。
【請求項１５】
前記第１クロマトグラフィ分離用ユニット（３）、前記第２クロマトグラフィ分離用ユニット（６）および前記第３クロマトグラフィ分離ユニット（１０）のうちの少なくとも１つは、５ｃｍ以上、もしくは１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の長さを有する、および／または、１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の直径を有する分離カラムを含む、請求項１１から１４のいずれか１項に記載の装置。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、脂肪酸、特にポリ不飽和脂肪酸（多価不飽和脂肪酸）、例えばエイコサペンタエン酸を製造するためのクロマトグラフィ法、およびこの方法を実施するために適した装置に関する。
【背景技術】
【０００２】
ポリ不飽和脂肪酸（ＰＵＦＡと略記する）を含む脂肪酸は、例えば細胞膜の構築および維持などの多くの生物学的過程や、血小板凝集、炎症過程および免疫応答などに関与するホルモン（例えばプロスタグランジン）の合成に介入するので、特に重要な生体化合物である。
【０００３】
必須脂肪酸と呼ばれる、食品から摂取しなければならないＰＵＦＡの２つのファミリーを除いて、ほとんどのＰＵＦＡは人体によって合成することができる。
【０００４】
必須脂肪酸の２つのファミリーとは：
クルミ、ヒマワリ、大豆、ブドウ種子またはトウモロコシおよび脂肪質の家禽（例えば

アヒル）の油中で特に豊富な、オメガ－６；
クルミの油中、ナタネおよびフラックスシードなどの植物中、ならびに脂肪質の魚（例えば、サケ、マグロ、イワシ、サバまたはニシン）中に特に存在するオメガ－３である。微細藻類、形質転換酵母またはオキアミを使用してオメガ－３製造する方法が最近開発された。

【０００５】
オメガ－３は、特にそれらの抗酸化効力の点で興味深いＰＵＦＡである。これらのオメガ－３のうち、精製したＥＰＡ（エイコサペンタエン酸、Ｃ２０－５ω３）およびＤＨＡ（ドコサヘキサエン酸、Ｃ２２－６ω３）ならびにそれらの濃縮した組み合わせが、トリグリセリドレベルや心血管系リスクを低減し、認知力または視力などを改善するために、栄養補助食品として、または薬物として最も一般的に使用される。

【０００６】
最近の臨床試験で、トリグリセリドレベルが５００ｍｌ／ｄＬを上回る患者を、ＤＨＡを含まない９６％ＥＰＡエチルエステル１日あたり４グラムで治療することによってＬＤＬレベル（「悪玉」コレステロール）を増加させることなくトリグリセリドレベルを減少させることが可能になり、一方、１日あたり４グラムのＥＰＡエチルエステルおよびＤＨＡエチルエステルそれぞれ約５０％および３５％の混合物で治療すると、ＬＤＬレベルの増加と同時にトリグリセリドの減少に至ることが示された。

【０００７】
現在までのところ、使用するＰＵＦＡ、特にオメガ－３の栄養補助食品は、３０～６０％のＥＰＡとＤＨＡとの混合物を含む混合物に実質的に基づく。今日使用されている分離方法では、トリグリセリドをエチルエステルにエステル交換し、次いで分子蒸留ならびに／または飽和およびモノ不飽和脂肪酸の尿素との共結晶化によりオメガ－３を濃縮することによって、混合物を得る。濃縮したエチルエステルを、おそらくは化学的または好ましくは酵素によりトリグリセリドに戻す。

【０００８】
しかしながら、これらの分離方法は、ＥＰＡ、ＤＨＡまたはステアリドン酸（ＳＤＡ、Ｃ１８－Ｓω３）などのオメガ－３を８０％超、さらには９６％超にて、特にエステル化形態で製造するためには満足できるものではない。

【０００９】
しかしながら、オメガ－３の精製は繊細である。なぜなら、これらの化合物が複数の炭素－炭素二重結合を含み、この二重結合のために酸化または分解に対して感受性になるからである。酸素の存在下で加熱する場合、これらのＰＵＦＡは、特に異性化、酸化、過酸化およびオリゴマー化の反応を受ける。

【００１０】
そのため、本明細書中で上述した分離技術によって、良好な収率および許容できる程度の純度のＰＵＦＡ混合物を得ることが可能になるが、それらをＰＵＦＡの個々の分離のために実施することはできない。したがって、それらの分離技術によって、オメガ－３同士を分離することはできない。実際、例えば分子蒸留はＤＨＡをＥＰＡまたはＳＤＡから経済的に除去することはできず、Ｃ２０およびＣ２２タイプの長鎖オメガ－３の有効な分離はできない。尿素での包接化と分子蒸留との組み合わせによって、概して低い収量および高い操作コストと引き換えに、より純度の高いオメガ－３混合物を得ることが可能になるが、長鎖オメガ－３同士、ならびに特にＥＰＡおよびＤＨＡからの長鎖オメガ－３の分離のためには使用できない。

【００１１】
したがって、非常に高純度のエステル化形態のオメガ－３の工業的精製のための方法を提供することが必要とされる。

【００１２】
クロマトグラフィは、光や空気から遠ざけた穏やかな状態で分子の有効な精製または濃縮を可能にする繊細な分離技術である。

【００１３】
この技術は、様々な相互作用をする固定相と接触させた分子の分離に基づく。移動相または溶離液と称する１つまたは複数の流体の使用によって、様々な分子の様々な速度での透過が可能になる。この様々な速度のために、分子を物理的に分離すること、そして１つまたは複数のカラムを用いたクロマトグラフィ法の最後で分子を精製された形態で回収することが可能になる。精製されたフラクションを、一般的には、真空中での蒸発またはメンブラン法などによって周囲温度または中温の穏やかな条件で濃縮する。
【００１４】
場合によっては、クロマトグラフィ精製の出発製品は、分子蒸留によりすでに濃縮された脂肪酸エステルから構成され、好ましくは３０％を上回る関心対象のオメガ－３を含む油であり、これは、酸化化合物を除去するための処理、あるいは最後の分子蒸留によるか、または好ましくはシリカ誘導体（シリカゲル、ベントナイト、珪藻土）もしくは例えば活性炭での吸着による処理に付されたものである。
【００１５】
高純度のオメガ－３を得るためのいくつかのクロマトグラフィ法が記載されている。
【００１６】
そのようなものとして、特許文献１は、超臨界溶離液（加圧下の炭酸ガス）を使用して、そして特にＳＭＢ（「擬似移動床：Ｓｉｍｕｌａｔｅｄ　Ｍｏｖｉｎｇ　Ｂｅｄ」）上でＰＵＦＡを分離する方法を記載している。
【００１７】
特許文献２は、擬似移動床クロマトグラフィの技術を使用する、オメガ－３を精製するための別の方法を記載する。その文献は、特に、１つの酵素エステル交換ステップと２つの分子蒸留ステップと１つのＳＭＢタイプのステップとの連続を記載し、これら最後の３つのステップによって製品を保持時間の順で２つのフラクションに分けることができる。
【００１８】
特許文献３は、直列に配置された２つのＳＭＢクロマトグラフィ機器と洗浄ゾーンとを備える機器を使用したオメガ－３の精製を記載し、各ＳＭＢクロマトグラフィ機器は分離ゾーンを規定し、複数のカラムから構成される。抽出物フローと、ラフィネートフローとを得るために、処理する装填物を第１分離ゾーンに注入し、関心対象の化合物を含む前記ラフィネートフローを、第１ゾーンのカラムに隣接しない第２分離ゾーンのカラムに注入する。
【００１９】
特許文献４は、水性－有機溶離液を用いて逆相でのＳＭＢまたはＡＭＢによる２つのクロマトグラフィ分離によるオメガ－３の精製を記載し、この場合、ＳＭＢまたはＡＭＢによる２つの分離は、同じクロマトグラフィ機器で連続して実施するか、または２つの異なる機器で、第１機器によって精製した中間体を第２機器に導入して実施する。
【００２０】
特許文献５は、第１クロマトグラフィ分離と、それに続いて各ステップで水－有機溶離液を用いて逆相においてＳＭＢまたはＡＭＢによる２つのクロマトグラフィ分離を行い、第１クロマトグラフィ分離によって精製した中間体を第２クロマトグラフィ分離に導入し、第２クロマトグラフィ分離によって精製した中間体を第３クロマトグラフィ分離に導入する、９０％を超える純度でのＥＰＡの精製を記載している。
【００２１】
ここでも、従来技術のものよりも簡単なクロマトグラフィ装置であって、さらには比生産性（固定相の質量あたり単位時間あたりの精製された製品の質量）が高く、かつ溶媒の消費が低い装置で投資費用を低減するような方法で実施できる、脂肪酸、好ましくはポリ不飽和脂肪酸を精製する方法が必要とされる。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００２２】

【特許文献１】ＵＳ５，７１９，３０２
【特許文献２】ＵＳ２０１１／００９１９４７
【特許文献３】ＷＯ２０１１／０８０５０３
【特許文献４】ＷＯ２０１３／００５０５１
【特許文献５】ＷＯ２０１３／００５０４８
【発明の概要】
【００２３】
本発明は、まず、第１脂肪酸を、少なくとも１つの第２脂肪酸および第３脂肪酸をさらに含む初期混合物を使用して精製する方法であって、少なくとも、
初期混合物を使用し、第１クロマトグラフィ分離用ユニットで実施され、一方では第１脂肪酸が濃縮された第１フロー（流れ）を回収し、他方では第２脂肪酸が濃縮されたフローを回収することを可能にする、液相における第１クロマトグラフィ分離ステップと、
第１脂肪酸が濃縮された第１フローを使用し、第２クロマトグラフィ分離ユニットで実施され、一方では第１脂肪酸が濃縮された第２フローを回収し、他方では第３脂肪酸が濃縮されたフローを回収することを可能にし、第２クロマトグラフィ分離用ユニットが固定床クロマトグラフィ分離ユニットである、液相における第２クロマトグラフィ分離ステップと、
を含む方法に関する。
【００２４】
１つの実施形態によると、第１クロマトグラフィ分離用ユニットは、複数のカラムと、好ましくは擬似移動床もしくは移動床（実移動床）システムまたはフローの注入ポイント（注入点）および回収ポイント（回収点）が非同期方式で周期的に変位するシステムとを有するクロマトグラフィ分離ユニットである。
【００２５】
１つの実施形態によると、初期混合物は第４脂肪酸をさらに含み、前記方法は、
第１脂肪酸が濃縮された第２フローを使用し、第３クロマトグラフィ分離ユニットで実施され、一方では第１脂肪酸が濃縮された第３フローを回収し、他方では第４脂肪酸が濃縮されたフローを回収することを可能にし、第３クロマトグラフィ分離用ユニットが好ましくは固定床クロマトグラフィ分離ユニットである、液相における第３クロマトグラフィ分離ステップを含む。
【００２６】
１つの実施形態によると、
第１クロマトグラフィ分離用ユニット、第２クロマトグラフィ分離用ユニットおよび第３クロマトグラフィ分離用ユニットのうちの少なくとも１つは、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである、シングル（単一）カラムを有する固定床クロマトグラフィ分離ユニットである；
好ましくは、第１クロマトグラフィ分離用ユニット、第２クロマトグラフィ分離用ユニットおよび第３クロマトグラフィ分離用ユニットのうちの少なくとも２つは、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである、シングルカラムを有する固定床クロマトグラフィ分離ユニットである；
適用可能ならば、第１クロマトグラフィ分離用ユニット、第２クロマトグラフィ分離用ユニットおよび第３クロマトグラフィ分離用ユニットは、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである、シングルカラムを有する固定床クロマトグラフィ分離ユニットである。
【００２７】
１つの実施形態によると、
第２クロマトグラフィ分離用ユニットは、シングルカラムを有するクロマトグラフィ分離ユニットであり、好ましくは定常状態でリサイクル（再循環）するシステムである；および／または、
適用可能ならば、第３クロマトグラフィ分離用ユニットはシングルカラムを有するクロ

マトグラフィ分離ユニットであり、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである。

【００２８】

１つの実施形態によると、

第１クロマトグラフィ分離ステップは、水－有機（水性－有機性）溶離液である第１溶離液で実施される；および／または、

第２クロマトグラフィ分離ステップは、水－有機溶離液である第２溶離液で実施される；および／または、

適用可能ならば、クロマトグラフィ分離ユニットの第３ステップは、水－有機溶離液である第３溶離液で実施される。

【００２９】

１つの実施形態によると、

第１溶離液は第２溶離液とは異なり、適用可能ならば、第３溶離液は第１溶離液および第２溶離液とは異なる；

好ましくは、第１溶離液はケトン／水混合物であり、より好ましくはアセトン／水である；

好ましくは、第２溶離液はアルコール／水混合物であり、より好ましくはメタノール／水である；

適用可能ならば、好ましくは、第３溶離液はケトン／水混合物であり、より好ましくはアセトン／水である。

【００３０】

１つの実施形態によると、第１脂肪酸は第１ポリ不飽和脂肪酸である。

【００３１】

例として、

第１ポリ不飽和脂肪酸はエイコサペンタエン酸であり、好ましくは方法の最後に８０％以上、もしくは９０％以上、もしくは９６％以上の純度で回収される；または

第１ポリ不飽和脂肪酸はドコサヘキサエン酸であり、好ましくは方法の最後に７０％以上、もしくは８０％以上、もしくは９０％以上、もしくは９５％以上の純度で回収される；または

第１ポリ不飽和脂肪酸はアラキドン酸であり、好ましくは方法の最後に７０％以上、もしくは８０％以上、もしくは９０％以上、もしくは９５％以上の純度で回収される；または

第１ポリ不飽和脂肪酸はドコサペンタエン酸であり、好ましくは方法の最後に７０％以上、もしくは８０％以上、もしくは９０％以上、もしくは９５％以上の純度で回収される。

【００３２】

１つの実施形態によると、

第１クロマトグラフィ分離ステップは、第１脂肪酸と、第１脂肪酸よりも保持される１つもしくは複数の化合物との分離ステップである；および／または

第２クロマトグラフィ分離ステップは、第１脂肪酸と、第１脂肪酸よりも保持される１つもしくは複数の化合物との分離ステップである；および／または

適用可能ならば、クロマトグラフィ分離ユニットの第３ステップは、第１脂肪酸と、第１脂肪酸よりも保持されない１つもしくは複数の化合物との分離ステップである。

【００３３】

１つの実施形態によると、方法は、クロマトグラフィ分離ユニットを含む装置で実施され、クロマトグラフィ分離ユニットの少なくとも１つは、５ｃｍ以上、もしくは１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の長さを有する；および／または１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の直径を有

する分離カラムを含む。
【００３４】
本発明は目的として、初期混合物を用いる第１脂肪酸（好ましくは第１ポリ不飽和脂肪酸）の精製のための装置も有し、装置は：
初期混合物の供給ダクトによって供給され、出口で、一方では第１脂肪酸が濃縮されたフローの第１ダクト、他方では第２脂肪酸が濃縮されたフローのダクトが接続された、液相における第１クロマトグラフィ分離用ユニットと、
第１脂肪酸が濃縮されたフローの第１ダクトにより供給され、出口で、一方では第１脂肪酸が濃縮されたフローの第２ダクト、他方では第３脂肪酸が濃縮されたフローのダクトが接続された、液相における第２クロマトグラフィ分離用ユニットであって、固定床クロマトグラフィ分離ユニットである第２クロマトグラフィ分離用ユニットと、
を備える。
【００３５】
１つの実施形態によると、第１クロマトグラフィ分離用ユニットは、複数のカラム；および好ましくは擬似移動床もしくは移動床システムまたはフローの注入ポイントおよび回収ポイントが非同期方式で周期的に変位されたシステムを有するクロマトグラフィ分離ユニットである。
【００３６】
１つの実施形態によると、装置は：
第１脂肪酸が濃縮されたフローの第２ダクトによって供給され、出口で、一方では第１脂肪酸が濃縮されたフローの第３ダクト、他方では第４脂肪酸が濃縮されたフローのダクトに接続された、液相における第３クロマトグラフィ分離ユニットであって、好ましくは固定床クロマトグラフィ分離ユニットである第３クロマトグラフィ分離用ユニットを備える。
【００３７】
１つの実施形態によると、
第２クロマトグラフィ分離用ユニットは、シングルカラムを有するクロマトグラフィ分離ユニットであり、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである；および／または、
適用可能ならば、第３分離ユニットは、シングルカラムを有するクロマトグラフィ分離ユニットであり、好ましくは定常状態でリサイクルするシステムである。
【００３８】
１つの実施形態によると、第１クロマトグラフィ分離用ユニット、第２クロマトグラフィ分離用ユニットおよび第３クロマトグラフィ分離ユニットの少なくとも１つは、５ｃｍ以上、もしくは１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の長さを有する；および／または１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の直径を有する分離カラムを備える。
【００３９】
本発明は、従来技術の欠点を克服することを可能にする。本発明は、さらに詳細には、従来技術のものよりも簡単なクロマトグラフィ装置で実施することができ、さらに比生産性が高くかつ溶媒の消費が少ない、脂肪酸（特にポリ不飽和脂肪酸）を精製するための方法を提供する。
【００４０】
これは、擬似移動床などを有するユニットなどの、複数のカラムを有する分離ユニットで実施することができる分離ユニットでの第１分離ステップの後に、固定床分離ユニット（好ましくはシングルカラム）での分離ステップを実施した結果として達成される。
【００４１】
好ましい実施形態において、本発明は、前記第１ステップの後に、固定床分離ユニット

（好ましくはシングルカラム）での２つの連続ステップを提供する。
【００４２】
本発明は、高純度の脂肪酸（特にポリ不飽和脂肪酸）を提供することを可能にし、それによってチャージマルチコンパウンドを使用して栄養補助食品または薬物の組成物で使用することが可能になり、このことは使用するクロマトグラフィカラムの数を最小にすることによって可能になる。
【図面の簡単な説明】
【００４３】
【図１】図１は、本発明を実施するための装置の一実施形態を図示する。
【発明を実施するための形態】
【００４４】
本発明を次に以下の説明でさらに詳細かつ非限定的方法で説明する。
【００４５】
概して、表示した比率は、特に指示のない限り質量比である。
【００４６】
以下の全説明は、第１脂肪酸が「第１ＰＵＦＡ」と呼ばれるＰＵＦＡである好ましい実施形態に関連して行う。しかしながら、この説明は、第１脂肪酸がポリ不飽和でない場合も同様に妥当である。したがって、「第１ＰＵＦＡ」を本明細書中の以下の記載でさらに一般的な用語「第１脂肪酸」と置き換えることが好適である。このために、第１脂肪酸は、飽和脂肪酸、モノ（一価）不飽和脂肪酸、または分岐、天然もしくは修飾脂肪酸などの脂肪酸誘導体であってもよい。
【００４７】
調製方法
本発明の方法は、初期混合物を使用して、第１ＰＵＦＡを精製形態で得ることを可能にする。初期混合物は、第１ＰＵＦＡに加えて他の望ましくない脂肪酸、すなわち概して飽和またはモノ不飽和脂肪酸および他のＰＵＦＡ、ならびに他の可能な不純物も含む。本明細書中で前述の第２脂肪酸、第３脂肪酸および第４脂肪酸は他の可能な不純物の一部である。
【００４８】
初期混合物は、魚、植物、藻類および／または酵母由来の、好ましくは魚由来の脂肪酸の混合物であってもよい。初期混合物は、例えば魚油もしくは藻類油、または酵母油などの原材料であってもよい。初期混合物は、本明細書中で上述の原材料由来の、例えば魚油、藻類油および／または酵母油由来であってもよい。油は、例えば天然または遺伝子組換え植物、藻類もしくは酵母から抽出できる。
【００４９】
「原材料由来の製品」とは、１つまたは複数の処理ステップに供した原材料を意味する。これらの処理ステップは、細胞分裂、粉砕、分離もしくは精製（例えば分画）の１つもしくは複数のステップ、ならびに／またはトリグリセリドを遊離脂肪酸に変換するための加水分解のステップ、ならびに／または脂肪酸をアルキルエステルに、好ましくはエチルエステルに変換するためのエステル交換のステップ、ならびに／または過酸化物価および／もしくはアニシジン価（以下参照）を減少させるステップ、ならびに／または分子蒸留のステップ、ならびに／または１つもしくは複数のクロマトグラフィ分離ステップなどを含む。
【００５０】
有利な実施形態によると、初期混合物は、エステル化またはエステル交換製品、例えば魚油、植物油、藻類油またはエステル交換酵母油である。
【００５１】
そのため、本発明の方法で入手または使用する各脂肪酸（特に各ＰＵＦＡ）は、特に、モノグリセリド、ジグリセリドもしくはトリグリセリド、エステル、リン脂質、アミド、ラクトンまたは塩の形態の脂肪酸誘導体であってもよい。

【００５２】
遊離脂肪酸およびエステル形態が好ましく、エステルが非常に好ましい。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、特にＣ１～Ｃ４、例えばメチルエステルおよびエチルエステルである。エチルエステルが好ましい。
【００５３】
そのため、本願で記載する第１ＰＵＦＡ、第２脂肪酸、第３脂肪酸および第４脂肪酸は、例えば遊離脂肪酸またはエステルの形態であってもよく、好ましくはエチルエステル化合物の形態である。
【００５４】
図１に関して、本発明の方法は、第１クロマトグラフィ分離用ユニット３を備えた装置で実施できる。第１クロマトグラフィ分離用ユニット３は第１ＰＵＦＡと第２脂肪酸とを分離させる。
【００５５】
第１ＰＵＦＡと所定の脂肪酸との間の分離について本願で言及する場合は常に、所定の脂肪酸に関する分離と同時に他の脂肪酸も第１ＰＵＦＡから分離され得ると理解される。
【００５６】
概して、各クロマトグラフィ分離は第１ＰＵＦＡをそれよりも極性が高い化合物またはそれよりも極性が低い化合物から分離する。分離は、脂肪族鎖長のサイズおよび不飽和数の基準にしたがって実施することもできる。さらに一般的には、その効果は使用する溶離液に依存し得るので、分離は、場合によって異なる保持時間の基準にしたがって実施され、そのため、第１ＰＵＦＡをそれよりも保持されるかまたは保持されない不純物から分離することが可能になる。
【００５７】
分離の温度は、当業者に周知の基準にしたがって、５℃～９０℃、優先的には１５～６０℃、さらに優先的には周囲温度～４５℃の範囲内に調節できる。適用可能ならば、カラム中で単相状態、好ましくは液体または超臨界を維持するために圧力が調節される。
【００５８】
第１クロマトグラフィ分離用ユニット３に、供給ダクト１によって脂肪酸の混合物を供給し、同様に供給ダクト２によって第１溶離液を供給する。
【００５９】
第１クロマトグラフィ分離用ユニット３の出口で、一方では第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローの第１ダクト５が、他方では第２脂肪酸が濃縮されたフローのダクト４が接続されている。
【００６０】
本願において、「濃縮された」という語は、相対的な意味を有し、すなわち、化学種Ａが濃縮されたフローを回収することを可能にする、初期フローから始まる化学種Ａと化学種Ｂとの分離は、回収されたフローが初期フローの質量比（Ａ／Ｂ）よりも大きい質量比（Ａ／Ｂ）を有することを意味する。
【００６１】
初期混合物を上記で記載されるような予備的処理ステップに供していてもよく、その場合、図示していない対応する処理ユニットを、本発明の装置に含むことができる。
【００６２】
第１ＰＵＦＡと第３脂肪酸との分離を確実にするために、第２クロマトグラフィ分離ユニット６を下流に提供する。この第２クロマトグラフィ分離ユニット６は第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローの第１ダクト５により供給され、同様に第２溶離液の供給ダクト７により供給される。
【００６３】
第２クロマトグラフィ分離用ユニット６の出口で、一方では第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローの第２ダクト９が、他方では第３脂肪酸が濃縮されたフローのダクト８が接続されている。

【００６４】
好ましくは、第１ＰＵＦＡと第４脂肪酸との分離を確実にするために、第３クロマトグラフィ分離ユニット１０を提供する。この第３クロマトグラフィ分離ユニット１０は、第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローの第２ダクト９によって供給され、同様に第３溶離液を含む供給ダクト１１によって供給される。
【００６５】
第３クロマトグラフィ分離用ユニット１０の出口で、一方では第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローの第３ダクト１２が、他方では第４脂肪酸が濃縮されたフローのダクト１３が接続されている。
【００６６】
好ましくは、方法は、本明細書中で前述の３つのユニットにちょうど３つのクロマトグラフィ分離ステップを含む。
【００６７】
別法として、方法は、クロマトグラフィ分離を２つだけ含み、この場合、第３クロマトグラフィ分離用ユニット１０は省略される。
【００６８】
さらに別法として、方法は、４つ（またはそれ以上）の連続したクロマトグラフィ分離ステップを含むことができ、この場合、さらなるクロマトグラフィ分離ユニットを同様に追加する。
【００６９】
「クロマトグラフィ分離ユニット」という語は、シングルカラムを有するクロマトグラフシステムまたは複数のカラムを有するクロマトグラフシステムのいずれも意味する。
【００７０】
それは、固定床を有するか、または有しないクロマトグラフシステムであってもよい。固定床クロマトグラフシステム中で、分離する化合物の混合物は、概して円筒形の筐体（またはカラム）中に透過する。カラムは、流体を透過可能である多孔性材料（固定相）床を含む。混合物中の各化合物の透過速度は化合物の物理的特性に左右される。固定相上に最も保持される化合物は、固定相上に最も保持されない化合物よりもゆっくりと透過する。この原則によって、所望の分離を実施することが可能になる。
【００７１】
そのような処理を直列または並列の複数のカラムで実施することが可能であるが、概して固定床システムにおける１つのクロマトグラフィ分離はシングルカラムで実施する。
【００７２】
そのような固定床クロマトグラフシステムの例は、ＨＰＬＣ（高性能液体クロマトグラフィ）またはＣＹＣＬＯＪＥＴ^{TM}（定常段階でリサイクルするシステム）システムである。
【００７３】
ＣＹＣＬＯＪＥＴ^{TM}システムは、例えば明示的に参照される文献ＵＳ６，０６３，２８４号に記載されている。これは、シングルカラムを備えた非連続的クロマトグラフィ分離システムであり、このシステムでは、クロマトグラムの分離されなかった部分がメインポンプによってリサイクルされながら、最も保持される化学種（ｉ）と、そして最も保持されない化学種（ｉｉ）とがカラムの出口で別々に回収される。分離する混合物をクロマトグラムのリサイクルされた部分に注入ループによって周期的に注入する。注入ループを、好ましくはメインポンプとカラムとの間に接続する。複数のクロマトグラフサイクル後に、方法は、注入した製品の量がカラムの出口で別々に回収される製品の量に等しい、周期的定常状態に達する。
【００７４】
１つの実施形態によると、定常状態でリサイクルするシングルカラム固定床システムでのクロマトグラフィ分離は、循環的であり、次のステップを含む：
溶離液ポンプによってカラム中で循環するクロマトグラフプロファイルを確立し、維持

するステップ、
分離対象の少なくとも２つの化合物を含むサンプルを前記循環クロマトグラフプロファイルに非連続的かつ各サイクルで注入し、循環クロマトグラフプロファイル中に、ループ中に存在するサンプルを注入するために、注入バルブにより注入の位置を制御した注入ループによって注入を実施し、この際、注入バルブは、注入のはじめから、プロファイルの全体がカラムから溶出され、その後、全プロファイルがカラム中にある場合に注入ループをロードするために注入バルブをローディング位置に切り替えるまで、注入位置にとどまるステップ、および、
循環プロファイルを使用して濃縮した少なくとも２つのフラクション（画分）を、非連続的かつ周期的方法で回収するステップ。

【００７５】
この分離は、次のステップも含むことができる：
溶離液ポンプによってサイクル中に略連続的に、溶離液をカラム中に移動相として通すステップ。

【００７６】
この分離は、次のステップも含むことができる：
第１フラクションの回収の開始から始まって第１フラクションの回収の次の開始まで起こる事象を記録するステップ；
第３フラクションの回収中に溶離液ポンプを中断するステップであって、この中断が、サイクルが一時的に再生できるような方法でサイクルの最後まで続くステップ。

【００７７】
１つの実施形態によると、維持された循環プロファイルでの注入の間に循環するプロファイルの損失はない。

【００７８】
このシステムの詳細な実施形態は、前記文献ＵＳ６，０６３，２８４号の第５欄第３６行～第１０欄第４１行に記載されている。

【００７９】
クロマトグラフィ分離ユニットは非固定床を有するクロマトグラフシステムでもあってもよい。非固定床システムは、マルチカラムシステムであり、固定相床および注入の相対的位置ならびに／またはフローの回収ポイントが時間とともに移動する。

【００８０】
非固定床を有するそのようなクロマトグラフシステムの例は、ＳＭＢ、ｉＳＭＢ、ＳＳＭＢ、ＡＭＢ、ＶＡＲＩＣＯＬ™、ＭＯＤＩＣＯＮ™、ＰＯＷＥＲＦＥＥＤ™、ＤＣＣまたはＭＣＳＧＰシステムである。

【００８１】
ＳＭＢシステムは、直列に接続された、吸着剤を含む複数の個々のカラムを備える。溶離液のフローは第１方向にしたがってカラムを通過する。供給および溶離液のフローの注入ポイント、ならびに分離した化合物の回収ポイントは、バルブセットによって周期的かつ同時にシフト（移動）される。全体的効果は、固体吸着剤の移動床を含むシングルカラムの操作をシミュレート（模擬）することであり、固体吸着剤は溶離液のフローに逆らう方向に移動する。そのため、ＳＭＢシステムは、溶離液が通過する固体吸着剤の固定床（静止床）を含むカラムから構成されるが、オペレーション（操作）は流れに逆らう連続移動床をシミュレートするようなものである。

【００８２】
ＳＭＢシステムのほとんどの従来型形態は４つのゾーンを有するＳＭＢシステムである。他の可能な形態は、３つのゾーンを有するＳＭＢシステムおよび２つのゾーンを有するＳＭＢシステムである（例えば、明確に参照する、論文“Ｔｗｏ Ｓｅｃｔｉｏｎ Ｓｉｍｕｌａｔｅｄ Ｍｏｖｉｎｇ Ｂｅｄ Ｐｒｏｃｅｓｓ” ｏｆ Ｋｗａｎｇｎａｍ Ｌｅｅ, ｉｎ Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ３５（４）：５１９－５３４, ２０００で記載されているもの）。

【００８３】
ｉＳＭＢシステムは、例えば明示的に参照する、文献ＥＰ０３４２６２９号およびＵＳ５，０６４，５３９号で記載されている。ＳＳＭＢシステムは、周期的に適用するサブシーケンスへのフローの導入および回収を削除する。ｉＳＭＢおよびＳＳＭＢシステムには、システムが製品の入口または出口のない閉鎖ループとして動作する少なくとも１つのステップがある。
【００８４】
ＳＭＢシステムの他の代替物は、経時的に変化するＳＭＢシステムおよび、例えば明示的に参照する、文献ＵＳ５，１０２，５５３号および論文“ＰｏｗｅｒＦｅｅｄ ｏｐｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｓｉｍｕｌａｔｅｄ ｍｏｖｉｎｇ ｂｅｄ ｕｎｉｔｓ：ｃｈａｎｇｉｎｇ ｆｌｏｗ－ｒａｔｅｓ ｄｕｒｉｎｇ ｔｈｅ ｓｗｉｔｃｈｉｎｇ ｉｎｔｅｒｖａｌ”，ｏｆ Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ Ａ，１００６：８７－９９，２００３に記載されているＰＯＷＥＲＦＥＥＤ™システム；例えば、明示的に参照される、文献ＵＳ７，４７９，２２８号で記載されているＭＯＤＩＣＯＮ™システム；ならびに例えば明示的に参照する文献ＵＳ８，２８２，８３１号で記載される、内部再循環を有するＳＭＢシステムである。
【００８５】
ＤＣＣクロマトグラフィシステムは、例えば明示的に参照する文献ＦＲ２８８９０７７号で記載されている。ＤＣＣシステムは、常に開放ループ中にあるという特性を有する移動相および分離する混合物の注入ポイントの周期的変位の逐次法である。それは２以上のカラムを使用する。
【００８６】
ＡＭＢシステムはＳＭＢシステムと類似したオペレーションを有する。しかしながら、バルブシステムによる供給フローおよび溶離液の注入ポイント、ならびに回収ポイントの変位の代わりに、吸着ユニット（カラム）セット（１セットの吸着ユニット）を供給ポイントおよび回収ポイントに対して物理的にシフトさせる。ここでも、オペレーションによって、流れに逆らう連続移動床をシミュレートすることが可能になる。
【００８７】
ＶＡＲＩＣＯＬ™クロマトグラフィシステムは、例えば明示的に参照する文献ＵＳ６，１３６，１９８号、ＵＳ６，３７５，８３９号、ＵＳ６，４１３，４１９号およびＵＳ６，７１２，９７３号に記載されている。ＶＡＲＩＣＯＬ™システムは、直列に接続された、吸着剤を含む複数の個々のカラムを備える。溶離液を、第１方向に沿ってカラムを通過させる。ＳＭＢシステムとは対照的に、分離する混合物および溶離液の注入ポイントならびにシステム中の分離した化合物の回収ポイントを、バルブセットによって周期的かつ非同期的に変位させる。全体的効果は、経時的に様々な長さを有する分離ゾーンを生じさせることであり、このため、固定相をそれが最も有用なゾーンに動的に割り当て、より少ないクロマトグラフィ分離ユニットと同様の分離力を提供し、かつ、生産性の増加を可能にすることである。ＳＭＢシステムと対照的に、ＶＡＲＩＣＯＬ™システムは固体吸着剤の移動床を含むシングルカラムの作業工程をシミュレートせず、固体吸着剤は溶離液のフローに逆らう方向で移動し、そのため、ＶＡＲＩＣＯＬ™の動作原理は等価なＡＭＢシステムでは実施できない。
【００８８】
本発明は、分離の第１ステップは、固定床分離ユニット中、または非固定床分離ユニット中のいずれか、そして好ましくは非固定床分離ユニット中で実施される；および分離の第２ステップは、固定床分離ユニット中で実施されることを提供する。
【００８９】
第３ステップは、存在する場合、固定床分離ユニット中、または非固定床分離ユニット中のいずれかで、そして好ましくは固定床分離ユニット中で実施される。
【００９０】

そのため、１つの実施形態によると、第１ステップは非固定床ユニット中で実施され、第２ステップは固定床ユニット中で実施され、そして適用可能ならば（すなわち第３クロマトグラフィ分離ステップが存在すると仮定して）、第３ステップは固定床ユニット中で実施される。

【００９１】

さらに、１つの実施形態によると、第１ステップはマルチカラムユニット中で実施され、第２ステップは、シングルカラムを備えたユニット中で実施され、そして適用可能ならば、第３ステップは、シングルカラムを備えたユニット中で実施される。

【００９２】

１つの実施形態によると、第１ステップはＶＡＲＩＣＯＬ™またはＳＭＢまたはＡＭＢユニット中で実施され、第２ステップはＨＰＬＣまたはＣＹＣＬＯＪＥＴ™ユニット中で実施され、そして第３ステップはＶＡＲＩＣＯＬ™またはＳＭＢまたはＡＭＢユニット中で実施される。

【００９３】

別の好ましい実施形態によると、第１ステップはＶＡＲＩＣＯＬ™またはＳＭＢまたはＡＭＢユニット中で実施され、第２ステップはＨＰＬＣまたはＣＹＣＬＯＪＥＴ™ユニット中で実施され、そして第３ステップはＨＰＬＣまたはＣＹＣＬＯＪＥＴ™ユニット中で実施される。

【００９４】

好ましい代替案では、第１ステップはＶＡＲＩＣＯＬ™ユニット中で実施され、第２ステップはＣＹＣＬＯＪＥＴ™ユニット中で実施され、そして第３ステップはＣＹＣＬＯＪＥＴ™ユニット中で実施される。

【００９５】

分離ステップは、物理的に分離したユニット中で同時に実施できるか、または物理的に分離したユニットもしくは同じユニット中で連続して実施できる。

【００９６】

クロマトグラフィ分離の２ステップをＳＭＢまたはＡＭＢタイプのシステムで実施する場合、それらを同じＳＭＢまたはＡＭＢシステムで同時に実施することが可能であることに留意しなければならない。同じ機器での同時実施の一例は、明確に参照する、文献ＷＯ２０１１／０８０５０３号、または文献ＷＯ２０１３／００５０４８号、または文献ＷＯ２０１３／００５０５１号で記載されている。

【００９７】

好ましくは、クロマトグラフィ分離ユニットのすべては物理的に別個のものである。

【００９８】

１つの実施形態によると、第１クロマトグラフィ分離用ユニット３の１つもしくは複数の分離カラム（好ましくは複数の分離カラム）は、５ｃｍ以上、もしくは１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の合計または累積長さを有する；および／または１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の直径を有する。

【００９９】

１つの実施形態によると、第２クロマトグラフィ分離用ユニット６の１つまたは複数の分離カラム（好ましくは１つの分離カラム）は、５ｃｍ以上、もしくは１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の合計もしくは累積長さを有する；および／または１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の直径を有する。

【０１００】

１つの実施形態によると、第３クロマトグラフィ分離用ユニット１０の１つもしくは複数の分離カラム（好ましくは１つの分離カラム）は、５ｃｍ以上、もしくは１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の合計または累積長さを有する；および／または直径１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の直径を有する。

【０１０１】

１つの実施形態によると、本発明の方法または装置で使用するクロマトグラフィカラムはすべて、５ｃｍ以上、もしくは１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍ以上の合計もしくは累積長さを有する；および／または１０ｃｍ以上、もしくは２０ｃｍ以上、もしくは２５ｃｍ以上、もしくは３０ｃｍ以上、もしくは４０ｃｍ以上、もしくは５０ｃｍ以上、もしくは６０ｃｍの直径を有する。

【０１０２】

カラムの長さおよび直径は、カラムの有用な寸法、すなわちカラム中の固定相床の寸法である。様々なカラム形状があり、軸または放射円筒型だけでなく、明示的に参照される、非円筒形セクションを有するセルもある（この場合、直径とはそのセクションの最大寸法を指す）。

【０１０３】

各クロマトグラフィ分離ステップを、吸着剤（固定相）として逆相で実施できる。例えば、吸着剤は、アルキル基（特にＣ４、Ｃ８、Ｃ１８、Ｃ２４、Ｃ３０）、フェニルなどの有機基を有する化学的に修飾されたシリカ系の若干極性である樹脂または固定相をベースとして使用できる。

【０１０４】

各クロマトグラフィ分離ステップは水－有機溶離液、すなわち１つまたは複数の有機溶媒と水との混合物を使用することによって実施できる。好ましくは、クロマトグラフィ分離ステップのすべては、水－有機溶離液を使用して実施される。別法として、あるクロマトグラフィ分離ステップを、純粋な有機溶離液を使用して実施することが可能である。

【０１０５】

本発明の枠組みで（特に水－有機溶離液を形成するために）使用できる有機溶媒は、例えばエタノール、プロパノール、およびさらに好ましくはメタノールなどのアルコール；アセトンまたはメチルエチル－ケトンなどのケトン；アセトニトリルなどのニトリル；酢酸メチルまたは酢酸エチルなどのエステル；テトラヒドロフランなどのフラン；ジエチルエーテルまたはメチルエチルエーテルなどのエーテル；および前述のもののうちの２つもしくはそれ以上の組み合わせである。メタノールおよびアセトンが好ましい有機溶媒である。

【０１０６】

各水－有機溶離液は、溶離液中の１つまたは複数の有機溶媒に対する水の体積比である、水／有機比によって特徴づけられる。

【０１０７】

各水－有機溶離液の水／有機比は、好ましくは０．０１：９９．９９から３０：７０、好ましくは５：９５から２５：７５まで変化させることができる。

【０１０８】

クロマトグラフィ分離の様々なステップを、同じ組成または異なる組成を有する溶離液で実施できる。

【０１０９】

異なる組成を有する溶離液、特に異なる水／有機比を有する溶離液を使用することが好ましく、これによって分離の各ステップでの溶離液の溶離強度を調節すること、したがって各ステップで異なる成分を分離することが可能になる。各分離ステップで分離されるこ

とになる特定の化学種間におけるクロマトグラフィ選択性を調節し、それにより、各ステップで異なる化合物を分離するために、様々なステップにおいて異なる有機溶媒から構成される溶離液を使用することも望ましい可能性がある。

【０１１０】

好ましくは、１つもしくは複数の有機溶媒中の第１溶離液の質量濃度を、約２％、好ましくは約１％、または約０．５％、または約０．２％、または約０．１％に調節し；適用可能ならば、好ましくは１つもしくは複数の有機溶媒中の第２溶離液の質量濃度を約２％、好ましくは約１％、または約０．５％、または約０．２％、または約０．１％に調節し；適用可能ならば、好ましくは１つもしくは複数の有機溶媒中の第３溶離液の質量濃度を約２％、好ましくは約１％、または約０．５％、または約０．２％、または約０．１％に調節する。溶離液の組成の調節は、必要とされる調節を進めるために水および／または１つもしくは複数の有機溶媒の供給を確実にすることによって実施される。

【０１１１】

第１クロマトグラフィ分離ステップでは、第４ＰＵＦＡは好ましくは第４ＰＵＦＡよりも保持される化合物（特に第２脂肪酸）から分離される。第１クロマトグラフィ分離用ユニット３が非固定床ユニットである場合、第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローはラフィネートであり、第２脂肪酸が濃縮されたフローは抽出物である。

【０１１２】

第２クロマトグラフィ分離ステップでは、第４ＰＵＦＡは好ましくは第４ＰＵＦＡよりも保持される化合物（特に第３脂肪酸）から分離される。

【０１１３】

第３クロマトグラフィ分離ステップでは、第４ＰＵＦＡは好ましくは第４ＰＵＦＡよりも保持される化合物（特に第４脂肪酸）から分離される。

【０１１４】

クロマトグラフィ分離のステップに由来する各フローは、好ましくは濃縮ステップを経る。溶離液（有機溶媒および水）を除去するように、または有機溶媒および水中のフローの質量含有率を、９０％未満、もしくは８０％未満、もしくは７０％未満、もしくは６０％未満、もしくは５０％未満、もしくは４０％未満、もしくは３０％未満、もしくは２０％未満、もしくは１０％未満、もしくは５％未満、もしくは２％未満、もしくは１％未満、もしくは０．５％未満、もしくは０．１％未満のレベルまで減少させるような方法で、フローを濃縮する。

【０１１５】

そのため、好ましい実施形態では、少なくとも１つの濃縮ユニット（図示せず）をクロマトグラフィ分離ユニット３、６、１０の各々と関連させる。

【０１１６】

そのため、好ましくは、第１クロマトグラフィ分離の最後に回収される第１ＰＵＦＡが濃縮された第１フローは濃縮フロー（溶離液が減少した、または有機溶媒および水を略含まない）であり；同様に、第２クロマトグラフィ分離の最後に回収される第１ＰＵＦＡが濃縮された第２フローは、好ましくは濃縮フロー（溶離液が減少した、または有機溶媒および水を略含まない）であり；同様に、適用可能ならば、第３クロマトグラフィ分離の最後で回収される第１ＰＵＦＡが濃縮された第３フローは、好ましくは濃縮フロー（溶離液が減少した、または有機溶媒および水を略含まない）である。

【０１１７】

場合により、第２脂肪酸が濃縮されたフロー、第３脂肪酸が濃縮されたフロー、および適用可能ならば、第４脂肪酸が濃縮されたフローは濃縮フローである（溶離液が減少した、または有機溶媒および水を略含まない）。

【０１１８】

各濃縮ユニット中で、溶離液を脂肪酸の混合物から分離するような方法で蒸発させることができ、凝縮させることができる。例えば、再循環で流下薄膜を有するエバポレータ、上昇流エバポレータ、スクレープトフィルムエバポレータ、薄膜エバポレータ、熱サイホ

ンエバポレータ、ロータリーエバポレータ、蒸留カラム、精留カラムもしくはその他の任意のエバポレータまたは装置の底部で溶離液の蒸発および濃縮脂肪酸の濃縮を可能にするエバポレータの組み合わせを使用することが可能である。蒸発は、好ましくは大気圧より低い圧力で、特に７５０ｍｂａｒ以下、または５００ｍｂａｒ以下、または３００ｍｂａｒ以下の圧力で実施する。

【０１１９】

別法として、１つもしくは複数の分離段階を有する膜分離デバイス、または蒸発手段および膜分離手段の組み合わせを使用できる。

【０１２０】

（例えば、蒸発されおよび凝縮され、または他の方法で分離される）濃縮ステップの最後に得られる溶離液をリサイクルして、方法の１つまたは複数のステップ、特にクロマトグラフィ分離の１つまたは複数のステップにリサイクルできる。

【０１２１】

そのため、本発明の方法は好ましくはクロマトグラフィ分離の第１ステップで使用する溶離液のリサイクルを行う。さらに好ましい方法で、クロマトグラフィ分離の第１ステップで再使用するために、溶離液がリサイクルされる。

【０１２２】

好ましくは、本発明の方法はクロマトグラフィ分離の第２ステップで使用する溶離液のリサイクルを行う。さらに好ましい方法で、クロマトグラフィ分離の第２ステップで再使用するために溶離液がリサイクルされる。

【０１２３】

そのため、本発明の方法は好ましくはクロマトグラフィ分離の第３ステップで使用する溶離液のリサイクルを行う。さらに好ましい方法で、クロマトグラフィ分離の第３ステップで再使用するために溶離液がリサイクルされる。

【０１２４】

特定の実施形態によると、第１ＰＵＦＡが濃縮された第１フローを使用して分離された溶離液は、５０％超、好ましくは６０％超、好ましくは７０％超、好ましくは８０％超、好ましくは９０％超、好ましくは９５％超、好ましくは９８％超、好ましくは９９％超がリサイクルされる。

【０１２５】

特定の実施形態によると、第１ＰＵＦＡが濃縮された第２フローを使用して分離された溶離液は、５０％超、好ましくは６０％超、好ましくは７０％超、好ましくは８０％超、好ましくは９０％超、好ましくは９５％超、好ましくは９８％超、好ましくは９９％超がリサイクルされる。

【０１２６】

特定の実施形態によると、第１ＰＵＦＡが濃縮された第３フローを使用して分離された溶離液は、５０％超、好ましくは６０％超、好ましくは７０％超、好ましくは８０％超、好ましくは９０％超、好ましくは９５％超、好ましくは９８％超、好ましくは９９％超がリサイクルされる。

【０１２７】

特定の実施形態によると、第２脂肪酸が濃縮されたフローを使用して分離された溶離液は、５０％超、好ましくは６０％超、好ましくは７０％超、好ましくは８０％超、好ましくは９０％超、好ましくは９５％超、好ましくは９８％超、好ましくは９９％超がリサイクルされる。

【０１２８】

特定の実施形態によると、第３脂肪酸が濃縮されたフローを使用して分離された溶離液は、５０％超、好ましくは６０％超、好ましくは７０％超、好ましくは８０％超、好ましくは９０％超、好ましくは９５％超、好ましくは９８％超、好ましくは９９％超がリサイクルされる。

【０１２９】

特定の実施形態によると、第４脂肪酸が濃縮されたフローを使用して分離された溶離液は、５０％超、好ましくは６０％超、好ましくは７０％超、好ましくは８０％超、好ましくは９０％超、好ましくは９５％超、好ましくは９８％超、好ましくは９９％超がリサイクルされる。

【０１３０】

好ましくは、各クロマトグラフィ分離ユニットの入口で供給され、分離されることを意図する供給製品は、可能な限り溶媒を含まない。

【０１３１】

そのため、

初期混合物は、８０％未満の有機溶媒、好ましくは６０％未満もしくは４０％未満もしくは２０％未満もしくは１０％未満もしくは５％未満もしくは２％未満もしくは１％未満の有機溶媒を含み、さらに好ましくは、有機溶媒を略含まない脂肪酸の混合物である；および／または

適用可能ならば、第２クロマトグラフィ分離用ユニット６に供給される第１ＰＵＦＡが濃縮された第１フローは、８０％未満の有機溶媒、好ましくは６０％未満または４０％未満または２０％未満または１０％未満または５％未満または２％未満または１％未満の有機溶媒を含み、特に好ましくは有機溶媒を略含まない脂肪酸の混合物である；および／または

第３クロマトグラフィ分離用ユニット１０に供給される第１ＰＵＦＡが濃縮された第２フローが、８０％未満の有機溶媒、好ましくは６０％未満または４０％未満または２０％未満または１０％未満または５％未満または２％未満または１％未満の有機溶媒を含み、さらに好ましくは、有機溶媒を略含まない脂肪酸の混合物である。

【０１３２】

本発明の方法は、場合によって、１回または複数回のクロマトグラフィ分離後の酸素化された（酸素を含んだ）化合物の除去(または量の減少)のステップを提供する。

【０１３３】

好ましくは、このステップはクロマトグラフィ分離のステップではなく、クロマトグラフィ分離ユニット中で実施されない。

【０１３４】

好ましくは、このステップは、フロー中に存在する他の脂肪酸（アルデヒドおよび過酸化物タイプの酸素化化合物を除く）から第１ＰＵＦＡを実質的に分離しない。

【０１３５】

酸素化化合物を除去するステップは、第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローの第３ダクト１２により（または２つのクロマトグラフィ分離ステップしかない場合は第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローの第２ダクト９により）直接的または間接的に供給される処理ユニット１４中で実施できる。このユニットの出口で、第１精製ＰＵＦＡの回収用ダクト１５が接続されている。

【０１３６】

処理ユニット１４は、特にショートパスを有する分子蒸留ユニットまたはエバポレータであってもよい。ショートパスを有するエバポレータは内部コンデンサ（凝縮器）を備え、好ましくは１０００ｓ未満、好ましくは１００ｓ未満、好ましくは１０ｓ未満の滞留時間、好ましくは１０ｍｂａｒ未満、好ましくは１ｍｂａｒ未満、好ましくは０．１ｍｂａｒ未満、好ましくは０．０１ｍｂａｒ未満、好ましくは０．００１ｍｂａｒ未満の圧力下、２００℃以下、好ましくは１５０℃以下、好ましくは１２０℃以下、好ましくは１００℃以下、好ましくは８０℃以下の温度で、蒸発させることができる。

【０１３７】

あるいは、処理ユニット１４は、吸着基材と接触させるためのユニットであってもよい。

【０１３８】

吸着基材は、過酸化物およびアルデヒド化合物などの酸素化化合物を吸着できる任意の

基材である。それは、例えば、シリカ、アルミナ、活性炭およびそれらの誘導体、特にシリカゲル、シリケート、アルミネートおよびアルミノシリケートから選択できる。ベントナイトなどのクレイも珪藻土の基材と同様に好適な基材の一例である。

【０１３９】

吸着は、吸着剤床を透過させることにより、非連続的に、すなわち「バッチ」で、または連続的に実施できる。好ましくは、脂肪酸をこのステップの間に希釈せず、そして特に溶媒を添加しない。接触は、例えば５分～２４時間、特に１０分～１０時間、２０分～５時間、３０分～２時間、および４５分～１時間３０分間持続し得る。

【０１４０】

使用する吸着剤の量は、吸着剤の性質および酸素化化合物を捕捉するその能力に依存する。例えば、処理するフロー（脂肪酸の混合物）１ｋｇあたり１～１０００ｇの吸着剤、特に１０～５００ｇ／ｋｇ、さらに詳細には２５～２００ｇ／ｋｇであってもよい。

【０１４１】

接触させた後、吸着剤を脂肪酸の混合物から分離し、残存する吸着剤によるコンタミ（汚染）を防止するために、脂肪酸の混合物をろ過できる。

【０１４２】

好ましくは、酸素化化合物の吸着剤との結合は実質的に不可逆的であり、すなわち吸着剤は再生されない。

【０１４３】

しかしながら、例えば、体積および／または廃棄物の処理費用を制限するために、熱処理により吸着剤を再生することが可能である。

【０１４４】

処理ユニット１４中の処理ステップは、処理されたフローの過酸化物価を少なくとも２５％、好ましくは少なくとも５０％、好ましくは少なくとも７５％、好ましくは少なくとも８０％または少なくとも９０％または少なくとも９５％または少なくとも９８％減少させることを可能にする。

【０１４５】

処理ユニット１４中の処理ステップは、処理されたフローのアニシジン価を少なくとも２５％、好ましくは少なくとも５０％、好ましくは少なくとも７５％、好ましくは少なくとも８０％または少なくとも９０％または少なくとも９５％または少なくとも９８％減少させることを可能にする。

【０１４６】

過酸化物価は、脂肪酸の混合物中の過酸化物化合物の量を評価する。使用する分析法は、好ましくは欧州薬局方の２．５．５の方法Ａである。

【０１４７】

アニシジン価は、脂肪酸の混合物中のアルデヒド化合物の量を評価する。使用する分析法は好ましくは欧州薬局方２．５．３６である。

【０１４８】

１つの実施形態によると、処理ステップから生じるフロー（第１精製ＰＵＦＡを回収するためのダクト１５中に回収される製品）の過酸化物価は、１０以下、または９以下、または８以下、または７以下、または６以下、または５以下、または４以下、または３以下、または２以下、または１．５，以下、または１以下である。

【０１４９】

１つの実施形態によると、処理ステップから生じるフロー（第１精製ＰＵＦＡを回収するためのダクト１５中に回収される製品）のアニシジン価は、２０以下、または１８以下、または１６以下、または１４以下、または１２以下、または１０以下、または９以下、または８以下、または７以下、または６以下、または５以下である。

【０１５０】

本明細書中で記載するものと類似した別の処理ステップ、さらに詳細には分子蒸留ステップも、上流に、特にクロマトグラフィ分離の任意のステップの前に提供できる。

【０１５１】
得られる製品
１つの実施形態によると、第１ＰＵＦＡはオメガ－３脂肪酸である。
【０１５２】
異なる実施形態によると、第１ＰＵＦＡは、ＥＰＡ、またはＤＨＡ、またはＡＲＡ、またはＤＰＡ、またはＳＤＡであってもよい。
【０１５３】
１つの実施形態によると、第１ＰＵＦＡはＥＰＡであり、第２脂肪酸は飽和またはモノ不飽和脂肪酸であり、第３脂肪酸はＤＨＡまたはＳＤＡであり、第４脂肪酸はＤＨＡおよびＳＤＡのうち第３脂肪酸でないほうである。例えば、第３脂肪酸はＤＨＡであり、第４脂肪酸はＳＤＡである。
【０１５４】
方法の最後で得られた（第１精製ＰＵＦＡを回収するためのダクト１５中、または酸素化化合物を除去するステップがない場合は第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローを回収するための第３ダクト１２中、または第３クロマトグラフィ分離ステップも酸素化化合物を除去するステップもない場合は第１ＰＵＦＡが濃縮されたフローを回収するための第２ダクト９中に回収された）最終製品中の第１ＰＵＦＡ中の濃度は（脂肪酸の全体に対して）、約８０％以上、好ましくは約９０％以上、または約９５％以上、または約９７％以上、または約９８％以上、または約９９％以上であってもよい。
【０１５５】
この最終製品中の第２脂肪酸の濃度は、（脂肪酸の全体に対して）約１％以下、または約０．１％以下、または約０．０５％以下、または約０．０３％以下、または約０．０１％以下であってもよい。
【０１５６】
この最終製品中の第３脂肪酸の濃度は、（脂肪酸の全体に対して）約１％以下、または約０．１％以下、または約０．０５％以下、または約０．０３％以下、または約０．０１％以下であってもよい。
【０１５７】
この最終製品中の第４脂肪酸の濃度は、（脂肪酸の全体に対して）約１％以下、または約０．１％以下、または約０．０５％以下、または約０．０３％以下、または約０．０１％以下であってもよい。
【０１５８】
例えば、方法の最後で得られる最終製品は、（脂肪酸の全体に対して）約８０％以上、または約９５％以上、または約９７％以上、または約９８％以上、または約９９％以上の割合のＥＰＡ；および約１％以下、または約０．１％以下、または約０．０５％以下、または約０．０３％以下、または約０．０１％以下の割合のＤＨＡを含むことができる。
【０１５９】
第１ＰＵＦＡが濃縮されたオイル（油）は、例えば最終的な剤形化（製剤化）および／またはカプセル封入など、包装および／または使用するまで空気や光から遠ざけて保管される。
【０１６０】
１つの実施形態によると、最終製品を医薬的および／または食事的（栄養学的）に許容されるビヒクル（担体）ならびに／または賦形剤および／もしくは希釈剤と組み合わせる。この製品はそのため、例えばカプセル、キャップ、もしくはタブレット（錠剤）の形態（または経口もしくは局所もしくは非経口投与に適したその他の形態）に形成することができる。
【０１６１】
個々の投与形態各形態（例えばキャップまたはカプセル）は、例えば２５０～１５００ｍｇ、好ましくは３００～１０００ｍｇの本明細書中で上述の製品を含むことができる。
【０１６２】

製品は、例えば、高トリグリセリド血症、高コレステロール血症および高血圧などの心血管疾患、ならびに不整脈、心房および／または心室細動、心代償不全および心不全などの心血管疾患の危険因子の防止および／または治療および／または予防用；梗塞および再梗塞の一次および二次予防用；例えば自己免疫疾患、潰瘍性大腸炎、腫瘍性病理、神経系の疾患、細胞の老化、脳梗塞、虚血性疾患、乾癬などの前記ＰＵＦＡで治療できるその他の病理の治療用の医薬組成物の調製のために使用できる。

【０１６３】

あるいは、製品は、準医薬（ｐａｒａｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ）、そして特に食事用途に使用できる。

【０１６４】

実施例

以下の実施例は本発明を限定することなく示す。

【０１６５】

実施例１ａ－実験室規模の２ステップでの精製

この実施例では、９４％を上回るＥＰＡのエチルエステルは、５０％を上回るＥＰＡを含むエチルエステルの混合物を使用する２つのクロマトグラフィステップによって得られる。

【０１６６】

ＥＰＡを、直径が平均で２０μｍの粒子を有するＣ１８逆相シリカ上で２つのクロマトグラフィステップによって精製する。クロマトグラフィ条件は次のとおりである：

ステップ１：

長さ９ｃｍ、直径４．８ｃｍの５つのカラムを備えたＶＡＲＩＣＯＬ^{TM}。

溶離液：９０／１０（ｖ／ｖ）のアセトン／水。

【０１６７】

ラフィネートは、ＥＰＡを約７０％（気相のクロマトグラフィの面積すなわちＣＰＧの面積）で含む。真空中で作動するロータリーエバポレータ中での濃縮後、濃縮ラフィネートは１％未満の残留溶媒を含む。

【０１６８】

ステップ２：

先のステップで得られた濃縮ラフィネートを、長さ３９ｃｍ、直径５ｃｍの軸方向動的圧縮のカラムを備えたＣＹＣＬＯＪＥＴ^{TM}中で精製する。

溶離液：９３／７（ｖ／ｖ）のメタノール／水。

【０１６９】

ＥＰＡを約９４％（ＣＰＧ中の面積）で、そして０．１％未満のＤＨＡを含むフラクションを回収する。このフラクション中のＥＰＡの回収率は９５％を上回る。比生産性は１日あたり１ｋｇの固定相につき２．７６ｋｇの純粋なＥＰＡである。溶離液の原単位（消費量）は１ｋｇの純粋なＥＰＡあたり２２４Ｌである。

【０１７０】

真空中で作動するロータリーエバポレータ中での濃縮後、濃縮フラクションは１％未満の残留溶媒を含む。

【０１７１】

実施例１ｂ（比較例）

この実施例では、前記実施例のステップ１で得られた濃縮ラフィネートは、長さ９ｃｍ、直径４．８ｃｍの５つのカラムを備えたＶＡＲＩＣＯＬ^{TM}システムで、９３／７（ｖ／ｖ）メタノール／水溶離液で精製される。

【０１７２】

ラフィネートは約９２％（ＣＰＧ中の面積）でＥＰＡと、０．１％未満のＤＨＡとを含む。ラフィネート中のＥＰＡの回収率は９５％を上回る。比生産性は１日当たり１ｋｇの固定相につき２．４６ｋｇの純粋なＥＰＡである。溶離液の原単位は１ｋｇの純粋なＥＰＡにつき２５８Ｌである。

【０１７３】
ＣＹＣＬＯＪＥＴ™の比生産性は、したがってＶＡＲＩＣＯＬ™の比生産性よりも１２％高く、ＣＹＣＬＯＪＥＴ™の溶離液の原単位はＶＡＲＩＣＯＬ™の原単位に対して１３％未満である。驚くべきことに、ＣＹＣＬＯＪＥＴ™は第２精製ステップについてＶＡＲＩＣＯＬ™よりも良好な性能をもたらす。
【０１７４】
実施例２ａ：ＣＹＣＬＯＪＥＴ™による実験室規模での超精製
この実施例では、９６％を上回るＥＰＡのエチルエステルは、実施例１ａで得られる製品を使用するクロマトグラフィのステップによって得られる。
【０１７５】
ＥＰＡは、平均２０μｍの直径の粒子を有するＣ１８逆相シリカで精製される。クロマトグラフィ条件は次のとおりである：
長さ３９ｃｍ、直径５ｃｍの軸方向動的圧縮のカラムを備えたＣｙｃｌｏｊｅｔ。
溶離液：７９／２１（ｖ／ｖ）のアセトン／水。
【０１７６】
回収したフラクションのうちの１つはＥＰＡを約９６．８％（ＣＰＧ中の面積）で含み、０．１％未満のＤＨＡを含む。抽出物中のＥＰＡの回収率は約９５％である。比生産性は、１日あたり固定相１ｋｇあたり３．５８ｋｇの純粋なＥＰＡである。溶離液の原単位は、１ｋｇの純粋なＥＰＡあたり１５３Ｌである。
【０１７７】
真空中で作動するロータリーエバポレータ中での濃縮後、濃縮フラクションは１％未満の残留溶媒を含む。
【０１７８】
実施例２ｂ（比較例）
この実施例では、実施例１ａで得られた濃縮ラフィネートは、長さ９ｃｍ、直径４．８ｃｍの５つのカラムを備えたＶＡＲＩＣＯＬ™中、７９／２１（ｖ／ｖ）のアセトン／水溶離液で精製される。
【０１７９】
抽出物は、ＥＰＡを約９７％（ＣＰＧ中の面積）で含み、０．１％未満のＤＨＡを含む。抽出物中のＥＰＡの回収率は約９５％である。比生産性は、１日あたり固定相１ｋｇにつき３．３５ｋｇの純粋なＥＰＡである。
【０１８０】
Ｃｙｃｌｏｊｅｔの比生産性はＶＡＲＩＣＯＬ™よりも７％高い。意外なことに、Ｃｙｃｌｏｊｅｔは第２精製ステップについてＶＡＲＩＣＯＬ™よりも良好な生産性をもたらす。
【０１８１】
実施例３－パイロット規模での精製
この実施例では、９６％を超えるＥＰＡのエチルエステルが、５０％を超えるＥＰＡを含むエチルエステルの混合物を使用するクロマトグラフィの３ステップにより得られる。
【０１８２】
ＥＰＡを、Ｃ１８逆相シリカのクロマトグラフィの３ステップによって精製する。クロマトグラフィ条件は以下のとおりである：
ステップ１：
長さ９ｃｍ、直径５９ｃｍの５つのカラムを備えたＶＡＲＩＣＯＬ™。カラムの構成：ゾーン１／２／３／４それぞれ１／１．６／１．６／０．８。
溶離液：９０／１０（ｖ／ｖ）のアセトン／水。
【０１８３】
ラフィネートは約７０％（ＣＰＧ中の面積）でＥＰＡを含む。真空中で作動するロータリーエバポレータ中で濃縮後、濃縮ラフィネートは１％未満の残留溶媒を含む。
【０１８４】

ステップ２：
長さ４９ｃｍ、直径３０ｃｍの軸方向動的圧縮カラムを備えたＣｙｃｌｏｊｅｔ。
溶離液：９３／７（ｖ／ｖ）のメタノール／水。

【０１８５】
ＥＰＡを約９４％（ＣＰＧ中の面積）で含み、０．１％未満のＤＨＡを含むフラクションが回収される。フラクション中のＥＰＡの回収率は９５％よりも高い。

【０１８６】
真空中で動作するロータリーエバポレータ中で濃縮後に、濃縮フラクションは１％未満の残留溶媒を含む。

【０１８７】
ステップ３：
長さ４９ｃｍ、直径３０ｃｍの軸方向動的圧縮カラムを備えたＣｙｃｌｏｊｅｔ。
溶離液：７９／２１（ｖ／ｖ）のアセトン／水。

【０１８８】
ＥＰＡを約９６．８％（ＣＰＧ中の面積）で含み、０．１％未満のＤＨＡを含むフラクションが回収される。フラクション中のＥＰＡの回収率は９５％よりも高い。

【０１８９】
真空中で作動するロータリーエバポレータで濃縮した後、濃縮フラクションは１％未満の残留溶媒を含む。

【図１】

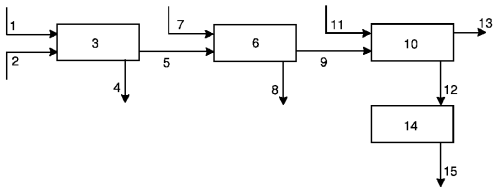


Fig. 1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/077036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. B01D15/18 C07C51/47 C07C57/03
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
B01D C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2014/108686 A1 (BASF PHARMA CALLANISH LTD [GB]) 17 July 2014 (2014-07-17) the whole document	1-15
X	WO 94/25552 A1 (NORSK HYDRO AS [NO]; PERRUT MICHEL [FR]; NICOUD ROGER MARC [FR]; BREIV) 10 November 1994 (1994-11-10) cited in the application the whole document	1-15
X	FR 2 898 283 A1 (NOVASEP SOC PAR ACTIONS SIMPLI [FR] NOVASEP [FR]) 14 September 2007 (2007-09-14) the whole document	1-15

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 January 2015	12/02/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seelmann, Marielle

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/077036

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 877 936 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE] NOVASEP [FR]) 18 November 1998 (1998-11-18) the whole document -----	1-15
X	WO 2013/005048 A1 (BASF PHARMA CALLANISH LTD [GB]; KELLIHER ADAM [GB]; MORRISON ANGUS [GB]) 10 January 2013 (2013-01-10) page 23, lines 9-20; claims 1-2,7,9-10; figures 2-4 page 22, lines 23-30 page 25, lines 25-34 page 39, lines 16-33 -----	1-15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2014/077036

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014108686 A1	17-07-2014	NONE	
WO 9425552 A1	10-11-1994	AT 147776 T	15-02-1997
		AU 676910 B2	27-03-1997
		AU 6691794 A	21-11-1994
		CA 2159823 A1	10-11-1994
		DE 69401506 D1	27-02-1997
		DE 69401506 T2	11-09-1997
		DK 0697034 T3	14-07-1997
		EP 0697034 A1	21-02-1996
		ES 2097047 T3	16-03-1997
		JP H08512336 A	24-12-1996
		US 5719302 A	17-02-1998
		WO 9425552 A1	10-11-1994
FR 2898283 A1	14-09-2007	EP 2024049 A2	18-02-2009
		FR 2898283 A1	14-09-2007
		US 2011000853 A1	06-01-2011
		WO 2007101944 A2	13-09-2007
EP 0877936 A1	18-11-1998	CA 2238954 A1	05-06-1997
		DE 69631903 D1	22-04-2004
		DE 69631903 T2	19-08-2004
		EP 0877936 A1	18-11-1998
		JP 4009671 B2	21-11-2007
		JP 2000503112 A	14-03-2000
		US 5630943 A	20-05-1997
		WO 9720206 A1	05-06-1997
WO 2013005048 A1	10-01-2013	AU 2012280067 A1	09-05-2013
		CA 2815300 A1	10-01-2013
		CN 103826714 A	28-05-2014
		EP 2613860 A1	17-07-2013
		JP 2014518313 A	28-07-2014
		KR 20140034922 A	20-03-2014
		PE 08072014 A1	17-07-2014
		WO 2013005048 A1	10-01-2013

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2014/077036

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. B01D15/18 C07C51/47 C07C57/03
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
B01D C07C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	WO 2014/108686 A1 (BASF PHARMA CALLANISH LTD [GB]) 17 juillet 2014 (2014-07-17) le document en entier	1-15
X	WO 94/25552 A1 (NORSK HYDRO AS [NO]; PERRUT MICHEL [FR]; NICOUD ROGER MARC [FR]; BREIV) 10 novembre 1994 (1994-11-10) cité dans la demande le document en entier	1-15
X	FR 2 898 283 A1 (NOVASEP SOC PAR ACTIONS SIMPLI [FR] NOVASEP [FR]) 14 septembre 2007 (2007-09-14) le document en entier	1-15

-/--

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
30 janvier 2015	12/02/2015

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seelmann, Marielle

1

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2014/077036

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 877 936 A1 (MERCK PATENT GMBH [DE] NOVASEP [FR]) 18 novembre 1998 (1998-11-18) le document en entier	1-15
X	WO 2013/005048 A1 (BASF PHARMA CALLANISH LTD [GB]; KELLIHER ADAM [GB]; MORRISON ANGUS [GB]) 10 janvier 2013 (2013-01-10) page 23, ligne 9-20; revendications 1-2,7,9-10; figures 2-4 page 22, ligne 23-30 page 25, ligne 25-34 page 39, ligne 16-33	1-15

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2014/077036

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2014108686 A1	17-07-2014	AUCUN	
WO 9425552 A1	10-11-1994	AT 147776 T	15-02-1997
		AU 676910 B2	27-03-1997
		AU 6691794 A	21-11-1994
		CA 2159823 A1	10-11-1994
		DE 69401506 D1	27-02-1997
		DE 69401506 T2	11-09-1997
		DK 0697034 T3	14-07-1997
		EP 0697034 A1	21-02-1996
		ES 2097047 T3	16-03-1997
		JP H08512336 A	24-12-1996
		US 5719302 A	17-02-1998
		WO 9425552 A1	10-11-1994
FR 2898283 A1	14-09-2007	EP 2024049 A2	18-02-2009
		FR 2898283 A1	14-09-2007
		US 2011000853 A1	06-01-2011
		WO 2007101944 A2	13-09-2007
EP 0877936 A1	18-11-1998	CA 2238954 A1	05-06-1997
		DE 69631903 D1	22-04-2004
		DE 69631903 T2	19-08-2004
		EP 0877936 A1	18-11-1998
		JP 4009671 B2	21-11-2007
		JP 2000503112 A	14-03-2000
		US 5630943 A	20-05-1997
		WO 9720206 A1	05-06-1997
WO 2013005048 A1	10-01-2013	AU 2012280067 A1	09-05-2013
		CA 2815300 A1	10-01-2013
		CN 103826714 A	28-05-2014
		EP 2613860 A1	17-07-2013
		JP 2014518313 A	28-07-2014
		KR 20140034922 A	20-03-2014
		PE 08072014 A1	17-07-2014
		WO 2013005048 A1	10-01-2013

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

Ｆターム(参考) 4H059 BA26 BB05 BB07 CA24 CA96