

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5946833号
(P5946833)

(45) 発行日 平成28年7月6日(2016.7.6)

(24) 登録日 平成28年6月10日(2016.6.10)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 1 C	1/08	(2006.01)	C 1 1 C 1/08
C 1 1 B	7/00	(2006.01)	C 1 1 B 7/00
C O 7 C	51/487	(2006.01)	C O 7 C 51/487
C O 7 C	57/12	(2006.01)	C O 7 C 57/12
B O 1 D	11/00	(2006.01)	B O 1 D 11/00

請求項の数 34 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-529730 (P2013-529730)	(73) 特許権者	504453362
(86) (22) 出願日	平成23年9月23日 (2011.9.23)		プロノヴァ・バイオフーマ・ノルゲ・ア ーエス
(65) 公表番号	特表2013-542927 (P2013-542927A)		Pronova BioPharma N orge AS
(43) 公表日	平成25年11月28日 (2013.11.28)		ノルウェー国、0283 オスロ、リリア ケルヴェイエン 2セ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/002593	(74) 代理人	230104019
(87) 国際公開番号	W02012/038833		弁護士 大野 聖二
(87) 国際公開日	平成24年3月29日 (2012.3.29)	(74) 代理人	230111590
審査請求日	平成26年9月22日 (2014.9.22)		弁護士 金本 恵子
(31) 優先権主張番号	61/386,096	(74) 代理人	100105991
(32) 優先日	平成22年9月24日 (2010.9.24)		弁理士 田中 玲子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ω 3脂肪酸を濃縮する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 脂肪酸油混合物および銀塩水溶液を組み合わせて水相および有機相を形成するステップであって、前記水相中、前記銀塩水溶液が少なくとも1の 3脂肪酸と錯体を形成するステップ；

(b) 前記有機相から前記水相を分離するステップ；

(c) 置換液により前記水相を抽出し、または前記水相の温度を少なくとも30 に上昇させ、または置換液による抽出と温度の上昇とを組み合わせて、少なくとも1の抽出物を形成させるステップ；

(d) 前記水相を水と組み合わせ、または前記水相を超臨界CO₂で抽出し、または前記水相を水と組み合わせることと超臨界CO₂による前記水相の抽出とを組み合わせ、前記錯体を解離させるステップであって、前記銀塩を含む水層と、脂肪酸濃縮物を含む少なくとも1の溶液とが形成されるステップ；および

(e) 前記銀塩を含む前記水相から前記脂肪酸濃縮物を含む前記少なくとも1の溶液を分離するステップ；

を含む、脂肪酸油混合物から少なくとも1の 3脂肪酸を濃縮し、かつ脂肪酸油混合物の少なくとも1の 6脂肪酸濃度を低減し、前記脂肪酸濃縮物中の 6脂肪酸に対する 3脂肪酸の割合が40を超える、方法。

【請求項2】

銀塩の濃度が水中10重量%～水中90重量%の範囲である、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

前記銀塩が $A \text{ g N O}_3$ および $A \text{ g B F}_4$ から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 の 3 脂肪酸が (全 Z) - 5, 8, 11, 14, 17 - エイコサペンタエン酸 (EPA)、(全 Z) - 4, 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサヘキサエン酸 (DHA) およびこれらの組み合わせから選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

少なくとも 1 の前記脂肪酸濃縮物、前記少なくとも 1 の抽出物および前記少なくとも 1 の溶液中の EPA / DHA 重量比が 0.1 ~ 1.0 の範囲である、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記脂肪酸濃縮物が少なくとも 90 重量%の 3 脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記脂肪酸油混合物に比べて、前記脂肪酸濃縮物中の 3 脂肪酸の 6 脂肪酸に対する比率を増加させる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記脂肪酸濃縮物中の 6 脂肪酸の総濃度が 3 重量%未満 である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 9】

脂肪酸油混合物の前記銀塩溶液に対する重量比が、0.4 ~ 1.6 の範囲である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (a) が、アルコールを前記水相に添加するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記置換液が有機溶媒を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記置換液により前記水相を抽出するステップが、少なくとも 2 回の連続抽出を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記少なくとも 30 の温度が、30 ~ 90 の範囲の温度である、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記水相を水と組み合わせ、または前記水相を超臨界 CO_2 で抽出し、または前記水相を水と組み合わせることと超臨界 CO_2 による前記水相の抽出とを組み合わせ、前記錯体を解離させるステップを、少なくとも 1 回繰り返す、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記脂肪酸油混合物が動物油、植物油、微生物油、海藻油またはこれらの任意の組み合わせに由来する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 16】

前記脂肪酸濃縮物が、前記脂肪酸油混合物に比べて減少した濃度の少なくとも 1 の環境汚染物質を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記脂肪酸濃縮物が、前記脂肪酸油混合物に比べて減少した濃度のコレステロールを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 の 3 脂肪酸がエチルエステル、遊離酸およびグリセリドから選択さ

50

れる形である、請求項 1 ~ 17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記脂肪酸濃縮物が、前記脂肪酸油混合物に比べて減少した濃度の、(全Z) - 5, 8, 11, 14, 17 - エイコサペンタエン酸 (EPA) および (全Z) - 4, 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサヘキサエン酸 (DHA) 以外の少なくとも1の $C_{20} \sim C_{22}$ 3 脂肪酸を含む、請求項 1 ~ 18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記脂肪酸濃縮物中の、EPA および DHA 以外の $C_{20} \sim C_{22}$ 3 脂肪酸の総濃度が3重量%未満である、請求項 19に記載の方法。

【請求項 21】

(f) 少なくとも1の精製法によって前記脂肪酸濃縮物を精製するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記少なくとも1の精製法が、短行路蒸留、分子蒸留、ヨードラクトン化による分離、超臨界流体抽出、酵素分画および分取クロマトグラフィーから選択される、請求項 21に記載の方法。

【請求項 23】

前記方法が、少なくとも1回繰り返され、ここで、前記脂肪酸濃縮物、前記少なくとも1の抽出物および前記少なくとも1の溶液の少なくとも1が、その後のプロセスで前記脂肪酸油混合物を含む、請求項 1 ~ 22のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

少なくとも80%の、(全Z) - 5, 8, 11, 14, 17 - エイコサペンタエン酸 (EPA)、(全Z) - 4, 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサヘキサエン酸 (DHA) および (全Z) - 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサペンタエン酸 (DPA) から選択される少なくとも1の 3 脂肪酸を含む脂肪酸濃縮物を製造する、請求項 23に記載の方法。

【請求項 25】

前記脂肪酸濃縮物、前記少なくとも1の抽出物および前記少なくとも1の溶液の少なくとも1を、少なくとも1の分画法により処理する、請求項 1 ~ 24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記少なくとも1の分画法が、蒸留、抽出、ヨードラクトン化およびクロマトグラフィーから選択される、請求項 25に記載の方法。

【請求項 27】

前記少なくとも1の分画法が、少なくとも80%の、 $C_{20} \sim C_{22}$ 3 脂肪酸から選択される少なくとも1の 3 脂肪酸を含む脂肪酸濃縮物を製造する、請求項 25または26に記載の方法。

【請求項 28】

前記少なくとも1の 3 脂肪酸が、(全Z) - 4, 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサヘキサエン酸 (DHA) および (全Z) - 7, 10, 13, 16, 19 - ドコサペンタエン酸 (DPA) から選択される、請求項 25または26に記載の方法。

【請求項 29】

前記脂肪酸油混合物が、ダイオキシン、PCB、DDT および PD BE から選択される少なくとも1の残留性有機汚染物質を含む、請求項 1 ~ 28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記脂肪酸油混合物中の前記少なくとも1の残留性有機汚染物質を、前記脂肪酸濃縮物中少なくとも95%減少させる、請求項 29に記載の方法。

【請求項 31】

前記脂肪酸油混合物がコレステロールを含む、請求項 1 ~ 30のいずれか一項に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 3 2】

前記超臨界 CO_2 が少なくとも 1 の極性修飾剤を含む、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記脂肪酸油混合物および前記銀塩水溶液を、- 2 5 ~ 9 0 の範囲の温度で組み合わせる、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記脂肪酸油混合物および前記銀塩水溶液を組み合わせた後、前記水相を - 2 5 ~ 9 0 の範囲の温度で前記有機相から分離する、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、全体が参照により本明細書に組み込まれている、2010年9月24日出願の米国仮特許出願第 61 / 386096 号に基づく優先権を主張する。

【0002】

本開示は、一般に、銀塩水溶液、例えば、 AgNO_3 水溶液を用いて、脂肪酸油混合物から多価不飽和脂肪酸、例えば、 ω -3 脂肪酸を濃縮する方法に関する。

【背景技術】

20

【0003】

ω -3 脂肪酸は、医薬および / または栄養補助製品を含むいくつかの用途で有用である。例えば、 ω -3 脂肪酸は、血漿脂質濃度、心血管および免疫機能、インスリン作用、ニューロン発達、ならびに視覚機能を調節することができる。 ω -3 脂肪酸は、心血管疾患、例えば、高血圧および高トリグリセリド血症のリスクファクターならびに凝固第 V I I 因子リン脂質複合体活性に対して、有用な効果を有し得る。 ω -3 脂肪酸はまた、血清トリグリセリドを低下させ、血清 H D L コレステロールを増加させ、収縮期および拡張期血圧ならびに / または脈拍数を低下させることができ、血液凝固第 V I I 因子 - リン脂質複合体の活性を低下させることができる。さらに、 ω -3 脂肪酸は、一般的に、忍容性が良好であり、重度の副作用を起こすことがない。

30

【0004】

一般に魚油とも呼ばれているマリンオイル (M a r i n e o i l s) は、脂質代謝を調節することが分かっている、エイコサペンタエン酸 (E P A) およびドコサヘキサエン酸 (D H A) を含む ω -3 脂肪酸の供給源である。植物性油、微生物油および海藻油 (a l g a e o i l s) も ω -3 脂肪酸の供給源である。 ω -3 脂肪酸のいくつかの配合物が開発されている。例えば、 ω -3 脂肪酸油混合物の一形態は、D H A および E P A を含む魚油からの主な ω -3 長鎖多価不飽和脂肪酸の濃縮物、例えば、商標 O m a c o r (登録商標) / L o v a z a (商標) / Z o d i n (登録商標) / S e a c o r (登録商標) で販売されているものである。例えば、米国特許第 5 5 0 2 0 7 7 号、第 5 6 5 6 6 6 7 号および第 5 6 9 8 5 9 4 号を参照されたい。特に、L o v a z a (商標) の各 1 0 0 0 m g カプセルは、少なくとも 9 0 % の ω -3 エチルエステル脂肪酸 (8 4 % E P A / D H A) ; およそ 4 6 5 m g の E P A エチルエステルおよびおよそ 3 7 5 m g の D H A エチルエステルを含む。

40

【0005】

他の ω -3 脂肪酸にも活性があるかもしれない。例えば、K a u r 他 (P r o g . L i p i d R e s . (2 0 1 1) 第 5 0 (1) 巻、2 8 ~ 3 4 頁) は、特定の生物学的効果を n - 3 D P A によるものとしている。n - 3 D P A が E P A よりも 1 0 倍高い内皮細胞遊走能力を有するという証拠が存在し、これは、創傷治癒プロセスで重要であり得る。さらに、報告によれば、n - 3 D P A は、血小板凝集の阻害において E P A および D H A よりも効果的である。さらに、n - 3 D P A は、空間学習および長期増強の加齢性低

50

下を弱めるのに役立つ。しかしながら、 $n-3$ DPAは、純粋な化合物の入手可能性が限られるために、広範囲な研究がなされていない。

【0006】

3脂肪酸の供給源の多くは、6脂肪酸の供給源でもある。しかしながら、特定の生物学的過程では、3脂肪酸および6脂肪酸は逆の活性を示し得るので、低濃度の6脂肪酸、すなわち、高い $n-3/n-6$ 比が望ましい。欧州薬局方モノグラフ1250に従った市販の製品は、典型的には24~40の範囲の $n-3/n-6$ 比を有する。

【0007】

3酸の濃縮物を調製する方法の概要は、Breivik (Long-Chain Omega-3 Specialty Oils, The Oily Press, P J Bames & Associates, Bridgwater UK, 111~140頁、2007)により示されている。マリンオイルの複雑な脂肪酸組成のために、1つの濃縮技術のみを使用して3脂肪酸の高濃縮組成物を調製することは困難である。通常は、技術の組み合わせが使用され、最も一般的には、不飽和度による分離(例えば、酵素分離および/または尿素分画)と炭素鎖長による分離(例えば、分子/短行程蒸留および/または超臨界流体抽出)を組み合わせた技術が使用される。従来技術は、通常、出発油中の量に比べて低い3脂肪酸収量の濃縮物を生じるという欠点を有する。これは、尿素分画および短行程蒸留のような低収率技術を組み合わせる場合に特に問題となり得る。

【0008】

さらに、短行程蒸留および主に鎖長に基づいて脂肪酸エステルを分離する他の方法のような分離法は、典型的には同じ数の炭素原子を有する3脂肪酸と6脂肪酸、例えば、 $C_{20}:4_{n-3}$ と $C_{20}:4_{n-6}$ 、または $C_{22}:5_{n-3}$ と $C_{22}:5_{n-6}$ は分離しない。脂肪酸誘導体が尿素と固体複合体を形成する傾向は、最初の二重結合から脂肪酸エステルのカルボニル基までの距離(値として一般的に知られている)と共に増加するので、例えば、尿素分画は、同族体3脂肪酸よりも6脂肪酸に関して高い濃縮係数をもたらす。6脂肪酸が'の値を有する場合、対応する3脂肪酸は(' + 3)の値を有し、尿素との複合体形成度がより高い。この傾向は、大きい尿素相対量を利用する3脂肪酸の高濃縮物で特に顕著である。

【0009】

銀塩を使用して混合物から多価不飽和脂肪酸を単離する研究が行われている。例えば、Quinn他(Perry他、Progress in Separation and Purification 4, Wiley-Interscience, New York, 1971の133~169頁); Peer他(J. Food Technology (1986)第21巻463~469頁); Suzuki他(Bioseparation (1993)第3巻197~204頁); Teramoto他(Ind. Eng. Chem. Res. (1994)、第33巻341~345頁); Teramoto他(J. Membrane Sci. (1994)第91巻、209~213頁); Kubota他(Sep. Sci. Technol. (1997)、第32巻、1529~1541頁); Chen他(J. Jiangsu University of Science and Technology (Natural Science) (2000)、第21巻、18~22頁); Tao他(Chinese J. Marine Drugs (2004) No. 3、28~30頁); Huong (J. Chemistry (2007)、第45巻、757~762頁); Li他(Sep. Sci. Technol. (2008)第43巻、2072~2089頁); EP0454430B1; EP0576191A2; Seike他(Journal of Chemical Engineering of Japan (2007)、第40巻、1076~1084頁); およびKamio他(Ind. Eng. Chem. Res. (2011)第50(11)巻、6915~24頁)を参照されたい。しかしながら、以前から知られている方法は、3脂肪酸を濃縮するための十分に選択的および/または効率的な方法を提供しない。

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、脂肪酸油混合物から 3 脂肪酸を濃縮するより効率的な方法が当技術分野で必要とされている。

【0011】

前記一般的な説明および以下の詳細な説明はいずれも代表的および説明的なものに過ぎず、特許請求の範囲に記載されている本発明を制限しないことを理解すべきである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本開示は、一般的に、(a) 脂肪酸油混合物および銀塩 ($AgNO_3$ または $AgBF_4$ など) 水溶液を組み合わせて水相および有機相を形成するステップであって、水相中、銀塩水溶液が少なくとも 1 の 3 脂肪酸と錯体を形成するステップと、(b) 有機相から水相を分離するステップと、(c) 置換液により水相を抽出し、または水相の温度を少なくとも 30 に上昇させ、または置換液による抽出と温度の上昇を組み合わせ、少なくとも 1 の抽出物を形成させるステップと、(d) 水相を水と組み合わせ、または水相を超臨界 CO_2 で抽出し、または水相と水の組み合わせと超臨界 CO_2 による水相の抽出とを組み合わせ、錯体を解離させるステップであって、水相は銀塩を含み、少なくとも 1 の溶液は脂肪酸濃縮物形を含むステップと、(e) 銀塩を含む水相から脂肪酸濃縮物を含む少なくとも 1 の溶液を分離するステップとを含む、脂肪酸油混合物から少なくとも 1 の 3 脂肪酸を濃縮する方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図 1】実施例 1 に記載されているような、水相を 70 に加熱することにより回収した脂肪酸濃縮物のガスクロマトグラムを示す図である。

【図 2】実施例 1 に記載されているような、図 1 に示す濃縮物を除去した後に水相を水に希釈することにより得られた脂肪酸濃縮物のガスクロマトグラムを示す図である。

【図 3】実施例 2 A の表 4 A に記載されているような、置換溶媒としてのヘキサンによる抽出により得られた分画のガスクロマトグラムを示す図である。

【図 4】実施例 3 の表 5 に記載されているような濃縮物 4 のガスクロマトグラムを示す図である。

【図 5】実施例 2 B の表 4 E に記載されているような、特定の選択された脂肪酸エステルのエチルエステルの相対濃度を表す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本開示の特定の態様を以下でさらに詳細に記載する。本出願で使用されるおよび本明細書で明らかにされる用語ならびに定義は、本開示内での意味を表すことを意図している。本明細書で言及されるおよび上に言及される特許ならびに科学文献は、これによって参照により組み込まれる。参照により組み込まれる用語および / または定義と矛盾する場合には、本明細書に提供される用語および定義が優先する。

【0015】

単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上別段の指示がない限り、複数対象を含む。

【0016】

用語「およそ」および「約」は、言及した数または値とほぼ同じであることを意味する。本明細書で使用する場合、用語「およそ」および「約」は、一般に、指定の量、回数または値の $\pm 30\%$ を包含するものと理解すべきである。

【0017】

用語「脂肪酸 (複数可)」には、例えば、少なくとも 1 個のカルボン酸基を含む短鎖および長鎖の飽和および不飽和 (例えば、一価不飽和および多価不飽和) 炭化水素が含まれる。

【0018】

用語「3脂肪酸(複数可)」には、天然および合成3脂肪酸、ならびにこれらの薬学的に許容されるエステル、遊離酸、トリグリセリド、誘導體、抱合体(例えば、各々がこれにより参照により組み込まれている、Zaloga他、米国特許出願公開第2004/0254357号およびHorrobin他、米国特許第6245811号参照)、前駆体、塩および混合物が含まれる。3脂肪酸油の例としては、それだけに限らないが、3多価不飽和脂肪酸、例えば、 α -リノレン酸(ALA、 $18:3n-3$)、オクタデカテトラエン酸(すなわち、ステアリドン酸、STA、 $18:4n-3$)、エイコサトリエン酸(ETE、 $20:3n-3$)、エイコサテトラエン酸(ETA、 $20:4n-3$)、エイコサペンタエン酸(EPA、 $20:5n-3$)、ヘニコサペンタエン酸(HPA、 $21:5n-3$)、ドコサペンタエン酸(DPA、イワシ酸、 $22:5n-3$)およびドコサヘキサエン酸(DHA、 $22:6n-3$)；3脂肪酸とグリセリンのエステル、例えば、モノ-、ジ-およびトリグリセリド；ならびに脂肪酸と第一級、第二級および/または第三級アルコールのエステル、例えば、脂肪酸メチルエステルおよび脂肪酸エチルエステルが挙げられる。

10

【0019】

用語「6脂肪酸(複数可)」には、天然および合成6脂肪酸、ならびにその薬学的に許容されるエステル、遊離酸、トリグリセリド、誘導體、抱合体、前駆体、塩および混合物が含まれる。6脂肪酸油の例としては、それだけに限らないが、6多価不飽和長鎖脂肪酸、例えば、リノール酸($18:2n-6$)、 α -リノール酸($18:3n-6$)、エイコサジエン酸($20:2n-6$)、ジホモ- α -リノール酸($20:3n-6$)、アラキドン酸($20:4n-6$)、ドコサジエン酸($22:2n-6$)、アドレン酸($22:4n-6$)およびドコサペンタエン酸(すなわち、オズボンド酸、 $22:5n-6$)；ならびにこれらのエステル、トリグリセリド、誘導體、抱合体、前駆体、塩および/または混合物が挙げられる。

20

【0020】

本開示による多価不飽和脂肪酸(例えば、3脂肪酸および/または6脂肪酸)、これらのエステル、トリグリセリド、誘導體、抱合体、前駆体、塩および/または混合物は、濃縮および/または精製形で、ならびに/あるいは油、例えば、マリンオイル(例えば、魚油)、海藻油、微生物油および/または植物性油の成分として使用することができる。

30

【0021】

脂肪酸油混合物

本開示による脂肪酸油混合物は、動物油(複数可)および/または非動物油(複数可)に由来し得る。本開示のいくつかの実施形態では、脂肪酸油混合物は、マリンオイル、単細胞油、海藻油、植物性油、微生物油およびこれらの組み合わせから選択される少なくとも1種の油に由来する。マリンオイルには、例えば、魚油、オキアミ油および魚に由来する脂質組成物が含まれる。植物性油には、例えば、アマニ油、キャノーラ油、からし油およびダイズ油が含まれる。単細胞/微生物油には、例えば、Martek, Nutrinova, and Nagase & Co.の製品が含まれる。単細胞油は、通常、微生物細胞に由来しており、ヒト消費向けの油と定義される。例えば、WynnおよびRatledge、「Microbial oils: production, processing and markets for specialty long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids」、43~76頁、Breivik(編)、Long-Chain Omega-3 Specialty Oils, The Oily Press, P. J. Barnes & Associates, Bridgewater UK, 2007を参照されたい。

40

【0022】

別の油には、長鎖トリグリセリドとして一般的に知られているトリグリセリド植物油、例えば、ヒマシ油、トウモロコシ油、綿実油、オリーブ油、ラッカセイ油、ベニバナ油、

50

ゴマ油、ダイズ油、水素化ダイズ油および水素化植物油；中鎖トリグリセリド、例えば、ヤシ油またはパーム核油に由来するもの、モノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリドが含まれる。混合グリセリドのほかに、プロピレングリコールのエステル、例えば、プロピレングリコールのカプリル/カプリン酸の混合ジエステル、プロピレングリコールの飽和ヤシおよびパーム核油由来カプリル、リノール、コハクまたはカプリン脂肪酸のエステルなどの他の油が存在する。

【0023】

脂肪酸油混合物の脂肪酸を、アルキルエステル、例えば、エチルエステルにエステル化することができる。いくつかの実施形態では、脂肪酸は、モノ-、ジ-およびトリグリセリドから選択されるようなグリセリド形である。他の実施形態では、脂肪酸は遊離酸形である。

10

【0024】

脂肪酸油混合物の不飽和脂肪酸は、シスおよび/またはトランス配置であり得る。全シス配置の3脂肪酸の例としては、それだけに限らないが、(全Z)-9,12,15-オクタデカトリエン酸(ALA)、(全Z)-6,9,12,15-オクタデカテトラエン酸(STA)、(全Z)-11,14,17-エイコサトリエン酸(ETE)、(全Z)-8,11,14,17-エイコサテトラエン酸(ETA)、(全Z)-7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸(DPA)、(全Z)-5,8,11,14,17-エイコサペンタエン酸(EPA)、(全Z)-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸(DHA)および(全Z)-6,9,12,15,18-ヘニコサペンタエン酸(HPA)が挙げられる。全シス配置の6脂肪酸の例としては、それだけに限らないが、(全Z)-4,7,10,13,16-ドコサペンタエン酸(オズボンド酸)、(全Z)-9,12-オクタデカジエン酸(リノール酸)、(全Z)-5,8,11,14-エイコサテトラエン酸(AA)および(全Z)-6,9,12-オクタデカトリエン酸(GLA)が挙げられる。シス配置の一価不飽和脂肪酸の例としては、それだけに限らないが、(Z)-9-ヘキサデセン酸(パルミトレイン酸)、(Z)-9-オクタデセン酸(オレイン酸)、(Z)-11-オクタデセン酸(バクセン酸)、(Z)-9-エイコセン酸(ガドレイン酸)、(Z)-11-エイコセン酸(ゴンド酸)、(Z)-11-エイコエセン酸(eicoesenoic acid)、(Z)-11-ドコセン酸(セトレイン酸)、(Z)-13-ドコセン酸(エルカ酸)および(R-(Z))-12-ヒドロキシ-9-オクタデセン酸(リシノール酸)が挙げられる。

20

30

【0025】

本開示による脂肪酸油混合物の例としては、それだけに限らないが、欧州薬局方Omega-3 Acid Ethyl Esters 60、欧州薬局方Fish Oil Rich in Omega-3 Acidsモノグラフ、USP Fish Oilモノグラフ、欧州薬局方Omega-3 Acid Triglycerides、欧州薬局方Omega-3-Acid Ethyl Esters 90およびUSP Omega-3-Acid Ethyl Estersモノグラフに定義されている脂肪酸が挙げられる。

【0026】

異なる脂肪酸を含む脂肪酸油混合物の市販の例としては、それだけに限らないが、Incromega(商標)3マリンオイル濃縮物、例えば、Incromega(商標)TG7010 SR、Incromega(商標)E7010 SR、Incromega(商標)TG6015、Incromega(商標)EPA500TG SR、Incromega(商標)E400200 SR、Incromega(商標)E4010、Incromega(商標)DHA700TG SR、Incromega(商標)DHA700E SR、Incromega(商標)DHA500TG SR、Incromega(商標)TG3322 SR、Incromega(商標)E3322 SR、Incromega(商標)TG3322、Incromega(商標)E3322、Incromega(商標)Trio TG/EE(Croda International

40

50

l PLC、Yorkshire、England) ; EPAX6000FA、EPAX5000TG、EPAX4510TG、EPAX2050TG、EPAX5500EE、EPAX5500TG、EPAX5000EE、EPAX5000TG、EPAX6000EE、EPAX6000TG、EPAX6500EE、EPAX6500TG、EPAX1050TG、EPAX2050TG、EPAX6015TG/EE、EPAX4020TGおよびEPAX4020EE (EPAXはTrygg Pharma ASの全額出資子会社である) ; Omacor (登録商標) / Lovaza (商標) / Zodin (登録商標) / Seacor (登録商標) 最終医薬製品、K85EE、AGP103、K30EE、K50EEおよびK70EE (Pronova BioPharma Norge AS) ; MEG-3 (登録商標) EPA/DHA魚油濃縮物 (Ocean Nutrition Canada) ; DHA FNO「Functional Nutritional Oil」およびDHA CL「Clear Liquid」(Lonza) ; Superba (商標) Krill Oil (Aker Biomarine) ; Martek製のDHAを含む 3製品 ; Neptuneオキアミ油 (Neptune) ; Mollers製のタラ肝油製品および抗還流魚油濃縮物 (TG) ; Lysi Omega-3 Fish oil ; Seven Seas Triomega (登録商標) Cod Liver Oil Blend (Seven Seas) ; Fri Flyt Omega-3 (Vesteralens) ; ならびにEpadel (Mochida) が挙げられる。これらの市販の実施形態は、種々の 3脂肪酸、組み合わせ、ならびに種々の供給源、例えば、海の、海藻、微生物 (単細胞) および / または植物性供給源から 3脂肪酸 (複数可) を得るためのエステル交換法または調製方法の結果としての他の成分を提供する。

10

20

【0027】

本開示のいくつかの実施形態では、脂肪酸油混合物は、少なくとも1の 3脂肪酸、例えば、EPAおよび / またはDHAを含む。少なくとも1の実施形態では、脂肪酸油混合物はEPAおよびDHAを含む。脂肪酸油混合物は、少なくとも1の他の脂肪酸、例えば、EPAおよびDHA以外の多価不飽和脂肪酸 (PUFA) をさらに含んでもよい。このようなPUFAの例としては、それだけに限らないが、他の 脂肪酸、例えば、EPAおよびDHA以外のC₂₀ ~ C₂₂ 3脂肪酸、および 6脂肪酸が挙げられる。

【0028】

本開示のいくつかの実施形態では、本方法は、C₂₂:5n-3 (n-3 DPA) の濃縮物を製造する。

30

【0029】

3脂肪酸 (複数可) を濃縮する方法

本開示のいくつかの実施形態は、脂肪酸油混合物から少なくとも1の 3脂肪酸を濃縮する方法に関する。

【0030】

一実施形態によると、本方法は、脂肪酸油混合物を銀塩水溶液、例えば、硝酸銀 (AgNO₃) 溶液と組み合わせるステップを含む。本議論はAgNO₃に焦点を当てているが、当業者は、テトラフルオロホウ酸銀 (AgBF₄) などの他の適当な銀塩を使用することができることを認識するだろう。銀イオンは、脂肪酸油混合物中の多価不飽和脂肪酸、例えば、 3脂肪酸、例えば、EPAおよび / またはDHAと錯体を形成することができる。こうして形成した銀錯体 (複数可) は、水相中に残り得る一方で、脂肪酸油混合物中に存在する他の脂肪酸 (例えば、飽和脂肪酸、短鎖脂肪酸、一価不飽和脂肪酸および / または他の不飽和脂肪酸、例えば、複合PUFAより少ない二重結合を有する脂肪酸) は未溶解脂肪酸として有機相中に残り得る。

40

【0031】

銀塩溶液、例えば、AgNO₃溶液の濃度は、約10重量% ~ 約90重量%、例えば、約60重量% ~ 約80重量%に及び得る。いくつかの実施形態では、例えば、AgNO₃水溶液の濃度は、約60重量%、約70重量%、約75重量%または約80重量%である

50

。いくつかの実施形態では、脂肪酸油混合物の AgNO_3 (固体) に対する重量比は、少なくとも 0.4 である。例えば、いくつかの実施形態では、脂肪酸油混合物の AgNO_3 に対する重量比は約 0.4 ~ 約 1.6 の範囲である。脂肪酸油混合物および AgNO_3 溶液は、室温 (例えば、約 20 ~ 約 25) で、または冷却により室温より低い温度、例えば、約 -25 ~ 約 20 で、または室温より高い温度、例えば、約 25 ~ 約 90 で組み合わせることができる。

【0032】

脂肪酸油混合物と混合する前および/または後に、少なくとも 1 の有機溶媒、例えば、極性有機溶媒を AgNO_3 溶液に添加することができる。適当な有機溶媒の例としては、それだけに限らないが、アルコール、例えば、エタノールおよびメタノールが挙げられる。極性有機溶媒の添加は、例えば、脂肪酸の脂肪酸油混合物から AgNO_3 水溶液への溶解性を高めることができる。

10

【0033】

脂肪酸油混合物および AgNO_3 溶液は、一般的に、数分から数時間程度、例えば、約 15 分 ~ 約 2 時間混合され、有機相および水相、例えば、油 - 水エマルジョンが得られる。当業者は、必要とされる混合時間が関係する体積および混合の効率に依存することを理解するだろう。例えば、マイクロリアクターにより調製されるスラグ流では、硝酸銀水溶液で DHA エチルエステルおよび EPA エチルエステルを抽出する場合、平衡に達するのに 20 秒未満しか必要とされない (Seike 他 (2007) Journal of Chemical Engineering of Japan、第 40 巻、1076 ~ 1084 頁)。あまり効率的でない混合により一緒にされる大体積については、脂肪酸と銀イオン水溶液の伝達および錯化は、平衡に達するのに実質的により長い時間、例えば、2 時間以上かかるだろう。

20

【0034】

沈殿により、有機相および水相を当技術分野で既知の方法にしたがって分離することができる。相分離は、例えば、混合物を、遠心分離、膜技術または他の適当な手段により 2 つの実質的に透明な相を得るのに十分な時間放置することにより起こる。

【0035】

有機相を除去した後、水相を置換液、例えば、有機溶媒で抽出して、少なくとも 1 の抽出物を形成させることができる。置換液は、例えば、特定の脂肪酸、例えば、6 脂肪酸ならびに/あるいは EPA および DHA 以外の 3 脂肪酸を優先的に除去することにより選択性の強化を提供することができる。理論に拘束されることなく、置換液は、脂肪酸の水相への相対溶解度に影響を及ぼすことにより、および/または銀錯体との相互作用を通して選択性を提供することができる。いくつかの例では、置換液は、銀イオンと錯体を形成しないように、または濃縮すべき 3 脂肪酸よりも弱い銀イオンとの錯体を形成するように選択することができる。適当な置換液の例としては、それだけに限らないが、アルカン、アルケン、シクロアルカン、シクロアルケン、ジエン、アロメート (aromate) およびハロゲン化溶媒が挙げられる。特定の例、例えば、ジクロロメタン、および 1 個もしくは複数の塩素原子を含む他の溶媒、および/または 1 もしくは複数の他のハロゲン化物、ヘキサン、ヘキセン、ヘプタン、ヘプテン、シクロヘキサン、シクロヘキセン、1,7-オクタジエン、1,5-シクロオクタジエン、ならびに 1 個もしくは複数の二重結合を含む他のアルケン、例えば、1 個、2 個もしくは 3 個の二重結合を含むアルケン、および酸素および窒素含有溶媒、例えば、ケトンおよびアミド/アミンに非限定的な言及をすることができる。水相は、2 回以上、すなわち、少なくとも 2 回の連続抽出で抽出することができる。各抽出のための置換液の量は、水性銀イオン相に溶解している脂肪酸油混合物の量の約 0.1 ~ 約 5 重量倍に及び得る。

30

40

【0036】

1 種または複数の特定の 3 脂肪酸を濃縮する際に所望の選択性にしたがって、異なる置換液および/または置換液の組み合わせを使用してもよい。

【0037】

50

水相および有機相を、分離する前に加熱してもよい。このような場合、適当な温度を決定する際に有機相の沸点を考慮することができる。一般的に言えば、水相/有機相混合物を約30 ~ 約90 の範囲である温度に加熱することができる。

【0038】

いくつかの実施形態では、有機相を除去した後に水相を加熱して少なくとも1の抽出物を形成させる。例えば、水相を少なくとも30、例えば、約30 ~ 約90 の範囲である温度に加熱することができる。このような場合、加熱により、水相からの6脂肪酸および/または特定の3脂肪酸、例えば、EPAおよびDHA以外のC₂₀ ~ C₂₂ 3脂肪酸が濃縮した脂肪酸油混合物の遊離がもたらされ得る。加熱は、多価不飽和脂肪酸の酸化、異性化および/または分解を避けるために酸素の非存在下および十分に穏やかな条件で慎重に行うべきである。

10

【0039】

さらに本方法によると、AgNO₃錯体(複数可)を解離させて、それによって脂肪酸濃縮物、すなわち、少なくとも1の3脂肪酸が濃縮した脂肪酸油混合物を遊離させるために、水相を水で希釈することができる。いくつかの実施形態では、水相を2回以上、すなわち、少なくとも2回の連続的希釈で希釈する。希釈に使用する水の量は、使用する固体硝酸銀(AgNO₃(固体))の重量の約1 ~ 約20倍に及び得る。正確な量は、銀イオン濃度および脂肪酸油混合物の性質を含むいくつかの因子に依存する。その後、脂肪酸濃縮物を水相から分離して少なくとも1の溶液を形成することができる。いくつかの実施形態では、銀イオンをその後のプロセスに再利用するために回収することができる。例えば、銀イオンを再生(例えば、電気分解を介した再生を含む)、濾過、遠心分離および/または精製により再利用のために回収することができる。

20

【0040】

さらに本方法によると、Ag⁺錯体(複数可)を解離させて、それによって脂肪酸濃縮物の全部または一部分を遊離させるために、水相を超臨界圧力下二酸化炭素(CO₂)で抽出することができる。二酸化炭素は、少なくとも1の極性修飾剤(polar modifier)、例えば、水またはアルコール、例えば、エタノールを含んでよい。二酸化炭素による抽出の利点には、錯体を破壊するための大量の水の必要性の排除が含まれ得る。CO₂は、圧力を解除することによりエチルエステルから容易に除去される。CO₂は無毒であり、活性Ag⁺を不活性Ag₂Oの形成から保護するために必要とされる不活性雰囲気を提供することができる。

30

【0041】

本開示による方法は、脂肪酸油混合物中の少なくとも1の6脂肪酸の濃度を減少させながら、少なくとも1の3脂肪酸を濃縮することができる。本方法は、例えば、脂肪酸油混合物に対して、脂肪酸濃縮物中の3脂肪酸の6脂肪酸に対する比率を増加させることができる。いくつかの実施形態では、脂肪酸濃縮物混合物中の3脂肪酸の6脂肪酸に対する比率($n - 3 / n - 6$)は、約40より大きい、例えば、約80より大きい、約100より大きい、約150より大きい、または約200より大きい。いくつかの実施形態では、脂肪酸濃縮物中の6脂肪酸の総濃度は約3重量%未満、例えば、約2重量%未満または約1重量%未満であり得る。

40

【0042】

現在開示している方法はまた、他の3脂肪酸の濃度を減少させながら、1種または複数の3脂肪酸を濃縮することができる。いくつかの実施形態では、例えば、本方法は、EPAおよびDNA以外のC₂₀ ~ C₂₂ 3脂肪酸の濃度を減少させながら、EPAおよびDNAを濃縮する。いくつかの実施形態では、脂肪酸濃縮物中のEPAおよびDNA以外のC₂₀ ~ C₂₂ 3脂肪酸の総濃度は、3重量%未満、例えば、2.5重量%未満、例えば、0.5重量%未満である。

【0043】

現在開示している方法はさらに、他の3脂肪酸よりも1の3脂肪酸をいくぶん濃縮することにより、脂肪酸油混合物中のEPA/DHA比を調節する。例えば、EPA/D

50

HA比は、温度、置換液および/または水希釈比を変化させることにより、ならびに極性修飾剤、例えば、水もしくはアルコール、例えば、エタノールを含むまたは含まないCO₂により抽出することにより、調節することができる。いくつかの実施形態では、脂肪酸濃縮物、少なくとも1の抽出物および少なくとも1の溶液のうち、少なくとも1におけるEPA/DHA重量比は、約0.1~約10の範囲である。

【0044】

脂肪酸濃縮物、少なくとも1の抽出物および/または少なくとも1の溶液は、少なくとも1の精製法を使用することにより精製することができる。精製法は、例えば、残留銀化合物、残留置換液、短鎖脂肪酸（例えば、脂肪酸16:4n-1）、銀イオンとの錯化により濃縮された低分子量化合物、環境汚染物質、コレステロールおよび/またはビタミンを除去することができる。このような精製法には、それだけに限らないが、短行路蒸留、分子蒸留、超臨界流体抽出、酵素分離法、ヨードラクトン化分画および分取クロマトグラフィーが含まれる。

10

【0045】

現在開示している方法を繰り返して、少なくとも1の3脂肪酸をさらに濃縮するおよび/または1もしくは複数の他の3脂肪酸を濃縮することができる。本方法を使用して少なくとも1の6脂肪酸を濃縮することもできる。例えば、脂肪酸濃縮物、少なくとも1の抽出物および/または少なくとも1の溶液は、上記のように1または複数のその後のプロセスで脂肪酸油混合物を含み得る。本開示による1または複数の濃縮法から得られる脂肪酸濃縮物は、少なくとも80%の少なくとも1の3脂肪酸、例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも98%の少なくとも1の3脂肪酸を含み得る。

20

【0046】

現在開示している方法から得られる脂肪酸濃縮物、少なくとも1の抽出物および/または少なくとも1の溶液はまた、少なくとも1の従来の分画法、例えば、短行路蒸留、分子蒸留、ヨードラクトン化分画、酵素分画法、抽出および/またはクロマトグラフィーにより処理することができる。こうして得られる脂肪酸濃縮物は、少なくとも80%の少なくとも1の3脂肪酸、例えば、少なくとも90%、少なくとも95%またはさらには少なくとも98%の少なくとも1の3脂肪酸を含み得る。一実施形態では、例えば、少なくとも1の分画法は、少なくとも90%の(全Z)-4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸(DHA)、例えば、少なくとも95%のDHAまたは例えば、少なくとも98%のDHAを含む脂肪酸濃縮物を製造する。別の実施形態では、少なくとも1の分画法は、少なくとも80%の(全Z)-7,10,13,16,19-ドコサペンタエン酸(DPA)、例えば、少なくとも90%のDPA、例えば、少なくとも95%のDPAまたは例えば、少なくとも98%のDPAを含む脂肪酸濃縮物を製造する。当業者は、少なくとも1の従来の分画法により本開示にしたがって得られる濃縮物を処理することにより、例えば、欧州薬局方モノグラフ1250、Omega-3-Acid Ethyl Esters 90モノグラフおよび/またはUSP Omega-3-Acid Ethyl Estersモノグラフに従う組成物を製造することができることを認識するだろう。

30

40

【0047】

現在開示している方法は、脂肪酸油混合物中の少なくとも1の環境汚染物質の濃度を減少させ、脂肪酸油濃縮物、少なくとも1の抽出物および/または少なくとも1の溶液が脂肪酸油混合物よりも低濃度の少なくとも1の環境汚染物質を含むようにすることができる。環境汚染物質には、それだけに限らないが、ポリ塩化ビフェニル(PCB)化合物、ポリクロロジベンゾジオキシン(PCDD)化合物、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)化合物、臭素化難燃剤、例えば、ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE)、テトラプロモビスフェノールA(TBBP-A)およびヘキサプロモシクロドデカン(HBCD)ならびに殺虫剤、例えば、DDT(2,2-ビス-(p-クロロフェニル)-1,1,1-トリクロロエタン)およびDDTの代謝産物が含まれる。現在開示している方法はまた、

50

脂肪酸油混合物中の総コレステロール（すなわち、遊離および/または結合コレステロール）の濃度を減少させ、脂肪酸濃縮物が脂肪酸油混合物よりも低濃度の総コレステロールを含むようにすることができる。本開示のいくつかの実施形態では、脂肪酸油混合物は、 AgNO_3 水溶液と組み合わせる前に、少なくとも1の除去処理ステップ、例えば、蒸留で除去され、除去処理ステップは、脂肪酸油混合物中の少なくとも1の環境汚染物質および/または総コレステロールの量を減少させる。

【0048】

以下の実施例は、本質的に限定することなく、本開示を説明することを意図したものである。当業者は、本明細書に提供する開示と調和した追加の実施形態を想起するだろうと理解される。以下の表に示す組成値は、ガスクロマトグラフィー（GC）面積百分率に基づく。当業者は、GC面積百分率がGC質量百分率とは異なる、例えばGC面積百分率是对応するGC質量百分率よりも高くなり得ることを理解するだろう。GC質量百分率を分析する手順は、欧州薬局方モノグラフ2.4.29、Composition of Fatty Acids in Oils Rich in Omega-3-Acidsに提供されている。

10

【実施例】

【0049】

実施例1： 温度
相分離前

K50EEを70重量%の AgNO_3 溶液（K50EE： AgNO_3 = 3：5）と約1.5時間混合し、所望の温度（表1参照、すなわち、8、21、50、60または70）とした。油/水混合物を約2時間放置して水相および有機相に分離し、有機相を除去した。水相を水に希釈し（水： AgNO_3 （固体） = 重量で約7.5：1）、有機物質、すなわち、脂肪酸濃縮物を遊離させた。濃縮物を回収し、その組成を表1に示すようにGC分析（GC面積%）により決定した。結果は、より高温がn-6脂肪酸および/または特定のn-3脂肪酸（例えば、EPAおよびDHA以外の長鎖（LC）脂肪酸）の相対濃度を減少させたことを示している。

20

【0050】

【表 1】

表 1: 脂肪酸濃縮物の組成;種々の温度で混合した K50EE:AgNO₃=3:5(GC 面積%)

脂肪酸エチル エステル	K50EE	8°C	21°C	50°C (I)	50°C (II)	60°C	70°C
18:2n-6	1.14	0.27	0.26	0.08	**	0.03	0.05
18:3n-3	0.62	0.26	0.21	0.11	0.07	0.07	0.05
18:4n-3	1.78	2.08	1.92	1.76	1.80	1.71	1.48
20:4n-6	1.66	1.01	0.84	0.48	0.45	0.40	0.30
20:4n-3	1.19	1.08	0.90	0.62	0.59	0.54	0.43
EPA	32.80	44.53	44.31	45.87	46.57	46.08	44.61
21:5n-3	1.32	1.96	1.77	1.72	1.74	1.68	1.55
22:5n-6	0.62	0.65	0.54	0.40	0.37	0.33	0.25
22:5n-3	4.64	6.64	5.71	5.07	4.98	4.67	4.08
DHA	25.48	34.72	36.69	41.31	41.66	42.50	44.80
EPA + DHA	58.28	79.25	81.00	87.18	88.23	88.58	89.41
Σn-3	70.83	91.27	91.51	96.46	97.41	97.25	97.00
Σn-6	3.42	1.93	1.64	0.96	0.82	0.76	0.60
Σn-3/Σn-6	20.7	47.2	55.8	100	119	128	162

**0.02%以下の GC 面積

【 0 0 5 1 】

相分離後

K30EEを室温で70重量%のAgNO₃溶液(K30EE:AgNO₃=1.2:1)と攪拌し、水相および有機相に分離させた。有機相を除去した。次いで、水相を70に加熱し、この実施例と同じ手順を使用した。加熱はしないで調製した濃縮物(「自然放熱濃縮物(Concentrate ambient)と比較してn-6脂肪酸および特定のn-3脂肪酸が濃縮した脂肪酸濃縮物(「濃縮物-1」)を遊離させた。水相を水に希釈し(水:AgNO₃(固体)=重量で約7.5:1)、第1の濃縮物と比較して、n-3/n-6比が増加し、EPAおよびDHA以外のn-3脂肪酸の濃度が低い第2の濃縮物(「濃縮物-2」)を得た。表2を参照されたい。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

【表 2】

表 2: 脂肪酸濃縮物の組成;70°Cに加熱した水相

脂肪酸エチルエステル	K30EE	自然放熱濃縮物	濃縮物-1	濃縮物-2
16:4n-1	1.24	5.07	3.57	6.74
18:1n-9	11.94	0.73	3.20	-
18:3n-3	0.59	0.07	0.37	-
18:4n-3	2.15	3.31	5.75	2.81
20:4n-6	1.03	0.33	1.29	0.13
20:4n-3	0.50	0.37	1.66	0.20
EPA	18.51	45.36	42.68	45.67
21:5n-3	0.71	1.57	1.96	1.44
22:5n-6	0.3*	0.35	1.01	0.21
22:5n-3	2.29	3.69	6.58	2.94
DHA	12.21	34.81	15.75	38.51
EPA+DHA	30.72	80.17	58.43	84.18
Σ n-3	36.96	89.18	74.75	91.57
Σ n-6	1.3	0.68	2.30	0.34
Σ n-3/ Σ n-6	28	131	32.5	269

*ピークサイズから推定した

【 0 0 5 3 】

図 1 および図 2 は、それぞれ、濃縮物 - 1 および濃縮物 - 2 についてのガスクロマトグラフを示している。図 1 および図 2 の比較は、現在開示している方法が、脂肪酸化合物を選択的に除去して、出発混合物と比較して特定の脂肪酸の量が低い濃縮物（例えば、図 2）を与えることを示している。

【 0 0 5 4 】

水相の高い塩濃度は、上記と同様の分離法を 0 よりずっと低い温度で行うことができるよう融点を下げる。おそらく、水相中の多価不飽和脂肪酸 / 脂肪酸誘導体の含量も融点のさらなる低下をもたらすだろう。本明細書に開示する方法により行くと、例えば、水相のいかなる凝固または部分的凝固も起こることなく、-20 で 70% 硝酸銀水溶液を用いて実験が行われた。おそらく、温度をさらに低下させることができるだろう。当業者は、このような温度の低下が上に論じた温度調節法の技術的価値を増加させ得ることを理解するだろう。

【 0 0 5 5 】

低温は EPA および DHA エチルエステルの取り込みを促進することが当技術分野で認識されている (Seike 他 (2007) Journal of Chemical Engineering of Japan, 第 40 巻, 1076 ~ 1084 頁)。しかしながら、温度調節を利用して、表 2 により説明されるように脂肪酸を分離すること、例えば、n3/n6 比を変えること、EPA および DHA 以外の脂肪酸（例えば、22:5n-3）を単離するための出発物質として適した中間体を作ること、ならびにより少量の他の長鎖 3 脂肪酸を含む EPA および DHA の濃縮物を作ることができることは当技術分野で認識されていない。

【 0 0 5 6 】

実施例 2 A : 置換液による抽出

K30EEを周囲温度で70重量%のAgNO₃溶液(K30EE:AgNO₃(固体)=1.2:1)と撹拌した。混合物を沈殿させ、有機相を除去した。水相を1-ヘキセン(ヘキセン:AgNO₃(固体)=重量で約0.54:1)で抽出し、次いで、水(水:AgNO₃(固体)=重量で約7.5:1)に希釈した。希釈により遊離した脂肪酸濃縮物を回収し、GCにより分析した。表3を参照されたい。

【0057】

【表3】

表3: 脂肪酸濃縮物の組成;ヘキセン抽出

脂肪酸エチルエステル	濃度 (GC 面積%)
16:4n-1	5.21
18:3n-3	**
18:4n-3	0.22
20:4n-6	**
20:4n-3	0.02
EPA	40.14
21:5n-3	1.04
22:5n-6	**
22:5n-3	1.37
DHA	50.16
EPA + DHA	90.30
Σn-3	92.95
Σn-6	**
Σn-3/Σn-6	∞ [‡]
Σ「他の C20~C22 n-3」	2.43

**0.02%以下のGC面積

[‡]0.05%より上の面積を有するピークのみ含めた。

【0058】

表4Aは、異なる置換液:有機溶媒ヘキサン、1-ヘキセンおよびシクロヘキサンの比較を示している。3種の溶媒全てについて以下の手順に従った。AgNO₃およそ30.2gを水12.9gに溶解して70重量%のAgNO₃溶液を調製した。溶液を70でK30EEおよそ24.1gと撹拌した。70で相分離を起こさせ、有機相(約17.1g~17.7g)を除去した。次いで、水相を4倍容の溶媒(それぞれ、4×15.8mlヘキサン、4×16.1mlヘキセン、4×19.5mlシクロヘキセン)で抽出した。4種の抽出物の組み合わせが、表4Aに示す各溶媒についての「抽出物」を表す。残っている水相を水225mlで希釈し、室温で暗所中、一晩放置した。水相から回収した脂肪酸濃縮物を分離し、これは表4Aに示す各溶媒についての「濃縮物」を表す。組成をGC面積%で報告する。

【0059】

ヘキサンにより製造した抽出物のGCクロマトグラムを図3に示す。例えば、表4Aに示すGC面積から分かるように、ヘキサンにより製造した抽出物については、DPAn-3/DHA比は約3.3:1であり、DPAn-3/DPAn-6比は約3.0:1である。ここで、いわゆる「ヨードラクトン化反応」(Breivik 2007参照)を使用して多価不飽和脂肪酸を分離することができる。適当な量の試薬を添加することにより

10

20

30

40

50

、DHAおよびDPA n - 6のより安定な五員環ヨード - - ラクトンが形成する一方で、DPA n - 3は実質的に影響されないままであるだろう。DHAおよびDPA n - 6のヨードラクトンを未反応脂肪酸から除去することができる。図3と類似の脂肪酸組成物では、ヨードラクトン化反応を利用して22個の炭素原子の鎖長を有する唯一の脂肪酸としてDPA n - 3 (22 : 5 n - 3) を実質的に含む脂肪酸組成物を製造することができる。当業者は、このような生成物が純粋なDPA n - 3の製造に比類なく適していることを理解するだろう。

【0060】

【表4】

表4A: 脂肪酸濃縮物の組成;置換液ヘキサン、1-ヘキセン、シクロヘキセン。K30EEは表2と同じバッチからのものとした。

K30EE 脂肪酸エチル エステル	ヘキサン		1-ヘキセン		シクロヘキセン	
	抽出物	濃縮物	抽出物	濃縮物	抽出物	濃縮物
16:4n-1	1.398	4.393	4.636	4.679	4.886	5.167
18:3n-3	1.019	**	0.297	**	0.167	**
18:4n-3	7.608	1.905	9.824	1.792	6.584	0.936
20:4n-6	3.242	**	1.782	**	0.735	**
20:4n-3	2.801	**	1.813	**	0.854	**
20:5n-3 (EPA)	13.43	47.316	42.263	46.44	53.469	40.536
21:5n-3	0.857	1.547	2.12	1.522	2.327	1.117
22:5n-6	1.734	0.136	1.435	0.174	0.841	
22:5n-3	5.288	2.961	8.818	2.979	7.069	1.583
22:6n-3 (DHA)	1.603	40.755	6.82	41.51	14.595	50.441
EPA+DHA	15.033	88.071	49.083	87.95	68.064	90.977
Σ n-3	32.606	94.484	71.955	94.243	85.065	94.613
Σ n-6	4.976	0.136	3.217	0.174	1.576	0
Σ n-3/n-6	6.6	694	22	541	53	∞ [‡]
他の n-3	17.573	6.413	22.872	6.293	17.001	3.636
他の LC n-3	8.946	4.508	12.751	4.501	10.25	2.7
(EPA+DHA)/ 他の LC n-3	1.7	20	3.8	20	6.6	34

**0.02%以下の GC 面積

[‡]0.05%より上の面積を有するピークのみ含めた。

【0061】

表4Aが示すように、3種の濃縮物全てが94%超のn-3脂肪酸を含んでいたが、異なるn-3およびn-6脂肪酸の相対濃度は有意に異なっていた。ヘキサンはn-6脂肪酸の相対的除去ならびに最終生成物中のEPAまたはDHAの実質的な損失がない(約15%の損失)DHA以外のn-3脂肪酸の除去において最も効率的な溶媒であった。D P

10

20

30

40

50

A (n - 3) : DHA = 3 . 3 : 1 という高い比は、ヘキサン抽出物が DPA (n - 3) の精製に適していることを示唆している。同様に、(EPA + DHA) : (他の LC n - 3) 比についての 1 . 7 という低い値は、ヘキサン抽出物が他の LC n - 3 脂肪酸の相対含量が高い濃縮物の製造に適していることを示している。ヘキセン抽出物は、およそ 1 : 1 の DPA (n - 3) : DHA 比を有し、ヘキサン抽出物よりも高い総濃度の n - 3 脂肪酸を含んでいた。ヘキセン抽出物はまた、このような濃縮物および個々の純粋な脂肪酸エステルを製造するための適当な原材料となり得る。シクロヘキセンは、他の溶媒よりも n - 6 脂肪酸が低く (n - 6 脂肪酸は実質的に非存在であった)、EPA および DHA 以外の n - 3 脂肪酸が低い濃縮物を与えたが、最終生成物における EPA および DHA の収率も低かった (約 68% の損失)。濃縮物中の EPA + DHA の和は約 91 . 0% であったが、他の C₂₀ ~ C₂₂ n - 3 脂肪酸 (「他の LC n - 3」) の和はわずか 2 . 7% であった。

10

【0062】

表3および表4Aの結果は、温度を変化させること、ならびに異なる相対量の出発脂肪酸混合物および溶媒を使用することが、得られる濃縮物の組成に影響を及ぼすことを示している。例えば、表3に示す結果は、表4Aのものと同じ体積のK30EEおよび1-ヘキセンを使用したが、わずか2/3体積の70重量%のAgNO₃溶液を用いて得られた。使用する温度も異なっていた(室温対70)。

【0063】

1, 7-オクタジエンでも研究を行った; しかしながら、この溶媒はかなりの発熱反応をもたらした。発熱反応は、シクロオクタジエンおよび他のジエン/ポリエンの銀イオンに対する高い親和性を示し、この高い親和性は、十分な安全対策を適用するならば、これらの化合物を置換液として有用にすることができるだろう。実施例2Bの表4Bも参照されたい。

20

【0064】

実施例2B: 置換液の使用に関する追加の実施例

表4Bに列挙する有機溶媒でいくつかの実験を行った。各実験について、以下のおおよその量の試薬およびエチルエステル出発物質を使用した: 硝酸銀60g、水に溶解して70%の濃度を得た(水25.7g)、およびK30EEエチルエステル(バッチ2101071)48g。正確な量、ならびに回収した抽出物の量を表4Cに示す。

30

【0065】

室温で1.5時間、マグネチックスターラーにより攪拌した後、硝酸銀水溶液およびK30EEの各混合物を分液漏斗に移し、相分離が起こるまで暗所に放置した。上部有機層(「非溶解エステル」)を除去した。分析用の試料を一連の実験の第1の実験のために回収した。

【0066】

一連の実験の第1の実験を除いては、水相を3部の溶媒で抽出した。各部はおよそ0.36molの溶媒を含んでいた。エチルエステル約20gが非溶解エステルの除去後に水相中に残っていたと推定される。エチルエステルの平均分子量が330g/molであると仮定すると、エチルエステル20gは0.06molに相当する。これは、水相に元々溶解しているエチルエステルと比較して推定6倍モル過剰の溶媒で各抽出が行われたことを意味する。表4Bを参照されたい。

40

【0067】

抽出が完了した後、水600mlを水相に添加し、激しく攪拌した後、混合物を暗所で一晚放置して新たな相分離を完了した。

【0068】

溶媒を含む全抽出物を、ロータリーエバポレーターを使用して真空下で蒸発させた。抽出物を秤量した後、試料を分析のためにとった。

【0069】

選択された脂肪酸エチルエステルからの分析結果を表4Cに示す。

50

【 0 0 7 0 】

【 表 5 】

表 4B. 溶媒の量

抽出溶媒	密度 (g/ml)	分子量 (g/mol)	3回の抽出の 各々について の溶媒のおお よその重量 (g)	3回の抽出の 各々について の溶媒のおお よその体積 (ml)	各抽出につ いてのおよ び合計のモ ル数
1. 溶媒無し	-	-	-	-	-
2. ヘキサン	0.66	86.2	31.3	47.3	0.36 (1.09)
3. 1-ヘキセン	0.673	84.2	30.6	45.5	
4. シクロヘキセン	0.811	82.1	29.8	36.7	
5. ジクロロメタン	1.335	84.9	30.8	23.1	
6. 1,5-シクロオクタジ エン	0.882	108.2	39.3	¹	
7. アセトン	0.788	58.1	21.1	²	

10

20

¹硝酸銀水溶液含有相への1,5-シクロオクタジエンの添加は、発熱反応をもたらし、安全性の理由のため、実験をやめた。しかしながら、この発熱反応は、シクロオクタジエンおよび他のジエン/ポリエンの銀イオンに対する高い親和性を示し、この高い親和性は、十分な安全対策を適用するならば、これらの化合物を置換液として有用にすることができるだろう。

²アセトンの添加は、相分離をもたらさなかった。例えば、アセトンを他の溶媒と組み合わせる、またはアセトン以外のケトンを使用するさらなる実験を行うことができるだろう。

【 0 0 7 1 】

【 表 6 】

表 4C. 試薬、出発物質および抽出物の重量(g)¹

溶媒	AgNO ₃	H ₂ O	K30EE	未溶解エステル	抽出物			濃縮物	回収した物質 の和	総収率 (%)
					A	B	C			
無	60.6	26.0	48.7	28.2			18.5	46.7	96	
ヘキサン	60.1	25.4	48.1	29.2	1.17	0.96	13.8	45.9	95	
1-ヘキセン	60.5	25.3	48.1	32.0	1.41	0.87	11.0	45.9	96	
シクロヘキセン	60.2	25.1	49.1	29.0	4.55	3.50	9.48	48.1	98	
CH ₂ Cl ₂	60.1	25.3	48.1	26.3	8.40	3.00	6.16	45.8	95	

¹少量の分離後の抽出物重量を得ることは困難である。ある物質はガラス機器の表面上で必然的に失われ、水相からのいくつかの混入を避けることは困難である。当業者は、種々の抽出物の重量ならびに総収率に関していくつかの不確実性が存在することを理解するだろう。

【 0 0 7 2 】

10

20

30

40

50

【 8 冊 】

表 4E. 置換液としてジクロロメタンを使用した実験。選択された脂肪酸エチルエステルについての GC 結果(正規化した面積%)。CF=「濃縮係数」、すなわち、K30EE の相対 GC 面積で割った濃縮物の相対 GC 面積。

分画 (質量、g)	体積 CH ₂ Cl ₂ (ml)	16:4n-1	18:3n-3	18:4n-3	19:5	20:4n-6	20:4n-3	EPA	21:5n-3	22:5n-6	22:5n-3	DHA
K30EE	-	2.0	0.6	2.4	nd	1.0	0.8	18.7	0.7	0.4*	2.2	12.6
A (6.75)	8.0	1.0	0.8	3.5	nd	1.6	1.2	8.0	0.3	0.6	2.2	1.2
B (1.88)	8.0	4.3	0.5	10.9	nd	2.0	2.2	37.0	1.9	1.5	7.5	6.2
C (1.72)	8.0	6.1	0.2	11.5	0.2	1.1	1.6	50.8	2.6	1.4	9.4	8.6
D (2.73)	23.1	7.6	0.1	7.6	0.2	0.2	0.5	59.0	2.8	0.7	8.3	10.4
E (1.77)	23.1	8.4	0.0	4.0	0.2	0.1	0.2	63.4	2.6	0.3	5.8	12.7
濃縮物 (6.34)		3.7	0.0	0.4	0.2	0.1	0.0	39.0	0.9	0.1	0.9	53.8
CF		1.9	0	1.7	-	0.1	0	2.1	1.3	0.3	0.4	4.3

*ピークサイズに基づく推定値

nd: 検出されず

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

50

表4Dから分かるように、種々の溶媒は、異なる方法で置換液として作用した。以下の議論は、種々の脂肪酸エチルエステル（またはエチルエステルの組み合わせ）の濃縮物のための原材料の製造のためにこれらの溶媒を使用するために存在する多くの異なる可能性のいくつかにのみ焦点を当てている。当業者は、これらの結果が、いくつかのさらなる脂肪酸エチルエステルまたは脂肪酸エチルエステルの組み合わせのための原材料を作る可能性を示したことを理解するだろう。

【0075】

ヘキサンはDHAに比べてDPA（22：5n-3）に富む分画の製造を可能にする有用な特性を有することが分かり、したがって、DHAの濃縮物の製造に（および作表した値から20：4n-3が濃縮した濃縮物の製造にも）有用であると思われたが、ジクロロメタン（CH₂Cl₂）は、例えば、少量の他のn-3脂肪酸ならびに少量のn-6脂肪酸を含むEPAおよびDHAの濃縮物の製造によく適合し得る。さらに、他の置換液と比べて、CH₂Cl₂はまた、高不飽和脂肪酸16：4n-1の相対量を減少させる効果を有していた。したがって、CH₂Cl₂または同様の効果を有する置換液は、鎖長により作用する補足の分離技術により16：4n-1を減少させる必要性を排除し得るので、EPAおよびDHAの高濃縮物の製造に有用となり得る。分子蒸留/短行路蒸留は、一般的に使用されている鎖長による分離技術である。しかしながら、この技術の分離力はあまり大きくないので、分子蒸留/短行路蒸留による脂肪酸16：4n-1の除去は、所望の脂肪酸のいくらかの損失ももたらし得る。したがって、値は、他の置換液に比べて16：4n-1の含量を減少させるCH₂Cl₂のような置換液を使用している。

【0076】

表4Cは、ジクロロメタンを置換液として使用した場合に、比較的大量のエチルエステルが第1の分画（分画A）に出たことを示している。表4Eは、置換剤としてジクロロメタンを使用したさらなる実験の結果を示している。CH₂Cl₂23.1mlによる第1の抽出をそれぞれCH₂Cl₂8mlによる3回の抽出に置換したことを除いて、手順は表4Bおよび表4Cに示すものと同一とした。

【0077】

濃縮物の最終量（6.34g）は、CH₂Cl₂を使用した第1の実施例で得られたものに近かった。EPAおよびDHAの濃度ならびに他の脂肪酸の濃度も第1の実施例で得られたものと非常に近かった（表4D参照）。抽出物Aの組成は、EPAおよびDHAの量が少ないこと、ならびに他の長鎖3脂肪酸および長鎖6脂肪酸の相対量が多いことを示した。したがって、例えば、少量のジクロロメタンを利用して、EPAおよびDHAの含量を改善し、他の長鎖n-3脂肪酸および長鎖n-6脂肪酸の含量を減少させることができることが分かった。CH₂Cl₂の量を変化させることにより、抽出物としてまたは濃縮物として異なる組成物が得られるだろう。この実施例の情報から、出発物質の量および濃度に対して特定の比のCH₂Cl₂を利用することにより、特定の脂肪酸含量を有する組成物を仕立てることができる。表4Eおよび表4Dから分かるように、CH₂Cl₂によるさらなる抽出は、他の長鎖n-3脂肪酸および長鎖n-6脂肪酸を大部分除去して、水希釈後に90%超のEPAおよびDHAのエチルエステル（GC面積%）を含む濃縮物をもたらした。そのため、中間体抽出物は、このような長鎖n-3およびn-6脂肪酸の濃縮した分画を製造するための有用な出発物質を表した。また、中間体生成物は、EPAが濃縮しており、このことは中間体生成物を、例えば、Epadel製品のような高濃度のEPAを含む製品を製造するための中間体として有用にした。

【0078】

図5は、表4Eと同じデータを表しており、柱は同じ選択された脂肪エステルのエチルエステルの相対濃度を表している。図および表から、特定の成分の最大抽出がいつ得られるかに基づき、K30EEおよび抽出物Aの相対濃度の比ならびに抽出物Eおよび最終濃縮物の相対濃度の比と比較して、置換液としてのCH₂Cl₂による脂肪酸エチルエステルの除去の容易さについての「つつき順位」を推測することができる。

【0079】

この「つつき順位」は、
 $18 : 3n - 3 > 20 : 4n - 6 > 22 : 5n - 6 > 20 : 4n - 3 > 18 : 4n - 3 >$
 $22 : 5n - 3 > 21 : 5n - 3 > 16 : 4n - 1 > EPA > DHA$
 であるように思われる。19 : 5 脂肪酸はあまりに少量で存在するので、この「つつき順位」の中の位置を見出すことが不可能であった。

【0080】

高速サイズ排除クロマトグラフィー（HPLC）による分析は、置換液として CH_2Cl_2 を使用すると、エチル化油中の典型的な微量成分である部分グリセリドが濃縮物中に濃縮されることを示した。他の溶媒を使用すると、濃縮物中の部分グリセリドの濃度は、出発K30EEに比べて有意な程度に影響を受けているようには見えなかった。これは、表4Fに示す分析結果で説明される。

【0081】

【表9】

表4F. 部分グリセリド。オメガ3脂肪酸エチルエステルについての欧州薬局方モノグラフ1250 および USP モノグラフの手順にしたがって分析。

溶媒	分画	ジグリセリド	モノグリセリド	エチルエステル
	K30EE	2.9	4.0	93.1
無	濃縮物	2.5	3.0	94.5
ヘキサン	濃縮物	2.2	2.7	95.1
1-ヘキセン	濃縮物	2.4	3.4	94.2
シクロヘキセン	濃縮物	2.6	3.7	93.7
$CH_2Cl_2^1$	濃縮物	3.5	6.0	90.5
$CH_2Cl_2^2$	A	4.0	1.8	94.2
	B	2.1	0.9	97.0
	C	1.9	0.8	97.3
	D	1.9	0.8	97.3
	E	1.3	0.9	97.8
	濃縮物	3.4	7.2	89.4

¹表4Dからの濃縮物

²表4Eからの抽出物および濃縮物

【0082】

表4Dおよび表4EのGC面積結果は、欧州薬局方モノグラフ2.4.29およびUSPモノグラフOmega-3 acid ethyl estersにより記載されているようにエチルエステル試料の直接注入により得た。試料中の部分グリセリドが出発K30EEの組成に似ている場合、当業者は、分析への部分グリセリドの包含がEPAおよびDHAの測定含量の減少につながることを理解するだろう。この理由は、部分グリセリドはGCクロマトグラムで観察されないためであり、この理由のために、エチルエステルピークの相対面積%は、全成分がクロマトグラムで観察される場合よりも高いだろう。当業者は、部分グリセリドを分析に含める方法が、試料をメチル化し、それによって、エチルエステルおよび部分グリセリドの両者をメチルエステルに変換することであることを理解するだろう。したがって、置換液として CH_2Cl_2 を使用して得られる濃縮物のためにこのような手順を行うと、EPAおよびDHAの含量は、表4Dおよび表4Eに示す結果と比べて減少するだろうと思われる。

【0083】

しかしながら、置換液として CH_2Cl_2 を使用して得られる濃縮物をメチル化した場合、得られたメチルエステルは、EPAおよびDHAの含量が減少していなかった。それどころか、EPAの濃度はいくぶん影響されなかったように見えたが、DHAの濃度は増加したように見えた（表4G）。同時に、16 : 4n - 1の相対濃度は増加せず、むしろわ

ずかに減少したように見えた。したがって、例えば、 CH_2Cl_2 のような置換液を使用すると、最終濃縮物中の部分グリセリドの濃度は増加し、これらの部分グリセリドは、例えば、出発K30EEに比べて、EPAおよびDHAの濃度が強く増加したように思われる。したがって、分子蒸留および尿素分画のような伝統的な濃縮手順において部分グリセリド分画と共に損失した有用な脂肪酸は、本明細書に開示する方法により保持および濃縮される。

【0084】

【表10】

表 4G. 置換液として CH_2Cl_2 を使用して得られる濃縮物。欧州薬局方モノグラフ 2.4.29 のトリグリセリドの誘導體化に関して、および USP モノグラフのオメガ3 脂肪酸エチルエステルの部分グリセリドを分析する際の誘導體化に関しての手順にしたがって、メチル化を行った。

		16:4n-1	EPA	DHA
表 4D から	エチルエステルとして分析	3.5	39.1	54.8
	メチル化後に分析	3.4	38.9	55.2
表 4E から	エチルエステルとして分析	3.7	39.0	53.8
	メチル化後に分析	3.4	39.2	54.9

【0085】

この実施例から、例えば、 CH_2Cl_2 は、炭素および水素のみを含む炭化水素に比べて置換液としての効果が改善していた。当業者は、他のハロゲン化溶媒ならびに酸素または窒素のような他の極性官能基を含む溶媒によっても同様の効果の改善が得られることを理解するだろう。

【0086】

実施例 2 C : 出発物質としてトリグリセリドを使用した EPA および DHA の濃縮

タラ肝油 (Moller's Tran) 60.3 g を、70 で H_2O 23 g および AgNO_3 59 g の混合物に添加した。混合物を 1 時間攪拌し、次いで、相分離が起こるまで放置した。下部水相を上部油相から分離し、水 400 g を添加して、 Ag^+ 錯体を解離させ、EPA および DHA が濃縮したトリグリセリドを遊離させた。出発物質および得られた油の脂肪酸プロファイルを表 4 H に示す。EPA および DHA は、2 倍超の増加を示した。この実施例は、トリグリセリドでも錯化が起こることを示している。EPA および DHA の濃縮を達成するためには、脂肪酸の分布は、トリグリセリド中で完全にランダムにすることはできない。トリグリセリドのいくらかは主鎖に結合した飽和または不飽和脂肪酸を主に有さなければならない。トリグリセリド中の脂肪酸の分布は、種に応じて変化し得る。

【0087】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 4H. 出発物質としてタラ肝油を使用した EPA および DHA の濃縮の例

脂肪酸	タラ肝油 (TG)	濃縮物	変化
C14:0	3.0	1.4	-53%
C16:0	9.7	5.0	-49%
C16:1	8.2	3.8	-54%
C18:0	2.1	1.5	-29%
C18:1n-9	17.8	9.6	-46%
C18:1n-7	4.9	3.1	-37%
C18:2	1.8	1.0	-45%
C18:3n-3	0.8	0.6	-18%
C8:4n-3	2.5	3.7	51%
C20:1	13.3	6.5	-51%
C20:4 n-3	0.8	0.9	11%
C20:5 n-3	9.4	19.8	110%
C22:1	7.2	2.9	-60%
C22:5 n-3	1.3	2.0	51%
C22:6 n-3	13.0	33.7	160%

10

20

【 0 0 8 8 】

実施例 2 D : 超臨界 CO₂による抽出

50 で、45% / 19% / 36% (重量基準) の AgNO₃ / H₂O / EE 比を使用すると、エチルエステルの 68% が有機層に残っていた。水層を抽出のために SFE (超臨界流体抽出) カラムに移した。Suzuki (Suzuki 他 (1993)、Bioseparation 3、197~204 頁) の発見に反して、錯体からのエチルエステルの全てを抽出することができたわけではなかった。エチルエステルの約 70% を抽出した後、残っている混合物はゲル状固体に変わった。抽出の温度および圧力を利用して EPA / DHA 比を変化させることができる。280 パールで 60 から 70 まで抽出温度を上昇させると、抽出したエチルエステル中の EPA / DHA は 53 / 15 から 55 / 23 に変化した。全てのエチルエステルを抽出するために、抽出中に水を添加することが必要であった。エチルエステルの完全な抽出を可能にするには 0.5% H₂O を CO₂ 流に添加することで十分であった。以下の実施例 6 の結果は、エタノールの添加もこの点で有用となり得ることを示唆している。

30

【 0 0 8 9 】

実施例 3 : 水への希釈

水による水相の部分希釈により、n-6 脂肪酸および / または特定の 3 脂肪酸 (例えば、EPA および DHA 以外の長鎖 n-3 脂肪酸) が濃縮した有機分画が遊離することが分かった。

【 0 0 9 0 】

K85EE を 60 重量% の AgNO₃ 溶液 (K85EE : AgNO₃ = 重量で約 7 : 10) と撈拌した。水相を有機相から分離し、水で徐々に希釈した。水 (水 : AgNO₃ (固体) = 重量で約 1.2 : 1) による 1 回の希釈後に「濃縮物 - 1」を得た。水相のさらなる希釈 (水 : AgNO₃ (固体) = 重量で約 2.8 : 1) により第 2 の脂肪酸濃縮物を得た (分析せず)。さらなる希釈 (水 : AgNO₃ (固体) = 重量で約 20 : 1) により「濃縮物 - 4」を得た。表 5 は、K85EE 出発混合物、分離した有機相 (「未溶解エステル」)、濃縮物 - 1 および濃縮物 - 4 の組成 (GC 面積%) を比較している。K85EE 出発混合物の重量と比較した収率をカッコ内に示す。濃縮物 - 4 のガスクロマトグラムは図 4 にある。

40

【 0 0 9 1 】

50

【表 1 2】

表 5: 脂肪酸濃縮物の組成;徐々の水希釈

脂肪酸エチルエステル	濃度 (GC 面積%)			
	K85EE	未溶解エ テル (45%)	濃縮物-1 (22%)	濃縮物-4 (4%)
フィタン酸	0.11	0.29	0.02	**
16:3n-4	0.11	0.22	0.07	**
16:4n-1	0.19	0.14	0.15	0.45
18:2n-6	0.04	0.10	**	**
18:3n-4	0.11	0.26	0.03	**
18:3n-3	0.06	0.13	0.03	**
18:4n-3	1.68	2.62	1.65	0.18
18:4n-1	0.11	0.17	0.15	**
フラン酸 5	0.15	0.37	**	**
19:5	0.07	0.07	0.07	0.13
20:3n-6	0.06	0.14	**	**
20:4n-6	1.71	3.86	0.61	**
フラン酸 7	0.15	0.29	0.04	0.06
20:4n-3	0.45	0.95	0.24	**
フラン酸 8	0.45	1.11	0.05	**
20:5n-3 (EPA)	48.65	52.76	54.39	27.39
フラン酸 9	0.07	0.16	**	**
21:5n-3	1.74	2.38	2.14	0.25
22:4	0.08	0.17	**	**
フラン酸 10	0.28	0.68	**	**
22:5n-6	0.90	1.87	0.53	**
フラン酸 11	0.04	0.12	**	**
22:5n-3	2.87	5.08	3.08	0.19
22:6n-3 (DHA)	39.55	25.15	36.16	70.14
24:1	0.02	**	**	**
EPA+DHA	88.20	77.91	90.53	97.54
Σ n-3	95.00	89.02	97.69	98.15
Σ n-6	2.65	5.83	1.14	**
Σn-3/Σn-6	35.8	15.3	85.7	∞ [†]
Σ「他の C20~C22 n-3」	5.06	8.41	5.46	0.44

**0.02%以下の GC 面積

†0.05%より上のピークのみ含めた。

【 0 0 9 2 】

表 5 の結果は、有機相が K 8 5 E E 出発混合物に比べて n - 6 脂肪エステルが濃縮して

いたことを示している。同様の結果がDHA以外のn-3脂肪酸について観察された。濃縮物4は、70% DHA (GC面積%) および非常にわずかなDPAを含んでおり、このようなおよび類似の分画を純粋なDHAを製造するための中間体として適したものにしている。

【0093】

実施例4: AgNO₃濃度

K85EEを、K85EE:AgNO₃=2:1(20.0g対10.1g)で60重量%または70重量%のAgNO₃溶液と攪拌した。油/水混合物を分離させ、有機相を除去した。水相を水100mlで希釈し、希釈により遊離した脂肪酸濃縮物(「濃縮物-1」)を回収した。追加の水50mlを水相に添加して第2の濃縮物(「濃縮物2」)を得た。K85EE出発混合物、分離した有機相(「未溶解エステル」)ならびに濃縮物1および2の組成を、表6および表7に示すようにGC分析(GC面積%)により決定した。K85EE出発混合物の重量と比較した収率をカッコ内に示す。

【0094】

【表13】

表6: 脂肪酸濃縮物の組成,60%AgNO₃溶液

脂肪酸エチルエステル	濃度 (GC 面積%)			
	K85EE	未溶解エステル (22%)	濃縮物-1 (64%)	濃縮物-2 (8%)
18:2n-6	0.04	0.05	**	**
18:3n-4	0.11	0.21	**	**
18:3n-3	0.06	0.08	**	**
18:4n-3	1.68	3.01	1.10	0.58
20:4n-6	1.71	6.75	0.46	0.10
20:4n-3	0.45	1.67	0.18	0.03
フラン酸 8	0.45	1.62	0.03	**
20:5n-3 EPA	48.65	47.84	46.03	39.95
21:5n-3	1.74	2.57	1.77	0.81
22:5n-6	0.90	3.22	0.46	0.07
22:5n-3	2.87	6.56	2.81	0.54
22:6n-3 DHA	39.55	19.54	46.02	57.12
24:1	0.02	0.04	**	**
Σ n-3	95.00	81.27	97.91	93.03
Σ n-6	2.65	10.02	0.92	0.17
Σn-3/Σn-6	35.8	8.11	106	547
Σ「他の C20~C22 n-3」	5.06	10.80	4.76	1.38

**0.02%以下のGC面積

【0095】

【表 1 4】

表 7: 脂肪酸濃縮物の組成;70%AgNO₃ 溶液

脂肪酸エチルエステル	濃度 (GC 面積%)			
	K85EE	未溶解 (15%)	濃縮物 1 (71%)	濃縮物 2 (9%)
18:2n-6	0.04	0.13	0.03	**
18:3n-4	0.11	0.24	**	**
18:3n-3	0.06	0.15	**	**
18:4n-3	1.68	2.70	1.31	0.62
20:4n-6	1.71	9.65	0.80	0.10
20:4n-3	0.45	1.96	0.29	0.03
フラン酸 8	0.45	1.16	**	**
20:5n-3 (EPA)	48.65	46.43	48.21	40.84
21:5n-3	1.74	2.38	1.94	0.85
22:5n-6	0.90	3.90	0.71	0.07
22:5n-3	2.87	6.43	3.10	0.53
22:6n-3 (DHA)	39.55	17.72	42.66	56.37
24:1	0.02	0.09	**	**
Σ n-3	95.00	77.77	97.51	99.24
Σ n-6	2.65	13.68	1.54	0.17
Σn-3/Σn-6	35.8	5.69	63.3	584
Σ「他の C20~C22 n-3」	5.06	10.77	5.33	1.41

**0.02%以下の GC 面積

【 0 0 9 6 】

比較的低濃度の銀イオンを含む水溶液により脂肪酸濃縮物を得ることも可能であり得る。しかしながら、2種の混合物：より多量のEPAおよびDHA（すなわち、より少量の6脂肪酸および/または特定の3脂肪酸、例えば、EPAおよびDHA以外の長鎖3脂肪酸）を含む脂肪酸濃縮物、ならびにより多量の6脂肪酸および/または特定の3脂肪酸、例えば、EPAおよびDHA以外の長鎖3脂肪酸（すなわち、より少量のEPAおよびDHA）を含む別の濃縮物（例えば、分離した有機相）を得るためには、水による希釈が好ましいだろう。このことを以下のように表8で説明する。K30EEを、K30EE:AgNO₃=0.8でAgNO₃溶液（60重量%、70重量%または80重量%）と混合し、2つの得られた相を分離した。水相を水に希釈した。表8の各AgNO₃濃度について、(1)の記号のついた列は、分離した有機相の組成を示す一方で、列(2)は約70の温度で水相を水に希釈することにより回収した脂肪酸濃縮物の組成を示す。表8に示すように、60%AgNO₃溶液は、より高いn-3/n-6比およびより高いDHA濃度をもたらした。

【 0 0 9 7 】

【表 15】

表 8: 脂肪酸濃縮物の組成;60%、70%、80%AgNO₃溶液

脂肪酸エチルエステル	K30EE	80% AgNO ₃		70% AgNO ₃		60% AgNO ₃	
		1 (69.1%)	2 (27.2%)	1 (73.2%)	2 (25.0%)	1 (80.3%)	2 (17.3%)
16:4n-1	2.04	0.42	5.42	0.63	5.54	1.00	6.23
18:2n-6	1.20	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	**
18:3n-3	0.60	0.71	0.09	0.69	0.07	0.64	0.04
18:4n-3	2.15	1.22	3.60	1.64	2.94	2.04	2.08
20:4n-6	1.05	1.09	0.53	1.16	0.27	1.13	0.10
20:4n-3	0.80	0.55	0.56	0.66	0.32	0.68	0.13
フラン酸 8	-	0.13	0.02	0.14	**	0.13	**
20:5n-3 (EPA)	18.53	3.11	43.15	5.83	42.79	10.33	41.29
21:5n-3	0.73	0.20	1.59	0.31	1.46	0.52	1.18
22:5n-6	0.5	0.31	0.59	0.44	0.36	0.48	0.14
22:5n-3	2.33	0.91	4.37	1.55	3.45	2.16	2.05
22:6n-3 (DHA)	12.87	0.65	31.53	1.32	34.14	3.21	39.88
EPA+DHA	30.87	3.76	74.60	7.15	76.93	13.54	81.17
Σn-3	37.43	7.35	84.81	12.35	85.17	19.58	86.65
Σn-6	1.55	1.42	1.14	1.62	0.65	1.63	0.24
Σn-3/Σn-6	24	5.18	74.4	7.62	131	12.0	361
Σ「他の C20~C22 n-3」	3.86	4.77	6.52	2.52	5.23	3.36	3.36

**0.02%以下の面積%

【0098】

実施例 5 : 脂肪酸混合物 : AgNO₃比

AgNO₃ (固体) に対する出発脂肪酸混合物の量を変化させることの影響を、K30EE : AgNO₃比を 0.4 から 1.6 まで変化させることにより試験した。全ての実験で AgNO₃ の 70 重量% 水溶液を使用した。組み合わせた K30EE - AgNO₃ を 70 で 1.5 時間攪拌した後、同じ温度で相分離を起こさせた。各実験で、約 1 時間後に 2 つの視覚的に明らかな相が得られた。有機相を除去した後、水溶液を水 (水 : AgNO₃ (固体) = 重量で約 7.5 : 1) で希釈した。得られた濃縮物を表 9 に示す。組成を GC 分析 (GC 面積%) により決定した。表 9 の結果は、AgNO₃ 当たりの K30EE の量を増加させることにより、より高い n-3 / n-6 比ならびにより高い (EPA + DHA) / (他の LC n-3) 比が得られることを示している。

【0099】

10

20

30

40

【表 1 6】

表 9: 脂肪酸濃縮物の組成;K30EE:AgNO₃比 0.4~1.6

脂肪酸エチルエステル	K30EE	K30EE : AgNO ₃ (固体)			
		0.4	0.8	1.2	1.6
16:4n-1	2.04	5.93	6.34	6.69	6.77
18:3n-3	0.6	0.05	ni	ni	0.05
18:4n-3	2.15	3.28	2.33	1.99	1.88
20:4n-6	1.05	0.27	0.19	0.15	0.17
20:4n-3	0.8	0.33	0.21	0.18	0.18
20:5n-3 (EPA)	18.53	46.23	42.5	39.75	37.62
21:5n-3	0.73	1.58	1.28	1.11	1.03
22:5n-6	0.5	0.36	0.22	0.18	0.17
22:5n-3	2.33	3.54	2.42	1.98	1.83
22:6n-3 (DHA)	12.29	34.66	40.8	44.79	45.21
EPA+DHA	30.82	80.89	83.3	84.54	82.83
Σ n-3	37.43	89.67	89.54	89.8	87.8
Σ n-6	1.55	0.63	0.41	0.33	0.34
Σ n-3/n-6	24	142	218	272	258
他の n-3	6.61	8.78	6.24	5.26	4.97
Σ(他の LC n-3)	3.86	5.45	3.91	3.27	3.04
(EPA+DHA)/ Σ(他の LC n-3)	7	14	21	25	27

ni: 積分せず;ピークは、0.05 面積%未満であると推定される。

【 0 1 0 0 】

実施例 6 : アルコールの添加

K 3 0 E E を、表 1 0 に示すように増加した相対量のエタノールを含む 7 0 重量%の A g N O₃ 溶液と攪拌した。上記のように最初の有機相を除去した後、残っている水相を水 (水 : A g N O₃ (固体) = 重量で 7 . 5 : 1) で希釈した。組成を表 1 0 に示すように G C 分析 (G C 面積%) により決定した。

【 0 1 0 1 】

10

20

30

【表 17】

表 10: 脂肪酸濃縮物の組成;水相へのエタノールの添加。K30EE は、表 9 と同じバッチからのものとする。

脂肪酸エチルエステル	エタノール% (AgNO ₃ (固体)と比べて)				
	0	15	30	45	60
16:3n-4	1.066	1.937	2.68	2.89	2.908
16:4n-1	3.399	3.366	3.235	3.084	2.926
18:1n-9	1.852	0.738	0.741	1.238	2.175
18:2n-6	0.078	0.058	0.12	0.027	0.029
18:3n-6	0.092	0.157	0.311	0.4	0.447
18:3n-4	0.045	0.092	0.178	0.23	0.243
18:3n-3	0.117	0.146	0.125	0.122	0.111
18:4n-3	4.237	4.893	4.973	4.878	4.61
18:4n-1	0.528	0.61	0.613	0.598	0.57
フラン酸 5	0.032	-	0.017	0.05	0.08
19:5	0.149	0.159	0.156	0.156	0.144
20:3n-6	0.038	0.052	0.123	0.195	0.242
20:4n-6	0.708	1.398	2.068	2.268	2.26
フラン酸 7	0.042	0.043	0.051	0.057	0.061
20:4n-3	0.738	1.249	1.534	1.57	1.521
フラン酸 8	0.024	0.024	0.023	0.022	0.018
トランス EPA	0.012	0.016	-	0.015	0.013
20:5n-3 (EPA)	42.63	43.79	42.21	40.46	38.07
フラン酸 9	0.022	0.086	0.031	0.035	0.034
21:5n-3	1.78	1.894	1.838	1.766	1.663
22:4n-6	0.027	0.075	0.157	0.191	0.204
フラン酸 10	0.032	-	0.035	-	0.033
22:5n-6	0.732	1.103	1.129	1.13	1.069
フラン酸 11	0.029	0.055	0.089	0.108	0.108
22:5n-3	5.247	6.019	6.077	5.822	5.492
トランス DHA	0.037	0.025	0.068	0.026	0.031
22:6n-3 (DHA)	26.61	26.72	25.45	24.42	23.02
EPA+DHA	69.233	70.509	67.658	64.88	61.089
EPA/DHA	1.60	1.65	1.66	1.66	1.65
Σ n-3	81.352	84.71	82.205	79.038	74.486
Σ n-6	1.675	2.843	3.908	4.211	4.251
Σ n-3/n-6	48	29	21	18	17
他の n-3	12.119	14.201	14.547	14.158	13.397
他の LC n-3	7.765	9.162	9.449	9.158	8.676
(EPA+DHA)/他の LC n-3	8	7	7	7	7
全収率 (%)	27	27	30	31	33

表10の結果は、エタノールの添加が、種々の多価不飽和脂肪酸に異なって影響を及ぼすことを示している。エタノールの相対量を増加させると、大量の一価不飽和脂肪酸（例えば、18:1 n-9）が水相に入るようになり得る。エタノールの添加はまた、n-3脂肪酸に比べてn-6脂肪酸の濃度の増加をもたらすように見える。「他のLC n-3酸」の含量も、EPA+DHAの和に比べて増加するように見える。これらの効果は、「他のLC n-3酸」の含量が高いおよび/またはn-6脂肪酸の含量が高い濃縮物を製造するのに有用となり得る。

【0103】

実施例7： 汚染物質の除去

いくつかの残留性有機汚染物質（POP）をK30EEに添加し、得られたエチルエステルを現在開示している方法にしたがって濃縮した。得られた油（すなわち、脂肪酸濃縮物）のPOPおよびコレステロールを測定した。コレステロールは、欧州薬局方モノグラフ2.4.32、Total cholesterol in oils rich in omega-3 acidsにしたがって分析した。POPの濃度は低く、脂肪酸濃縮物中の総コレステロール（遊離およびエステル型コレステロール）の濃度は0.06 mg/gであった。K30EE出発物質中および得られた濃縮物中のPOPの濃度を表11に示す。銀イオンは結合系と相互作用することが知られているので（表4C参照）、芳香環系を含む残留性有機汚染物質の濃度は本方法中増加すると予想され得る。ベンゾ（a）ピレンは、74%の減少を示した。これは、銀イオンとの弱い錯化傾向、およびベンゾ（a）ピレンが完全には水相に移らず、主に有機相に残ることを示している。ハロゲン化溶媒は、銀イオン/多価不飽和脂肪酸錯体と相互作用する高い能力を示したことに留意すると（表4C参照）、少量のハロゲン化芳香族が水相に移り、濃縮物中に見出されることは驚くべきことである。出発物質に添加されたハロゲン化芳香族の96%以上が本方法で除去される。

【0104】

10

20

【表 18】

表 11. 出発物質(POP を添加した K30EE)ならびに濃縮物中の残留性有機汚染物質の濃度

POP 群	名称	出発物質	濃縮物
ダイオキシン	2,3,7,8-TCDD	18 pg/g	0.36 pg/g
非オルト PCB	3,3',4,4'-TeCB (PCB-77)	249 pg/g	7.0 pg/g
	3,4,4',5'-TeCB (PCB-81)	12 pg/g	0.30 pg/g
	3,3',4,4',5'-PeCB (PCB-126)	6.3 pg/g	0.18 pg/g
DDT	p,p'-DDT	112 ng/g	1.52 ng/g
PAH	ベンゾ(a)ピレン	20 ng/g	5.2 ng/g
PBDE	DecaBDE	4.7 ng/g	0.19 ng/g
PCB	2,2',4,4'-TetCB	1.2 ng/g	0.05 ng/g
	2,2',5,5'-TetCB	3.9 ng/g	0.10 ng/g
	2,3',4,4'-TetCB	2.2 ng/g	0.04 ng/g
	2,4,4',5'-TetCB	1.3 ng/g	0.02 ng/g
	2,2',4,4',5'-PenCB	1.0 ng/g	0.02 ng/g
	2,2',4,5,5'-PenCB	3.7 ng/g	0.08 ng/g
	2,3,3',4,4'-PenCB	1.0 ng/g	0.02 ng/g
	2,3,4,4',5'-PenCB	0.08 ng/g	<0.01 ng/g
	2,3',4,4',5'-PenCB	2.1 ng/g	0.04 ng/g
	2,2',3,3',4,4'-HexCB	0.7 ng/g	<0.01 ng/g
	2,2',3,4,4',5'-HexCB	29 ng/g	0.65 ng/g
	2,2',3,4,5,5'-HexCB	1.3 ng/g	0.02 ng/g
	2,2',3,4',5',6'-HexCB	4.0 ng/g	0.08 ng/g
	2,2',4,4',5,5'-HexCB	4.8 ng/g	0.09 ng/g
	2,3',4,4',5,5'-HexCB	0.12 ng/g	<0.01 ng/g
	2,2',3,3',4,4',5'-HepCB	1.7 ng/g	0.03 ng/g
	2,2',3,4,4',5,5'-HepCB	6.0 ng/g	0.11 ng/g
	2,2',3,4,4',5',6'-HepCB	1.1 ng/g	0.01 ng/g
	2,2',3,4',5,5',6'-HepCB	2.9 ng/g	0.06 ng/g
	2,3,3',4,4',5,5'-HepCB	0.04 ng/g	<0.01 ng/g
2,2',3,3',4,4',5,5'-OctCB	1.3 ng/g	0.02 ng/g	
2,2',3,3',4,4',5,5',6'-NonCB	0.46 ng/g	<0.01 ng/g	
DecaCB	0.04 ng/g	<0.01 ng/g	

【 0 1 0 5 】

実施例以外においてまたは特に指示しない限りは、本明細書および特許請求の範囲に使用する全ての成分の量を表す数字、反応条件、分析測定値などは、全ての例で用語「約」により修飾されるものと理解すべきである。したがって、特に指示しない限り、本明細書および添付の特許請求の範囲に示す数値パラメータは、本開示により得ようとする所望の特性に応じて変化し得る近似値である。最低でも、また特許請求の範囲への均等論の適用を限定する試みとしてではなく、各数値パラメータは、有効数字の数および通常の丸めアプローチに照らして解釈すべきである。

【 0 1 0 6 】

10

20

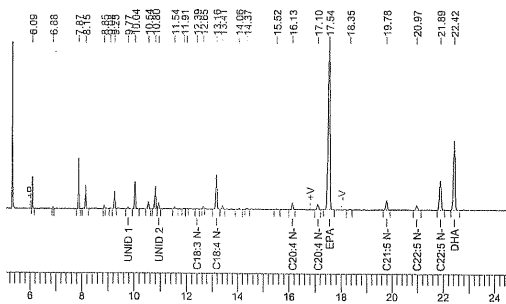
30

40

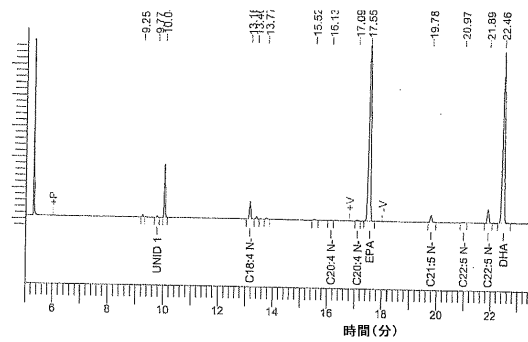
50

本開示の広範な範囲を示す数値範囲およびパラメータは近似値であるが、特に指示しない限り、特定の実施例に示す数値は、可能な限り正確に報告している。しかしながら、いかなる数値も、本質的に、それぞれの試験測定値に見られる標準偏差から必ず生じる特定の誤差を含む。

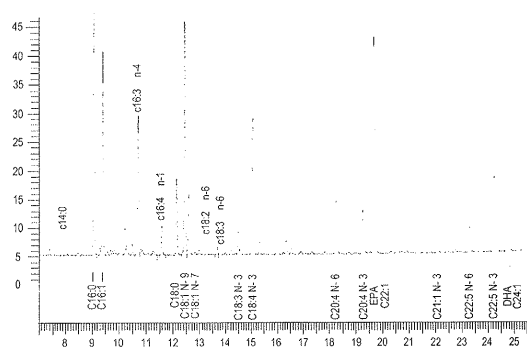
【 図 1 】



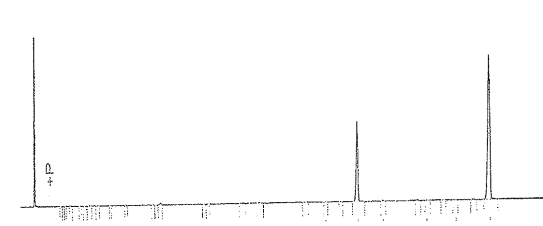
【 図 2 】



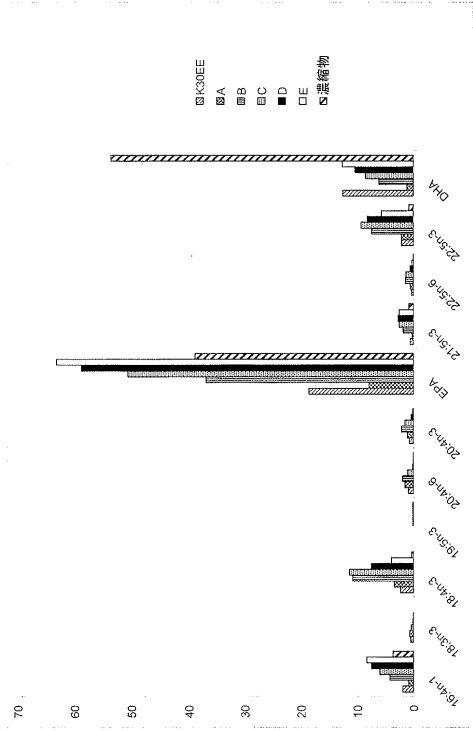
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
B 0 1 D 11/04 (2006.01) B 0 1 D 11/04 C

(74)代理人 100114465

弁理士 北野 健

(74)代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(74)代理人 100149076

弁理士 梅田 慎介

(72)発明者 ブレイヴィク, ハラルド

ノルウェー王国 エヌ - 8 1 4 0 インディル, アスファウゲン

(72)発明者 ソルスタッド, オラフ

ノルウェー王国 エヌ - 3 9 4 0 ポルスグルン, セルヴィヴェイエン 1 1

(72)発明者 リブナウ, フレッド, オラフ

ノルウェー王国 エヌ - 5 0 9 8 ベルゲン, ナットランドスリンデン 1 8 6

審査官 小久保 敦規

(56)参考文献 特開2001-240893(JP, A)

特開2001-335794(JP, A)

特開平06-248289(JP, A)

中国特許出願公開第1478875(CN, A)

国際公開第2010/029706(WO, A1)

化学工学論文集, Vol.20, No.1, p.97-104 (1994).

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 1 B 7 / 0 0

C 1 1 C 1 / 0 8

C 0 7 C 5 1 / 4 8 7

C 0 7 C 6 7 / 6 0

C 0 7 C 6 9 / 5 8 7

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)