



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202515985 A

(43)公開日：中華民國 114 (2025) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：113123091

(22)申請日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 21 日

(51)Int. Cl.：

C11B7/00 (2006.01)

C11B3/10 (2006.01)

B01D15/32 (2006.01)

(30)優先權：2023/06/22

日本

2023-102401

(71)申請人：日商日水股份有限公司 (日本) NISSUI CORPORATION (JP)

日本

(72)發明人：山口秀明 YAMAGUCHI, HIDEAKI (JP)；降旗清代美 FURIHATA, KIYOMI (JP)；

佐藤誠造 SATO, SEIZO (JP)

(74)代理人：洪澄文；洪茂

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：17 項 圖式數：0 共 78 頁

(54)名稱

高度不飽和脂肪酸酯組合物的製造方法

(57)摘要

提供有效率地以高純度製造目標的高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法。提供一種從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，其包含：藉由將油脂組合物供至第一管柱層析法，去除將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為 1.0 之情形的峰頂的滯留時間的相對值為 1.8 ~ 3.5 之至少一種的成分的全部或一部分；以及藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之析出液供至第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為 1.0 之情形的峰頂的滯留時間的相對值為 0.90 ~ 1.1 之至少一種的成分的全部或一部分。

【發明摘要】

【中文發明名稱】 高度不飽和脂肪酸酯組合物的製造方法

【中文】

提供有效率地以高純度製造目標的高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法。提供一種從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，其包含：藉由將油脂組合物供至第一管柱層析法，去除將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分的全部或一部分；以及藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之析出液供至第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分。

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 高度不飽和脂肪酸酯組合物的製造方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於使用管柱層析法製造高度不飽和脂肪酸（PUFA）酯的組合物之方法。

【先前技術】

【0002】 高度不飽和脂肪酸被利用作為醫藥品、健康食品等。高度不飽和脂肪酸係從富含高度不飽和脂肪酸之植物油及海產油等天然原料所製造。在天然原料中，亦包含雙鍵數量不同之脂肪酸，例如飽和脂肪酸、一價不飽和脂肪酸、碳鏈長度不同之脂肪酸等其他成分。天然原料中的高度不飽和脂肪酸的含量不高。為了將高度不飽和脂肪酸使用作為醫藥品、健康食品等，需要選擇性地分離目標的高度不飽和脂肪酸（專利文獻1）。

【0003】 作為高度不飽和脂肪酸的分離方法，已知有管柱層析法（專利文獻2）。另一方面，作為能連續操作的層析法，使用模擬移動床層析法（專利文獻3～7）。

[先行技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

[專利文獻1] 國際公開第2014／054435號

[專利文獻2] 日本特表2014-511406號公報

[專利文獻3] 日本特表平8-512336號公報

[專利文獻4] 日本特開平8-218091號公報

[專利文獻5] 日本特表2016-508156號公報

[專利文獻6] 日本特開2019-207234號公報

[專利文獻7] 日本特表2013-516398號公報

【發明內容】

[發明所欲解決的問題]

【0005】 模擬移動床層析法需要複雜的系統、裝置，相較於使用單一管柱之層析法為高價。因此，現仍尋求不需要如模擬移動床層析法般的複雜裝置而有效率地以高純度製造目標的高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法。

[用以解決問題的手段]

【0006】 出乎意料地，本發明的發明人發現藉由使用第一管柱層析法及第二管柱層析法之多段式分離方法，能應對上述問題並有效率地製造目標的高度不飽和脂肪酸，進而完成本發明。

本發明的主旨為以下的從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法。

【0007】 [1-1]一種方法，其係從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，並包含：

(a) 藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，

去除將係為在第一管柱層析法中之目標物之高度不飽和脂肪酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第一管柱層析法而獲得包含目標物之溶析液；

(b)藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

(c)將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含目標物之組合物，

所得之組合物含有95重量%以上的目標物。

【0008】 [1-2]如[1-1]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載

(loading)間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[1-3]如[1-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0009】 [1-4]如[1-1]~[1-3]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之前述至少一種

的成分為油脂組合物中的高度不飽和脂肪酸酯以外的至少一種的成分。

[1-5]如[1-1]~[1-4]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的係為，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09之至少一種的成分。

[1-6]如[1-1]~[1-5]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[1-7]如[1-6]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1的範圍。

【0010】 [1-8]如[1-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94~1.1的範圍。

[1-9]如[1-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中

之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96～1.1的範圍。

[1-10]如[1-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09的範圍。

[1-11]如[1-6]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

[1-12]如[1-1]～[1-11]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【0011】 [1-13]如[1-1]～[1-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法（fixed bed column chromatography）。

[1-14]如[1-1]～[1-13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[1-15]如[1-1]～[1-14]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0012】 [1-16]如[1-1]～[1-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[1-17]如[1-1]~[1-16]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[1-18]如[1-1]~[1-17]中任一項所記載之方法，其中，前述目標物為二十碳五烯酸（*eicosapentaenoic acid*，EPA）、雙同- γ -次亞麻油酸（*dihomo- γ -linolenic acid*，DGLA）及花生四烯酸（*arachidonic acid*，ARA）中的任一者的酯。

[1-19]如[1-1]~[1-18]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22:0、C20:0、C18:0及C20:1中的任一者的酯。

[1-20]如[1-18]或[1-19]所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0013】 [1-21]如[1-1]~[1-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之前述至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[1-22]如[1-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之前述至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量%以下或0.05重量%以下。

【0014】 [1-23]如[1-1]~[1-22]中任一項所記載之方法，其中，由（c）所得之組合物含有96重量%以上的目標物。

[1-24]如[1-1]~[1-23]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[1-25]如[1-1]~[1-24]中任一項所記載之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

[1-26]如[1-1]~[1-25]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在（a）之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認目標物的峰頂的滯留時間。

[1-27]如[1-1]~[1-26]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液為來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液。

【0015】 [2-1]一種方法，其係從油脂組合物製造二十碳五烯酸酯組合物之方法，並包含：

（a）藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，獲得包含二十碳五烯酸酯之溶析液，所述溶析液包含相對於溶析液中所含之脂肪酸酯整體為0.3重量%以下的C20：0的酯；

（b）將由第一管柱層析法所得之包含二十碳五烯酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

（c）將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含二十碳五烯酸酯之組合物，

所得之組合物含有96.5重量%以上的二十碳五烯酸酯以及二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分，二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分含有各0.2重量%以下的十八碳四烯酸（stearidonic

acid)、C19:4、C21:5的酯。

[2-2]如[2-1]所記載之方法，其中，在前述所得之組合物中，包含各0.01重量%~0.2重量%的十八碳四烯酸、C19:4、C21:5的酯。

【0016】 [2-3]如[2-1]或[2-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一根柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[2-4]如[2-3]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0017】 [2-5]如[2-1]~[2-4]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分。

[2-6]如[2-1]~[2-5]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含二十碳五烯酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09之至少一種的成分。

[2-7]如[2-1]~[2-6]中任一項所記載之方法，其中，能以

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[2-8]如[2-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1的範圍。

【0018】 [2-9]如[2-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94~1.1的範圍。

[2-10]如[2-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96~1.1的範圍。

[2-11]如[2-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析

液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09的範圍。

[2-12]如[2-7]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

【0019】 [2-13]如[2-1]～[2-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

[2-14]如[2-1]～[2-13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[2-15]如[2-1]～[2-14]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

【0020】 [2-16]如[2-1]～[2-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

[2-17]如[2-1]～[2-16]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[2-18]如[2-1]～[2-17]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C20：0、C18：0及C20：1中的任一者的酯。

[2-19]如[2-1]～[2-18]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[2-20]如[2-1]~[2-19]中任一項所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0021】 [2-21]如[2-1]~[2-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含二十碳五烯酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[2-22]如[2-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含二十碳五烯酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量%以下或0.05重量%以下。

【0022】 [2-23]如[2-1]~[2-22]中任一項所記載之方法，其中，前述所得之組合物含有96重量%以上的二十碳五烯酸酯。

[2-24]如[2-1]~[2-22]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[2-25]如[2-1]~[2-24]中任一項所記載之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

【0023】 [2-26]如[2-1]~[2-25]中任一項所記載之方法，其中，在（b）中，去除將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分。

[2-27]如[2-1]~[2-26]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在(a)之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間。

[2-28]如[2-1]~[2-27]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含二十碳五烯酸酯之溶析液為來自第一管柱的二十碳五烯酸酯的溶析結束時為止的溶析液。

【0024】 [3-1]一種方法，其係從油脂組合物製造雙同- γ -一次亞麻油酸酯(dihomo- γ -linolenic acid ester)組合物之方法，並包含：

(a)藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，獲得包含雙同- γ -一次亞麻油酸酯之溶析液，所述溶析液包含相對於溶析液中所含之脂肪酸酯整體為0.5重量%以下的C22:0的酯；

(b)將由第一管柱層析法所得之包含雙同- γ -一次亞麻油酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

(c)將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含二十碳五烯酸酯之組合物，

所得之組合物含有95.0重量%以上的雙同- γ -一次亞麻油酸酯以及雙同- γ -一次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分，雙同- γ -一次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分含有0.60重量%以下的C20:4n-6的酯。

[3-2]如[3-1]所記載之方法，其中，在前述所得之組合物中，包含0.01重量%~0.2重量%的C20:4n-6的酯。

【0025】 [3-3]如[3-1]或[3-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一根柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[3-4]如[3-3]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0026】 [3-5]如[3-1]～[3-4]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8～3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分。

[3-6]如[3-1]～[3-5]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09之至少一種的成分。

[3-7]如[3-1]～[3-6]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的

前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

【0027】 [3-8]如[3-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1的範圍。

[3-9]如[3-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94~1.1的範圍。

[3-10]如[3-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96~1.1的範圍。

[3-11]如[3-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09的範圍。

[3-12]如[3-7]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

[3-13]如[3-1]~[3-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【0028】 [3-14]如[3-1]~[3-13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[3-15]如[3-1]~[3-14]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[3-16]如[3-1]~[3-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0029】 [3-17]如[3-1]~[3-16]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[3-18]如[3-1]~[3-17]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22:0、C20:0、C18:0及C20:1中的任一者的酯。

[3-19]如[3-1]~[3-18]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[3-20]如[3-1]~[3-19]中任一項所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0030】 [3-21]如[3-1]~[3-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含雙同- γ -次亞麻油酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[3-22]如[3-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含雙同- γ -次亞麻油酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量%以下或0.05重量%以下。

[3-23]如[3-1]~[3-22]中任一項所記載之方法，其中，前述所得之組合物含有96重量%以上的雙同- γ -次亞麻油酸酯。

【0031】 [3-24]如[3-1]~[3-23]中任一項所記載之方法，其中，在（b）中，去除將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分。

[3-25]如[3-1]~[3-24]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在（a）之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間。

[3-26]如[3-1]~[3-25]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含雙同- γ -次亞麻油酸酯之溶析液為來自第一管柱的雙同- γ -次亞麻油酸酯的溶析結束時為止的溶析

液。

【0032】 [4-1]一種方法，其係從油脂組合物製造花生四烯酸酯組合物之方法，並包含：

(a)藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，獲得包含花生四烯酸酯之溶析液，所述溶析液包含相對於溶析液中所含之脂肪酸酯整體為0.5重量%以下的C22：0的酯；

(b)將由第一管柱層析法所得之包含花生四烯酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

(c)將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含花生四烯酸酯之組合物，

所得之組合物含有95.0重量%以上之花生四烯酸酯以及花生四烯酸酯以外的至少一種的成分，花生四烯酸酯以外的至少一種的成分含有0.25重量%以下的C18：3n-6的酯。

[4-2]如[4-1]所記載之方法，其中，在前述所得之組合物中，包含0.01重量%~0.2重量%的C18：3n-6的酯。

【0033】 [4-3]如[4-1]或[4-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一根柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[4-4]如[4-3]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0034】 [4-5]如[4-1]~[4-4]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的花生四烯酸酯以外的至少一種的成分。

[4-6]如[4-1]~[4-5]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含花生四烯酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09之至少一種的成分。

[4-7]如[4-1]~[4-6]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[4-8]如[4-7]中任一項所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1的範圍。

【0035】 [4-9]如[4-7]所記載之方法，其中，將來自第一

管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94～1.1的範圍。

[4-10]如[4-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96～1.1的範圍。

[4-11]如[4-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09的範圍。

[4-12]如[4-7]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

【0036】 [4-13]如[4-1]～[4-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

[4-14]如[4-1]～[4-13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[4-15]如[4-1]～[4-14]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[4-16]如[4-1]~[4-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0037】 [4-17]如[4-1]~[4-16]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[4-18]如[4-1]~[4-17]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22：0、C20：0、C18：0及C20：1中的任一者的酯。

[4-19]如[4-1]~[4-18]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[4-20]如[4-1]~[4-19]中任一項所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0038】 [4-21]如[4-1]~[4-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含花生四烯酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[4-22]如[4-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含花生四烯酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量%以下或0.05重量%以下。

[4-23]如[4-1]~[4-22]中任一項所記載之方法，其中，前述所得之組合物含有96重量%以上之花生四烯酸酯。

【0039】 [4-24]如[4-1]~[4-23]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[4-25]如[4-1]~[4-24]中任一項所記載之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

【0040】 [4-26]如[4-1]~[4-25]中任一項所記載之方法，其中，在（b）中，去除將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分。

[4-27]如[4-1]~[4-26]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在（a）之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間。

[4-28]如[4-1]~[4-27]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含花生四烯酸酯之溶析液為來自第一管柱的花生四烯酸酯的溶析結束時為止的溶析液。

【0041】 [5-1]一種方法，其係縮短在從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物中之管柱層析法所需要的時間之方法，並包含：

（a）藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，去除將係為在第一管柱層析法中之目標物之高度不飽和脂肪酸酯的

峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8～3.5之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第一管柱層析法而獲得包含目標物之溶析液；

(b)藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90～1.1之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

(c)將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含目標物之組合物，

所得之組合物含有95重量%以上的目標物，

一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0042】 [5-2]如[5-1]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[5-3]如[5-1]或[5-2]所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8～3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的高度不飽和脂肪酸酯以外的至少一種的成分。

【0043】 [5-4]如[5-1]～[5-3]中任一項所記載之方

法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09之至少一種的成分。

[5-5]如[5-1]～[5-4]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[5-6]如[5-5]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90～1.1的範圍。

[5-7]如[5-5]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94～1.1的範圍。

【0044】 [5-8]如[5-5]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96～1.1的範圍。

[5-9]如[5-5]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09的範圍。

[5-10]如[5-5]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

[5-11]如[5-1]~[5-10]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【0045】 [5-12]如[5-1]~[5-11]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[5-13]如[5-1]~[5-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[5-14]如[5-1]~[5-13]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0046】 [5-15]如[5-1]~[5-14]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[5-16]如[5-1]~[5-15]中任一項所記載之方法，其中，前述目標物為二十碳五烯酸(EPA)、雙同- γ -次亞麻油酸(DGLA)及花生四烯酸(ARA)中的任一者的酯。

[5-17]如[5-1]~[5-16]中任一項所記載之方法，其中，在

前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為 C22 : 0、C20 : 0、C18 : 0 及 C20 : 1 中的任一者的酯。

[5-18] 如 [5-1] ~ [5-17] 中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[5-19] 如 [5-17] 或 [5-18] 所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0047】 [5-20] 如 [5-1] ~ [5-19] 中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為 0.3 重量% 以下。

[5-21] 如 [5-20] 所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為 0.1 重量% 以下或 0.05 重量% 以下。

[5-22] 如 [5-1] ~ [5-21] 中任一項所記載之方法，其中，高度不飽和脂肪酸酯組合物含有 96 重量% 以上的目標物。

【0048】 [5-23] 如 [5-1] ~ [5-22] 中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[5-24] 如 [5-1] ~ [5-23] 中任一項所記載之方法，其中，將

(a)、(b) 及 (c) 重複 2 次以上。

[5-25]如[5-1]~[5-24]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在(a)之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認目標物的峰頂的滯留時間。

[5-26]如[5-1]~[5-25]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液為來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液。

【0049】 [6-1]一種方法，其係從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，並包含：

(a)藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，去除將係為在第一管柱層析法中之目標物之高度不飽和脂肪酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第一管柱層析法而獲得包含目標物之溶析液；以及

(b)藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第二管柱層析法而獲得溶析液。

【0050】 [6-2]如[6-1]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[6-3]如[6-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0051】 [6-4]如[6-1]～[6-3]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8～3.5之前述至少一種的成分為油脂組合物中的高度不飽和脂肪酸酯以外的至少一種的成分。

[6-5]如[6-1]～[6-4]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09之至少一種的成分。

[6-6]如[6-1]～[6-5]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[6-7]如[6-6]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂

的滯留時間的相對值為0.90～1.1的範圍。

【0052】 [6-8]如[6-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94～1.1的範圍。

[6-9]如[6-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96～1.1的範圍。

[6-10]如[6-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09的範圍。

[6-11]如[6-6]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

[6-12]如[6-1]～[6-11]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【0053】 [6-13]如[6-1]～[6-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[6-14]如[6-1]～[6-13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[6-15]如[6-1]~[6-14]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0054】 [6-16]如[6-1]~[6-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[6-17]如[6-1]~[6-16]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[6-18]如[6-1]~[6-17]中任一項所記載之方法，其中，前述目標物為二十碳五烯酸(EPA)、雙同- γ -次亞麻油酸(DGLA)及花生四烯酸(ARA)中的任一者的酯。

[6-19]如[6-1]~[6-18]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22:0、C20:0、C18:0及C20:1中的任一者的酯。

[6-20]如[6-18]或[6-19]所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0055】 [6-21]如[6-1]~[6-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之前述至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[6-22]如[6-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之前述至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二

管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量％以下或0.05重量％以下。

【0056】 [6-23]如[6-1]～[6-22]中任一項所記載之方法，其中，所得之組合物含有96重量％以上的目標物。

[6-24]如[6-1]～[6-23]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[6-25]如[6-1]～[6-24]中任一項所記載之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

[6-26]如[6-1]～[6-25]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在（a）之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認目標物的峰頂的滯留時間。

[6-27]如[6-1]～[6-26]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液為來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液。

[發明功效]

【0057】 在本發明中，發現可在比使用單一管柱更短的時間且減少溶劑使用量而有效果地製造以高濃度含有EPA乙酯、DGLA乙酯及ARA乙酯等高度不飽和脂肪酸乙酯之組合物。在本發明中，可去除C20：0乙酯等脂肪酸。

【圖式簡單說明】

無。

【實施方式】

[用以實施發明的形態]

【0058】 在本發明的一態樣中，「組合物」可包含一種類以上的PUFA或其酯衍生物。包含PUFA或其酯衍生物之組合物可從包含高度不飽和脂肪酸作為構成脂肪酸之原料獲得。例如，適當的油脂組合物可從將包含植物、動物的油及脂肪之天然油脂進行酯化而成之原料組合物獲得，以及可從將油進行酯化而成之原料組合物獲得，所述油係從基因重組植物、動物以及包含酵母、絲狀真菌之微生物所得。可列舉例如將從作為絲狀真菌的被孢黴(*Mortierella*)屬微生物所得之油進行酯化而成之組合物。作為例子，可列舉將魚油、藻類及微藻類的油以及例如琉璃苣油、藍薊屬的油及月見草油之植物油進行乙酯化而成之組合物。在一實施形態中，原料組合物為將魚油進行乙酯化而成之組合物。在另一實施形態中，原料組合物為將藻類的油進行乙酯化而成之組合物。

【0059】 在本發明的一態樣中，油脂組合物係藉由對原料組合物施以蒸餾而得。

在本發明的一態樣中，所謂高度不飽和脂肪酸酯組合物，係指藉由本發明的方法所得之組合物，為包含為目標物之高度不飽和脂肪酸酯之組合物。目標物的高度不飽和脂肪酸酯可為二十碳五烯酸(EPA)、雙同- γ -次亞麻油酸(DGLA)及花生四烯酸(ARA)中的任一者的酯，例如乙酯。

【0060】 在本說明書中，用語「脂肪酸」意指約C12～C22（於此，數字意指鏈中的碳原子的總數）的各種鏈長的長鏈脂肪族羧酸（烷酸（alkanoic acid））。主鏈長度為C16～C22。脂肪酸的結構能以「X：Y」的單純標記法表示。於此，X為特定的脂肪酸中的碳原子的總數，Y為雙鍵的數量。例如，碳數20的飽和脂肪酸能被標記為「C20：0」，碳數18的一價不飽和脂肪酸能被標記為「C18：1」等，花生四烯酸能被標記為「C20：4，n-6」等。「n-」表示從脂肪酸的甲基末端起算之雙鍵的開始位置，例如若為「n-6」，則表示雙鍵的開始位置為從脂肪酸的甲基末端起算第6個。此方法對本發明所屬技術領域中具有通常知識者而言為周知，針對遵循此方法被標記之脂肪酸，若為本發明所屬技術領域中具有通常知識者則可輕易地特定。

【0061】 脂肪酸為具有長脂肪族鏈之羧酸，其為飽和或不飽和。脂肪酸通常係藉由源自天然來源的三酸甘油酯或磷脂質的水解而被工業製造。一部分係藉由合成而被製造。不問製造方法，為了獲得用於食品、化妝品或產業使用的純粹的產品，需要純化法。

【0062】 在本說明書中，用語「高度不飽和脂肪酸（PUFA）」意指具有大於一個的雙鍵之脂肪酸。在本說明書中之高度不飽和脂肪酸為酯的形態。酯典型而言為烷基酯，例如C₁—C₆烷基酯或C₁—C₄烷基酯。作為酯的例子，可列舉乙酯。

【0063】 在本發明的一態樣中，作為高度不飽和脂肪酸，可列舉二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸（docosapentaenoic acid）、

二十二碳六烯酸、雙同- γ -次亞麻油酸、花生四烯酸、十八碳四烯酸、C18:3、C19:4、C20:4、C21:5。在本發明的一態樣中，作為高度不飽和脂肪酸，可列舉二十碳五烯酸、雙同- γ -次亞麻油酸、花生四烯酸。在本發明的一態樣中，作為在第二管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分，可列舉C18:3、C19:4、C20:4及C21:5。在第二管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分可為目標的高度不飽和脂肪酸的有關物質。

【0064】 在本說明書中，用語「二十碳五烯酸（eicosapentaenoic acid, EPA）」為順-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸的通用名稱。此脂肪酸為C20:5n-3脂肪酸。「EPA-EE」具體而言能指EPA乙酯。

在本說明書中，「雙同- γ -次亞麻油酸（DGLA）」為順-8,11,14-二十碳三烯酸的通用名稱；此脂肪酸為C20:3n-6脂肪酸。

在本說明書中，「花生四烯酸（ARA）」為順-5,8,11,14-二十碳四烯酸的通用名稱；此脂肪酸為C20:4n-6脂肪酸。

【0065】 在本發明的一態樣中，油脂組合物典型而言包含高度不飽和脂肪酸及至少一個脂肪酸。因此，更典型而言，油脂組合物包含高度不飽和脂肪酸以及至少一個脂肪酸及／或其酯。典型的脂肪酸酯係與上述對於高度不飽和脂肪酸所規定者同樣。較佳為，油脂組合物包含碳數20的脂肪酸以及脂肪酸乙酯的至少一者。再佳為，油脂組合物包含選自高度不飽和脂肪酸以及C18:0（十八酸）、

C20：0（二十酸）、C20：1（二十烯酸）、C22：0（二十二酸）以及其等的酯之至少一種脂肪酸。在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為上述之至少一個的脂肪酸酯。

【0066】 在本發明的一態樣中，油脂組合物所含之目標物（例如，高度不飽和脂肪酸酯）以外的至少一個成分，其極性比目標物低。

【0067】 在本發明的一態樣中，被供至第二管柱層析法之析出液所含之油脂組合物係以相對於被供至第二管柱層析法之析出液所含之油脂組合物整體為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％以下或0.01重量％以下的量包含選自C18：0、C20：0、C20：1、C22：0的酯之至少一個成分。

【0068】 「管柱層析法」被使用於本說明書之際，意指流體流過管柱之際的流體溶液的一種以上的構成要素的選擇性滯留或延遲的過程，所述管柱含有由經細微分割之物質及／或具有毛細管之材料所構成的固定相（單數或複數）。滯留係由固定相及整體流體相（bulk fluid phase）（例如移動相）之間的混合物的構成要素的相對分配所導致，其後者係通過固定相而移動。管柱層析法被使用於二種類以上的物質的混合物的分析及分離。管柱層析法例如包含製備層析法、分析用層析法、高效液相層析法、模擬移動床層析法、真實移動床層析法及超臨界流體層析法（SFC）。

【0069】 用於記載移動相或高度不飽和脂肪酸酯的「非極性」及「極性」之用語，可被使用作為彼此相對之相對性用語。例如，「非極性」可意指極性最低的移動相中的溶劑，另一方面，「極性」可意指極性比「非極性」溶劑高的移動相中的溶劑。

【0070】 在本發明的一態樣中，管柱層析法包含使油脂組合物通過一個以上的管柱。因此，第一管柱層析法包含：使油脂組合物通過第一管柱；以及去除比係為目標物之高度不飽和脂肪酸酯更慢溶析（亦即，將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為大於1.0）之至少一種的成分的全部或一部分。第一管柱可將複數的管柱組合成直列及／或並列而使用。第二管柱層析法包含：使由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液通過第二管柱，去除有關物質的成分的全部或一部分，獲得以指定量包含目標物之高度不飽和脂肪酸酯組合物。第二管柱可將複數的管柱組合成直列及／或並列而使用。任意已知管柱能被用於請求項之方法。

在本發明的一態樣中，由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液為來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液。在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中之去除目標物以外的至少一種的成分的全部或一部分，係藉由回收來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液而進行。

【0071】 第一管柱層析法係使用第一管柱而實施。在本發明的一態樣中，第一管柱層析法係將去除滯留時間比目標物長的成分

的全部或一部分作為目的而進行。在本發明的一態樣中，藉由第一管柱層析法而被去除全部或一部分之成分的滯留時間，將在第一管柱層析法中之目標物的滯留時間設為1之情形，為1.5以上、1.7以上、1.8以上，或10以下、8以下、5以下、3.5以下、3.0以下，或1.5～10、1.7～8、1.8～5、1.8～3.5、1.8～3.0或者1.8～2.5。在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中至少一種類的成分被去除一部分之情形，係99%以上、95%以上、90%以上的該成分被去除。

【0072】 第二管柱層析法係使用第二管柱而實施。在本發明的一態樣中，第二管柱層析法係將去除滯留時間與目標物相近的成分的全部或一部分作為目的而進行。滯留時間與目標物相近的成分，在本說明書中，可被稱為有關物質。在本發明的一態樣中，藉由第二管柱層析法而被去除之成分的滯留時間，將在第二管柱層析法中之目標物的滯留時間設為1之情形，為0.8以上、0.9以上，或1.5以下、1.3以下、1.2以下或者1.1以下，或0.8～1.5、0.9～1.3、0.9～1.2或者0.9～1.1。在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中滯留時間與目標物相近的成分被去除一部分之情形，係5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上的該成分被去除。

【0073】 在本發明的一態樣中，可將第一層析法的溶析液中的未被供至第二層析法之餾分（fraction）以及第二層析法的溶析液中的包含已從高度不飽和脂肪酸酯組合物去除之脂肪酸酯之餾分

進行回收，並供至第三管柱層析法。第三管柱層析法係使用第三管柱而實施。

【0074】 在本發明的一態樣中，第一管柱係指被用於第一管柱層析法之管柱，第二管柱係指被用於第二管柱層析法之管柱，第三管柱意指被用於第三管柱層析法之管柱。所使用之管柱的尺寸未被特別限定，將一定程度地取決於將被純化之油脂組合物的體積。各管柱的直徑為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以上或者500 mm以上，或4000 mm以下、2000 mm以下、1000 mm以下、500 mm以下，或1~4000 mm、2~2000 mm、4~1000 mm、8~1000 mm、16~1000 mm、32~500 mm、30~800 mm，或400~800 mm。在本發明的一態樣中，第一管柱與第二管柱可具有同一或不同的直徑。第一及第二管柱的直徑的比，將第一管柱設為1之情形，第二管柱為0.1以上、0.3以上、0.5以上，或10以下、3以下、2以下或者1.5以下，或0.1~10、0.3~3、0.5~2或者0.5~1.5。在本發明的一態樣中，將直徑相同的管柱使用作為第一及第二管柱。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第一管柱~第三管柱可具有同一或不同的直徑。第三管柱可具有分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的直徑。在本發明的一態樣中，第二管柱具有與第一管柱相同的直徑且長度比第一管柱長。在本說明書中，所謂第一管柱與第二管柱具有相同或同一的直徑，係指第一管柱與第二管柱的直徑的比為0.8~1.2，例如為0.9~1.1或1。

【0075】 在本發明的一態樣中，第一及第二管柱的剖面為大致圓形，第一及第二管柱的剖面面積的比，將第一管柱設為1之情形，第二管柱為0.1以上、0.2以上，或10以下、4以下、2以下，或0.1～10、0.2～4或者0.2～2。在本發明的一態樣中，將剖面面積相同的管柱使用作為第一及第二管柱。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第一管柱～第三管柱可具有同一或不同的剖面面積。第三管柱可具有分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的剖面面積。

【0076】 在本發明的一態樣中，各管柱的長度為5cm以上、10cm以上、20cm以上，或800cm以下、400cm以下、200cm以下、150cm、120cm以下，或5～800cm、10～400cm、20～200cm、20～150cm或者20～120cm。在本發明的一態樣中，第一管柱比第二管柱短。第一及第二管柱的長度的比，將第一管柱設為1之情形，第二管柱為0.5以上、1以上、1.1以上、1.5以上，或10以下、7以下、5以下，或0.5～10、1～7、1.1～5或者1.5～5。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可具有分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的長度。在本發明的一態樣中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。第二管柱具有與第一管柱相同的內徑，例如具有第一管柱的長度的1.1倍以上、1.5倍以上或5倍以下、7倍以下、10倍以下的長度。在本說明書中，所謂第一管柱與第二管柱具有相同或同一的內徑，係指第一管柱與第二管柱的內徑的比為0.8～1.2，例如為0.9～1.1或1。

【0077】 管柱為具有外徑、內徑及長度之圓筒形。在一態樣中，管柱為製備層析法管柱。製備層析法管柱可包含5mm以上、10mm以上、20mm以上、50mm以上，或4m以下、2m以下、1m以下、80cm以下，或約5mm～約4m、約10mm～約2m、約20mm～約1m或者約50mm～80cm的內徑以及約100mm～約5m、約2cm～約2m或約10cm～約1.5m的長度。在一態樣中，管柱為分析用層析法管柱。分析用管柱可包含約1mm～約10cm的內徑以及約10mm～約500mm的長度。尺寸可以內徑為長度的約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%或約500%之方式選擇。外徑可比內徑大約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%或者約30%。

【0078】 用語「峰」被使用於本說明書之際，意指層析圖中的峰。層析圖為經時地顯示檢測到的值之圖。檢測到析出液之際，檢測到的值會增大，層析圖顯示「峰」。層析圖中的各峰表示樣本中的成分的存在。以滯留時間標記各峰，層析圖中的時間從左至右增加。

「峰頂」意指層析圖中的各峰的檢測值成為最大之點。

【0079】 「分離」被使用於本說明書之際，意指具有下述特徵的過程：基於在相對運動中之相（例如移動相及固定相）之間的其等分配差，空間性分離包含高度不飽和脂肪酸酯之組合物的構成要素。分離係由樣本往管柱上的裝載以及裝載後的管柱的溶析所導致。

「分餾（fractionation）」為某一量的混合物在相變期間被分成好幾個較小的量之分離過程，於此，組成係依據梯度而變動。不同餾分係在不同時間點基於各個構成要素（混合物或樣本內的高度不飽和脂肪酸酯）的特定特性例如其對於固定相及／或移動相之親和力的差異而被收集。

【0080】 「供至管柱層析法」被使用於本說明書之際，意指將含有高度不飽和脂肪酸酯之樣本裝載至管柱直至全部樣本被容納於管柱內為止。在本說明書中，樣本為油脂組合物。樣本典型而言被裝載至經填充之管柱的固定相的頂部。於此，「頂部」為移動相通過管柱而溶析之際最先接收移動相之固定相的末端。油脂組合物能藉由注入器、泵或將樣本直接適用於固定相的頂部而被供至管柱層析法。樣本可與最小量的移動相或者用於裝載的其他溶劑進行混合。

【0081】 「溶析」被使用於本說明書之際，意指已裝載至管柱之成分通過管柱而作為移動相的溶液流出。

「溶析液」（Eluent）被使用於本說明書之際，為已從管柱溶

析之移動相，能包含已裝載至管柱之油脂組合物中所含之成分。在一態樣中，為在已從管柱溶析之移動相中包含油脂組合物中所含之成分之溶液。在本發明的一態樣中，所謂「由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液」，意指已通過第一管柱之溶析液，為包含目標物之溶析液。

【0082】 「析出液」(Eluate)被使用於本說明書之際，係指在管柱層析法中從管柱被排出之成分。在本發明的一態樣中，「被供至第二管柱層析法之析出液」為第一管柱層析法的析出液。

【0083】 所謂「成分」，為被供至管柱層析法之油脂組合物中所含之成分，包含高度不飽和脂肪酸酯及脂肪酸酯。在本發明的一態樣中，所謂「在第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分」，可為滯留時間比係為目標物之高度不飽和脂肪酸酯長的脂肪酸酯，例如C22：0、C20：0、C18：0及C20：1中的任一者的酯。又，所謂「在第二管柱層析法中之至少一種的成分」，係指由油脂組合物所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物中所含之目標的高度不飽和脂肪酸酯以外的成分，可為十八碳四烯酸、C19：4、C21：5、C20：4及C18：3中的任一者的酯。

【0084】 在本發明的一態樣中，「在第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分」與「在第二管柱層析法中之至少一種的成分」可不相同。在本發明的一態樣中，「在第二管柱層析法中之至少一種的成分」可包含與「在第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分」相同的成分。

【0085】 「聯苯」、「C30」、「C22」、「C18」、「C8」、「C5」、「C4」被使用於本說明書之際，意指管柱填充材料（固定相）上存在之官能基。例如，聯苯管柱係將流通管柱之材料暴露於非取代聯苯，另一方面，C18管柱係將流通管柱之材料（例如移動相及成分）暴露於非取代的直鏈或分支鏈18－碳烷基。

【0086】 「層析法條件」意指運行管柱層析法之參數。作為例子，包含填充壓、移動相及固定相的組成、漿體濃度、運行管柱之壓力、管柱溫度、移動相溫度、移動相梯度、移動相流速、所使用之管柱類型、所使用之檢測儀器及參數、所利用之樣本製備方案、沉澱時間及實施沉澱之壓力、靜置時間及實施靜置之壓力。

【0087】 「梯度」意指實施管柱層析法的期間伴隨時間經過之移動相組成中的變化。在溶劑通過管柱而溶析的期間，移動相的組成能變化。在溶析期間，可以經時增加之百分比添加不同移動相。

【0088】 「純度」為表示組合物的主成分的含量之比例，例如，可使用內部標準並由氣相層析法（GC）的測量結果進行計算。在本說明書的一態樣中，主成分為高度不飽和脂肪酸酯，例如EPA酯、DGLA酯或ARA酯。

【0089】 「目標物」意指由藉由溶析及分餾所得之單一餾分或複數餾分的組合所得之目標的高度不飽和脂肪酸酯，例如EPA酯、DGLA酯或ARA酯。

【0090】 在本發明的一態樣中，濃縮包含：將包含目標的高度不飽和脂肪酸酯之析出液進行減壓及／或加熱，藉由蒸餾而回收

作為溶劑。在本發明的一態樣中，濃縮係使用蒸發器進行。作為蒸發器，可列舉析出液蒸發器及／或薄膜蒸發器。濃縮可使用任意類型的蒸發器，但可使用例如薄膜蒸發器、單一蒸發裝置、多效蒸發裝置、多室蒸發裝置、自然循環型蒸發器、強制循環型蒸發器、薄膜流下型蒸發器、薄膜上升型蒸發器及此等的組合。在本發明的一態樣中，作為自然循環型蒸發器的方式，可列舉例如外部加熱方式、排管方式。

【0091】 在本說明書中，藉由前方帶有用語「約」之數值而給出特定的範圍。用語「約」在本說明書中被使用於提供與以下數字相關之措辭上的支持：前方帶有其之正確數字；以及與前方帶有該用語之數字相近或大致相等之數字。在確定某一數字是否為與具體記載之數字相近或大致相等的數字時，與所記載之數字相近的數字或與所記載之數字相近的未被記載的數字可為在呈現其的上下文中提供具體記載之數字的實質均等量之數字。在一態樣中，約能指其提及之數字的 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2.5\%$ 或 $\pm 1\%$ 。

【0092】 在與本說明書對應之英文說明書中，在用語「a」、「an」及「the」以及成分的記載的上下文中之同樣的指示語，尤其在請求項的上下文中，只要無其他限定或只要未被上下文否定，則被解釋為包含單數及複數兩者。

只要未被另外定義，則本說明書所使用之全部技術用語及科學用語具有與在本發明所屬技術領域中之本發明所屬技術領域中具有通常知識者一般所理解之意義相同的意義。與在本說明書中所記載

之方法及材料類似或均等的所有方法及材料亦可被使用於本發明的實施或試驗中，於此記載具代表性的示例方法及材料。

【0093】 提供值的範圍之情形，位在其範圍的上限～下限之間的各值（只要上下文未明確指示，則至下限的單位的10分之1為止）及其所記載之範圍中的所有其他記載之值或位於其間之值被理解為包含在本發明的範圍內。此等的更小範圍的上限及下限，可獨立地被包含在更小範圍，其亦被包含在本發明的範圍內並包含所有被具體排除之限制對象的一者或兩者之情形中，排除其等所含之限制的一者或兩者之範圍亦被包含在本發明中。

【0094】 本發明並不受限於所記載之特定態樣（因其能理所當然地變動）。考量到本發明的範圍僅被添附之申請專利範圍限定，因此應理解本說明書所使用之用語法僅用於記載特定態樣之目的，並不意圖進行限定。

【0095】 在本發明的一態樣中，從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，包含：在實施第一管柱層析法之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認目標物的峰頂的滯留時間。

在本發明的一態樣中，藉由第一管柱層析法而去除峰頂的滯留時間比係為目標物之高度不飽和脂肪酸慢的至少一種的成分的全部或一部分。

所謂「滯留時間」，表示成分被注入管柱後在管柱內經過之時間。典型而言，滯留時間表示峰頂在層析圖中出現之時間。

【0096】 在本說明書中，所謂「為目標物之高度不飽和脂肪酸的峰頂的滯留時間」，意指在第一及第二層析法的層析圖中，在目標物所示之峰頂中之滯留時間。

在本發明的一態樣中，可基於滯留時間的測量結果而計算「相對滯留時間（RRT）」（能與「相對值」、「滯留時間的相對值」互換使用）。「相對滯留時間」表示成分的滯留時間相對於目標物的滯留時間之關係。

在本說明書中，所謂「峰頂的滯留時間的相對值」，意指在第一及第二層析法的層析圖中，將在目標物所示之峰頂中之滯留時間設為1之情形中，將目標物以外的成分所示之峰頂的滯留時間除以目標物的峰頂的滯留時間所得之值。

【0097】 [數1]

$$RRT = \frac{\text{成分的滯留時間}}{\text{目標物的滯留時間}}$$

所謂「滯留時間的相對值」為指定的數值以上的溶析液，意指在「滯留時間的相對值」成為該數值之時間以後所回收之溶析液。又，所謂「滯留時間的相對值」為指定的數值以下的溶析液，意指在「滯留時間的相對值」成為該數值之時間以前所回收之溶析液。

【0098】 在本發明的一態樣中，峰頂的滯留時間可藉由以UV檢測器進行測量而決定。

【0099】 在本發明的一態樣中，峰頂的滯留時間可藉由以由氣相層析法所進行之脂肪酸分析測量各分餾而決定。

【0100】 在本說明書中，所謂「一次的管柱層析法」，意指將一批油脂組合物通過一個以上的管柱，獲得以指定的濃度包含目標物之高度不飽和脂肪酸酯組合物之處理。在一次的管柱層析法中，可將一批油脂組合物通過一或兩個管柱。在一次的管柱層析法中將一批油脂組合物通過兩個管柱之情形，兩個管柱被稱為第一管柱及第二管柱並被串聯。在一次的管柱層析法中使用兩個管柱之情形，來自第一管柱的溶析液的一部分不被注入第二管柱而被排出。在本發明的一態樣中，第一管柱及第二管柱能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通。在本發明的一態樣中，所謂「將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱」，意指來自第一管柱的溶析液可注入第二管柱。在一態樣中，溶析液可不進行濃縮等處理而直接供至第二管柱。在本發明的一態樣中，所謂能連通，意指第一管柱及第二管柱能從已連通之狀態切換成未連通之狀態，或其相反。

【0101】 在本發明的一態樣中，所謂「排出來自第一管柱的溶析液」，意指來自第一管柱的溶析液不注入第二管柱而作為不需要的物質排出。在本發明的一態樣中，滯留時間的相對值為3.5以上係藉由第一管柱與第二管柱不連通而排出來自第一管柱的溶析液。在本發明的一態樣中，已從第一管柱排出之溶析液可注入第三管柱。

【0102】 在本發明的一態樣中，所謂「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，意指在使用單一或兩個以上的管柱之管柱層析法中，從將油脂組合物裝載一次至第一或第二管柱之時間起至可再次開始在同一管柱中裝載油脂

組合物（例如，第二次的裝載）為止的時間。在此情形中，油脂組合物往同一管柱的再次裝載係以下述方式空開時間間隔而開始：在一次的管柱層析法中之最後的成分的溶析完畢後，再次被裝載之油脂組合物中的目標物的溶析會開始。在本發明的一態樣中，「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，係作為在第一或第二管柱中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分的溶析完畢為止的時間而被計算或測量。在本發明的一態樣中，「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，係作為從將油脂組合物供至第一管柱層析法之時間點起至目標物從第一管柱溶析結束為止的時間與在第二管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間之合計時間而被計算。在本發明的一態樣中，使用第一管柱及第二管柱，最後的成分係從第一管柱或第二管柱溶析。在本發明的一態樣中，「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，係與下述時間相等之時間：在第一管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第一管柱排出結束為止的時間。在本發明的另一態樣中，「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，係與下述時間相等之時間：從將油脂組合物供至第一管柱層析法之時間點起至目標物從第一管柱溶析結束為止的時間與在第二管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間之合計時間；或在第二管柱

層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間。在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第一管柱排出結束為止的時間係比下述時間短：在由與第一及第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱所進行之管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被排出結束為止的時間。在本發明的一態樣中，從將油脂組合物供至第一管柱層析法之時間點起至目標物從第一管柱溶析結束為止的時間與在第一管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第一管柱排出結束為止的時間之合計時間，或在第二管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間係比下述時間短：在由與第一及第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱所進行之管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被排出結束為止的時間。又，在本發明的另一態樣中，在第一管柱中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分的溶析完畢為止的時間係比下述時間短：在僅由第二管柱所進行之管柱層析法中，從在第二管柱中之目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分的溶析完畢為止的時間。又，在本發明的另一態樣中，從將油脂組合物供至第一管柱層析法之時間點起至目標物從第一管柱溶析結束為止的時間與在第二管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間之合計時間為止的時間係比下述時間短：在僅由第二管柱所進行之管柱層析法中，從在第

二管柱中之目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分的溶析完畢為止的時間。

【0103】 在本說明書中，「與第一及第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱」，例如意指具有與第一及／或第二管柱相同的內徑及固定相之單一管柱。在一態樣中，與第一及第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱，意指為具有與第二管柱相同的內徑及固定相且流路方向的長度為與第一及第二管柱的長度的合計相等的長度之單一管柱。

【0104】 在本發明的一態樣中，作為管柱層析法，宜為逆相管柱層析法。作為固定相，只要為逆相分配系統的吸附劑則可不特別指定地使用，例如，已與DVB（二乙烯基苯）進行網狀化之聚苯乙烯等的聚合物珠粒，或已鍵結C4或C8或C18的烷基之矽膠，尤其為使用十八烷基矽基（octadecylsilyl，ODS）之ODS管柱。各層析法管柱能包含同一或不同的吸附劑。典型而言，第一管柱及第二管柱能包含同一或不同的吸附劑。在本發明的一態樣中，第一管柱及第二管柱包含同一吸附劑。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可使用分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的吸附劑。

【0105】 固定相可選自C30、C22、C18、C8、C4、聯苯、氟苯基、親水性相互作用液相層析法（HILIC）固定相、丙烯醯胺、矽石、苯基己基固定相、極性嵌入烷基（polar embedded alkyl）、氟苯基丙基或在層析法的技術領域中已知之所有固定相。

在一態樣中，使用掌性固定相。本發明所屬技術領域中具有通常知識者已明確清楚固定相的選擇，能取決於應被層析法純化之成分。非極性成分例如高度不飽和脂肪酸酯能設為需要使用逆相固定相例如C18 (ODS)。可使用包含完全被封端 (end-capped) 者、部分地被封端者及被鹼去活化者在內的各種不同種類的十八烷基矽石 (ODS)。極性較高的成分能設為需要非鍵結矽石、如胺基相或氰基相般的正相的固定相。

【0106】 在一態樣中，固定相包含具有 $1\ \mu\text{m}$ 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，或 $20\ \mu\text{m}$ 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，或約 $1\ \mu\text{m}$ ～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 $5000\ \mu\text{m}$ 的中值粒徑之粒子。在一態樣中，固定相包含具有大於 $50\ \mu\text{m}$ 、大於 $45\ \mu\text{m}$ 、大於 $40\ \mu\text{m}$ 、大於 $35\ \mu\text{m}$ 、大於 $30\ \mu\text{m}$ 、大於 $25\ \mu\text{m}$ 、大於 $20\ \mu\text{m}$ 、大於 $15\ \mu\text{m}$ 或者大於 $10\ \mu\text{m}$ ，且／或小於 $5000\ \mu\text{m}$ 、小於 $4000\ \mu\text{m}$ 、小於 $3000\ \mu\text{m}$ 、小於 $2000\ \mu\text{m}$ 、小於 $1000\ \mu\text{m}$ 、小於 $500\ \mu\text{m}$ 、小於 $100\ \mu\text{m}$ 、小於 $80\ \mu\text{m}$ 、小於 $60\ \mu\text{m}$ ，或 $10\ \mu\text{m}$ ～ $5000\ \mu\text{m}$ 、 $15\ \mu\text{m}$ ～ $4000\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ ～ $3000\ \mu\text{m}$ 、 $25\ \mu\text{m}$ ～ $2000\ \mu\text{m}$ 、 $30\ \mu\text{m}$ ～ $1000\ \mu\text{m}$ 、

35 μm $\sim$ 500 μm 、40 μm $\sim$ 100 μm 、45 μm $\sim$ 80 μm 、50 μm $\sim$ 60 μm 的中值粒徑之粒子。中值粒徑係如本發明所屬技術領域中具有通常知識者所理解般可藉由雷射繞射散射法進行測量。

【0107】 在本發明的一態樣中，固定相可在第一管柱及第二管柱中使用同一或不同的固定相。使用不同的固定相之情形，在第一管柱中，例如可使用已與DVB（二乙烯基苯）進行網狀化之聚苯乙烯、已與C8烷基或十八烷基矽基（ODS）鍵結之矽膠，在第二管柱中，可使用選自已與DVB（二乙烯基苯）進行網狀化之聚苯乙烯、已與烷基或十八烷基矽基（ODS）鍵結之矽膠的與第一管柱的固定相不同的固定相。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可使用分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的固定相。

【0108】 又，在第一管柱及第二管柱中可使用包含具有同一或不同的中值粒徑的粒子之固定相。使用包含具有不同的中值粒徑的粒子之固定相之情形，在第一管柱中，可使用包含具有例如1 μm 以上、20 μm 以上、40 μm 以上、60 μm 以上、80 μm 以上、1000 μm 以上、2000 μm 以上、3000 μm 以上、4000 μm 以上，或20 μm 以下、40 μm 以下、60 μm 以下、80 μm 以下、1000 μm 以下、2000 μm 以下、3000 μm 以下、4000 μm 以下、5000 μm 以下，或約1 μm $\sim$ 約20 μm 、約20 μm $\sim$ 約40 μm 、約40 μm $\sim$ 約60 μm 、約60 μm $\sim$ 約80 μm 、約80 μm $\sim$ 約1000 μm 、約1000 μm $\sim$ 約2000 μm 、約2000 μm $\sim$ 約3000 μm 、約3000 μm $\sim$ 約4000 μm 、

約4000 μm ~ 約5000 μm 的中值粒徑的粒子之固定相，在第二管柱中，可使用包含具有選自1 μm 以上、20 μm 以上、40 μm 以上、60 μm 以上、80 μm 以上、1000 μm 以上、2000 μm 以上、3000 μm 以上、4000 μm 以上，或20 μm 以下、40 μm 以下、60 μm 以下、80 μm 以下、1000 μm 以下、2000 μm 以下、3000 μm 以下、4000 μm 以下、5000 μm 以下，或約1 μm ~ 約20 μm 、約20 μm ~ 約40 μm 、約40 μm ~ 約60 μm 、約60 μm ~ 約80 μm 、約80 μm ~ 約1000 μm 、約1000 μm ~ 約2000 μm 、約2000 μm ~ 約3000 μm 、約3000 μm ~ 約4000 μm 、約4000 μm ~ 約5000 μm 的中值粒徑的粒子之與第一管柱的固定相不同的固定相。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可使用包含具有分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的中值粒徑的粒子之固定相。

【0109】 在本發明的一態樣中，被填充之固定相的量，以重量計為1 ~ 1000kg、10 ~ 900kg、20 ~ 800kg、30 ~ 700kg、40 ~ 600kg 或 50 ~ 500kg。在本發明的一態樣中，第一管柱的固定相與第二管柱的固定相的量可同一亦可不同。被填充之固定相的量不同之情形，第一管柱的固定相的量例如為1 ~ 100kg、10 ~ 100kg、30 ~ 100kg。又，第二管柱的固定相的量例如為1 ~ 1000kg、10 ~ 800g、50 ~ 800g。第一及第二管柱的固定相的量的比，將第一管柱設為1之情形，第二管柱為0.5 ~ 10、1 ~ 7、1.1 ~ 5、2 ~ 4.5。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可充充分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的量的固定相。

在本發明的一態樣中，被填充至第二管柱之固定相的量比被填充至第一管柱之固定相的量多。相對於被填充至第一管柱之固定相的量，被填充至第二管柱之固定相的量為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、或4倍以下、4.5倍以下、5倍以下、6倍以下、7倍以下、10倍以下。

【0110】 在本發明的一態樣中，管柱層析法包含使用移動相之溶析，所述移動相包含水、有機溶劑或超臨界二氧化碳的一者以上。在此等方法的一部分的態樣中，移動相包含甲醇。在此等方法的一部分的態樣中，層析法包含移動相，所述移動相包含選自甲酸、甲酸銨、三甲胺、氨及氫氧化銨的一者以上之添加劑。

【0111】 在本發明的一態樣中，被使用作為移動相之溶劑為有機溶劑，選自醇、醚、酯、酮、腈、己烷類及二氯甲烷。作為醇的例子，可列舉甲醇、乙醇、n-丙醇、i-丙醇、n-丁醇、i-丁醇、s-丁醇及t-丁醇。宜為甲醇及乙醇。甲醇更佳。作為醚的例子，可列舉二乙醚、二異丙醚及甲基t-丁醚（MTBE）。作為酯的例子，可列舉乙酸甲酯及乙酸乙酯。作為酮的例子，可列舉丙酮、甲基乙基酮及甲基異丁基酮（MIBK）。作為腈的例子，可列舉乙腈。

【0112】 在本發明的一態樣中，移動相在第一及第二管柱層析法中可同一亦可不同，但較佳為同一。使用不同移動相之情形，在第一管柱層析法中可使用例如甲醇、乙醇、二乙醚、二異丙醚、甲基t-丁醚、乙酸甲酯、乙酸乙酯、丙酮、甲基乙基酮、甲基異丁

基酮（**MIBK**）、乙腈、己烷類及二氯甲烷，在第二管柱中可使用選自甲醇、乙醇、二乙醚、二異丙醚、甲基 t -丁醚、乙酸甲酯、乙酸乙酯、丙酮、甲基乙基酮、甲基異丁基酮（**MIBK**）、乙腈、己烷類及二氯甲烷之與第一管柱的移動相不同的移動相。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可使用分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的移動相。

【0113】 移動相可進一步包含添加劑，所述添加劑包含緩衝劑及pH調整劑。添加劑的選擇能基於所使用之移動相、所使用之固定相及應被純化之成分而決定。在一部分的態樣中，移動相包含選自甲酸、三氟乙酸、七氟丁酸、甲酸銨、三甲胺、氨及氫氧化銨的一者以上之添加劑。在一部分的態樣中，移動相可不包含添加劑。

【0114】 在本發明的一態樣中，管柱層析法包含移動相梯度。在本發明的一態樣中，管柱層析法包含一種以上的高度不飽和脂肪酸酯的純化。在本發明的一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯為選自二十二碳六烯酸、巴豆酸、肉豆蔻油酸、棕櫚油酸、順十六烯酸、油酸、反油酸、異油酸、鱈油酸、二十烯酸、芥酸、神經酸、亞麻油酸、二十碳二烯酸、二十二碳二烯酸、次亞麻油酸、松油酸

（**pinolenic acid**）、桐酸、二十碳三烯酸、雙同- γ -次亞麻油酸、二十碳三烯酸、十八碳四烯酸、花生四烯酸、二十碳四烯酸、二十二碳四烯酸（**adrenic acid**）、伯色五烯酸（**bosseopentaenoic acid**）、二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸（**ozubondo acid**）、沙丁魚酸（**sardine acid**）、二十四碳五烯酸（**tetracosapentaenoic**

acid)、鯊魚酸(herring acid)、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一酸、十二酸、十三酸、十四酸、十五酸、十六酸、十七酸、十八酸、十九酸、二十酸、二十一酸、二十二酸、二十三酸、二十四酸、二十五酸、二十六酸、二十七酸(carboceric acid)、二十八酸、二十九酸(nonacosylic acid)、三十酸、三十一酸、三十二酸(lacceroic acid)、三十三酸(psyllic acid)、三十四酸(geddic acid)、三十五酸、三十六酸、三十七酸(heptatriacontylic acid)、三十八酸(octatriacontylic acid)、三十九酸(nonatriacontylic acid)及四十酸(tetracontylic acid)的一者以上之高度不飽和脂肪酸的酯。在本發明的一態樣中，酯為甲酯、乙酯、丙酯、丁酯、戊酯、己酯、庚酯、辛酯、壬酯或癸酯。在本發明的一態樣中，管柱層析法包含二十碳五烯酸乙酯的純化。

【0115】 在一部分的態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物係以約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%以上或者約99.9%以上，且／或小於約97%、小於約98%、小於約99.0%、小於約99.95%、小於約99.99%的純度含有目標的高度不飽和脂肪酸酯。在一部分的態樣中，產率為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，且／或小於75%、

小於80%、小於85%、小於90%或者小於95%。在一部分的態樣中，回收率為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%以上或者99.7%以上，且／或小於95%、小於97%、小於98%、小於99%、小於99.5%、小於99.7%或者小於99.9%。

【0116】 移動相可包含水、甲醇、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、己烷類、二氯甲烷、超臨界二氧化碳或在該技術中已知的所有其他溶劑的一者以上。移動相的選擇能設為需要考慮應被純化之高度不飽和脂肪酸酯及所使用之固定相。在針對非極性高度不飽和脂肪酸酯之逆相固定相中，應選擇如下述般的極性移動相：雖充分溶析對象的高度不飽和脂肪酸酯，但溶析不會過快到會接近溶劑前端。

【0117】 在一態樣中，溶劑梯度可在溶析期間被使用作為移動相。梯度溶析的主要目的係以已被溶析之分析物在檢測時會生成充分分離之峰之方式，更快速地溶析被強保持於管柱之分析物，另一方面，更緩慢地溶析被弱保持之分析物。例如，在逆相層析法中，以低含量開始溶析液中的非極性溶劑，而能分離被弱保持之分析物。被強保持之分析物將殘留在管柱的頂部的吸附劑表面上，或非常緩慢地移動。增加溶析液中的非極性構成要素（例如乙腈）的量，因會穩定增大由非極性溶劑所導致之對於吸附部位之競爭，故被強保持之構成要素能更快速地移動。

【0118】 因此，在對於非極性高度不飽和脂肪酸酯使用之逆

相層析法中，在層析法中之溶析的開始時的溶劑能包含選自約100%、約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%或約0%之高百分比的極性溶劑A，例如水。溶劑B可為比溶劑A更非極性的溶劑，例如甲醇（溶劑A為水之情形）。溶劑B將構成移動相的殘餘的百分比。在運行管柱而溶劑通過固定相及管柱被溶析之際，梯度將導致伴隨時間的經過而溶劑B的濃度漸增的結果。在一部分的態樣中，亦可將單一組成的溶劑使用作為移動相。在一部分的態樣中，單一組成的溶劑可單獨或混合使用水、甲醇、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、己烷類、二氯甲烷、超臨界二氧化碳或在該技術中已知的所有其他溶劑的一者或一者以上。

【0119】 在一態樣中，經時性的溶劑B的增加率可為固定。在一態樣中，不存在梯度，移動相為溶析期間的固定組成。在一態樣中，可利用層析法內的在不同時間範圍中之溶劑B的百分比的不同增加率。在一態樣中，移動相在層析法的特定時間範圍期間可為固定組成，在其他時間範圍中則包含梯度。

【0120】 在一態樣中，第一管柱層析法及第二管柱層析法可皆為固定組成，或可皆包含梯度，或可皆在特定時間範圍中為固定組成且在其他時間範圍中包含梯度。在一態樣中，可第一管柱層析法為固定組成且第二管柱層析法包含梯度，或可第一管柱層析法包含梯度且第一管柱層析法為固定組成。在一態樣中，包含第三管柱層析法之情形，第三管柱層析法可為固定組成或包含梯度。

【0121】 在移動相中所使用之複數溶劑可分別被儲藏於移

動相供給部，在通過管柱之溶析前使用泵而混合。移動相供給部包含移動相源及溶劑送達系統。此種溶劑送達系統為泵裝置，例如能商業取得的管柱層析法用泵，其將溶劑或移動相提供至管柱。此種泵通常提供無脈衝的流動、 $0.1 \sim 100\text{L} / \text{分鐘}$ 的範圍的流速、流速的正確控制、高壓（ 6000psi 以下）的生成以及耐腐蝕性且耐溶劑性的構成要素。往復泵係由小腔室所構成，其中將溶劑藉由馬達驅動活塞的前後運動而進行泵注入。交互地開關的兩個止回閥係控制出入汽缸之溶劑的方向及流動。單活塞泵係使用特別設計之凸輪，能有非常迅速的補充時間，產生更連續性的流動。經常藉由使用脈衝阻尼器而克服由往復泵所導致之經脈衝化之流動的缺點。由彼此相位不同地移動的活塞所作動之雙活塞泵的使用，提供用於送達無脈衝的流體的合理解決對策。在管柱中之線速度表示流體通過管柱剖面之速度。線速度（線速度（ $\text{m} / \text{小時}$ ）= 流量（ $\text{m}^3 / \text{小時}$ ）/ 管柱剖面積（ m^2 ））可為約 $0.2 \sim 20.0\text{m} / \text{小時}$ 、約 $1.0 \sim 15.0\text{m} / \text{小時}$ 、約 $1.0 \sim 10.0\text{m} / \text{小時}$ 、約 $1.5 \sim 10.0\text{m} / \text{小時}$ 或約 $2.0 \sim 9.0\text{m} / \text{小時}$ 。在一態樣中，線速度為約 $4.0 \sim 9.0\text{m} / \text{小時}$ 。

【0122】 在本發明的一態樣中，在第一管柱或第二管柱中之線速度可同一亦可不同。線速度不同之情形，在第一管柱中之線速度可比在第二管柱中之線速度快，亦可比在第二管柱中之線速度慢。在第一及第二管柱中之線速度的比，將第一管柱設為1之情形，在第二管柱中為 $0.5 \sim 2.0$ 、 $0.5 \sim 1.5$ 或 $1 \sim 1.5$ 。在本發明的一態樣中，在第一管柱及第二管柱中之線速度為相同。在本發明的一態樣

中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可以分別與第一管柱或第二管柱相同或不同的線速度進行。

【0123】 在本發明的一態樣中，管柱層析法係在室溫或比室溫高的溫度下執行。較佳為，方法係在比室溫高的溫度下執行。第一及第二管柱層析法能在相同溫度或不同的溫度下執行，但較佳為相同溫度。

【0124】 在本發明的一態樣中，比室溫高的溫度為 20°C 以上、 25°C 以上、 30°C 以上、 35°C 以上，或 60°C 以下、 55°C 以下、 50°C 以下、 45°C 以下，或 $20\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、 $25\sim 55^{\circ}\text{C}$ 、 $30\sim 50^{\circ}\text{C}$ 或 $35\sim 45^{\circ}\text{C}$ 。

【0125】 在本發明的一態樣中，管柱層析法能使用兩個以上的管柱。管柱層析法能使用已知的固定床層析法裝置而執行。此種管柱層析法被稱為固定床層析法。在本發明的一態樣中，第一及第二管柱層析法為固定床層析法。

【0126】 在一部分的態樣中，檢測器被使用於監測從管柱溶析之移動相的成分（單數或複數）的存在。在該技術中能使用已知的檢測法（例如質量分析（MS）、UV/Vis吸光度、螢光、折射率或傳導率）。

【0127】 在另一態樣中，為了檢測來自管柱的剛溶析後的析出液，可使用各種的標準管柱層析法用檢測器中的任一者。

在另一態樣中，可藉由分別分析各分餾而監測成分的存在。在一部分的態樣中，分析為使用氣相層析法之脂肪酸分析。

【0128】 在一部分的態樣中，來自管柱的析出液係作為層析圖中之峰而被檢測。峰的滯留時間被使用於辨識化合物，峰的高度（或面積）係與油脂組合物中的析出液的量成比例。「滯留時間」為析出液通過管柱所需的時間，測量從油脂組合物的注入（或裝載）的時間點起至溶析的時間點為止。理想而言，對象的各析出液將具有特徵性的滯留時間。但是，若溶析液、固定相、溫度及管柱層析法的設定條件變動，則析出液的滯留會不同。因此，析出液的滯留時間係在同一條件下與一個以上的標準化合物的滯留時間進行比較。適當的檢測器顯示良好的靈敏度、良好的穩定性、再現性、多位數大小的被使用於定量目的之情形的線性反應、短的反應時間及操作的容易度。此種檢測器包含UV／Vis吸光度檢測器、光電二極體陣列檢測器、螢光檢測器、折射率檢測器及傳導率檢測器，但不受限於此等。

【0129】 可使用由具有光柵光學系統之掃瞄型分光光度計所構成之UV／Vis吸光度檢測器。氘源（紫外線範圍，190～360nm）與鎢源（可見光範圍，360～800nm）的獨立或組合使用，提供吸光物從管柱移出時檢測其之簡單手段。

【0130】 光電二極體陣列（PDA）基礎的設備為能非常迅速地收集橫跨所選擇的光譜範圍的數據之紫外線／可見光吸光度檢測器。可收集及保存關於各層析法峰之吸光度光譜數據。經保存之數據能與來自資料庫的單純的標準光譜進行比較。與未被分離的各構成要素相關之特徵性的光譜有高度可能會不同，因此PDA檢測器能

有用於辨識難以分離之構成要素（重複的峰）。

【0131】 螢光檢測器能有用於檢測顯示如螢光或磷光般的化學發光特性之分析物。其等比UV吸光度檢測器高至少1位數的靈敏度。螢光典型而言係藉由檢測相對於激光呈90度的角度之被光柵分離的放射輻射（**emission radiation**）而被觀察。螢光物的數量可藉由使用特別試劑所溶析之化合物的管柱後衍生化（**PCD**）反應（或樣本本身的管柱前衍生化反應）而增強。

【0132】 折射率（**RI**）檢測器與幾乎所有溶質進行反應。參照移動相相對於管柱流出液之折射率的差，導致檢測出作為層析圖上的峰的經分離之構成要素的結果。因其對於移動相之極高靈敏度，此檢測器在LC泵內若沒有充分的脈衝衰減便無法使用，其因變化之移動相組成，故亦不適合梯度應用。檢測極限通常比以吸光度檢測器所觀察之檢測極限低。

【0133】 傳導率檢測器提供所有帶電物的高靈敏度檢測。為了簡單且可信賴地檢測陰離子、陽離子、金屬、有機酸及界面活性劑至ppb程度，此檢測器可與LC系統一起使用。管柱及傳導率檢測器之間的化學抑制劑的添加，發揮使溶析液的傳導率降低之作用，而能使用梯度溶析以及能在最小限度的基線漂移下做出ppb程度的確定。為了低程度的陰離子的典型的確定，溶析液被轉換成其弱離子化之低傳導率的酸（例如從 Na_2CO_3 轉換成碳酸），減少背景值雜訊。同時，分析物的陰離子被轉換成其等對應之高傳導率的酸（例如從 NaCl 轉換成 HCl ），使相對的分析物的訊號增大。

【0134】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物所含之高度不飽和脂肪酸酯的純度，相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體，為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%以上或99.5重量%以上。

【0135】 目標物的滯留時間可為約0.5分鐘～約2分鐘、約2分鐘～約4分鐘、約4分鐘～約6分鐘、約6分鐘～約8分鐘、約8分鐘～約10分鐘、約10分鐘～約12分鐘、約12分鐘～約14分鐘、約14分鐘～約16分鐘、約16分鐘～約18分鐘、約18分鐘～約20分鐘、約20分鐘～約22分鐘、約22分鐘～約24分鐘、約24分鐘～約26分鐘、約26分鐘～約28分鐘、約28分鐘～約30分鐘、約30分鐘～約32分鐘、約32分鐘～約34分鐘、約34分鐘～約36分鐘、約36分鐘～約38分鐘或者約38分鐘～約40分鐘，或大於約0.5分鐘、大於約1分鐘、大於約1.5分鐘、大於約2分鐘或者大於約5分鐘，且／或小於50分鐘、小於40分鐘、小於30分鐘或者小於20分鐘。

【0136】 在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間比在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間短。在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間可為約0.5分鐘～約2分鐘、約2分鐘～約4分鐘、約4分鐘～約6分鐘、約6分鐘～約8分鐘、約8分鐘～約10分鐘，或小於10分鐘、小於9分鐘、小於8分鐘、小於7分鐘、小於6分鐘、小於5分鐘、小於4分鐘、小於3

分鐘、小於2分鐘、小於1分鐘。在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間可為約6分鐘～約8分鐘、約8分鐘～約10分鐘、約10分鐘～約12分鐘、約12分鐘～約14分鐘、約14分鐘～約16分鐘、約16分鐘～約18分鐘、約18分鐘～約20分鐘、約20分鐘～約22分鐘、約22分鐘～約24分鐘、約24分鐘～約26分鐘、約26分鐘～約28分鐘、約28分鐘～約30分鐘、約30分鐘～約32分鐘、約32分鐘～約34分鐘、約34分鐘～約36分鐘、約36分鐘～約38分鐘或者約38分鐘～約40分鐘，或小於40分鐘、小於38分鐘、小於36分鐘、小於34分鐘、小於32分鐘、小於30分鐘、小於28分鐘、小於26分鐘、小於24分鐘、小於22分鐘、小於20分鐘、小於18分鐘、小於16分鐘、小於14分鐘、小於12分鐘、小於10分鐘、小於8分鐘。

【0137】 在本發明的一態樣中，在利用氣相層析法（GC）的分析時，可使用內部標準。為了決定分析物相對於內部標準之相對滯留時間，或為了有助於分析物的定量化，內部標準能作為參照標記被添加至樣本。內部標準能以為與目標分析物非常類似但不同的化合物例如目標分析物的氘化衍生物之方式，被本發明所屬技術領域中具有通常知識者適當選擇。被使用於定量化目的之情形，內部標準可接著將分析物的訊號相對於內部標準的訊號之比作為標準的分析物濃度的函數而進行作圖，藉此被使用於校正，於此，標準係為了使用作為對於被定量化之未知的分析物樣本的參照而被本發明所屬技術領域中具有通常知識者製備之已知的濃度的樣本。

【0138】 在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物為二十二

碳六烯酸、巴豆酸、肉豆蔻油酸、棕櫚油酸、順十六烯酸、油酸、反油酸、異油酸、鱈油酸、二十烯酸、芥酸、神經酸、亞麻油酸、二十碳二烯酸、二十二碳二烯酸、次亞麻油酸、松油酸、桐酸、二十碳三烯酸、雙同- γ -次亞麻油酸、二十碳三烯酸、十八碳四烯酸、花生四烯酸、二十碳四烯酸、二十二碳四烯酸、伯色五烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸、沙丁魚酸、二十四碳五烯酸、鯡魚酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一酸、十二酸、十三酸、十四酸、十五酸、十六酸、十七酸、十八酸、十九酸、二十酸、二十一酸、二十二酸、二十三酸、二十四酸、二十五酸、二十六酸、二十七酸、二十八酸、二十九酸、三十酸、三十一酸、三十二酸、三十三酸、三十四酸、三十五酸、三十六酸、三十七酸、三十八酸、三十九酸、四十酸或其酯，或包含其等。

【0139】 在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有大於約70%、大於約80%、大於約85%、大於約86%、大於約90%、大於約95%、大於約96.5%、大於約98%、大於約99%、大於約99.5%、大於約99.8%或大於約99.9%的純度。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有小於約100%、小於約99.9999%、小於約99.5%、小於99%、小於98.5%或小於約98%的純度。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有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%的純度。在一態樣中，可以大於50%、

大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%或大於80%的產率獲得高度不飽和脂肪酸酯組合物。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有小於100%、小於95%、小於90%或小於80%的產率。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有50~80%、55~90%、60~90%、65~95%、70~95%、75~100%、80~100%的產率。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%、大於95%、大於98%、大於99%或大於99.7%的回收率。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有小於100%、小於99.9999%的回收率。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有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%的純度。

【0140】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物所含之高度不飽和脂肪酸酯為EPA酯，例如為EPA乙酯，其純度相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體為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%以上或99.5重量%以上。

【0141】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物所含之高度不飽和脂肪酸酯為DGLA

酯，例如為DGLA乙酯，其純度相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體為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%以上或99.5重量%以上的純度。

【0142】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物所含之高度不飽和脂肪酸酯為ARA酯，例如為ARA乙酯，其純度高，相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體為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%以上或99.5重量%以上。

【0143】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物以相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體為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%以下或0.01重量%以下的量包含選自C18：0、C20：0、C20：1、C22：0的酯之至少一個脂肪酸酯。

【0144】 以下雖記載本發明的實施例，但本發明並不受此等任何限定。

[實施例]

【0145】 [實施例1]

在本試驗中，藉由單一串聯管柱與兩連串聯式管柱的比較，以管柱模型驗證裝載間隔的縮短。從粗純化的沙丁魚油製備包含EPA

— EE、C20：0乙酯、C20：1乙酯之樣品（製備方法係與以下實施例2同樣）。單一串聯管柱使用將內徑20mm、長度300mm、500mm及500mm的管柱串聯連接者。兩連串聯式管柱使用內徑20mm、長度300mm的第一管柱與將內徑20mm、長度500mm的兩個管柱串聯連接之第二管柱。管柱溫度設為40℃。單一串聯管柱的流速為37mL／分鐘。在兩連串聯式管柱中之第一管柱的流速為32mL／分鐘，第二管柱的流速為37mL／分鐘。固定相使用Daisopak SP-120-50-ODS-B（OSAKA SODA股份有限公司）。移動相為HPLC等級的甲醇（關東化學股份有限公司）。檢測為在230nm中之UV。

在單一串聯管柱中，EPA-EE係在從管柱層析法開始起13分鐘後開始溶析，C20：0乙酯的溶析結束時間為從EPA-EE的溶析開始起24分鐘後。

又，在兩連串聯式管柱中，第一管柱的EPA-EE溶析結束時間為從管柱層析法開始起3.5分鐘後。在第二管柱中，EPA-EE溶析開始為從管柱層析法開始起10.5分鐘後，C20：1乙酯的溶析結束時間為從EPA-EE溶析開始起12分鐘後。

【0146】 在單一串聯管柱中，離EPA-EE最遠的脂肪酸成為C20：0乙酯。又，在兩連串聯式管柱中，回收係為在第一管柱中的EPA-EE溶析結束時間之3.5分鐘為止的溶析液並裝載至第二管柱之情形，在第二管柱中離EPA-EE最遠的脂肪酸成為C20：1乙酯。由於，C20：0乙酯經由第一管柱被去除。在單一串聯管柱中，從EPA-EE溶析開始起24分鐘後，C20：0乙酯溶析結束，因此藉

由將裝載間隔設為24分鐘，前一次裝載中最後溶析之C20：0乙酯變得不混入下一次裝載中被檢測之EPA－EE的餾分。

另一方面，在兩連串聯式管柱中，因在第二管柱中的從EPA－EE溶析開始起12分鐘後成為C20：1乙酯的溶析結束時間，故若裝載間隔為12分鐘，則前一次裝載中最後溶析之C20：1乙酯不會混入下一次裝載中被溶析之EPA－EE的餾分。

亦即，得知在單一管柱中的裝載間隔係藉由導入兩連串聯式管柱而從24分鐘縮短一半成為12分鐘，為可減少使用的溶劑的有效方法。

【0147】 [實施例2]

關於管柱層析法之條件係如同下述。所使用之HPLC設備係如同下述。泵為NP－KX500（日本精密科學股份有限公司），檢測器為S－3702（相馬光學股份有限公司）、管柱烘箱為CO705（GL Sciences股份有限公司）。所使用之ODS填充劑為Daisopak SP－120－50－ODS－B（OSAKA SODA股份有限公司）。第一管柱為內徑20mm、長度300mm，第二管柱為內徑20mm、長度1000mm。第一管柱的流速為32mL／分鐘，第二管柱的流速為37mL／分鐘。溶劑為HPLC等級的甲醇（關東化學股份有限公司）。檢測為在230nm中之UV。裝載2.4g的EPA－EE（80％）。

【0148】 如下述般製備EPA－EE（80％）。對粗純化的沙丁魚油施以短程蒸餾（SPD）。在鹼性觸媒的存在下對SPD處理油施以與乙醇的乙醇解（ethanolysis）反應，形成為魚油乙酯之EPA

—EE。將魚油乙酯藉由精密蒸餾而製備80%EPA—EE。

【0149】 首先，進行第一管柱的分餾試驗。在第一管柱中裝載2.4g的EPA—EE（80%），將餾分（Fr.0）從注入後立即分餾至UV上升為止，接著每隔10秒鐘分餾Fr.1～20，接著分餾30分鐘的Fr.29。使用真空蒸發器從經分離取出之餾分餾除甲醇，添加C23：0甲酯1mg/mL己烷溶液作為內部標準物質後，以氣相層析法（GC）進行分析。從GC峰面積及內部標準之間的面積比計算在各餾分中之化合物的溶析的量，結果EPA—EE（含量93%）的溶析開始為3分30秒，溶析結束為4分20秒，求取當時的有關物質組成。於是，確定在從管柱層析法開始起3分30秒至4分20秒之間的溶析範圍中，從第一管柱往第二管柱進行送液。

【0150】 接著，在第一管柱中裝載2.4g後，在EPA—EE93%以上的溶析範圍（3分30秒至4分20秒）中往第二管柱進行送液。在第二管柱中，將UV上升為止設為Fr.0，每隔10秒鐘分離取出Fr.1～38，接著分餾35分鐘的Fr.39。與第一管柱的分餾試驗同樣地進行GC分析，求取EPA—EE為97%以上時的有關物質組成。

【0151】 關於GC分析，所使用之條件係如同下述。設備為具有DB—WAX 30m×0.25mm×0.25 μm管柱之7890A網路GC系統（Agilent）。管柱溫度為210℃。注入溫度為250℃，分流率（split rate）為1：50，注入量為1 μL。使用250℃的FID檢測器。使用具有31cm/分鐘的線速度之氦的載體氣體。

【0152】 [表1]

EPA數據 (ODS-B)

	%脂肪酸 第一管柱前	第一溶析時間[分鐘] (峰頂值)	%脂肪酸 第一管柱後	第一溶析時間比 (峰頂值)	第二溶析時間 (峰頂值)	%脂肪酸 第二管柱分離 取出	第二溶析時間比 (峰頂值)
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】 [實施例3]

關於為了DGLA濃縮所進行之管柱層析法的條件係如同下述。

管柱使用在內徑600mm的軸向壓縮管柱 (axial compression column) LC-600型(栗田工業股份有限公司)中以填充壓3.5MPa將粒徑50 μ m的ODS填充劑 (SP-120-50-ODS-B, OSAKA SODA股份有限公司)在第一管柱中填充75kg且在第二管柱中填充115kg而成之管柱。第一管柱的管柱長為50cm,第二管柱的管柱長為80cm。移動相使用甲醇,將流速設為第一管柱、第二管柱皆為28L/分鐘。

【0154】 油脂組合物1 (DGLA含量, 87.7%) 係如以下般製備。亦即,將在脂肪酸組合物中含有37.2重量%的DGLA之源自被孢黴屬 (Mortierella) 微生物的微生物油1,依循通常方法以鹼性觸媒進行乙酯化,藉由精密蒸餾而濃縮C20餾分,獲得油脂組合物1。

首先,進行第一管柱的分餾。在第一管柱中裝載油脂組合物1 (DGLA含量, 87.7%) 8.6kg (相對於第一管柱及第二管柱的吸附材重量為4.5%),從注入結束後立即分餾餾分 (Fr.1),以180

秒鐘分餾餾分 (Fr.1)，以各餾分30秒鐘分餾Fr.2至Fr.19、以各餾分120秒鐘分餾Fr.20至Fr.33。將已分餾之各餾分1 mL分注至錐形離心管 (falcon tube)，使用容量移液管添加1 mL的二十三烷酸甲酯 (methyl tricosanoate) 1 mg/mL己烷溶液，再添加5 mL的5% NaCl水溶液，劇烈攪拌進行二層分離後，將上層回收至GC小瓶作為GC樣本，供至GC—FID分析。GC條件係如同下述。從GC峰面積及內部標準之間的面積比計算在各餾分中之化合物的溶析的量。

【0155】 <<GC分析條件>>

裝置：毛細管氣相層析儀GC-2025 島津製作所股份有限公司

管柱：DB-WAX (30 m×0.25 mmID，膜厚：0.25 μm)

載體氣體：氫，1 mL/分鐘

分流比：1：30

管柱溫度：230℃ (30分鐘)

注入口溫度：250℃

檢測器種類、溫度：FID、250℃

注入量：1 μL

【0156】 其結果，得知為在第一管柱中之目標物的DGLA的溶析開始為4.5分鐘，溶析結束為30分鐘，但藉由特意將往第二管柱進行送液之目標餾分 (DGLA含量，92.7%) 的溶析開始設定成4.5分鐘、將溶析結束設定成9分鐘，而將溶析費時之C22：0抑制成0.0%。

【0157】 接著，在第一管柱中裝載8.6kg的油脂組合物1結束後，從第一管柱往第二管柱進行送液之時間設為上述的第一管柱的分餾所特定之範圍（4.5分鐘至9分鐘）。第二管柱的溶析液的分餾係在油脂組合物1的從第一管柱往第二管柱的送液結束後立即開始，以360秒鐘分餾Fr.1，以各30秒鐘分餾Fr.2至Fr.24，以各120秒鐘分餾Fr.25至Fr.34。與第一管柱的分餾試驗同樣地進行GC分析，以在回收餾分的脂肪酸組成中DGLA成為96.5%以上之方式特定回收餾分，求取當時的回收餾分的脂肪酸組成。

【0158】 [表2]

脂肪酸	油脂組合物1	溶析時間[分鐘] (峰頂值 第一)	第一管柱分離 取出	第二管柱注入	溶析時間[分鐘] (峰頂值 第二)	第二管柱後
DGLA	87.74%	6	92.74%	同左	18	96.54%
C20: 4n-6	0.66%	5.5	0.64%	同左	17.5	0.54%
C22: 0	1.74%	18	0.02%	同左	—	0

【0159】 [實施例4]

關於為了ARA濃縮所進行之管柱層析法的條件係如同下述。

HPLC管柱、移動相條件使用與實施例2相同的設備條件。

【0160】 油脂組合物2（ARA含量，79.4%）係如以下般製備。亦即，將在脂肪酸組成中含有43.6重量%的ARA之源自被孢黴屬微生物的微生物油2，依循通常方法以鹼性觸媒進行乙酯化，藉由精密蒸餾而濃縮C20餾分，獲得油脂組合物2。

首先，進行第一管柱的分餾。在第一管柱中裝載油脂組合物2（ARA含量，79.4%）1.0kg（相對於第一及第二管柱的合計吸附材重量為0.55%），從注入結束後立即分餾餾分（Fr.1），以361

秒鐘分餾Fr.1，以各餾分30秒鐘分餾Fr.2至Fr.13，以各餾分300秒鐘分餾Fr.14至Fr.16，以各餾分60秒鐘分餾Fr.17起至Fr.29為止。針對已分餾之各餾分，以與實施例2相同的方法進行GC分析，求取在各餾分中之化合物的溶析的量。其結果，為第一管柱後的目標成分之ARA的溶析開始為6分鐘，溶析結束為40分鐘，但藉由特意將往第二管柱進行送液之目標餾分（ARA含量，78.9%）的溶析開始設定成6.5分鐘、將溶析結束設定成12分鐘，而將溶析費時之C22：0抑制成0.0%。

【0161】 接著，在第一管柱中裝載1.0kg的油脂組合物2結束後，從第一管柱往第二管柱進行送液之時間設為上述的第一管柱的分餾所特定之範圍（6.5分鐘至12分鐘）。第二管柱的溶析液的分餾係在油脂組合物2往第一管柱的裝載結束後開始，以1051秒鐘分餾Fr.1，以各10秒鐘分餾Fr.2至Fr.31，以各600秒鐘分餾Fr.32至Fr.33。與第一管柱的分餾試驗同樣地進行前處理，將已製備之GC樣本以下述的GC條件進行分析，以在回收餾分的脂肪酸組成中ARA成為96.5%以上之方式特定回收餾分，求取當時的回收餾分的脂肪酸組成。

【0162】 <<GC分析條件>>

裝置：毛細管氣相層析儀GC-2025 島津製作所股份有限公司

管柱：DB-WAX（30m×0.25mmID，膜厚：0.25 μm）

載體氣體：氫，31.8cm／秒鐘恆定線性速度控制

分流比：1：30

管柱溫度：210℃（30分鐘）

注入口溫度：250℃

檢測器種類、溫度：FID、250℃

注入量：1 μ L

【0163】 [表3]

脂肪酸	油脂組合物2	溶析時間[分鐘] (峰頂值 第一)	% 第一管柱後	% 第二管柱注入	溶析時間[分鐘] (峰頂值 第二)	% 第二管柱後
ARA	79.42%	8.0	78.86	同左	19.9	97.16
C18：2n－6	2.24%	8.0	2.97	同左	21.2	1.91
C18：3n－6	0.32%	7.5	0.44	同左	18.9	0.19
C18：3n－3	0.14%	7.5	0.21	同左	19.0	0.09
C22：0	0.69%	22.0	0.00	同左	—	0.00

【符號說明】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種方法，其係從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，並包含：

（a）藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，去除將係為在第一管柱層析法中之目標物之高度不飽和脂肪酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8～3.5之至少一種的成分的全部或一部分；

（b）藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90以上且1.1以下之至少一種的成分的全部或一部分；以及

（c）將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含目標物之組合物，

所得之組合物含有95重量%以上的目標物。

【請求項2】如請求項1之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用合併第一與第二管柱之長度的單一管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【請求項3】如請求項1或2之方法，其中，將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8～3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的高度

不飽和脂肪酸酯以外的至少一種的成分。

【請求項4】如請求項1至3中任一項之方法，其中，在該（b）中被去除全部或一部分之至少一種的成分為將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93以上且1.09以下之至少一種的成分。

【請求項5】如請求項1至4中任一項之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱。

【請求項6】如請求項1至5中任一項之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【請求項7】如請求項1至6中任一項之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法（fixed bed column chromatography）。

【請求項8】如請求項1至7中任一項之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

【請求項9】如請求項1至8中任一項之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多，或第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

【請求項10】如請求項1至9中任一項之方法，其中，該目標物為二十碳五烯酸（eicosapentaenoic acid，EPA）、雙同- γ -次亞麻油酸（dihomo- γ -linolenic acid，DGLA）及花生四烯酸（arachidonic acid，ARA）中的任一者的酯。

【請求項11】如請求項1至10中任一項之方法，其中，在該第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22：0、C20：0、C18：0及C20：1中的任一者的酯。

【請求項12】如請求項10或11之方法，其中，酯為乙酯。

【請求項13】如請求項1至12中任一項之方法，其中，高度不飽和脂肪酸酯組合物含有96重量％以上的目標物。

【請求項14】如請求項1至13中任一項之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

【請求項15】如請求項1至14中任一項之方法，其中，目標物為二十碳五烯酸酯，在第二管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為十八碳四烯酸（stearidonic acid）、C19：4、C21：5的酯。

【請求項16】如請求項1至14中任一項之方法，其中，目標物為雙同- γ -次亞麻油酸酯，在第二管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C20：4n-6酯。

【請求項17】如請求項1至14中任一項之方法，其中，目標物為花生四烯酸酯，在第二管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C18：3n-6酯。

【發明說明書】

【中文發明名稱】 高度不飽和脂肪酸酯組合物的製造方法

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於使用管柱層析法製造高度不飽和脂肪酸（PUFA）酯的組合物之方法。

【先前技術】

【0002】 高度不飽和脂肪酸被利用作為醫藥品、健康食品等。高度不飽和脂肪酸係從富含高度不飽和脂肪酸之植物油及海產油等天然原料所製造。在天然原料中，亦包含雙鍵數量不同之脂肪酸，例如飽和脂肪酸、一價不飽和脂肪酸、碳鏈長度不同之脂肪酸等其他成分。天然原料中的高度不飽和脂肪酸的含量不高。為了將高度不飽和脂肪酸使用作為醫藥品、健康食品等，需要選擇性地分離目標的高度不飽和脂肪酸（專利文獻1）。

【0003】 作為高度不飽和脂肪酸的分離方法，已知有管柱層析法（專利文獻2）。另一方面，作為能連續操作的層析法，使用模擬移動床層析法（專利文獻3～7）。

[先行技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

[專利文獻1] 國際公開第2014／054435號

[專利文獻2] 日本特表2014－511406號公報

[專利文獻3] 日本特表平8－512336號公報

[專利文獻4] 日本特開平8－218091號公報

[專利文獻5] 日本特表2016－508156號公報

[專利文獻6] 日本特開2019－207234號公報

[專利文獻7] 日本特表2013－516398號公報

【發明內容】

[發明所欲解決的問題]

【0005】 模擬移動床層析法需要複雜的系統、裝置，相較於使用單一管柱之層析法為高價。因此，現仍尋求不需要如模擬移動床層析法般的複雜裝置而有效率地以高純度製造目標的高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法。

[用以解決問題的手段]

【0006】 出乎意料地，本發明的發明人發現藉由使用第一管柱層析法及第二管柱層析法之多段式分離方法，能應對上述問題並有效率地製造目標的高度不飽和脂肪酸，進而完成本發明。

本發明的主旨為以下的從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法。

【0007】 [1－1]一種方法，其係從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，並包含：

(a) 藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，

去除將係為在第一管柱層析法中之目標物之高度不飽和脂肪酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第一管柱層析法而獲得包含目標物之溶析液；

(b)藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

(c)將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含目標物之組合物，

所得之組合物含有95重量%以上的目標物。

【0008】 [1-2]如[1-1]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載

(loading)間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[1-3]如[1-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0009】 [1-4]如[1-1]~[1-3]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之前述至少一種

的成分為油脂組合物中的高度不飽和脂肪酸酯以外的至少一種的成分。

[1-5]如[1-1]~[1-4]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的係為，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09之至少一種的成分。

[1-6]如[1-1]~[1-5]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[1-7]如[1-6]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1的範圍。

【0010】 [1-8]如[1-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94~1.1的範圍。

[1-9]如[1-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中

之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96～1.1的範圍。

[1-10]如[1-6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09的範圍。

[1-11]如[1-6]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形之滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

[1-12]如[1-1]～[1-11]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【0011】 [1-13]如[1-1]～[1-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法（fixed bed column chromatography）。

[1-14]如[1-1]～[1-13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[1-15]如[1-1]～[1-14]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0012】 [1-16]如[1-1]～[1-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[1-17]如[1-1]~[1-16]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[1-18]如[1-1]~[1-17]中任一項所記載之方法，其中，前述目標物為二十碳五烯酸（*eicosapentaenoic acid*，EPA）、雙同- γ -次亞麻油酸（*dihomo- γ -linolenic acid*，DGLA）及花生四烯酸（*arachidonic acid*，ARA）中的任一者的酯。

[1-19]如[1-1]~[1-18]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22:0、C20:0、C18:0及C20:1中的任一者的酯。

[1-20]如[1-18]或[1-19]所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0013】 [1-21]如[1-1]~[1-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之前述至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[1-22]如[1-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之前述至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量%以下或0.05重量%以下。

【0014】 [1-23]如[1-1]~[1-22]中任一項所記載之方法，其中，由（c）所得之組合物含有96重量%以上的目標物。

[1-24]如[1-1]~[1-23]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[1-25]如[1-1]~[1-24]中任一項所記載之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

[1-26]如[1-1]~[1-25]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在（a）之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認目標物的峰頂的滯留時間。

[1-27]如[1-1]~[1-26]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液為來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液。

【0015】 [2-1]一種方法，其係從油脂組合物製造二十碳五烯酸酯組合物之方法，並包含：

（a）藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，獲得包含二十碳五烯酸酯之溶析液，所述溶析液包含相對於溶析液中所含之脂肪酸酯整體為0.3重量%以下的C20：0的酯；

（b）將由第一管柱層析法所得之包含二十碳五烯酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

（c）將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含二十碳五烯酸酯之組合物，

所得之組合物含有96.5重量%以上的二十碳五烯酸酯以及二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分，二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分含有各0.2重量%以下的十八碳四烯酸（stearidonic

acid)、C19:4、C21:5的酯。

[2-2]如[2-1]所記載之方法，其中，在前述所得之組合物中，包含各0.01重量%~0.2重量%的十八碳四烯酸、C19:4、C21:5的酯。

【0016】 [2-3]如[2-1]或[2-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一根柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[2-4]如[2-3]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0017】 [2-5]如[2-1]~[2-4]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分。

[2-6]如[2-1]~[2-5]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含二十碳五烯酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09之至少一種的成分。

[2-7]如[2-1]~[2-6]中任一項所記載之方法，其中，能以

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[2-8]如[2-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1的範圍。

【0018】 [2-9]如[2-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94~1.1的範圍。

[2-10]如[2-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96~1.1的範圍。

[2-11]如[2-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析

液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之二十碳五烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09的範圍。

[2-12]如[2-7]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

【0019】 [2-13]如[2-1]～[2-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

[2-14]如[2-1]～[2-13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[2-15]如[2-1]～[2-14]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

【0020】 [2-16]如[2-1]～[2-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

[2-17]如[2-1]～[2-16]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[2-18]如[2-1]～[2-17]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C20：0、C18：0及C20：1中的任一者的酯。

[2-19]如[2-1]～[2-18]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[2-20]如[2-1]~[2-19]中任一項所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0021】 [2-21]如[2-1]~[2-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含二十碳五烯酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[2-22]如[2-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含二十碳五烯酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量%以下或0.05重量%以下。

【0022】 [2-23]如[2-1]~[2-22]中任一項所記載之方法，其中，前述所得之組合物含有96重量%以上的二十碳五烯酸酯。

[2-24]如[2-1]~[2-22]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[2-25]如[2-1]~[2-24]中任一項所記載之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

【0023】 [2-26]如[2-1]~[2-25]中任一項所記載之方法，其中，在（b）中，去除將在第二管柱層析法中之二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分。

[2-27]如[2-1]~[2-26]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在(a)之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認二十碳五烯酸酯的峰頂的滯留時間。

[2-28]如[2-1]~[2-27]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含二十碳五烯酸酯之溶析液為來自第一管柱的二十碳五烯酸酯的溶析結束時為止的溶析液。

【0024】 [3-1]一種方法，其係從油脂組合物製造雙同- γ -一次亞麻油酸酯(dihomo- γ -linolenic acid ester)組合物之方法，並包含：

(a)藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，獲得包含雙同- γ -一次亞麻油酸酯之溶析液，所述溶析液包含相對於溶析液中所含之脂肪酸酯整體為0.5重量%以下的C22:0的酯；

(b)將由第一管柱層析法所得之包含雙同- γ -一次亞麻油酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

(c)將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含雙同- γ -一次亞麻油酸酯之組合物，

所得之組合物含有95.0重量%以上的雙同- γ -一次亞麻油酸酯以及雙同- γ -一次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分，雙同- γ -一次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分含有0.60重量%以下的C20:4n-6的酯。

[3-2]如[3-1]所記載之方法，其中，在前述所得之組合物中，包含0.01重量%~0.2重量%的C20:4n-6的酯。

【0025】 [3-3]如[3-1]或[3-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一根柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[3-4]如[3-3]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0026】 [3-5]如[3-1]～[3-4]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8～3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分。

[3-6]如[3-1]～[3-5]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09之至少一種的成分。

[3-7]如[3-1]～[3-6]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的

前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

【0027】 [3-8]如[3-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1的範圍。

[3-9]如[3-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94~1.1的範圍。

[3-10]如[3-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96~1.1的範圍。

[3-11]如[3-7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之雙同- γ -次亞麻油酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09的範圍。

[3-12]如[3-7]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

[3-13]如[3-1]~[3-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【0028】 [3-14]如[3-1]~[3-13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[3-15]如[3-1]~[3-14]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[3-16]如[3-1]~[3-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0029】 [3-17]如[3-1]~[3-16]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[3-18]如[3-1]~[3-17]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22:0、C20:0、C18:0及C20:1中的任一者的酯。

[3-19]如[3-1]~[3-18]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[3-20]如[3-1]~[3-19]中任一項所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0030】 [3-21]如[3-1]~[3-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含雙同- γ -次亞麻油酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[3-22]如[3-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含雙同- γ -次亞麻油酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量%以下或0.05重量%以下。

[3-23]如[3-1]~[3-22]中任一項所記載之方法，其中，前述所得之組合物含有96重量%以上的雙同- γ -次亞麻油酸酯。

【0031】 [3-24]如[3-1]~[3-23]中任一項所記載之方法，其中，在（b）中，去除將在第二管柱層析法中之雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分。

[3-25]如[3-1]~[3-24]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在（a）之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認雙同- γ -次亞麻油酸酯的峰頂的滯留時間。

[3-26]如[3-1]~[3-25]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含雙同- γ -次亞麻油酸酯之溶析液為來自第一管柱的雙同- γ -次亞麻油酸酯的溶析結束時為止的溶析

液。

【0032】 [4-1]一種方法，其係從油脂組合物製造花生四烯酸酯組合物之方法，並包含：

(a)藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，獲得包含花生四烯酸酯之溶析液，所述溶析液包含相對於溶析液中所含之脂肪酸酯整體為0.5重量%以下的C22：0的酯；

(b)將由第一管柱層析法所得之包含花生四烯酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

(c)將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含花生四烯酸酯之組合物，

所得之組合物含有95.0重量%以上的花生四烯酸酯以及花生四烯酸酯以外的至少一種的成分，花生四烯酸酯以外的至少一種的成分含有0.25重量%以下的C18：3n-6的酯。

[4-2]如[4-1]所記載之方法，其中，在前述所得之組合物中，包含0.01重量%~0.2重量%的C18：3n-6的酯。

【0033】 [4-3]如[4-1]或[4-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一根柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[4-4]如[4-3]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0034】 [4-5]如[4-1]~[4-4]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的花生四烯酸酯以外的至少一種的成分。

[4-6]如[4-1]~[4-5]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含花生四烯酸酯之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09之至少一種的成分。

[4-7]如[4-1]~[4-6]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[4-8]如[4-7]中任一項所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1的範圍。

【0035】 [4-9]如[4-7]所記載之方法，其中，將來自第一

管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94～1.1的範圍。

[4－10]如[4－7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96～1.1的範圍。

[4－11]如[4－7]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之花生四烯酸酯以外的至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09的範圍。

[4－12]如[4－7]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

【0036】 [4－13]如[4－1]～[4－12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

[4－14]如[4－1]～[4－13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[4－15]如[4－1]～[4－14]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[4-16]如[4-1]~[4-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0037】 [4-17]如[4-1]~[4-16]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[4-18]如[4-1]~[4-17]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22：0、C20：0、C18：0及C20：1中的任一者的酯。

[4-19]如[4-1]~[4-18]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[4-20]如[4-1]~[4-19]中任一項所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0038】 [4-21]如[4-1]~[4-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含花生四烯酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[4-22]如[4-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含花生四烯酸酯之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量%以下或0.05重量%以下。

[4-23]如[4-1]~[4-22]中任一項所記載之方法，其中，前述所得之組合物含有96重量%以上的花生四烯酸酯。

【0039】 [4-24]如[4-1]~[4-23]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[4-25]如[4-1]~[4-24]中任一項所記載之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

【0040】 [4-26]如[4-1]~[4-25]中任一項所記載之方法，其中，在（b）中，去除將在第二管柱層析法中之花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分。

[4-27]如[4-1]~[4-26]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在（a）之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認花生四烯酸酯的峰頂的滯留時間。

[4-28]如[4-1]~[4-27]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含花生四烯酸酯之溶析液為來自第一管柱的花生四烯酸酯的溶析結束時為止的溶析液。

【0041】 [5-1]一種方法，其係縮短在從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物中之管柱層析法所需要的時間之方法，並包含：

（a）藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，去除將係為在第一管柱層析法中之目標物之高度不飽和脂肪酸酯的

峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8
~3.5之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第一管柱層析法而獲得包含目標物之溶析液；

(b)藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第二管柱層析法而獲得溶析液；以及

(c)將由第二管柱層析法所得之溶析液進行濃縮，獲得包含目標物之組合物，

所得之組合物含有95重量%以上的目標物，

一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0042】 [5-2]如[5-1]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[5-3]如[5-1]或[5-2]所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分為油脂組合物中的高度不飽和脂肪酸酯以外的至少一種的成分。

【0043】 [5-4]如[5-1]~[5-3]中任一項所記載之方

法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09之至少一種的成分。

[5-5]如[5-1]～[5-4]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[5-6]如[5-5]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.90～1.1的範圍。

[5-7]如[5-5]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94～1.1的範圍。

【0044】 [5-8]如[5-5]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96～1.1的範圍。

[5-9]如[5-5]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09的範圍。

[5-10]如[5-5]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

[5-11]如[5-1]~[5-10]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【0045】 [5-12]如[5-1]~[5-11]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[5-13]如[5-1]~[5-12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[5-14]如[5-1]~[5-13]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0046】 [5-15]如[5-1]~[5-14]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[5-16]如[5-1]~[5-15]中任一項所記載之方法，其中，前述目標物為二十碳五烯酸(EPA)、雙同- γ -次亞麻油酸(DGLA)及花生四烯酸(ARA)中的任一者的酯。

[5-17]如[5-1]~[5-16]中任一項所記載之方法，其中，在

前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為 C22 : 0、C20 : 0、C18 : 0 及 C20 : 1 中的任一者的酯。

[5-18] 如 [5-1] ~ [5-17] 中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[5-19] 如 [5-17] 或 [5-18] 所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0047】 [5-20] 如 [5-1] ~ [5-19] 中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為 0.3 重量% 以下。

[5-21] 如 [5-20] 所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為 0.1 重量% 以下或 0.05 重量% 以下。

[5-22] 如 [5-1] ~ [5-21] 中任一項所記載之方法，其中，高度不飽和脂肪酸酯組合物含有 96 重量% 以上的目標物。

【0048】 [5-23] 如 [5-1] ~ [5-22] 中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[5-24] 如 [5-1] ~ [5-23] 中任一項所記載之方法，其中，將

(a)、(b) 及 (c) 重複 2 次以上。

[5-25]如[5-1]~[5-24]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在(a)之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認目標物的峰頂的滯留時間。

[5-26]如[5-1]~[5-25]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液為來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液。

【0049】 [6-1]一種方法，其係從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，並包含：

(a)藉由將油脂組合物供至使用第一管柱之第一管柱層析法，去除將係為在第一管柱層析法中之目標物之高度不飽和脂肪酸酯的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第一管柱層析法而獲得包含目標物之溶析液；以及

(b)藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法，去除將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.90~1.1之至少一種的成分的全部或一部分，藉由第二管柱層析法而獲得溶析液。

【0050】 [6-2]如[6-1]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起使用與第一與第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

[6-3]如[6-2]所記載之方法，其中，一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔，比起僅使用第二管柱之管柱層析法之情形，更為縮短。

【0051】 [6-4]如[6-1]~[6-3]中任一項所記載之方法，其中，將在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為1.8~3.5之前述至少一種的成分為油脂組合物中的高度不飽和脂肪酸酯以外的至少一種的成分。

[6-5]如[6-1]~[6-4]中任一項所記載之方法，其中，藉由將由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液供至使用第二管柱之第二管柱層析法而被去除全部或一部分的為將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為0.93~1.09之至少一種的成分。

[6-6]如[6-1]~[6-5]中任一項所記載之方法，其中，能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通第一管柱與第二管柱，

將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為1.1以下的範圍。

[6-7]如[6-6]所記載之方法，其中，將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂

的滯留時間的相對值為0.90～1.1的範圍。

【0052】 [6－8]如[6－6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.94～1.1的範圍。

[6－9]如[6－6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.96～1.1的範圍。

[6－10]如[6－6]所記載之方法，其中，將在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述溶析液所含之前述至少一種的成分的峰頂的滯留時間的相對值為0.93～1.09的範圍。

[6－11]如[6－6]所記載之方法，其中，排出將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的前述滯留時間的相對值為3.5以上之來自第一管柱的溶析液，將新的移動相注入第二管柱。

[6－12]如[6－1]～[6－11]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用逆相管柱層析法。

【0053】 [6－13]如[6－1]～[6－12]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法為固定床管柱層析法。

[6－14]如[6－1]～[6－13]中任一項所記載之方法，其中，第一管柱層析法與第二管柱層析法使用相同的移動相。

[6-15]如[6-1]~[6-14]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱所填充之固定相的量比第一管柱多。

【0054】 [6-16]如[6-1]~[6-15]中任一項所記載之方法，其中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。

[6-17]如[6-1]~[6-16]中任一項所記載之方法，其中，前述油脂組合物源自魚油、植物油、藻類及微生物中的任一者。

[6-18]如[6-1]~[6-17]中任一項所記載之方法，其中，前述目標物為二十碳五烯酸(EPA)、雙同- γ -次亞麻油酸(DGLA)及花生四烯酸(ARA)中的任一者的酯。

[6-19]如[6-1]~[6-18]中任一項所記載之方法，其中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為C22:0、C20:0、C18:0及C20:1中的任一者的酯。

[6-20]如[6-18]或[6-19]所記載之方法，其中，酯為乙酯。

【0055】 [6-21]如[6-1]~[6-20]中任一項所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之前述至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.3重量%以下。

[6-22]如[6-21]所記載之方法，其中，在被供至第二管柱層析法之包含目標物之析出液中，在前述第一管柱層析法中被去除全部或一部分之前述至少一種的成分的含量，相對於被供至前述第二

管柱層析法之析出液所含之脂肪酸酯整體，為0.1重量％以下或0.05重量％以下。

【0056】 [6-23]如[6-1]～[6-22]中任一項所記載之方法，其中，所得之組合物含有96重量％以上的目標物。

[6-24]如[6-1]～[6-23]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含藉由蒸餾而從原料組合物製備前述油脂組合物。

[6-25]如[6-1]～[6-24]中任一項所記載之方法，其中，將（a）、（b）及（c）重複2次以上。

[6-26]如[6-1]～[6-25]中任一項所記載之方法，其中，進一步包含：在（a）之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認目標物的峰頂的滯留時間。

[6-27]如[6-1]～[6-26]中任一項所記載之方法，其中，由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液為來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液。

[發明功效]

【0057】 在本發明中，發現可在比使用單一管柱更短的時間且減少溶劑使用量而有效果地製造以高濃度含有EPA乙酯、DGLA乙酯及ARA乙酯等高度不飽和脂肪酸乙酯之組合物。在本發明中，可去除C20：0乙酯等脂肪酸。

【圖式簡單說明】

無。

【實施方式】

[用以實施發明的形態]

【0058】 在本發明的一態樣中，「組合物」可包含一種類以上的PUFA或其酯衍生物。包含PUFA或其酯衍生物之組合物可從包含高度不飽和脂肪酸作為構成脂肪酸之原料獲得。例如，適當的油脂組合物可從將包含植物、動物的油及脂肪之天然油脂進行酯化而成之原料組合物獲得，以及可從將油進行酯化而成之原料組合物獲得，所述油係從基因重組植物、動物以及包含酵母、絲狀真菌之微生物所得。可列舉例如將從作為絲狀真菌的被孢黴(*Mortierella*)屬微生物所得之油進行酯化而成之組合物。作為例子，可列舉將魚油、藻類及微藻類的油以及例如琉璃苣油、藍薊屬的油及月見草油之植物油進行乙酯化而成之組合物。在一實施形態中，原料組合物為將魚油進行乙酯化而成之組合物。在另一實施形態中，原料組合物為將藻類的油進行乙酯化而成之組合物。

【0059】 在本發明的一態樣中，油脂組合物係藉由對原料組合物施以蒸餾而得。

在本發明的一態樣中，所謂高度不飽和脂肪酸酯組合物，係指藉由本發明的方法所得之組合物，為包含為目標物之高度不飽和脂肪酸酯之組合物。目標物的高度不飽和脂肪酸酯可為二十碳五烯酸(EPA)、雙同- γ -次亞麻油酸(DGLA)及花生四烯酸(ARA)中的任一者的酯，例如乙酯。

【0060】 在本說明書中，用語「脂肪酸」意指約C12～C22（於此，數字意指鏈中的碳原子的總數）的各種鏈長的長鏈脂肪族系羧酸（烷酸（alkanoic acid））。主鏈長度為C16～C22。脂肪酸的結構能以「X：Y」的單純標記法表示。於此，X為特定的脂肪酸中的碳原子的總數，Y為雙鍵的數量。例如，碳數20的飽和脂肪酸能被標記為「C20：0」，碳數18的一價不飽和脂肪酸能被標記為「C18：1」等，花生四烯酸能被標記為「C20：4，n－6」等。「n－」表示從脂肪酸的甲基末端起算之雙鍵的開始位置，例如若為「n－6」，則表示雙鍵的開始位置為從脂肪酸的甲基末端起算第6個。此方法對本發明所屬技術領域中具有通常知識者而言為周知，針對遵循此方法被標記之脂肪酸，若為本發明所屬技術領域中具有通常知識者則可輕易地特定。

【0061】 脂肪酸為具有長脂肪族鏈之羧酸，其為飽和或不飽和。脂肪酸通常係藉由源自天然來源的三酸甘油酯或磷脂質的水解而被工業製造。一部分係藉由合成而被製造。不問製造方法，為了獲得用於食品、化妝品或產業使用的純粹的產品，需要純化法。

【0062】 在本說明書中，用語「高度不飽和脂肪酸（PUFA）」意指具有大於一個的雙鍵之脂肪酸。在本說明書中之高度不飽和脂肪酸為酯的形態。酯典型而言為烷基酯，例如C₁－C₆烷基酯或C₁－C₄烷基酯。作為酯的例子，可列舉乙酯。

【0063】 在本發明的一態樣中，作為高度不飽和脂肪酸，可列舉二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸（docosapentaenoic acid）、

二十二碳六烯酸、雙同- γ -次亞麻油酸、花生四烯酸、十八碳四烯酸、C18:3、C19:4、C20:4、C21:5。在本發明的一態樣中，作為高度不飽和脂肪酸，可列舉二十碳五烯酸、雙同- γ -次亞麻油酸、花生四烯酸。在本發明的一態樣中，作為在第二管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分，可列舉C18:3、C19:4、C20:4及C21:5。在第二管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分可為目標的高度不飽和脂肪酸的有關物質。

【0064】 在本說明書中，用語「二十碳五烯酸（eicosapentaenoic acid，EPA）」為順-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸的通用名稱。此脂肪酸為C20:5n-3脂肪酸。「EPA-EE」具體而言能指EPA乙酯。

在本說明書中，「雙同- γ -次亞麻油酸（DGLA）」為順-8,11,14-二十碳三烯酸的通用名稱；此脂肪酸為C20:3n-6脂肪酸。

在本說明書中，「花生四烯酸（ARA）」為順-5,8,11,14-二十碳四烯酸的通用名稱；此脂肪酸為C20:4n-6脂肪酸。

【0065】 在本發明的一態樣中，油脂組合物典型而言包含高度不飽和脂肪酸及至少一個脂肪酸。因此，更典型而言，油脂組合物包含高度不飽和脂肪酸以及至少一個脂肪酸及／或其酯。典型的脂肪酸酯係與上述對於高度不飽和脂肪酸所規定者同樣。較佳為，油脂組合物包含碳數20的脂肪酸以及脂肪酸乙酯的至少一者。再佳為，油脂組合物包含選自高度不飽和脂肪酸以及C18:0（十八酸）、

C20：0（二十酸）、C20：1（二十烯酸）、C22：0（二十二酸）以及其等的酯之至少一種脂肪酸。在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分為上述之至少一個的脂肪酸酯。

【0066】 在本發明的一態樣中，油脂組合物所含之目標物（例如，高度不飽和脂肪酸酯）以外的至少一個成分，其極性比目標物低。

【0067】 在本發明的一態樣中，被供至第二管柱層析法之析出液所含之油脂組合物係以相對於被供至第二管柱層析法之析出液所含之油脂組合物整體為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％以下或0.01重量％以下的量包含選自C18：0、C20：0、C20：1、C22：0的酯之至少一個成分。

【0068】 「管柱層析法」被使用於本說明書之際，意指流體流過管柱之際的流體溶液的一種以上的構成要素的選擇性滯留或延遲的過程，所述管柱含有由經細微分割之物質及／或具有毛細管之材料所構成的固定相（單數或複數）。滯留係由固定相及整體流體相（bulk fluid phase）（例如移動相）之間的混合物的構成要素的相對分配所導致，其後者係通過固定相而移動。管柱層析法被使用於二種類以上的物質的混合物的分析及分離。管柱層析法例如包含製備層析法、分析用層析法、高效液相層析法、模擬移動床層析法、真實移動床層析法及超臨界流體層析法（SFC）。

【0069】 用於記載移動相或高度不飽和脂肪酸酯的「非極性」及「極性」之用語，可被使用作為彼此相對之相對性用語。例如，「非極性」可意指極性最低的移動相中的溶劑，另一方面，「極性」可意指極性比「非極性」溶劑高的移動相中的溶劑。

【0070】 在本發明的一態樣中，管柱層析法包含使油脂組合物通過一個以上的管柱。因此，第一管柱層析法包含：使油脂組合物通過第一管柱；以及去除比係為目標物之高度不飽和脂肪酸酯更慢溶析（亦即，將在第一管柱中之目標物的峰頂的滯留時間設為1.0之情形的峰頂的滯留時間的相對值為大於1.0）之至少一種的成分的全部或一部分。第一管柱可將複數的管柱組合成直列及／或並列而使用。第二管柱層析法包含：使由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液通過第二管柱，去除有關物質的成分的全部或一部分，獲得以指定量包含目標物之高度不飽和脂肪酸酯組合物。第二管柱可將複數的管柱組合成直列及／或並列而使用。任意已知管柱能被用於請求項之方法。

在本發明的一態樣中，由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液為來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液。在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中之去除目標物以外的至少一種的成分的全部或一部分，係藉由回收來自第一管柱的目標物的溶析結束時為止的溶析液而進行。

【0071】 第一管柱層析法係使用第一管柱而實施。在本發明的一態樣中，第一管柱層析法係將去除滯留時間比目標物長的成分

的全部或一部分作為目的而進行。在本發明的一態樣中，藉由第一管柱層析法而被去除全部或一部分之成分的滯留時間，將在第一管柱層析法中之目標物的滯留時間設為1之情形，為1.5以上、1.7以上、1.8以上，或10以下、8以下、5以下、3.5以下、3.0以下，或1.5～10、1.7～8、1.8～5、1.8～3.5、1.8～3.0或者1.8～2.5。在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中至少一種類的成分被去除一部分之情形，係99%以上、95%以上、90%以上的該成分被去除。

【0072】 第二管柱層析法係使用第二管柱而實施。在本發明的一態樣中，第二管柱層析法係將去除滯留時間與目標物相近的成分的全部或一部分作為目的而進行。滯留時間與目標物相近的成分，在本說明書中，可被稱為有關物質。在本發明的一態樣中，藉由第二管柱層析法而被去除之成分的滯留時間，將在第二管柱層析法中之目標物的滯留時間設為1之情形，為0.8以上、0.9以上，或1.5以下、1.3以下、1.2以下或者1.1以下，或0.8～1.5、0.9～1.3、0.9～1.2或者0.9～1.1。在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中滯留時間與目標物相近的成分被去除一部分之情形，係5%以上、10%以上、15%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上的該成分被去除。

【0073】 在本發明的一態樣中，可將第一層析法的溶析液中的未被供至第二層析法之餾分（fraction）以及第二層析法的溶析液中的包含已從高度不飽和脂肪酸酯組合物去除之脂肪酸酯之餾分

進行回收，並供至第三管柱層析法。第三管柱層析法係使用第三管柱而實施。

【0074】 在本發明的一態樣中，第一管柱係指被用於第一管柱層析法之管柱，第二管柱係指被用於第二管柱層析法之管柱，第三管柱意指被用於第三管柱層析法之管柱。所使用之管柱的尺寸未被特別限定，將一定程度地取決於將被純化之油脂組合物的體積。各管柱的直徑為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以上或者500 mm以上，或4000 mm以下、2000 mm以下、1000 mm以下、500 mm以下，或1~4000 mm、2~2000 mm、4~1000 mm、8~1000 mm、16~1000 mm、32~500 mm、30~800 mm，或400~800 mm。在本發明的一態樣中，第一管柱與第二管柱可具有同一或不同的直徑。第一及第二管柱的直徑的比，將第一管柱設為1之情形，第二管柱為0.1以上、0.3以上、0.5以上，或10以下、3以下、2以下或者1.5以下，或0.1~10、0.3~3、0.5~2或者0.5~1.5。在本發明的一態樣中，將直徑相同的管柱使用作為第一及第二管柱。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第一管柱~第三管柱可具有同一或不同的直徑。第三管柱可具有分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的直徑。在本發明的一態樣中，第二管柱具有與第一管柱相同的直徑且長度比第一管柱長。在本說明書中，所謂第一管柱與第二管柱具有相同或同一的直徑，係指第一管柱與第二管柱的直徑的比為0.8~1.2，例如為0.9~1.1或1。

【0075】 在本發明的一態樣中，第一及第二管柱的剖面為大致圓形，第一及第二管柱的剖面面積的比，將第一管柱設為1之情形，第二管柱為0.1以上、0.2以上，或10以下、4以下、2以下，或0.1～10、0.2～4或者0.2～2。在本發明的一態樣中，將剖面面積相同的管柱使用作為第一及第二管柱。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第一管柱～第三管柱可具有同一或不同的剖面面積。第三管柱可具有分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的剖面面積。

【0076】 在本發明的一態樣中，各管柱的長度為5cm以上、10cm以上、20cm以上，或800cm以下、400cm以下、200cm以下、150cm、120cm以下，或5～800cm、10～400cm、20～200cm、20～150cm或者20～120cm。在本發明的一態樣中，第一管柱比第二管柱短。第一及第二管柱的長度的比，將第一管柱設為1之情形，第二管柱為0.5以上、1以上、1.1以上、1.5以上，或10以下、7以下、5以下，或0.5～10、1～7、1.1～5或者1.5～5。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可具有分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的長度。在本發明的一態樣中，第二管柱具有與第一管柱相同的內徑且長度比第一管柱長。第二管柱具有與第一管柱相同的內徑，例如具有第一管柱的長度的1.1倍以上、1.5倍以上或5倍以下、7倍以下、10倍以下的長度。在本說明書中，所謂第一管柱與第二管柱具有相同或同一的內徑，係指第一管柱與第二管柱的內徑的比為0.8～1.2，例如為0.9～1.1或1。

【0077】 管柱為具有外徑、內徑及長度之圓筒形。在一態樣中，管柱為製備層析法管柱。製備層析法管柱可包含5mm以上、10mm以上、20mm以上、50mm以上，或4m以下、2m以下、1m以下、80cm以下，或約5mm～約4m、約10mm～約2m、約20mm～約1m或者約50mm～80cm的內徑以及約100mm～約5m、約2cm～約2m或約10cm～約1.5m的長度。在一態樣中，管柱為分析用層析法管柱。分析用管柱可包含約1mm～約10cm的內徑以及約10mm～約500mm的長度。尺寸可以內徑為長度的約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%或約500%之方式選擇。外徑可比內徑大約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%或者約30%。

【0078】 用語「峰」被使用於本說明書之際，意指層析圖中的峰。層析圖為經時地顯示檢測到的值之圖。檢測到析出液之際，檢測到的值會增大，層析圖顯示「峰」。層析圖中的各峰表示樣本中的成分的存在。以滯留時間標記各峰，層析圖中的時間從左至右增加。

「峰頂」意指層析圖中的各峰的檢測值成為最大之點。

【0079】 「分離」被使用於本說明書之際，意指具有下述特徵的過程：基於在相對運動中之相（例如移動相及固定相）之間的其等分配差，空間性分離包含高度不飽和脂肪酸酯之組合物的構成要素。分離係由樣本往管柱上的裝載以及裝載後的管柱的溶析所導致。

「分餾（fractionation）」為某一量的混合物在相變期間被分成好幾個較小的量之分離過程，於此，組成係依據梯度而變動。不同餾分係在不同時間點基於各個構成要素（混合物或樣本內的高度不飽和脂肪酸酯）的特定特性例如其對於固定相及／或移動相之親和力的差異而被收集。

【0080】 「供至管柱層析法」被使用於本說明書之際，意指將含有高度不飽和脂肪酸酯之樣本裝載至管柱直至全部樣本被容納於管柱內為止。在本說明書中，樣本為油脂組合物。樣本典型而言被裝載至經填充之管柱的固定相的頂部。於此，「頂部」為移動相通過管柱而溶析之際最先接收移動相之固定相的末端。油脂組合物能藉由注入器、泵或將樣本直接適用於固定相的頂部而被供至管柱層析法。樣本可與最小量的移動相或者用於裝載的其他溶劑進行混合。

【0081】 「溶析」被使用於本說明書之際，意指已裝載至管柱之成分通過管柱而作為移動相的溶液流出。

「溶析液」（Eluent）被使用於本說明書之際，為已從管柱溶

析之移動相，能包含已裝載至管柱之油脂組合物中所含之成分。在一態樣中，為在已從管柱溶析之移動相中包含油脂組合物中所含之成分之溶液。在本發明的一態樣中，所謂「由第一管柱層析法所得之包含目標物之溶析液」，意指已通過第一管柱之溶析液，為包含目標物之溶析液。

【0082】 「析出液」(Eluate)被使用於本說明書之際，係指在管柱層析法中從管柱被排出之成分。在本發明的一態樣中，「被供至第二管柱層析法之析出液」為第一管柱層析法的析出液。

【0083】 所謂「成分」，為被供至管柱層析法之油脂組合物中所含之成分，包含高度不飽和脂肪酸酯及脂肪酸酯。在本發明的一態樣中，所謂「在第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分」，可為滯留時間比係為目標物之高度不飽和脂肪酸酯長的脂肪酸酯，例如C22：0、C20：0、C18：0及C20：1中的任一者的酯。又，所謂「在第二管柱層析法中之至少一種的成分」，係指由油脂組合物所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物中所含之目標的高度不飽和脂肪酸酯以外的成分，可為十八碳四烯酸、C19：4、C21：5、C20：4及C18：3中的任一者的酯。

【0084】 在本發明的一態樣中，「在第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分」與「在第二管柱層析法中之至少一種的成分」可不相同。在本發明的一態樣中，「在第二管柱層析法中之至少一種的成分」可包含與「在第一管柱層析法中被去除全部或一部分之至少一種的成分」相同的成分。

【0085】 「聯苯」、「C30」、「C22」、「C18」、「C8」、「C5」、「C4」被使用於本說明書之際，意指管柱填充材料（固定相）上存在之官能基。例如，聯苯管柱係將流通管柱之材料暴露於非取代聯苯，另一方面，C18管柱係將流通管柱之材料（例如移動相及成分）暴露於非取代的直鏈或分支鏈18－碳烷基。

【0086】 「層析法條件」意指運行管柱層析法之參數。作為例子，包含填充壓、移動相及固定相的組成、漿體濃度、運行管柱之壓力、管柱溫度、移動相溫度、移動相梯度、移動相流速、所使用之管柱類型、所使用之檢測儀器及參數、所利用之樣本製備方案、沉澱時間及實施沉澱之壓力、靜置時間及實施靜置之壓力。

【0087】 「梯度」意指實施管柱層析法的期間伴隨時間經過之移動相組成中的變化。在溶劑通過管柱而溶析的期間，移動相的組成能變化。在溶析期間，可以經時增加之百分比添加不同移動相。

【0088】 「純度」為表示組合物的主成分的含量之比例，例如，可使用內部標準並由氣相層析法（GC）的測量結果進行計算。在本說明書的一態樣中，主成分為高度不飽和脂肪酸酯，例如EPA酯、DGLA酯或ARA酯。

【0089】 「目標物」意指由藉由溶析及分餾所得之單一餾分或複數餾分的組合所得之目標的高度不飽和脂肪酸酯，例如EPA酯、DGLA酯或ARA酯。

【0090】 在本發明的一態樣中，濃縮包含：將包含目標的高度不飽和脂肪酸酯之析出液進行減壓及／或加熱，藉由蒸餾而回收

作為溶劑。在本發明的一態樣中，濃縮係使用蒸發器進行。作為蒸發器，可列舉析出液蒸發器及／或薄膜蒸發器。濃縮可使用任意類型的蒸發器，但可使用例如薄膜蒸發器、單一蒸發裝置、多效蒸發裝置、多室蒸發裝置、自然循環型蒸發器、強制循環型蒸發器、薄膜流下型蒸發器、薄膜上升型蒸發器及此等的組合。在本發明的一態樣中，作為自然循環型蒸發器的方式，可列舉例如外部加熱方式、排管方式。

【0091】 在本說明書中，藉由前方帶有用語「約」之數值而給出特定的範圍。用語「約」在本說明書中被使用於提供與以下數字相關之措辭上的支持：前方帶有其之正確數字；以及與前方帶有該用語之數字相近或大致相等之數字。在確定某一數字是否為與具體記載之數字相近或大致相等的數字時，與所記載之數字相近的數字或與所記載之數字相近的未被記載的數字可為在呈現其的上下文中提供具體記載之數字的實質均等量之數字。在一態樣中，約能指其提及之數字的 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2.5\%$ 或 $\pm 1\%$ 。

【0092】 在與本說明書對應之英文說明書中，在用語「a」、「an」及「the」以及成分的記載的上下文中之同樣的指示語，尤其在請求項的上下文中，只要無其他限定或只要未被上下文否定，則被解釋為包含單數及複數兩者。

只要未被另外定義，則本說明書所使用之全部技術用語及科學用語具有與在本發明所屬技術領域中之本發明所屬技術領域中具有通常知識者一般所理解之意義相同的意義。與在本說明書中所記載

之方法及材料類似或均等的所有方法及材料亦可被使用於本發明的實施或試驗中，於此記載具代表性的示例方法及材料。

【0093】 提供值的範圍之情形，位在其範圍的上限～下限之間的各值（只要上下文未明確指示，則至下限的單位的10分之1為止）及其所記載之範圍中的所有其他記載之值或位於其間之值被理解為包含在本發明的範圍內。此等的更小範圍的上限及下限，可獨立地被包含在更小範圍，其亦被包含在本發明的範圍內並包含所有被具體排除之限制對象的一者或兩者之情形中，排除其等所含之限制的一者或兩者之範圍亦被包含在本發明中。

【0094】 本發明並不受限於所記載之特定態樣（因其能理所當然地變動）。考量到本發明的範圍僅被添附之申請專利範圍限定，因此應理解本說明書所使用之用語法僅用於記載特定態樣之目的，並不意圖進行限定。

【0095】 在本發明的一態樣中，從油脂組合物製造高度不飽和脂肪酸酯組合物之方法，包含：在實施第一管柱層析法之前，將油脂組合物供至使用第一管柱之管柱層析法而確認目標物的峰頂的滯留時間。

在本發明的一態樣中，藉由第一管柱層析法而去除峰頂的滯留時間比係為目標物之高度不飽和脂肪酸慢的至少一種的成分的全部或一部分。

所謂「滯留時間」，表示成分被注入管柱後在管柱內經過之時間。典型而言，滯留時間表示峰頂在層析圖中出現之時間。

【0096】 在本說明書中，所謂「為目標物之高度不飽和脂肪酸的峰頂的滯留時間」，意指在第一及第二層析法的層析圖中，在目標物所示之峰頂中之滯留時間。

在本發明的一態樣中，可基於滯留時間的測量結果而計算「相對滯留時間（RRT）」（能與「相對值」、「滯留時間的相對值」互換使用）。「相對滯留時間」表示成分的滯留時間相對於目標物的滯留時間之關係。

在本說明書中，所謂「峰頂的滯留時間的相對值」，意指在第一及第二層析法的層析圖中，將在目標物所示之峰頂中之滯留時間設為1之情形中，將目標物以外的成分所示之峰頂的滯留時間除以目標物的峰頂的滯留時間所得之值。

【0097】 [數1]

$$RRT = \frac{\text{成分的滯留時間}}{\text{目標物的滯留時間}}$$

所謂「滯留時間的相對值」為指定的數值以上的溶析液，意指在「滯留時間的相對值」成為該數值之時間以後所回收之溶析液。又，所謂「滯留時間的相對值」為指定的數值以下的溶析液，意指在「滯留時間的相對值」成為該數值之時間以前所回收之溶析液。

【0098】 在本發明的一態樣中，峰頂的滯留時間可藉由以UV檢測器進行測量而決定。

【0099】 在本發明的一態樣中，峰頂的滯留時間可藉由以由氣相層析法所進行之脂肪酸分析測量各分餾而決定。

【0100】 在本說明書中，所謂「一次的管柱層析法」，意指將一批油脂組合物通過一個以上的管柱，獲得以指定的濃度包含目標物之高度不飽和脂肪酸酯組合物之處理。在一次的管柱層析法中，可將一批油脂組合物通過一或兩個管柱。在一次的管柱層析法中將一批油脂組合物通過兩個管柱之情形，兩個管柱被稱為第一管柱及第二管柱並被串聯。在一次的管柱層析法中使用兩個管柱之情形，來自第一管柱的溶析液的一部分不被注入第二管柱而被排出。在本發明的一態樣中，第一管柱及第二管柱能以將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱之方式連通。在本發明的一態樣中，所謂「將來自第一管柱的溶析液注入第二管柱」，意指來自第一管柱的溶析液可注入第二管柱。在一態樣中，溶析液可不進行濃縮等處理而直接供至第二管柱。在本發明的一態樣中，所謂能連通，意指第一管柱及第二管柱能從已連通之狀態切換成未連通之狀態，或其相反。

【0101】 在本發明的一態樣中，所謂「排出來自第一管柱的溶析液」，意指來自第一管柱的溶析液不注入第二管柱而作為不需要的物質排出。在本發明的一態樣中，滯留時間的相對值為3.5以上係藉由第一管柱與第二管柱不連通而排出來自第一管柱的溶析液。在本發明的一態樣中，已從第一管柱排出之溶析液可注入第三管柱。

【0102】 在本發明的一態樣中，所謂「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，意指在使用單一或兩個以上的管柱之管柱層析法中，從將油脂組合物裝載一次至第一或第二管柱之時間起至可再次開始在同一管柱中裝載油脂

組合物（例如，第二次的裝載）為止的時間。在此情形中，油脂組合物往同一管柱的再次裝載係以下述方式空開時間間隔而開始：在一次的管柱層析法中之最後的成分的溶析完畢後，再次被裝載之油脂組合物中的目標物的溶析會開始。在本發明的一態樣中，「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，係作為在第一或第二管柱中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分的溶析完畢為止的時間而被計算或測量。在本發明的一態樣中，「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，係作為從將油脂組合物供至第一管柱層析法之時間點起至目標物從第一管柱溶析結束為止的時間與在第二管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間之合計時間而被計算。在本發明的一態樣中，使用第一管柱及第二管柱，最後的成分係從第一管柱或第二管柱溶析。在本發明的一態樣中，「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，係與下述時間相等之時間：在第一管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第一管柱排出結束為止的時間。在本發明的另一態樣中，「一次的管柱層析法開始後至變得能開始再次的管柱層析法為止的裝載間隔」，係與下述時間相等之時間：從將油脂組合物供至第一管柱層析法之時間點起至目標物從第一管柱溶析結束為止的時間與在第二管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間之合計時間；或在第二管柱

層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間。在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第一管柱排出結束為止的時間係比下述時間短：在由與第一及第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱所進行之管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被排出結束為止的時間。在本發明的一態樣中，從將油脂組合物供至第一管柱層析法之時間點起至目標物從第一管柱溶析結束為止的時間與在第一管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第一管柱排出結束為止的時間之合計時間，或在第二管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間係比下述時間短：在由與第一及第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱所進行之管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被排出結束為止的時間。又，在本發明的另一態樣中，在第一管柱中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分的溶析完畢為止的時間係比下述時間短：在僅由第二管柱所進行之管柱層析法中，從在第二管柱中之目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分的溶析完畢為止的時間。又，在本發明的另一態樣中，從將油脂組合物供至第一管柱層析法之時間點起至目標物從第一管柱溶析結束為止的時間與在第二管柱層析法中從目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分被從第二管柱排出結束為止的時間之合計時間為止的時間係比下述時間短：在僅由第二管柱所進行之管柱層析法中，從在第

二管柱中之目標物的溶析開始之時間點起至最後的成分的溶析完畢為止的時間。

【0103】 在本說明書中，「與第一及第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱」，例如意指具有與第一及／或第二管柱相同的內徑及固定相之單一管柱。在一態樣中，與第一及第二管柱的長度的合計相等之長度的單一管柱，意指為具有與第二管柱相同的內徑及固定相且流路方向的長度為與第一及第二管柱的長度的合計相等的長度之單一管柱。

【0104】 在本發明的一態樣中，作為管柱層析法，宜為逆相管柱層析法。作為固定相，只要為逆相分配系統的吸附劑則可不特別指定地使用，例如，已與DVB（二乙烯基苯）進行網狀化之聚苯乙烯等的聚合物珠粒，或已鍵結C4或C8或C18的烷基之矽膠，尤其為使用十八烷基矽基（octadecylsilyl，ODS）之ODS管柱。各層析法管柱能包含同一或不同的吸附劑。典型而言，第一管柱及第二管柱能包含同一或不同的吸附劑。在本發明的一態樣中，第一管柱及第二管柱包含同一吸附劑。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可使用分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的吸附劑。

【0105】 固定相可選自C30、C22、C18、C8、C4、聯苯、氟苯基、親水性相互作用液相層析法（HILIC）固定相、丙烯醯胺、矽石、苯基己基固定相、極性嵌入烷基（polar embedded alkyl）、氟苯基丙基或在層析法的技術領域中已知之所有固定相。

在一態樣中，使用掌性固定相。本發明所屬技術領域中具有通常知識者已明確清楚固定相的選擇，能取決於應被層析法純化之成分。非極性成分例如高度不飽和脂肪酸酯能設為需要使用逆相固定相例如C18 (ODS)。可使用包含完全被封端 (end-capped) 者、部分地被封端者及被鹼去活化者在內的各種不同種類的十八烷基矽石 (ODS)。極性較高的成分能設為需要非鍵結矽石、如胺基相或氰基相般的正相的固定相。

【0106】 在一態樣中，固定相包含具有 $1\ \mu\text{m}$ 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，或 $20\ \mu\text{m}$ 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，或約 $1\ \mu\text{m}$ ～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 $5000\ \mu\text{m}$ 的中值粒徑之粒子。在一態樣中，固定相包含具有大於 $50\ \mu\text{m}$ 、大於 $45\ \mu\text{m}$ 、大於 $40\ \mu\text{m}$ 、大於 $35\ \mu\text{m}$ 、大於 $30\ \mu\text{m}$ 、大於 $25\ \mu\text{m}$ 、大於 $20\ \mu\text{m}$ 、大於 $15\ \mu\text{m}$ 或者大於 $10\ \mu\text{m}$ ，且／或小於 $5000\ \mu\text{m}$ 、小於 $4000\ \mu\text{m}$ 、小於 $3000\ \mu\text{m}$ 、小於 $2000\ \mu\text{m}$ 、小於 $1000\ \mu\text{m}$ 、小於 $500\ \mu\text{m}$ 、小於 $100\ \mu\text{m}$ 、小於 $80\ \mu\text{m}$ 、小於 $60\ \mu\text{m}$ ，或 $10\ \mu\text{m}$ ～ $5000\ \mu\text{m}$ 、 $15\ \mu\text{m}$ ～ $4000\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ ～ $3000\ \mu\text{m}$ 、 $25\ \mu\text{m}$ ～ $2000\ \mu\text{m}$ 、 $30\ \mu\text{m}$ ～ $1000\ \mu\text{m}$ 、

35 μm $\sim$ 500 μm 、40 μm $\sim$ 100 μm 、45 μm $\sim$ 80 μm 、50 μm $\sim$ 60 μm 的中值粒徑之粒子。中值粒徑係如本發明所屬技術領域中具有通常知識者所理解般可藉由雷射繞射散射法進行測量。

【0107】 在本發明的一態樣中，固定相可在第一管柱及第二管柱中使用同一或不同的固定相。使用不同的固定相之情形，在第一管柱中，例如可使用已與DVB（二乙烯基苯）進行網狀化之聚苯乙烯、已與C8烷基或十八烷基矽基（ODS）鍵結之矽膠，在第二管柱中，可使用選自已與DVB（二乙烯基苯）進行網狀化之聚苯乙烯、已與烷基或十八烷基矽基（ODS）鍵結之矽膠的與第一管柱的固定相不同的固定相。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可使用分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的固定相。

【0108】 又，在第一管柱及第二管柱中可使用包含具有同一或不同的中值粒徑的粒子之固定相。使用包含具有不同的中值粒徑的粒子之固定相之情形，在第一管柱中，可使用包含具有例如1 μm 以上、20 μm 以上、40 μm 以上、60 μm 以上、80 μm 以上、1000 μm 以上、2000 μm 以上、3000 μm 以上、4000 μm 以上，或20 μm 以下、40 μm 以下、60 μm 以下、80 μm 以下、1000 μm 以下、2000 μm 以下、3000 μm 以下、4000 μm 以下、5000 μm 以下，或約1 μm $\sim$ 約20 μm 、約20 μm $\sim$ 約40 μm 、約40 μm $\sim$ 約60 μm 、約60 μm $\sim$ 約80 μm 、約80 μm $\sim$ 約1000 μm 、約1000 μm $\sim$ 約2000 μm 、約2000 μm $\sim$ 約3000 μm 、約3000 μm $\sim$ 約4000 μm 、

約4000 μm ~ 約5000 μm 的中值粒徑的粒子之固定相，在第二管柱中，可使用包含具有選自1 μm 以上、20 μm 以上、40 μm 以上、60 μm 以上、80 μm 以上、1000 μm 以上、2000 μm 以上、3000 μm 以上、4000 μm 以上，或20 μm 以下、40 μm 以下、60 μm 以下、80 μm 以下、1000 μm 以下、2000 μm 以下、3000 μm 以下、4000 μm 以下、5000 μm 以下，或約1 μm ~ 約20 μm 、約20 μm ~ 約40 μm 、約40 μm ~ 約60 μm 、約60 μm ~ 約80 μm 、約80 μm ~ 約1000 μm 、約1000 μm ~ 約2000 μm 、約2000 μm ~ 約3000 μm 、約3000 μm ~ 約4000 μm 、約4000 μm ~ 約5000 μm 的中值粒徑的粒子之與第一管柱的固定相不同的固定相。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可使用包含具有分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的中值粒徑的粒子之固定相。

【0109】 在本發明的一態樣中，被填充之固定相的量，以重量計為1 ~ 1000kg、10 ~ 900kg、20 ~ 800kg、30 ~ 700kg、40 ~ 600kg 或 50 ~ 500kg。在本發明的一態樣中，第一管柱的固定相與第二管柱的固定相的量可同一亦可不同。被填充之固定相的量不同之情形，第一管柱的固定相的量例如為1 ~ 100kg、10 ~ 100kg、30 ~ 100kg。又，第二管柱的固定相的量例如為1 ~ 1000kg、10 ~ 800g、50 ~ 800g。第一及第二管柱的固定相的量的比，將第一管柱設為1之情形，第二管柱為0.5 ~ 10、1 ~ 7、1.1 ~ 5、2 ~ 4.5。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可充充分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的量的固定相。

在本發明的一態樣中，被填充至第二管柱之固定相的量比被填充至第一管柱之固定相的量多。相對於被填充至第一管柱之固定相的量，被填充至第二管柱之固定相的量為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、或4倍以下、4.5倍以下、5倍以下、6倍以下、7倍以下、10倍以下。

【0110】 在本發明的一態樣中，管柱層析法包含使用移動相之溶析，所述移動相包含水、有機溶劑或超臨界二氧化碳的一者以上。在此等方法的一部分的態樣中，移動相包含甲醇。在此等方法的一部分的態樣中，層析法包含移動相，所述移動相包含選自甲酸、甲酸銨、三甲胺、氨及氫氧化銨的一者以上之添加劑。

【0111】 在本發明的一態樣中，被使用作為移動相之溶劑為有機溶劑，選自醇、醚、酯、酮、腈、己烷類及二氯甲烷。作為醇的例子，可列舉甲醇、乙醇、n-丙醇、i-丙醇、n-丁醇、i-丁醇、s-丁醇及t-丁醇。宜為甲醇及乙醇。甲醇更佳。作為醚的例子，可列舉二乙醚、二異丙醚及甲基t-丁醚（MTBE）。作為酯的例子，可列舉乙酸甲酯及乙酸乙酯。作為酮的例子，可列舉丙酮、甲基乙基酮及甲基異丁基酮（MIBK）。作為腈的例子，可列舉乙腈。

【0112】 在本發明的一態樣中，移動相在第一及第二管柱層析法中可同一亦可不同，但較佳為同一。使用不同移動相之情形，在第一管柱層析法中可使用例如甲醇、乙醇、二乙醚、二異丙醚、甲基t-丁醚、乙酸甲酯、乙酸乙酯、丙酮、甲基乙基酮、甲基異丁

基酮 (MIBK)、乙腈、己烷類及二氯甲烷，在第二管柱中可使用選自甲醇、乙醇、二乙醚、二異丙醚、甲基t-丁醚、乙酸甲酯、乙酸乙酯、丙酮、甲基乙基酮、甲基異丁基酮 (MIBK)、乙腈、己烷類及二氯甲烷之與第一管柱的移動相不同的移動相。在本發明的一態樣中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可使用分別與第一管柱或第二管柱同一或不同的移動相。

【0113】 移動相可進一步包含添加劑，所述添加劑包含緩衝劑及pH調整劑。添加劑的選擇能基於所使用之移動相、所使用之固定相及應被純化之成分而決定。在一部分的態樣中，移動相包含選自甲酸、三氟乙酸、七氟丁酸、甲酸銨、三甲胺、氨及氫氧化銨的一者以上之添加劑。在一部分的態樣中，移動相可不包含添加劑。

【0114】 在本發明的一態樣中，管柱層析法包含移動相梯度。在本發明的一態樣中，管柱層析法包含一種以上的高度不飽和脂肪酸酯的純化。在本發明的一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯為選自二十二碳六烯酸、巴豆酸、肉豆蔻油酸、棕櫚油酸、順十六烯酸、油酸、反油酸、異油酸、鱈油酸、二十烯酸、芥酸、神經酸、亞麻油酸、二十碳二烯酸、二十二碳二烯酸、次亞麻油酸、松油酸

(pinolenic acid)、桐酸、二十碳三烯酸、雙同- γ -次亞麻油酸、二十碳三烯酸、十八碳四烯酸、花生四烯酸、二十碳四烯酸、二十二碳四烯酸(adrenic acid)、伯色五烯酸(bosseopentaenoic acid)、二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸(ozubondo acid)、沙丁魚酸(sardine acid)、二十四碳五烯酸(tetracosapentaenoic

acid)、鯡魚酸(herring acid)、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一酸、十二酸、十三酸、十四酸、十五酸、十六酸、十七酸、十八酸、十九酸、二十酸、二十一酸、二十二酸、二十三酸、二十四酸、二十五酸、二十六酸、二十七酸(carboceric acid)、二十八酸、二十九酸(nonacosylic acid)、三十酸、三十一酸、三十二酸(lacceroic acid)、三十三酸(psyllic acid)、三十四酸(geddic acid)、三十五酸、三十六酸、三十七酸(heptatriacontylic acid)、三十八酸(octatriacontylic acid)、三十九酸(nonatriacontylic acid)及四十酸(tetracontylic acid)的一者以上之高度不飽和脂肪酸的酯。在本發明的一態樣中，酯為甲酯、乙酯、丙酯、丁酯、戊酯、己酯、庚酯、辛酯、壬酯或癸酯。在本發明的一態樣中，管柱層析法包含二十碳五烯酸乙酯的純化。

【0115】 在一部分的態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物係以約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%以上或者約99.9%以上，且／或小於約97%、小於約98%、小於約99.0%、小於約99.95%、小於約99.99%的純度含有目標的高度不飽和脂肪酸酯。在一部分的態樣中，產率為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，且／或小於75%、

小於80%、小於85%、小於90%或者小於95%。在一部分的態樣中，回收率為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%以上或者99.7%以上，且／或小於95%、小於97%、小於98%、小於99%、小於99.5%、小於99.7%或者小於99.9%。

【0116】 移動相可包含水、甲醇、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、己烷類、二氯甲烷、超臨界二氧化碳或在該技術中已知的所有其他溶劑的一者以上。移動相的選擇能設為需要考慮應被純化之高度不飽和脂肪酸酯及所使用之固定相。在針對非極性高度不飽和脂肪酸酯之逆相固定相中，應選擇如下述般的極性移動相：雖充分溶析對象的高度不飽和脂肪酸酯，但溶析不會過快到會接近溶劑前端。

【0117】 在一態樣中，溶劑梯度可在溶析期間被使用作為移動相。梯度溶析的主要目的係以已被溶析之分析物在檢測時會生成充分分離之峰之方式，更快速地溶析被強保持於管柱之分析物，另一方面，更緩慢地溶析被弱保持之分析物。例如，在逆相層析法中，以低含量開始溶析液中的非極性溶劑，而能分離被弱保持之分析物。被強保持之分析物將殘留在管柱的頂部的吸附劑表面上，或非常緩慢地移動。增加溶析液中的非極性構成要素（例如乙腈）的量，因會穩定增大由非極性溶劑所導致之對於吸附部位之競爭，故被強保持之構成要素能更快速地移動。

【0118】 因此，在對於非極性高度不飽和脂肪酸酯使用之逆

相層析法中，在層析法中之溶析的開始時的溶劑能包含選自約100%、約90%、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、約10%或約0%之高百分比的極性溶劑A，例如水。溶劑B可為比溶劑A更非極性的溶劑，例如甲醇（溶劑A為水之情形）。溶劑B將構成移動相的殘餘的百分比。在運行管柱而溶劑通過固定相及管柱被溶析之際，梯度將導致伴隨時間的經過而溶劑B的濃度漸增的結果。在一部分的態樣中，亦可將單一組成的溶劑使用作為移動相。在一部分的態樣中，單一組成的溶劑可單獨或混合使用水、甲醇、乙醇、乙腈、乙酸乙酯、己烷類、二氯甲烷、超臨界二氧化碳或在該技術中已知的所有其他溶劑的一者或一者以上。

【0119】 在一態樣中，經時性的溶劑B的增加率可為固定。在一態樣中，不存在梯度，移動相為溶析期間的固定組成。在一態樣中，可利用層析法內的在不同時間範圍中之溶劑B的百分比的不同增加率。在一態樣中，移動相在層析法的特定時間範圍期間可為固定組成，在其他時間範圍中則包含梯度。

【0120】 在一態樣中，第一管柱層析法及第二管柱層析法可皆為固定組成，或可皆包含梯度，或可皆在特定時間範圍中為固定組成且在其他時間範圍中包含梯度。在一態樣中，可第一管柱層析法為固定組成且第二管柱層析法包含梯度，或可第一管柱層析法包含梯度且第二管柱層析法為固定組成。在一態樣中，包含第三管柱層析法之情形，第三管柱層析法可為固定組成或包含梯度。

【0121】 在移動相中所使用之複數溶劑可分別被儲藏於移

動相供給部，在通過管柱之溶析前使用泵而混合。移動相供給部包含移動相源及溶劑送達系統。此種溶劑送達系統為泵裝置，例如能商業取得的管柱層析法用泵，其將溶劑或移動相提供至管柱。此種泵通常提供無脈衝的流動、 $0.1 \sim 100\text{L} / \text{分鐘}$ 的範圍的流速、流速的正確控制、高壓（ 6000psi 以下）的生成以及耐腐蝕性且耐溶劑性的構成要素。往復泵係由小腔室所構成，其中將溶劑藉由馬達驅動活塞的前後運動而進行泵注入。交互地開關的兩個止回閥係控制出入汽缸之溶劑的方向及流動。單活塞泵係使用特別設計之凸輪，能有非常迅速的補充時間，產生更連續性的流動。經常藉由使用脈衝阻尼器而克服由往復泵所導致之經脈衝化之流動的缺點。由彼此相位不同地移動的活塞所作動之雙活塞泵的使用，提供用於送達無脈衝的流體的合理解決對策。在管柱中之線速度表示流體通過管柱剖面之速度。線速度（線速度（ $\text{m} / \text{小時}$ ）= 流量（ $\text{m}^3 / \text{小時}$ ）/ 管柱剖面積（ m^2 ））可為約 $0.2 \sim 20.0\text{m} / \text{小時}$ 、約 $1.0 \sim 15.0\text{m} / \text{小時}$ 、約 $1.0 \sim 10.0\text{m} / \text{小時}$ 、約 $1.5 \sim 10.0\text{m} / \text{小時}$ 或約 $2.0 \sim 9.0\text{m} / \text{小時}$ 。在一態樣中，線速度為約 $4.0 \sim 9.0\text{m} / \text{小時}$ 。

【0122】 在本發明的一態樣中，在第一管柱或第二管柱中之線速度可同一亦可不同。線速度不同之情形，在第一管柱中之線速度可比在第二管柱中之線速度快，亦可比在第二管柱中之線速度慢。在第一及第二管柱中之線速度的比，將第一管柱設為1之情形，在第二管柱中為 $0.5 \sim 2.0$ 、 $0.5 \sim 1.5$ 或 $1 \sim 1.5$ 。在本發明的一態樣中，在第一管柱及第二管柱中之線速度為相同。在本發明的一態樣

中，進行第三管柱層析法之情形，第三管柱可以分別與第一管柱或第二管柱相同或不同的線速度進行。

【0123】 在本發明的一態樣中，管柱層析法係在室溫或比室溫高的溫度下執行。較佳為，方法係在比室溫高的溫度下執行。第一及第二管柱層析法能在相同溫度或不同的溫度下執行，但較佳為相同溫度。

【0124】 在本發明的一態樣中，比室溫高的溫度為 20°C 以上、 25°C 以上、 30°C 以上、 35°C 以上，或 60°C 以下、 55°C 以下、 50°C 以下、 45°C 以下，或 $20\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、 $25\sim 55^{\circ}\text{C}$ 、 $30\sim 50^{\circ}\text{C}$ 或 $35\sim 45^{\circ}\text{C}$ 。

【0125】 在本發明的一態樣中，管柱層析法能使用兩個以上的管柱。管柱層析法能使用已知的固定床層析法裝置而執行。此種管柱層析法被稱為固定床層析法。在本發明的一態樣中，第一及第二管柱層析法為固定床層析法。

【0126】 在一部分的態樣中，檢測器被使用於監測從管柱溶析之移動相的成分（單數或複數）的存在。在該技術中能使用已知的檢測法（例如質量分析（MS）、UV/Vis吸光度、螢光、折射率或傳導率）。

【0127】 在另一態樣中，為了檢測來自管柱的剛溶析後的析出液，可使用各種的標準管柱層析法用檢測器中的任一者。

在另一態樣中，可藉由分別分析各分餾而監測成分的存在。在一部分的態樣中，分析為使用氣相層析法之脂肪酸分析。

【0128】 在一部分的態樣中，來自管柱的析出液係作為層析圖中之峰而被檢測。峰的滯留時間被使用於辨識化合物，峰的高度（或面積）係與油脂組合物中的析出液的量成比例。「滯留時間」為析出液通過管柱所需的時間，測量從油脂組合物的注入（或裝載）的時間點起至溶析的時間點為止。理想而言，對象的各析出液將具有特徵性的滯留時間。但是，若溶析液、固定相、溫度及管柱層析法的設定條件變動，則析出液的滯留會不同。因此，析出液的滯留時間係在同一條件下與一個以上的標準化合物的滯留時間進行比較。適當的檢測器顯示良好的靈敏度、良好的穩定性、再現性、多位數大小的被使用於定量目的之情形的線性反應、短的反應時間及操作的容易度。此種檢測器包含UV／Vis吸光度檢測器、光電二極體陣列檢測器、螢光檢測器、折射率檢測器及傳導率檢測器，但不受限於此等。

【0129】 可使用由具有光柵光學系統之掃瞄型分光光度計所構成之UV／Vis吸光度檢測器。氘源（紫外線範圍，190～360nm）與鎢源（可見光範圍，360～800nm）的獨立或組合使用，提供吸光物從管柱移出時檢測其之簡單手段。

【0130】 光電二極體陣列（PDA）基礎的設備為能非常迅速地收集橫跨所選擇的光譜範圍的數據之紫外線／可見光吸光度檢測器。可收集及保存關於各層析法峰之吸光度光譜數據。經保存之數據能與來自資料庫的單純的標準光譜進行比較。與未被分離的各構成要素相關之特徵性的光譜有高度可能會不同，因此PDA檢測器能

有用於辨識難以分離之構成要素（重複的峰）。

【0131】 螢光檢測器能有用於檢測顯示如螢光或磷光般的化學發光特性之分析物。其等比UV吸光度檢測器高至少1位數的靈敏度。螢光典型而言係藉由檢測相對於激光呈90度的角度之被光柵分離的放射輻射（**emission radiation**）而被觀察。螢光物的數量可藉由使用特別試劑所溶析之化合物的管柱後衍生化（**PCD**）反應（或樣本本身的管柱前衍生化反應）而增強。

【0132】 折射率（**RI**）檢測器與幾乎所有溶質進行反應。參照移動相相對於管柱流出液之折射率的差，導致檢測出作為層析圖上的峰的經分離之構成要素的結果。因其對於移動相之極高靈敏度，此檢測器在LC泵內若沒有充分的脈衝衰減便無法使用，其因變化之移動相組成，故亦不適合梯度應用。檢測極限通常比以吸光度檢測器所觀察之檢測極限低。

【0133】 傳導率檢測器提供所有帶電物的高靈敏度檢測。為了簡單且可信賴地檢測陰離子、陽離子、金屬、有機酸及界面活性劑至ppb程度，此檢測器可與LC系統一起使用。管柱及傳導率檢測器之間的化學抑制劑的添加，發揮使溶析液的傳導率降低之作用，而能使用梯度溶析以及能在最小限度的基線漂移下做出ppb程度的確定。為了低程度的陰離子的典型的確定，溶析液被轉換成其弱離子化之低傳導率的酸（例如從 Na_2CO_3 轉換成碳酸），減少背景值雜訊。同時，分析物的陰離子被轉換成其等對應之高傳導率的酸（例如從 NaCl 轉換成 HCl ），使相對的分析物的訊號增大。

【0134】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物所含之高度不飽和脂肪酸酯的純度，相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體，為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%以上或99.5重量%以上。

【0135】 目標物的滯留時間可為約0.5分鐘～約2分鐘、約2分鐘～約4分鐘、約4分鐘～約6分鐘、約6分鐘～約8分鐘、約8分鐘～約10分鐘、約10分鐘～約12分鐘、約12分鐘～約14分鐘、約14分鐘～約16分鐘、約16分鐘～約18分鐘、約18分鐘～約20分鐘、約20分鐘～約22分鐘、約22分鐘～約24分鐘、約24分鐘～約26分鐘、約26分鐘～約28分鐘、約28分鐘～約30分鐘、約30分鐘～約32分鐘、約32分鐘～約34分鐘、約34分鐘～約36分鐘、約36分鐘～約38分鐘或者約38分鐘～約40分鐘，或大於約0.5分鐘、大於約1分鐘、大於約1.5分鐘、大於約2分鐘或者大於約5分鐘，且／或小於50分鐘、小於40分鐘、小於30分鐘或者小於20分鐘。

【0136】 在本發明的一態樣中，在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間比在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間短。在第一管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間可為約0.5分鐘～約2分鐘、約2分鐘～約4分鐘、約4分鐘～約6分鐘、約6分鐘～約8分鐘、約8分鐘～約10分鐘，或小於10分鐘、小於9分鐘、小於8分鐘、小於7分鐘、小於6分鐘、小於5分鐘、小於4分鐘、小於3

分鐘、小於2分鐘、小於1分鐘。在第二管柱層析法中之目標物的峰頂的滯留時間可為約6分鐘～約8分鐘、約8分鐘～約10分鐘、約10分鐘～約12分鐘、約12分鐘～約14分鐘、約14分鐘～約16分鐘、約16分鐘～約18分鐘、約18分鐘～約20分鐘、約20分鐘～約22分鐘、約22分鐘～約24分鐘、約24分鐘～約26分鐘、約26分鐘～約28分鐘、約28分鐘～約30分鐘、約30分鐘～約32分鐘、約32分鐘～約34分鐘、約34分鐘～約36分鐘、約36分鐘～約38分鐘或者約38分鐘～約40分鐘，或小於40分鐘、小於38分鐘、小於36分鐘、小於34分鐘、小於32分鐘、小於30分鐘、小於28分鐘、小於26分鐘、小於24分鐘、小於22分鐘、小於20分鐘、小於18分鐘、小於16分鐘、小於14分鐘、小於12分鐘、小於10分鐘、小於8分鐘。

【0137】 在本發明的一態樣中，在利用氣相層析法（GC）的分析時，可使用內部標準。為了決定分析物相對於內部標準之相對滯留時間，或為了有助於分析物的定量化，內部標準能作為參照標記被添加至樣本。內部標準能以為與目標分析物非常類似但不同的化合物例如目標分析物的氘化衍生物之方式，被本發明所屬技術領域中具有通常知識者適當選擇。被使用於定量化目的之情形，內部標準可接著將分析物的訊號相對於內部標準的訊號之比作為標準的分析物濃度的函數而進行作圖，藉此被使用於校正，於此，標準係為了使用作為對於被定量化之未知的分析物樣本的參照而被本發明所屬技術領域中具有通常知識者製備之已知的濃度的樣本。

【0138】 在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物為二十二

碳六烯酸、巴豆酸、肉豆蔻油酸、棕櫚油酸、順十六烯酸、油酸、反油酸、異油酸、鱈油酸、二十烯酸、芥酸、神經酸、亞麻油酸、二十碳二烯酸、二十二碳二烯酸、次亞麻油酸、松油酸、桐酸、二十碳三烯酸、雙同- γ -次亞麻油酸、二十碳三烯酸、十八碳四烯酸、花生四烯酸、二十碳四烯酸、二十二碳四烯酸、伯色五烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸、沙丁魚酸、二十四碳五烯酸、鯡魚酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一酸、十二酸、十三酸、十四酸、十五酸、十六酸、十七酸、十八酸、十九酸、二十酸、二十一酸、二十二酸、二十三酸、二十四酸、二十五酸、二十六酸、二十七酸、二十八酸、二十九酸、三十酸、三十一酸、三十二酸、三十三酸、三十四酸、三十五酸、三十六酸、三十七酸、三十八酸、三十九酸、四十酸或其酯，或包含其等。

【0139】 在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有大於約70%、大於約80%、大於約85%、大於約86%、大於約90%、大於約95%、大於約96.5%、大於約98%、大於約99%、大於約99.5%、大於約99.8%或大於約99.9%的純度。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有小於約100%、小於約99.9999%、小於約99.5%、小於99%、小於98.5%或小於約98%的純度。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有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%的純度。在一態樣中，可以大於50%、大於55%、

大於60%、大於65%、大於70%、大於75%或大於80%的產率獲得高度不飽和脂肪酸酯組合物。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有小於100%、小於95%、小於90%或小於80%的產率。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有50~80%、55~90%、60~90%、65~95%、70~95%、75~100%、80~100%的產率。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有大於55%、大於60%、大於65%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%、大於90%、大於95%、大於98%、大於99%或大於99.7%的回收率。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有小於100%、小於99.9999%的回收率。在一態樣中，高度不飽和脂肪酸酯組合物能具有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%的純度。

【0140】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物所含之高度不飽和脂肪酸酯為EPA酯，例如為EPA乙酯，其純度相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體為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%以上或99.5重量%以上。

【0141】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物所含之高度不飽和脂肪酸酯為DGLA

酯，例如為DGLA乙酯，其純度相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體為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%以上或99.5重量%以上的純度。

【0142】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物所含之高度不飽和脂肪酸酯為ARA酯，例如為ARA乙酯，其純度高，相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體為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%以上或99.5重量%以上。

【0143】 在本發明的一態樣中，在第二管柱層析法中所得之高度不飽和脂肪酸酯組合物以相對於高度不飽和脂肪酸酯組合物整體為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%以下或0.01重量%以下的量包含選自C18：0、C20：0、C20：1、C22：0的酯之至少一個脂肪酸酯。

【0144】 以下雖記載本發明的實施例，但本發明並不受此等任何限定。

[實施例]

【0145】 [實施例1]

在本試驗中，藉由單一串聯管柱與兩連串聯式管柱的比較，以管柱模型驗證裝載間隔的縮短。從粗純化的沙丁魚油製備包含EPA

— EE、C20：0乙酯、C20：1乙酯之樣品（製備方法係與以下實施例2同樣）。單一串聯管柱使用將內徑20mm、長度300mm、500mm及500mm的管柱串聯連接者。兩連串聯式管柱使用內徑20mm、長度300mm的第一管柱與將內徑20mm、長度500mm的兩個管柱串聯連接之第二管柱。管柱溫度設為40℃。單一串聯管柱的流速為37mL／分鐘。在兩連串聯式管柱中之第一管柱的流速為32mL／分鐘，第二管柱的流速為37mL／分鐘。固定相使用Daisopak SP-120-50-ODS-B（OSAKA SODA股份有限公司）。移動相為HPLC等級的甲醇（關東化學股份有限公司）。檢測為在230nm中之UV。

在單一串聯管柱中，EPA-EE係在從管柱層析法開始起13分鐘後開始溶析，C20：0乙酯的溶析結束時間為從EPA-EE的溶析開始起24分鐘後。

又，在兩連串聯式管柱中，第一管柱的EPA-EE溶析結束時間為從管柱層析法開始起3.5分鐘後。在第二管柱中，EPA-EE溶析開始為從管柱層析法開始起10.5分鐘後，C20：1乙酯的溶析結束時間為從EPA-EE溶析開始起12分鐘後。

【0146】 在單一串聯管柱中，離EPA-EE最遠的脂肪酸成為C20：0乙酯。又，在兩連串聯式管柱中，回收係為在第一管柱中的EPA-EE溶析結束時間之3.5分鐘為止的溶析液並裝載至第二管柱之情形，在第二管柱中離EPA-EE最遠的脂肪酸成為C20：1乙酯。由於，C20：0乙酯經由第一管柱被去除。在單一串聯管柱中，從EPA-EE溶析開始起24分鐘後，C20：0乙酯溶析結束，因此藉

由將裝載間隔設為24分鐘，前一次裝載中最後溶析之C20：0乙酯變得不會混入下一次裝載中被檢測之EPA－EE的餾分。

另一方面，在兩連串聯式管柱中，因在第二管柱中的從EPA－EE溶析開始起12分鐘後成為C20：1乙酯的溶析結束時間，故若裝載間隔為12分鐘，則前一次裝載中最後溶析之C20：1乙酯不會混入下一次裝載中被溶析之EPA－EE的餾分。

亦即，得知在單一管柱中的裝載間隔係藉由導入兩連串聯式管柱而從24分鐘縮短一半成為12分鐘，為可減少使用的溶劑的有效方法。

【0147】 [實施例2]

關於管柱層析法之條件係如同下述。所使用之HPLC設備係如同下述。泵為NP－KX500（日本精密科學股份有限公司），檢測器為S－3702（相馬光學股份有限公司）、管柱烘箱為CO705（GL Sciences股份有限公司）。所使用之ODS填充劑為Daisopak SP－120－50－ODS－B（OSAKA SODA股份有限公司）。第一管柱為內徑20mm、長度300mm，第二管柱為內徑20mm、長度1000mm。第一管柱的流速為32mL／分鐘，第二管柱的流速為37mL／分鐘。溶劑為HPLC等級的甲醇（關東化學股份有限公司）。檢測為在230nm中之UV。裝載2.4g的EPA－EE（80％）。

【0148】 如下述般製備EPA－EE（80％）。對粗純化的沙丁魚油施以短程蒸餾（SPD）。在鹼性觸媒的存在下對SPD處理油施以與乙醇的乙醇解（ethanolysis）反應，形成為魚油乙酯之EPA

—EE。將魚油乙酯藉由精密蒸餾而製備80%EPA—EE。

【0149】 首先，進行第一管柱的分餾試驗。在第一管柱中裝載2.4g的EPA—EE（80%），將餾分（Fr.0）從注入後立即分餾至UV上升為止，接著每隔10秒鐘分餾Fr.1～20，接著分餾30分鐘的Fr.29。使用真空蒸發器從經分離取出之餾分餾除甲醇，添加C23：0甲酯1mg/mL己烷溶液作為內部標準物質後，以氣相層析法（GC）進行分析。從GC峰面積及內部標準之間的面積比計算在各餾分中之化合物的溶析的量，結果EPA—EE（含量93%）的溶析開始為3分30秒，溶析結束為4分20秒，求取當時的有關物質組成。於是，確定在從管柱層析法開始起3分30秒至4分20秒之間的溶析範圍中，從第一管柱往第二管柱進行送液。

【0150】 接著，在第一管柱中裝載2.4g後，在EPA—EE93%以上的溶析範圍（3分30秒至4分20秒）中往第二管柱進行送液。在第二管柱中，將UV上升為止設為Fr.0，每隔10秒鐘分離取出Fr.1～38，接著分餾35分鐘的Fr.39。與第一管柱的分餾試驗同樣地進行GC分析，求取EPA—EE為97%以上時的有關物質組成。

【0151】 關於GC分析，所使用之條件係如同下述。設備為具有DB—WAX 30m×0.25mm×0.25 μm管柱之7890A網路GC系統（Agilent）。管柱溫度為210℃。注入溫度為250℃，分流率（split rate）為1：50，注入量為1 μL。使用250℃的FID檢測器。使用具有31cm/分鐘的線速度之氦的載體氣體。

【0152】 [表1]

EPA數據（ODS－B）

	%脂肪酸 第一管柱前	第一溶析時間[分鐘] （峰頂值）	%脂肪酸 第一管柱後	第一溶析時間比 （峰頂值）	第二溶析時間 （峰頂值）	%脂肪酸 第二管柱分離 取出	第二溶析時間比 （峰頂值）
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】 [實施例3]

關於為了DGLA濃縮所進行之管柱層析法的條件係如同下述。

管柱使用在內徑600mm的軸向壓縮管柱（axial compression column）LC－600型（栗田工業股份有限公司）中以填充壓3.5MPa將粒徑50 μm的ODS填充劑（SP－120－50－ODS－B，OSAKA SODA股份有限公司）在第一管柱中填充75kg且在第二管柱中填充115kg而成之管柱。第一管柱的管柱長為50cm，第二管柱的管柱長為80cm。移動相使用甲醇，將流速設為第一管柱、第二管柱皆為28L／分鐘。

【0154】 油脂組合物1（DGLA含量，87.7％）係如以下般製備。亦即，將在脂肪酸組合物中含有37.2重量％的DGLA之源自被孢黴屬（Mortierella）微生物的微生物油1，依循通常方法以鹼性觸媒進行乙酯化，藉由精密蒸餾而濃縮C20餾分，獲得油脂組合物1。

首先，進行第一管柱的分餾。在第一管柱中裝載油脂組合物1（DGLA含量，87.7％）8.6kg（相對於第一管柱及第二管柱的吸附材重量為4.5％），從注入結束後立即分餾餾分（Fr.1），以180

秒鐘分餾餾分 (Fr.1) , 以各餾分30秒鐘分餾Fr.2至Fr.19、以各餾分120秒鐘分餾Fr.20至Fr.33。將已分餾之各餾分1 mL分注至錐形離心管 (falcon tube) , 使用容量移液管添加1 mL的二十三烷酸甲酯 (methyl tricosanoate) 1 mg / mL己烷溶液, 再添加5 mL的5 % NaCl水溶液, 劇烈攪拌進行二層分離後, 將上層回收至GC小瓶作為GC樣本, 供至GC—FID分析。GC條件係如同下述。從GC峰面積及內部標準之間的面積比計算在各餾分中之化合物的溶析的量。

【0155】 <<GC分析條件>>

裝置：毛細管氣相層析儀GC—2025 島津製作所股份有限公司

管柱：DB—WAX (30 m×0.25 mmID, 膜厚：0.25 μm)

載體氣體：氫, 1 mL / 分鐘

分流比：1 : 30

管柱溫度：230℃ (30分鐘)

注入口溫度：250℃

檢測器種類、溫度：FID、250℃

注入量：1 μL

【0156】 其結果, 得知為在第一管柱中之目標物的DGLA的溶析開始為4.5分鐘, 溶析結束為30分鐘, 但藉由特意將往第二管柱進行送液之目標餾分 (DGLA含量, 92.7%) 的溶析開始設定成4.5分鐘、將溶析結束設定成9分鐘, 而將溶析費時之C22:0抑制成0.0%。

【0157】 接著，在第一管柱中裝載8.6kg的油脂組合物1結束後，從第一管柱往第二管柱進行送液之時間設為上述的第一管柱的分餾所特定之範圍（4.5分鐘至9分鐘）。第二管柱的溶析液的分餾係在油脂組合物1的從第一管柱往第二管柱的送液結束後立即開始，以360秒鐘分餾Fr.1，以各30秒鐘分餾Fr.2至Fr.24，以各120秒鐘分餾Fr.25至Fr.34。與第一管柱的分餾試驗同樣地進行GC分析，以在回收餾分的脂肪酸組成中DGLA成為96.5%以上之方式特定回收餾分，求取當時的回收餾分的脂肪酸組成。

【0158】 [表2]

脂肪酸	油脂組合物1	溶析時間[分鐘] (峰頂值 第一)	第一管柱分離 取出	第二管柱注入	溶析時間[分鐘] (峰頂值 第二)	第二管柱後
DGLA	87.74%	6	92.74%	同左	18	96.54%
C20：4n-6	0.66%	5.5	0.64%	同左	17.5	0.54%
C22：0	1.74%	18	0.02%	同左	—	0

【0159】 [實施例4]

關於為了ARA濃縮所進行之管柱層析法的條件係如同下述。
HPLC管柱、移動相條件使用與實施例2相同的設備條件。

【0160】 油脂組合物2（ARA含量，79.4%）係如以下般製備。亦即，將在脂肪酸組成中含有43.6重量%的ARA之源自被孢黴屬微生物的微生物油2，依循通常方法以鹼性觸媒進行乙酯化，藉由精密蒸餾而濃縮C20餾分，獲得油脂組合物2。

首先，進行第一管柱的分餾。在第一管柱中裝載油脂組合物2（ARA含量，79.4%）1.0kg（相對於第一及第二管柱的合計吸附材重量為0.55%），從注入結束後立即分餾餾分（Fr.1），以361

秒鐘分餾Fr.1，以各餾分30秒鐘分餾Fr.2至Fr.13，以各餾分300秒鐘分餾Fr.14至Fr.16，以各餾分60秒鐘分餾Fr.17起至Fr.29為止。針對已分餾之各餾分，以與實施例2相同的方法進行GC分析，求取在各餾分中之化合物的溶析的量。其結果，為第一管柱後的目標成分之ARA的溶析開始為6分鐘，溶析結束為40分鐘，但藉由特意將往第二管柱進行送液之目標餾分（ARA含量，78.9%）的溶析開始設定成6.5分鐘、將溶析結束設定成12分鐘，而將溶析費時之C22：0抑制成0.0%。

【0161】 接著，在第一管柱中裝載1.0kg的油脂組合物2結束後，從第一管柱往第二管柱進行送液之時間設為上述的第一管柱的分餾所特定之範圍（6.5分鐘至12分鐘）。第二管柱的溶析液的分餾係在油脂組合物2往第一管柱的裝載結束後開始，以1051秒鐘分餾Fr.1，以各10秒鐘分餾Fr.2至Fr.31，以各600秒鐘分餾Fr.32至Fr.33。與第一管柱的分餾試驗同樣地進行前處理，將已製備之GC樣本以下述的GC條件進行分析，以在回收餾分的脂肪酸組成中ARA成為96.5%以上之方式特定回收餾分，求取當時的回收餾分的脂肪酸組成。

【0162】 <<GC分析條件>>

裝置：毛細管氣相層析儀GC-2025 島津製作所股份有限公司

管柱：DB-WAX（30m×0.25mmID，膜厚：0.25 μm）

載體氣體：氫，31.8cm／秒鐘恆定線性速度控制

分流比：1：30

管柱溫度：210℃（30分鐘）

注入口溫度：250℃

檢測器種類、溫度：FID、250℃

注入量：1 μ L

【0163】 [表3]

脂肪酸	油脂組合物2	溶析時間[分鐘] （峰頂值 第一）	% 第一管柱後	% 第二管柱注入	溶析時間[分鐘] （峰頂值 第二）	% 第二管柱後
ARA	79.42%	8.0	78.86	同左	19.9	97.16
C18：2n－6	2.24%	8.0	2.97	同左	21.2	1.91
C18：3n－6	0.32%	7.5	0.44	同左	18.9	0.19
C18：3n－3	0.14%	7.5	0.21	同左	19.0	0.09
C22：0	0.69%	22.0	0.00	同左	—	0.00

【符號說明】

無。