

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-30685

(P2015-30685A)

(43) 公開日 平成27年2月16日(2015.2.16)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C O 7 C 67/56 (2006.01)		C O 7 C	67/56	4 H O O 6
G O 1 N 30/46 (2006.01)		G O 1 N	30/46	A
G O 1 N 30/88 (2006.01)		G O 1 N	30/88	1 O 1 K
C O 7 C 69/587 (2006.01)		G O 1 N	30/88	C
		C O 7 C	69/587	
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 16 頁)				

(21) 出願番号	特願2013-159861 (P2013-159861)	(71) 出願人	391007356
(22) 出願日	平成25年7月31日 (2013.7.31)		備前化成株式会社
			岡山県赤磐市徳富363番地
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	清水 芳雄
			岡山県赤磐市徳富363 備前化成株式会
			社内
		(72) 発明者	田畑 宏
			岡山県赤磐市徳富363 備前化成株式会
			社内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 逆相カラムを用いる擬似移動層クロマトグラフィーによる脂溶性物質の分離法およびそのための装置

(57) 【要約】

【課題】既存の不飽和脂肪酸精製法における課題を解決し、高効率の不飽和脂肪酸精製法およびそのための装置を提供すること。

【解決手段】C18カラム、C8カラム、C4カラム、および、C1カラムからなる群から選択される少なくとも2種類のカラム、好ましくは、少なくとも3本のC18カラムおよび少なくとも1本のC8カラムおよび／またはC4カラムおよび／またはC1カラムを備えるSMBクロマトグラフィーを用いる分離法および装置を提供することによって、上記課題は、解決された。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離方法であって、
ここで、該SMBクロマトグラフィーによって分離を行う装置が、以下：

- (1) 少なくとも3本のC18カラム；
- (2) C8カラム、C4カラム、およびC1カラムからなる群から選択される、少なくとも1本のカラム；ならびに、
- (3) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン；

備え、

ここで、該方法は、以下：

- (a) 溶離液を第1の循環ラインに供給する工程；
 - (a) 試料を第3の循環ラインに供給する工程；
 - (c) 第2の循環ラインおよび第4の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、
 - (d) 該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインを切り替える工程；
- を包含し、ここで、該第1の循環ラインないし該第4の循環ラインは、上流より下流に、該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインの順番に並ぶ、方法。

10

【請求項 2】

前記試料が、蒸留した試料である、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記脂溶性物質が、脂肪酸または脂肪酸誘導体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記脂溶性物質が、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、および、ドコサヘキサエン酸、ならびに、それらの低級アルコールエステルからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離方法であって、
ここで、該SMBクロマトグラフィーによって分離を行う装置が、以下：

- (1) C18カラム、C8カラム、C4カラム、および、C1カラムからなる群から選択される少なくとも2種類の、少なくとも4本のカラム；ならびに、
- (2) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン

備え、

ここで、該方法は、以下：

- (a) 溶離液を第1の循環ラインに供給する工程；
 - (a) 試料を第3の循環ラインに供給する工程；
 - (c) 第2の循環ラインおよび第4の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、
 - (d) 該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインを切り替える工程；
- を包含し、ここで、該第1の循環ラインないし該第4の循環ラインは、上流より下流に、該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインの順番に並ぶ、方法。

30

40

【請求項 6】

前記試料が、蒸留した試料である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

前記脂溶性物質が、脂肪酸または脂肪酸誘導体である、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

前記脂溶性物質が、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサ

50

ペンタエン酸、および、ドコサヘキサエン酸、ならびに、それらの低級アルコールエステルからなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離装置であって、以下：

(1) 少なくとも 3 本の C 18 カラム；

(2) C 8 カラム、C 4 カラム、および C 1 カラムからなる群から選択される、少なくとも 1 本のカラム；ならびに、

(3) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン；

備え、

ここで、該装置は、以下：

(a) 溶離液を第 1 の循環ラインに供給する工程；

(a) 原料を第 3 の循環ラインに供給する工程；

(c) 第 2 の循環ラインおよび第 4 の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、

(d) 該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインを切り替える工程；

を包含する方法によって脂溶性物質を分離し、ここで、該第 1 の循環ラインないし該第 4 の循環ラインは、上流より下流に、該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインの順番に並ぶ、装置。

【請求項 10】

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離装置であって、以下：

(1) C 18 カラム、C 8 カラム、C 4 カラム、および、C 1 カラムからなる群から選択される少なくとも 2 種類の、少なくとも 4 本のカラム；ならびに、

(2) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン

備え、

ここで、該装置は、以下：

(a) 溶離液を第 1 の循環ラインに供給する工程；

(a) 原料を第 3 の循環ラインに供給する工程；

(c) 第 2 の循環ラインおよび第 4 の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、

(d) 該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインを切り替える工程；

を包含する方法によって脂溶性物質を分離し、ここで、該第 1 の循環ラインないし該第 4 の循環ラインは、上流より下流に、該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインの順番に並ぶ、装置。

【請求項 11】

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離方法であって、

ここで、該 SMBクロマトグラフィーによって分離を行う装置が、以下：

(1) 少なくとも 2 種類の、少なくとも 4 本の逆相カラム；ならびに、

(2) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン

備え、

ここで、該方法は、以下：

(a) 溶離液を第 1 の循環ラインに供給する工程；

(a) 試料を第 3 の循環ラインに供給する工程；

(c) 第 2 の循環ラインおよび第 4 の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、

(d) 該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインを切り替える工程；

を包含し、ここで、該第 1 の循環ラインないし該第 4 の循環ラインは、上流より下流に、該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環

10

20

30

40

50

ラインの順番に並ぶ、方法。

【請求項 12】

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離装置であって、以下：

(1) 少なくとも2種類の、少なくとも4本の逆相カラム；ならびに、

(2) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン

備え、

ここで、該装置は、以下：

(a) 溶離液を第1の循環ラインに供給する工程；

(a) 原料を第3の循環ラインに供給する工程；

(c) 第2の循環ラインおよび第4の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに

10

、

(d) 該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインを切り替える工程；

を包含する方法によって脂溶性物質を分離し、ここで、該第1の循環ラインないし該第4の循環ラインは、上流より下流に、該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインの順番に並ぶ、装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C18、C8、C4、および／または、C1カラムを用いる擬似移動層クロマトグラフィーによる分離精製法ならびにそのための装置に関する。

20

【背景技術】

【0002】

不飽和脂肪酸類は、分子量、化学的性質が類似するため、相互に分離・精製することが難しい。従来より脂肪酸あるいはモノエステルの混合物から特定の脂肪酸を分離する方法としては、主として沸点の差、分子量の差、溶解度の差が利用されてきた。例えば、蒸留、分子ふるい、および、超臨界流体抽出が知られている。また二重結合数による分離法としては、ウインタリング、尿素付加、銀錯体形成、および、溶剤分別が挙げられる。

【0003】

さらに銀イオン処理樹脂やC18充填剤を用いたクロマト法などがあるが、簡便である一方で分離が不十分であったり、高度精製は可能であるものの、工業的な大量処理には不向きであるなど、それぞれ一長一短がある。以下にこれまで不飽和脂肪酸およびその誘導体の精製に用いられてきた技術の課題について記載する。代表的な分離・精製法としては、例えば、(1) 真空精密蒸留法、(2) 分子蒸留法、(3) 尿素付加法、(4) 硝酸銀処理法、(5) 固定層方式クロマトグラフィー、および、(6) 擬似移動層クロマトグラフィーが挙げられる。各方法の特徴と課題は、以下のとおりである。

30

(1) 真空精密蒸留法

特徴：各成分の沸点差を利用して分離する方法である。

課題：熱変性が有りうる。高純度品を精製する際に長時間がかかる。

(2) 分子蒸留法

特徴：蒸留の際に熱的影響が少ない。

課題：分離能が低い。

40

(3) 尿素付加法

特徴：溶解した尿素が結晶化する際に直鎖の分子を取り込みながら、六角柱状の付加物結晶を形成する性質を利用。

課題：選択性が低い。尿素付加物の派生による廃棄物処理。

(4) 硝酸銀処理法

特徴：脂肪酸の二重結合に対して硝酸銀溶液が錯体を形成する性質を利用。

課題：銀の価格が不安定。夾雑物を抱き込む。

(5) 固定層クロマトグラフィー

50

特徴：熱的影響が少ない。高精度な分離が可能。

課題：溶離液の使用量が多い。工業的な製造には向かない。

（６）擬似移動層クロマトグラフィー

特徴：溶離液の使用量が少なく、連続操作のため工業化に向いている。

課題：不飽和脂肪酸の分離によく用いられる C 1 8 充填剤が高価である。単一溶媒しか使用できないので、グラジエントで分離ができない。

【０００４】

擬似移動層（以下「SMB」ともいう）クロマトグラフィーは、従来の固定層クロマトグラフィーと異なり溶離液の使用量が少なく、連続操作が可能であることから工業的なクロマト精製によく利用されている。例えば、p-キシレンはSMBにより50万t／年製造されている。

10

【０００５】

一般的に、グラジエントを利用することによって、経時的に溶出条件を変化させることが可能であり、その結果、各成分間の分離が改善され、かつ、溶出までの時間が短縮される。しかしながらSMBクロマトグラフィーでは、単一のカラムクロマトグラフィーにおいて行われるような異なる溶媒の割合を一定時間で変化させるグラジエントを利用することができず、単一の溶離液しか利用できない。

【０００６】

エイコサペンタエン酸エチルエステル（以下EPAエチル）の精製技術として、例えば特許文献１及び２では、不飽和脂肪酸およびその誘導体の工業的に優れた精製技術としてSMBクロマトグラフィーが挙げられている。SMBクロマトグラフィーは、原料を連続的に供給しながらカラム吸着剤の層に形成される各画分の分布を定常状態に保つことにより目的成分である高度不飽和脂肪酸及びその誘導体を連続的に取り出すことができる。

20

【０００７】

高度不飽和脂肪酸及びその誘導体を分離する際に、カラム充填剤はC 1 8 シリカゲルを使用することが多いが分離性能に対して高価であり工業化において更なる性能の向上が課題となる。

【０００８】

そこで、既存の不飽和脂肪酸精製法における課題を解決し、高効率の不飽和脂肪酸精製法およびそのための装置が求められている。

30

【０００９】

また、近年、不飽和脂肪酸は必須脂肪酸としてサプリメントで注目されているだけでなく、特にEPAエチルがスイッチOTCとして閉塞性動脈硬化症、高脂血症治療薬として認可を受けたため、医薬品グレードのEPAエチルの市場が拡大している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】特表 2 0 1 3 - 5 1 6 3 9 8

【特許文献２】特開平 8 - 2 1 8 0 9 1

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

既存の不飽和脂肪酸精製法における課題を解決し、高効率の不飽和脂肪酸精製法およびそのための装置を提供することを課題とする。

【００１２】

また、高度不飽和脂肪酸及びその誘導体を分離する際に、カラム充填剤はC 1 8 シリカゲルを使用することが多いが分離性能に対して高価であることから、比較的安価な不飽和脂肪酸精製法およびそのための装置を提供すること、並びに、分離性能の向上を課題とする。

【００１３】

50

本発明は、魚油、藻類の抽出油、遺伝子組み換え植物からの抽出油などの動植物および微生物油脂由来の高度不飽和脂肪酸およびその誘導体からの精製技術、特に医薬品グレードの製品を工業的に安価に製造する方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明では、SMBクロマトグラフィーにおいて、複数種類のカラムを同時に用いることによって、上記課題が解決された。

【0015】

例えば、本発明では、SMBクロマトグラフィーにおいて、C18、C8、C4、および／または、C1カラムを用いる複数のシリカゲルカラムを4本以上用いる。溶離液としては、例えば、順層系（n-ヘキサン）を用いることができるが、これに限定されない。

10

【0016】

本発明は、例えば、以下を提供する：

（項目1）

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離方法であって、

ここで、該SMBクロマトグラフィーによって分離を行う装置が、以下：

（1）少なくとも3本のC18カラム；

（2）C8カラム、C4カラム、およびC1カラムからなる群から選択される、少なくとも1本のカラム；ならびに、

（3）カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン；

20

備え、

ここで、該方法は、以下：

（a）溶離液を第1の循環ラインに供給する工程；

（a）試料を第3の循環ラインに供給する工程；

（c）第2の循環ラインおよび第4の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、

（d）該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインを切り替える工程；

を包含し、ここで、該第1の循環ラインないし該第4の循環ラインは、上流より下流に、該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインの順番に並ぶ、方法。

30

（項目2）

前記試料が、蒸留した試料である、項目1に記載の方法。

（項目3）

前記脂溶性物質が、脂肪酸または脂肪酸誘導体である、項目1に記載の方法。

（項目4）

前記脂溶性物質が、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、および、ドコサヘキサエン酸、ならびに、それらの低級アルコールエステルからなる群から選択される、項目1に記載の方法。

（項目5）

40

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離方法であって、

ここで、該SMBクロマトグラフィーによって分離を行う装置が、以下：

（1）C18カラム、C8カラム、C4カラム、および、C1カラムからなる群から選択される少なくとも2種類の、少なくとも4本のカラム；ならびに、

（2）カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン

備え、

ここで、該方法は、以下：

（a）溶離液を第1の循環ラインに供給する工程；

（a）試料を第3の循環ラインに供給する工程；

（c）第2の循環ラインおよび第4の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに

50

、
 (d) 該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインを切り替える工程；
 を包含し、ここで、該第 1 の循環ラインないし該第 4 の循環ラインは、上流より下流に、該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインの順番に並ぶ、方法。

(項目 6)

前記試料が、蒸留した試料である、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

前記脂溶性物質が、脂肪酸または脂肪酸誘導体である、項目 5 に記載の方法。

10

(項目 8)

前記脂溶性物質が、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、および、ドコサヘキサエン酸、ならびに、それらの低級アルコールエステルからなる群から選択される、項目 5 に記載の方法。

(項目 9)

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離装置であって、以下：

(1) 少なくとも 3 本の C18 カラム；

(2) C8 カラム、C4 カラム、および C1 カラムからなる群から選択される、少なくとも 1 本のカラム；ならびに、

(3) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン；

20

備え、

ここで、該装置は、以下：

(a) 溶離液を第 1 の循環ラインに供給する工程；

(a) 原料を第 3 の循環ラインに供給する工程；

(c) 第 2 の循環ラインおよび第 4 の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、

、
 (d) 該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインを切り替える工程；

を包含する方法によって脂溶性物質を分離し、ここで、該第 1 の循環ラインないし該第 4 の循環ラインは、上流より下流に、該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインの順番に並ぶ、装置。

30

(項目 10)

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離装置であって、以下：

(1) C18 カラム、C8 カラム、C4 カラム、および、C1 カラムからなる群から選択される少なくとも 2 種類の、少なくとも 4 本のカラム；ならびに、

(2) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン

備え、

ここで、該装置は、以下：

(a) 溶離液を第 1 の循環ラインに供給する工程；

(a) 原料を第 3 の循環ラインに供給する工程；

40

(c) 第 2 の循環ラインおよび第 4 の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、

、
 (d) 該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインを切り替える工程；

を包含する方法によって脂溶性物質を分離し、ここで、該第 1 の循環ラインないし該第 4 の循環ラインは、上流より下流に、該第 1 の循環ライン、該第 2 の循環ライン、該第 3 の循環ライン、および、該第 4 の循環ラインの順番に並ぶ、装置。

(項目 11)

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離方法であって、

ここで、該 SMBクロマトグラフィーによって分離を行う装置が、以下：

50

- (1) 少なくとも2種類の、少なくとも4本の逆相カラム；ならびに、
- (2) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン

備え、

ここで、該方法は、以下：

- (a) 溶離液を第1の循環ラインに供給する工程；
- (a) 試料を第3の循環ラインに供給する工程；
- (c) 第2の循環ラインおよび第4の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、
- (d) 該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインを切り替える工程；

10

を包含し、ここで、該第1の循環ラインないし該第4の循環ラインは、上流より下流に、該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインの順番に並ぶ、方法。

(項目12)

SMBクロマトグラフィーを用いる脂溶性物質の分離装置であって、以下：

- (1) 少なくとも2種類の、少なくとも4本の逆相カラム；ならびに、
- (2) カラム間を連結する、カラム本数と同数の循環ライン

備え、

ここで、該装置は、以下：

- (a) 溶離液を第1の循環ラインに供給する工程；
- (a) 原料を第3の循環ラインに供給する工程；
- (c) 第2の循環ラインおよび第4の循環ラインより分離溶液を抜き出す工程；ならびに、
- (d) 該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインを切り替える工程；

20

を包含する方法によって脂溶性物質を分離し、ここで、該第1の循環ラインないし該第4の循環ラインは、上流より下流に、該第1の循環ライン、該第2の循環ライン、該第3の循環ライン、および、該第4の循環ラインの順番に並ぶ、装置。

【発明の効果】

【0017】

30

本発明にしたがって、高効率の不飽和脂肪酸精製法およびそのための装置が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1は、SMBクロマトグラフィーの模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

40

【0020】

（用語の定義）

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

【0021】

本明細書において使用される用語「SMBクロマトグラフィー」とは、液体クロマトグラフィーの原理を利用する分離法であって、原料中の特定の成分と、別の特定の成分に対

50

して異なる選択的吸着能力を有する吸着剤が充填された複数の単位充填層を直列に連結するとともに、最下流部の単位充填層と最上流部の単位充填層とを連結し、無端状の循環系を形成した移動層をいう。

【0022】

本明細書において使用される用語「原料の供給口」とは、SMBクロマトグラフィーに供される原料の供給口をいう。本明細書において使用される用語「成分抜き出し位置」とは、SMBクロマトグラフィーに供された溶液のカラムからの出口をいう。

【0023】

本明細書において使用される用語「上流」とは、溶離液が流れ込む側をいい、用語「下流」とは、溶離液が流れ出す側をいう。

10

【0024】

本明細書において使用される用語「循環ライン」とは、隣接するカラムを連結する部分をいう。循環ラインは、上流の成分抜き出し位置と下流の原料の供給口とを連結するか、あるいは、最下流の成分抜き出し位置と最上流の原料の供給口とを連結する。

【0025】

本明細書において使用される用語「循環ラインを切り替える」とは、上流から下流にカラムAーカラムBーカラムCーカラムDの順番で隣接する一連のカラムにおいて、カラムBの出口とカラムCの入口を連結する循環ラインを、(i)カラムAの出口とカラムBの入口を連結する循環ラインとするか、または、(i i)カラムCの出口とカラムDの入口を連結する循環ラインとするかのいずれかをいう。

20

【0026】

本明細書において使用される用語「逆相カラム」とは、移動相の極性が固定相の極性より高い分離系で使用されるカラムをいう。代表的な逆相カラムとしては、逆相シリカゲルカラムが挙げられるがこれらに限定されない。

【0027】

本明細書において使用される用語「逆相シリカゲルカラム」とは、逆相シリカゲルを担体とするクロマトグラフィーカラムをいう。代表的な逆相シリカゲルカラムとしては、C18カラム、C8カラム、C4カラム、C1カラムが挙げられるがこれらに限定されない。逆相シリカゲルカラムは脂溶性からイオン性物質まで、広い範囲の化合物の分離に応用でき、現在もっとも広く用いられている手法である。

30

【0028】

本明細書において使用される用語「C18カラム」とは、オクタデシルシリル基で表面が修飾された化学結合型多孔性球状シリカゲルを担体として使用するクロマトグラフィーカラムをいう。単にODSカラムとも称する。

【0029】

本明細書において使用される用語「C8カラム」とは、オクチル基で表面が修飾された化学結合型多孔性球状シリカゲルを担体として使用するクロマトグラフィーカラムをいう。

【0030】

本明細書において使用される用語「C4カラム」とは、ブチル基で表面が修飾された化学結合型多孔性球状シリカゲルを担体として使用するクロマトグラフィーカラムをいう。

40

【0031】

本明細書において使用される用語「C1カラム」とは、トリメチル基で表面が修飾された化学結合型多孔性球状シリカゲルを担体として使用するクロマトグラフィーカラムをいう。

【0032】

本発明において使用するSMBクロマトグラフィーは、4本以上のカラムを含む。本発明のSMBクロマトグラフィーは、好ましくは、3本以上のC18カラム、および、1本以上のC8カラムおよび／またはC4カラムおよび／またはC1カラムを備える。両者の

50

好ましい組み合わせの比率としてC 1 8 カラム：C 8 カラムおよび／またはC 4 カラムおよび／またはC 1 カラム＝3：1～1 2 が挙げられる。

【0033】

本発明のSMBクロマトグラフィーに供する原料に用いる溶媒は、カラムクロマトグラフィーに供することができる液体である限り、あらゆる純度の液体を使用してもよい。例えば、原料から抽出した液体について、真空精密蒸留、ろ過、尿素付加、硝酸銀処理、および、固定層クロマトグラフィーからなる群から選択される方法によって目的脂肪酸を一部濃縮した液体を原料として使用することができる。用いる原料は遊離型脂肪酸又はエタノールやメタノールなどの低級アルコールエステルであることが望ましい。原料が固体の場合はメタノール、エタノール、ヘキサンなどの溶媒で溶解して用いる。

10

【0034】

本願明細書で使用する場合、「真空精密蒸留」とは、EPAの場合、EPAを含む炭素鎖数が20の成分は魚油脂肪酸の中で中間の沸点に位置しており、バッチ式の場合、単塔式蒸留装置を用いる事が、連続蒸留の場合、二塔式装置ないしは四塔式装置が必要となる。二塔式であればC 1 9 以下の成分（初留）を留出させ、その残留分を第二塔に送りC 2 0 成分を（主留）を分取することをいう。

【0035】

本願明細書で使用する場合、「ろ過」とは、フィルターおよび／または吸着剤による原料の脱色や、過酸化物の除去をする方法をいう。代表的には、窒素雰囲気下で原料と吸着剤を混合・攪拌し、フィルタープレスにより吸着剤を除く方法をいう。本発明の方法においては、好ましい吸着剤としてシリカゲル、活性白土、活性炭、ゼオライトが挙げられるがこの限りではない。

20

【0036】

本願明細書で使用する場合、「尿素付加」とは、原料と尿素メタノール溶液を混合し冷却、飽和脂肪酸やモノ不飽和脂肪酸を取り込んだ尿素付加物を形成させ、これをろ別する方法をいう。代表的には、尿素付加物からn-ヘキサン抽出し、シリカゲル処理の後、n-ヘキサンを留去して目的の不飽和脂肪酸を得る方法をいう。

【0037】

本願明細書で使用する場合、「硝酸銀処理」とは、高度不飽和脂肪酸エチルの場合、原料と硝酸銀溶液を攪拌し、未反応エステルを例えばn-ヘキサン抽出した後水相を希釈または加温、遊離したエステルを再度n-ヘキサンにて抽出することにより目的の高度不飽和脂肪酸エチルの濃縮を行う方法をいう。

30

【0038】

本願明細書で使用する場合、「固定層クロマトグラフィー」とは、カラムに充填剤を詰め、原料を溶離液で通過させることにより目的の成分を含む画分を取り出し、濃縮する方法をいう。本発明の方法においては、好ましい充填剤としてシリカゲル、逆相シリカゲル、硝酸銀含浸シリカゲルが挙げられるがこの限りではない。

【0039】

本明細書において使用される用語「溶離液」とは、溶離液供給口Dを通じて供給される溶液である。使用するゲルおよび分離対象である物質に応じて、当業者は、容易に溶離液を決定することが可能である。逆相シリカゲルカラムを用いて脂溶性物質を分離する場合に使用可能な溶離液としては、極性の高い溶媒が一般的に用いられ、代表的には、水／メタノール、メタノール、エタノール、水／エタノール、水／アセトニトリル、アセトニトリル、アセトン、イソプロパノールが挙げられるがこれらに限定されない。

40

【0040】

本明細書において使用される用語「脂溶性物質」とは、n-ヘキサン又はエタノールなどの有機溶媒に溶解する化合物をいう。本発明における脂溶性物質としては、例えば、脂肪酸またはその誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。本発明における「脂溶性物質」としては、例えば、 α -リノレン酸、ステアリドン酸、ドコサペンタエン酸、エイコサペンタエン酸、および、ドコサヘキサエン酸等の ω 3系脂肪酸またはそれらの低級アル

50

コールエステル、並びに、 γ -リノレン酸、アラキドン酸等の ω 6系脂肪酸又はそれらのメタノールやエタノールの低級アルコールエステルが挙げられるがこれらに限定されない。

【0041】

本明細書において使用される用語「低級アルコールエステル」とは、脂肪酸またはその誘導体と低級アルコールとのエステルをいう。本明細書において使用される用語「低級アルコール」とは、炭素数10以下の直鎖または分岐の任意のアルコールをいう。

【0042】

(SMBクロマトグラフィー)

SMBクロマトグラフィーでは、無端状の循環系に対して原料と溶離液とを供給し、カラム内(単位充填層)を高速で移動するX成分(すなわち、弱親和性成分)と、カラム内を低速で移動するY成分(すなわち、親和性成分)とをそれぞれ異なる位置から抜き出す。そして、SMBクロマトグラフィーは、原料供給位置、溶離液供給位置、X成分抜き出し位置、およびY成分抜き出し位置を、一定の位置関係に保ちながら流体循環方向下流側に順次移動させることで、原料供給を連続的に行う処理操作を擬似的に実現する。その結果、層内での各成分の分布状態はほぼ一定の幅で移動し、各成分の抜き出し位置も、純度・濃度ともに高い部分を取り続けることが可能な操作方式である。

【0043】

例示的なSMBクロマトグラフィーを図1に示す。カラム1~4を循環ラインで接続し、各カラム間の循環ラインに原料供給口F、溶離液供給口D、親和性成分の抜出口A、弱親和性成分の抜出口Bを設け、循環する流れの方向に一定時間ごとに順次バルブを切り替えていく(すなわち、循環ラインを切り替えていく)。

【0044】

例えば、原料供給口Fから供給された原料は、溶離液供給口Dから供給された溶離液のために、カラム3からカラム2に向かって移動する。その際、弱親和性成分であるX成分は、カラムに対する親和性が弱いため、より高速でカラムを移動する。逆に、親和性成分であるY成分は、カラムに対する親和性が強いため、より低速でカラムを移動する。その結果、X成分およびY成分の両者は異なる速度で移動し、その結果、これら両者は分離されていく。X成分とY成分を連続して分離するためには、これら両者の間の位置に原料供給口Fを提供する必要がある。Y成分は、X成分よりも低速でカラムを移動するものの、溶離液供給口Dから供給された溶離液のために移動し続けるため、循環する流れの方向に一定時間ごとに順次バルブを切り替え、原料供給口FをX成分とY成分との間に維持する必要がある。すなわち、図1において一定時間経過後に、カラム4をカラム3の位置に移動させ、カラム3をカラム2の位置に移動させ、カラム2をカラム1の位置に移動させ、カラム1をカラム4の位置に移動させる(言い換えると、カラム1とカラム2を連結する循環ラインをカラム2とカラム3を連結する循環ラインに切り替え、カラム2とカラム3を連結する循環ラインをカラム3とカラム4を連結する循環ラインに切り替え、カラム3とカラム4を連結する循環ラインをカラム4とカラム1を連結する循環ラインに切り替え、カラム4とカラム1を連結する循環ラインをカラム1とカラム2を連結する循環ラインに切り替える。)。その結果、原料供給口Fは、カラム4とカラム3の間に移動し、弱親和性成分の抜出口Bは、カラム3とカラム2の間に移動し、溶離液供給口Dは、カラム2とカラム1の間に移動し、親和性成分の抜出口Aは、カラム1とカラム4の間に移動する。

【0045】

本発明のSMBクロマトグラフィーでは、4本以上のカラムを用いるが、カラムの本数は特に限定されない。好ましくは、カラムの本数は、4本、5本、6本、7本、8本、9本、10本、11本、12本、13本、14本、15本、16本、17本、18本、19本、20本であるが、これらに限定されない。カラム本数を4本よりも多くする場合、原料供給口Fと弱親和性成分の抜出口Bとの間、弱親和性成分の抜出口Bと溶離液供給口Dとの間、溶離液供給口Dと親和性成分の抜出口Aとの間、および/または、親和性成分の

拔出口 A と原料供給口 F との間に複数本のカラムを備えてもよい。

【0046】

(C18 シリカゲルについて)

脂肪酸エステル分離によく利用される C18 シリカゲルはシリカゲル表面の水酸基にオクタデシルシリル基を結合させ、炭素鎖 18 の疎水性分子を表面から伸ばした構造を取っている。この疎水性分子と各成分との間に生じる疎水性相互作用により充填剤への保持力が変化し、成分が分離される。保持の強さに関しては以下のような傾向がある。

(1) 試料分子の二重結合が少ないほど保持が強い。

(2) 試料分子の分子量が大きいほど保持が強い。

このため、特に高度不飽和脂肪酸の中でも利用価値の高いエイコサペンタエン酸 (C20 : 5) やドコサヘキサエン酸 (C22 : 6) は、天然由来の類縁物質であるエイコサテトラエン酸 (C20 : 4 ω 3) やアラキドン酸 (C20 : 4 ω 6)、ドコサペンタエン酸 (C22 : 5) などの各成分の間で分子量や二重結合数の関係から C18 シリカゲルでの分離の難易度が高い。よって従来の SMB で高純度品を得るために十分に成分を分離させる場合は、試料に対して充填剤を増やすか、試料の注入量を下げる必要がある。

【0047】

(C8、C4、C1 シリカゲルについて)

C8 及び C4 シリカゲルは C18 シリカゲルが炭素鎖 18 の疎水性分子がシリカゲルに結合しているのに対し、それぞれ炭素鎖 8、4 の疎水性分子が結合している。このため C18 シリカゲルと比較し次のような特性を持つ。

(1) 保持力が弱い。

(2) 立体選択性が小さい。

これにより C18 にはない分離パターンを示し、物質によっては C18 シリカゲルよりも良好な分離条件を与える (例 キニーネとリドカイン)。

【0048】

以下に実施例等により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0049】

(比較例 1)

比較例として、C18 シリカゲルのみを用いた結果を記載する。

【0050】

出発原料として、EPA エチルエステルを 75% 含有する油脂を使用した。原料濃度は、200 g/L (メタノール溶液) であった。原料供給量は、1 時間当り充填剤 1 L 当り 10.5 mL (10.5 mL/L-R/h) であった。充填剤は、C18 シリカゲル 4 本を用いた。カラムサイズは、直径 10 mm × 高さ 500 mm であった。溶離液としてのメタノールを、溶離液量 1 時間当り充填剤 1 L 当り 400 mL (0.40 L/L-R/h) で使用した。

【0051】

結果として得られた精製品は、EPA エチルを純度 98.3% で含んでいた。類縁物質として、以下の物質が含まれていた：

オクタデカテトラエン酸エチル：0.31%

アラキドン酸エチル：0.42%

イコサテトラエン酸エチル：0.46%

その他の不純物：0.51%。

【0052】

EPA の回収率は 89%、POV (過酸化物質価) は 1.9、AV (酸価) は 0.03、AnV (アニシジン価) は 0.5 であった。以上の結果からこの製品は医薬、化粧品、食品分野で利用可能であることが判明した。

【0053】

10

20

30

40

50

(実施例 1)

C 1 8 カラムと C 8 カラムを用いた結果は、以下のとおりである。

【0054】

出発原料は、E P A エチルエステルを 7 5 % 含有する油脂であった。原料濃度は、2 0 0 g / L (メタノール溶液) であり、原料供給量を 1 時間当り充填剤 1 L 当り 2 1 m L (2 1 m L / L - R / h) とした。使用したカラムは、C 1 8 シリカゲルのカラム 3 本と、C 8 シリカゲルカラム 1 本であった (カラムサイズ: 直径 1 0 m m × 高さ 5 0 0 m m) 。溶離液としてのメタノールを、溶離液量: 1 時間当り充填剤 1 L 当り 4 0 0 m L (0 . 4 0 L / L - R / h) で使用した。

【0055】

その結果、純度 9 8 . 3 % の E P A エチルが得られた。類縁物質として以下を含んでいた:

オクタデカテトラエン酸エチル:	0 . 2 2 %
アラキドン酸エチル:	0 . 3 2 %
イコサテトラエン酸エチル:	0 . 5 5 %
その他の不純物:	0 . 6 1 %。

【0056】

E P A の回収率は 9 2 % であり、P O V (過酸化価) は 2 . 2 であり、A V (酸価) は 0 . 0 4 であり、A n V (アニシジン価) は 0 . 6 であった。

【0057】

以上の結果から C 1 8 カラムのみを使用した比較例 1 と比較すると、原料供給量は約 2 倍まで処理可能となった。したがって、本発明では、従来より少ない充填剤量で医薬品グレードの E P A エチルを製造できることが明らかになった。

【0058】

(実施例 2)

C 1 8 カラムと C 8 カラムの比率を実施例 1 から変更して用いた結果は、以下のとおりである。

【0059】

出発原料として、E P A エチルエステルを 7 5 % 含有する油脂を使用した。原料濃度は、2 0 0 g / L (メタノール溶液) であり、原料供給量として、1 時間当り充填剤 1 L 当り 2 1 m L (2 1 m L / L - R / h) を使用した。使用したカラムは、C 1 8 シリカゲルカラム 2 本、および、C 8 シリカゲルカラム 2 本である (カラムサイズ: 直径 1 0 m m × 高さ 5 0 0 m m) 。溶離液としてのメタノールを、溶離液量: 1 時間当り充填剤 1 L 当り 4 0 0 m L (0 . 4 0 L / L - R / h) で使用した。

【0060】

その結果、純度 9 5 . 0 % の E P A エチルが得られた。類縁物質として、以下を含んでいた:

オクタデカテトラエン酸エチル:	0 . 6 0 %
アラキドン酸エチル:	0 . 8 4 %
イコサテトラエン酸エチル:	1 . 3 7 %
その他の不純物:	2 . 1 9 %

E P A の回収率は 8 0 % であり、P O V (過酸化価) は 2 . 0 であり、A V (酸価) は 0 . 0 2 であり、A n V (アニシジン価) は 0 . 7 であった。

【0061】

以上の結果から比較例 1 と比較すると純度は 3 . 3 % 低下したが、原料供給量は約 2 倍まで処理可能となった。

【0062】

(実施例 3)

C 1 8 カラムと C 4 カラムを用いた結果は、以下のとおりである。

【0063】

10

20

30

40

50

出発原料として、EPAエチルエステルを75%含有する油脂を使用した。原料濃度は、200 g/L（メタノール溶液）であり、原料供給量として、1時間当り充填剤1 L当り21 mL（21 mL/L-R/h）を使用した。使用したカラムは、C18シリカゲルカラム3本、および、C4シリカゲルカラム1本である（カラムサイズ：直径10 mm×高さ500 mm）。溶離液としてのメタノールを、溶離液量：1時間当り充填剤1 L当り400 mL（0.40 L/L-R/h）で使用した。

【0064】

その結果、純度98.2%のEPAエチルが得られた。類縁物質として、以下を含んでいた：

オクタデカテトラエン酸エチル：0.30%
アラキドン酸エチル：0.29%
イコサテトラエン酸エチル：0.44%
その他の不純物：0.77%

10

EPAの回収率は87%であり、POV（過酸化価）は2.1であり、AV（酸価）は0.03であり、AnV（アニシジン価）は0.7であった。

【0065】

以上の結果から比較例1と比較すると純度は0.1%低下したが、原料供給量は約2倍まで処理可能となった。またその他データから医薬品グレードまで精製できたことが判明した。

【0066】

20

（実施例4）

C18カラムとC4カラムの比率を実施例3から変更して用いた結果は、以下のとおりである。

【0067】

出発原料として、EPAエチルエステルを75%含有する油脂を使用した。原料濃度は、200 g/L（メタノール溶液）であり、原料供給量として、1時間当り充填剤1 L当り21 mL（21 mL/L-R/h）を使用した。使用したカラムは、C18シリカゲルカラム2本、および、C4シリカゲルカラム2本である（カラムサイズ：直径10 mm×高さ500 mm）。溶離液としてのメタノールを、溶離液量：1時間当り充填剤1 L当り400 mL（0.40 L/L-R/h）で使用した。

30

【0068】

その結果、純度98.6%のEPAエチルが得られた。類縁物質として、以下を含んでいた：

オクタデカテトラエン酸エチル：0.24%
アラキドン酸エチル：0.21%
イコサテトラエン酸エチル：0.36%
その他の不純物：0.59%

EPAの回収率は76%であり、POV（過酸化価）は2.5であり、AV（酸価）は0.03であり、AnV（アニシジン価）は0.7であった。

【0069】

40

以上の結果から比較例1と比較すると純度は0.3%上がり、原料供給量は約2倍まで処理可能となった。またその他データから医薬品グレードまで精製できたことが判明した。

【0070】

（C18シリカゲルとC8、C4、C1シリカゲルの併用について）

本発明ではSMBクロマトグラフィーに2種類以上の分離性能の異なるカラム充填剤を用いること、特に、C18カラムと、C8カラムおよび／またはC4カラムおよび／またはC1カラムとの組み合わせを用いることによって、単一種類のカラム充填剤の使用によっては分離が困難である複数の物質についても、容易かつ簡便に分離が可能となった。また、本発明では、従来のSMBクロマトグラフィーよりも高精度かつ大量に分離（例えば

50

、医薬品グレードまで精製）を行うことを可能とする。また、本発明の一つの局面においては、高精度の分離を短時間で、かつ、安価に終了することも可能である。

【0071】

理論に拘束されることは望まないが、C18シリカゲル、C8シリカゲル、C4シリカゲル、および、C1シリカゲルは、立体選択性が低いことから、成分保持力の強さは分子量よりも極性の差に依存する。このことから例を挙げるとエイコサペンタエン酸（C20：5）とエイコサテトラエン酸（C20：4 ω 3）のような分子量は同じだが、極性に差があるような成分について分離度を向上させたと考えられる。またC8、C4、C1シリカゲルは保持力が弱いことから、成分の注入から抜き出しまでの時間が短くなる。よってC18シリカゲルと比較した時の処理量が増える。これによりSMBのカラム充填剤として分離能と処理能力の最適な組み合わせを行うことで、従来のC18シリカゲルと比較して充填剤あたりの処理能力を向上させ、製造コストの低減に貢献できたと考えられる。

【0072】

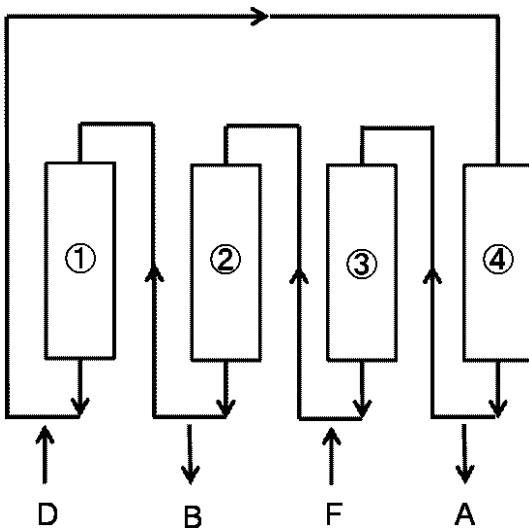
以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみ、その範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

【0073】

本発明にしたがって、高効率の不飽和脂肪酸精製法およびそのための装置が提供される。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 万倉 三正

岡山県赤磐市徳富 3 6 3 備前化成株式会社内

Fターム(参考) 4H006 AA02 AD17 BD82 KC14