

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 471**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)

C11B 7/00 (2006.01)

C11C 1/02 (2006.01)

C11C 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12735935 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2613861**

54 Título: **Proceso SMB mejorado**

30 Prioridad:

06.07.2011 GB 201111591

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.08.2015

73 Titular/es:

**BASF PHARMA (CALLANISH) LIMITED (100.0%)
PO Box 4, Earl Road, Cheadle Hulme
Cheadle, Cheshire SK8 6QG, GB**

72 Inventor/es:

**KELLIHER, ADAM;
MORRISON, ANGUS;
OROSKAR, ANIL;
NAIR REMA, RAKESH VIKRAMAN y
AGARWAL, ABHILESH**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 544 471 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso SMB mejorado

5 La presente invención se refiere a un proceso de separación cromatográfica mejorado para purificar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y derivados de los mismos. En particular, la presente invención se refiere a un proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado o real mejorado para purificar AGPI y derivados de los mismos.

10 Los ácidos grasos, en particular los AGPI, y sus derivados son precursores de moléculas biológicamente importantes, que desempeñan un papel importante en la regulación de funciones biológicas tales como la agregación plaquetaria, la inflamación y las respuestas inmunológicas. Por lo tanto, los AGPI y sus derivados pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de una amplia gama de afecciones patológicas que incluyen afecciones del SNC; neuropatías, incluyendo neuropatía diabética; enfermedades cardiovasculares; afecciones generales del sistema inmunitario e inflamatorias, incluyendo enfermedades inflamatorias cutáneas.

15 Los AGPI se encuentran en materias primas naturales, tales como aceites vegetales y aceites marinos. Dichos AGPI, no obstante, con frecuencia están presentes en dichos aceites en mezcla con ácidos grasos saturados y muchas otras impurezas. Por tanto, de forma deseable, los AGPI deben purificarse antes de sus usos nutricional o farmacéutico.

20 Desafortunadamente, los AGPI son extremadamente frágiles. De este modo, cuando se calientan en presencia de oxígeno, son propensos a la isomerización, peroxidación y oligomerización. Por lo tanto, el fraccionamiento y purificación de los productos de AGPI para preparar ácidos grasos puros es difícil. La destilación, incluso al vacío, puede dar lugar a la degradación en productos no aceptables.

25 La cromatografía de lecho móvil simulado o real son técnicas conocidas, familiares para los expertos en la materia. El principio de funcionamiento supone el movimiento a contracorriente de una fase eluyente líquida y una fase adsorbente sólida. Esta operación permite un uso mínimo de disolvente haciendo que el proceso sea económicamente viable. Dicha tecnología de separación ha encontrado diversas aplicaciones en distintas áreas, incluyendo hidrocarburos, compuestos químicos industriales, aceites, azúcares y API.

30 Como es bien sabido, en un sistema cromatográfico de lecho estacionario convencional, una mezcla cuyos componentes se deben separar se percola a través de un recipiente. El recipiente por lo general es cilíndrico, y típicamente se denomina columna. La columna contiene un relleno de un material poroso (generalmente denominado fase estacionaria) que muestra una elevada permeabilidad a los fluidos. La velocidad de percolación de cada componente de la mezcla depende de las propiedades físicas de ese componente, de modo que los componentes salen de la columna de forma sucesiva y selectiva. De este modo, algunos de los componentes tienden a fijarse fuertemente a la fase estacionaria y, por lo tanto, se percolarán lentamente, mientras que otros tienden a fijarse débilmente y salen de la columna más rápidamente. Se han propuesto muchos sistemas cromatográficos de lecho estacionario diferentes y se usan tanto para fines analíticos como de producción industrial.

35 En contraste, un sistema de lecho móvil simulado consta de una serie de columnas individuales que contienen adsorbente que están conectadas entre sí en serie. El eluyente se hace pasar a través de las columnas en una primera dirección. Los puntos de inyección de la materia prima de alimentación y el eluyente, y los puntos de recogida de los componentes separados en el sistema, se desplazan periódicamente por medio de una serie de válvulas. El efecto global es simular el funcionamiento de una sola columna que contiene un lecho móvil de adsorbente sólido, moviéndose el adsorbente sólido en una dirección a contracorriente del flujo de eluyente. De este modo, un sistema de lecho móvil simulado consta de columnas que, como en un sistema de lecho estacionario convencional, contienen lechos estacionarios de adsorbente sólido a través de los cuales se hace pasar al eluyente, pero en un sistema de lecho móvil simulado el funcionamiento es tal que simula un lecho móvil continuo a contracorriente.

40 Los procesos y el equipo para cromatografía de lecho móvil simulado se describen en varias patentes, incluyendo los documentos US 2.985.589, US 3.696.107, US 3.706.812, US 3.761.533, FR-A-2103302, FR-A-26 1148 y FR-A-26 1149. El tema también se trata en profundidad en el documento "Preparative and Production Scale Chromatography", editado por Ganetsos and Barker, Marcel Dekker Inc, Nueva York, 1993.

45 El documento WO-A-2007/073499 describe un método de preparación de composiciones enriquecidas en compuestos que contienen cadenas de carbono de grados de insaturación variables usando cromatografía de argentación.

50 El documento US-A-5719302 describe procesos para fraccionamiento cromatográfico de composiciones que comprenden ácidos grasos poliinsaturados o derivados de los mismos

55 Un sistema de lecho móvil real es similar en funcionamiento a un sistema de lecho móvil simulado. Sin embargo, en lugar de desplazar los puntos de inyección de la mezcla de alimentación y el eluyente, y los puntos de recogida del

componente separado por medio de un sistema de válvulas, en su lugar una serie de unidades de adsorción (es decir columnas) se mueven físicamente con respecto a los puntos de alimentación y extracción. De nuevo, el funcionamiento es tal que simula un lecho móvil continuo a contracorriente.

5 Los procesos y el equipo para cromatografía de lecho móvil real se describen en varias patentes, incluyendo los documentos US 6.979.402, US 5.069.883 y US 4.764.276.

10 La purificación de productos de AGPI es particularmente desafiante. De este modo, muchas materias primas de alimentación adecuadas para preparar productos de AGPI son mezclas extremadamente complejas que contienen un gran número de diferentes componentes con tiempos de retención muy similares en aparatos de cromatografía. Por lo tanto, es muy difícil separar ciertos AGPI de dichas materias primas de alimentación. Sin embargo, se requiere un alto grado de pureza de productos de AGPI, particularmente para aplicaciones farmacéuticas y nutracéuticas. Históricamente, por lo tanto, se ha usado la destilación cuando se requieren productos de AGPI de alta pureza. Existen, sin embargo, desventajas significativas del uso de destilación como técnica de separación para AGPI delicados tal como se ha descrito anteriormente.

20 Hasta ahora, no se ha puesto a disposición ninguna técnica cromatográfica para conseguir productos de AGPI de alta pureza, por ejemplo mayor del 95 o el 97% de pureza, en particular a partir de materias primas de alimentación disponibles en el mercado tales como aceites de pescado.

25 Un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado típico se ilustra con referencia a la figura 1. El concepto de un proceso de separación cromatográfica de lecho móvil simulado o real se explica considerando una columna cromatográfica vertical que contiene fase estacionaria S dividida en secciones, más exactamente en cuatro subzonas superpuestas I, II, III y IV que van desde la parte inferior hasta la parte superior de la columna. El eluyente se introduce en la parte inferior en IE por medio de una bomba P. La mezcla de los componentes A y B que deben separarse se introduce en IA + B entre la subzona II y la subzona III. Un extracto que contiene principalmente B se recogen en SB entre la subzona I y la subzona II, y se recoge un refinado que contiene principalmente A en SA entre la subzona III y la subzona IV.

30 En el caso de un sistema de lecho móvil simulado, un movimiento hacia abajo simulado de la fase estacionaria S es causado por el movimiento de los puntos de introducción y recogida con respecto a la fase sólida. En el caso de un sistema de lecho móvil real, un movimiento hacia abajo simulado de la fase estacionaria S es causado por el movimiento de las diversas columnas cromatográficas con respecto a los puntos de introducción y recogida. En la figura 1, el eluyente fluye hacia arriba y la mezcla A + B es inyectada entre la subzona II y la subzona III. Los componentes se moverán de acuerdo con sus interacciones cromatográficas con la fase estacionaria, por ejemplo adsorción sobre un medio poroso. El componente B que muestra una afinidad más fuerte por la fase estacionaria (el componente que avanza más lentamente) será arrastrado más lentamente por el eluyente y le seguirá con retraso. El componente A que muestra la afinidad más débil por la fase estacionaria (el componente que avanza más rápido) será arrastrado fácilmente por el eluyente. Si el conjunto correcto de parámetros, especialmente el caudal en cada subzona, están correctamente estimados y controlados, el componente A que muestra la afinidad más débil por la fase estacionaria se recogerá entre la subzona III y la subzona IV como un refinado y el componente B que muestra la afinidad más fuerte por la fase estacionaria se recogerá entre la subzona I y la subzona II como un extracto.

45 Se apreciará, por lo tanto, que el sistema de lecho móvil simulado convencional ilustrado esquemáticamente en la figura 1 está limitado a fraccionamiento binario.

50 Por consiguiente, existe una necesidad de un proceso de separación cromatográfica de lecho móvil simulado o real que pueda separar AGPI o sus derivados de componentes que avanzan tanto rápido como lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares), para producir productos de AGPI de alta pureza a partir de materias primas de alimentación disponibles en el mercado tales como aceites de pescado. Es deseable, además, que el proceso deba implicar eluyentes económicos que funcionan en condiciones estándar de presión y temperatura.

Sumario de la invención

55 Ahora se ha descubierto sorprendentemente que un producto de AGPI puede purificarse eficazmente a partir de materias primas de alimentación disponibles en el mercado tales como aceites de pescado mediante un aparato de lecho móvil simulado o real usando un eluyente disolvente orgánico acuoso. La presente invención proporciona, por lo tanto, un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácido graso poliinsaturado (AGPI) de una mezcla de alimentación, proceso que comprende las etapas de:

- 60 (i) purificar la mezcla de alimentación en una primera etapa de separación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener un producto intermedio; y
- 65 (ii) purificar el producto intermedio obtenido en (i) en una segunda etapa de separación usando un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener el producto de AGPI; en el que

(a) las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, siendo el producto intermedio recuperado entre las primera y segunda etapas de separación y estando las condiciones del proceso en el aparato de cromatografía ajustadas entre las primera y segunda etapas de separación de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; o

(b) las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en primer y segundo aparatos de cromatografía independientes respectivamente, siendo el producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación introducido en el segundo aparato de cromatografía, y siendo el producto de AGPI separado de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; y

en el que (1) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y/o

(2) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y/o

(3) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación; y/o

(4) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación, y en el que (I) el caudal al cual el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y refinado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI pueda separarse de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; y/o (II) el caudal al cual el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y refinado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI pueda separarse de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación

También se describe un producto de AGPI obtenible mediante el proceso de la presente invención.

Los productos de AGPI producidos mediante el proceso de la presente invención se producen con alto rendimiento, y tienen alta pureza. Además, el contenido de las impurezas características que típicamente surgen de la destilación de AGPI es muy bajo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "impurezas isoméricas" se usa para indicar aquellas impurezas típicamente producidas durante la destilación de aceites naturales que contienen AGPI. Esto incluyen isómeros, productos de peroxidación y oligomerización de AGPI.

Descripción de las figuras

La figura 1 ilustra los principios básicos de un proceso de lecho móvil simulado o real para separar una mezcla binaria.

La figura 2 ilustra una primera realización preferida de la invención que es adecuada para separar EPA de componentes que avanzan más rápida y más lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares).

La figura 3 ilustra una segunda realización preferida de la invención que es adecuada para separar DHA de componentes que avanzan más rápida y más lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares).

La figura 4 ilustra con más detalle la primera realización preferida de la invención que es adecuada para separar EPA de componentes que avanzan más rápida y más lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares).

La figura 5 ilustra con más detalle la segunda realización preferida de la invención que es adecuada para separar DHA de componentes que avanzan más rápida y más lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares).

La figura 6 ilustra con más detalle un método alternativo para la primera realización preferida de la invención que es adecuada para separar EPA de componentes que avanzan más rápida y más lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares).

La figura 7 ilustra con más detalle un método alternativo para la segunda realización preferida de la invención que es adecuada para separar DHA de componentes que avanzan más rápida y más lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares).

La figura 8 ilustra una realización particularmente preferida de la invención para purificar EPA de componentes que avanzan más rápida y más lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares).

La figura 9 ilustra un método alternativo para una realización particularmente preferida de la invención para purificar EPA de componentes que avanzan más rápida y más lentamente (es decir impurezas más polares y menos polares).

5 La figura 10 ilustra tres maneras en las que puede llevarse a cabo el proceso de separación cromatográfica de la invención.

La figura 11 muestra un análisis por GC de una materia prima de alimentación rica en EPA que puede usarse adecuadamente como la mezcla de alimentación en el proceso de la presente invención.

10 La figura 12 muestra un análisis por GC del producto intermedio de refinado obtenido en la primera etapa de separación de un proceso de acuerdo con la presente invención.

15 La figura 13 muestra un análisis por GC del producto final de EPA procedente de la segunda etapa de separación de un proceso de acuerdo con la presente invención.

La figura 14 muestra un análisis por GC del producto final de EPA procedente de la segunda etapa de separación de un proceso de acuerdo con la presente invención.

20 La figura 15 muestra una huella de GC FAMES de un producto de DHA producido por SMB.

La figura 16 muestra una huella de GC FAMES de un producto de DHA producido por destilación.

25 Descripción detallada de la invención

El proceso de separación cromatográfica de la invención es típicamente diferente de un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácido graso poliinsaturado (AGPI), de una mezcla de alimentación, proceso que comprende introducir la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un alcohol acuoso, en el que el aparato tiene una pluralidad de zonas que comprenden al menos una primera zona y una segunda zona, teniendo cada zona una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas, y en el que (a) una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares se recoge de una columna en la primera zona y se introduce en una columna no adyacente en la segunda zona, y/o (b) una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares se recoge de una columna en la segunda zona y se introduce en una columna no adyacente en la primera zona, siendo dicho producto de AGPI separado de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada zona.

40 Tal como se usa en el presente documento en esta realización, el término "zona" se refiere a una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un alcohol acuoso, y que tienen uno o más puntos de inyección para una corriente de mezcla de alimentación, uno o más puntos de inyección para agua y/o alcohol, una corriente de extracción de refinado a partir de la cual puede recogerse líquido procedente de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas, y una corriente de extracción de extracto a partir de la cual puede recogerse líquido procedente de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas. Típicamente, cada zona tiene solamente un punto de inyección para una mezcla de alimentación. En una realización, cada zona tiene solamente un punto de inyección para el eluyente de alcohol acuoso. En otra realización, cada zona tiene dos o más puntos de inyección para agua y/o alcohol.

50 Detalles adicionales de esta realización se encontrarán en la solicitud de patente internacional nº PCT/GB 10/002339. El proceso de separación cromatográfica de la invención es típicamente diferente de los procesos desvelados en el documento PCT/GB 10/002339.

55 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "producto de AGPI" se refiere a un producto que comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), y/o derivados de los mismos, típicamente de importancia nutricional o farmacéutica. Típicamente, el producto de AGPI es un único AGPI o derivado del mismo. Como alternativa, el producto de AGPI es una mezcla de dos o más AGPI o derivados de los mismos, por ejemplo dos.

60 La expresión "ácido graso poliinsaturado" (AGPI) se refiere a ácidos grasos que contienen más de un doble enlace. Dichos AGPI son bien conocidos por el experto en la materia. Tal como se usa en el presente documento, un derivado de AGPI es un AGPI en forma de un mono-, di- o triglicérido, éster, fosfolípido, amida, lactona o sal. Se prefieren triglicéridos y ésteres. Se prefieren más ésteres. Los ésteres son típicamente ésteres alquílicos, preferentemente ésteres alquílicos de C₁-C₆, más preferentemente ésteres alquílicos de C₁-C₄. Los ejemplos de ésteres incluyen ésteres metílicos y etílicos. Los ésteres etílicos son los que más se prefieren.

65

Típicamente, el producto de AGPI comprende al menos un AGPI ω -3 o ω -6, preferentemente al menos un AGPI ω -3. Los ejemplos de AGPI ω -3 incluyen ácido alfa-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido eicosatrienoico (ETE), ácido eicosatetraenoico (ETA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Se prefieren SDA, EPA, DPA y DHA. Se prefieren más EPA y DHA. Los ejemplos de AGPI ω -6 incluyen ácido linoleico (LA), ácido gamma-linolénico (GLA), ácido eicosadienoico, ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), ácido araquidónico (ARA), ácido docosadienoico, ácido adrenico y ácido docosapentaenoico (ω -6). Se prefieren LA, ARA, GLA y DGLA.

En una realización, el producto de AGPI es EPA y/o éster etílico (EE) del EPA

En otra realización, el producto de AGPI es DHA y/o éster etílico (EE) del DHA.

En una realización adicional más, el producto de AGPI es una mezcla de EPA y DHA y/o EE del EPA y EE del DHA.

En una realización la más preferida, el producto de AGPI es EPA o éster etílico del EPA que se produce a más del 90% de pureza, preferentemente más del 95% de pureza, y más preferentemente más del 97% de pureza.

Típicamente, además de dicho producto de AGPI, se recoge un producto de AGPI secundario adicional en el proceso de separación cromatográfica de la invención. Preferentemente, el producto de AGPI es EPA y el producto de AGPI secundario adicional es DHA.

En una realización adicional de la invención, el aparato está configurado para recoger un producto de AGPI que es una mezcla concentrada de EPA y DHA. De este modo, se usa una mezcla de alimentación que contiene EPA, DHA, componentes que son más polares que EPA y DHA, y componentes que son menos polares que EPA y DHA. En la primera etapa de separación, el material menos polar que EPA y DHA se retira típicamente. En la segunda etapa de separación, el material que es más polar que EPA y DHA se retira típicamente, y una mezcla concentrada de EPA y DHA se recoge como el producto de AGPI.

Mezclas de alimentación adecuadas para fraccionamiento mediante el proceso de la presente invención pueden obtenerse de fuentes naturales que incluyen aceites y grasas vegetales y animales, y de fuentes sintéticas que incluyen aceites obtenidos de plantas, animales y microorganismos incluyendo levaduras modificadas genéticamente. Los ejemplos incluyen aceites de pescado, aceites de algas y microalgas y aceites vegetales, por ejemplo aceite de borraja, aceite de *Echium* y aceite de onagra. En una realización, la mezcla de alimentación es un aceite de pescado. En otra realización, la mezcla de alimentación es un aceite de algas. Los aceites de algas son particularmente adecuados cuando el producto de AGPI deseado es EPA y/o DHA. El aceite de cártamo genéticamente modificado es particularmente adecuado cuando el producto de AGPI deseado es GLA. Levadura genéticamente modificada es particularmente adecuada cuando el producto de AGPI deseado es EPA.

En una realización particularmente preferida, la mezcla de alimentación es un aceite de pescado o materia prima de alimentación derivada de aceite de pescado. Se ha descubierto ventajosamente que, cuando se usa un aceite de pescado o materia prima de alimentación derivada de aceite de pescado, puede producirse un producto de AGPI de EPA o éster etílico del EPA mediante el proceso de la presente invención con más del 90% de pureza, preferentemente más del 95% de pureza, y más preferentemente más del 97% de pureza.

La mezcla de alimentación puede someterse a tratamiento químico antes de fraccionamiento mediante el proceso de la invención. Por ejemplo, puede someterse a transesterificación con glicéridos o hidrólisis de glicéridos seguida en algunos casos mediante procesos selectivos tales como cristalización, destilación molecular, fraccionamiento con urea, extracción con nitrato de plata u otras soluciones de sales metálicas, yodolactonización o fraccionamiento con fluido supercrítico. Como alternativa, una mezcla de alimentación puede usarse directamente sin ninguna etapa de tratamiento inicial.

Las mezclas de alimentación típicamente contienen el producto de AGPI y al menos un componente más polar y al menos un componente menos polar. Los componentes menos polares tienen una adherencia más fuerte al adsorbente usado en el proceso de la presente invención que la del producto de AGPI. Durante el funcionamiento, dichos componentes menos polares típicamente se mueven con la fase adsorbente sólida en preferencia con respecto a la fase eluyente líquida. Los componentes más polares tienen una adherencia más débil al adsorbente usado en el proceso de la presente invención que la del producto de AGPI. Durante el funcionamiento, dichos componentes más polares típicamente se mueven con la fase eluyente líquida en preferencia con respecto a la fase adsorbente sólida. En general, los componentes más polares se separarán en una corriente de refinado, y los componentes menos polares se separarán en una corriente de extracto.

Los ejemplos de los componentes más y menos polares incluyen (1) otros compuestos que se producen en aceites naturales (por ejemplo aceites marinos o aceites vegetales), (2) subproductos formados durante las etapas de almacenamiento, refinado y concentración previa y (3) contaminantes procedentes de disolventes o reactivos que se utilizan durante etapas previas de concentración o purificación.

Los ejemplos de (1) incluyen otros AGPI no deseados; ácidos grasos saturados; esteroides, por ejemplo colesterol; vitaminas; y contaminantes medioambientales, tales como policlorobifenilo (PCB), pesticidas de hidrocarburo poliaromático (PAH), pesticidas clorados, dioxinas y metales pesados. PCB, PAH, dioxinas y pesticidas clorados son todos componentes altamente no polares.

5 Los ejemplos de (2) incluyen isómeros y productos de oxidación o descomposición del producto de AGPI, por ejemplo, productos poliméricos de autooxidación de ácidos grasos o sus derivados.

10 Los ejemplos de (3) incluyen urea que puede añadirse para eliminar ácidos grasos saturados o monoinsaturados de la mezcla de alimentación.

Preferentemente, la mezcla de alimentación es un aceite marino que contiene AGPI (por ejemplo un aceite de pescado), más preferentemente un aceite marino (por ejemplo un aceite de pescado) que comprende EPA y/o DHA.

15 Una mezcla de alimentación típica para preparar (EE del) EPA concentrado mediante el proceso de la presente invención comprende el 50-75% de (EE del) EPA, del 0 al 10% de (EE del) DHA, y otros componentes incluyendo otros ácidos grasos ω -3 y ω -6 esenciales.

20 Una mezcla de alimentación preferida para preparar (EE del) EPA concentrado mediante el proceso de la presente invención comprende el 55% de (EE del) EPA, el 5% de (EE del) DHA, y otros componentes incluyendo otros ácidos grasos ω -3 y ω -6 esenciales. (EE del) DHA es menos polar que (EE del) EPA.

25 Una mezcla de alimentación típica para preparar (EE del) DHA concentrado mediante el proceso de la presente invención comprende el 50-75% (EE del) DHA, del 0 al 10% de (EE del) EPA, y otros componentes incluyendo otros ácidos grasos ω -3 y ω -6 esenciales.

30 Una mezcla de alimentación preferida para preparar (EE del) DHA concentrado mediante el proceso de la presente invención comprende el 75% (EE del) DHA, el 7% (EE del) EPA y otros componentes incluyendo otros ácidos grasos ω -3 y ω -6 esenciales. (EE del) EPA es más polar que (EE del) DHA.

Una mezcla de alimentación típica para preparar una mezcla concentrada de (EE del) EPA y (EE del) DHA mediante el proceso de la presente invención comprende más del 33% de (EE del) EPA, y más del 22% de (EE del) DHA.

35 Cada etapa de separación del proceso de la presente invención se lleva a cabo en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real.

40 Cualquier aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real conocido puede utilizarse para los fines del método de la presente invención, siempre que el aparato se use de acuerdo con el proceso de la presente invención. Aquellos aparatos descritos en los documentos US 2.985.589, US 3.696.107, US 3.706.812, US 3.761.533, FR-A-2103302, FR-A-2651148, FR-A-2651149, US 6.979.402, US 5.069.883 y US 4.764.276 pueden usarse todos si se configuran de acuerdo con el proceso de la presente invención.

45 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real" típicamente se refiere a una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, y que tienen uno o más puntos de inyección para una corriente de mezcla de alimentación, uno o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico, una corriente de extracción de refinado a partir de la cual puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas, y una corriente de extracción de extracto a partir de la cual puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas.

50 El aparato de cromatografía usado en cada etapa del proceso de la presente invención tiene una única agrupación de columnas de cromatografía unidas en serie que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso. Típicamente, cada una de las columnas de cromatografía está unida a las dos columnas en el aparato adyacentes a esa columna. De este modo, la salida de una columna dada en la agrupación está conectada a la entrada de la columna adyacente en la agrupación, que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en la agrupación. De este modo, el eluyente puede fluir alrededor de la agrupación de columnas de cromatografía unidas. Típicamente, ninguna de las columnas de cromatografía está unida a columnas no adyacentes en el aparato.

60 Tal como se usa en el presente documento la expresión "no adyacente" se refiere a columnas, en por ejemplo el mismo aparato, separadas por una o más columnas, preferentemente 3 o más columnas, más preferentemente 5 o más columnas, de la forma más preferente aproximadamente 5 columnas.

65 Típicamente, cada aparato tiene solamente un punto de inyección para una mezcla de alimentación. En una realización, cada aparato tiene solamente un punto de inyección para el eluyente disolvente orgánico acuoso. En otra realización, cada aparato tiene dos o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico.

El término “refinado” es bien conocido por el experto en la materia. En el contexto de cromatografía de lecho móvil real y simulado se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase eluyente líquida en comparación con la fase adsorbente sólida. De este modo, una corriente de refinado está típicamente enriquecida con componentes más polares, y empobrecida en componentes menos polares en comparación con una corriente de alimentación.

El término “extracto” es bien conocido por el experto en la materia. En el contexto de cromatografía de lecho móvil real y simulado se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase adsorbente sólida en comparación con la fase eluyente líquida. De este modo, una corriente de extracto está típicamente enriquecida en componentes menos polares, y empobrecida en componentes más polares en comparación con una corriente de alimentación.

El número de columnas usadas en cada aparato no está particularmente limitado. Un experto en la materia sería capaz fácilmente de determinar un número de apropiado de columnas a usar. El número de columnas es típicamente 4 o más, preferentemente 6 o más, más preferentemente 8 o más, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 columnas. En una realización preferida, se usan 5 ó 6 columnas, más preferentemente 6 columnas. En otra realización preferida, se usan 7 u 8 columnas, más preferentemente 8 columnas. Típicamente, no hay más de 25 columnas, preferentemente no más de 20, más preferentemente no más de 15.

Los aparatos cromatográficos usados en las primera y segunda etapas de separación típicamente contienen el mismo número de columnas. Para algunas aplicaciones, puede haber diferentes números de columnas.

Las dimensiones de las columnas usadas en el aparato no están particularmente limitadas, y dependerán del volumen de mezcla de alimentación a purificar. Un experto en la materia sería capaz fácilmente de determinar columnas de un tamaño apropiado a usar. El diámetro de cada columna está típicamente entre 10 y 1000 mm, preferentemente entre 10 y 500 mm, más preferentemente entre 25 y 250 mm, aún más preferentemente entre 50 y 100 mm, y de la forma más preferente entre 70 y 80 mm. La longitud de cada columna está típicamente entre 10 y 300 cm, preferentemente entre 10 y 200 cm, más preferentemente entre 25 y 150 cm, aún más preferentemente entre 70 y 110 cm, y de la forma más preferente entre 80 y 100 cm.

Las columnas en los aparatos cromatográficos usados en las primera y segunda etapas de separación típicamente tienen dimensiones idénticas pero pueden tener, para algunas aplicaciones, diferentes dimensiones.

Los caudales a la columna están limitados por presión máximas a través de la serie de columnas y dependerán de las dimensiones de la columna y el tamaño de partículas de las fases sólidas. Un experto en la materia será capaz fácilmente de establecer el caudal requerido para cada dimensión de columna para garantizar desorción eficiente. Columnas de diámetro más grande necesitarán en general flujos más elevados para mantener el flujo lineal a través de las columnas.

Para los tamaños de columna típicos perfilados anteriormente, típicamente el caudal de eluyente al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es de 1 a 4,5 l/min, preferentemente de 1,5 a 2,5 l/min. Típicamente, el caudal del extracto procedente del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es de 0,1 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,5 a 2,25 l/min. En realizaciones donde parte del extracto procedente de la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación, el caudal de recirculación es típicamente de 0,7 a 1,4 l/min, preferentemente aproximadamente 1 l/min. Típicamente, el caudal del refinado procedente del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es de 0,2 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,3 a 2,0 l/min. En realizaciones donde parte del refinado procedente de la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación, el caudal de recirculación es típicamente de 0,3 a 1,0 l/min, preferentemente aproximadamente 0,5 l/min. Típicamente, el caudal de introducción de la mezcla de alimentación en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es de 5 a 150 ml/min, preferentemente de 10 a 100 ml/min, más preferentemente de 20 a 60 ml/min.

Para los tamaños de columna típicos perfilados anteriormente, típicamente el caudal de eluyente al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es de 1 a 4 l/min, preferentemente de 1,5 a 3,5 l/min. Típicamente, el caudal del extracto procedente del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es de 0,5 a 2 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,9 l/min. En realizaciones donde parte del extracto procedente de la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación, el caudal de recirculación es típicamente de 0,6 a 1,4 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,1 l/min, más preferentemente aproximadamente 0,9 l/min. Típicamente, el caudal del refinado procedente del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es de 0,5 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,8 l/min, más preferentemente aproximadamente 1,4 l/min. En realizaciones donde parte del refinado procedente de la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación, el caudal de recirculación es típicamente de 0,3 a 1,0 l/min, preferentemente aproximadamente 0,5 l/min.

Como apreciará el experto en la materia, las referencias a caudales a los que se recoge o elimina líquido mediante las diversas corrientes de extracto y refinado se refieren a volúmenes de líquido eliminados en una cantidad de tiempo, típicamente l/minuto. Análogamente, las referencias a los caudales a los que se recircula de vuelta líquido al interior de un aparato, típicamente a una columna adyacente en el aparato, se refieren a volúmenes de líquido recirculados en una cantidad de tiempo, típicamente l/minuto.

El tiempo de etapa, es decir el tiempo entre el desplazamiento de los puntos de inyección de la mezcla de alimentación y eluyente, y los diversos puntos de extracción de las fracciones recogidas, no está particularmente limitado, y dependerá del número y las dimensiones de las columnas usadas, y el caudal a través del aparato. Un experto en la materia sería capaz fácilmente de determinar tiempos de etapa apropiados para usar en el proceso de la presente invención. El tiempo de etapa es típicamente de 100 a 1000 segundos, preferentemente de 200 a 800 segundos, más preferentemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 750 segundos. En algunas realizaciones, un tiempo de etapa de 100 a 400 segundos, preferentemente 200 a 300 segundos, más preferentemente aproximadamente 250 segundos, es apropiado. En otras realizaciones, un tiempo de etapa de 600 a 900 segundos, preferentemente 700 a 800 segundos, más preferentemente aproximadamente 750 segundos es apropiado.

En el proceso de la presente invención, se prefiere cromatografía de lecho móvil real.

Pueden usarse adsorbentes convencionales conocidos en la técnica para sistemas de lecho móvil real y simulado en el proceso de la presente invención. Cada columna cromatográfica puede contener el mismo o un adsorbente diferente. Típicamente, cada columna contiene el mismo adsorbente. Los ejemplos de dichos materiales usados habitualmente son perlas poliméricas, preferentemente poliestireno reticulado con DVB (divinilbenceno); y gel de sílice, preferentemente gel de sílice de fase inversa unida a alcanos C8 o C18, especialmente C18. El gel de sílice de fase inversa unido a C18 se prefiere. El adsorbente usando en el proceso de la presente invención es preferentemente no polar.

La forma del material de fase estacionaria adsorbente puede ser, por ejemplo, perlas esféricas o no esféricas, preferentemente perlas sustancialmente esféricas. Dichas perlas típicamente tienen un diámetro de 5 a 500 micrómetros, preferentemente 10 a 500 micrómetros, más preferentemente 15 a 500 micrómetros, más preferentemente 40 a 500 micrómetros, más preferentemente 100 a 500 micrómetros, más preferentemente 250 a 500 micrómetros, aún más preferentemente 250 a 400 micrómetros, de la forma más preferente 250 a 350 micrómetros. En algunas realizaciones, pueden usarse perlas con un diámetro de 5 a 35 micrómetros, típicamente 10 a 30 micrómetros, preferentemente 15 a 25 micrómetros. Algunos tamaños de partícula preferidos son algo más grandes que los tamaños de partícula de perlas usadas en el pasado en procesos de lecho móvil simulado y real. El uso de partículas más grandes permite que se use una presión de eluyente más baja en el sistema. Esto, a su vez, tiene ventajas en términos de ahorros de costes, eficiencia y vida útil del aparato. Se ha descubierto sorprendentemente que pueden usarse perlas adsorbentes de gran tamaño de partícula en el proceso de la presente invención (con sus ventajas asociadas) sin ninguna pérdida de resolución.

El adsorbente típicamente tiene un tamaño de poro de 10 a 50 nm, preferentemente 15 a 45 nm, más preferentemente 20 a 40 nm, de la forma más preferente 25 a 35 nm.

Típicamente, el proceso de la presente invención se realiza a de 15 a 55°C, preferentemente a de 20 a 40°C, más preferentemente a aproximadamente 30°C. De este modo, el proceso se lleva a cabo típicamente a temperatura ambiente, pero pueden realizarse a temperaturas elevadas.

El proceso de la presente invención comprende una primera y una segunda etapa de separación.

Estas dos etapas pueden llevarse a cabo fácilmente en un único aparato cromatográfico. De este modo, en una realización, (a) las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, siendo el producto intermedio recuperado entre las primera y segunda etapas de separación y siendo las condiciones del proceso en el aparato de cromatografía ajustadas entre las primera y segunda etapas de separación de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación. Una realización preferida de este proceso de separación se muestra como la figura 10a. De este modo, la primera etapa de separación (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato de SMB que tiene 8 columnas. Entre las primera y segunda etapas de separación el producto intermedio se recupera en, por ejemplo, un recipiente, las condiciones del proceso en el aparato de cromatografía se ajustan de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación. La segunda etapa de separación (lado derecho) se lleva a cabo entonces en el mismo aparato de SMB que tiene 8 columnas.

En la realización (a), ajustar las condiciones del proceso típicamente se refiere a ajustar las condiciones del proceso en el aparato como un todo, es decir modificar físicamente el aparato de modo que las condiciones sean diferentes. No se refiere a reintroducir simplemente el producto intermedio de vuelta en una parte diferente del mismo aparato donde podría ocurrir que las condiciones del proceso fueran diferentes.

Como alternativa, pueden usarse primer y segundo aparatos cromatográficos independientes en las primera y segunda etapas de separación. De este modo, en otra realización, (b) las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en primer y segundo aparatos de cromatografía independientes respectivamente, siendo el producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación introducido en el segundo aparato de cromatografía, y siendo el producto de AGPI separado de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

En la realización (b), las dos etapas de separación pueden llevarse a cabo secuencial o simultáneamente.

De este modo, en la realización (b) en el caso donde las dos etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente, las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en primer y segundo aparatos de cromatografía independientes respectivamente, siendo el producto intermedio recuperado entre las primera y segunda etapas de separación y siendo las condiciones del proceso en los primer y segundo aparatos de cromatografía ajustadas de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación. Una realización preferida de este proceso de separación se muestra como la figura 10b. De este modo, la primera etapa de separación (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato de SMB que tiene 8 columnas, del uno al ocho. Entre las primera y segunda etapas de separación, el producto intermedio se recupera, por ejemplo en un recipiente, y a continuación se introduce en un segundo aparato de SMB independiente. La segunda etapa de separación (lado derecho) se lleva a cabo en el segundo aparato de SMB independiente que tiene 8 columnas, del nueve al dieciséis. Las condiciones del proceso en los dos aparatos de cromatografía se ajustan de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

En la realización (b) en el caso donde las dos etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente, las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en primer y segundo aparatos de cromatografía independientes respectivamente, siendo el producto intermedio introducido en el aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación, y siendo las condiciones del proceso en los primer y segundo aparatos de cromatografía ajustadas de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación. Una realización preferida de este proceso de separación se muestra como la figura 10c. De este modo, la primera etapa de separación (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato de SMB que tiene 8 columnas, del uno al ocho. El producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación se introduce a continuación en el segundo aparato de cromatografía independiente usado en la segunda etapa de separación. El producto intermedio puede hacerse pasar de la primera etapa de separación a la segunda etapa de separación directa o indirectamente, por ejemplo mediante un recipiente. La segunda etapa de separación (lado derecho) se lleva a cabo en el segundo aparato de SMB independiente que tiene 8 columnas, del nueve al dieciséis. Las condiciones del proceso en los dos aparatos de cromatografía se ajustan de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

En la realización (b) en el caso donde las dos etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente, el eluyente circula por separado en los dos aparatos cromatográficos independientes. De este modo, no se comparte el eluyente entre los dos aparatos cromatográficos independientes aparte de que el eluyente puede estar presente como disolvente en el producto intermedio que se purifica en la segunda etapa de separación, y que se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. Las columnas cromatográficas no se comparten entre los dos aparatos cromatográficos independientes usados en las primera y segunda etapas de separación.

Después de que el producto intermedio se obtiene en la primera etapa de separación, el eluyente disolvente orgánico acuoso puede eliminarse parcial o totalmente antes de que el producto intermedio se purifique en la segunda etapa de separación. Como alternativa, el producto intermedio puede purificarse en la segunda etapa de separación sin la eliminación de cualquier disolvente presente.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación. En la realización (a), las condiciones del proceso del aparato de SMB individual usado en ambas etapas de separación se ajustan entre las primera y segunda etapas de separación de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación. En la realización (b), las condiciones del proceso en los dos aparatos de cromatografía independientes usados en las primera y segunda etapas de separación se establecen de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

De este modo, las condiciones del proceso en las primera y segunda etapas de separación varían. Las condiciones del proceso que varían pueden incluir, por ejemplo, el tamaño de las columnas usadas, el número de columnas usadas, el relleno usado en las columnas, el tiempo de etapa del aparato de SMB, la temperatura del aparato, o los caudales usados en el aparato, en particular el caudal de recirculación de líquido recogido mediante las corrientes de extracto o refinado.

El producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación está típicamente enriquecido en el producto de AGPI en comparación con la mezcla de alimentación.

El producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación se introduce a continuación en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

5 El producto intermedio se recoge típicamente como la corriente de refinado o extracto procedente del aparato cromatográfico usado en el primer proceso de separación.

10 Típicamente, el producto intermedio se recoge como la corriente de refinado en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se recoge como la corriente de extracto en la segunda etapa de separación. De este modo, la corriente de refinado recogida en la primera etapa de separación se usa como mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación. La corriente de refinado recogida en la primera etapa de separación típicamente contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares.

15 Como alternativa, el producto intermedio se recoge como corriente de extracto en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se recoge como corriente de refinado en la segunda etapa de separación. De este modo, la corriente de extracto recogida en la primera etapa de separación se usa como mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación. La corriente de extracto recogida en la primera etapa de separación típicamente contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares.

20 El producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación. Típicamente, los componentes separados en cada etapa de separación del proceso de la presente invención tienen diferentes polaridades.

25 Preferentemente, el producto de AGPI se separa de componentes menos polares de la mezcla de alimentación en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se separa de componentes más polares de la mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación.

En el proceso de la invención,

- 30 (a) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y/o
 (b) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y/o
 (c) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación; y/o
 35 (d) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación.

40 Preferentemente, (a) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y (b) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y (c) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación; y (d) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación.

45 Esta recirculación implica alimentar parte de la corriente de extracto o refinado fuera del aparato de cromatografía usado en la primera o segunda etapa de separación de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa, típicamente en una columna adyacente. Esta columna adyacente es la columna adyacente que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el sistema.

50 El caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto o refinado en la primera o segunda etapas de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en esa etapa es el caudal al cual el líquido recogido mediante esa corriente es alimentado de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa, típicamente al interior de una columna adyacente, es decir la columna aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el sistema.

60 Esto puede verse con referencia a una realización preferida en la figura 9. El caudal de recirculación de extracto en la primera etapa de separación es el caudal al cual el extracto recogido de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es alimentado en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, es decir el caudal de líquido al interior de la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

65 El caudal de recirculación de extracto en la segunda etapa de separación es el caudal al cual el extracto recogido en la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es alimentado al interior de la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, es decir el caudal de líquido al interior de la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la

segunda etapa de separación.

La recirculación de las corrientes de extracto y/o refinado en las primera y/o segunda etapas de separación se realiza típicamente alimentando el líquido recogido mediante esa corriente en esa etapa de separación al interior de un recipiente, y a continuación bombeando una cantidad de ese líquido desde el recipiente de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación, típicamente al interior de una columna adyacente. En este caso, el caudal de recirculación de líquido recogido mediante una corriente de extracto o refinado particular en las primera y/o segunda etapas de separación, típicamente de vuelta al interior de una columna adyacente, es el caudal al cual el líquido es bombeado fuera del recipiente de vuelta al interior del aparato de cromatografía, típicamente al interior de una columna adyacente.

Como apreciará el experto en la materia, la cantidad de líquido que es introducido en un aparato de cromatografía mediante las corrientes de eluyente y materia prima de alimentación se equilibra con la cantidad de líquido eliminado del aparato, y recirculado de vuelta al interior del aparato.

De este modo, con referencia a la figura 9, para la corriente de extracto, el caudal de eluyente (desorbente) al interior del aparato o aparatos cromatográficos usados en las primera y segunda etapas de separación (D) es igual al caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en esa etapa de separación se acumula en un recipiente (E1 y E2) añadido al caudal al cual el extracto se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (D-E1 y D-E2).

Para la corriente de refinado procedente de una etapa de separación, el caudal al cual el extracto se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (D-E1 y D-E2) añadido al caudal al cual se introduce materia prima de alimentación en el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (F y R1) es igual al caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en esa etapa de separación particular se acumula en un recipiente (R1 y R2) añadido al caudal al cual el refinado se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (D+F-E1-R1 y D+R1-E2-R2).

El caudal al cual el líquido recogido de una corriente de extracto o refinado particular procedente de un aparato de cromatografía se acumula en un recipiente también puede considerarse como el caudal neto de eliminación de esa corriente de extracto o refinado de ese aparato de cromatografía.

El caudal al cual el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y refinado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI pueda separarse de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; y/o el caudal al cual el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y refinado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI pueda separarse de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

Preferentemente, el caudal al cual el líquido recogido mediante las corrientes de extracto y refinado en cada etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI pueda separarse de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

Típicamente, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación difiere del caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación, y/o el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación difiere del caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación.

Modificar el caudal al cual el líquido recogido mediante las corrientes de extracto y/o refinado en la primera o segunda etapas de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación particular tiene el efecto de modificar la cantidad de componentes más polares y menos polares presentes en las corrientes de extracto y refinado. De este modo, por ejemplo, un caudal de recirculación de extracto más bajo da como resultado que menos de los componentes menos polares en esa etapa de separación son transportados hacia la corriente de refinado. Un caudal de recirculación de extracto más elevado da como resultado que más de los componentes menos polares en esa etapa de separación son transportados hacia la corriente de refinado.

Esto puede verse, por ejemplo, en la realización específica de la invención mostrada en la figura 6. El caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación (D-E1) afectará a en qué medida cualquiera

del componente A es transportado hacia la corriente de refinado en la primera etapa de separación (R1).

Típicamente, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. Preferentemente, una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares se recoge de la primera etapa de separación y se purifica en una segunda etapa de separación, y el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

Como alternativa, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es más lento que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

Típicamente, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. Preferentemente, una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares se recoge de la primera etapa de separación y se purifica en una segunda etapa de separación, y el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

Como alternativa, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es más lento que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

En realizaciones donde los caudales de recirculación se ajustan de modo que el producto de AGPI pueda separarse de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación, la relación agua:disolvente orgánico de los eluyentes usados en cada etapa de separación puede ser igual o diferente. Típicamente, la relación agua:disolvente orgánico del eluyente en cada etapa de separación es de 0,5:99,5 a 5,5:94,5 partes en volumen.

El eluyente usado en el proceso de la presente invención es un disolvente orgánico acuoso.

El disolvente orgánico acuoso típicamente comprende agua y uno o más alcoholes, éteres, ésteres, cetonas o nitrilos, o mezclas de los mismos.

Los disolventes alcohólicos son bien conocidos por el experto en la materia. Los alcoholes son típicamente alcoholes de cadena corta. Los alcoholes típicamente son de fórmula ROH, en la que R es un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. El grupo alquilo C₁-C₆ está preferentemente sin sustituir. Los ejemplos de alcoholes incluyen metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol y t-butanol. Metanol y etanol son preferidos. Metanol es más preferido.

Los disolventes de éter son bien conocidos por el experto en la materia. Los éteres son típicamente éteres de cadena corta. Los éteres son típicamente de fórmula R-O-R', en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. El grupo alquilo C₁-C₆ está preferentemente sin sustituir. Los éteres preferidos incluyen éter dietílico, éter diisopropílico, y éter metil t-butílico (MTBE).

Los disolventes de éster son bien conocidos por el experto en la materia. Los ésteres son típicamente ésteres de cadena corta. Los ésteres típicamente son de fórmula R-(C=O)O-R', en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. Los ésteres preferidos incluyen acetato de metilo y acetato de etilo.

Los disolventes cetónicos son bien conocidos por el experto en la materia. Las cetonas son típicamente cetonas de cadena corta. Las cetonas típicamente son de fórmula R-(C=O)-R', en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. El grupo alquilo C₁-C₆ está preferentemente sin sustituir. Las cetonas preferidas incluyen acetona, metiletilcetona y metil isobutil cetona (MIBK).

Los disolventes de nitrilo son bien conocidos por el experto en la materia. Los nitrilos son típicamente nitrilos de cadena corta. Los nitrilos típicamente son de fórmula R-CN, en la que R representa un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. El grupo alquilo C₁-C₆ está preferentemente sin sustituir. Los nitrilos preferidos incluyen acetonitrilo.

5 Típicamente, el disolvente orgánico acuoso es alcohol acuoso o acetonitrilo acuoso.

El disolvente orgánico acuoso es preferentemente metanol acuoso o acetonitrilo acuoso. El metanol acuoso es más preferido.

10 Típicamente, el eluyente no está en un estado supercrítico. Típicamente, el eluyente es un líquido.

Típicamente, la relación promedio de agua:disolvente orgánico, por ejemplo relación de agua:metanol, del eluyente en todo el aparato es de 0,1:99,9 a 9:91 partes en volumen, preferentemente de 0,25:99,75 a 7:93 partes en volumen, más preferentemente de 0,5:99,5 a 6:94 partes en volumen.

15 Cuando el disolvente orgánico acuoso es acetonitrilo acuoso, el eluyente típicamente contiene hasta el 30% en peso de agua, el resto acetonitrilo. Preferentemente, el eluyente contiene del 5 al 25% en peso de agua, el resto acetonitrilo. Más preferentemente, el eluyente contiene del 10 al 20% en peso de agua, el resto acetonitrilo. Aún más preferentemente, el eluyente contiene del 15 al 25% en peso de agua, el resto acetonitrilo.

20 En una realización particularmente preferida, (1) el producto intermedio que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares se recoge como la corriente de refinado en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se recoge como la corriente de extracto en la segunda etapa de separación; o (2) el producto intermedio que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares se recoge como la corriente de extracto en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se recoge como la corriente de refinado en la segunda etapa de separación.

La realización particularmente preferida (1) es adecuada para purificar EPA de una mezcla de alimentación.

30 Esta realización particularmente preferida (1) se ilustra en la figura 2. Una mezcla de alimentación F que comprende el producto de AGPI (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se purifica en la primera etapa de separación. En la primera etapa de separación, los componentes menos polares (A) se eliminan como corriente de extracto E1. El producto de AGPI (B) y los componentes más polares (C) se recogen como corriente de refinado R1. La corriente de refinado R1 es el producto intermedio que a continuación se purifica en la segunda etapa de separación. En la segunda etapa de separación, los componentes más polares (C) se eliminan como corriente de refinado R2. El producto de AGPI (B) se recoge como corriente de extracto E2.

40 Esta realización se ilustra con más detalle en la figura 4. La figura 4 es idéntica a la figura 2, excepto que se muestran los puntos de introducción del desorbente disolvente orgánico (D) y agua (W) al interior de cada aparato cromatográfico. El desorbente disolvente orgánico (D) y agua (W) juntos constituyen el eluyente. La fase (D) es típicamente disolvente orgánico esencialmente puro pero, en algunas realizaciones puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente disolvente orgánico. La fase (W) es típicamente agua esencialmente pura pero, en algunas realizaciones puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente agua, por ejemplo una mezcla del 98% de agua/2% de metanol.

45 Una ilustración adicional de esta realización particularmente preferida se muestra en la figura 6. En este caso no hay punto de inyección de agua independiente, y en su lugar un desorbente disolvente orgánico acuoso se inyecta en (D).

50 La separación en corriente de refinado y de extracto puede ser asistida modificando la potencia de desorción del eluyente dentro de cada aparato cromatográfico. Esto puede conseguirse introduciendo el componente de disolvente orgánico (o rico en disolvente orgánico) del eluyente y el componente de agua (o rico en agua) en puntos diferentes en cada aparato cromatográfico. De este modo, típicamente, el disolvente orgánico se introduce aguas arriba del punto de extracción de extracto y el agua se introduce entre el punto de extracción de extracto y el punto de introducción de la alimentación en el aparato cromatográfico, con respecto al flujo de eluyente en el sistema. Esto se muestra en la figura 4.

Los disolventes típicos para uso en esta realización la más preferida son alcoholes acuosos o acetonitrilo acuoso, preferentemente metanol acuoso.

60 La separación puede asistirse modificando los caudales a los cuales el líquido recogido mediante las corrientes de extracto y refinado en las primera y segunda etapas de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación.

65 Típicamente, en esta realización particularmente preferida, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en

la primera etapa de separación es más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

5 En esta realización particularmente preferida, la primera corriente de refinado en la primera etapa de separación se elimina típicamente aguas abajo del punto de introducción de la mezcla de alimentación en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

10 En esta realización particularmente preferida, la primera corriente de extracto en la primera etapa de separación se elimina típicamente aguas arriba del punto de introducción de la mezcla de alimentación en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

15 En esta realización particularmente preferida, la segunda corriente de refinado en la segunda etapa de separación se elimina típicamente aguas abajo del punto de introducción del producto intermedio en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

20 En esta realización particularmente preferida, la segunda corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recoge típicamente aguas arriba del punto de introducción del producto intermedio en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

Típicamente en esta realización particularmente preferida, el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación aguas arriba del punto de eliminación de la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

25 Típicamente en esta realización particularmente preferida, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación aguas arriba del punto de introducción de la mezcla de alimentación pero aguas abajo del punto de eliminación de la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

30 Típicamente en esta realización particularmente preferida, el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación aguas arriba del punto de eliminación de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

35 Típicamente en esta realización particularmente preferida, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación aguas arriba del punto de introducción del producto intermedio pero aguas abajo del punto de eliminación de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

40 La realización particularmente preferida (2) es adecuada para purificar DHA de una mezcla de alimentación.

45 La realización particularmente preferida (2) se ilustra en la figura 3. Una mezcla de alimentación F que comprende el producto de AGPI (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se purifica en la primera etapa de separación. En la primera etapa de separación, los componentes más polares (C) se eliminan como corriente de refinado R1. El producto de AGPI (B) y los componentes menos polares (A) se recogen como corriente de extracto E1. La corriente de extracto E1 es el producto intermedio que a continuación se purifica en la segunda etapa de separación. En la segunda etapa de separación, los componentes menos polares (A) se eliminan como corriente de extracto E2. El producto de AGPI (B) se recoge como corriente de refinado R2.

50 Esta realización se ilustra con más detalle en la figura 5. La figura 5 es idéntica a la figura 3, excepto que se muestran los puntos de introducción del desorbente disolvente orgánico (D) y agua (W) en cada aparato cromatográfico. Como anteriormente, la fase (D) es típicamente disolvente orgánico esencialmente puro, pero, en algunas realizaciones puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente disolvente orgánico. La fase (W) es típicamente agua esencialmente pura pero, en algunas realizaciones puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente agua, por ejemplo una mezcla de 98% de agua /2% de metanol.

55 Una ilustración adicional de esta realización particularmente preferida se muestra en la figura 7. En este caso no hay punto de inyección de agua independiente, y en su lugar un desorbente disolvente orgánico acuoso se inyecta en (D).

60 Los disolventes típicos para uso en esta realización la más preferida son alcoholes acuosos o acetonitrilo acuoso, preferentemente metanol acuoso.

65 Típicamente en esta realización, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la primera etapa de separación se reintroduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación

se reintroduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

En esta realización la primera corriente de refinado en la primera etapa de separación se elimina típicamente aguas abajo del punto de introducción de la mezcla de alimentación en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

En esta realización, la primera corriente de extracto en la primera etapa de separación se elimina típicamente aguas arriba del punto de introducción de la mezcla de alimentación en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

En esta realización, la segunda corriente de refinado en la segunda etapa de separación se elimina típicamente aguas abajo del punto de introducción del producto intermedio en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

En esta realización, la segunda corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recoge típicamente aguas arriba del punto de introducción del producto intermedio en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

Típicamente en esta realización, el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación aguas arriba del punto de eliminación de la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

Típicamente en esta realización, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación aguas arriba del punto de introducción de la mezcla de alimentación pero aguas abajo del punto de eliminación de la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

Típicamente en esta realización, el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación aguas arriba del punto de eliminación de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

Típicamente en esta realización, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación aguas arriba del punto de introducción del producto intermedio pero aguas abajo del punto de eliminación de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

En una realización preferida de la invención, cada uno del aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real usado en las primera y segunda etapas de separación consta de ocho columnas cromatográficas. Éstas se denominan como columnas 1 a 8. En cada aparato las ocho columnas están dispuestas en serie de modo que la parte inferior de la columna 1 está unida a la parte superior de la columna 2, la parte inferior de la columna 2 está unida a la parte superior de la columna 3... etc.... y la parte inferior de la columna 8 está unida a la parte superior de la columna 1. Estas uniones pueden ser opcionalmente mediante un recipiente de retención, con una corriente de recirculación al interior de la siguiente columna. El flujo de eluyente a través del sistema es de la columna 1 a la columna 2 a la columna 3 etc. El flujo efectivo de adsorbente a través del sistema es de columna 8 a la columna 7 a la columna 6 etc.

Una realización la más preferida se ilustra en la figura 8. Una mezcla de alimentación F que comprende el producto de AGPI (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se introduce en la parte superior de la columna 5 en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. El desorbente disolvente orgánico se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. Se introduce agua en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. En la primera etapa de separación, los componentes menos polares (A) se eliminan como corriente de extracto E1 procedente de la parte inferior de la columna 2. El producto de AGPI (B) y los componentes más polares (C) se eliminan como corriente de refinado R1 procedente de la parte inferior de la columna 7. La corriente de refinado R1 es el producto intermedio que a continuación se purifica en la segunda etapa de separación, al ser introducido en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación en la parte superior de la columna 5. El desorbente disolvente orgánico se introduce en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. Se introduce agua en la parte superior de la columna 4 en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. En la segunda etapa de separación, los componentes más polares (C) se eliminan como corriente de refinado R2 en la parte inferior de la columna 7. El producto de AGPI (B) se recoge como corriente de extracto E2 en la parte inferior de la columna 2.

En esta realización la más preferida, el disolvente orgánico se introduce típicamente en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

En esta realización la más preferida, el agua se introduce típicamente en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

5 En esta realización la más preferida, el disolvente orgánico se introduce típicamente en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

En esta realización la más preferida, el disolvente orgánico se introduce típicamente en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

10 En esta realización la más preferida, la corriente de alimentación se introduce típicamente en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

15 En esta realización la más preferida, una primera corriente de refinado se recoge típicamente como el producto intermedio procedente de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. Este producto intermedio se purifica a continuación en la segunda etapa de separación y se introduce típicamente en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. La primera corriente de refinado puede recogerse opcionalmente en un recipiente antes de ser purificada en la segunda etapa de separación.

20 En esta realización la más preferida, una primera corriente de extracto se elimina típicamente de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. La primera corriente de extracto puede recogerse opcionalmente en un recipiente y reintroducirse en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

25 En esta realización la más preferida, una segunda corriente de refinado se elimina típicamente de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

30 En esta realización la más preferida, una segunda corriente de extracto se recoge típicamente de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. Esta segunda corriente de extracto típicamente contiene el producto de AGPI purificado. La segunda corriente de extracto puede recogerse opcionalmente en un recipiente y reintroducirse en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

35 En esta realización la más preferida, el eluyente usado es típicamente alcohol acuoso, preferentemente metanol acuoso. La relación agua:alcohol es típicamente de 0,5:99,5 a 6:94 partes en volumen.

40 En esta realización la más preferida, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto procedente de la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es típicamente más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto procedente de la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

45 En esta realización la más preferida, el eluyente disolvente orgánico acuoso es sustancialmente igual en cada etapa de separación.

Aunque la realización de la figura 8 está configurada tal como se muestra en la figura 10a, la configuración mostrada en las figuras 10b y 10c también podría usarse en esta realización.

50 Una realización la más preferida adicional se ilustra en la figura 9. Una mezcla de alimentación F que comprende el producto de AGPI (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se introduce en la parte superior de la columna 5 en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. Desorbente disolvente orgánico acuoso se introduce en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. En la primera etapa de separación, los componentes menos polares (A) se eliminan como corriente de extracto E1 procedente de la parte inferior de la columna 2. El producto de AGPI (B) y componentes más polares (C) se eliminan como corriente de refinado R1 procedente de la parte inferior de la columna 7. La corriente de refinado R1 es el producto intermedio que se purifica en la segunda etapa de separación al ser introducido en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. Desorbente disolvente orgánico acuoso se introduce en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. En la segunda etapa de separación, los componentes más polares (C) se eliminan como corriente de refinado R2 en la parte inferior de la columna 7. El producto de AGPI (B) se recoge como corriente de extracto E2 en la parte inferior de la columna 2.

60 En esta realización la más preferida, el disolvente orgánico acuoso se introduce típicamente en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

65

En esta realización la más preferida, el disolvente orgánico acuoso se introduce típicamente en la parte superior de la columna 9 en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

5 En esta realización la más preferida, la corriente de alimentación se introduce típicamente en la parte superior de la columna 5 en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

10 En esta realización la más preferida, una primera corriente de refinado se recoge típicamente como el producto intermedio procedente de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. Este producto intermedio se purifica a continuación en la segunda etapa de separación y se introduce típicamente en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. La primera corriente de refinado puede recogerse opcionalmente en un recipiente antes de ser purificada en la segunda etapa de separación.

15 En esta realización la más preferida, una primera corriente de extracto se elimina típicamente de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. La primera corriente de extracto puede recogerse opcionalmente en un recipiente y una parte reintroducirse en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. El caudal de recirculación de líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es el caudal al cual el líquido es bombeado desde este recipiente al interior de la parte superior de la columna 3.

20 En esta realización la más preferida, una segunda corriente de refinado se elimina típicamente de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

25 En esta realización la más preferida, una segunda corriente de extracto se recoge típicamente de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. Esta segunda corriente de extracto típicamente contiene el producto de AGPI purificado. La segunda corriente de extracto puede recogerse opcionalmente en un recipiente y una parte reintroducirse en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. El caudal de recirculación de líquido recogido mediante la corriente de extracto procedente de la segunda etapa de separación de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es el caudal al cual el líquido es bombeado desde este recipiente al interior de la parte superior de la columna 3.

30 En esta realización la más preferida, el eluyente usado es típicamente alcohol acuoso, preferentemente metanol acuoso. La relación agua:alcohol es típicamente de 0,5:99,5 a 6:94 partes en volumen.

35 En esta realización la más preferida, el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto procedente de la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es típicamente más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto procedente de la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

40 En esta realización la más preferida, el eluyente disolvente orgánico acuoso es sustancialmente igual en cada etapa de separación.

45 Aunque la realización de la figura 9 está configurada tal como se muestra en la figura 10a, la configuración mostrada en las figuras 10b y 10c también podría usarse en esta realización.

50 El proceso de la invención permite que se consigan purzas de producto de AGPI mucho más elevadas de lo que ha sido posible con técnicas cromatográficas convencionales. Los productos de AGPI producidos mediante el proceso de la invención tienen también perfiles de impureza particularmente ventajosos, que son bastante diferentes de los observados en aceites preparados mediante técnicas conocidas. La presente invención también se refiere, por lo tanto, composiciones que comprende un producto de AGPI, por ejemplo uno obtenible mediante el proceso de la presente invención.

55 En la práctica, el proceso de la presente invención estará controlado generalmente por un ordenador. La presente invención, por lo tanto, también proporciona un programa informático para controlar un aparato cromatográfico tal como se define en el presente documento, conteniendo el programa informático un medio de código que, cuando se ejecuta ordena al aparato que lleve a cabo el proceso de la invención.

60 Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Una materia prima de alimentación derivada de aceite de pescado (55 % en peso de EE del EPA, 5 % en peso de EE del DHA) se fracciona usando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice unido a C18 (tamaño de partícula 300 micrómetros, porosidad de partícula 150 angstroms) como fase estacionaria y metanol acuoso (que contenía el 7,5% de agua) como eluyente de acuerdo con el sistema ilustrado esquemáticamente en la figura 9.

10 La primera etapa de separación se llevó a cabo en un aparato de SMB que tenía 8 columnas (diámetro: 76,29 mm, longitud: 914,40 mm) que están conectadas en serie tal como se muestra en la figura 9. El producto intermedio refinado procedente de la primera etapa de separación se aisló y se purificó en una segunda etapa de separación usando la misma secuencia de columnas que anteriormente.

15 EPA se produjo con una pureza del 97%

Los parámetros de funcionamiento y los caudales son los siguientes.

20 Tiempo de etapa: 500 s
Tiempo de ciclo: 133,33 minutos

Primera etapa de separación

25 Caudal de alimentación de la materia prima de alimentación (F): 25 ml/min
Caudal de alimentación de desorbente (D1): 2050 ml/min
Caudal de acumulación de extracto en el recipiente (E1): 1125 ml/min
Caudal de recirculación de extracto (D1-E1): 925 ml/min
Caudal de refinado (R 1): 950 ml/min

30 Segunda etapa de separación

Caudal de alimentación de desorbente (D2): 1700 ml/min
Caudal de acumulación de extracto en el recipiente (E2): 900 ml/min
35 Caudal de recirculación de extracto (D2-E2): 800 ml/min
Caudal de refinado (R2): 800 ml/min

Una huella de GC de la materia prima de alimentación de EPA se muestra como la figura 11.

40 Una huella de GC del producto intermedio de refinado obtenido en la primera etapa de separación se muestra como la figura 12.

Una huella de GC del producto final de EPA se muestra como la figura 13.

45 Ejemplo 2

Una materia prima de alimentación derivada de aceite de pescado (55% en peso de EE del EPA, 5% en peso de EE del DHA) se fracciona usando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice unido a C18 (tamaño de partícula 300 micrómetros, porosidad de partícula 150 angstroms) como fase estacionaria y metanol acuoso (que contenía el 8% en peso de agua) como eluyente de acuerdo con el sistema ilustrado esquemáticamente en la figura 9, excepto que se usó una agrupación de quince columnas en lugar de una agrupación de ocho columnas.

50 La primera etapa de separación se llevó a cabo en un aparato de SMB que tenía 15 columnas (diámetro: 150 mm, longitud: 813 mm) que están conectadas en serie tal como se muestra en la figura 9. El producto intermedio procedente de la primera etapa de separación se aisló y se purificó en una segunda etapa de separación usando la misma secuencia de columnas que anteriormente.

EPA se produjo con una pureza del 98%.

60 Tiempo de etapa: 1200 s

Primera etapa de separación

65 Alimentación (F): 35 ml/min
Desorb. (DI): 2270 ml/min

ES 2 544 471 T3

Separación de extracto E1: 1320 ml/min
 Caudal de recirculación de extracto (D1-E1): 950 ml/min
 Separación de refinado R1: 950 ml/min

5 Segunda etapa de separación

Desorb. (D2): 1510 ml/min
 Separación de extracto E2: 850 ml/min
 Caudal de recirculación de extracto (D2-E2): 660 ml/min
 Separación de refinado R2: 670 ml/min

10

Una huella de GC del producto de EPA producido se muestra como la figura 14.

15 Ejemplo de referencia 1

Se llevó a cabo un experimento para comparar la cantidad de contaminantes medioambientales presentes en dos productos de AGPI producidos por SMB con aceites similares preparados por destilación. Los perfiles contaminantes de los aceites se muestran en la tabla 1 a continuación.

20

Tabla 1

Parámetro	Especificación de liberación	Aceite destilado [1]	Aceite destilado [2]	Producto de AGPI producido mediante SMB [1]	Producto de AGPI producido mediante SMB [2]
Hidrocarburos poliaromáticos (PAH) ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Benzo(a)pireno	NMT 2,0	0,90	0,90	<0,05	<0,05
Impurezas Dioxinas y Furanos PCDD y PCDFs ¹⁾ ($\text{pg OMS-PCDD/F-TEQ}/\text{g}$)	NMT 2,0	0,46	0,37	0,2	0,184
PCB (mg/kg)	NMT 0,09	0,0037	0,0103	0,0007	0,0012
Suma de Dioxinas, Furanos y PCB similares a dioxinas ²⁾ ($\text{pg OMS-PCDD/F-PCB-TEQ}/\text{g}$)	NMT 10,0	1,03	0,466	0,30	0,298
1) Los límites de dioxina incluyen la suma de dibenzo-para-dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzofuranos policlorados (PCDF) y se expresan en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) usando los factores de equivalencia tóxica (FET) de la OMS. Esto significa que los resultados analíticos relacionados con 17 congéneres de dioxina individuales de preocupación toxicológica se expresan en una única unidad cuantificable: concentración de equivalentes tóxicos TCDD o TEQ. 2) El máximo para dioxina y furanos permanece en 2 pg/g					

Ejemplo de referencia 2

25 Se llevó a cabo un experimento para determinar la cantidad de impurezas isoméricas presentes en un aceite preparado mediante SMB en comparación con un aceite equivalente preparado por destilación.

Una huella de GC del aceite rico en DHA preparado mediante SMB se muestra como la figura 15. No hay indicios de impurezas isoméricas en la huella de GC.

30 Una huella de GC del aceite preparado mediante destilación se muestra como la figura 16. Los cuatro picos con tiempos de elución más largos que el pico de DHA corresponden a isómeros de DHA. A partir de la huella de GC puede verse que el aceite preparado por destilación contiene aproximadamente el 1,5% en peso de impurezas isoméricas.

Ejemplo de referencia 3

Dos productos ricos en EPA producidos mediante SMB se compararon con aceites ricos en EPA producidos mediante destilación. El análisis del % en peso de sus AGPI componentes se muestran a continuación.

5

Ácido graso	Producto de AGPI producido mediante SMB [1]	Producto de AGPI producido mediante SMB [2]	Aceite destilado [1]	Aceite destilado [2]
EPA (C20:5n-3)	98,33	97,04	98,09	98,14
DHA (C22:6n-3)	0,15	<LdD	0,34	< LdD
C18:3 n-3	< LdD	0,28	0,24	< LdD
C18:4 n-3	0,33	0,20	0,14	0,26
C20:4 n-3	0,14	0,45	0,18	0,46
C21:5 n-3	< LdD	< LdD	< LdD	<LdD
C22:5 n-3	0,32	<LdD	< LdD	< LdD
Omega-3 total	99,27	97,97	98,94	98,86
C18:3n-6	< LdD	< LdD	0,05	< LdD
C20:3 n-6	< LdD	< LdD	0,13	0,11
C20:4 n-6	< LdD	0,21	0,26	0,37
Omega-6 total	< LdD	0,21	0,44	0,48

Ejemplo de referencia 4

Un producto rico en EPA/DHA producido mediante SMB se comparó con un aceite rico en EPA/DHA producido mediante destilación. El análisis del % en peso de sus AGPI componentes se muestra a continuación.

10

Ácido graso	Éster etílico Maxomega (90 ésteres etílicos de omega-3 90) % de área	Éster etílico destilado (90 ésteres de etílico de omega-3 ¹) % de área
EPA (C20:5n-3)	53,3	46,6
DHA (C22:6n-3)	32,9	38,2
EPA + DHA TOTAL	86,2	84,8
C18:3 n-3	0,3	0,1
C18:4 n-3	1,2	2,0
C20:4 n-3	1,8	0,6
C21:5 n-3	2,7	1,8
C22:5 n-3	5,0	3,8
Omega-3 total	97,2	93,1
C18:2 n-6	0,2	0,1
C18:3n-6	<0,1	0,2
C20:3 n-6	<0,1	0,1
C20:4 n-6	2,0	2,6
C22:4 n-6	<0,1	0,1
C22:5 n-6	0,6	1,0
Omega-6 total	2,8	4,1

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácido graso poliinsaturado (AGPI) a partir de una mezcla de alimentación, cuyo proceso comprende las etapas de:
- (i) purificar la mezcla de alimentación en una primera etapa de separación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener un producto intermedio; y
- (ii) purificar el producto intermedio obtenido en (i) en una segunda etapa de separación usando un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener el producto de AGPI; en el que
- (a) la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, siendo el producto intermedio recuperado entre las primera y segunda etapas de separación y siendo las condiciones del proceso en el aparato de cromatografía ajustadas entre las primera y segunda etapas de separación de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; o
- (b) la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en primer y segundo aparatos de cromatografía independientes respectivamente, siendo el producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación introducido en el segundo aparato de cromatografía, y siendo el producto de AGPI separado de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; y en el que
- (1) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y/o
- (2) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y/o
- (3) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación; y/o
- (4) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación, y
- en el que (I) el caudal al cual el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y refinado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI pueda separarse de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; y/o
- (II) el caudal al cual el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y refinado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI pueda separarse de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada aparato tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual puede recogerse líquido procedente de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación está enriquecido en el producto de AGPI en comparación con la mezcla de alimentación.
4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
- (a) el producto intermedio se recoge como la corriente de refinado en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se recoge como la corriente de extracto en la segunda etapa de separación; o
- (b) el producto intermedio se recoge como la corriente de extracto en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se recoge como la corriente de refinado en la segunda etapa de separación.
5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de AGPI se separa de componentes menos polares de la mezcla de alimentación en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se separa de componentes más polares de la mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación.
6. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de AGPI comprende al menos un AGPI ω -3.
7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el producto de AGPI comprende EPA y/o DHA.
8. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el eluyente es una mezcla de agua y un alcohol, un éter, un éster, una cetona o un nitrilo.

9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el eluyente es una mezcla de agua y metanol.
- 5 10. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de alimentación es un aceite de pescado o materia prima de alimentación derivada de aceite de pescado, el producto de AGPI es EPA o éster etílico de EPA, y el producto de AGPI se produce con una pureza mayor del 90% de pureza, preferentemente mayor del 95% de pureza, y más preferentemente mayor del 97% de pureza.
- 10 11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación difiere del caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación.
- 15 12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 u 11, en el que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación difiere del caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación.
- 20 13. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, 11 ó 12, en el que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación es más rápido que el caudal al cual el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.
- 25 14. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la opción (b) el producto intermedio se hace pasar desde la primera etapa de separación hasta la segunda etapa de separación directa o indirectamente.
- 30 15. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que después de que se obtiene el producto intermedio en la primera etapa de separación, el eluyente disolvente orgánico acuoso puede eliminarse parcial o totalmente antes de que el producto intermedio se purifique en la segunda etapa de separación.
- 35 16. Un programa informático para controlar un aparato de cromatografía tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, programa informático que contiene medio de código que, cuando se ejecuta, ordena al aparato que lleve a cabo un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

Figura 1

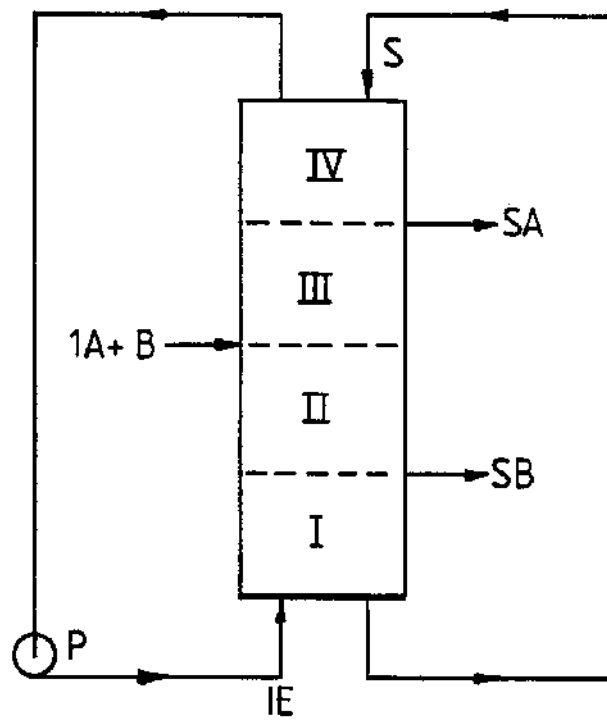


Figura 2

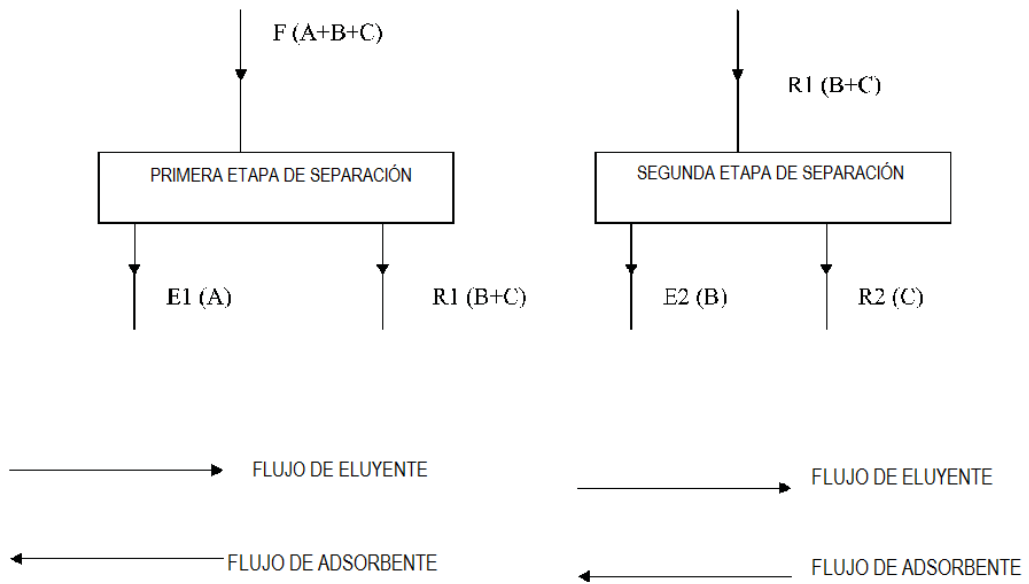


Figura 3

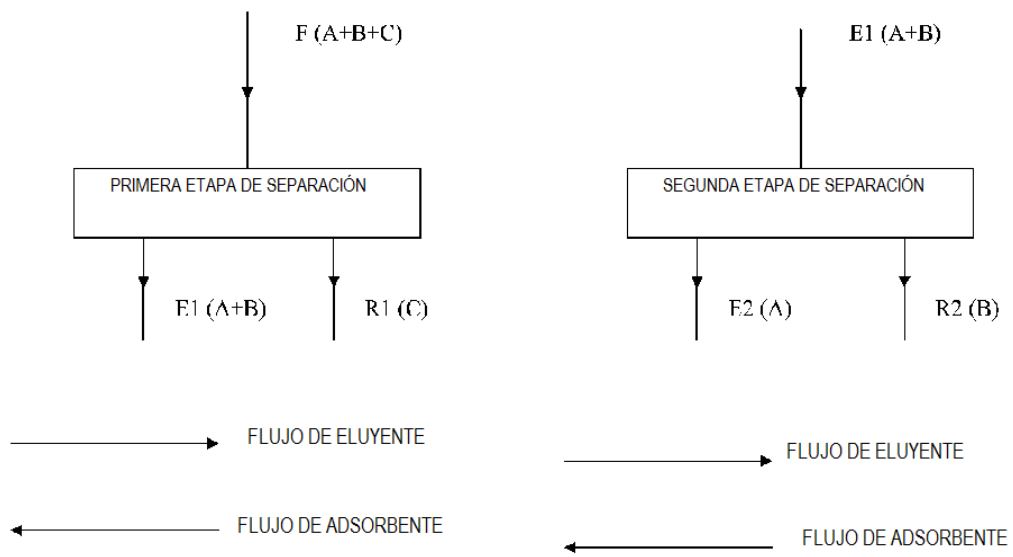


Figura 4

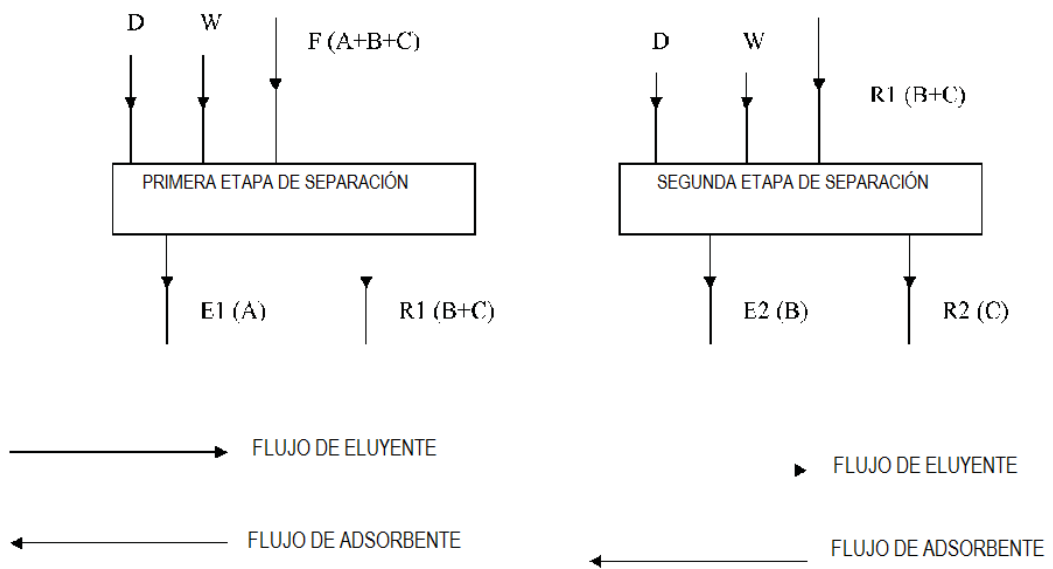


Figura 5

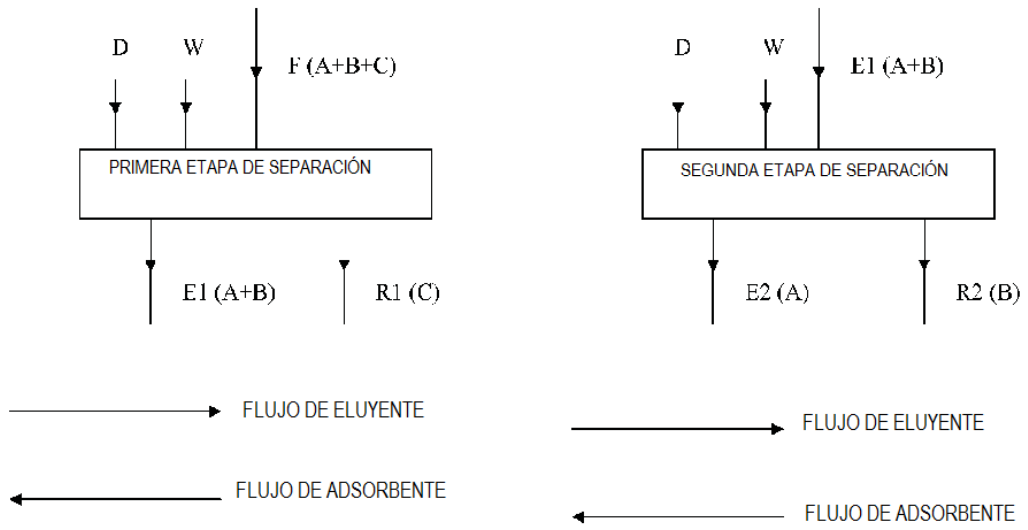


Figura 6

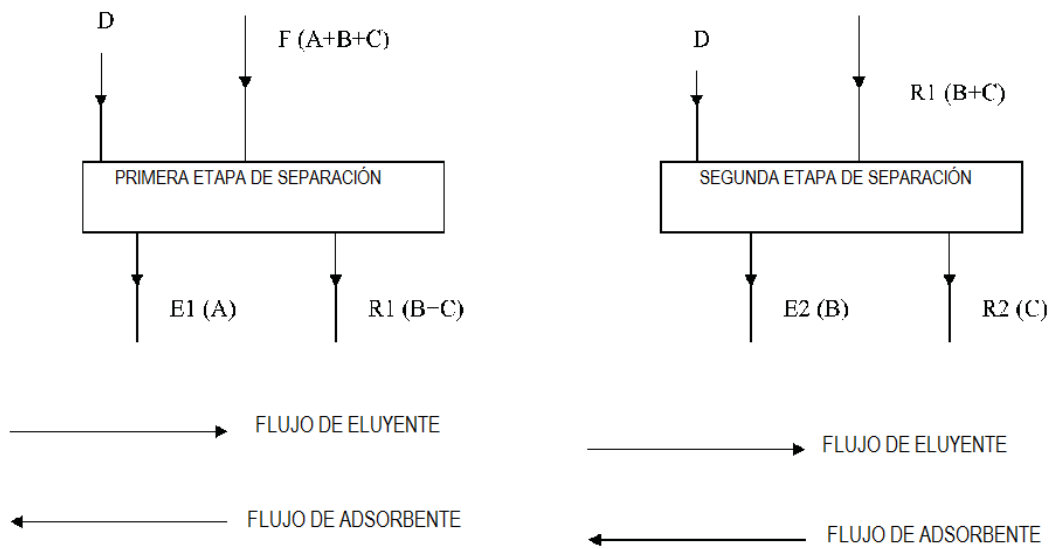


Figura 7

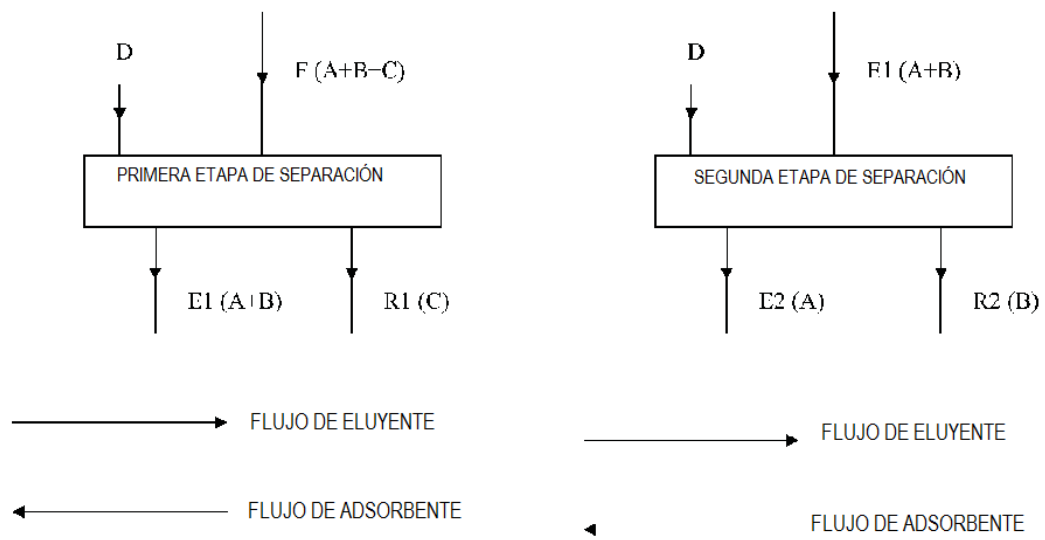


Figura 8

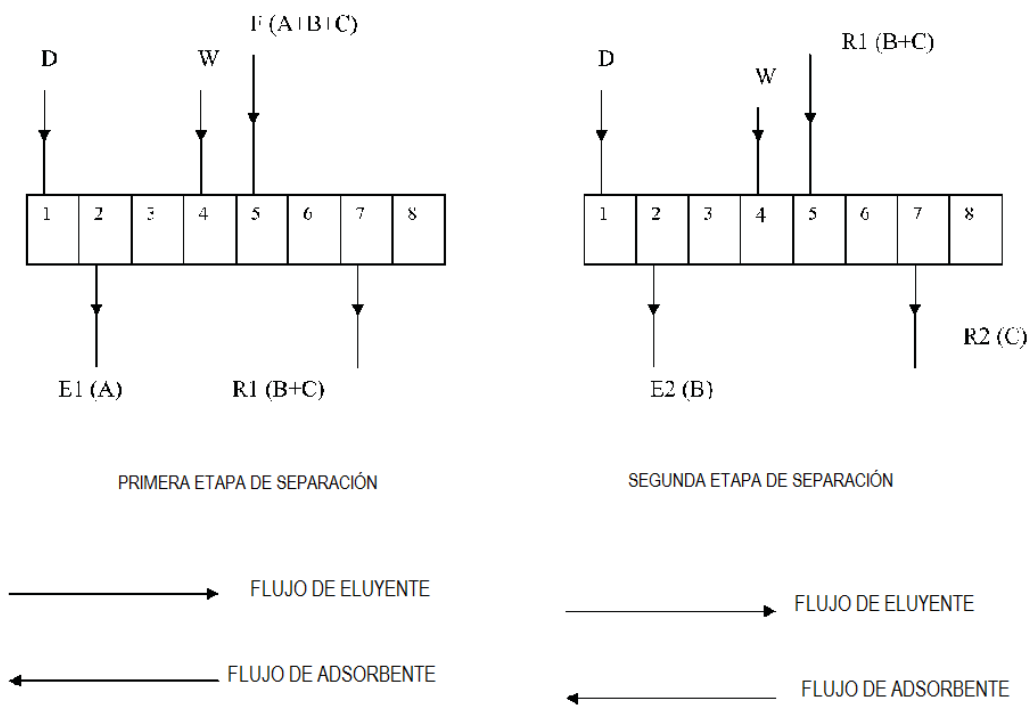


Figura 9

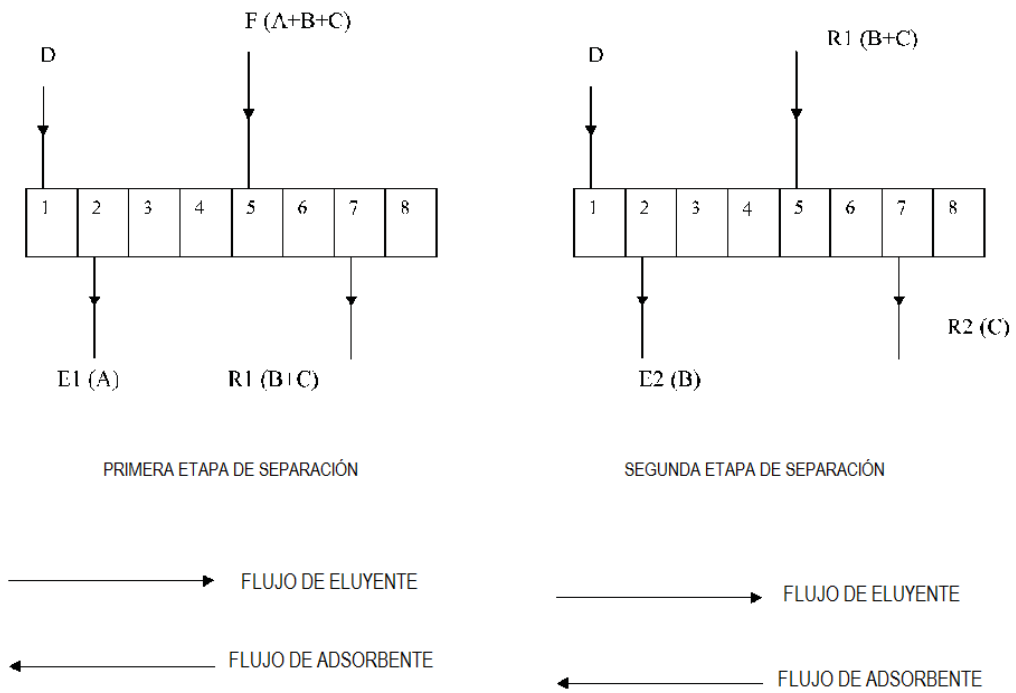
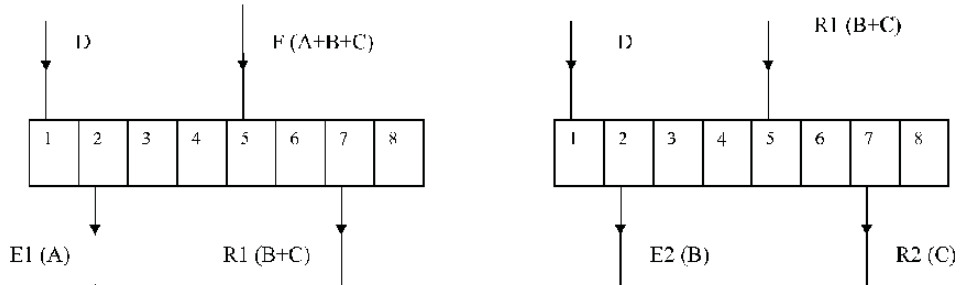
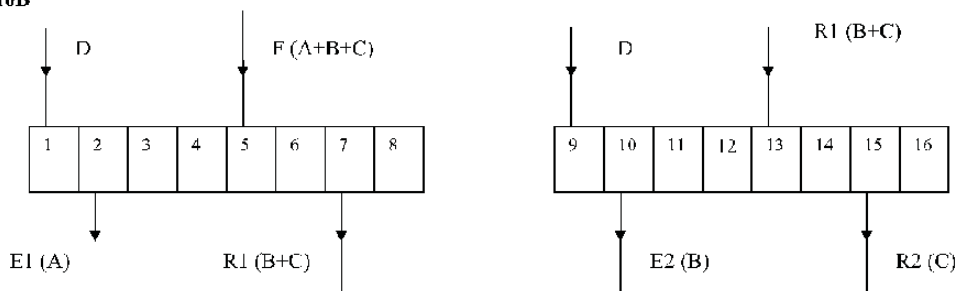


Figura 10

10A



10B



10C

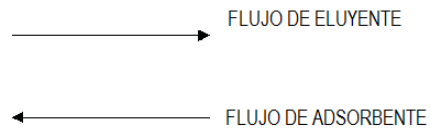
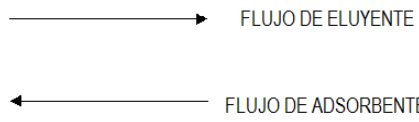
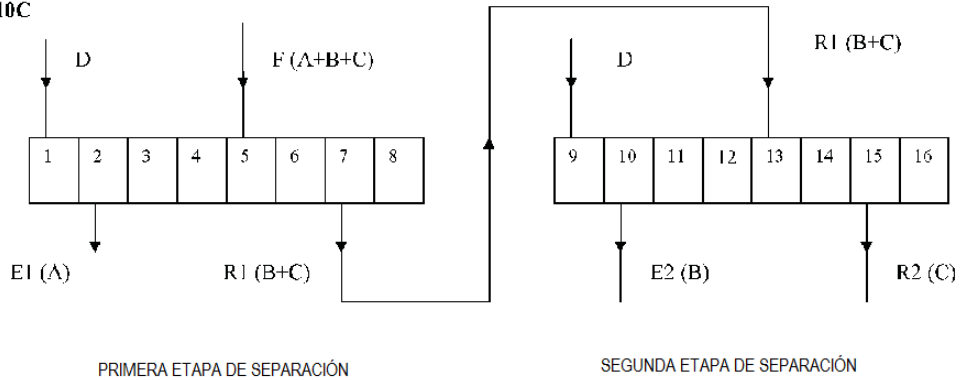


Figura 11

EPA 55 Material de alimentación

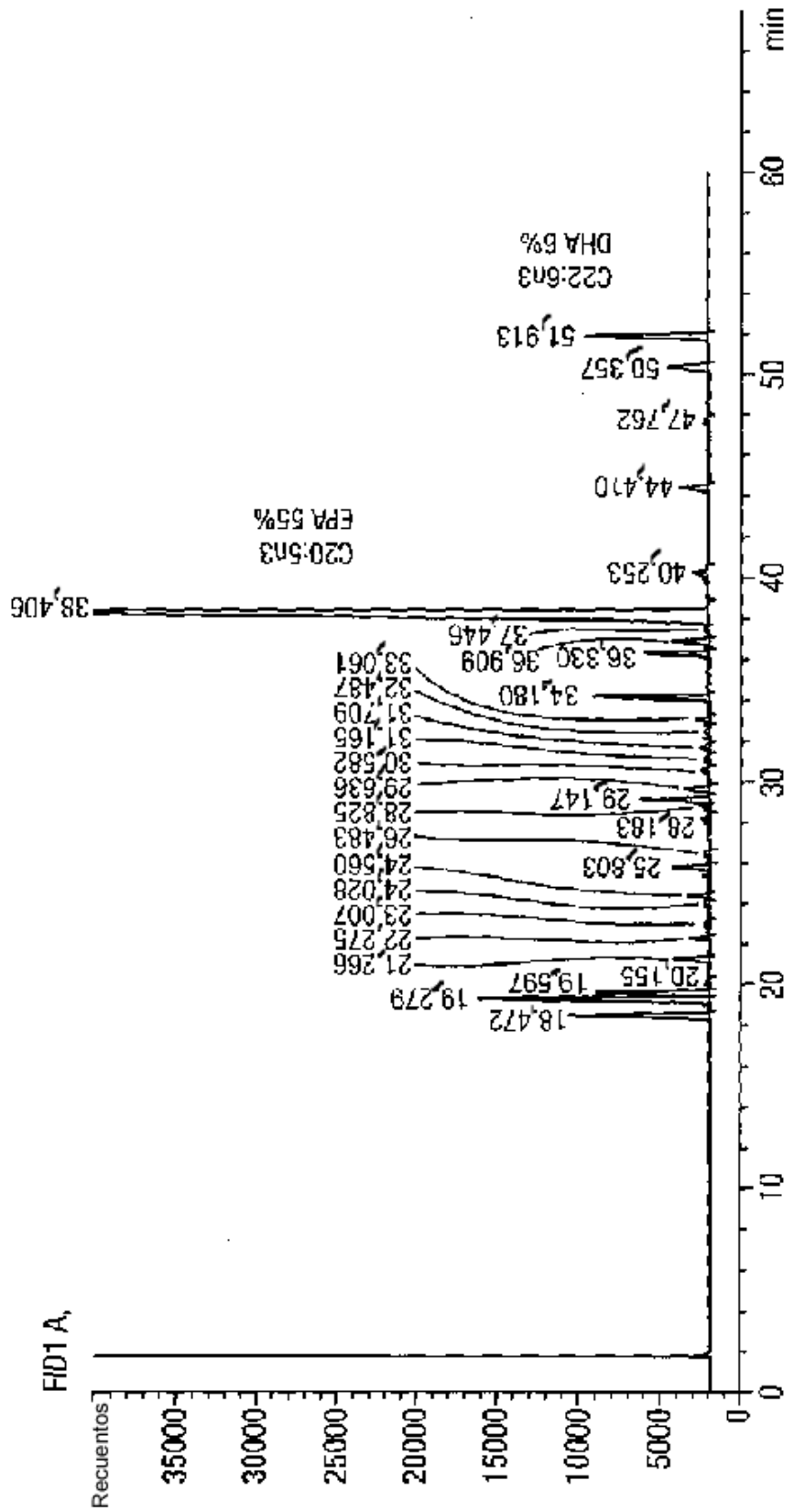


Figura 12

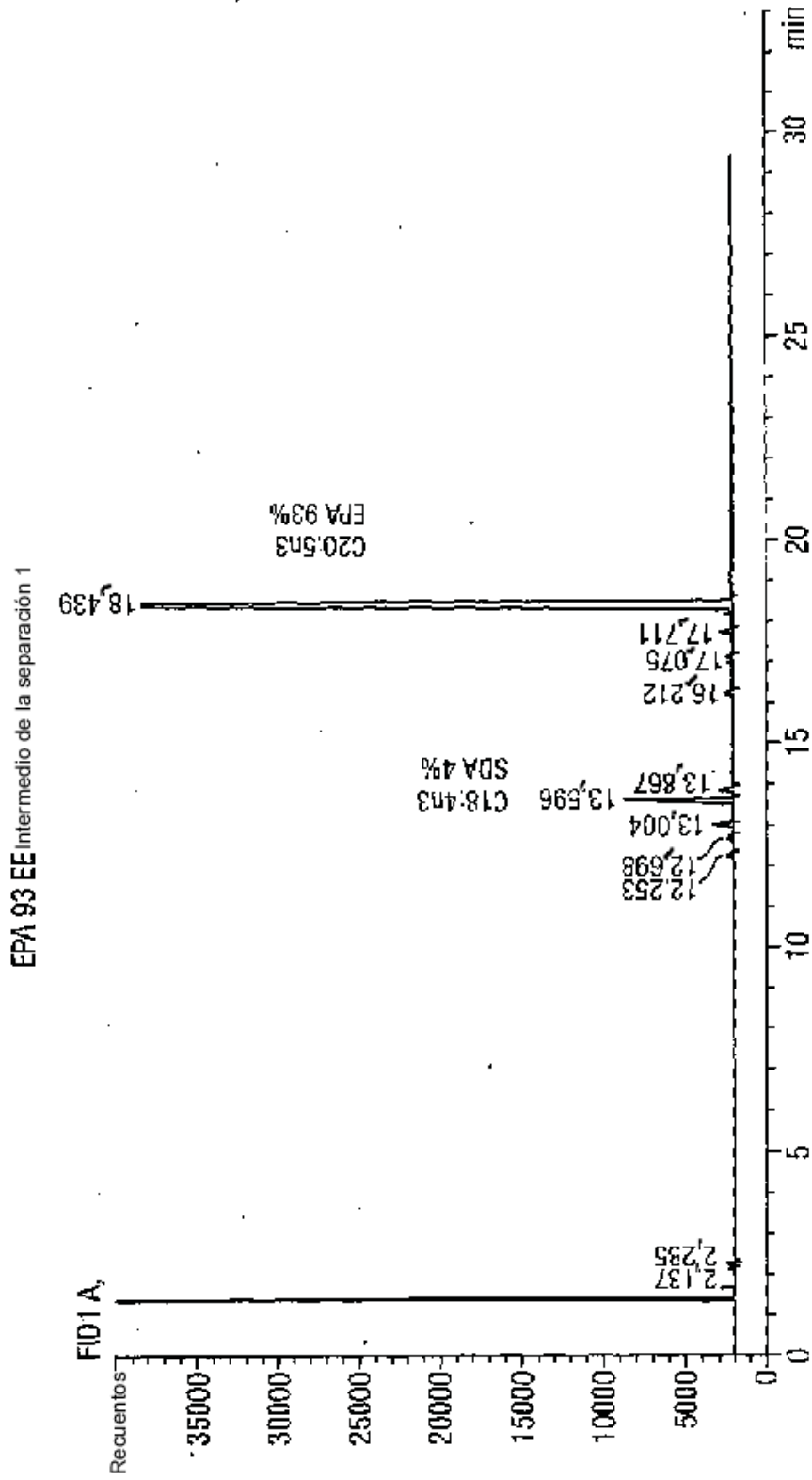


Figura 13

EPA 97 EE Producto aislado de la separación 2

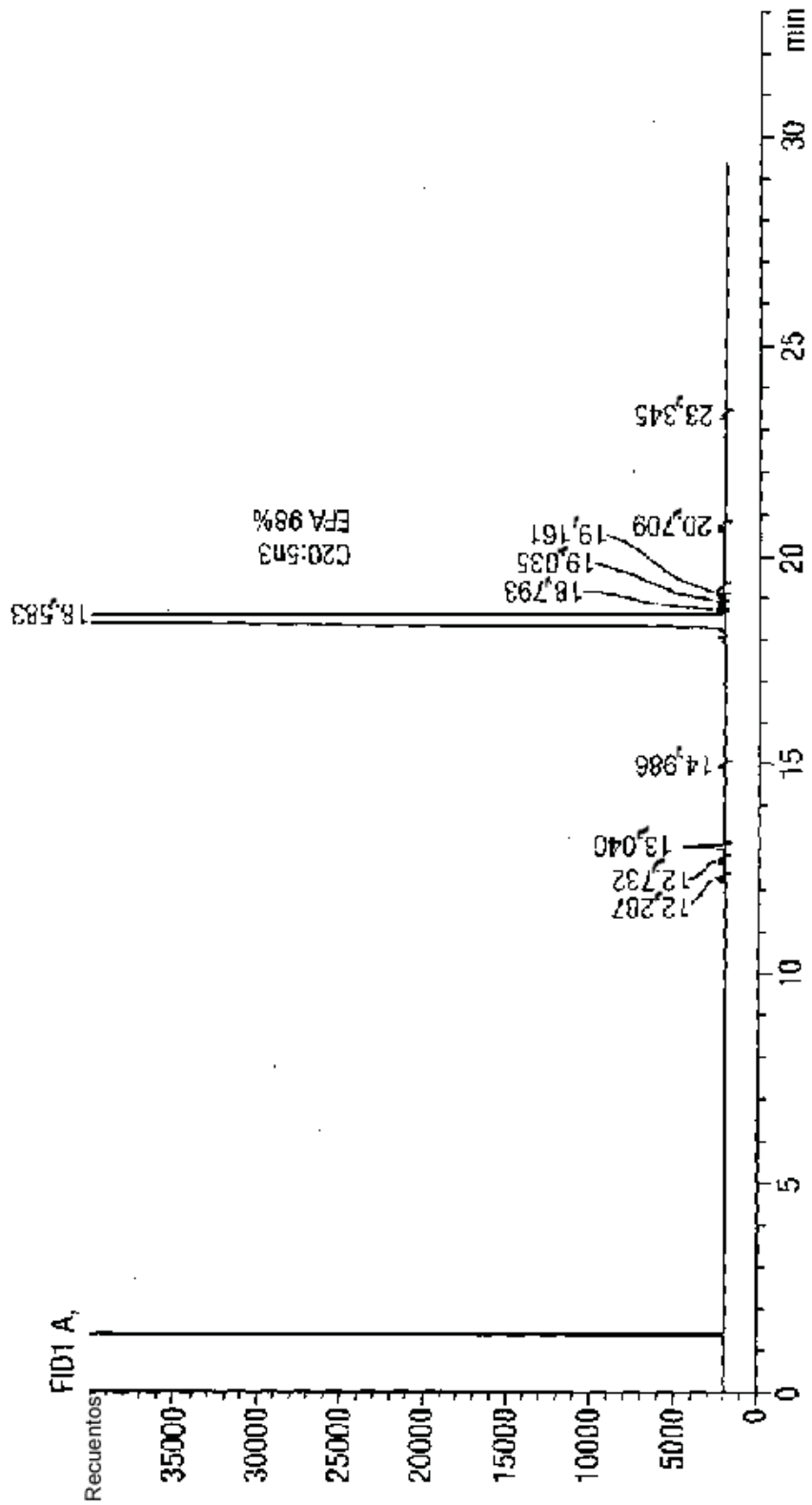


Figura 14

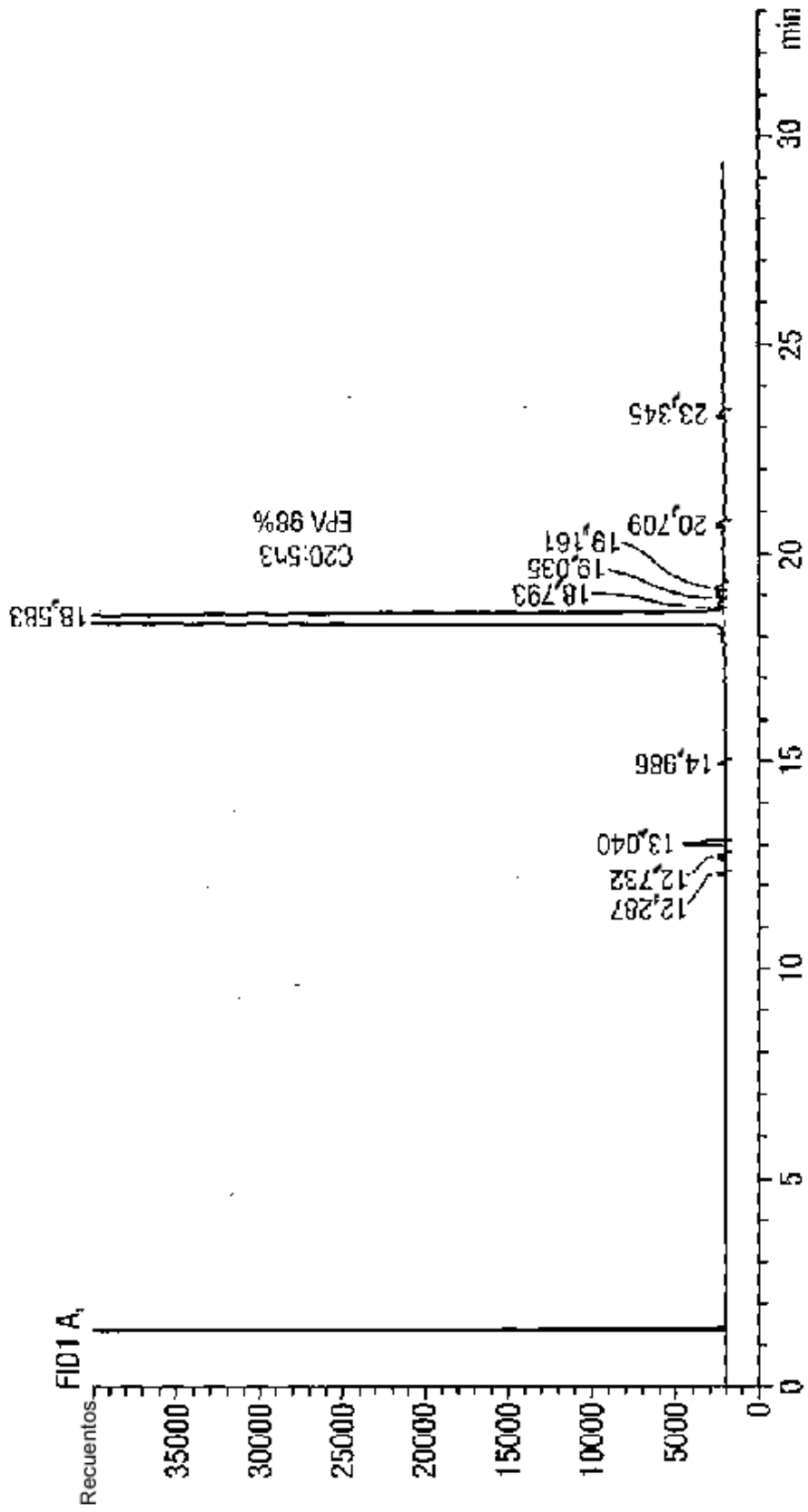


Figura 15

Extracto de la zona 2 - dha al 97%

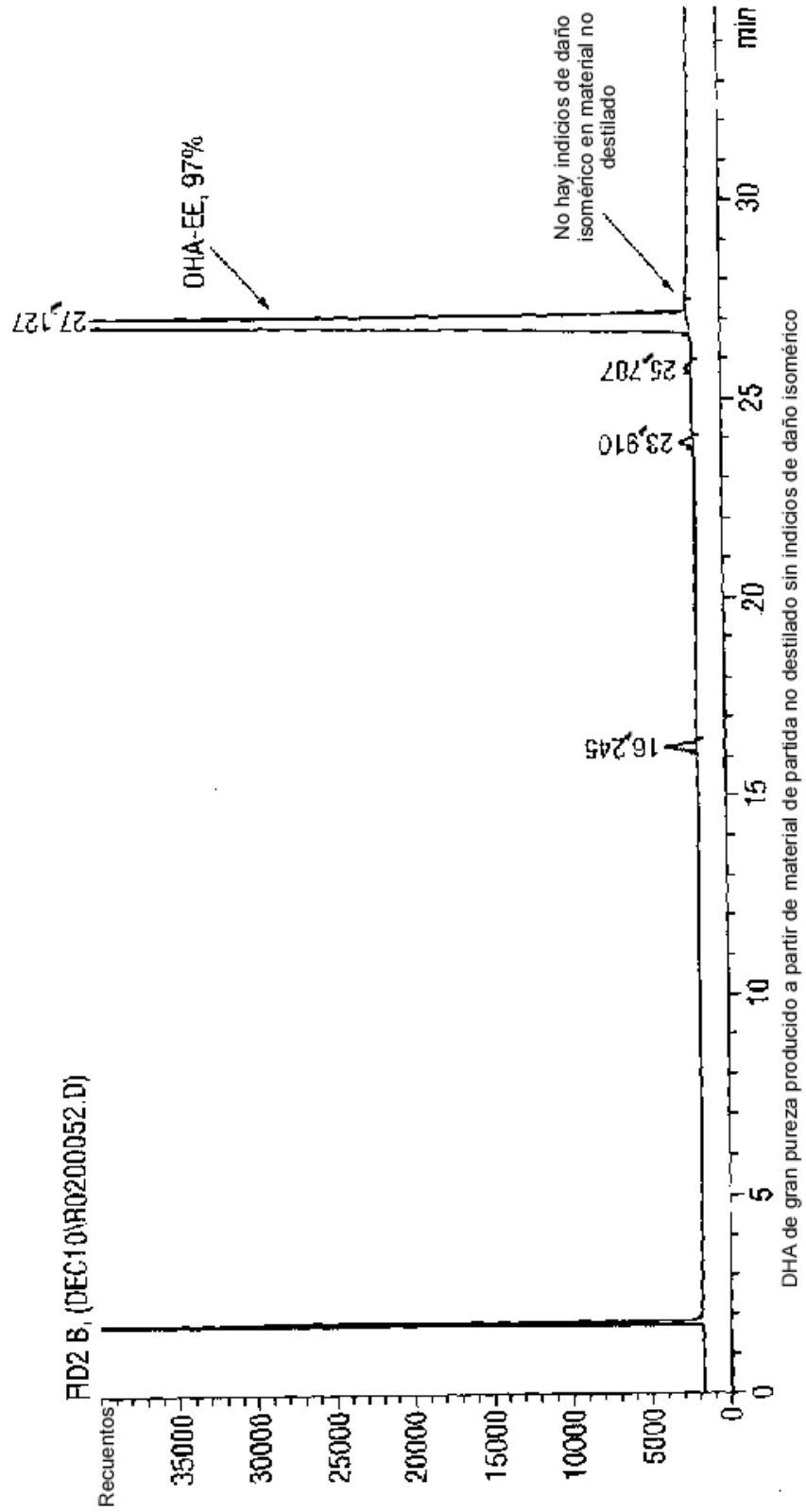


Figura 16

DHA de gran pureza producido a partir de material de partida que contiene el 1,5% de impurezas isoméricas (total de 4 picos por gc de FAME)

