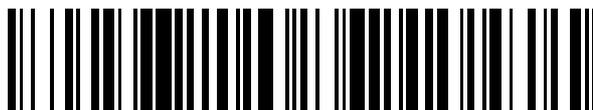


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 613**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)

B01D 15/24 (2006.01)

G01N 30/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2011 E 11799741 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2637760**

54 Título: **Procedimiento de separación por cromatografía continua de alto flujo, y dispositivo correspondiente**

30 Prioridad:

09.11.2010 FR 1004383

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

07.03.2016

73 Titular/es:

**FAUQUET, NICOLAS (100.0%)
5 Avenue des Diablots
95320 Saint Leu La Foret, FR**

72 Inventor/es:

FAUQUET, NICOLAS

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 562 613 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

Procedimiento de separación por cromatografía continua de alto flujo, y dispositivo correspondiente

La presente invención se relaciona con un procedimiento de separación de fracciones de una mezcla por cromatografía en fase líquida, aun llamada de forma abreviada cromatografía líquida de acceso rápido.

5 Conviene resaltar que en el marco de la invención, el término cromatografía líquida cubre técnicas variadas, tales como la cromatografía en fase líquida de alto rendimiento, cromatografía en fase líquida bajo presión, cromatografía en fase líquida en columna abierta, cromatografía acuosa subcrítica, cromatografía acuosa supercrítica, cromatografía de reparto centrífuga (CPC)...

10 La cromatografía en fase líquida es un método de separación de los constituyentes de una mezcla. Este utiliza las diferencias de afinidad de los diferentes constituyentes de la mezcla para un mismo sistema a través del cual percolan.

Este sistema está compuesto de una fase estacionaria y una fase móvil que pueden ser de naturaleza muy variable.

Este principio es muy ampliamente utilizado particularmente en las industrias y laboratorios para permitir la purificación de diferentes productos de interés o eliminar específicamente una impureza.

15 Los diferentes procedimientos, particularmente empleados durante el tratamiento de cantidades importantes, se enfrentan al carácter discontinuo de estos procedimientos. Una respuesta fue la utilización de los sistemas por tandas, lecho móvil simulado, utilización de diferentes columnas en serie o en paralelo,... Estos procedimientos conocidos presentan el inconveniente de ser muy complejos en términos de ramificaciones, bombas, válvulas, pues necesitan el desplazamiento de los puntos de inyección en las diferentes columnas utilizadas, o el desplazamiento de los sentidos de flujo en las columnas.

Otro enfoque conocido comprende la utilización de gradientes, permite disminuir los tiempos que separan dos inyecciones en la misma columna, pero presentan entre otros, los inconvenientes de necesitar una fase de equilibrio más importante entre dos inyecciones y la utilización de mezclas de solventes más complejas.

25 Se conoce igualmente, en el campo conexo de la cromatografía en fase gaseosa, los documentos DE-B-1121591 y US-A-3248929, que describen procedimientos de separación de fracciones de una mezcla utilizando una única columna de cromatografía.

30 La invención tiene por objeto obtener un procedimiento simple de separación de fracciones de una mezcla. No requiere necesariamente, en su procedimiento fundamental la utilización de gradiente, ni desplazamiento de los puntos de inyección ni cambio de los sentidos de flujo del solvente ni esperar más de algunos minutos entre dos inyecciones.

Esta invención permite particularmente disminuir el tamaño de las columnas utilizadas, aumentar su rendimiento, limitar la puesta a punto de los diferentes sistemas eluyentes y limitar el consumo de solvente. Otras ventajas muy numerosas aparecerán con la lectura de los párrafos siguientes.

35 La invención se relaciona con un procedimiento de separación de fracciones de una mezcla que se va a separar por cromatografía líquida.

Para este fin se propone un procedimiento que comprende las etapas de:

- inyecciones múltiples de la mezcla que se va a separar: las inyecciones se suceden después de los intervalos de tiempos A en una columna de cromatografía,

40 - extracciones múltiples: la extracción de fracciones de esta columna se sucede después de los intervalos de tiempos A, que generan una elución enriquecida en la fracción de interés, formada a partir de al menos una de las dichas fracciones extraídas,

- inyecciones múltiples del eluyente recogido precedentemente: las inyecciones se suceden después de los intervalos de tiempos B en una segunda columna de cromatografía,

45 - extracciones múltiples: las extracciones de fracciones de esta segunda columna se suceden después de los intervalos de tiempos B.

Conviene notar que, en el marco de la invención, el término “eluyente” hace referencia a un producto enriquecido que comprende al menos una de las dichas fracciones. El término “eluyente” no debe por lo tanto ser limitado al resultado de la elución.

5 Particularmente, el eluyente recogido puede estar formado de una sola fracción o de varias fracciones. Por otra parte, el número de fracciones que forman el eluyente pueden variar en el curso del tiempo.

En un modo de realización particular de la invención, el eluyente está formado a partir del conjunto de las fracciones extraídas de la primera columna.

En otro modo de realización particular de la invención, el eluyente recogido puede ser obtenido seleccionando ciertas fracciones extraídas de la primera columna.

10 Una variante de este procedimiento es fijar A más B con valores tales a medida que las inyecciones sucesivas se producen antes de que el producto de interés comience a ser eluido.

Una variante de este producto es fijar A más B con valores fijos en el curso del tiempo.

Una variante de este procedimiento es fijar A más B con valores fijos en el curso del tiempo, determinados de tal forma que A y B no sean múltiplos enteros el uno del otro.

15 Una variante de este procedimiento es el cambio de los valores de A y/o B entre cada inyección.

Una variante de este procedimiento es cambiar los valores de A y/o B en el curso del procedimiento según un protocolo común a las etapas de inyección y de extracción de una misma columna.

Una variante de este procedimiento es dar a y B valores tales que no sean múltiplos enteros el uno del otro.

Una variante de este procedimiento es la reutilización de la primera columna en lugar de la segunda.

20 En un modo de realización particular de la invención, puede ser previsto concentrar el eluyente generado antes de inyectarlo en la segunda columna.

Para este efecto, pueden ser utilizados un evaporador rotativo, por ejemplo de la gama Rotavapor (marca registrada), y/o un dispositivo, tal como un cartucho o una columna, aptos para asegurar el secuestro (por ejemplo por adsorción) luego la liberación de los productos de interés.

25 Una variante de este procedimiento es la conexión de un detector en serie o en paralelo de los dispositivos de extracción.

Una variante de este procedimiento es la utilización de una segunda columna cuya sección se aproxima a un múltiplo notable de la sección de la primera columna.

30 Una variante de este procedimiento es la reinyección de fracciones empobrecidas en producto de interés en el dispositivo.

Una variante de este procedimiento es la reinyección de fracciones enriquecidas en producto de interés en el dispositivo.

Una variante de este procedimiento es que el producto eluido es un producto que se va a eliminar de la mezcla.

35 Una variante de este procedimiento es la conexión de válvulas o dispositivos que permiten purgas, limpieza o el control de presiones en las columnas.

Una variante de este procedimiento es la utilización en bucle de este procedimiento.

Una variante de este procedimiento es operar las inyecciones de mezcla que se van a separar de manera cíclica.

Una variante de este procedimiento es la utilización de montajes de varias columnas en lugar de la primera y/o de la segunda columna.

40 Una variante de este procedimiento es la utilización de un sistema de elución diferente en la segunda columna.

Una variante de este procedimiento es la utilización de un sistema de elución diferente en la segunda columna.

Una variante de este procedimiento es la utilización de una diferencia de presión entre la entrada y la salida del dispositivo.

5 Se propone por otra parte utilizar este procedimiento para la separación o purificación de moléculas de síntesis, productos naturales, proteínas, inmunoglobulinas, péptidos, iones...

Uno de los principales intereses de este procedimiento es que permite inyectar varias veces la mezcla que se va a separar (llamada "cantidades" o "cuantos" en lo que sigue del texto) en la misma columna antes incluso de que las fracciones de interés comiencen a ser eluidas. Por otro lado, contrariamente a otros procedimientos esta invención tolera una superposición de moléculas en el transcurso de la migración inyectadas en tiempos diferentes.

10 Los sitios de inyección y de extracción no son necesariamente desplazados en el curso del procedimiento.

La invención se relaciona igualmente con un dispositivo de separación de fracciones de mezcla para la utilización de uno cualquiera de los procedimientos de separación de fracciones de una mezcla descrita anteriormente.

Según la invención, un tal dispositivo de separación de fracciones de mezcla comprende:

- al menos una columna de cromatografía;

15 - medios de extracción de una pluralidad de fracciones de la dicha columna de cromatografía, con intervalos de tiempo controlados A y/o B;

- medios de inyección en la dicha columna de cromatografía de una mezcla con intervalos de tiempo controlados A, y/o de un eluyente con intervalos de tiempo controlados B, estando formado el dicho eluyente a partir de al menos una de las dichas fracciones extraídas;

20 - medios de recolección de la dicha pluralidad de fracciones extraídas de la dicha columna de cromatografía;

-medios de transferencia de las dichas fracciones extraídas a partir de los dichos medios de recolección hacia los dichos medios de inyección.

25 Los medios de extracción pueden particularmente comprender una o varias válvulas magnéticas, y los medios de inyección pueden comprender por ejemplo uno o varios inyectores provistos de muestreadores controlados automáticamente por un terminal informático.

30 Por otro lado, la recolección de fracciones puede ser efectuada en cualquier recipiente, cartucho o columna conocidos, de forma y contenido conveniente. En un modo de realización ventajoso de la invención, el dicho cartucho o la dicha columna pueden estar configurados de manera que permitan atrapar el producto de interés para a continuación liberarlo particularmente bajo la acción de un solvente, con el objeto de concentrar la elución generada.

En un modo de realización particular de este dispositivo de separación de fracciones de mezcla, la transferencia de fracciones extraídas puede ser realizada por gravedad y/o con la ayuda de una bomba.

35 Además, puede preverse, en al menos un modo de realización particular de la invención, que un tal dispositivo de separación comprenda un conducto de derivación, o "divisor", dispuesto en paralelo a los medios de extracción de las fracciones, conectado con un espectrómetro de masas, con el fin de detectar a partir de qué instante el producto de interés alcanza el nivel de los medios de extracción.

Preferencialmente, un tal dispositivo de separación de fracciones de mezcla comprende medios de sincronización de las dichas inyecciones de mezcla y del eluyente en la o las dichas columnas de cromatografía.

40 En al menos un modo de realización particular de la invención, el dispositivo de separación comprende una columna de cromatografía en la cual la dicha mezcla está destinada a ser inyectada, y una columna de cromatografía en la cual las dichas fracciones recogidas son destinadas a ser inyectadas, solidarizadas por al menos un conducto de transferencia de las dichas fracciones.

45 Según un aspecto particular de la invención, el dicho dispositivo de separación de fracciones de mezcla comprende medios de concentración de fracciones que forman un eluyente extraído de la dicha o de una de las dichas columnas de cromatografía.

Los medios de concentración pueden por ejemplo comprender uno o varios evaporadores rotativos y/o al menos un dispositivo, tal como una columna o un cartucho por ejemplo, aptos para atrapar (particularmente por adsorción) el producto de interés para a continuación liberarlo, particularmente bajo la acción de un solvente eluyente.

5 De manera preferencial, el dicho dispositivo de separación de fracciones de mezcla comprende medios de control automático de los dichos medios de inyección y/o de los dichos medios de extracción y/o de los dichos medios de transferencia.

Estos medios de control pueden, por ejemplo, comprender al menos una automatización programable.

Además, se puede prever una aplicación informática que permita predecir las correcciones que van a aportar a los valores de los intervalos de tiempos A y/o B, en caso de deriva de una duración de elución a través de la columna.

10 En un modo de realización particular de la invención, una etapa previa de optimización de los valores de los intervalos de tiempos A y B, sus variaciones en el transcurso del tiempo, y duraciones de inyección, en función de los resultados de una fase de calibración del dispositivo de separación puede igualmente ser previsto. Un producto de programa de ordenador telecargable desde una red de comunicación y/o registrada en un soporte legible por ordenador y/o ejecutable por un procesador que comprende instrucciones de código de programa para la ejecución de esta etapa de optimización cuando el dicho programa es ejecutado por un ordenador, puede así ser previsto.

15

Otras ventajas de la invención aparecerán con el estudio de las descripciones detalladas provistas más adelante.

El procedimiento general de la invención es proceder con múltiples inyecciones de mezcla que se van a separar en una columna, sin esperar que el producto de interés sea eluido, incluso sin esperar que el grupo de moléculas inyectadas precedentemente no se superponga más con el inyectado a continuación.

20 Estas múltiples inyecciones respetan un primer protocolo que define el valor de A y sus variaciones en el transcurso del tiempo, A se define como el intervalo de tiempo entre dos inyecciones sucesivas; este puede tomar varios valores Δt .

Las fracciones enriquecidas en producto de interés son a continuación recogidas gracias a un dispositivo de extracción al final de la columna que respeta el mismo protocolo que el de inyección.

25 El eluyente obtenido contiene por lo tanto el producto de interés enriquecido con respecto a la mezcla inicial. Pero este está siempre en mezcla con impurezas provenientes de otras inyecciones que migran en la columna.

Estas impurezas que son coeluidas con el producto de interés dependen directamente del protocolo empleado. (Así, para la variante cuyo protocolo define A como un valor fijo en el curso del procedimiento, las impurezas coeluidas presentan un tiempo de retención igual al del producto de interés más o menos los múltiplos enteros del valor de A).

30 En un segundo tiempo reiniciando la operación sobre el eluyente recogido precedentemente con un protocolo de inyección y de extracción diferente, las impurezas se encuentran eliminadas:

Múltiples inyecciones son de nuevo efectuadas respetando un nuevo protocolo que define el valor de B y sus variaciones en el curso del tiempo, B se define como el intervalo de tiempo entre dos inyecciones; este toma varios valores Δt .

35 Las fracciones purificadas son a continuación recogidas gracias un dispositivo de extracción al final de la columna que respeta este mismo nuevo protocolo.

El procedimiento inventado es colocado en un dispositivo que funciona en dos fases, estas dos fases pueden ser efectuadas en la misma columna en dos instantes diferentes (figura 2), o en dos columnas de manera simultánea (figura 1).

40 - Fase 1: El dispositivo está compuesto de un inyector (11), de una columna de cromatografía (C1) y de un dispositivo de recolección de fracciones (S1). Esta parte del dispositivo asegura las funciones de inyecciones múltiples de la mezcla que se va a separar en el dispositivo y de recolección de las fracciones enriquecidas respetando un protocolo 1 definido. Este protocolo 1 impone el ritmo común de las inyecciones y de las extracciones de la fase 1. El control de las inyecciones y de las extracciones según el ritmo impuesto por el protocolo 1 está ventajosamente asegurado a través de un programa informático de gestión del funcionamiento de la columna de cromatografía (no representado en las figuras 1 y 2). Las inyecciones se suceden después de los intervalos de tiempo A cuyas variaciones son definidas en el protocolo 1. Las múltiples extracciones del producto de interés se suceden a continuación después de los intervalos de tiempo A cuyas variaciones siguen el mismo protocolo 1 que el

45

de las inyecciones. Esto conduce a la formación de un eluyente, enriquecido en fracción de interés.

5 - Fase 2: El dispositivo está compuesto de un inyector (I2), de una columna (C2) de cromatografía y de un dispositivo de recolección de fracciones (S2). Esta parte del dispositivo asegura las funciones de inyección del eluyente precedentemente obtenido en el dispositivo y de recolección de las fracciones purificadas respetando un protocolo 2
10 definido. Este protocolo 2 impone el ritmo común de las inyecciones y de las extracciones de la fase 2, el pilotaje de las inyecciones y de las extracciones según el ritmo impuesto por el protocolo 2 es ventajosamente asegurado a través de un programa informático de gestión del funcionamiento de la columna de cromatografía (no representado en las figuras 1 y 2). Las inyecciones se suceden después de los intervalos de tiempo B cuyas variaciones están definidas en el protocolo 2. Las múltiples extracciones en el producto de interés se suceden a continuación después de los intervalos de tiempo B cuyas variaciones siguen el mismo protocolo 2 que el de las inyecciones.

En lo que sigue designaremos por "frecuencia de inyección", representada por Δt los valores tomados por A o B, los intervalos de tiempo entre dos inyecciones sucesivas.

La figura 1 ilustra un funcionamiento del procedimiento entre otros:

15 (I1) designa el inyector número 1, este inyecta la muestra que se va a separar respetando entre cada inyección los tiempos A cuyas variaciones están determinadas por un protocolo definido (protocolo 1).

(C1) designa la primera columna de cromatografía en la cual se asegura la separación del producto de interés.

20 (S1) designa el dispositivo de extracción número 1, este recoge las fracciones de interés de la columna (C1) respetando el mismo protocolo 1 que el de las inyecciones (1), si estas son orientadas hacia el inyector (I2). Fuera de los períodos de elución del producto de interés, el flujo de solvente que contiene las impurezas que se van a eliminar (2) está orientado hacia el colector de las fracciones no valorizables.

(I2) designa el inyector número 2, este colecta las fracciones de interés recolectadas por (S1) y las inyecta en la columna (C2) respetando un segundo protocolo (protocolo 2) que fija las variaciones del valor de B en el transcurso del tiempo.

(C2) designa la segunda columna de cromatografía en la cual se asegura la separación del producto de interés.

25 (S2) designa el dispositivo de extracción número 2, este recoge las fracciones de interés de la columna (C2) respetando el mismo protocolo 2 que el de las inyecciones (5). Fuera de los períodos de elución del producto de interés, el flujo de solvente que contiene las impurezas que se van a eliminar (4) está orientado hacia el colector de las fracciones no valorizables.

Las flechas representan el flujo de solvente.

30 El punto (E) designa la entrada de la mezcla que se va a purificar, el punto (F) el lugar de la recolección de la fracción purificada y el punto (G) el colector con fracciones no valorizables.

La figura 2 representa una variante del procedimiento según la cual la segunda columna es diferente de la primera, esta puede particularmente comprender dimensiones superiores o inferiores a la primera o utilizar un sistema diferente de elución, o de fase sólida.

35 En esta variante, (I1) designa el inyector número 1, este inyecta la mezcla que se va a separar respetando entre cada inyección los tiempos A que están determinados por un primer protocolo definido (protocolo 1).

(C1) designa la primera columna de cromatografía en la cual se asegura la separación del producto de interés.

40 (S1) designa el dispositivo de extracción número 1, este recoge las fracciones de interés de la columna (C1) respetando el ritmo fijado por el protocolo 1 (1). Estas fracciones de interés son orientadas hacia el inyector (I2). Fuera de los períodos de elución del producto de interés, el flujo de solvente que contiene las impurezas que se van a eliminar (2) está orientado hacia el colector de fracciones no valorizables.

(I2) designa el inyector número 2, este colecta las fracciones de interés recogidas por (S1) y las inyecta en la columna (C2) respetando un segundo protocolo (protocolo 2) que fija las variaciones del valor de B en el transcurso del tiempo.

45 (C2) designa la segunda columna de cromatografía en la cual se asegura la separación del producto de interés.

(S2) designa el dispositivo de extracción número 2, este recoge las fracciones de interés de la columna (C2) respetando el mismo protocolo 2 que el de las inyecciones (5). Fuera de los períodos de elución del producto de interés, el flujo de solvente que contiene las impurezas que se van a eliminar (4) está orientado hacia el colector de fracciones no valorizables.

5 Las flechas representan el flujo de solvente.

El punto (E) designa la entrada de mezcla que se va a purificar, el punto (F) el lugar de la recolección de la fracción purificada y el punto (G) el colector de fracciones no valorizables.

Hay que resaltar el interés de esta variante cuando la sección de la segunda columna se aproxima al mínimo de B/A múltiplo de la sección de la primera columna.

10 Esto permite en efecto conservar un flujo de material constante: en la segunda columna las inyecciones son B/A veces menos frecuentes que en la primera columna, la segunda columna puede por lo tanto tener un flujo más débil que la primera que lo alimenta. Para evitar que las capacidades de almacenamiento del inyector (I2) sean sobrepasadas, puede ser necesario aumentar en B/A el volumen inyectado en la segunda columna. Particularmente aumentando en B/A la sección de la segunda columna. Es igualmente posible, en esta variante del dispositivo, modificar las condiciones de elución en esta segunda columna para modificar la diferencia de tiempos de retención entre las impurezas y el producto de interés, esto con el fin de que no sean más de un múltiplo entero de la frecuencia de inyección, por ejemplo.

La figura 3 representa una variante del procedimiento según la cual la primera columna y la segunda columna son las mismas.

20 En este caso (I) designa el inyector, este inyecta la mezcla que se va a separar respetando entre cada inyección los tiempos A (fase 1) luego B (fase 2) cuyas variaciones son determinadas, como precede, por un protocolo definido (protocolo 1) durante la fase 1, luego por un segundo protocolo (protocolo 2) durante la fase 2.

(C) designa la columna de cromatografía en la cual se asegura la separación del producto de interés.

25 (S) designa el dispositivo de extracción, este recoge las fracciones de interés de la columna (C) según el protocolo 1 durante la fase 1, luego según el protocolo 2 durante la fase 2 (1), estas son orientadas hacia los depósitos durante la primera fase (3) y hacia el colector de la fracción purificada durante la fase 2 (5). Fuera de los períodos de elución del producto de interés, el flujo de solvente que contiene las impurezas que se van a eliminar (4) es orientado hacia el colector de las fracciones no valorizables.

Las flechas representan el flujo de solvente.

30 El punto (E) designa la entrada de la mezcla que se va a purificar, el punto (F) el lugar de recolección de la fracción purificada, el punto (G) el colector con fracciones no valorizables y (R) el depósito que contiene la mezcla de fracciones de interés extraídas durante la primera fase que alimenta el inyector durante la fase 2 (6).

35 Las figuras 4a y 4b representan en diferentes instantes el contenido de la primera columna de cromatografía del instante t_0 al instante $t_0 + nA$, en donde t_0 representa el tiempo al cual ha tenido lugar la primera inyección y n representa el número de inyecciones necesarias que se van a efectuar para inyectar la totalidad de la mezcla que se va a separar en la columna. A designa los intervalos de tiempo entre dos inyecciones.

La figura 4a representa la variante según la cual A es fija en el transcurso del tiempo. La figura 4b representa una variante según la cual A no es fija en el transcurso del tiempo y se determina para cada inyección por un protocolo común a las inyecciones y extracciones.

40 La flecha vertical de la izquierda representa el flujo de solvente en la columna.

(I) representa el sitio de inyección en la columna, y (E) el sitio de elución.

45 Los trazos punteados numerados de (1) a (n-1) representan el producto de interés en el transcurso de migración en la columna. Se observa en estas figuras que después de cada inyección espaciada de A, tiene lugar una nueva inyección de mezcla que se va a purificar, esta se produce sin por tanto esperar que el producto de interés proveniente de la inyección precedente sea eluido de la columna, o incluso separado de una impureza en el transcurso de la migración.

En un mismo momento varios cuantos de la mezcla que se va a separar pueden por lo tanto hacerse migrar en la

misma columna con un espaciamento regular de $\Delta t = A$ para la figura 4a y los espaciamentos Δt variables en la figura 4b.

5 |T0) representa el tiempo en el cual tiene lugar la primera inyección y (n') representa el número de inyecciones necesarias que se van a efectuar para inyectar en la columna la totalidad de las fracciones de interés obtenidas precedentemente. B designa los intervalos de tiempo entre dos inyecciones que están en la ilustración de esta variante, definida por un protocolo que determina B como un valor fijo en el transcurso del tiempo.

La flecha vertical de la izquierda representa el flujo de solvente en la columna.

(I') representa el sitio de inyección en la columna, y (E') el sitio de elución.

10 | Los trazos punteados numerados de (1) a $n'-1$) representan el producto de interés en el transcurso de migración en la columna. Se observa en esta figura que después de cada inyección espaciada de B tiene lugar una nueva inyección de la mezcla que se va a purificar, esta se produce sin por lo tanto esperar que el producto de interés proveniente de la inyección precedente sea eluido de la columna.

15 | En un mismo momento varios cuantos de la mezcla que se van a separar pueden por lo tanto hacerse migrar en la misma columna con un espaciamento regular de $\Delta t = B$ (para un protocolo de fijación B como fijo en el transcurso del tiempo), o variable (para un protocolo de fijación de los diferentes valores de Δt en cada instante).

20 | En estas variantes ilustradas por la figura 4a, la purificación se obtiene por el hecho de que las impurezas, coeluidas con el producto de interés todos los A minutos durante la primera fase, no son más extraídas en el mismo tiempo que el producto de interés en una segunda fase (por ejemplo la ilustrada por la figura 5). Siendo diferentes las frecuencias de inyección y de recolección de las fracciones de interés de una fase a la otra (protocolo 1 y 2 diferentes):

Así, a la salida de la primera columna, el producto de interés que se va a aislar o a purificar se eluye en los tiempos de retención (t_r) del producto, luego $t_r + A$ mn, $t_r + 2A$ mn, $t_r + 3A$ mn, ..., $t_r + nA$ mn.

25 | Recolectando no más que fracciones de interés con una periodicidad A, se elimina una gran parte de impurezas de la mezcla. En el estado de procedimiento no persisten mezcla con el producto de interés recogido, más que las impurezas provenientes de inyección precedentes o siguientes. Estas impurezas presentan tiempos de retención habiéndoles permitido ser eluidas durante una fase de extracción de fracciones de interés, de la cual un múltiplo de A minutos desde el tiempo de retención del producto de interés.

30 | Inyectando todos los B minutos (con B que tiene un valor diferente de A y que no es un múltiplo de A) está recogida de eluyentes en la misma columna, se eliminan las impurezas que coeluyen con los productos de interés en la primera fase.

Efectivamente en esta segunda fase las impurezas migran siempre con los t_r equivalente a $t_r + A$ mn, $t_r + 2A$ mn, ..., $t_r + nA$ mn sin embargo el producto de interés que se va a aislar o a purificar es eluido en los tiempos de retención del producto t_r , luego $t_r + B$ mn, $t_r + 2B$ mn, $t_r + 3B$ mn, ..., $t_r + nB$ mn.

35 | La extracción no se produce más en los mismo tiempos para las impurezas: eluidas a $t_r + A$ mn, $t_r + 2A$ mn, $t_r + 3A$ mn, ..., $t_r + nA$ mn; y para el producto de interés eluido a $t_r + B$ mn, $t_r + 2B$ mn, ..., $t_r + nB$ mn. Esto induce por lo tanto a un desfase entre la elución de los picos de las impurezas y de los productos de interés.

La purificación obtenida gracias a este procedimiento, ilustrada en esta variante es garantizada por la modificación de las frecuencias de inyección entre la segunda y la primera fase del procedimiento.

40 | Otra variante de este procedimiento, representada en la figura 4b es proceder con inyecciones entre las cuales A no es constante en el interior de una misma fase, A puede entonces tomar varios valores Δt . Las variaciones de A respetan un programa de variaciones del valor de Δt común a las fases de inyecciones y de extracciones en una misma fase (protocolo 1).

Se ve en esta figura que A toma sucesivamente los valores Δt_1 , Δt_2 , Δt_3 , y así sucesivamente. La extracción se produce en este caso respetando sucesivamente los intervalos de tiempo de Δt_1 , Δt_2 , Δt_3 , y así sucesivamente.

45 | La purificación, se asegura en este caso, por el cambio de protocolo entre la fase 1 (protocolo 1) y la fase 2 (protocolo 2).

Otra variante no representada en las figuras consiste en colocar en paralelo o en serie dispositivos de extracción uno

o más detectores.

El dispositivo inventado y estas variantes permiten por lo tanto inyectar todos los A minutos n veces la mezcla que se va a separar en la misma columna sin tener que esperar que el producto de interés sea eluido.

5 El interés de esta invención es poder separar eficazmente y a gran escala los componentes de una mezcla multiplicando el rendimiento de una sola columna por varios factores. En efecto permite inyectar en una columna de cromatografía muy numerosas veces la mezcla que se va a separar antes incluso que el producto de interés comience a ser eluido, sin incluso esperar que una separación eficaz sea obtenida con impurezas provenientes de otras inyecciones.

10 Este procedimiento permite esperar comportamientos de cromatografía muy importantes con un material y de inversiones mucho más bajas, limitar la utilización de solventes cuya eliminación es por otra parte a menudo costosa y limitar el coste de estudios de transposición de escalas.

Ejemplos:

15 Este ejemplo sirve solo para ilustrar un funcionamiento del procedimiento inventado entre otros, no nos limitaremos más que a explicitar el procedimiento cuando es aplicado a una cromatografía líquida en una columna de cromatografía. Las figuras utilizadas para ilustrar este ejemplo no hacen referencia más que a las etapas citadas en ejemplo, no son dadas más que a título de ejemplo y no son limitativas.

La figura 8 representa una parte del cromatograma de la mezcla que se va a separar.

20 Se tomara aquí a título de ejemplo la separación de una mezcla, por lo tanto, se busca purificar un producto de interés (X) de sus impurezas, entre las cuales (Y1), (Y2) y (Y3) (figura 8). El tiempo de retención del producto (X) de interés es de 44 mn, el de (Y1) es 41 mn, el de (Y2) 48,5 mn y el de (Y3) de 54,5 mn.

Se tomarán a título de ejemplo los protocolos según los cuales A y B son fijos en el transcurso del procedimiento, con A = 3 mn y B = 5 mn y se utilizará la misma columna en la dos principales secuencias del procedimiento para no afectar la comprensión.

25 Fase 1: (figura 6) en el tiempo t_0 , una parte de la mezcla que se va a separar se inyecta en el punto (I) de la columna cuyo flujo del solvente está simbolizado por la flecha vertical de la izquierda. El tiempo $t_0 + A$, 3 minutos más tarde en nuestro ejemplo, se inyecta de la misma manera una segunda parte de la mezcla que se va a separar. Esta inyección tiene lugar en el mismo punto (I) precedente.

30 En el tiempo $t_0 + 2A$, sea aún 3 minutos más tarde en el ejemplo y por lo tanto 6 minutos después de haber iniciado el procedimiento, se inyectan de la misma manera una tercera parte de la mezcla que se va a separar. Esta inyección tiene siempre lugar en el mismo punto (I) precedente.

Estas inyecciones son así sucesivamente repetidas con la misma periodicidad de 3 minutos (protocolo 1: A se fija en el transcurso del tiempo) hasta el agotamiento de la mezcla que se va a separar. La inyección se hace siempre en el mismo lugar en las condiciones de solvente, temperatura, flujo y otros factores habitualmente modificados no son cambiados.

35 Hay que anotar que en los tiempos $t = 42$ mn la columna contiene 14 fracciones de la mezcla que se va a separar en el transcurso de la migración.

En la figura se representan las posiciones de estas fracciones de producto de interés mientras que en el transcurso de la migración en la columna: numeradas de 1 a 14.

40 A partir de la fracción en 44 minutos de tiempos de retención del producto de interés, este va a ser eluido durante 3 minutos. La figura 9 representa la superposición de tres primeros cromatogramas de la mezcla comigrante en la misma columna con un desfase de 3 minutos (período A impuesto por el protocolo 1), la curva en trazo grueso representa el cromatograma obtenido por la inyección de la primera cantidad de mezcla. La curva en punteado representa el cromatograma desfasado 3 minutos, este corresponde con la inyección de la segunda cantidad de la mezcla y la curva en trazo continuo representa el cromatograma correspondiente con la inyección de la tercera cantidad de mezcla que se va a separar.

45 El dispositivo de recuperación del eluyente permite recuperar el eluyente de la columna durante los 3 minutos a partir del tiempo de retención del producto de interés. Se trata de un dispositivo de recolección de las fracciones que extrae según el mismo protocolo que es seguido por las inyecciones, aquí, a los tiempos t_r , $t_r + 3$ mn, $t_r + 2 \times 3$ mn, t_r

+ 3x3 mn hasta $t_r + n \times 3$ mn, la fracción de interés. Fuera de estos períodos en donde el dispositivo recupera la fracción de interés, el flujo de solvente se orienta hacia una cubeta de recuperación de los eluyentes no valorizables.

(S1), (S2) y (S3) (figura 9) representan los períodos de extracción de la fracción de interés, intervienen durante los A minutos y por lo tanto aquí, durante los 3 minutos, aquí mayoritariamente Y1.

- 5 Las impurezas Y2 y Y3 que tienen diferencias de tiempo de retención con el producto de interés que no son múltiplos enteros de 3 minutos (la frecuencia de inyección), no son extraídas durante las secuencias (S) de extracción.

Se constata sin embargo que la impureza Y1 se encuentra coeluida con el producto de interés en la medida en donde su tiempo de retención es el del producto de interés X menos A = 3 mn ($44 \text{ mn} - 3 \text{ mn} = 41 \text{ mn}$).

- 10 La recolección de las fracciones de interés conduce a la formación de una mezcla que contiene el producto de interés con las impurezas que tienen una diferencia de tiempos de retención con el producto de interés múltiplo entero de 3 minutos.

En nuestro ejemplo el eluyente recuperado contiene:

- el producto X inyectado luego de t_0 ,

- 15 - el producto X inyectado luego de t_1 y las impurezas que provienen de la primera inyección que tienen un $t_r = 44 \pm 3$ minutos.

- el producto X inyectado después de t_2 , las impurezas que provienen de la primera inyección que tienen un $t_r = 44 + 6$ minutos y las impurezas que provienen de la primera inyección que tiene un $t_r = 44 + 3$ minutos,...

- y así sucesivamente.

- 20 En donde $t_1 = t_0 + 3 \text{ mn}$, $t_2 = t_0 + 6 \text{ mn}$,... $t_n = t_0 + n \times 3 \text{ mn}$.

Reinventándose esta mezcla y modificando los intervalos de inyección y de recolección (B se fija a 5 minutos y constante en el ejemplo: es el protocolo 2) en una segunda parte del dispositivo, es posible eliminar estas impurezas: figura 7.

- 25 Fase 2 (representada en la figura 7): a los tiempos T_0 , una parte de la mezcla precedentemente obtenida se inyecta en el punto (I') de la columna cuyo flujo de solvente está simbolizado por la flecha vertical de la izquierda.

En los tiempos $T_0 + B$, sea 5 minutos más tarde en el ejemplo, se inyecta de la misma manera una segunda parte de la mezcla obtenida al final de la fase 1. Esta inyección tiene lugar en el mismo punto (I') que precede.

- 30 En los tiempos $T_0 + 2B$, sea aún 5 minutos más tarde en nuestro ejemplo y por lo tanto 10 minutos después de haber iniciado el procedimiento, se inyectan de la misma manera una tercera parte de la mezcla que se va a separar. Esta inyección tiene siempre lugar en el mismo punto (I') que precede.

Estas inyecciones son así sucesivamente repetidas con la misma periodicidad de 5 minutos hasta el agotamiento de la mezcla obtenida al final de la fase 1. La inyección se hace siempre en el mismo lugar y las mismas condiciones de solvente, temperatura, flujo u otros factores habitualmente modificados que no son cambiados.

- 35 Hay que anotar que en tiempos $T = 42$ minutos la columna contiene 8 fracciones de mezcla que se va a separar en el transcurso de la migración.

En la figura se representan las posiciones, numeradas de (1') a (8'), de estas fracciones de producto de interés en el transcurso de la migración en la columna.

- 40 A partir del minuto 44, el producto de interés se eluye durante los 5 minutos (el tiempo de retención t_r es efectivamente, en este ejemplo, el mismo que precede en la medida en la que se ha escogido conservar la misma columna).

El dispositivo de recuperación del eluyente (semejante precedente) permite recuperar el eluyente de la columna respetando el protocolo 2, sea, durante los 5 minutos a partir del tiempo de retención del producto de interés. Se trata de un dispositivo que respeta el protocolo 2 (B se fija en el transcurso del tiempo) de recolección de fracciones que extrae a los tiempos t_r , $t_r + 5 \text{ mn}$, $t_r + 2 \times 5 \text{ mn}$, $t_r + 3 \times 5 \text{ mn}$ hasta $t_r + n \times 5 \text{ mn}$, la fracción de interés. Fuera de

estos períodos en donde el dispositivo recupera la fracción de interés, el flujo del solvente se orienta hacia una cubeta de recuperación de los eluyente no valorizables.

Esta recolección de las fracciones de interés conduce a la formación de una fracción altamente purificada en el producto de interés.

- 5 Efectivamente la impurezas coeluidas con el producto de interés durante la primera fase con un tr de un múltiplo de 3 minutos no son más en la segunda fase recuperadas al mismo tiempo que el producto de interés puesto que este es eluido durante los 5 minutos. Así la impureza Y1 migra con un tr de 41 minutos, se eluye a 41 mn, luego 46 mn, 51 mn, 56 mn... mientras que el producto de interés X se recoge a los 44 minutos, luego 49 mn, 54 mn, 59 mn.

La recolección de las fracciones de interés conduce a la obtención del producto purificado.

- 10 Solamente pueden persistir los potenciales no purificados que tienen un tiempo de retención = tr del producto de interés +/- nx3x5 minutos, sea las impurezas que migran con un tr de 44 +/- 15 minutos, 44 +/- 30 minutos,...

En el ejemplo ninguna impureza migra en estos tiempos de retención, una etapa suplementaria de este procedimiento con un intervalo de inyección de 7 minutos, por ejemplo, no obstante los habría eliminado.

- 15 Se constata en este ejemplo que en dos fase es posible hacer migrar 8 veces más de la mezcla que se va a separar en la columna en un mismo instante que podría clásicamente soportar.

Reivindicaciones

1. Un procedimiento de separación de fracciones de una mezcla que se va a separar por cromatografía líquida que comprende las etapas de:
 - 5 - inyecciones múltiples de la mezcla que se va a separar: las inyecciones se suceden después de los intervalos de tiempos A en una columna de cromatografía,
 - extracciones múltiples: la extracción de fracciones de esta columna se suceden después de los intervalos de tiempo A, que generan un eluyente enriquecido de fracción de interés, formado a partir de al menos una de las dichas fracciones extraídas,
 - 10 Inyecciones múltiples del eluyente recogido precedentemente: las inyecciones se suceden después de los intervalos del tiempo B en una segunda columna de cromatografía,
 - extracciones múltiples: la extracción de las fracciones de esta segunda columna se suceden después de los intervalos de tiempos B.
2. El procedimiento de separación según la reivindicación 1 en el cual las inyecciones se hacen en una columna de forma que puedan intervenir antes de las primeras eluciones de las fracciones de interés de esta misma columna.
- 15 3. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 o 2 en la cual las inyecciones se hacen en una columna de forma que puedan intervenir sin que una separación sea obtenida con los cromatogramas provenientes de inyecciones precedentes.
4. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1, 2 o 3 en el cual A y/o B están fijos en el transcurso del tiempo.
- 20 5. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 3 en el cual A y/o B varían en el transcurso del tiempo.
6. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 5 en el cual A y/o B son determinados para no ser múltiplos enteros el uno del otro.
- 25 7. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 6 en el cual la segunda columna es la misma que la primera.
8. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende una etapa de concentración del eluyente generado antes de proceder a las etapas de inyecciones múltiples en la dicha segunda columna de cromatografía.
- 30 9. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 8 en el cual los sistemas eluyentes puestos en juego en la segunda columna son diferentes de los puestos en juego en la primera.
10. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 9 en el cual la inyección de la mezcla que se va a separar es cíclica.
11. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 10 en el cual el producto de interés es el que se va a eliminar de una mezcla.
- 35 12. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 11 en el cual las columnas son reemplazadas por una o por montajes de varias columnas.
13. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 12 en el cual el detector es agregado en paralelo o en serie con el dispositivo de extracción.
- 40 14. El procedimiento de separación según una de las reivindicaciones 1 a 13 en el cual la sección de la segunda columna se aproxima a un múltiplo notable de la sección de la primera columna.
15. Dispositivo de separación de fracciones de mezcla para la utilización del procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende:
 - una primera (C1) y una segunda (C2) columnas de cromatografía, pudiendo la dicha segunda columna (C2) ser la

misma que la primera columna (C1);

- 5 - medios de extracción y recolección (S1) de una pluralidad de fracciones de la dicha primera columna de cromatografía (C1), con intervalos de tiempo controlados A y medios de extracción y recolección (S2) de una pluralidad de fracciones de la dicha segunda columna de cromatografía (C2), con intervalos de tiempo controlados B;
- medios de inyección (I1) en la dicha primera columna de cromatografía (C1) de una mezcla con intervalos de tiempo controlados A, y medios de inyección (I2) en la dicha segunda columna (C2) de un eluyente con intervalos de tiempo controlados B, estando formado el dicho eluyente a partir de al menos una de las dichas fracciones extraídas de la dicha primera columna (C1);
- 10 - medios de transferencia de las dichas fracciones extraídas de los dichos medios de extracción y recolección (S1) de una pluralidad de fracciones de la dicha primera columna de cromatografía (C1) hacia los dichos medios de inyección (I2) en la segunda columna (C2);
- un colector de las fracciones no valorizables (G);
- 15 - medios de control automático de los dichos medios de inyección (I1; I2) y de los dichos medios de extracción y de recolección (S1; S2).

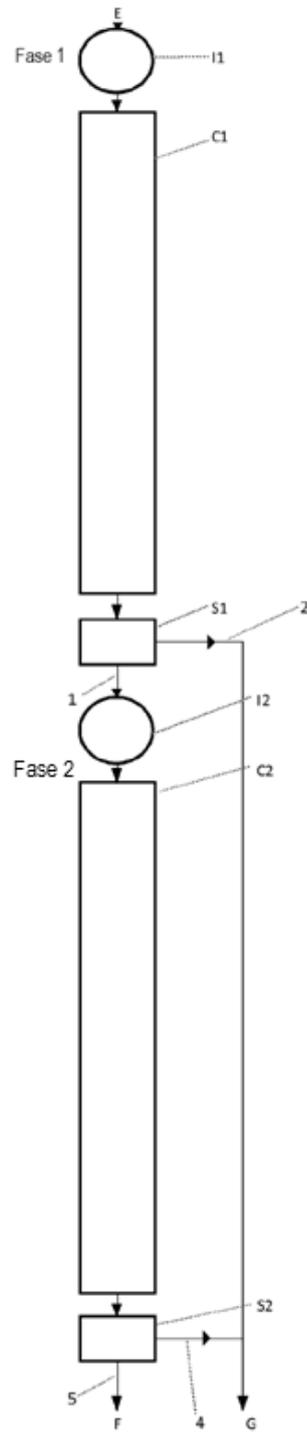


Fig. 1

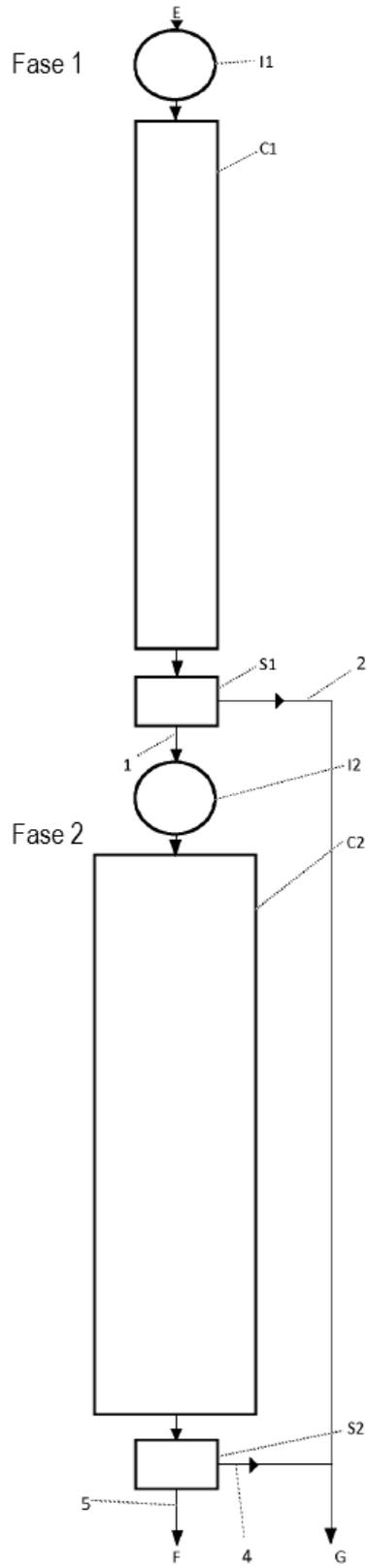


Fig. 2

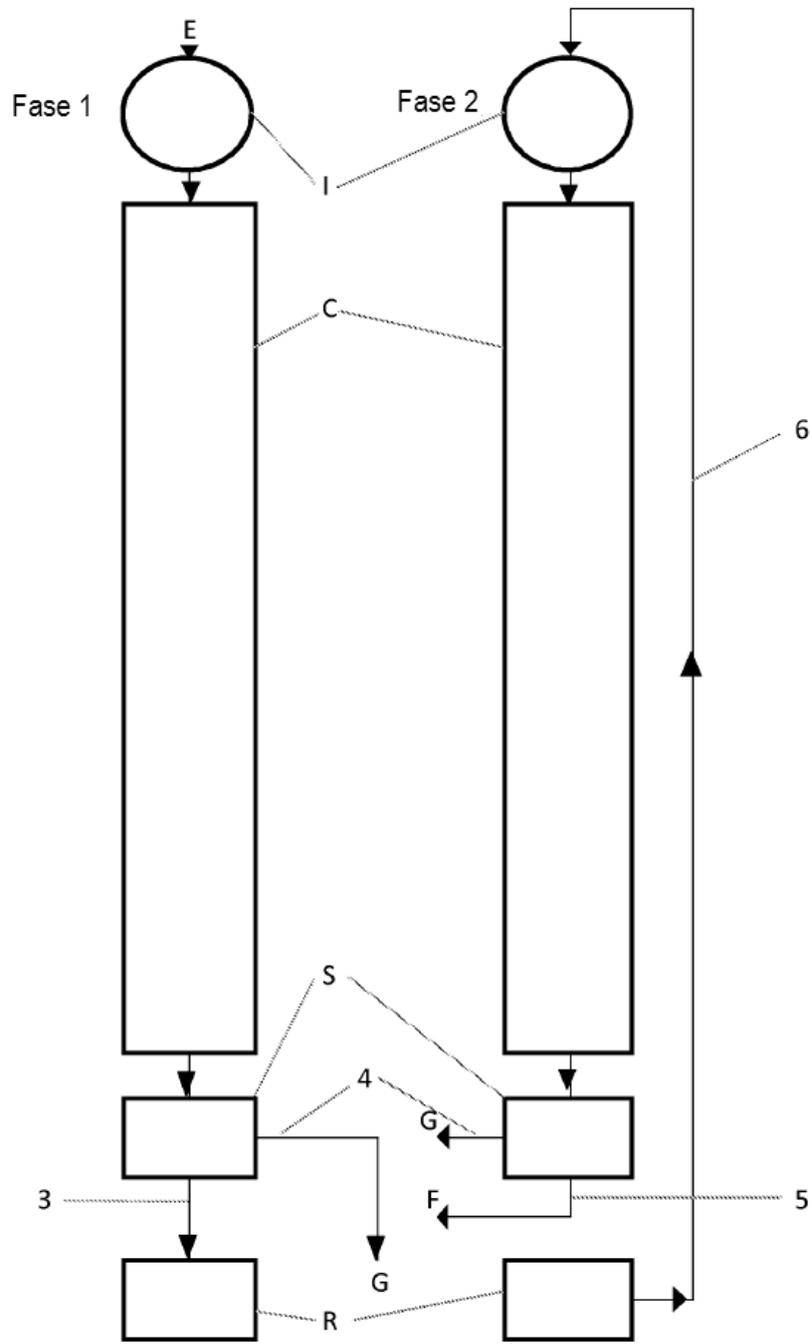


Fig. 3

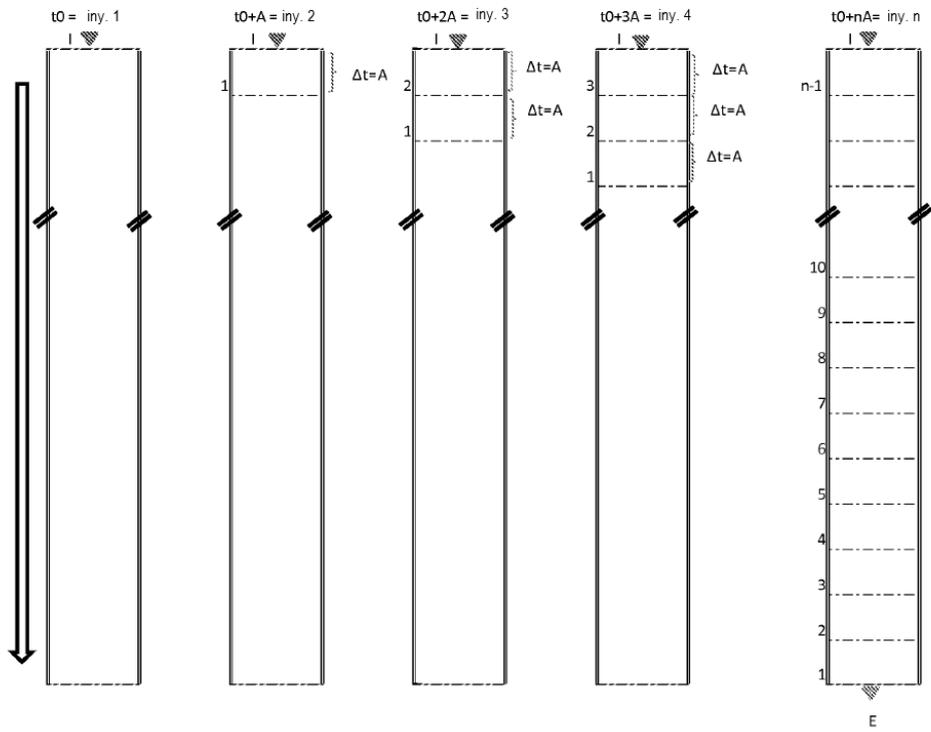


Fig. 4a

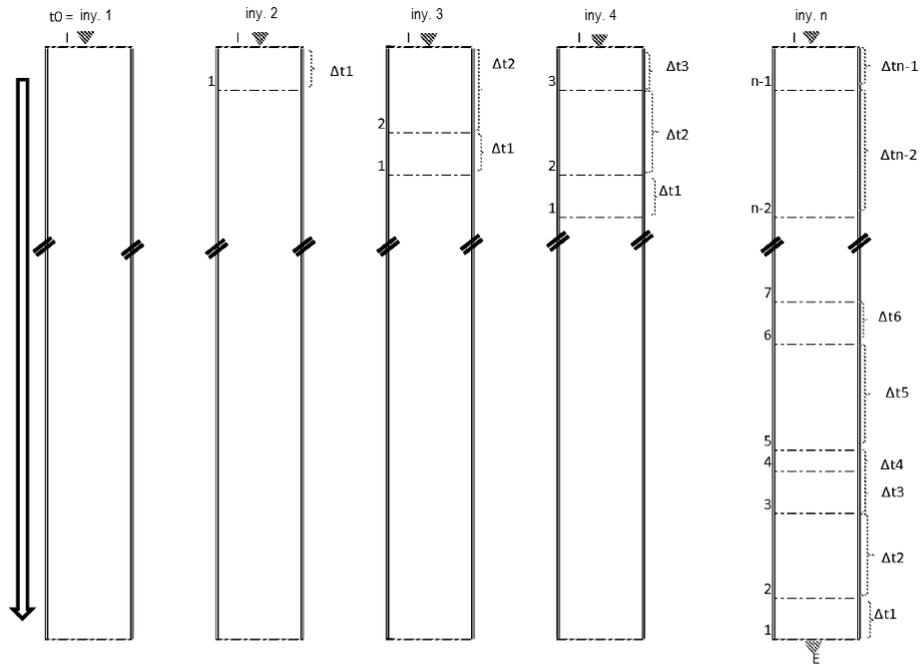


Fig. 4b

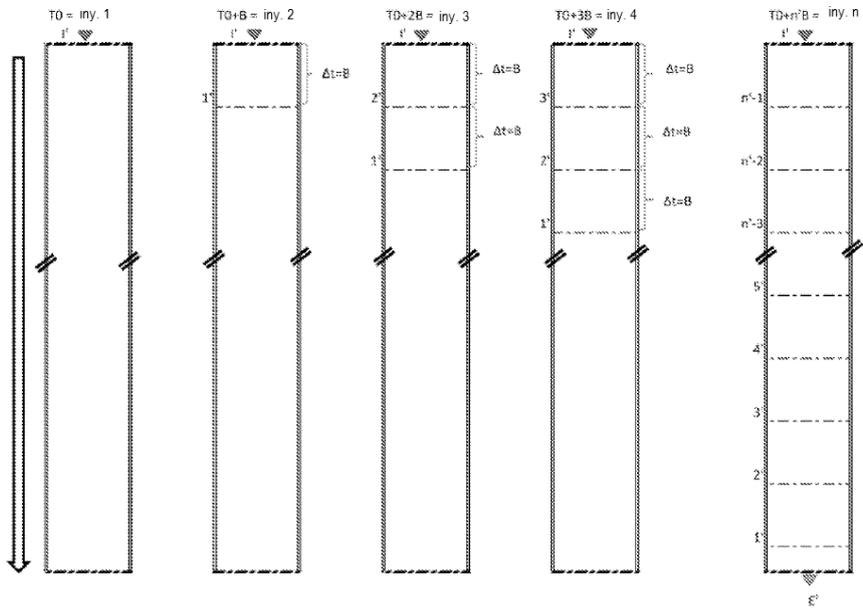


Fig. 5

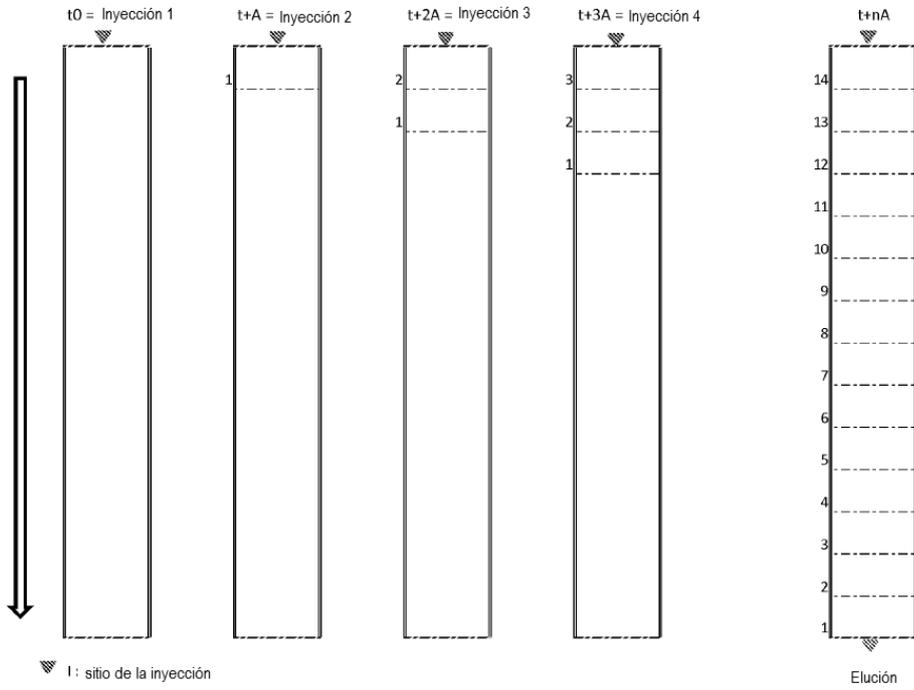


Fig. 6

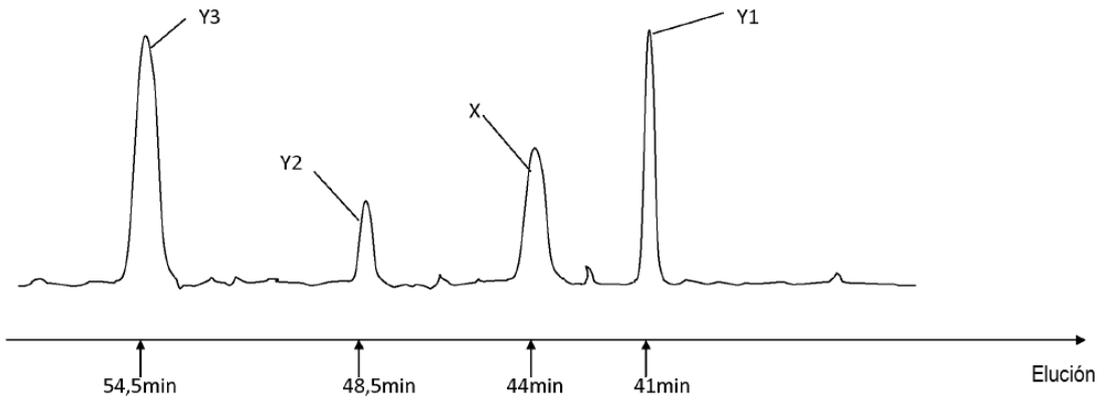


Fig. 8

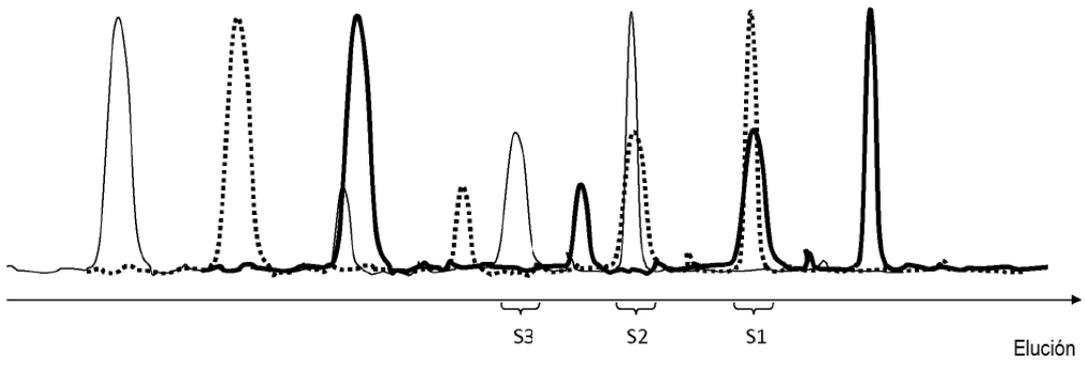


Fig. 9