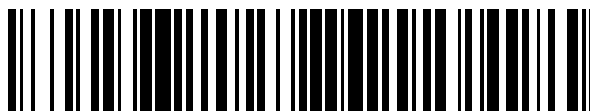


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 536**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/18** (2006.01)

**B01D 15/38** (2006.01)

**C11B 3/10** (2006.01)

**C11C 1/00** (2006.01)

**C11C 1/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/GB2012/051592**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005047**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12735933 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2613859**

54 Título: **Proceso de separación cromatográfica calentada**

30 Prioridad:

**06.07.2011 GB 201111594**

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

**10.11.2017**

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 2 641 536 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 de separación cromatográfica calentada

- 5 La presente invención se refiere a un proceso de separación cromatográfica mejorado para purificar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y sus derivados. En particular, la presente invención se refiere a un proceso de separación cromatográfica mejorado que permite utilizar una cantidad reducida de eluyente.
- 10 Los ácidos grasos, en particular los AGPI, y sus derivados son precursores de moléculas biológicamente importantes, que juegan un papel importante en la regulación de funciones biológicas tales como la agregación plaquetaria, la inflamación y las respuestas inmunológicas. De este modo, los AGPI y sus derivados pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de una amplia gama de afecciones patológicas incluyendo afecciones del SNC; neuropatías, incluyendo neuropatía diabética; enfermedades cardiovasculares; el sistema inmunitario general y las afecciones inflamatorias, incluyendo las enfermedades inflamatorias de la piel.
- 15 Los AGPI se encuentran en materias primas naturales, tales como aceites vegetales y aceites marinos. Dichos AGPI, sin embargo, con frecuencia están presentes en dichos aceites en mezcla con ácidos grasos saturados y muchas otras impurezas. Por lo tanto, los AGPI deseablemente se deben purificar antes de un uso nutricional o farmacéutico.
- 20 Desafortunadamente, los AGPI son extremadamente frágiles. Así, cuando se calientan en presencia de oxígeno, son propensos a la isomerización, peroxidación y oligomerización. Por lo tanto, es difícil el fraccionamiento y la purificación de productos de AGPI para preparar ácidos grasos puros. La destilación, incluso bajo vacío, puede dar lugar a una degradación no aceptable del producto.
- 25 Las técnicas de separación cromatográfica son bien conocidas por los expertos en la materia. Las técnicas de separación cromatográfica que implican sistemas de lecho fijos y sistemas de lecho móvil simulado o real son familiares para un experto en la materia.
- 30 En un sistema cromatográfico de lecho estacionario convencional, una mezcla cuyos componentes se han de separar se filtra a través de un recipiente. El recipiente generalmente es cilíndrico, y normalmente se denomina columna. La columna contiene un empaquetamiento de un material poroso (denominado generalmente fase estacionaria) que presenta una alta 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. Por lo tanto, algunos de los componentes tienden a fijarse fuertemente a la fase estacionaria y, por tanto, se filtran lentamente, mientras que otros tienden a fijarse débilmente y salen de la columna más rápidamente. Se han propuesto muchos sistemas de cromatografía de lechos estacionarios diferentes y se utilizan tanto para fines analíticos como para la producción industrial.
- 35 40 La cromatografía de lecho móvil simulado y real son técnicas conocidas y familiares para los expertos en la materia. El principio de la operación implica el movimiento en contracorriente de una fase líquida de eluyente y una fase adsorbente sólida. Esta operación permite un uso mínimo de solvente haciendo que el proceso sea económicamente viable. Esta tecnología de separación ha encontrado varias aplicaciones en diversas áreas, incluyendo hidrocarburos, productos químicos industriales, aceites, azúcares y API.
- 45 Así, un aparato cromatográfico en lecho móvil simulado consiste en una serie de columnas individuales que contienen adsorbente que están conectadas juntas en serie. El eluyente se hace pasar a través de las columnas en una primera dirección. Los puntos de inyección del material 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 general es simular el funcionamiento de una única columna que contiene un lecho móvil del adsorbente sólido, el adsorbente sólido que se mueve en una dirección a contracorriente al flujo del eluyente. De este modo, un sistema de lecho móvil simulado consiste en columnas que, como en un sistema de lecho estacionario convencional, contienen lechos estacionarios de adsorbente sólido a través de los cuales se pasa el eluyente, pero en un sistema de lecho móvil simulado la operación es tal que simula un lecho móvil continuo a contracorriente.
- 50 55 Un aparato cromatográfico 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 una fase estacionaria S dividida en secciones, más precisamente en cuatro subzonas I, II, III y IV superpuestas que van de abajo hacia arriba 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 han de separarse se introduce a IA + B entre la subzona II y la subzona III. Un extracto que contiene principalmente B se recoge en SB entre la subzona I y la subzona II, y un refinado que contiene principalmente A se recoge en SA entre la subzona III y la subzona IV.
- 60 65 En el caso de un sistema de lecho móvil simulado, el movimiento simulado hacia abajo de la fase estacionaria S es provocado por el movimiento de los puntos de introducción y de recogida con respecto a la fase sólida. En el caso

de un sistema de lecho móvil real, el movimiento simulado hacia abajo de la fase estacionaria S es provocado por el movimiento de las diversas columnas cromatográficas con respecto a los puntos de introducción y de recogida. En la Figura 1, el eluyente fluye hacia arriba y la mezcla A + B se inyecta entre la subzona II y la subzona III. Los componentes se moverán de acuerdo con sus interacciones cromatográficas con la fase estacionaria, por ejemplo, la adsorción sobre un medio poroso. El componente B que presenta mayor afinidad por la fase estacionaria (el componente que se desplaza más lento) será arrastrado más lentamente por el eluyente y lo seguirá con retardo. El componente A que presenta la afinidad más débil por la fase estacionaria (el componente que se desplaza más rápido) será arrastrado fácilmente por el eluyente. Si se calculan y controlan correctamente el grupo de parámetros correcto, especialmente el caudal en cada subzona, el componente A que presenta la afinidad más débil por la fase estacionaria se recogerá entre la subzona III y la subzona IV como refinado y el componente B que presenta la afinidad más fuerte por la fase estacionaria se recogerá entre subzona I y la subzona II como extracto.

Por lo tanto, se apreciará que el sistema de lecho móvil simulado convencional ilustrado esquemáticamente en la Figura 1 se limita al fraccionamiento binario.

Los procesos y equipos para la cromatografía en lecho móvil simulado se describen en varias patentes, incluyendo US 2.985.589, US 3.696.107, US 3.706.812, US 3.761.533, FR-A-2103302, FR-A-2651148 y FR-A-2651149. El tema también se trata extensamente en "Preparative and Production Scale Chromatography", editado por Ganetsos y Barker, Marcel Dekker Inc, Nueva York, 1993.

Un sistema de lecho móvil real es similar en cuanto a su funcionamiento a un sistema de lecho móvil simulado. Sin embargo, en lugar de desplazar por medio de un sistema de válvulas los puntos de inyección de la mezcla de alimentación y el eluyente, y los puntos de recogida de los componentes separados, se mueven físicamente una serie de unidades de adsorción (es decir, columnas) con relación a los puntos de alimentación y de descarga. De nuevo, el funcionamiento es tal que simula un lecho móvil continuo a contracorriente.

Los procesos y equipos para la cromatografía de lecho móvil real se describen en varias patentes, incluyendo US 6.979.402, US 5.069.883 y US 4.764.276.

La purificación de los productos de AGPI es particularmente desafiante. Así, muchas materias primas adecuadas para preparar productos de AGPI son mezclas extremadamente complejas que contienen un gran número de componentes diferentes con tiempos de retención muy similares en aparatos cromatográficos. Por lo tanto, es muy difícil separar AGPI terapéuticamente útiles de dichas materias primas. Sin embargo, se requiere un alto grado de pureza de los productos de AGPI, particularmente para aplicaciones farmacéuticas y nutracéuticas. Históricamente, por lo tanto, cuando se requieren productos de AGPI de alta pureza se ha utilizado la destilación. Sin embargo, existen inconvenientes significativos en el uso de la destilación como una técnica de separación para AGPI delicados como se ha descrito anteriormente.

En general, todas las técnicas de separación cromatográfica para separar AGPI utilizan grandes cantidades de disolventes orgánicos como eluyentes. Una vez completado el proceso de separación cromatográfica, los AGPI deben recuperarse de la solución en el eluyente. Normalmente, la recuperación de los AGPI a partir de la solución en el eluyente supone un gran gasto de tiempo y energía. Además, los disolventes orgánicos utilizados como eluyentes en los procesos de separación cromatográfica con frecuencia son dañinos para el medio ambiente o para los agentes que los manipulan. Por lo tanto, se requiere un proceso de separación cromatográfica que reduce la cantidad de disolvente orgánico que se debe usar.

Como se ha descrito anteriormente, las materias primas comerciales adecuadas, por ejemplo aceites de pescado que contienen AGPI, normalmente contienen un gran número de componentes diferentes con tiempos de retención muy similares en aparatos cromatográficos. Por lo tanto, también existe un requisito para un proceso de separación cromatográfica que mejore la resolución entre los componentes de una mezcla de alimentación que tiene tiempos de retención similares.

### Sumario de la invención

Ventajosamente se ha encontrado que un proceso de separación cromatográfica llevado a cabo a una temperatura por encima de la temperatura ambiente requiere menos eluyente de disolvente orgánico. Por lo tanto, a temperaturas elevadas, los tiempos de retención para muchos AGPI de interés comercial se reducen sustancialmente, lo que a su vez significa que se debe usar menos eluyente de disolvente orgánico para separar una mezcla que contiene una variedad de diferentes AGPI, por ejemplo una materia prima de aceite de pescado, o una materia prima derivada de aceites de pescado.

Ventajosamente también se ha comprobado que el aumento de la cantidad de agua utilizada en un proceso de separación cromatográfica utilizando un disolvente orgánico acuoso mejora la resolución de los componentes presentes en mezclas de alimentación que tienen tiempos de retención similares. Esto significa que un eluyente que tenga un contenido de agua más alto permite una separación más limpia de un producto de AGPI de una mezcla de alimentación.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende introducir la mezcla de alimentación en uno o más aparatos cromatográficos de lecho móvil simulado o real que tienen una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, en el que

- 5
- la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas a través de las cuales pasa la mezcla de alimentación es superior a la temperatura ambiente,
- la pluralidad de columnas cromatográficas contienen, como adsorbente, perlas poliméricas o gel de sílice, y
- 10 – la mezcla de alimentación es una materia prima de aceite de pescado o una materia prima 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 superior al 90 %; y

en el que el proceso es distinto de un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende introducir la mezcla de alimentación en un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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, cada zona que tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas, y en el que (a) se recoge una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares de una columna en la primera zona y se introduce en una columna no adyacente en la segunda zona, y/o (b) se recoge una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares de una columna en la segunda zona y se introduce en una columna no adyacente en la primera zona, separándose dicho producto de AGPI de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada zona, proceso de separación cromatográfica que se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15 y 55 °C.

#### Descripción de las figuras

30 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 realización particular de la invención que es adecuada para separar EPA de componentes que se desplazan más rápido y más lento (es decir, impurezas más polares y menos polares).

35 La Figura 3 ilustra una realización particular de la invención que es adecuada para separar DHA de componentes que se desplazan más rápido y más lento (es decir, impurezas más polares y menos polares).

La Figura 4 ilustra con más detalle una realización particular de la invención que es adecuada para separar EPA de componentes que se desplazan más rápido y más lento (es decir, impurezas más polares y menos polares).

La Figura 5 ilustra con más detalle una realización particular de la invención que es adecuada para separar DHA de componentes que se desplazan más rápido y más lento (es decir, impurezas más polares y menos polares).

45 La Figura 6 ilustra con más detalle un método alternativo para la primera realización preferida de la invención que es adecuado para separar EPA de componentes que se desplazan más rápido y más lento (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 adecuado para separar DHA de componentes que se desplazan más rápido y más lento (es decir, impurezas más polares y menos polares).

La Figura 8 ilustra una realización particular de la invención para purificar EPA a partir de componentes que se desplazan más rápido y más lento (es decir, impurezas más polares y menos polares).

55 La Figura 9 ilustra un método alternativo para una realización particular de la invención para purificar EPA a partir de componentes que se desplazan más rápido y más lento (es decir, impurezas más polares y menos polares).

La Figura 10 ilustra tres modos en los que se puede llevar a cabo una realización particular del proceso de separación cromatográfica de la invención.

La Figura 11 muestra una realización adicional para purificar EPA a partir de componentes que se desplazan más rápido y más lento (es decir, impurezas más polares y menos polares).

65 La Figura 12 muestra el rastro de GC FAMES de un producto de AGPI EPA producido de acuerdo con la presente invención.

La Figura 13 muestra el rastro de GC FAMES de un producto de AGPI EPA producido de acuerdo con la presente invención.

### Descripción detallada de la invención

5 El término "producto de AGPI" puede referirse a un producto que comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), y/o derivados de los mismos, normalmente de importancia nutricional o farmacéutica. Normalmente, un producto de AGPI es un AGPI individual o un derivado del mismo. Como alternativa, un producto de AGPI es una mezcla de dos o más AGPI o derivados de los mismos, por ejemplo dos.

10 El término "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. Como se usa en este documento, un derivado de AGPI es un AGPI en forma de mono-, di- o triglicérido, éster, fosfolípido, amida, lactona o sal. Se prefieren los triglicéridos y los ésteres. Los ésteres son más preferidos. Los ésteres normalmente son ésteres de alquilo, preferentemente ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, más preferentemente ésteres de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. Ejemplos de ésteres incluyen ésteres de metilo y etilo. Los ésteres de etilo son los más preferidos.

20 El término "producto de AGPI" puede referirse a un producto que comprende al menos un AGPI  $\omega$ -3 o  $\omega$ -6, preferentemente al menos un AGPI  $\omega$ -3. Ejemplos de AGPIs  $\omega$ -3 incluyen ácido alfa-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido eicosatrienóico (ETE), ácido eicosatetraenoico (ETA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Se prefieren el SDA, EPA, DPA y DHA. El EPA y el DHA son más preferidos. Ejemplos de AGPI  $\omega$ -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 ( $\omega$ -6). Se prefieren el LA, ARA, GLA y DGLA.

25 En el proceso de la presente invención el producto de AGPI es EPA y/o el éster etílico (EE) de EPA.

30 En una realización más preferida, el producto de AGPI es EPA o éster etílico de EPA que se produce en una pureza superior al 90 %, preferentemente superior al 95 %, y más preferentemente superior al 97 %.

Normalmente, 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.

35 El aparato de la presente invención puede configurarse para recoger un producto de AGPI que es una mezcla concentrada de EPA y DHA. Por lo tanto, se utiliza una mezcla de alimentación que contiene EPA, DHA, componentes que son más polares que el EPA y el DHA, y componentes que son menos polares que el EPA y el DHA. En la primera etapa de separación, el material menos polar que el EPA y el DHA normalmente se elimina. En la segunda etapa de separación, el material que es más polar que el EPA y el DHA normalmente se elimina, y se recoge una mezcla concentrada de EPA y DHA como producto de AGPI.

45 La mezcla de alimentación para fraccionar mediante el proceso de la presente invención es un aceite de pescado o materia prima derivada de aceite de pescado. Ventajosamente se ha comprobado que cuando se usa un aceite de pescado o una materia prima derivada de aceite de pescado, se puede producir un producto de AGPI EPA o éster etílico de EPA mediante el proceso de la presente invención con una pureza superior al 90 %, preferentemente superior al 95 % de pureza, y más preferentemente superior al 97 % de pureza.

50 La mezcla de alimentación se puede someter a tratamiento químico antes del fraccionamiento por el proceso de la invención. Por ejemplo, puede experimentar una transesterificación de glicéridos o una hidrólisis de glicéridos seguida en ciertos casos por procesos selectivos tales como cristalización, destilación molecular, fraccionamiento de urea, extracción con nitrato de plata u otras soluciones de sales metálicas, yodolactonización o fraccionamiento de fluidos supercríticos. Como alternativa, se puede usar una mezcla de alimentación directamente sin ninguna etapa de tratamiento inicial.

55 Las mezclas de alimentación normalmente 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 el producto de AGPI. Durante la operación, dichos componentes menos polares normalmente se mueven con la fase adsorbente sólida con preferencia 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 el producto de AGPI. Durante la operación, dichos componentes más polares normalmente se mueven con la fase de eluyente líquido con preferencia 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.

65 Ejemplos de componentes más o menos polares incluyen (1) otros compuestos que se encuentran en aceites naturales (por ejemplo aceites marinos o aceites vegetales), (2) subproductos formados durante el almacenamiento,

refinado y etapas de concentración anteriores y (3) contaminantes de disolventes o reactivos que se utilizan durante etapas de concentración o purificación previas.

5 Ejemplos de (1) incluyen otros AGPI no deseados; ácidos grasos saturados; esteroides, por ejemplo colesterol; vitaminas; y contaminantes ambientales, tales como policlorobifenilo (PCB), plaguicidas de hidrocarburos poliaromáticos (PAH), plaguicidas clorados, dioxinas y metales pesados. Los PCB, HAP, dioxinas y plaguicidas clorados son componentes altamente no polares.

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

Ejemplos de (3) incluyen urea que se puede añadir para eliminar los ácidos grasos saturados o monoinsaturados de la mezcla de alimentación.

15 La mezcla de alimentación es un aceite de pescado que contiene AGPI que comprende EPA (y opcionalmente DHA).

20 Una mezcla de alimentación típica para preparar EPA (EE) concentrado mediante el proceso de la presente invención comprende el 50-75 % de EPA (EE), del 0 al 10 % de DHA (EE) y otros componentes que incluyen otros ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6.

25 Una mezcla de alimentación preferida para preparar EPA (EE) concentrado por el proceso de la presente invención comprende el 55 % de EPA (EE), el 5 % de DHA (EE) y otros componentes que incluyen otros ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 esenciales. El DHA (EE) es menos polar que el EPA (EE).

Normalmente, la temperatura de todas las columnas cromatográficas utilizadas en el proceso de la presente invención es superior a la temperatura ambiente.

30 Como se apreciará, en la al menos una columna cromatográfica que se encuentra a una temperatura superior que la temperatura ambiente, lo que es importante para el proceso de separación es el interior de la columna. Por lo tanto, normalmente el eluyente de disolvente orgánico acuoso y el adsorbente dentro de la columna cromatográfica son los que se encuentran a una temperatura superior a la temperatura ambiente. Naturalmente, es posible conseguir la temperatura requerida en el interior de la al menos una columna cromatográfica por un medio interno (por ejemplo calentando el eluyente y/o la mezcla de alimentación) y/o por medios externos (por ejemplo calentando el exterior de la columna cromatográfica por cualquier medio convencional conocido).

40 Normalmente, la temperatura elevada requerida de las columnas cromatográficas calentadas se consigue calentando el eluyente de disolvente orgánico acuoso y/o la mezcla de alimentación. Esto tiene el efecto de calentar internamente las columnas.

Por lo tanto, la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas a través de las cuales se pasa la mezcla de alimentación también se puede medir como temperatura del eluyente de disolvente orgánico acuoso.

45 Por tanto, la presente invención también proporciona un proceso de separación cromatográfica como se define en este documento, para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende introducir la mezcla de alimentación en uno o más aparatos cromatográficos de lecho móvil simulado o real que tienen una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, en el que la temperatura del eluyente es superior a la temperatura ambiente, como se define en este documento.

50 Como alternativa, la temperatura requerida de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas se consigue calentando las columnas. El calentamiento se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, una camisa de calefacción eléctrica, una camisa de agua caliente o una bobina o mediante lámparas de calor radiante. Normalmente se calienta el interior y/o exterior de una o más columnas cromatográficas.

La temperatura requerida de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas se puede conseguir calentando las columnas y/o el eluyente de disolvente orgánico acuoso, y/o la mezcla de alimentación.

60 Normalmente, la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas es superior a 30 °C, preferentemente superior a 35 °C, más preferentemente superior a 40 °C, incluso más preferentemente superior a 45 °C, incluso más preferentemente superior a 50 °C, incluso más preferentemente superior a 55 °C, e incluso más preferentemente superior a 57 °C. En ciertas realizaciones es útil una temperatura de 56 °C.

65 Normalmente, la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas es de hasta 100 °C, preferentemente de hasta 95 °C, más preferentemente de hasta 90 °C, incluso más preferentemente de hasta 85 °C,

incluso más preferentemente de hasta 80 °C, incluso más preferentemente de hasta 75 °C, e incluso más preferentemente de hasta 70 °C.

5 Así, los intervalos de temperatura típicos para al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas son de 30 a 100 °C, de 35 a 95 °C, de 40 °C a 90 °C, de 45 °C a 85 °C, de 50 a 80 °C, de 55 a 75 °C o de 57 a 70 °C.

10 Los intervalos de temperatura preferidos para al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas son de 40 a 70 °C, preferentemente de 50 a 67 °C, más preferentemente de 56 a 65 °C, aún más preferentemente de 57 a 63 °C.

El proceso de la presente invención implica pasar una mezcla de alimentación a través de una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas a uno o más aparatos cromatográficos de lecho móvil simulado o real. Se pueden usar cualquier columna cromatográfica adecuada en el proceso reivindicado.

15 La una o más columnas cromatográficas contienen, como adsorbente, perlas poliméricas o gel de sílice. Se pueden usar adsorbentes convencionales conocidos en la materia para técnicas de separación cromatográfica en el proceso de la presente invención. Cuando se utiliza más de una columna cromatográfica, cada columna cromatográfica puede contener el mismo o un adsorbente diferente. Normalmente, cuando se usa más de una columna cromatográfica cada columna contiene el mismo adsorbente. Ejemplos de dichos materiales de uso común son  
20 perlas poliméricas, preferentemente de poliestireno reticulado con DVB (divinilbenceno); y gel de sílice, preferentemente gel de sílice unido a fase inversa con alcanos C8 o C18, especialmente C18. Se prefiere el gel de sílice de fase inversa unido a C18. El adsorbente utilizado en el proceso de la presente invención preferentemente es no polar.

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

Las dimensiones de las columnas utilizadas no están particularmente limitadas y dependerán en cierta medida del volumen de la mezcla de alimentación a purificar. Una persona experta puede determinar fácilmente columnas con  
40 un tamaño apropiado a usar. El diámetro de cada columna normalmente se encuentra 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 lo más preferentemente entre 70 y 80 mm. La longitud de cada columna normalmente se encuentra 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 lo más preferentemente entre 80 y 100 cm.

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

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

50 Los disolventes alcohólicos son bien conocidos por el experto en la materia. Los alcoholes normalmente son alcoholes de cadena corta. Los alcoholes normalmente tienen la fórmula ROH, en la que R es un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado. El grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> preferentemente está sin sustituir. Ejemplos de alcoholes incluyen metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol y t-butanol. Se prefieren metanol y etanol. El metanol es más preferido.

Los disolventes de éter son bien conocidos por el experto en la materia. Los éteres normalmente son éteres de cadena corta. Los éteres normalmente tienen la fórmula RO-R', en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> lineal o ramificado. El grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> preferentemente está sin sustituir. Los  
60 éteres preferidos incluyen éter dietílico, éter diisopropílico y éter metil-t-butílico (MTBE).

Los disolventes éster son bien conocidos por el experto en la materia. Los ésteres normalmente son ésteres de cadena corta. Los ésteres normalmente tienen la fórmula R-(C=O)O-R' en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 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 normalmente son cetonas de cadena corta. Las cetonas normalmente tienen la fórmula  $R-(C=O)-R'$  en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo  $C_1-C_6$  lineal o ramificado. El grupo alquilo  $C_1-C_6$  preferentemente está sin sustituir. Las cetonas preferidas incluyen acetona, metiletilcetona y metilisobutilcetona (MIBK).

5 Los disolventes de nitrilo son bien conocidos por el experto en la materia. Los nitrilos normalmente son nitrilos de cadena corta. Los nitrilos normalmente tienen la fórmula  $R-CN$ , en la que R representa un grupo alquilo  $C_1-C_6$  lineal o ramificado. El grupo alquilo  $C_1-C_6$  preferentemente está sin sustituir. Los nitrilos preferidos incluyen acetonitrilo.

10 Normalmente, el disolvente orgánico acuoso es alcohol acuoso o acetonitrilo acuoso.

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

15 Normalmente, el eluyente no está en un estado supercrítico. Normalmente, el eluyente es un líquido.

Normalmente, la relación media de agua:disolvente orgánico, por ejemplo relación de agua:metanol, del eluyente en todo el aparato es de 0,1:99,9 a 12:88 partes en volumen, preferentemente de 0,25:99,75 a 10:90 partes en volumen, y más preferentemente de 0,5:99,5 a 9:91 partes en volumen. En algunas realizaciones, la relación media de agua:disolvente orgánico, por ejemplo relación de agua:metanol, del eluyente en todo el aparato es preferentemente de 0,1:99,9 a 9:91 partes en volumen, más preferentemente de 0,25:99,75 a 7:93 partes en volumen, incluso más preferentemente de 0,5:99,5 a 6:94 partes en volumen. En otras realizaciones, la relación media de agua:disolvente orgánico, por ejemplo relación de agua:metanol, del eluyente en todo el aparato es preferentemente de 4:96 a 12:88 partes en volumen, preferentemente de 6:94 a 10:90 partes en volumen, más preferentemente de 7:93 a 9:

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

30 Normalmente, el eluyente contiene el 5 % en peso de agua o más, basado en el peso total del agua y el disolvente orgánico. Preferentemente, el eluyente contiene el 6 % en peso de agua o más, más preferentemente el 7 % en peso de agua o más, incluso más preferentemente el 8 % en peso de agua aproximadamente. Por lo tanto, el eluyente normalmente contiene del 5 al 15 % en peso de agua, preferentemente del 6 al 13 % en peso de agua, más preferentemente del 7 al 11 % en peso de agua, incluso más preferentemente del 7,5 al 9,5 % en peso de agua, incluso más preferentemente del 7,5 al 8,5 % en peso de agua. Ventajosamente, este aumento del contenido de agua mejora la resolución de componentes estrechamente relacionados presentes en la mezcla de alimentación. Un mayor contenido de agua en el eluyente puede requerir, en ciertas circunstancias, que se use un mayor volumen de eluyente. En la práctica, esto se compensa al calentar al menos una de las columnas cromatográficas a través de la cual se hace pasar la mezcla de alimentación a una temperatura superior a la temperatura ambiente, preferentemente calentando el eluyente a una temperatura superior a la temperatura ambiente. El calentamiento de la columna y/o el eluyente de esta manera reduce la cantidad de disolvente que se debe usar.

40 Se puede utilizar cualquier aparato cromatográfico conocido para los fines del proceso de la presente invención, siempre que implique la introducción de una mezcla de alimentación en uno o más aparatos cromatográficos de lecho móvil simulado o real que tengan una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas que contengan como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, en el que la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas a través de las cuales pasa la mezcla de alimentación es superior a la temperatura ambiente.

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

50 El número de columnas cromatográficas utilizadas en el proceso de la presente invención no está particularmente limitado. Se utiliza más de una columna cromatográfica. Esto puede implicar pasar la mezcla de alimentación a través de dos o más columnas cromatográficas, que pueden ser iguales o diferentes, dispuestas en serie o en paralelo. El número de columnas utilizadas en esta realización no está particularmente limitado, pero normalmente no excede de treinta columnas.

55 De este modo, el proceso de la presente invención, tal como se describe en este documento, comprende introducir la mezcla de alimentación en uno o más aparatos cromatográficos de lecho móvil simulado o real que tienen una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas que contienen como eluyente un disolvente orgánico acuoso, en el que la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas es superior a la temperatura ambiente.



Normalmente, la temperatura de sustancialmente todas las columnas cromatográficas conectadas es superior a la temperatura ambiente. Preferentemente, la temperatura de todas las columnas cromatográficas conectadas es superior a la temperatura ambiente.

5 Se puede utilizar cualquier aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real conocido para los fines del método de la presente invención, siempre y cuando el aparato se use de acuerdo con el proceso de la presente invención. Se pueden usar todos los aparatos descritos en las patentes 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 si están configurados de acuerdo con el proceso de la presente invención.

10 En una realización, el proceso comprende las etapas de:

(i) purificar la mezcla de alimentación en una primera etapa de separación en un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener un producto intermedio; y

15 (ii) purificar el producto intermedio obtenido en (i) en una segunda etapa de separación usando un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener el producto de AGPI;

20 en el que la temperatura de una o más de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas en la primera etapa de separación y/o una o más de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas en la segunda etapa de separación es superior a la temperatura ambiente; y en el que

(a) la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato cromatográfico, recuperándose el producto intermedio entre la primera y la segunda etapas de separación y ajustándose las condiciones del proceso en el aparato cromatográfico entre la primera y la segunda etapas de separación de manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; o

25 (b) la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en un primer y segundo aparatos cromatográficos separados, respectivamente, introduciéndose el producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación en el segundo aparato cromatográfico y separándose el producto de AGPI de diferentes componentes de la alimentación en cada etapa de separación.

30 En esta realización, el término "aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real" normalmente se refiere a una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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 se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas y una corriente de extracción de extracto a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas.

40 El aparato cromatográfico utilizado en esta realización tiene un único grupo de columnas cromatográficas conectadas en serie que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso. Normalmente, cada una de las columnas cromatográficas está unida a las dos columnas del aparato adyacentes a esa columna. Por lo tanto, la salida de una columna dada en el grupo está conectada a la entrada de la columna adyacente en el grupo, que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el grupo. Por lo tanto, el eluyente puede fluir alrededor del grupo de columnas cromatográficas conectadas. Normalmente, ninguna de las columnas cromatográficas está unida a columnas no adyacentes en el aparato.

45 Como se usa en el presente documento, el término "no adyacente" se refiere a columnas, por ejemplo en el mismo aparato, separadas por una o más columnas, preferentemente 3 o más columnas, más preferentemente 5 o más columnas, más preferentemente aproximadamente 5 columnas.

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

55 El término "refinado" es bien conocido por el experto en la materia. En el contexto de la cromatografía de lecho móvil real y simulado se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase de eluyente líquido en comparación con la fase adsorbente sólida. De este modo, una corriente de refinado normalmente se enriquece con componentes más polares, y se agota de componentes menos polares en comparación con una corriente de alimentación.

60 El término "extracto" es bien conocido por el experto en la materia. En el contexto de la 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 de eluyente líquido. De este modo, una corriente de extracto normalmente se

enriquece con componentes menos polares y se agota de componentes más polares en comparación con una corriente de alimentación.

5 El número de columnas utilizadas en cada aparato en esta realización no está particularmente limitado. Una persona experta puede determinar fácilmente un número apropiado de columnas a usar. El número de columnas normalmente es de 4 o más, preferentemente de 6 o más, más preferentemente de 8 o más, por ejemplo de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 columnas. En una realización preferida, se utilizan 5 o 6 columnas, más preferentemente 6 columnas. En otra realización preferida, se utilizan 7 u 8 columnas, más preferentemente 8 columnas. Normalmente, no hay más de 25 columnas, preferentemente no más de 20, más preferentemente no más de 15.

10 En esta realización, los aparatos cromatográficos usados en la primera y segunda etapas de separación normalmente contienen el mismo número de columnas. Para ciertas aplicaciones pueden tener un número de columnas diferente.

15 En esta realización, las columnas en los aparatos cromatográficos usados en la primera y segunda etapas de separación normalmente tienen dimensiones idénticas pero, para ciertas aplicaciones, pueden tener dimensiones diferentes.

20 Las velocidades de flujo a la columna están limitadas por las presiones máximas a través de la serie de columnas y dependerán de las dimensiones de la columna y del tamaño de partícula de las fases sólidas. Un experto en la materia será capaz de establecer fácilmente el caudal requerido para cada dimensión de la columna para asegurar una desorción eficaz. Las columnas de mayor diámetro en general necesitarán flujos más altos para mantener el flujo lineal a través de las columnas.

25 En esta realización, para los tamaños de columna típicos esbozados anteriormente, el caudal de eluyente en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación normalmente es de 1 a 4,5 l/min, preferentemente de 1,5 a 2,5 l/min. Normalmente, el caudal del extracto del aparato cromatográfico utilizado 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 las realizaciones en las que parte del extracto de la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en la primera etapa de separación, el caudal reciclado normalmente es de 0,7 a 1,4 l/min, preferentemente de aproximadamente 1 l/min. Normalmente, el caudal del refinado del aparato cromatográfico utilizado 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 las realizaciones en las que parte del refinado de la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato usado en la primera etapa de separación, el caudal de reciclado normalmente es de 0,3 a 1,0 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,5 l/min. Normalmente, el caudal de introducción de la mezcla de alimentación en el aparato cromatográfico utilizado 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.

30 En esta realización, para los tamaños de columna típicos esbozados anteriormente, el caudal de eluyente en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación normalmente es de 1 a 4 l/min, preferentemente de 1,5 a 3,5 l/min. Normalmente, el caudal del extracto del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación es de 0,5 a 2 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,9 l/min. En las realizaciones en las que parte del extracto de la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en la segunda etapa de separación, el caudal de reciclado normalmente es de 0,6 a 1,4 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,1 l/min, más preferentemente de 0,9 l/min aproximadamente. Normalmente, la velocidad de flujo del refinado del aparato cromatográfico utilizado 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 de 1,4 l/min aproximadamente. En las realizaciones en las que parte del refinado de la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en la segunda etapa de separación, el caudal de reciclado normalmente es de 0,3 a 1,0 l/min, preferentemente de 0,5 l/min aproximadamente.

45 Como apreciará la persona experta, las referencias a las velocidades a las que se recoge o se elimina líquido a través de las diversas corrientes de extracto y refinado se refieren a volúmenes de líquido eliminados en una cantidad de tiempo, normalmente l/minuto. De forma similar, las referencias a las velocidades a las que el líquido se vuelve a recircular a un aparato, normalmente a una columna adyacente en el aparato, se refieren a volúmenes de líquido reciclado en una cantidad de tiempo, normalmente l/minuto.

50 En esta realización, se prefiere la cromatografía de lecho móvil real.

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

segundos.

En esta realización, el proceso de la presente invención comprende una primera y segunda etapas de separación.

5 Estas dos etapas se pueden llevar a cabo fácilmente en un solo aparato cromatográfico. De este modo, en una realización, (a) la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato cromatográfico, recuperándose el producto intermedio entre la primera y la segunda etapas de separación y ajustándose las condiciones del proceso en el aparato cromatográfico entre la primera y segunda etapas de separación de manera 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 Figura 10a. De este modo, la primera etapa de separación (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato SMB que tiene 8 columnas. Entre las primera y segunda etapas de separación se recupera el producto intermedio en, por ejemplo, un recipiente, se ajustan las condiciones del proceso en el aparato cromatográfico de manera 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 SMB que tiene 8 columnas.

En la realización (a), el ajuste de las condiciones del proceso normalmente se refiere al ajuste de las condiciones del proceso en el aparato como un todo, es decir, modificando físicamente el aparato de modo que las condiciones sean diferentes. No se refiere simplemente a reintroducir el producto intermedio de vuelta en una parte diferente del mismo aparato donde las condiciones del proceso pueden ser diferentes.

Como alternativa, se pueden usar los primeros y segundos aparatos cromatográficos separados en las primera y segunda etapas de separación. De este modo, en otra realización, (b) la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en un primer y segundo aparatos cromatográficos separados, respectivamente, introduciéndose el producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación en el segundo aparato cromatográfico y separándose el producto de AGPI a partir de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

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

Por lo tanto, en la realización (b) en el caso de que las dos etapas de separación se lleven a cabo secuencialmente, la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en un primer y segundo aparatos cromatográficos separados, recuperándose el producto intermedio entre la primera y la segunda etapas de separación y ajustándose las condiciones del proceso en los primeros y segundos aparatos cromatográficos de manera 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 Figura 10b. De este modo, la primera etapa de separación (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato SMB que tiene 8 columnas, una a ocho. Entre la primera y la segunda etapas de separación se recupera el producto intermedio, por ejemplo en un recipiente, y después se introduce en un segundo aparato SMB separado. La segunda etapa de separación (lado derecho) se lleva a cabo en el segundo aparato SMB separado que tiene 8 columnas, nueve a dieciséis. Las condiciones del proceso en los dos aparatos cromatográficos se ajustan de manera 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 de que las dos etapas de separación se lleven a cabo simultáneamente, la primera y la segunda etapas de separación se llevan a cabo en un primer y segundo aparatos cromatográficos separados, respectivamente, introduciendo el producto intermedio en el aparato cromatográfico usado en la segunda separación y las condiciones del proceso en el primer y el segundo aparato cromatográfico se ajustan de tal manera 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 Figura 10c. De este modo, la primera etapa de separación (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato SMB que tiene 8 columnas, una a ocho. El producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación se introduce entonces en el segundo aparato cromatográfico separado usado en la segunda etapa de separación. El producto intermedio puede pasar de la primera etapa de separación a la segunda etapa de separación directa o indirectamente, por ejemplo a través de un recipiente. La segunda etapa de separación (lado derecho) se lleva a cabo en el segundo aparato SMB separado que tiene 8 columnas, nueve a dieciséis. Las condiciones del proceso en los dos aparatos cromatográficos se ajustan de manera 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 de que las dos etapas de separación se lleven a cabo simultáneamente, el eluyente circula por separado en los dos aparatos cromatográficos separados. Por lo tanto, el eluyente no se reparte entre los dos aparatos cromatográficos separados, aparte de qué eluyente pueda 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 utilizado en la segunda etapa de separación. Las columnas cromatográficas no se reparten entre los dos aparatos cromatográficos separados utilizados en la primera y segunda etapas de separación.

En esta realización, después de obtener el producto intermedio en la primera etapa de separación, el eluyente de

disolvente orgánico acuoso se puede eliminar 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.

5 Como se ha mencionado anteriormente, en esta realización 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 SMB individual usado en ambas etapas de separación se ajustan entre la primera y segunda etapas de separación de tal manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.  
10

Así, en esta realización las condiciones del proceso en la primera y segunda etapas de separación varían. Las condiciones del proceso que pueden variar pueden incluir, por ejemplo, el tamaño de las columnas usadas, el número de columnas usadas, el empaquetamiento usado en las columnas, el tiempo de paso del aparato SMB, la temperatura del aparato, el eluyente usado en la etapas de separación o los caudales utilizados en el aparato, en particular la velocidad de reciclado del líquido recogido a través de las corrientes de extracto o refinado.  
15

Preferentemente, en esta realización, las condiciones del proceso que pueden variar son la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente utilizado en las etapas de separación y/o la velocidad de reciclado del líquido recogido a través de las corrientes de extracto o refinado en las etapas de separación. Ambas opciones se analizan con más detalle a continuación.  
20

En esta realización, el producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación normalmente se enriquece en el producto de AGPI en comparación con la mezcla de alimentación.  
25

En esta realización, el producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación se introduce entonces en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

30 En esta realización, el producto intermedio normalmente se recoge como refinado o corriente de extracto del aparato cromatográfico usado en el primer proceso de separación.

Normalmente, en esta realización, el producto intermedio se recoge como corriente de refinado en la primera etapa de separación, y el producto de AGPI se recoge como corriente de extracto en la segunda etapa de separación. De este modo, la corriente de refinado recogida en la primera etapa de separación se utiliza como mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación. La corriente de refinado recogida en la primera etapa de separación normalmente contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares.  
35

Como alternativa, en esta realización, 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 utiliza como mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación. La corriente de extracto recogida en la primera etapa de separación normalmente contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares.  
40

45 En esta realización, el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación. Normalmente, los componentes separados en cada etapa de separación del proceso de la presente invención tienen polaridades diferentes.

Preferentemente, en esta realización, el producto de AGPI se separa de los componentes menos polares de la mezcla de alimentación en la primera etapa de separación y el producto de AGPI se separa de los componentes más polares de la mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación.  
50

Normalmente, en esta realización, (a) parte de la corriente de extracto procedente del aparato utilizado en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en la primera etapa de separación; y/o  
55

(b) una parte de la corriente de refinado procedente del aparato utilizado en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en la primera etapa de separación; y/o

(c) una parte de la corriente de extracto del aparato utilizado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato usado en la segunda etapa de separación; y/o

60 (d) una parte de la corriente de refinado procedente del aparato utilizado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en la segunda etapa de separación.

Preferentemente, en esta realización, (a) parte de la corriente de extracto procedente del aparato utilizado en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en la primera etapa de separación; y  
65

(b) una parte de la corriente de refinado procedente del aparato utilizado en la primera etapa de separación se

vuelve a recircular al aparato utilizado en la primera etapa de separación; y

(c) una parte de la corriente de extracto del aparato utilizado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato usado en la segunda etapa de separación; y

5 (d) una parte de la corriente de refinado procedente del aparato utilizado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en la segunda etapa de separación.

10 El reciclado en esta realización implica la alimentación de parte del extracto o corriente de refinado fuera del aparato cromatográfico usado en la primera o segunda etapa de separación de vuelta al aparato usado en esa etapa, normalmente en una columna adyacente. Esta columna adyacente es la columna adyacente que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el sistema.

15 En esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto o refinado en la primera o segunda etapas de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico usado en esa etapa es la velocidad a la que el líquido recogido a través de dicha corriente es devuelto al aparato usado en esa etapa, normalmente en una columna adyacente, es decir, la columna aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el sistema.

20 Esto se puede ver con referencia a una realización preferida en la Figura 9. La velocidad de reciclado del extracto en la primera etapa de separación es la velocidad a la que el extracto recogido de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación se introduce en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, es decir, el caudal de líquido en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación.

25 En esta realización, la velocidad de reciclado del extracto en la segunda etapa de separación es la velocidad a la que el extracto recogido en la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación se introduce en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación, es decir, el caudal de líquido en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

30 En esta realización, el reciclaje de las corrientes de extracto y/o refinado en la primera y/o segunda etapas de separación normalmente se efectúa introduciendo el líquido recogido a través de esa corriente en esa etapa de separación en un recipiente, y después bombeando una cantidad de ese líquido desde el recipiente al aparato usado en esa etapa de separación, normalmente en una columna adyacente. En este caso, la velocidad de reciclado del líquido recogido a través de un extracto particular o corriente de refinado en la primera y/o segunda etapas de separación, normalmente de vuelta a una columna adyacente, es la velocidad a la que el líquido es bombeado fuera del recipiente de vuelta al interior cromatografía, normalmente en una columna adyacente.

35 Como apreciará el experto en la materia, en esta realización la cantidad de líquido que se introduce en un aparato cromatográfico a través de las corrientes de eluyente y de alimentación se equilibra con la cantidad de líquido extraído del aparato y se vuelve a recircular al aparato.

40 Por lo tanto, en esta realización con referencia a la Figura 9, para la corriente de extracto, el caudal de eluyente (desorbente) en el aparato o aparatos cromatográficos utilizados en la primera y segunda etapas de separación (D) es igual a la velocidad a la que se acumula el líquido recogido a través de la corriente de extracto en esa etapa de separación en un recipiente (E1 y E2) añadido a la velocidad a la que el extracto se vuelve a recircular al aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (D - E1 y D - E2).

45 En esta realización, para la corriente de refinado procedente de una etapa de separación, la velocidad a la que se recicla el extracto en el aparato cromatográfico utilizado en esa etapa de separación particular (D - E1 y D - E2) añadida a la velocidad a la que se introduce la materia prima en el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (F y R1) es igual a la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en esa etapa de separación particular se acumula en un recipiente (R1 y R2) añadida a la velocidad a la que se recicla el refinado de vuelta al aparato cromatográfico utilizado en esa etapa de separación particular (D + F - E1 - R1 y D + R1 - E2 - R2).

50 En esta realización, la velocidad a la que se acumula el líquido recogido de un extracto particular o corriente de refinado procedente de un aparato cromatográfico en un recipiente también puede considerarse como la velocidad neta de eliminación de dicho extracto o corriente de refinado de dicho aparato cromatográfico.

55 Normalmente, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y refinado en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en esa etapa de separación se ajusta de tal manera que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

60 Normalmente, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y refinado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en esa etapa de separación se

ajusta de tal manera que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

5 Preferentemente, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y refinado en cada etapa de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en esa etapa de separación se ajusta de tal manera que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

10 Normalmente, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación difiere de la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación y/o la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación difiere de la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

20 La variación de la velocidad a la que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y/o refinado en la primera o segunda etapas de separación se vuelve a recircular al aparato utilizado en esa etapa particular de separación tiene el efecto de variar la cantidad de componentes polares y menos polares presentes en el extracto y las corrientes de refinado. Así, por ejemplo, una velocidad de reciclado de extracto más baja da como resultado menos componentes menos polares en esa etapa de separación que se lleva a cabo a la corriente de refinado. Una velocidad de reciclado de extracto más alta da como resultado que más de los componentes menos polares en esa etapa de separación sean arrastrados por la corriente de refinado.

25 Esto puede verse, por ejemplo, en la realización específica de la invención mostrada en la Figura 6. La velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en dicha etapa de separación (D - E1) afectará en qué grado cualquiera de los componentes A será arrastrado por la corriente de refinado en la primera etapa de separación (R1).

30 Normalmente, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. Preferentemente, se recoge una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares de la primera etapa de separación y se purifica en una segunda etapa de separación, y la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

45 Como alternativa, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es más lenta que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

50 Normalmente, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. Preferentemente, se recoge una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares de la primera etapa de separación y se purifica en una segunda etapa de separación, y la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

60 Como alternativa, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es más lenta que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

65 En esta realización, cuando las velocidades de reciclado se ajustan de tal manera que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación, la relación de

agua:disolvente orgánico de los eluyentes usados en cada etapa de separación puede ser igual o diferente. Normalmente, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en cada etapa de separación es de 0,5:99,5 a 5,5:94,5 partes en volumen.

5 Normalmente, en esta realización, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en cada etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente. La relación de agua:disolvente orgánico utilizada en cada etapa de separación se ajusta preferentemente de modo que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

10 En esta realización, la potencia de elución del eluyente utilizado en cada una de las etapas de separación normalmente es diferente. Preferentemente, la potencia de elución del eluyente usado en la primera etapa de separación es superior a la del eluyente usado en la segunda etapa de separación. En la práctica, esto se consigue variando las cantidades relativas de agua y disolvente orgánico usadas en cada etapa de separación.

15 Dependiendo de la elección del disolvente orgánico, pueden ser desorbedores más potentes que el agua. Como alternativa, pueden ser desorbedores menos potentes que el agua. El acetonitrilo y los alcoholes, por ejemplo, son desorbedores más potentes que el agua. Por lo tanto, cuando el disolvente orgánico acuoso es alcohol acuoso o acetonitrilo, la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la primera etapa de separación normalmente es superior a la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la segunda etapa de separación.

20 Normalmente, en esta realización, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación es menor que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda etapa de separación. Por lo tanto, el eluyente en la primera etapa de separación normalmente contiene más disolvente orgánico, preferentemente alcohol, más preferentemente metanol, que el eluyente en la segunda etapa de separación.

25 En esta realización, cuando el disolvente orgánico acuoso usado en cada etapa de separación tiene una relación agua:disolvente orgánico diferente, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación normalmente es de 0:100 a 5:95 partes en volumen, preferentemente de 0,1:99,9 a 2,5:97,5 partes en volumen, más preferentemente de 0,25:99,75 a 2:98 partes en volumen, y lo más preferentemente de 0,5:99,5 a 1,5:98,5 partes en volumen. En estas realizaciones, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda etapa de separación normalmente es de 2:98 a 8:92 partes en volumen, preferentemente 3:97 a 7:93 partes en volumen, más preferentemente de 4:96 a 6:94 partes en volumen, e incluso más preferentemente de 4,5:95,5 a 5,5:94,5 partes en volumen.

30 En esta realización, cuando el disolvente orgánico acuoso usado en cada etapa de separación tiene un contenido en disolvente orgánico de agua diferente, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación es preferentemente de 0,5:99,5 a 1,5:98,5 partes en volumen, y la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda etapa de separación es preferentemente de 4,5:95,5 a 5,5:94,5 partes en volumen.

35 Se apreciará que las relaciones de agua y disolvente orgánico en cada etapa de separación mencionada anteriormente son relaciones medias dentro de la totalidad del aparato cromatográfico.

40 Normalmente, en esta realización, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en cada etapa de separación se controla introduciendo agua y/o disolvente orgánico en una o más columnas en los aparatos cromatográficos usados en las etapas de separación. Por lo tanto, por ejemplo, para conseguir una relación más baja de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación que en la segunda etapa de separación, el agua normalmente se introduce más lentamente en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación que en la segunda etapa de separación.

45 Normalmente, en esta realización, puede introducirse disolvente orgánico esencialmente puro y agua esencialmente pura en diferentes puntos en el aparato cromatográfico utilizado en cada etapa de separación. Los caudales relativos de estas dos corrientes determinarán el perfil de disolvente global en el aparato cromatográfico. Como alternativa, en esta realización, pueden introducirse diferentes mezclas de disolvente orgánico/agua en diferentes puntos en cada aparato cromatográfico utilizado en cada etapa de separación. Esto implicará la introducción de dos o más mezclas de disolvente orgánico/agua diferentes en el aparato cromatográfico utilizado en una etapa de separación particular, cada disolución de disolvente orgánico/agua que tiene una relación de disolvente orgánico:agua diferente. Los caudales relativos y las concentraciones relativas de las mezclas de disolvente orgánico/agua en esta realización determinarán el perfil de disolvente global en el aparato cromatográfico utilizado en esa etapa de separación.

50 En esta realización, o bien (1) el producto intermedio que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares se recoge como corriente de refinado en la primera etapa de separación y el producto de AGPI se recoge como corriente de extracto en la segunda etapa de separación; o bien

55 (2) el producto intermedio que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares 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.

La opción (1) es adecuada para purificar EPA de una mezcla de alimentación.

- 5 La opción (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 componentes 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 R1 de refinado. La corriente de refinado R1 es el producto intermedio que después se purifica en la segunda etapa de separación. En la segunda  
10 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.

- La opción (1) se ilustra con más detalle en la Figura 4. La Figura 4 es idéntica a la Figura 2, excepto por que se muestran los puntos de introducción del desorbente de disolvente orgánico (D) y agua (W) en cada aparato  
15 cromatográfico. El desorbente de disolvente orgánico (D) y el agua (W) juntos forman el eluyente. La fase (D) normalmente es un disolvente orgánico esencialmente puro, pero, en ciertas realizaciones, puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente un disolvente orgánico. La fase (W) normalmente es agua esencialmente pura, pero, en ciertas realizaciones, puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente agua, por ejemplo una mezcla del 98 % de agua/2 % de metanol.

- 20 Otra ilustración de la opción (1) se muestra en la Figura 6. En este documento no hay un punto de inyección de agua separado, y en lugar de ello se inyecta un desorbente de disolvente orgánico acuoso a (D).

- En esta realización, la separación en corriente de refinado y de extracto se puede promover variando la potencia de desorción del eluyente dentro de cada aparato cromatográfico. Esto se puede conseguir introduciendo el  
25 componente disolvente orgánico (o rico en disolvente orgánico) del eluyente y el componente agua (o rico en agua) en diferentes puntos en cada aparato cromatográfico. Por lo tanto, normalmente, el disolvente orgánico se introduce aguas arriba del punto de extracción del extracto y el agua se introduce entre el punto de extracción del extracto y el  
30 sistema. Esto se muestra en la Figura 4.

- Normalmente, en esta realización, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación contiene más disolvente orgánico que el eluyente usado en la segunda etapa de separación, es decir, la  
35 relación de agua:disolvente orgánico en la primera etapa es menor que la relación de agua:disolvente orgánico en la segunda etapa.

- En esta realización, la separación se puede promover variando las velocidades a las que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y refinado en la primera y segunda etapas de separación se vuelve a recircular al  
40 aparato cromatográfico utilizado en esa etapa de separación.

- Normalmente, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la  
45 segunda separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

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

- 50 En esta realización, la primera corriente de extracto en la primera etapa de separación normalmente se elimina 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 normalmente se elimina aguas abajo del punto de introducción del producto intermedio en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda  
55 etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

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

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

65



- Normalmente, en esta realización, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico utilizado 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.
- 5 Normalmente, en esta realización, el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación aguas arriba del punto de extracción de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.
- 10 Normalmente, en esta realización, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico utilizado 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.
- 15 La opción (2) es adecuada para purificar DHA de una mezcla de alimentación.
- La opción (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 después 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.
- 20
- 25 La opción (2) se ilustra con más detalle en la Figura 5. La Figura 5 es idéntica a la Figura 3, excepto por que se muestran los puntos de introducción del desorbente de disolvente orgánico (D) y agua (W) en cada aparato cromatográfico. Como antes, la fase (D) normalmente es un disolvente orgánico esencialmente puro, pero, en ciertas realizaciones, puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente un disolvente orgánico. La fase (W) normalmente es agua esencialmente pura, pero, en ciertas realizaciones, puede ser una
- 30 mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente agua, por ejemplo una mezcla del 98 % de agua/2 % de metanol.
- Otra ilustración de la opción (2) se muestra en la Figura 7. En este documento no hay un punto de inyección de agua separado, y en lugar de ello se inyecta un desorbente de disolvente orgánico acuoso a (D).
- 35 Normalmente, en esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación se reintroduce en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se reintroduce en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.
- 40 Normalmente, en esta realización, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación contiene menos disolvente orgánico que el eluyente usado en la segunda etapa de separación, es decir, la relación de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación es más alta que en la segunda etapa de separación.
- 45 En esta realización, la primera corriente de refinado en la primera etapa de separación normalmente se elimina aguas abajo del punto de introducción de la mezcla de alimentación en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.
- 50 En esta realización, la primera corriente de extracto en la primera etapa de separación normalmente se elimina 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 normalmente se elimina aguas abajo del punto de introducción del producto intermedio en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.
- 55 En esta realización, la segunda corriente de extracto en la segunda etapa de separación normalmente se recoge aguas arriba del punto de introducción del producto intermedio en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.
- 60 Normalmente, en esta realización, el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación aguas arriba del punto de eliminación de la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.
- 65 Normalmente, en esta realización, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico utilizado en la primera

etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico utilizado 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.

- 5 Normalmente, en esta realización, el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación aguas arriba del punto de extracción de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

- 10 Normalmente, en esta realización, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico utilizado 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.

- 15 En esta realización, cada uno de los aparatos cromatográficos de lecho móvil simulado o real usados en la primera y segunda etapas de separación consiste preferentemente en ocho columnas cromatográficas. 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 opcionalmente pueden ser a través de un recipiente de retención, con una corriente de reciclado en la siguiente columna. El flujo de eluyente a través del sistema pasa de la columna 1 a la columna 2 a la columna 3, etc. El flujo efectivo de adsorbente a través del sistema pasa de la columna 8 a la columna 7 a la columna 6, etc.
- 20

- 25 Esto 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 utilizado en la primera etapa de separación. El desorbente de disolvente orgánico se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. Se introduce agua en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. En la primera etapa de separación se eliminan los componentes menos polares (A) como corriente de extracto E1 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 de la parte inferior de la columna 7. La corriente de refinado R1 es el producto intermedio que después se purifica en la segunda etapa de separación, introduciéndose en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación en la parte superior de la columna 5. Se introduce desorbente de disolvente orgánico en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. Se introduce agua en la parte superior de la columna 4 en el aparato cromatográfico utilizado 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.
- 30
- 35

- 40 En esta realización, el disolvente orgánico normalmente se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación.

En esta realización, el agua normalmente se introduce en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación.

- 45 En esta realización, el disolvente orgánico normalmente se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

En esta realización, el disolvente orgánico normalmente se introduce en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.

- 50 En esta realización, la corriente de alimentación normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación.

- 55 En esta realización, una primera corriente de refinado normalmente se recoge como producto intermedio de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. Este producto intermedio se purifica entonces en la segunda etapa de separación y normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. La primera corriente de refinado se puede recoger opcionalmente en un recipiente antes de purificarse en la segunda etapa de separación.

- 60 En esta realización, una primera corriente de extracto normalmente se elimina de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. La primera corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y reintroducirse en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación.

- 65 En esta realización, una segunda corriente de refinado normalmente se elimina de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

- 5 En esta realización, normalmente se recoge una segunda corriente de extracto desde la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. Esta segunda corriente de extracto normalmente contiene el producto de AGPI purificado. La segunda corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y reintroducirse en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.
- 10 En esta realización, el eluyente usado normalmente es alcohol acuoso, preferentemente metanol acuoso. La relación de agua:alcohol normalmente es de 0,5:99,5 a 6:94 partes en volumen.
- 10 Normalmente, en esta realización, la relación de agua:disolvente orgánico en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es menor que la relación de agua:disolvente orgánico en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. Por lo tanto, el eluyente en la primera etapa de separación normalmente contiene más disolvente orgánico que el eluyente usado en la segunda etapa de separación.
- 15 En esta realización, la relación de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación normalmente es de 0,5:99,5 a 1,5:98,5 partes en volumen. La relación de agua:disolvente orgánico en la segunda etapa de separación normalmente es de 2:98 a 6:94 partes en volumen.
- 20 En esta realización, aunque la realización de la Figura 8 está configurada como se muestra en la Figura 10a, en esta realización también podría usarse las configuraciones mostradas en las Figuras 10b y 10c.
- 25 Esta realización se ilustra también 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 utilizado en la primera etapa de separación. El desorbente de disolvente orgánico acuoso se introduce en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. En la primera etapa de separación se eliminan los componentes menos polares (A) como corriente de extracto E1 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 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 introducirse en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. El desorbente de disolvente orgánico acuoso se introduce en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico utilizado 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.
- 30
- 35 En esta realización, el disolvente orgánico acuoso normalmente se introduce en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación.
- 40 En esta realización, el disolvente orgánico acuoso normalmente se introduce en la parte superior de la columna 9 en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación.
- En esta realización, la corriente de alimentación normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación.
- 45 En esta realización, una primera corriente de refinado normalmente se recoge como producto intermedio de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. Este producto intermedio se purifica entonces en la segunda etapa de separación y normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. La primera corriente de refinado se puede recoger opcionalmente en un recipiente antes de purificarse en la segunda etapa de separación.
- 50
- 55 En esta realización, una primera corriente de extracto normalmente se elimina de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. La primera corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y una parte se reintroduce en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. La velocidad de reciclado del líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación de vuelta al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es la velocidad a la que se bombea líquido desde este recipiente a la parte superior de la columna 3.
- 60 En esta realización, normalmente se elimina una segunda corriente de refinado de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación.
- 65 En esta realización, una segunda corriente de extracto normalmente se recoge de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. Esta segunda corriente de extracto normalmente contiene el producto de AGPI purificado. La segunda corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y una parte se reintroduce en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación. La velocidad de reciclado del líquido recogido a través

de la corriente de extracto de la segunda etapa de separación de vuelta al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación es la velocidad a la que se bombea líquido desde este recipiente hasta la parte superior de la columna 3.

- 5 En esta realización, el eluyente usado normalmente es alcohol acuoso, preferentemente metanol acuoso. La relación de agua:alcohol normalmente es de 0,5:99,5 a 6:94 partes en volumen.

10 Normalmente, en esta realización, la relación de agua:disolvente orgánico en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación es menor que la relación de agua:disolvente orgánico en el aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. Por lo tanto, el eluyente usado en la primera etapa de separación normalmente contiene más disolvente orgánico que el eluyente usado en la segunda etapa de separación.

15 En esta realización, la relación de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación normalmente es de 0,5:99,5 a 1,5:98,5 partes en volumen. La relación de agua:disolvente orgánico en la segunda etapa de separación normalmente es de 2:98 a 6:94 partes en volumen.

20 En esta realización, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto de la primera etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación normalmente es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto de la segunda etapa de separación se vuelve a recircular al aparato cromatográfico utilizado en la segunda etapa de separación. En este caso, el eluyente de disolvente orgánico acuoso normalmente es sustancialmente el mismo en cada etapa de separación.

25 En esta realización, aunque la realización de la Figura 9 está configurado como se muestra en la Figura 10a, en esta realización también podría usarse las configuraciones mostradas en las Figuras 10b y 10c.

30 En una realización adicional, el proceso de la presente invención, tal como se describe en este documento, comprende introducir la mezcla de alimentación a un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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, cada zona que tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas y en el que (a) se recoge una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares de una columna en la primera zona y se introducen en una columna no adyacente en la segunda zona, y/o (b) se recoge una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares de una columna en la segunda zona y se introduce en una columna no adyacente en la primera zona, separándose dicho producto de AGPI de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada zona, en el que la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas es superior a 55 °C.

40 En esta realización adicional, el término zona se refiere a una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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 se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas y una corriente de extracción de extracto a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas. Normalmente, cada zona solo tiene un punto de inyección para una mezcla de alimentación. En una realización, cada zona solo tiene 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 En esta realización adicional, la temperatura de sustancialmente toda la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas normalmente es superior a 55 °C. En esta realización adicional, la temperatura de toda la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas preferentemente es superior a 55 °C.

55 En esta realización adicional, la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas normalmente es de 56 °C o superior, preferentemente de 57 °C o superior.

60 Normalmente, en esta realización adicional, la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas es de hasta 100 °C, preferentemente de hasta 95 °C, más preferentemente de hasta 90 °C, aún más preferentemente de hasta 85 °C, incluso más preferentemente de hasta 80 °C, incluso más preferentemente de hasta 75 °C, e incluso más preferentemente de hasta 70 °C.

Normalmente, en esta realización adicional, la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas es de 56 a 70 °C, preferentemente de 56 a 67 °C, más preferentemente de 56 a 65 °C, aún más preferentemente de 57 a 63 °C.

65 Esta realización adicional se refiere a procesos como los descritos en el documento PCT/GB10/002339. Las condiciones de proceso preferidas especificadas en el documento PCT/GB10/002339 son condiciones del proceso

preferidas para esta realización adicional.

5 Esta realización adicional se ilustra en la Figura 11. 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 la primera zona. El desorbente de alcohol acuoso se introduce en la parte superior de la columna 1 en la primera zona. En la primera zona se eliminan los componentes menos polares (A) como corriente de extracto E1 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 de la parte inferior de la columna 7. La corriente de refinado R1 se introduce a continuación en la segunda zona en la parte superior de la columna 12. El desorbente de alcohol acuoso se introduce en la parte superior de la columna 9 en la segunda zona. En la segunda zona, los componentes más polares (C) se eliminan como corriente de refinado R2 en la parte inferior de la columna 14. El producto de AGPI (B) se recoge como corriente de extracto E2 en la parte inferior de la columna 10.

15 En esta realización adicional, el alcohol acuoso normalmente se introduce en la parte superior de la columna 1 en la primera zona.

En esta realización adicional, el alcohol acuoso normalmente se introduce en la parte superior de la columna 9 en la segunda zona.

20 En esta realización adicional, la corriente de alimentación normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 en la primera zona.

25 En esta realización adicional, una primera corriente de refinado normalmente se recoge de la parte inferior de la columna 7 en la primera zona y se introduce en la parte superior de la columna 12 en la segunda zona. La primera corriente de refinado se puede recoger opcionalmente en un recipiente antes de introducirse en la columna 12.

30 En esta realización adicional, una primera corriente de extracto normalmente se elimina de la parte inferior de la columna 2 en la primera zona. La primera corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y una parte se reintroduce en la parte superior de la columna 3 en la primera zona. La velocidad de reciclado del líquido recogido a través de la corriente de extracto desde la primera zona de vuelta a la primera zona es la velocidad a la que se bombea líquido desde este recipiente hasta la parte superior de la columna 3.

35 En esta realización adicional, una segunda corriente de refinado normalmente se elimina de la parte inferior de la columna 14 en la segunda zona.

40 En esta realización adicional, normalmente se recoge una segunda corriente de extracto desde la parte inferior de la columna 10 en la segunda zona. Esta segunda corriente de extracto normalmente contiene el producto de AGPI purificado. La segunda corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y una parte se reintroduce en la parte superior de la columna 11 en la segunda zona. La velocidad de reciclado del líquido recogido a través de la corriente de extracto desde la segunda zona hacia la segunda zona es la velocidad a la que se bombea líquido desde este recipiente hasta la parte superior de la columna 11.

45 En esta realización adicional, la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto de la primera zona se vuelve a recircular a la primera zona normalmente es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto de la segunda zona se vuelve a recircular a la segunda zona.

En esta realización adicional, el eluyente de alcohol acuoso normalmente es sustancialmente el mismo en cada zona.

50 El proceso de la presente invención es distinto de un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende introducir la mezcla de alimentación a un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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, cada zona que tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas y en el que (a) se recoge una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares de una columna en la primera zona y se introduce en una columna no adyacente en la segunda zona, y/o (b) se recoge una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares de una columna en la segunda zona y se introduce en una columna no adyacente en la primera zona, separándose dicho producto de AGPI de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada zona, proceso de separación cromatográfica que se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15 y 55 °C.

60 En este proceso excluido, el término "zona" es como se ha definido anteriormente.

65

Normalmente, en este proceso excluido, la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas es de 40 °C o 55 °C, o la temperatura de toda la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas es 40 °C o 55 °C. Preferentemente, en este proceso excluido, el proceso se lleva a cabo a una temperatura de 20 a 40 °C, más preferentemente a aproximadamente 30 °C, es decir, normalmente a temperatura ambiente.

Normalmente, el proceso de la presente invención es distinto de un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende introducir la mezcla de alimentación a un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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, cada zona que tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas, y en el que (a) se recoge una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares de una columna en la primera zona y se introduce en una columna no adyacente en la segunda zona, y/o (b) se recoge una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares de una columna en la segunda zona y se introduce en una columna no adyacente en la primera zona, separándose dicho producto de AGPI de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada zona.

De este modo, preferentemente, el proceso de la presente invención es distinto del descrito en el documento PCT/GB10/002339.

En otra realización adicional, la temperatura de al menos una de las columnas cromatográficas a través de las cuales se pasa la mezcla de alimentación es distinta de 40 °C o 55 °C.

En esta otra realización adicional, la temperatura de todas las columnas cromatográficas a través de las cuales pasa la mezcla de alimentación normalmente es distinta de 40 °C o 55 °C, preferentemente distinta de 40 °C o 55 °C, más preferentemente distinta de 39,5 a 40,5 °C o de 54,5 a 55,5 °C.

En la práctica, el proceso de la presente invención generalmente será controlado por un ordenador. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un programa de ordenador para controlar un aparato cromatográfico como se define en el presente documento, el programa de ordenador que contiene que contiene medios de código que cuando se ejecutan instruye al aparato para llevar a cabo el proceso de la invención.

En este documento también se describe el uso de una o más columnas cromatográficas calentadas y/o eluyente calentado y/o mezcla de alimentación calentada en un proceso de separación cromatográfica como se describe en este documento para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende purificar la mezcla de alimentación en una o más columnas cromatográficas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para (a) reducir la cantidad de eluyente utilizada en el proceso de separación y/o (b) mejorar la resolución en el proceso de separación de los diversos componentes presentes en la mezcla de alimentación.

Normalmente al menos una de las columnas cromatográficas y/o el eluyente calentado y/o la mezcla de alimentación calentada se calientan a una temperatura como se define en este documento.

En este documento también se describe el uso de eluyente calentado en un proceso de separación cromatográfica como se describe en este documento para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende purificar la mezcla de alimentación en una o más columnas cromatográficas que contienen como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para (a) reducir la cantidad de eluyente utilizado en el proceso de separación y/o (b) mejorar la resolución en el proceso de separación de los diversos componentes presentes en la mezcla de alimentación.

La presente invención también proporciona un proceso de separación cromatográfica como se describe en este documento para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende pasar la mezcla de alimentación a través de una o más columnas cromatográficas calentadas que contienen como eluyente un disolvente orgánico acuoso, en el que la temperatura de al menos una de las columnas cromatográficas a través de la cual se hace pasar la mezcla de alimentación es superior a la temperatura ambiente y/o en la que la temperatura del eluyente y/o la mezcla de alimentación es superior a la temperatura ambiente, y en el que las una o más columnas cromatográficas calentadas permiten (a) reducir la cantidad de eluyente utilizada en el proceso de separación y/o (b) mejorar la resolución en el proceso de separación de los diversos componentes presentes en la mezcla de alimentación.

Normalmente, al menos una de las columnas cromatográficas se calienta a una temperatura como se define en este documento.

Preferentemente, el eluyente se calienta a una temperatura como se define en este documento.

Normalmente, en el proceso de la presente invención, la al menos una columna cromatográfica a una temperatura superior a la temperatura ambiente permite (a) reducir la cantidad de eluyente utilizada en el proceso de separación y/o (b) mejorar la resolución en la separación de los diversos componentes presentes en la mezcla de alimentación.

- 5 En este documento también se describen composiciones que comprenden un producto de AGPI que se puede obtener mediante el proceso de la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1

- 15 Se fracciona un material de alimentación derivado de aceite de pescado (55 % en peso de EE EPA, 5 % en peso de EE DHA) utilizando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice C18 unido (tamaño de partícula 300  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionaria y metanol acuoso (90:10 en p/p de metanol:agua) como eluyente de acuerdo con el sistema ilustrado esquemáticamente en la Figura 11. Se conectan 15 columnas en serie (diámetro: 22 mm, longitud: 300 mm) como se muestra en la Figura 11. El desorbente se precalentó a una temperatura de 60 °C, dando como resultado una temperatura de la columna de aproximadamente 60 °C.

- 20 Los parámetros de funcionamiento y los caudales son los siguientes. Para las condiciones siguientes, el EE EPA se produce con un alto nivel de pureza (99 % por GC FAMES). El rastro de GC FAMES del producto EPA se muestra como Figura 12.

- 25 Tiempo del paso: 600 segundos  
 Caudal de la alimentación (F): 0,5 ml/min  
 Caudal del desorbente (D1) en la primera zona: 33 ml/min  
 Caudal del extracto (E1) en la primera zona: 7 ml/min  
 Velocidad de reciclado del extracto (D1 - E1) en la primera zona: 26 ml/min  
 30 Caudal del refinado (R1) en la primera zona: 8 ml/min  
 Caudal del desorbente (D2) en la segunda zona: 34 ml/min  
 Caudal del extracto (E2) en la segunda zona: 10 ml/min  
 Velocidad de reciclado del extracto (D2 - E2) en la segunda zona: 24 ml/min  
 Caudal del refinado (R2) en la segunda zona: 8 ml/min

### 35 Ejemplo 2

- Se fracciona un material de alimentación derivado de aceite de pescado (55 % en peso de EE EPA, 5 % en peso de EE DHA) utilizando un sistema de cromatografía de lecho móvil en movimiento utilizando gel de sílice C18 unido (tamaño de partícula 300  $\mu\text{m}$ ) como fase estacionaria y metanol acuoso (98:2 en p/p de metanol:agua) como eluyente de acuerdo con el sistema ilustrado esquemáticamente en la Figura 10. La separación 1 consta de 8 columnas (diámetro: 76,29 mm, longitud: 914,40 mm) que se conectan en serie como se muestra en la Figura 10. El refinado intermedio de la separación 1 se aísla y se separa y la separación 2 se realiza usando la misma secuencia de columnas que la anterior. El desorbente se precalentó a una temperatura de 40 °C, dando como resultado una temperatura de la columna de aproximadamente 40 °C.

- Los parámetros de funcionamiento y los caudales son los siguientes. Para las condiciones siguientes, el EE EPA se produce con un alto nivel de pureza (98 % por GC FAMES). El rastro de GC FAMES del producto EPA se muestra como Figura 13.

- 50 Tiempo del paso: 1200 segundos  
 Caudal de la alimentación (F): 35 ml/min  
 Caudal del desorbente (D1) en la primera etapa: 2270 ml/min  
 Caudal del extracto (E1) en la primera etapa: 1320 ml/min  
 55 Velocidad de reciclado del extracto (D1 - E1) en la primera etapa: 950 ml/min  
 Caudal del refinado (R1) en la primera etapa: 950 ml/min  
 Caudal del desorbente (D2) en la segunda etapa: 1510 ml/min  
 Caudal del extracto (E2) en la segunda etapa: 850 ml/min  
 Velocidad de reciclado del extracto (D2 - E2) en la segunda etapa: 660 ml/min  
 60 Caudal del refinado (R2) en la segunda etapa: 670 ml/min

### Ejemplo de referencia 1

- Los tiempos de retención de una serie de ácidos grasos comunes se midieron en un aparato cromatográfico en lecho fijo usando un eluyente de metanol acuoso y un adsorbente de sílice C18. Así, se midieron los tiempos de retención del ácido estearidónico (SDA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido

oleico (OA) y se varió la temperatura y concentración de metanol. Las tablas siguientes muestran los tiempos de retención absolutos y los tiempos de retención relativos (relativos a EPA) para los diversos ácidos grasos.

5 A partir de los tiempos de retención absolutos en las tablas 1, 3 y 5, se puede observar que el tiempo de funcionamiento global es mucho más corto a temperatura elevada, es decir, menor consumo de disolvente y mayor rendimiento a temperatura más alta.

10 A partir de los tiempos de retención relativos en las tablas 2, 4 y 6, puede observarse que el aumento de la temperatura tiene un mayor efecto sobre el tiempo de retención relativo de las impurezas menos polares (OA) que los componentes más estrechamente relacionados (DHA). Por lo tanto, con un 5 % de agua, el tiempo de retención relativo de OA (frente a EPA) se reduce de 1,91 a 18 °C a 1,63 a 70 °C, mientras que el tiempo de retención relativo de DHA (con EPA) se reduce de 1,19 a 18 °C a 1,15 a 70 °C. Se observa un efecto similar cuando se realizan pruebas con el 2 % de agua y el 10 % de agua, respectivamente.

15 Esto significa que se puede lograr una mejor resolución de componentes estrechamente relacionados (por ejemplo, EPA de DHA) utilizando un mayor contenido de agua, pero a un menor consumo de disolventes y un mayor rendimiento cuando se lleva a cabo a una temperatura más alta.

20 **TABLA 1 Tiempo de retención (minutos) de los picos de ácidos grasos principales a diversas temperaturas usando metanol que contiene el 2 % de agua como fase móvil y sílice C18**

Regular C18	Rt a 18 °C	Rt a 30 °C	Rt a 40 °C	Rt a 50 °C	Rt a 60 °C	Rt a 70 °C
SDA (C18:4n3)	6,7	6,1	5,9	5,7	5,4	4,96
EPA (C20:5n3)	7,4	6,66	6,38	6,06	5,7	5,15
DHA (C22:6n3)	8,3	7,54	7,24	6,8	6,4	5,78
OA (C18:1)	12,3	10,6	10,01	9,2	8,4	7,35

25 **Tabla 2 - Tiempos de retención relativos (RRT) de los principales picos de ácidos grasos con EPA a diversas temperaturas usando metanol que contiene el 2 % de agua como fase móvil y sílice C18**

Regular C18	RRT a 18 °C	RRT a 30 °C	RRT a 40 °C	RRT a 50 °C	RRT a 60 °C	RRT 70 °C
SDA (C18:4n3)	0,91	0,92	0,92	0,94	0,95	0,96
EPA (C20:5n3)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
DHA (C22:6n3)	1,12	1,13	1,13	1,12	1,12	1,12
OA (C18:1)	1,66	1,59	1,57	1,52	1,47	1,43

30 **TABLA 3 - Tiempo de retención (minutos) de los principales picos de ácidos grasos a diversas temperaturas utilizando metanol que contiene el 5 % de agua como fase móvil y sílice C18**

Regular C18	Rt a 18 °C	Rt a 30 °C	Rt a 40 °C	Rt a 50 °C	Rt a 60 °C	Rt 70 °C
SDA (C18:4n3)	10,3	9,57	9,14	8,75	8,3	8
EPA (C20:5n3)	12,08	11,17	10,6	10,1	9,59	9,14
DHA (C22:6n3)	14,33	13,15	12,4	11,73	11,08	10,49
OA (C18:1)	23,07	20,47	18,79	17,46	16,11	14,9

35 **Tabla 4 - Tiempos de retención relativos (RRT) de los principales picos de ácidos grasos con EPA a diversas temperaturas utilizando metanol que contiene el 5 % de agua como fase móvil y sílice C18**

Regular C18	RRT a 18 °C	RRT a 30 °C	RRT a 40 °C	RRT a 50 °C	RRT a 60 °C	RRT a 70 °C
SDA (C18:4n3)	0,85	0,86	0,86	0,87	0,87	0,88
EPA (C20:5n3)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
DHA (C22:6n3)	1,19	1,18	1,17	1,16	1,16	1,15
OA (C18:1)	1,91	1,83	1,77	1,73	1,68	1,63

**Tabla 5 - Tiempo de retención (minutos) de los picos principales de ácidos grasos a diversas temperaturas usando metanol que contiene el 10 % de agua como fase móvil y sílice C18**

Regular C18	Rt a 18 °C	Rt a 30 °C	Rt a 40 °C	Rt a 50 °C	Rt a 60 °C	Rt 70 °C
SDA (C18:4n3)	20,69	n/d	n/d	17,27	16,33	16,41
EPA (C20:5n3)	26,45	n/d	n/d	21,78	20,38	20,41
DHA (C22:6n3)	34,43	n/d	n/d	27,61	25,88	25,77
OA (C18:1)	58,81	n/d	n/d	43,97	40,55	40,61



**Tabla 6 - Tiempos de retención relativa (RRT) de los principales picos de ácidos grasos con EPA a diversas temperaturas usando metanol que contiene 10 % de agua como fase móvil y silicio C18**

<b>Regular C18</b>	<b>RRT a 18 °C</b>	<b>RRT a 30 °C</b>	<b>RRT a 40 °C</b>	<b>RRT a 50 °C</b>	<b>RRT a 60 °C</b>	<b>RRT a 70 °C</b>
<b>SDA (C18:4n3)</b>	0,78	n/d	n/d	0,79	0,80	0,80
<b>EPA (C20:5n3)</b>	1.0	n/d	n/d	1.0	1.0	1.0
<b>DHA (C22:6n3)</b>	1,30	n/d	n/d	1,27	1,27	1,26
<b>OA (C18:1)</b>	2,22	n/d	n/d	2,02	1,99	1,99

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende introducir la mezcla de alimentación en uno o más aparatos cromatográficos de lecho móvil simulado o real que tienen una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas que contienen como eluyente un disolvente orgánico acuoso, en el que
- la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas a través de las cuales pasa la mezcla de alimentación es superior a temperatura ambiente,
  - la pluralidad de columnas cromatográficas contiene, como adsorbente, perlas poliméricas o gel de sílice, y
  - la mezcla de alimentación es una materia prima de aceite de pescado o una materia prima 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 superior al 90 %; y
- en el que el proceso es distinto de un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende introducir la mezcla de alimentación en un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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, cada zona que tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas, y en el que (a) se recoge una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares de una columna en la primera zona y se introduce en una columna no adyacente en la segunda zona, y/o (b) se recoge una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares de una columna en la segunda zona y se introduce en una columna no adyacente en la primera zona, separándose dicho producto de AGPI de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada zona, proceso de separación cromatográfica que se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 15 y 55 °C.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el eluyente no está en un estado supercrítico.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas superior a temperatura ambiente se consigue calentando el eluyente de disolvente orgánico acuoso y/o la mezcla de alimentación a una temperatura superior a temperatura ambiente.
4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas es superior a 30 °C, preferentemente superior a 40 °C, y/o en el que la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas es de hasta 100 °C, preferentemente de hasta 70 °C, y/o en el que la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas es de 40 a 70 °C, preferentemente de 57 a 63 °C.
5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, proceso que comprende las etapas de:
- (i) purificar la mezcla de alimentación en una primera etapa de separación en un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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 cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener el producto de AGPI;
- en el que la temperatura de una o más de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas en la primera etapa de separación y/o una o más de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas en la segunda etapa de separación es superior a temperatura ambiente; y en el que
- (a) la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato cromatográfico, recuperándose el producto intermedio entre la primera y la segunda etapas de separación y ajustándose las condiciones del proceso en el aparato cromatográfico entre la primera y la segunda etapas de separación de manera 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 un primer y segundo aparatos cromatográficos separados, respectivamente, introduciéndose el producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación en el segundo aparato cromatográfico y separándose el producto de AGPI de diferentes componentes de la alimentación en cada etapa de separación.
6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura de todas las

columnas cromatográficas es superior a temperatura ambiente y/o en el que cada aparato tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas unidas.

- 5 7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el eluyente contiene más del 5 % en peso de agua, basado en el peso total del disolvente orgánico y agua, y/o en el que el eluyente es una mezcla de agua y un alcohol, un éter, un éster, una cetona o un nitrilo.
- 10 8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el eluyente es una mezcla de agua y metanol.
- 15 9. Un proceso de separación cromatográfica de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cuando el proceso comprende introducir la mezcla de alimentación a un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas conectadas 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, cada zona que tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de la cual se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas conectadas y en el que (a) se recoge una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares de una columna en la primera zona y se introduce en una columna no adyacente en la segunda zona, y/o (b) se recoge una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares de una columna en la segunda zona y se introduce en una columna no adyacente en la primera zona, separándose dicho producto de AGPI de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada zona,
- 20 la temperatura de al menos una de la pluralidad de columnas cromatográficas conectadas es superior a 55 °C, preferentemente de 56 °C o superior.

Figura 1

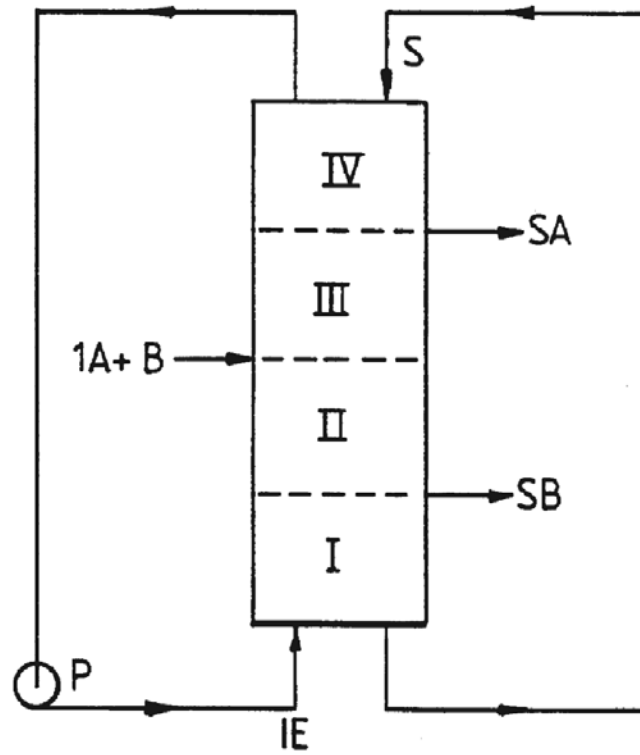


Figura 2

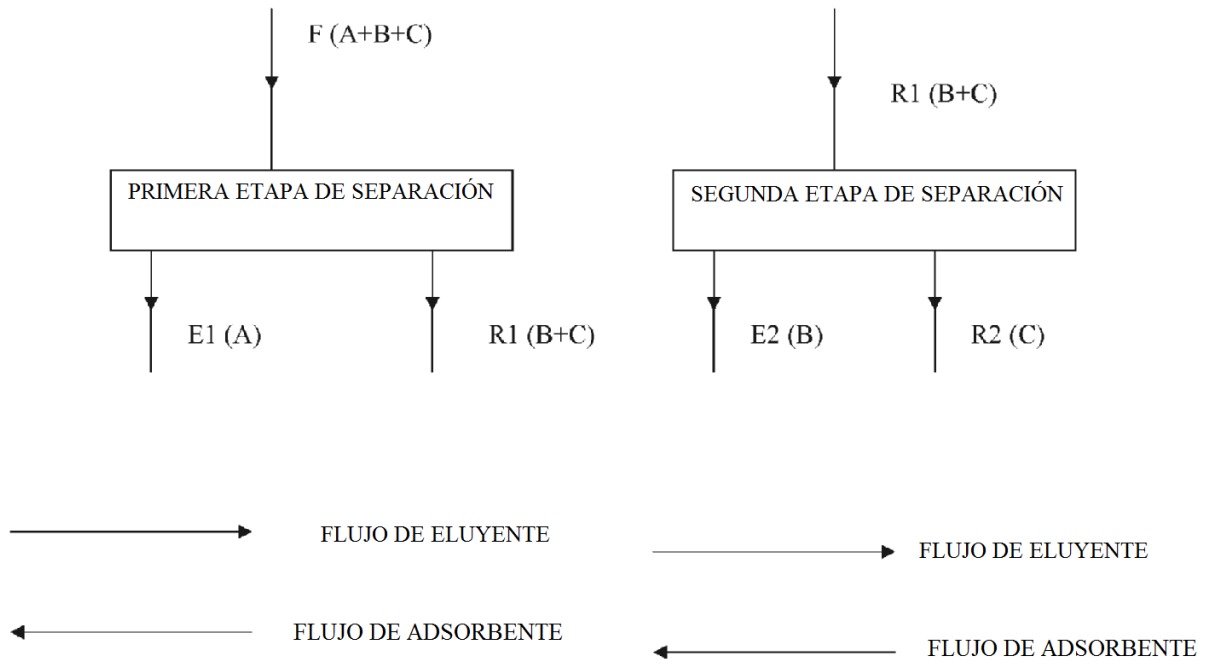


Figura 3

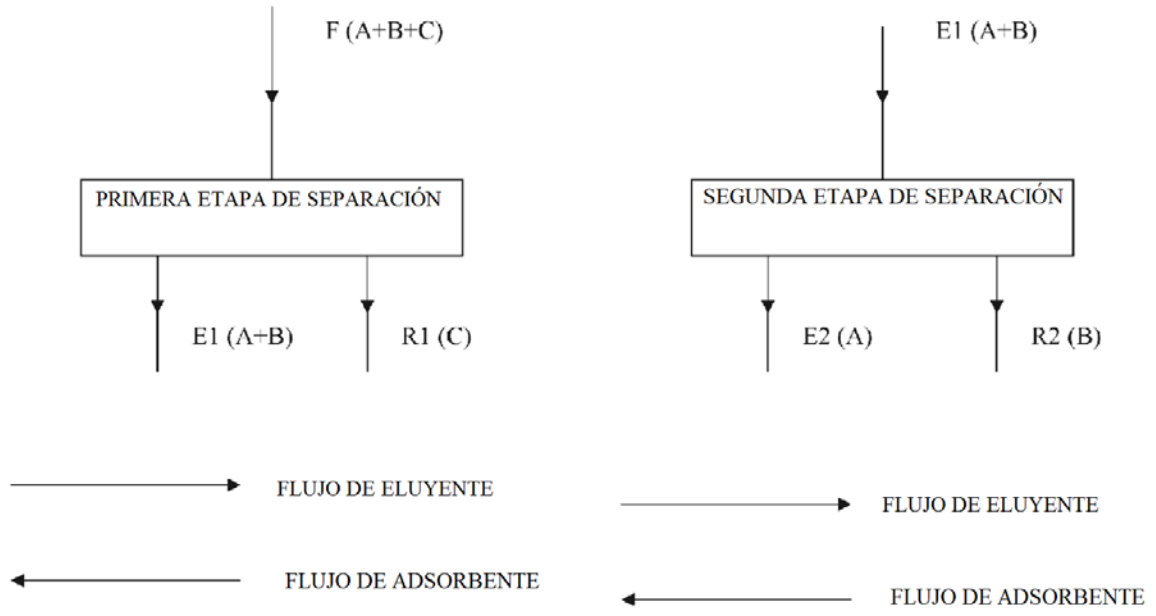


Figura 4

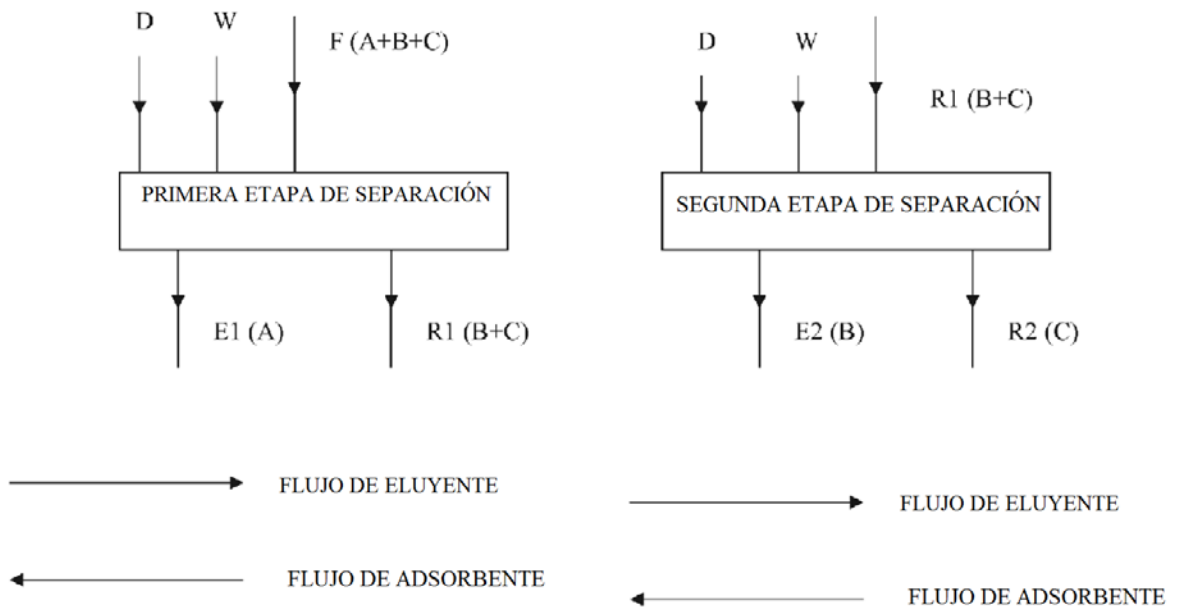


Figura 5

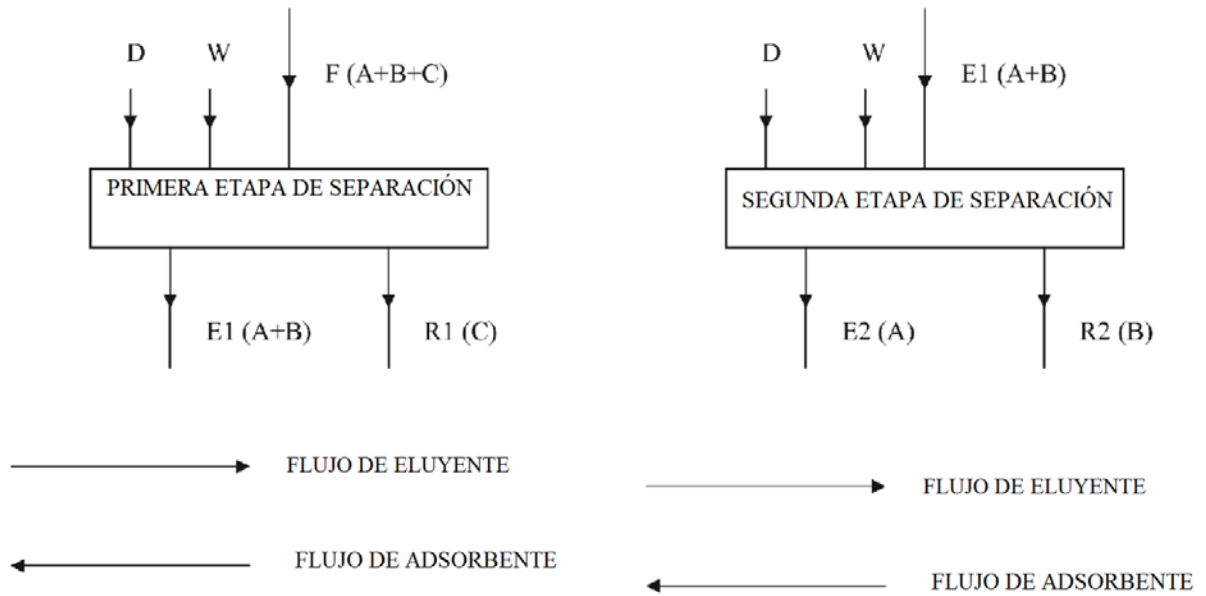




Figura 6

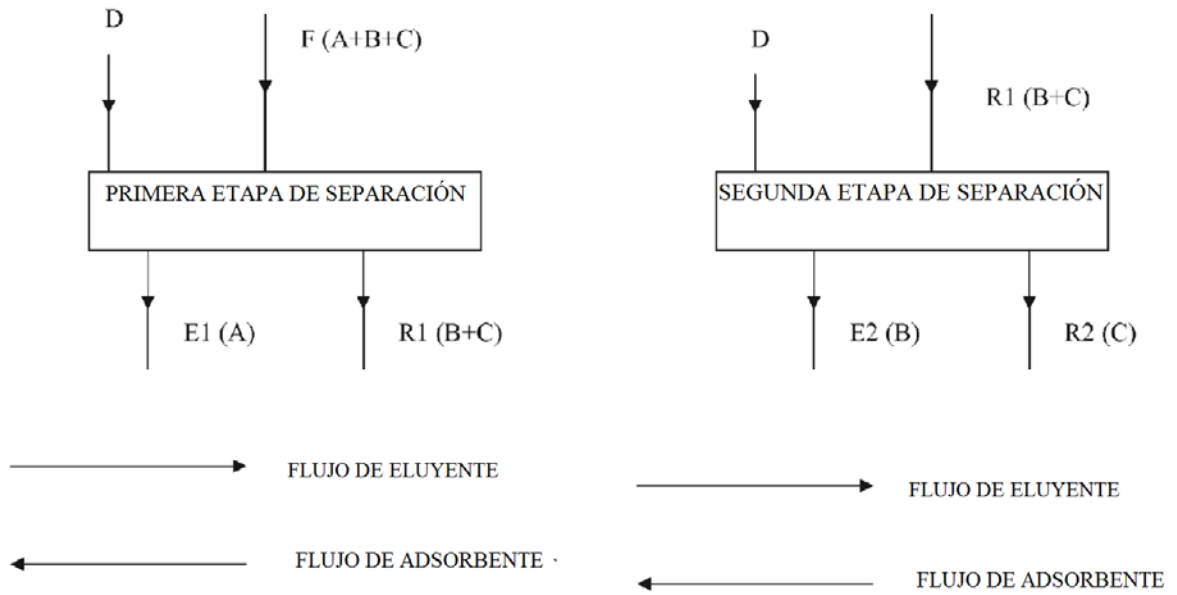


Figura 7

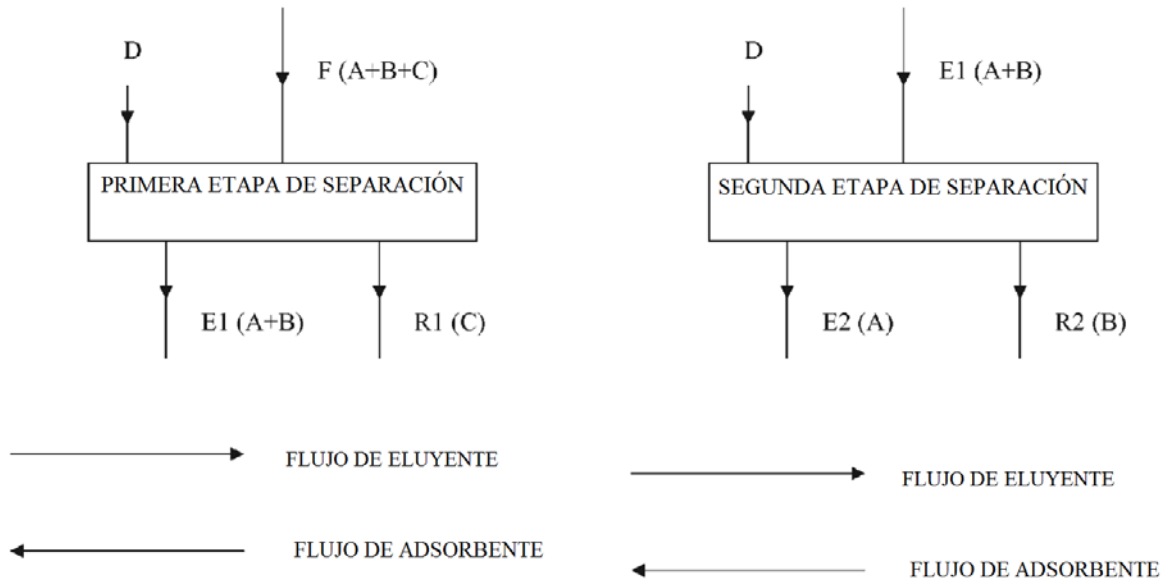


Figura 8

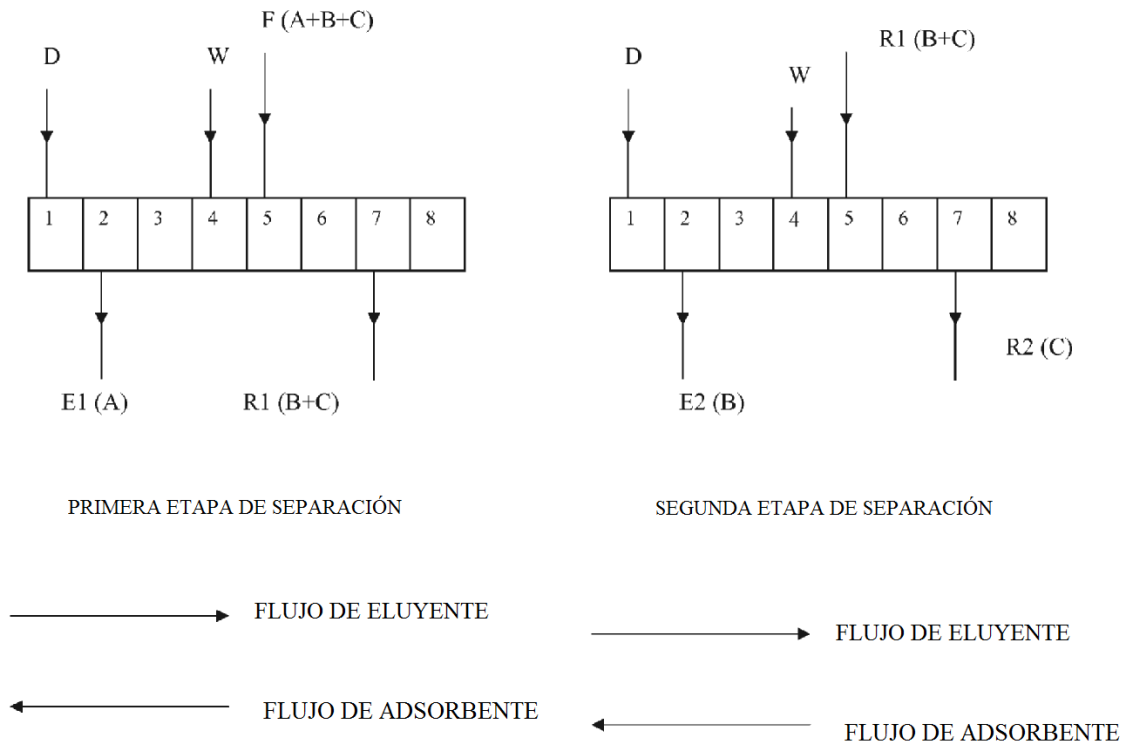


Figura 9

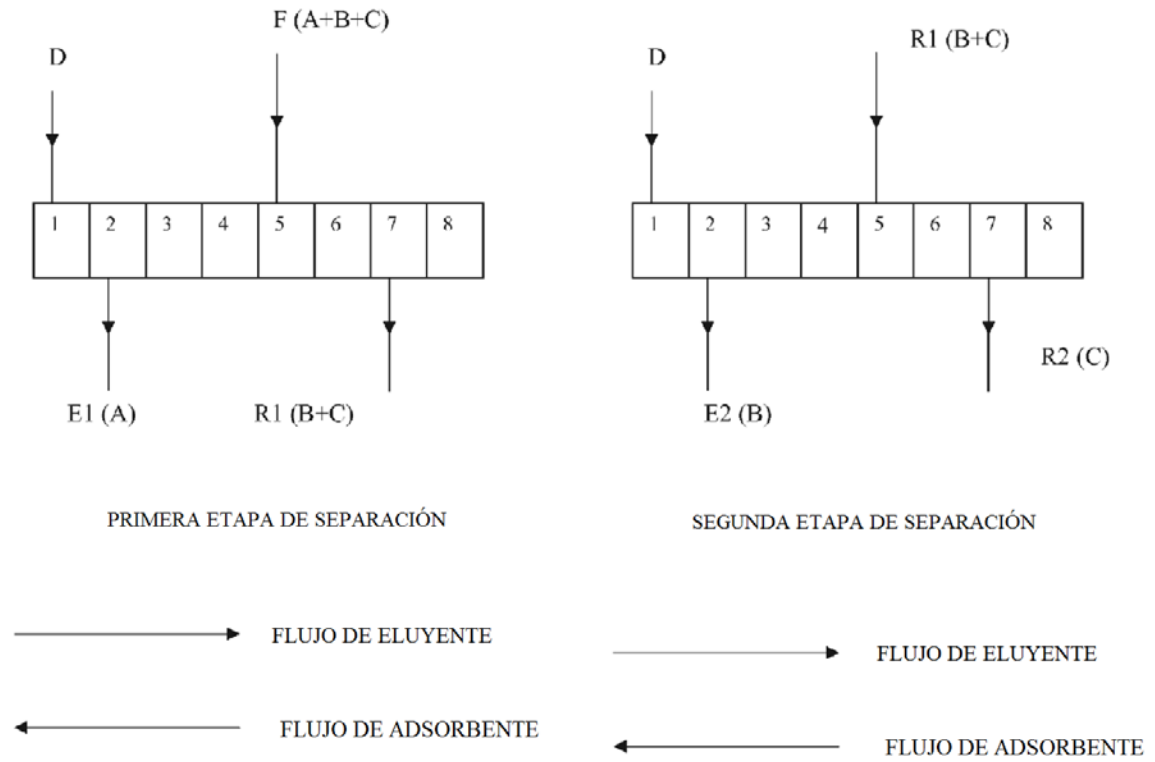
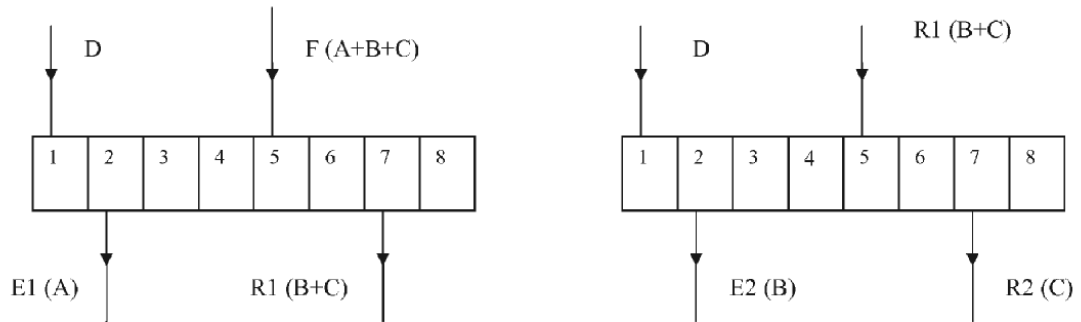
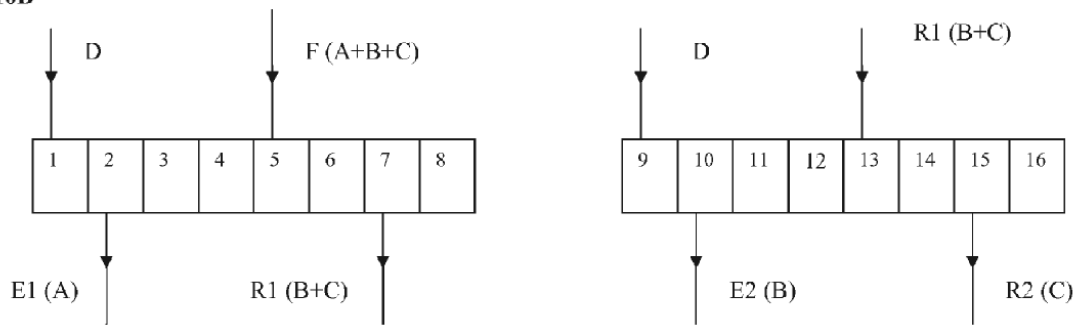


Figura 10

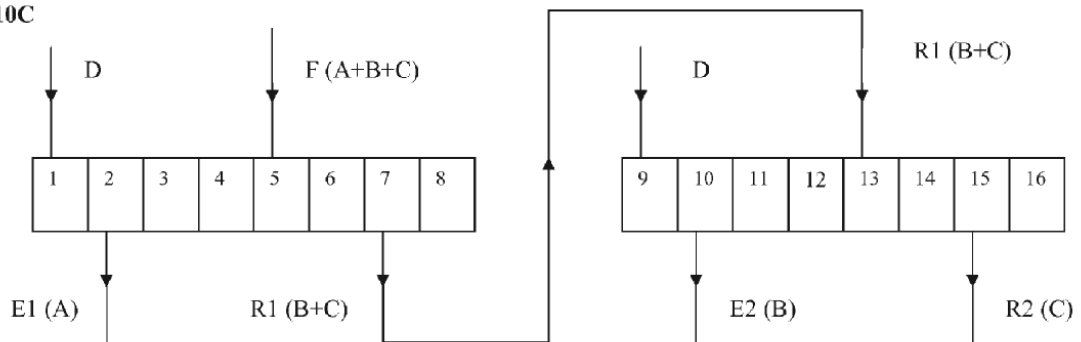
10A



10B



10C



PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN

SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN

→ FLUJO DE ELUYENTE

→ FLUJO DE ELUYENTE

← FLUJO DE ADSORBENTE

← FLUJO DE ADSORBENTE

Figura 11

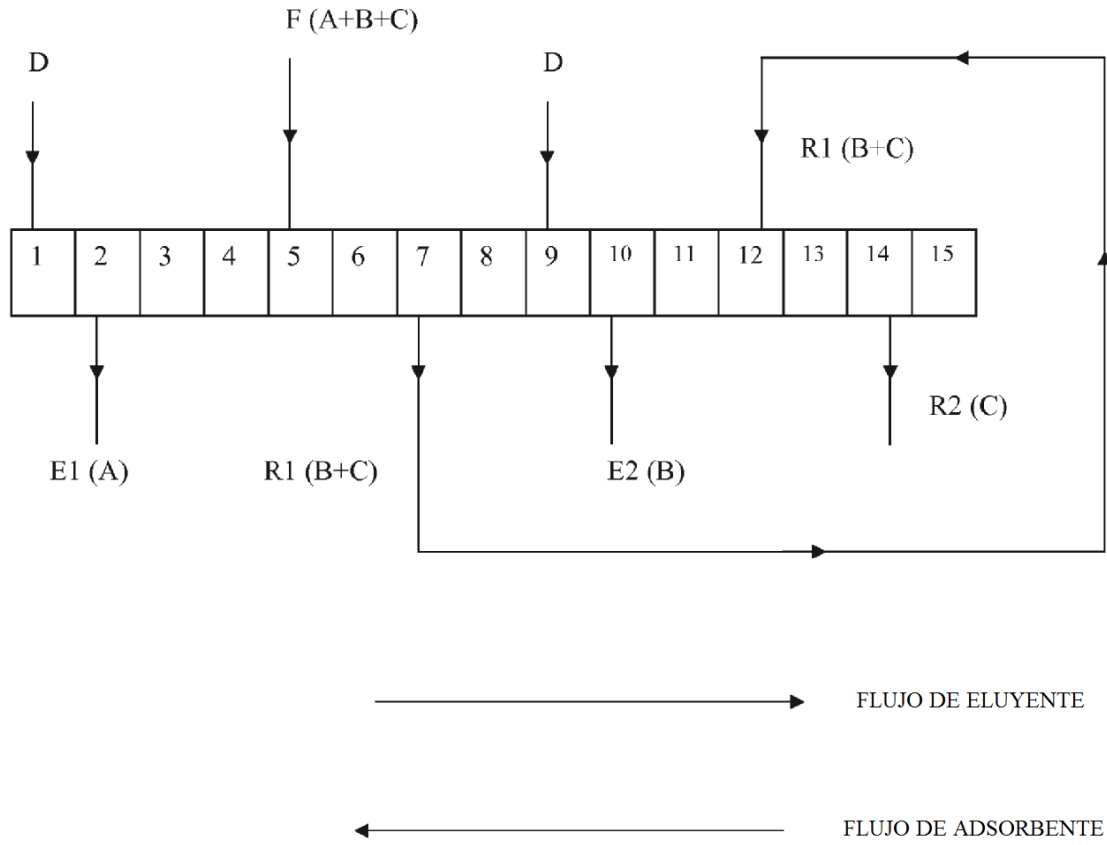


Figura 12

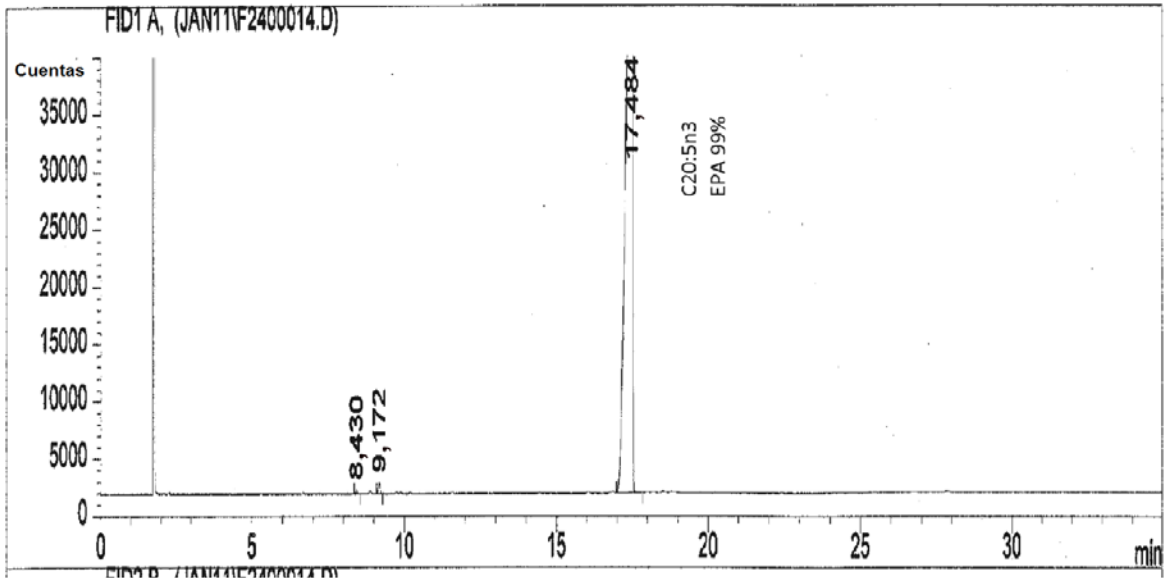


Figura 13

