(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 661 261**

(51) Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)
C11C 1/00 (2006.01)
C11C 1/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012** **E 15152383 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017** **EP 2886176**

(54) Título: **Proceso SMB para producir EPA altamente puro de aceite de pescado**

(30) Prioridad:

06.07.2011 GB 201111595

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.03.2018

(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 2 661 261 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso SMB para producir EPA altamente puro de aceite de pescado

La presente invención se refiere a un proceso de separación cromatográfica mejorado para purificar el ácido graso poliinsaturado EPA o un derivado del mismo.

EPA y sus derivados son precursores para moléculas biológicamente importantes, que desempeñan una función importante en la regulación de funciones biológicas tales como la agregación de plaquetas, inflamación y respuestas inmunológicas. Así, EPA y sus derivados pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de una amplia variedad de afecciones patológicas que incluyen afecciones del SNC; neuropatías, que incluyen neuropatía diabética; enfermedades cardiovasculares; afecciones del sistema inmunitario general e inflamatorias, que incluyen enfermedades inflamatorias de la piel.

Se encuentra EPA en materiales de partida naturales, y en particular aceites de pescado. El EPA en los aceites de pescado está, sin embargo, presente en tales aceites en mezcla con ácidos grasos saturados y numerosas otras impurezas.

La purificación de EPA de aceites de pescado es particularmente exigente. Así, los aceites de pescado son mezclas extremadamente complejas que contienen un gran número de diferentes componentes con tiempos de retención muy similares en aparatos de cromatografía. Representan una materia prima mucho más exigente de la que purificar EPA que, por ejemplo, una materia prima de aceite de algas. Sin embargo, se requiere un grado de pureza muy alto de EPA, particularmente para aplicaciones farmacéuticas y nutracéuticas. Por tanto, históricamente, se ha usado destilación para purificar EPA para aplicaciones terapéuticas.

Desafortunadamente, EPA es extremadamente frágil. Así, cuando se calienta en presencia de oxígeno, tiene tendencia a isomerización, peroxidación y oligomerización. Por tanto, el fraccionamiento y purificación de EPA para preparar ácidos grasos puros es difícil. La destilación, incluso a vacío, puede conducir a degradación de productos no aceptable.

La cromatografía en lecho móvil simulado o real son técnicas conocidas, comunes para aquellos expertos en la materia. El principio de operación implica el movimiento en contracorriente de una fase de eluyente líquido y una fase de adsorbente sólido. Esta operación permite el uso mínimo de disolvente, haciendo el proceso económicamente viable. Tal tecnología de separación ha encontrado varias aplicaciones en diversas áreas, que incluyen hidrocarburos, productos químicos industriales, aceites, azúcares y API.

Como es muy sabido, en un sistema cromatográfico de lecho estacionario convencional, una mezcla cuyos componentes van a separarse percola a través de un recipiente. El recipiente es generalmente cilíndrico, y normalmente se denomina columna. La columna contiene un relleno de un material poroso (generalmente llamado la 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 manera que los componentes salen de la columna sucesivamente y selectivamente. Así, algunos de los componentes tienden a fijarse fuertemente a la fase estacionaria y así percolarán lentamente, mientras que otros tienden a fijarse débilmente y salir de la columna más rápidamente. Se han propuesto muchos sistemas cromatográficos de lecho estacionario diferentes y se usan para tanto fines analíticos como de producción industrial.

A diferencia, un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado consiste en varias columnas individuales que contienen adsorbente que están conectadas juntas en serie. Se pasa eluyente a través de las columnas en una primera dirección. Los puntos de inyección de la materia prima y el eluyente, y los puntos de recogida de los componentes separados en el sistema, se desplazan periódicamente por medio de una serie de válvulas. El efecto global es simular la operación de una única columna que contiene un lecho móvil de adsorbente sólido, moviéndose el adsorbente sólido en una dirección en contracorriente al flujo de eluyente. Así, 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 pasa el eluyente, pero en un sistema de lecho móvil simulado la operación es tal que se simula un lecho móvil en contracorriente continuo.

Los procesos y equipo para la cromatografía en lecho móvil simulado se describen en varias patentes, que incluyen los documentos 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 tópico también se trata en detalle en “Preparative and Production Scale Chromatography”, editado por Ganetsos y Barker, Marcel Dekker Inc, New York, 1993.

El documento US-A-5.719.302 describe procesos para el fraccionamiento cromatográfico de composiciones que comprenden ácidos grasos poliinsaturados o derivados de los mismos.

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

componentes separados por medio de un sistema de válvulas, en su lugar se mueven físicamente una serie de unidades de adsorción (es decir, columnas) con respecto a los puntos de alimentación y descarga. De nuevo, la operación es tal que se simula un lecho móvil en contracorriente continuo.

Los procesos y equipo para la cromatografía en lecho móvil real se describen en varias patentes, que incluyen los documentos US 6.979.402, US 5.069.883 y US 4.764.276.

Un aparato de cromatografía en lecho móvil simulado típico se ilustra con referencia a la Figura 1. El concepto de un proceso de separación cromatográfica en lecho móvil simulado o real se explica considerando una columna cromatográfica vertical que contiene la fase estacionaria S dividida en secciones, más precisamente en cuatro sub-zonas superpuestas I, II, III y IV desde el fondo hasta la cabeza de la columna. El eluyente se introduce en el fondo en IE por medio de una bomba P. La mezcla de los componentes A y B que van a separarse se introduce en IA + B entre la sub-zona II y la sub-zona III. Un extracto que contiene principalmente B se recoge en SB entre la sub-zona I y la sub-zona II, y un refinado que contiene principalmente A se recoge en SA entre la sub-zona III y la sub-zona IV.

En el caso de un sistema de lecho móvil simulado, se produce un movimiento descendente simulado de la fase estacionaria S por movimiento de los puntos de introducción y recogida con respecto a la fase sólida. En el caso de un sistema de lecho móvil real, el movimiento descendente simulado de la fase estacionaria S se produce por movimiento de las diversas columnas cromatográficas con respecto a los puntos de introducción y recogida. En la Figura 1, el eluyente circula hacia arriba y la mezcla A + B se inyecta entre la sub-zona II y la sub-zona III. Los componentes se moverán según sus interacciones cromatográficas con la fase estacionaria, por ejemplo, adsorción sobre un medio poroso. El componente B que presenta afinidad más fuerte con la fase estacionaria (el componente que eluye más lento) será más lentamente arrastrado por el eluyente y lo seguirá con retraso.

El componente A que presenta afinidad más débil con la fase estacionaria (el componente que eluye más rápido) será más fácilmente arrastrado por el eluyente. Si el conjunto adecuado de parámetros, especialmente la velocidad de flujo en cada sub-zona, están correctamente estimados y controlados, el componente A que presenta la afinidad más débil con la fase estacionaria se recogerá entre la sub-zona III y la sub-zona IV como un refinado y el componente B que presenta la afinidad más fuerte con la fase estacionaria se recogerá entre la sub-zona I y la sub-zona II como un extracto.

Para lograr EPA de alta pureza o éster etílico de EPA en purezas superiores al 90 %, por ejemplo, superiores al 95 o 97 %, es posible utilizar un proceso de separación en lecho móvil simulado que realiza dos etapas de separación simultáneas. Un proceso tal se describe en la solicitud de patente internacional nº PCT/GB10/002339.

En general, todas las técnicas cromatográficas de separación para separar PUFA, que incluyen procesos SMB, utilizan grandes volúmenes de disolventes orgánicos como eluyentes. Después de completarse el proceso de separación cromatográfica, los PUFA deben recuperarse de la disolución en el eluyente. Normalmente, un gran gasto de tiempo y energía participa en la recuperación de PUFA de la disolución en el eluyente. Además, los disolventes orgánicos usados como eluyentes en los procesos de separación cromatográfica son frecuentemente perjudiciales para el medioambiente o para los operarios que los manipulan. Por tanto, se requiere un proceso de separación cromatográfica que reduzca la cantidad de disolvente orgánico que necesita usarse.

Se ha encontrado ahora ventajosamente que pueden producirse EPA o un derivado de EPA con una pureza similarmente alta como se describe en el documento PCT/GB10/002339 por un proceso de separación de tres etapas que usa un volumen mucho menor de disolvente que el proceso de dos etapas. El proceso mejorado de la presente invención utiliza casi el 50 % menos de disolvente que el proceso de dos etapas descrito en el documento PCT/GB10/002339. Esto es claramente ventajoso en términos de coste, facilidad de recuperación de producto e impacto medioambiental.

Resumen de la invención

Se ha encontrado sorprendentemente que EPA o un derivado de EPA pueden purificarse eficazmente de materias primas comercialmente disponibles tales como aceites de pescado por un aparato de lecho móvil simulado o real que usa un volumen relativamente bajo de un eluyente de disolvente orgánico acuoso. Por tanto, la presente invención proporciona un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácido graso poliinsaturado (PUFA) de una mezcla de alimentación que es un aceite de pescado o que se deriva de aceite de pescado, proceso que comprende las etapas de:

(i) purificar la mezcla de alimentación en una etapa de separación cromatográfica, usando un aparato de cromatografía en lecho estacionario o lecho móvil simulado o real, para obtener un primer producto intermedio; y
(ii) purificar el primer producto intermedio obtenido en (i) en una etapa de separación cromatográfica en lecho móvil simulado o real, para obtener un segundo producto intermedio; y
(iii) purificar el segundo producto intermedio obtenido en (ii) en una etapa de separación cromatográfica usando un aparato cromatográfico diferente al usado en la segunda etapa de separación, para obtener el producto de PUFA; en el que

un disolvente orgánico acuoso se usa como eluyente en cada etapa de separación;
ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraen en la primera etapa de separación;
el producto de PUFA se separa de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); y
el producto de PUFA obtenido en la tercera etapa de separación contiene EPA o un derivado de EPA en una cantidad superior al 90 % en peso;
en el que (a) en la primera etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, y
en la segunda etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación, y en la tercera etapa de separación el producto de PUFA se separa de componentes que son más polares que el producto de PUFA, o

(b) en la segunda etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que so más polares que el producto de PUFA, y en la tercera etapa de separación el producto de PUFA se separa de componentes que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación.

También se describe un producto de PUFA obtenible por el proceso de la presente invención.

Descripción de las figuras

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

La Figura 2 ilustra tres formas en las que puede llevarse a cabo el proceso de separación cromatográfica de la invención.

La Figura 3 ilustra una variante del proceso descrito en el presente documento que es adecuada para producir EPA de alta pureza (no según la presente invención).

La Figura 4 ilustra en más detalle la variante de la Figura 2 (no según la presente invención).

La Figura 5 ilustra una manifestación adicional de la variante mostrada en la Figura 2 (no según la presente invención).

La Figura 6 ilustra un proceso de separación de dos etapas para producir EPA (no según la presente invención).

La Figura 7 muestra un perfil de CG de una disolución madre de alimentación adecuada para su uso según el proceso de la presente invención.

La Figura 8 muestra un perfil de CG de un primer producto intermedio producido según el proceso de la presente invención.

La Figura 9 muestra un perfil de CG de un segundo producto intermedio producido según el proceso de la presente invención.

La Figura 10 muestra un perfil de CG de un producto de PUFA producido según el proceso de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, el término “producto de PUFA” se refiere a un producto que comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), y/o derivados de los mismos, normalmente de importancia nutricional o farmacéutica. El producto de PUFA obtenido en el proceso de la presente invención contiene EPA o un derivado de EPA en una cantidad superior al 90 % en peso, es decir, EPA o un derivado de EPA está presente al 90 % en peso de pureza con respecto a todos los componentes en el producto de PUFA final, no incluyendo el eluyente de disolvente orgánico acuoso. Así, EPA o un derivado de EPA está presente en el producto de PUFA en una cantidad de al menos el 90 % en peso basándose en todos los componentes del producto de PUFA que se originaron en la mezcla de alimentación.

Un derivado de EPA es EPA en forma de un mono-, di- o triglicérido, éster, fosfolípido, amida, lactona, o sal. Se prefieren triglicéridos y ésteres. Los ésteres son más preferidos. Los ésteres normalmente son ésteres de alquilo, preferentemente ésteres de alquilo C_1-C_6, más preferentemente ésteres de alquilo C_1-C_4. Ejemplos de ésteres incluyen ésteres metílicos y etílicos. Los ésteres etílicos son los más preferidos.

Normalmente, el producto de PUFA contiene EPA o un derivado de EPA en una cantidad superior al 95 % en peso, preferentemente superior al 97 % en peso.

En una realización, el producto de PUFA contiene EPA en una cantidad superior al 90 % en peso, preferentemente superior al 95 % en peso, más preferentemente superior al 97 % en peso. Como se ha explicado anteriormente, EPA está presente al % en peso especificado con respecto a la cantidad total de todos los componentes del producto de PUFA que se originaron en la mezcla de alimentación.

En otra realización, el producto de PUFA contiene éster etílico de EPA en una cantidad superior al 90 % en peso, preferentemente superior al 95 % en peso, más preferentemente superior al 97 % en peso. Como se ha explicado anteriormente, EPA está presente al % en peso especificado con respecto a la cantidad total de todos los componentes del producto de PUFA que se originaron en la mezcla de alimentación.

Mezclas de alimentación adecuadas para el fraccionamiento por el proceso de la presente invención son aceites de pescado, o cargas de alimentación derivadas de aceites de pescado. Aceites de pescado adecuados para su uso en el proceso de la presente invención son muy conocidos para el experto. Aceites de pescado típicos contienen EPA, DHA, SDA, y normalmente una gama de otros PUFA tanto más como menos polares que EPA, ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados.

La mezcla de alimentación puede someterse a tratamiento químico antes del fraccionamiento por el proceso de la invención. Por ejemplo, puede someterse a transesterificación de glicéridos o hidrólisis de glicéridos, seguido en ciertos casos por procesos selectivos tales como cristalización, destilación molecular, fraccionamiento de la urea, extracción con nitrato de plata u otras disoluciones de sal metálica, yodolactonización o fraccionamiento con fluidos supercríticos. Alternativamente, una mezcla de alimentación puede usarse directamente sin etapa de tratamiento inicial.

Las mezclas de alimentación normalmente contienen el producto de PUFA 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 PUFA. Durante la operación, tales componentes menos polares normalmente se mueven con la fase de adsorbente sólido en preferencia a la fase de eluyente líquido. Los componentes más polares tienen una adherencia más débil al adsorbente usado en el proceso de la presente invención que el producto de PUFA. Durante la operación, tales componentes más polares normalmente se mueven con la fase de eluyente líquido en preferencia a la fase de adsorbente sólido. 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.

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

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

Ejemplos de (2) incluyen isómeros y productos de oxidación o descomposición del producto de PUFA, por ejemplo, productos poliméricos de auto-oxidación de ácidos grasos o sus derivados.

Ejemplos de (3) incluyen urea que puede añadirse para extraer ácidos grasos saturados o mono-insaturados de la mezcla de alimentación.

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

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

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

El proceso de la presente invención implica múltiples etapas de separación por cromatografía.

La primera etapa de separación es eficaz para eliminar ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en

la mezcla de alimentación y puede llevarse a cabo usando un aparato de cromatografía en lecho estacionario o en lecho simulado o real.

Cuando la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, hay varias formas en las que pueden realizarse las tres etapas de separación. Cuatro formas posibles de llevar a cabo el proceso se describen como la primera, segunda, tercera y cuarta variantes a continuación, de las cuales la segunda variante y la opción (b) de la cuarta variante son realizaciones de la presente invención.

En una primera variante, que no es según la presente invención, la primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la primera, segunda y tercera etapas de separación en la primera, segunda y tercera zonas, respectivamente, en el que cada zona tiene 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 descarga de refinado de la que puede recogerse líquido de dicha zona y una corriente de descarga de extracto de la que puede recogerse líquido de dicha zona.

Normalmente, cada zona tiene solo un punto de inyección para una mezcla de alimentación. En una variante, cada zona tiene solo un punto de inyección para el eluyente de disolvente orgánico acuoso. En otra variante, cada zona tiene dos o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico.

Normalmente, cada zona usada tiene una única matriz de columnas de cromatografía conectadas en serie que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso. Normalmente, cada una de las columnas de cromatografía en una zona está conectada a las dos columnas en el aparato adyacentes a esa columna. Así, la salida de una columna dada en una zona está conectada a la entrada de la columna adyacente, por ejemplo, en la zona, que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el sistema. Normalmente, ninguna de las columnas de cromatografía en una zona está conectada a columnas no adyacentes en la misma zona.

El término “refinado” es muy conocido para el experto en la materia. En el contexto de la cromatografía en lecho móvil real y simulada se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase de eluyente líquido en comparación con la fase de adsorbente sólido. Así, una corriente de refinado normalmente está enriquecida en componentes más polares, y agotada en componentes menos polares, en comparación con una corriente de alimentación.

El término “extracto” es muy conocido para el experto en la materia. En el contexto de la cromatografía en lecho móvil real y simulada se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase de adsorbente sólido en comparación con la fase de eluyente líquido. Así, una corriente de extracto normalmente está enriquecida en componentes menos polares, y agotada en componentes más polares, en comparación con una corriente de alimentación.

Como se usa en el presente documento, el término “no adyacentes” se refiere a columnas, en por ejemplo el mismo aparato, separadas por una o más columnas, preferentemente 3 o más columnas, más preferentemente 5 o más columnas, lo más preferentemente aproximadamente 5 columnas.

En una segunda variante, que es una realización de la presente invención, la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la primera y segunda etapas de separación en la primera y segunda zonas, respectivamente, en el que cada zona es como se define en el presente documento, y en el que la tercera etapa de separación se lleva a cabo en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real separado.

En esta realización, la tercera etapa de separación se lleva a cabo normalmente en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real que comprende una pluralidad de columnas de cromatografía 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 descarga de refinado de la que puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía conectadas, y una corriente de descarga de extracto de la que puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía conectadas. Este aparato de cromatografía normalmente tiene solo un punto de inyección para una mezcla de alimentación. En una realización, este aparato de cromatografía tiene solo un punto de inyección para el eluyente de disolvente orgánico acuoso. En otra realización, este aparato de cromatografía tiene dos o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico.

El aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación en la segunda realización normalmente tiene una única matriz de columnas de cromatografía conectadas en serie que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso. Normalmente, cada una de las columnas de cromatografía está conectada a las dos columnas en

el aparato adyacentes a esa columna. Así, la salida de una columna dada está conectada a la entrada de la columna adyacente, que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el sistema. Normalmente, ninguna de las columnas de cromatografía está conectada a columnas no adyacentes en el aparato de cromatografía.

El aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación en la segunda variante es un aparato separado del aparato usado en la primera y segunda etapas de separación. Así, se usan dos aparatos separados. El eluyente circula por separado en los aparatos cromatográficos separados. Así, el eluyente no es compartido entre los aparatos cromatográficos separados, aparte de aquel eluyente que pueda estar presente como disolvente en el segundo producto intermedio que se produce en la segunda etapa, y que entonces se introduce en el aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación. Las columnas cromatográficas no son compartidas entre los aparatos cromatográficos separados.

Después de obtenerse el segundo producto intermedio en la segunda etapa de separación, el eluyente de disolvente orgánico acuoso puede extraerse parcialmente o completamente antes de que el segundo producto intermedio se purifique adicionalmente en la tercera etapa de separación. Alternativamente, el producto intermedio puede purificarse adicionalmente en la tercera etapa sin la extracción de ningún disolvente presente.

El aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación en la segunda variante es similar al aparato de cromatografía ilustrado en la Figura 1.

En una tercera variante, que no es según la presente invención, la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la segunda y tercera etapas de separación en la primera y segunda zonas, respectivamente, en el que cada zona es como se define en el presente documento, y en el que la primera etapa de separación se lleva a cabo en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real separado.

En la tercera variante, la primera etapa de separación normalmente se lleva a cabo en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real que comprende una pluralidad de columnas de cromatografía 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 descarga de refinado de la que puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía conectadas, y una corriente de descarga de extracto de la que puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía conectadas. Este aparato de cromatografía normalmente tiene solo un punto de inyección para una mezcla de alimentación. En una variante, este aparato de cromatografía tiene solo un punto de inyección para el eluyente de disolvente orgánico acuoso. En otra variante, este aparato de cromatografía tiene dos o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico.

El aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación en la tercera variante normalmente tiene una única matriz de columnas de cromatografía conectadas en serie que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso. Normalmente, cada una de las columnas de cromatografía está conectada a las dos columnas en el aparato adyacentes a esa columna. Así, la salida de una columna dada está conectada a la entrada de la columna adyacente, que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el sistema. Normalmente, ninguna de las columnas de cromatografía está conectada a columnas no adyacentes en el aparato de cromatografía.

El aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación en la tercera variante es un aparato separado del aparato usado en la segunda y tercera etapas de separación. Así, se usan dos aparatos separados. El eluyente no es compartido entre los aparatos cromatográficos separados, aparte de aquel eluyente que pueda estar presente como disolvente en el primer producto intermedio que se produce en la primera etapa, y que se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. Las columnas cromatográficas no son compartidas entre los aparatos cromatográficos separados.

Después de obtenerse el primer producto intermedio en la primera etapa de separación, el eluyente de disolvente orgánico acuoso puede extraerse parcialmente o completamente antes de purificarse adicionalmente el producto intermedio en la siguiente etapa de separación. Alternativamente, el primer producto intermedio puede purificarse adicionalmente en la segunda etapa de separación sin la extracción de ningún disolvente presente.

El aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación en la tercera variante es similar al aparato de cromatografía ilustrado en la Figura 1.

Se apreciará que en la primera, segunda y tercera variantes descritas anteriormente dos o más etapas de separación pueden tener lugar simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene dos o tres zonas, en el que una zona es como se ha definido anteriormente. Un aparato de cromatografía típico que tiene dos o más zonas, por ejemplo dos o tres zonas, es como se describe en, por ejemplo, el documento PCT/GB10/002339.

En una cuarta variante, o bien (a) la primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, recuperándose el primer y segundo productos intermedios entre la primera y segunda, y segunda y tercera etapas de separación, respectivamente, y ajustándose las condiciones de proceso en el aparato de cromatografía entre la primera y segunda, y segunda y tercera etapas de separación de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); o bien (b) la segunda etapa de separación se lleva a cabo usando un aparato cromatográfico diferente al usado en la primera etapa de separación, y/o la tercera etapa de separación se lleva a cabo usando un aparato cromatográfico diferente al usado en la segunda etapa de separación. La opción (a) de esta cuarta variante no es según la presente invención, pero la opción (b) de esta cuarta variante es una realización de la presente invención.

En la cuarta variante, cada uno de los aparatos de cromatografía usados para llevar a cabo la primera, segunda y tercera etapas de separación normalmente es como se ha definido anteriormente para la tercera etapa de separación en la variante (2).

En la opción (b) de la cuarta variante, las tres etapas se llevan a cabo en aparatos cromatográficos separados. Dos o tres de la primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo en dos o tres aparatos cromatográficos separados diferentes. Éstas pueden funcionar secuencialmente o simultáneamente.

En particular, en la opción (b) de la cuarta variante, dos aparatos de cromatografía separados pueden funcionar secuencialmente para llevar a cabo la primera y segunda etapas de separación. En este caso, el primer producto intermedio se recupera entre la primera y segunda etapas de separación y las condiciones de proceso en el primer y segundo aparatos de cromatografía se ajustan de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

En particular, en la opción (b) de la cuarta variante, dos aparatos de cromatografía separados pueden funcionar secuencialmente para llevar a cabo la segunda y tercera etapas de separación. En este caso, el segundo producto intermedio se recupera entre la segunda y tercera etapas de separación y las condiciones de proceso en el primer y tercer aparatos de cromatografía se ajustan de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

En particular, en la opción (b) de la cuarta variante, tres aparatos de cromatografía separados pueden funcionar secuencialmente para llevar a cabo la primera, segunda y tercera etapas de separación. En este caso, el primer producto intermedio se recupera entre la primera y segunda etapas de separación, el segundo producto intermedio se recupera entre la segunda y tercera etapas de separación y las condiciones de proceso en el primer, segundo y tercer aparatos de cromatografía se ajustan de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

En particular, en la opción (b) de la cuarta variante, dos aparatos de cromatografía separados pueden funcionar simultáneamente para llevar a cabo la primera y segunda etapas de separación. La primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en aparatos de cromatografía separados, introduciéndose el primer producto intermedio obtenido en la primera etapa en el aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación, y ajustándose las condiciones de proceso en los aparatos de cromatografía de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

En particular, en la opción (b) de la cuarta variante, dos aparatos de cromatografía separados pueden funcionar simultáneamente para llevar a cabo la segunda y tercera etapas de separación. La segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo en aparatos de cromatografía separados, introduciéndose el segundo producto intermedio obtenido en la segunda etapa en el aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación, y ajustándose las condiciones de proceso en los aparatos de cromatografía de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

En particular, en la opción (b) de la cuarta variante, tres aparatos de cromatografía separados pueden funcionar simultáneamente para llevar a cabo la primera, segunda y tercera etapas de separación. La primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo en aparatos de cromatografía separados, introduciéndose el primer producto intermedio obtenido en la primera etapa en el aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación, introduciéndose el segundo producto intermedio obtenido en la segunda etapa en el aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación, y ajustándose las condiciones de proceso en los aparatos de cromatografía de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes

componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

En particular, en la opción (b) de la cuarta variante, funcionan dos o tres aparatos cromatográficos separados. El eluyente circula por separado en los aparatos cromatográficos separados. Así, el eluyente no es compartido entre los aparatos cromatográficos separados, aparte de aquel eluyente que pueda estar presente como disolvente en el producto intermedio que se purifica en la primera y/o segunda etapa, y que se introduce en el aparato cromatográfico usado en la siguiente etapa de separación. Las columnas cromatográficas no son compartidas entre los aparatos cromatográficos separados usados en la primera y segunda y/o segunda y tercera etapas de separación.

Después de obtenerse el producto intermedio en la primera y/o segunda etapa de separación, el eluyente de disolvente orgánico acuoso puede extraerse parcialmente o completamente antes de que el producto intermedio se purifique adicionalmente en la siguiente etapa de separación. Alternativamente, el producto intermedio puede purificarse adicionalmente sin la extracción de ningún disolvente presente. Estas consideraciones también se aplican para el segundo producto intermedio obtenido en la segunda etapa de separación en la variante (2) anterior, y para el primer producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación en la variante (3) anterior.

En general, cualquier aparato de cromatografía en lecho estacionario o en lecho simulado o real conocido puede utilizarse para los fines del método de la presente invención, en tanto que el aparato se use según el proceso de la presente invención. Aquellos aparatos descritos en los documentos PCT/GB10/002339, US 2.985.589, US 3.696.107, US 3.706.812, US 3.761.533, FR-A-2103302, FR-A-2651148, FR-A-2651149, US 6.979.402, US 5.069.883 y US 4.764.276 pueden todos usarse si se configuran según el proceso de la presente invención.

En ciertas aplicaciones, la cuarta variante será la más adecuada.

La primera a cuarta variantes se ilustran en más detalle con referencia a la Figura 2. En las cuatro variantes en la Figura 2, el flujo de eluyente es de derecha a izquierda y el flujo eficaz de adsorbente es de izquierda a derecha. Puede observarse en todos los casos que el primer producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación se usa como mezcla de alimentación para la segunda etapa de separación y el segundo producto intermedio se usa como mezcla de alimentación para la tercera etapa de separación.

Refiriéndose ahora a la Figura 2A, ésta ilustra la primera variante anterior, es decir, en la que la primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real en la primera, segunda y tercera zonas, respectivamente. La primera etapa de separación tiene lugar en la primera zona. A continuación, el primer producto intermedio de la primera etapa de separación llevada a cabo en la primera zona se pasa a la segunda zona como mezcla de alimentación. A continuación, la segunda etapa de separación se lleva a cabo en la segunda zona. A continuación, el segundo producto intermedio se pasa de la segunda etapa de separación llevada a cabo en la segunda zona a la tercera zona como mezcla de alimentación. A continuación, la tercera etapa de separación se lleva a cabo en la tercera zona.

Refiriéndose ahora a la Figura 2B, ésta ilustra la segunda variante anterior, es decir, en la que la primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real en la primera y segunda zonas, respectivamente, y la tercera etapa de separación se lleva a cabo en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real separado. La primera etapa de separación tiene lugar en la primera zona. A continuación, el primer producto intermedio de la primera etapa de separación llevada a cabo en la primera zona se pasa a la segunda zona como mezcla de alimentación. La segunda etapa de separación se lleva a cabo en la segunda zona. El segundo producto intermedio se recoge de la segunda zona. A continuación, éste se introduce en un aparato de cromatografía como mezcla de alimentación para la tercera etapa de separación.

Refiriéndose ahora a la Figura 2C, ésta ilustra la tercera variante anterior, es decir, en la que la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real en la primera y segunda zonas, respectivamente, y la primera etapa de separación se lleva a cabo en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real separado. La primera etapa de separación tiene lugar en un aparato de cromatografía. El primer producto intermedio se recoge de la primera aparato. A continuación, éste se introduce en un aparato de cromatografía separado como mezcla de alimentación para la segunda etapa de separación. La segunda etapa de separación se lleva a cabo en la primera zona del aparato cromatográfico en el que tienen lugar la segunda y tercera etapas de separación. El segundo producto intermedio de la segunda etapa de separación llevada a cabo en la primera zona se pasa a la segunda zona como mezcla de alimentación para la tercera etapa de separación. La tercera etapa de separación tiene lugar en la segunda zona.

Refiriéndose ahora a la Figura 2D, ésta ilustra la cuarta variante anterior, es decir, en la que (a) la primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, recuperándose el primer y segundo productos intermedios entre la primera y segunda, y segunda y tercera etapas de separación, respectivamente, y ajustándose las condiciones de proceso en el aparato de cromatografía entre la primera y segunda, y segunda y tercera etapas de separación de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el

producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); o (b) dos o tres de la primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo en dos o tres aparatos separados diferentes; en el que la segunda etapa de separación se lleva a cabo usando un aparato cromatográfico diferente al usado en la primera etapa de separación, y/o la tercera etapa de separación se lleva a cabo usando un aparato cromatográfico diferente al usado en la segunda etapa de separación.

Cuando la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho estacionario, hay varias formas en las que pueden realizarse las tres etapas de separación. Así, normalmente, (a) la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la segunda y tercera etapas de separación en la primera y segunda zonas, respectivamente, en el que cada zona es como se define en el presente documento; o (b) la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, recuperándose el segundo producto intermedio entre la segunda y tercera etapas de separación y ajustándose las condiciones de proceso en el aparato de cromatografía entre la segunda y tercera etapas de separación de forma que el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); o (c) la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo en aparatos de cromatografía separados, respectivamente, introduciéndose el producto intermedio obtenido de la segunda etapa de separación en el aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación.

La opción (c) anterior es una realización de la presente invención. Las opciones (a) y (b) anteriores no son según la presente invención.

La opción (a) anterior se lleva a cabo de un modo similar a la segunda y tercera etapas de separación en la variante (3) anterior.

Los aparatos de cromatografía usados en las opciones (b) y (c) anteriores son normalmente como se han definido anteriormente para la tercera etapa de separación en la variante (2). Las opciones (b) y (c) normalmente se llevan a cabo de un modo similar a la variante (4) anterior.

Se apreciará que en ciertas variantes, dos o tres etapas de separación pueden llevarse a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía que tiene dos o tres zonas, respectivamente. En los aparatos de cromatografía en lecho simulado o real en los que se llevan a cabo simultáneamente dos etapas de separación en dos zonas, una corriente de refinado o de extracto se recoge normalmente de una columna en la primera zona y se introduce a una columna no adyacente en la segunda zona. En los aparatos de cromatografía en lecho simulado o real en los que se llevan a cabo simultáneamente tres etapas de separación en tres zonas, que no son según la presente invención, una corriente de refinado o de extracto se recoge normalmente de una columna en la primera zona y se introduce a una columna no adyacente en la segunda zona, y una corriente de refinado o de extracto se recoge normalmente de una columna en la segunda zona y se introduce a una columna no adyacente en la tercera zona. Esto permite que el primer y/o segundo productos intermedios recogidos en la primera y/o segunda etapas de separación se usen como mezcla de alimentación para la siguiente etapa de separación.

Normalmente, el segundo producto intermedio se recoge como corriente de refinado en la segunda etapa de separación y el producto de PUFA se recoge como corriente de extracto en la tercera etapa de separación; o el segundo producto intermedio se recoge como corriente de extracto en la segunda etapa de separación y el producto de PUFA se recoge como corriente de refinado en la tercera etapa de separación.

Preferentemente, el segundo producto intermedio se recoge como corriente de refinado en la segunda etapa de separación y el producto de PUFA se recoge como corriente de extracto en la tercera etapa de separación.

Normalmente, en variantes no según la presente invención en las que la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real en la primera y segunda zonas, respectivamente, (a) el segundo producto intermedio se recoge como corriente de refinado que contiene el producto de PUFA junto con componentes más polares de una columna en la primera zona y se introduce a una columna no adyacente en la segunda zona, en la que el producto de PUFA se recoge entonces como corriente de extracto en la tercera etapa de separación llevada a cabo en la segunda zona; o (b) el segundo producto intermedio se recoge como corriente de extracto que contiene el producto de PUFA junto con componentes menos polares de una columna en la primera zona y se introduce a una columna no adyacente en la segunda zona, en la que el producto de PUFA se recoge entonces como corriente de refinado en la tercera etapa de separación llevada a cabo en la segunda zona.

En tales variantes no según la presente invención en las que la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real en la primera y segunda zonas, respectivamente, el segundo producto intermedio puede ser recogido como corriente de refinado que contiene el producto de PUFA junto con componentes más polares de una columna en la primera zona y se

introduce a una columna no adyacente en la segunda zona, en la que el producto de PUFA se recoge entonces como corriente de extracto en la tercera etapa de separación que se lleva a cabo en la segunda zona.

Cuando la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, el primer producto intermedio se recoge normalmente como corriente de refinado en la primera etapa de separación.

Cuando la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, el primer producto intermedio se recoge normalmente como corriente de refinado en la primera etapa de separación y (a) el segundo producto intermedio se recoge como corriente de refinado en la segunda etapa de separación y el producto de PUFA se recoge como corriente de extracto en la tercera etapa de separación; o (b) el segundo producto intermedio se recoge como corriente de extracto en la segunda etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como corriente de refinado en la tercera etapa de separación.

Normalmente, el primer producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación está enriquecido en el producto de PUFA en comparación con la mezcla de alimentación; y/o el segundo producto intermedio obtenido en la segunda etapa de separación está enriquecido en el producto de PUFA en comparación con el primer producto intermedio.

Preferentemente, el primer producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación está enriquecido en el producto de PUFA en comparación con la mezcla de alimentación y el segundo producto intermedio obtenido en la segunda etapa de separación está enriquecido en el producto de PUFA en comparación con el primer producto intermedio.

Normalmente, el primer producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación está agotado en ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados en comparación con la mezcla de alimentación.

Normalmente, en la primera etapa, el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, en la segunda etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación, y en la tercera etapa de separación el producto de PUFA se separa de componentes que son más polares que el producto de PUFA.

Alternativamente, en la primera etapa, el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, en la segunda etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son más polares que el producto de PUFA, y en la tercera etapa de separación el producto de PUFA se separa de componentes que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación.

Los componentes de la mezcla de alimentación separados en la primera etapa que son menos polares que el producto de PUFA normalmente son ácidos grasos insaturados y/o monoinsaturados.

Los componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación, normalmente incluyen DHA o un derivado de DHA y/u otros PUFA o derivados de PUFA que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación.

Los componentes de la mezcla de alimentación que son más polares que el producto de PUFA incluyen SDA o un derivado de SDA y/u otros PUFA que son más polares que el producto de PUFA.

PUFA distintos de EPA son muy conocidos e incluyen PUFA ω-3 y ω-6. Ejemplos de ω-3 PUFA incluyen ácido alfa-linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido eicosatrienoico (ETE), ácido eicosatetraenoico (ETA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Ejemplos de PUFA ω-6 incluyen ácido linoleico (LA), ácido gamma-linolénico (GLA), ácido eicosadienoico, ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), ácido araquidónico (ARA), ácido docosadienoico, ácido adrénico y ácido docosapentaenoico (ω-6).

El número de columnas usadas en cada etapa de separación no está particularmente limitado. Un experto sería fácilmente capaz de determinar un número apropiado de columnas a usar. El número de columnas normalmente es 4 o más, preferentemente 6 o más, más preferentemente 8 o más, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 columnas. En una realización preferida se usan 5 o 6 columnas, más preferentemente 6 columnas. En otra realización preferida se usan 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.

En realizaciones en las que tienen lugar simultáneamente dos etapas de separación en un único aparato de cromatografía en la primera y segunda zonas, respectivamente, el número de columnas en cada zona normalmente

es 4 o más, preferentemente 6 o más, más preferentemente 8 o más, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 columnas.

En variantes no según la invención en las que tienen lugar simultáneamente tres etapas de separación en un único aparato de cromatografía en la primera, segunda y tercera zonas, respectivamente, el número de columnas en cada zona normalmente es 4 o más, 6 o más, u 8 o más, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 columnas.

La primera, segunda y tercera etapas de separación normalmente implican el mismo número de columnas. Para ciertas aplicaciones pueden tener diferentes números de columnas.

Las dimensiones de las columnas usadas no están particularmente limitadas, y dependerán del volumen de mezcla de alimentación que vaya a purificarse. Un experto sería fácilmente capaz de determinar las columnas apropiadamente dimensionadas a usar. El diámetro de cada columna normalmente está entre 10 y 1000 mm, preferentemente entre 10 y 500 mm, más preferentemente entre 25 y 250 mm, incluso más preferentemente entre 50 y 100 mm, y lo más preferentemente entre 70 y 80 mm. La longitud de cada columna normalmente está entre 10 y 300 cm, preferentemente entre 10 y 200 cm, más preferentemente entre 25 y 150 cm, incluso más preferentemente entre 70 y 110 cm, y lo más preferentemente entre 80 y 100 cm.

La primera, segunda y tercera etapas de separación normalmente implican columnas que tienen dimensiones idénticas pero, para ciertas aplicaciones, pueden tener dimensiones diferentes.

Las velocidades de flujo para la columna están limitadas por las presiones máximas a través de la serie de columnas y dependerán de las dimensiones de la columna y el tamaño de partícula de las fases sólidas. Un experto en la materia será fácilmente capaz de establecer la velocidad de flujo requerida para cada dimensión de columna para garantizar la eficaz desorción. Columnas de diámetro mayor necesitarán en general mayores flujos para mantener el flujo lineal a través de las columnas.

Para los tamaños de columna típicos explicados resumidamente anteriormente, normalmente la velocidad de flujo de eluyente en el aparato cromatográfico usado en la primera o segunda etapa de separación es de 1 a 4,5 l/min, preferentemente de 1,5 a 2,5 l/min. Normalmente, la velocidad de flujo del extracto del aparato cromatográfico usado en la primera o segunda etapa de separación es de 0,1 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,5 a 2,25 l/min. En realizaciones en las que parte del extracto de la primera o segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la primera o segunda etapa de separación, la velocidad de flujo de recirculación normalmente es de 0,7 a 1,4 l/min, preferentemente aproximadamente 1 l/min. Normalmente, la velocidad de flujo del refinado del aparato cromatográfico usado en la primera o segunda etapa de separación es de 0,2 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,3 a 2,0 l/min. En realizaciones en las que parte del refinado de la primera o segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la primera o segunda etapa de separación, la velocidad de flujo de recirculación normalmente es de 0,3 a 1,0 l/min, preferentemente aproximadamente 0,5 l/min. Normalmente, la velocidad de flujo de introducción de la mezcla de alimentación en el aparato cromatográfico usado en la primera o segunda etapa de separación es de 5 a 150 ml/min, preferentemente de 10 a 100 ml/min, más preferentemente de 20 a 60 ml/min.

Para los tamaños de columna típicos explicados resumidamente anteriormente, normalmente la velocidad de flujo de eluyente en el aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación es de 1 a 4 l/min, preferentemente de 1,5 a 3,5 l/min. Normalmente, la velocidad de flujo del extracto del aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación es de 0,5 a 2 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,9 l/min. En realizaciones en las que parte del extracto de la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la tercera etapa de separación, la velocidad de flujo de recirculación normalmente es de 0,6 a 1,4 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,1 l/min, más preferentemente aproximadamente 0,9 l/min. Normalmente, la velocidad de flujo del refinado del aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación es de 0,5 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,8 l/min, más preferentemente aproximadamente 1,4 l/min. En realizaciones en las que parte del refinado de la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la tercera etapa de separación, la velocidad de flujo de recirculación normalmente es de 0,3 a 1,0 l/min, preferentemente aproximadamente 0,5 l/min.

Como apreciará el experto, referencias a las tasas a las que el líquido se recoge o extrae mediante las diversas corrientes de extracto y de refinado se refieren a volúmenes de líquido eliminadas en una cantidad de tiempo, normalmente l/minuto. Similarmente, referencias a las tasas a las que el líquido se recircula de nuevo a un aparato, normalmente a una columna adyacente en el aparato, se refieren a volúmenes de líquido recirculados en una cantidad de tiempo, normalmente l/minuto.

El tiempo de etapa, 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 descarga de las fracciones recogidas, no está particularmente limitado, y dependerá del número y dimensiones de las columnas usadas, y la velocidad de flujo a través del aparato. Un experto sería fácilmente capaz de determinar tiempos de etapa apropiados para usar en el proceso de la presente invención. El tiempo de etapa normalmente es de 100 a 1000 segundos, preferentemente de 200 a 800 segundos, más preferentemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 750 segundos. En algunas realizaciones es apropiado un tiempo de etapa de 100 a 400 segundos, preferentemente 200 a 300 segundos, más

preferentemente aproximadamente 250 segundos. En otras realizaciones es apropiado un tiempo de etapa de 600 a 900 segundos, preferentemente 700 a 800 segundos, más preferentemente aproximadamente 750 segundos.

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

Pueden usarse adsorbentes convencionales conocidos en la técnica para los sistemas de lecho móvil real y simulado en el proceso de la presente invención. Cada columna cromatográfica puede contener el mismo adsorbente o un adsorbente diferente. Normalmente, cada columna contiene el mismo adsorbente. Ejemplos de tales materiales comúnmente usados son perlas poliméricas, preferentemente 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 gel de sílice de fase inversa unida a C18. El adsorbente usado en el proceso de la presente invención es preferentemente apolar.

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

El adsorbente normalmente tiene un tamaño de poro de 10 a 50 nm, preferentemente 15 a 45 nm, más preferentemente 20 a 40 nm, lo más preferentemente 25 a 35 nm.

Normalmente, el proceso de la presente invención se realiza a de 15 a 55 ºC, preferentemente a de 20 a 40 ºC, más preferentemente a aproximadamente 30 ºC. Así, el proceso normalmente se lleva a cabo a temperatura ambiente, pero puede realizarse a temperaturas elevadas.

Como se ha mencionado anteriormente, los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraen en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separa de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii). Esto se efectúa normalmente ajustando las condiciones de proceso en el aparato de cromatografía, o zona en un aparato de cromatografía en el que se llevan a cabo la primera, segunda y tercera etapas de separación.

Así, las condiciones de proceso en la primera, segunda y tercera etapas de separación varían normalmente. Las condiciones de proceso que varían pueden incluir, por ejemplo, el tamaño de las columnas usadas, el número de columnas usadas, el relleno usado en las columnas, el tiempo de etapa del aparato de SMB, la temperatura del aparato, el eluyente usado en las etapas de separación, o las velocidades de flujo usadas en el aparato, en particular la tasa de recirculación de líquido recogido mediante las corrientes de extracto o de refinado.

Preferentemente, las condiciones de proceso que varían son la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente usada en las etapas de separación, y/o la tasa de recirculación de líquido recogido mediante las corrientes de extracto o de refinado en las etapas de separación. Ambas de estas opciones se tratan más abajo en más detalle.

Normalmente, parte de la corriente de extracto del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la segunda etapa de separación; y/o parte de la corriente de refinado del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la segunda etapa de separación; y/o parte de la corriente de extracto del aparato usado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la tercera etapa de separación; y/o parte de la corriente de refinado del aparato usado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la tercera etapa de separación.

Preferentemente, parte de la corriente de extracto del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la segunda etapa de separación; y parte de la corriente de refinado del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la segunda etapa de separación; y parte de la corriente de extracto del aparato usado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la tercera etapa de separación; y parte de la corriente de refinado del aparato usado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la tercera etapa de separación.

Cuando la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, normalmente parte de la corriente de extracto del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la primera etapa de separación; y/o parte de

la corriente de refinado del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la primera etapa de separación.

Cuando la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, preferentemente parte de la corriente de extracto del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la primera etapa de separación; y parte de la corriente de refinado del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la primera etapa de separación; y parte de la corriente de extracto del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la segunda etapa de separación; y parte de la corriente de refinado del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la segunda etapa de separación; y parte de la corriente de extracto del aparato usado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la tercera etapa de separación; y parte de la corriente de refinado del aparato usado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en la tercera etapa de separación.

Esta recirculación implica alimentar parte de la corriente de extracto o de refinado fuera del aparato de cromatografía usado en la primera, segunda o tercera etapa de separación de nuevo en el 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.

Cuando se llevan a cabo simultáneamente dos (según la presente invención) o tres (no según la presente invención) etapas de separación en una única cromatografía en dos o tres zonas, respectivamente, esta recirculación implica recircular la corriente de extracto o de refinado particular extraída de una zona de nuevo a la misma zona.

La tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto o de refinado en una etapa de separación particular se recircula de nuevo a un aparato de cromatografía o zona usado en esa etapa de separación es la tasa a la que el líquido recogido mediante esa corriente se alimenta de nuevo en el 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.

Esto puede observarse con referencia a una variante no según la presente invención que se ilustra en la Figura 5. La tasa de recirculación de extracto en la primera etapa de separación es la tasa a la que el extracto recogido del fondo de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación se alimenta en la cabeza de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación, es decir, la velocidad de flujo del líquido en la cabeza de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

La tasa de recirculación de extracto en la segunda etapa de separación es la tasa a la que el extracto recogido en el fondo de la columna 10 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación se alimenta en la cabeza de la columna 11 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, es decir, la velocidad de flujo del líquido en la cabeza de la columna 11 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

La tasa de recirculación de extracto en la tercera etapa de separación es la tasa a la que el extracto recogido en el fondo de la columna 19 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación se alimenta en la cabeza de la columna 19 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, es decir, la velocidad de flujo del líquido en la cabeza de la columna 19 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

La recirculación de las corrientes de extracto y/o de refinado en la primera, segunda y/o tercera etapas de separación normalmente se efectúa alimentando el líquido recogido mediante esa corriente en esa etapa de separación en un recipiente, y luego bombeando una cantidad de ese líquido del recipiente de nuevo al aparato o zona usada en esa etapa de separación, normalmente en una columna adyacente. En este caso, la tasa de recirculación de líquido recogido mediante una corriente de extracto o de refinado particular en la primera y/o segunda etapas de separación, normalmente de nuevo a una columna adyacente, es la tasa a la que el líquido se bombea fuera del recipiente de nuevo al aparato de cromatografía o zona, normalmente a una columna adyacente.

Como apreciará el experto, la cantidad de líquido que se introduce en un aparato de cromatografía mediante las corrientes de eluyente y de materia prima se equilibra con la cantidad de líquido extraída del aparato, y se recircula de nuevo al aparato.

Así, con referencia a la Figura 5, para la corriente de extracto, la velocidad de flujo de eluyente (desorbente) en el (los) aparato(s) cromatográfico(s) usado(s) en la segunda y tercera etapas de separación (D) es igual a la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en esa etapa de separación se acumula en un recipiente (E2 y E3) sumada a la tasa a la que el extracto se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (D-E2 y D-E3).

Para la corriente de refinado de una etapa de separación, la tasa a la que el extracto se recircula de nuevo al

aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (D-E1 y D-E2) sumada a la tasa a la que la materia prima se introduce en el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (F y R1) es igual a la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en esa etapa de separación particular se acumula en un recipiente (R1 y R2) sumada a la tasa a la que el refinado se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación particular (D+F-E1-R1 y D+R1-E2-R2).

La tasa a la que el líquido recogido de una corriente de extracto o de refinado particular de un aparato de cromatografía o zona se acumula en un recipiente también puede considerarse como la tasa neta de extracción de esa corriente de extracto o de refinado de ese aparato de cromatografía.

Normalmente, la tasa a la que el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); y/o en el que la tasa a la que el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y de refinado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

Preferentemente, la tasa a la que el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); y en el que la tasa a la que el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y de refinado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

Cuando la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, la tasa a la que el líquido recogido mediante una o ambas de las corrientes de extracto y de refinado en la primera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato usado en esa etapa de separación normalmente se ajusta de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

Normalmente, la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación se diferencia de la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación; y/o la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación se diferencia de la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación.

Cuando la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la primera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación se diferencia normalmente de la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación; y/o la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la primera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la primera etapa de separación se diferencia normalmente de la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación

El variar la tasa a la que el líquido recogido mediante las corrientes de extracto y/o de refinado en la primera, segunda y/o tercera etapas de separación se recircula de nuevo al aparato usado en esa etapa de separación particular tiene el efecto de variar la cantidad de componentes más polares y menos polares presentes en las corrientes de extracto y de refinado. Así, por ejemplo, una menor tasa de recirculación de extracto produce menos de los componentes menos polares en esa etapa de separación que se llevan a la corriente de refinado. Una mayor tasa de recirculación de extracto produce más de los componentes menos polares en esa etapa de separación que se llevan a la corriente de refinado.

Esto puede observarse, por ejemplo, en la variante no según la presente invención mostrada en la Figura 5. La tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de

nuevo al aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación (D-E2) afectará a qué grado cualquiera del componente A se lleva a la corriente de refinado en la segunda etapa de separación (R2).

Normalmente, la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es más rápida que la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación. Preferentemente, una corriente de refinado que contiene el producto de PUFA junto con componentes más polares se recoge de la segunda etapa de separación y se purifica en la tercera etapa de separación, y la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es más rápida que la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

Alternativamente, la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es más rápida que la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación. Preferentemente, una corriente de extracto que contiene el producto de PUFA junto con componentes menos polares se recoge de la segunda etapa de separación y se purifica en la tercera etapa de separación, y la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es más rápida que la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de refinado en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

Si las tasas de recirculación se ajustan de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii), la relación de agua:disolvente orgánico de los eluyentes usados en las etapas de separación en las que las tasas de recirculación se diferencian puede ser iguales o diferentes.

El eluyente usado 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.

Los disolventes de alcohol son muy conocidos para el experto en la materia. Los alcoholes normalmente son alcoholes de cadena corta. Los alcoholes son normalmente de fórmula ROH en el que R es un grupo alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado. El grupo alquilo C_1-C_6 está preferentemente 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 muy conocidos para el experto en la materia. Los éteres normalmente son éteres de cadena corta. Los éteres son normalmente de fórmula R-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 está preferentemente sin sustituir. Éteres preferidos incluyen éter dietílico, éter diisopropílico y metil t-butil éter (MTBE).

Los disolventes de éster son muy conocidos para el experto en la materia. Los ésteres normalmente son ésteres de cadena corta. Los ésteres son normalmente de fórmula R-(C=O)O-R' en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo C_1-C_6 lineal o ramificado. Ésteres preferidos incluyen acetato de metilo y acetato de etilo.

Los disolventes de cetona son muy conocidos para el experto en la materia. Las cetonas normalmente son cetonas de cadena corta. Las cetonas son normalmente de 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 está preferentemente sin sustituir. Cetonas preferidas incluyen acetona, metiletilcetona y metilisobutilcetona (MIBK).

Los disolventes de nitrilo son muy conocidos para el experto en la materia. Los nitrilos normalmente son nitrilos de cadena corta. Los nitrilos normalmente son de 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 está preferentemente sin sustituir. Nitrilos preferidos incluyen acetonitrilo.

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

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

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

Normalmente, la relación de agua:disolvente orgánico promedio, por ejemplo relación de agua:metanol, del eluyente en el aparato entero es del 0,1:99,9 al 9:91 % en peso, preferentemente del 0,25:99,75 al 7:93 % en peso, más preferentemente del 0,5:99,5 al 6:94 % en peso.

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

Normalmente, la relación de agua:disolvente orgánico usado en cada etapa de separación se ajusta de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación; y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

Normalmente, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en dos o más de las etapas de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente. En una realización, la relación de agua:disolvente orgánico usada en cada etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente.

La potencia eluyente del eluyente usado en dos o más de las etapas de separación normalmente es diferente. Dependiendo de la elección del disolvente orgánico, pueden ser desorbentes más poderosos que el agua. Alternativamente, pueden ser desorbentes menos poderosos que el agua. El acetonitrilo y los alcoholes, por ejemplo, son desorbentes más poderosos que el agua.

En una realización preferida, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la segunda y tercera etapas de separación tiene la misma relación de agua:disolvente orgánico y el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente del eluyente de disolvente orgánico usado en la segunda y tercera etapas de separación.

En esta realización preferida, la potencia eluyente del eluyente usado en la segunda y tercera etapas de separación es la misma; y/o la potencia eluyente del eluyente usado en la primera etapa de separación es mayor que la del eluyente usado en la segunda etapa de separación. Preferentemente en esta realización, la potencia eluyente del eluyente usado en la segunda y tercera etapas de separación es la misma; y la potencia eluyente del eluyente usado en la primera etapa de separación es mayor que la del eluyente usado en la segunda y tercera etapas de separación. En esta realización, cuando el disolvente orgánico acuoso es alcohol o acetonitrilo acuoso, la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la segunda y tercera etapas de separación normalmente es la misma, y la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la primera etapa de separación normalmente es mayor que la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la segunda y tercera etapas de separación. Así, en esta realización, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda y tercera etapas de separación normalmente es la misma, y la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación normalmente es menor que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda y tercera etapas de separación.

En esta realización preferida, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación normalmente es del 0:100 al 5:95 % en peso, preferentemente del 0,1:99,9 al 2,5:97,5 % en peso, más preferentemente del 0,1:99,9 al 2:98 % en peso, incluso más preferentemente del 0,1:99,9 al 1:99 % en peso, incluso más preferentemente del 0,25:99,75 al 0,75:99,25 % en peso, y lo más preferentemente aproximadamente el 0,5:99,5. En esta realización preferida, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda y tercera etapas de separación normalmente es del 5:95 al 11:89 % en peso, preferentemente 6:94 al 10:90 % en peso, más preferentemente del 7:93 al 9:91 % en peso, incluso más preferentemente del 7,5:92,5 al 8,5:91,5 % en peso, y lo más preferentemente aproximadamente el 8:92 % en peso.

En esta realización preferida, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente usada en la primera etapa de separación es preferentemente del 0,1:99,9 al 1:99 % en peso, y la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente usada en la segunda y tercera etapas de separación es preferentemente del 7:93 al 9:91 % en peso.

En una realización alternativa, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en cada etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente.

En esta realización alternativa, la potencia eluyente del eluyente usado en la primera etapa de separación es mayor que la del eluyente usado en la segunda etapa de separación; y/o la potencia eluyente del eluyente usado en la segunda etapa de separación es mayor que la del eluyente usado en la tercera etapa de separación. Preferentemente, una corriente de refinado que contiene el producto de PUFA junto con componentes más polares se recoge de la segunda etapa de separación y se purifica en la tercera etapa de separación y la potencia eluyente del eluyente usado en la segunda etapa de separación es mayor que la del eluyente usado en la tercera etapa de

separación. Alternativamente, una corriente de extracto que contiene el producto de PUFA junto con componentes menos polares se recoge de la segunda etapa de separación y se purifica en la tercera etapa de separación y la potencia eluyente del eluyente usado en la segunda etapa de separación es menor que la del eluyente usado en la tercera etapa de separación.

En la práctica, esto se logra variando las cantidades relativas de agua y disolvente orgánico usadas en cada etapa de separación. En esta realización, cuando el disolvente orgánico acuoso es alcohol o acetonitrilo acuoso, la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la primera etapa de separación normalmente es mayor que la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la segunda etapa de separación; y/o la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la segunda etapa de separación normalmente es mayor que la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la tercera etapa de separación. Así, en esta realización, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación normalmente es menor que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda etapa de separación; y/o la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda etapa de separación normalmente es menor que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la tercera etapa de separación.

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

Normalmente, 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. Así, por ejemplo, para lograr una menor relación de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación que en la segunda y tercera etapas de separación, normalmente se introduce más lentamente el agua en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación que en la segunda y tercera etapas de separación.

En algunas realizaciones pueden introducirse disolvente orgánico esencialmente puro y agua esencialmente pura en los diferentes puntos en el aparato cromatográfico usado en cada etapa de separación. Las velocidades de flujo relativas de estas dos corrientes determinarán el perfil del disolvente global en el aparato cromatográfico. En otras realizaciones, diferentes mezclas de disolvente orgánico/agua pueden introducirse en los diferentes puntos en cada aparato cromatográfico usado en cada etapa de separación. Esto implicará introducir dos o más mezclas de disolvente orgánico/agua diferentes en el aparato cromatográfico usado en una etapa de separación particular, teniendo cada mezcla de disolvente orgánico/agua una relación de disolvente orgánico:agua diferente. Las velocidades de flujo relativas y las concentraciones relativas de las mezclas de disolvente orgánico/agua en esta realización determinarán el perfil del disolvente global en el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación.

Preferentemente, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la segunda y tercera etapas de separación tiene la misma relación de agua:disolvente orgánico y el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente de la del eluyente de disolvente orgánico usado en la segunda y tercera etapas de separación; y la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación se diferencia de la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación.

Más preferentemente, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda y tercera etapas de separación es la misma y 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 y tercera etapas de separación; y la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es más rápida que la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

En una variante particular descrita en el presente documento, que no es según la presente invención,
la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real;
la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la segunda y tercera etapas de separación en la primera y segunda zonas, respectivamente, en el que cada zona es como se define en el presente documento, y en el que la primera etapa de separación se lleva a cabo en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real separado;
el primer producto intermedio se recoge como corriente de refinado en la primera etapa de separación, el segundo producto intermedio se recoge como corriente de refinado en la segunda etapa de separación y el producto de PUFA se recoge como corriente de extracto en la tercera etapa de separación;
la segunda corriente intermedia de refinado que contiene el producto de PUFA junto con componentes más polares

se recoge de una columna en la primera zona y se introduce en una columna no adyacente en la segunda zona;
el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la segunda y tercera etapas de separación tiene la misma relación de agua:disolvente orgánico, y la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente usada en la primera etapa de separación es menor que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente usada en la segunda y tercera etapas de separación; y
la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación es más rápida que la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

En otra variante descrita en el presente documento, que no es según la presente invención, la primera etapa de separación comprenda purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real; y la segunda y tercera etapas de separación se lleven a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la segunda y tercera etapas de separación en la primera y segunda zonas, respectivamente, en el que cada zona es como se define en el presente documento, y en el que la primera etapa de separación se lleva a cabo en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real separado. Una variante preferida de esto se ilustra en la Figura 3.

Una mezcla de alimentación F que comprende el producto de PUFA (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A') y (A) se purifica en la primera etapa de separación. En la primera etapa de separación, los componentes menos polares (por ejemplo, saturados y/o monoinsaturados) (A') se extraen como la corriente de extracto E1. El producto de PUFA (B), los componentes más polares (C) y los componentes menos polares (pero más polares que (A')) (A) se recogen como la corriente de refinado R1. La corriente de refinado R1 es el producto intermedio que a continuación se purifica en la segunda etapa de separación.

En la segunda etapa de separación, los componentes menos polares (A) se extraen como la corriente de extracto E2. El producto de PUFA (B) y los componentes más polares (C) se recogen como la corriente de refinado R2. La corriente de refinado R2 es el producto intermedio que a continuación se purifica en la tercera etapa de separación.

En la tercera etapa de separación, los componentes más polares (C) se extraen como la corriente de refinado R3. El producto de PUFA (B) se recoge como la corriente de extracto E3. La segunda y tercera etapas de separación tienen lugar en dos zonas en un único aparato cromatográfico de SMB.

Esta variante se ilustra en más detalle en la Figura 4. La Figura 4 es idéntica a la Figura 2, excepto que se muestran los puntos de introducción del desorbente de disolvente orgánico acuoso (D) en cada aparato cromatográfico.

Disolventes típicos para su uso en esta variante son alcoholes acuosos o acetonitrilo acuoso, preferentemente metanol acuoso.

Normalmente en esta variante, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la segunda y tercera etapas de separación tiene la misma relación de agua:disolvente orgánico y el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente del eluyente de disolvente orgánico usado en la segunda y tercera etapas de separación; y la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación se diferencia de la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación.

En esta variante, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda y tercera etapas de separación puede ser la misma y la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación puede ser menor que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda y tercera etapas de separación; y la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación puede ser más rápida que la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

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

En esta variante, la primera corriente de extracto en la primera etapa de separación normalmente se extrae 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 variante, la segunda corriente de refinado en la segunda etapa de separación normalmente se extrae aguas

abajo del punto de introducción del primer producto intermedio en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

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

En esta variante, la tercera corriente de refinado en la tercera etapa de separación normalmente se extrae aguas abajo del punto de introducción del segundo producto intermedio en el aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación, con respecto al flujo de eluyente.

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

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

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

Normalmente en esta variante, el disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación aguas arriba del punto de extracción de la tercera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

Una manifestación adicional de la variante ilustrada en las Figuras 3 y 4, que no es según la presente invención, se muestra en la Figura 5. Ésta ilustra el número de columnas usadas en cada etapa de separación, y muestra puntos típicos de introducción de mezclas de alimentación y eluyentes, y puntos típicos de extracción de corrientes de extracto y de refinado.

Así, en esta manifestación, el aparato de cromatografía de SMB usado en la primera etapa de separación consiste en ocho columnas cromatográficas, 1 a 8. El aparato de cromatografía de SMB usado en la segunda etapa de separación consiste en ocho columnas cromatográficas, 9 a 16. El aparato de cromatografía de SMB usado en la tercera etapa de separación consiste en siete columnas cromatográficas, 17 a 23.

En cada aparato, las columnas están normalmente dispuestas en serie de manera que (en el caso de la primera etapa de separación) el fondo de la columna 1 está conectado a la cabeza de la columna 2, el fondo de la columna 2 está conectado a la cabeza de la columna 3, etc., y el fondo de la columna 8 está conectado a la cabeza de la columna 1. Estas conexiones pueden ser opcionalmente mediante un recipiente de almacenamiento, con una corriente de recirculación a la siguiente columna. El flujo de eluyente a través del sistema es de la columna 1 a la columna 2 a la columna 3, etc. El flujo eficaz de adsorbente a través del sistema es de la columna 8 a la columna 7 a la columna 6, etc.

En esta manifestación, una mezcla de alimentación F que comprende el producto de PUFA (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A') y (A) se introduce en la cabeza de la columna 5 en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. Se introduce desorbente de disolvente orgánico acuoso en la cabeza de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. En la primera etapa de separación, los componentes menos polares (por ejemplo, saturados y/o monoinsaturados) (A') se extraen como la corriente de extracto E1 del fondo de la columna 2. El producto de PUFA (B), los componentes más polares (C) y los componentes menos polares (pero más polares que (A')) (A) se recogen como la corriente de refinado R1 del fondo de la columna 6.

La corriente de refinado R1 es el primer producto intermedio que a continuación se purifica en la segunda etapa de separación, introduciéndose en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación en la cabeza de la columna 13. Se introduce desorbente de disolvente orgánico acuoso en la cabeza de la columna D en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

En la segunda etapa de separación, los componentes menos polares (A) se extraen como la corriente de extracto E2 en el fondo de la columna 10. El producto de PUFA (B) y los componentes más polares (C) se recogen como la corriente de refinado R2 en el fondo de la columna 14. La corriente de refinado R2 es el producto intermedio que a continuación se purifica en la tercera etapa de separación, introduciéndose en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación en la cabeza de la columna 21.

En la tercera etapa de separación, los componentes más polares (C) se extraen como la corriente de refinado R3 en

el fondo de la columna 22. El producto de PUFA (B) se recoge como la corriente de extracto E3 en el fondo de la columna 18. La segunda y tercera etapas de separación tienen lugar en dos zonas en un único aparato cromatográfico de SMB.

En esta manifestación, el disolvente orgánico acuoso se introduce normalmente en la cabeza de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

En esta manifestación, el disolvente orgánico acuoso se introduce normalmente en la cabeza de la columna 9 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

En esta manifestación, el disolvente orgánico acuoso se introduce normalmente en la cabeza de la columna 17 del aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

En esta manifestación, la corriente de alimentación se introduce normalmente en la cabeza de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

En esta manifestación, una primera corriente de refinado se recoge normalmente como el primer producto intermedio del fondo de la columna 6 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. Este primer producto intermedio se purifica a continuación en la segunda etapa de separación y se introduce normalmente en la cabeza de la columna 13 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. La primera corriente de refinado puede recogerse opcionalmente en un recipiente antes de purificarse en la segunda etapa de separación.

En esta manifestación, una primera corriente de extracto normalmente se extrae del fondo de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación. La primera corriente de extracto puede recogerse opcionalmente en un recipiente y reintroducirse en la cabeza de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación.

En esta manifestación, una segunda corriente de refinado se recoge normalmente como el segundo producto intermedio del fondo de la columna 14 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación. Este segundo producto intermedio se purifica a continuación en la tercera etapa de separación y se introduce normalmente en la cabeza de la columna 21 del aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación. La segunda corriente de refinado puede recogerse opcionalmente en un recipiente antes de purificarse en la segunda etapa de separación.

En esta manifestación, una segunda corriente de extracto normalmente se extrae del fondo de la columna 10 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

En esta manifestación, una tercera corriente de extracto se recoge normalmente del fondo de la columna 18 del aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación. Esta tercera corriente de extracto normalmente contiene el producto de PUFA purificado. La tercera corriente de extracto puede recogerse opcionalmente en un recipiente y reintroducirse en la cabeza de la columna 19 del aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

En esta manifestación, una tercera corriente de refinado normalmente se extrae del fondo de la columna 22 del aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

Normalmente, en esta manifestación, el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la segunda y tercera etapas de separación tiene la misma relación de agua:disolvente orgánico y el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente del eluyente de disolvente orgánico usado en la segunda y tercera etapas de separación; y la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación se diferencia de la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación.

En esta manifestación, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda y tercera etapas de separación puede ser la misma y la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación puede ser menor que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda y tercera etapas de separación; y la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la segunda etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación puede ser más rápida que la tasa a la que el líquido recogido mediante la corriente de extracto en la tercera etapa de separación se recircula de nuevo al aparato cromatográfico usado en la tercera etapa de separación.

En esta manifestación, la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente usada en la segunda y tercera etapas de separación es la misma y es del 7:93 al 9:91 % en peso, y la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente en la

primera etapa de separación es del 0,1:99,9 al 1:99 % en peso.

Aunque estas variantes descritas en el presente documento, que no son según la presente invención, se muestran en cuanto a la Figura 2C tratada anteriormente, también pueden llevarse a cabo con aparatos configurados de forma que:

la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, y la primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la primera, segunda y tercera etapas de separación en la primera, segunda y tercera zonas, respectivamente, en los que cada zona es como se define en el presente documento; o
la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, y la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la segunda y tercera etapas de separación en la primera y segunda zonas, respectivamente, en los que cada zona es como se define en el presente documento, y en los que la primera etapa de separación se lleva a cabo en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real separado; o
la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho simulado o real, y (a) la primera, segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, recuperándose el primer y segundo productos intermedios entre la primera y segunda, y segunda y tercera etapas de separación, respectivamente, y ajustándose las condiciones de proceso en el aparato de cromatografía entre la primera y segunda, y segunda y tercera etapas de separación de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación y el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); o

(b) la segunda etapa de separación se lleva a cabo usando un aparato cromatográfico diferente al usado en la primera etapa de separación, y/o la tercera etapa de separación se lleva a cabo usando un aparato cromatográfico diferente al usado en la segunda etapa de separación; o

la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho estacionario y la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo simultáneamente en un único aparato de cromatografía en lecho simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía conectadas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, llevándose a cabo la segunda y tercera etapas de separación en la primera y segunda zonas, respectivamente, en el que cada zona es como se define en el presente documento; o la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho estacionario y la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, recuperándose el segundo producto intermedio entre la segunda y tercera etapas de separación y ajustándose las condiciones de proceso en el aparato de cromatografía entre la segunda y tercera etapas de separación de forma que el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); o
la primera etapa de separación comprende purificar la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía en lecho estacionario y la segunda y tercera etapas de separación se llevan a cabo en aparatos de cromatografía separados, respectivamente, introduciéndose el producto intermedio obtenido de la segunda etapa de separación en el aparato de cromatografía usado en la tercera etapa de separación.

El proceso de la invención permite lograr purezas mucho mayores del producto de PUFA que las que han sido posibles con técnicas cromatográficas convencionales. Los productos de PUFA producidos por el proceso de la invención también tienen perfiles de impurezas particularmente ventajosos, que son bastante diferentes de aquellos observados en aceites preparados por técnicas conocidas. También se describen en el presente documento composiciones que comprenden un producto de PUFA, por ejemplo, uno obtenible por el proceso de la presente invención.

En la práctica, el proceso de la presente invención se controlará generalmente por un ordenador. Por tanto, la presente invención también proporciona un programa informático para controlar un aparato cromatográfico como se define en el presente documento, conteniendo el programa informático un medio de código que cuando se ejecuta instruye al aparato a llevar a cabo el proceso de la invención.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1

Se fracciona una materia prima derivada de aceite de pescado (55 % en peso de EE EPA, 5 % en peso de EE DHA) usando un sistema de cromatografía en lecho móvil real usando gel de sílice unido a C18 como fase estacionaria y

metanol acuoso como eluyente según el sistema esquemáticamente ilustrado en la Figura 5. Un perfil de CG de la mezcla de alimentación se muestra como Figura 7.

En una primera etapa de separación, la mezcla de alimentación se pasó a través de un aparato de SMB que tenía 8 columnas 1 a 8 (diámetro: 152 mm, longitud: 813 mm) conectadas en serie como muestra la Figura 5. Las condiciones de proceso se ajustaron para extraer componentes saturados y monoinsaturados de la mezcla de alimentación como corriente de extracto. Se usó 0,5:99,5 % en peso de eluyente de agua:metanol. La corriente de refinado se retuvo como el primer producto intermedio. Un perfil de CG del primer producto intermedio se muestra como Figura 8.

El primer producto intermedio se pasó a través de un aparato de SMB que tiene dos zonas con ocho columnas, columnas 9 a 16, en la primera zona y siete columnas, columnas 17 a 23, en la segunda zona. Se usó 8:92 % en peso de eluyente de agua:metanol en tanto la primera como la segunda zonas, es decir, en tanto la segunda como la tercera etapas de separación. Las condiciones de proceso en la primera zona se ajustaron para purificar EPA de los componentes que eluyen más lentos tales como DHA, que se extrajeron como corriente de extracto. La corriente de refinado se retuvo como el segundo producto intermedio. Un perfil de CG del segundo producto intermedio se muestra como Figura 9.

A continuación se introdujo el segundo producto intermedio en la segunda zona y se separó de los componentes que eluyen más rápido, que se extrajeron como una corriente de refinado. Se recogió EPA de alta pureza como corriente de extracto de la segunda zona. Un perfil de CG del producto de PUFA EPA se muestra como Figura 10.

EPA se produjo con una pureza final superior al 97 %.

Puede observarse que para las tres etapas de separación tomadas conjuntamente, la tasa global de acumulación de extracto (E1+E2+E3) 3876 ml/min.

Las condiciones de proceso para cada etapa de separación son las siguientes:

<u>Primera etapa de separación</u>
Tasa de alimentación de materia prima: 94 ml/min
Tasa de alimentación de desorbente: 6250 ml/min
Tasa de acumulación de extracto: 1250 ml/min
Tasa de recirculación de extracto: 5000 ml/min
Tasa de acumulación de refinado: 1688 ml/min
Tiempo de ciclo: 600 s

<u>Segunda etapa de separación</u>
Tasa de alimentación del primer producto intermedio: 40 ml/min
Tasa de alimentación de desorbente: 6313 ml/min
Tasa de acumulación de extracto: 1188 ml/min
Tasa de recirculación de extracto: 5125 ml/min
Tasa de acumulación de refinado: 1625 ml/min
Tiempo de ciclo: 1200 s

<u>Tercera etapa de separación</u>
Tasa de alimentación del segundo producto intermedio: 40 ml/min
Tasa de alimentación de desorbente: 6189 ml/min
Tasa de acumulación de extracto: 1438 ml/min
Tasa de recirculación de extracto: 4750 ml/min
Tasa de acumulación de refinado: 1438 ml/min
Tiempo de ciclo: 1080 s

<u>Ejemplo comparativo 1</u>

Se llevó a cabo un experimento para producir un producto de PUFA que contenía más del 97 % de EPA de la misma mezcla de alimentación que se usó en el Ejemplo 1. Sin embargo, en lugar de usar un proceso de separación de tres etapas según la presente invención, solo se usaron dos etapas de separación. Así, el proceso se llevó a cabo según el proceso desvelado en el documento PCT/GB10/002339, y como se ilustra en la Figura 6.

Se usó un único aparato cromatográfico que tiene dos zonas como se muestra en la Figura 6. La primera zona contiene 8 columnas (diámetro: 24", longitud: 32") y la segunda zona 7 columnas (diámetro: 24", longitud: 32"). Las condiciones de proceso se ajustaron para separar el producto de PUFA EPA de componentes menos polares de la mezcla de alimentación en la primera zona y los componentes más polares de la mezcla de alimentación en la segunda zona. Se usó 8:92 % en peso de eluyente de agua:metanol en ambas zonas.

Se produjo EPA con una pureza final superior al 97 %.

Puede observarse que para las dos etapas de separación tomadas conjuntamente, la tasa global de acumulación de extracto (E1+E2) fue 10571 ml/min. Así, puede observarse que se requiere un volumen mucho mayor de disolvente orgánico acuoso para recuperar el producto de PUFA en comparación con el proceso de tres etapas de la invención.

Las condiciones de proceso para las etapas de separación son las siguientes:

Primera etapa de separación
Tasa de alimentación de la mezcla de alimentación: 34 ml/min
Tasa de alimentación de desorbente: 14438 ml/min
Tasa de acumulación de extracto: 9313 ml/min
Tasa de recirculación de extracto: 5125 ml/min
Tasa de acumulación de refinado: 1688 ml/min
Tiempo de ciclo: 1200 s

Tercera etapa de separación
Tasa de alimentación de producto intermedio: 40 ml/min
Tasa de alimentación de desorbente: 6189 ml/min
Tasa de acumulación de extracto: 1438 ml/min
Tasa de recirculación de extracto: 4750 ml/min
Tasa de acumulación de refinado: 1438 ml/min
Tiempo de ciclo: 1080 s

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácido graso poliinsaturado (PUFA) de una mezcla de alimentación que es un aceite de pescado o que se deriva de aceite de pescado, proceso que comprende las etapas de:

(i) purificar la mezcla de alimentación en una etapa de separación cromatográfica, usando un aparato de cromatografía en lecho estacionario o lecho móvil simulado o real, para obtener un primer producto intermedio; y
(ii) purificar el primer producto intermedio obtenido en (i) en una etapa de separación cromatográfica en lecho móvil simulado o real, para obtener un segundo producto intermedio; y
(iii) purificar el segundo producto intermedio obtenido en (ii) en una etapa de separación usando un aparato cromatográfico diferente al usado en la segunda etapa de separación, para obtener el producto de PUFA;

en el que
un disolvente orgánico acuoso se usa como eluyente en cada etapa de separación;
ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraen en la primera etapa de separación;
el producto de PUFA se separa de componentes diferentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii); y el producto de PUFA obtenido en la tercera etapa de separación contiene EPA o un derivado de EPA en una cantidad superior al 90 % en peso;
en el que (a) en la primera etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, y en la segunda etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación, y en la tercera etapa de separación el producto de PUFA se separa de componentes que son más polares que el producto de PUFA, o

(b) en la segunda etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son más polares que el producto de PUFA, y en la tercera etapa de separación el producto de PUFA se separa de componentes que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación.

2. Un proceso según la reivindicación 1, en el que las tres etapas se llevan a cabo en aparatos cromatográficos separados.

3. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer producto intermedio se recupera entre la primera y segunda etapas de separación.

4. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el segundo producto intermedio se recupera entre la segunda y tercera etapas de separación.

5. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el eluyente de disolvente orgánico acuoso se elimina parcialmente o totalmente del producto intermedio obtenido en la primera y/o segunda etapa de separación antes de que el producto intermedio se purifique adicionalmente en la siguiente etapa de separación.

6. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el eluyente no es compartido entre los aparatos cromatográficos separados.

7. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer producto intermedio obtenido en la primera etapa de separación está enriquecido en el producto de PUFA en comparación con la mezcla de alimentación; y el segundo producto intermedio obtenido en la segunda etapa de separación está enriquecido en el producto de PUFA en comparación con el primer producto intermedio; y/o en el que en la primera etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, en la segunda etapa el producto de PUFA se separa de componentes de la mezcla de alimentación que son menos polares que el producto de PUFA, pero más polares que los componentes separados en la primera etapa de separación, y en la tercera etapa de separación el producto de PUFA se separa de componentes más polares de la mezcla de alimentación.

8. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los componentes separados del producto de PUFA en la segunda etapa de separación incluyen DHA o un derivado de DHA y/u otros PUFA o derivados de PUFA que son menos polares que el producto de PUFA;
y/o los componentes separados del producto de PUFA en la tercera etapa de separación incluyen SDA o un derivado de SDA y/u otros PUFA que son más polares que el producto de PUFA.

9. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que el eluyente es una mezcla de agua y un alcohol, un éter, un éster, una cetona o un nitrilo, y en el que el eluyente es preferentemente una mezcla de agua

y metanol.

10. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el producto de PUFA contiene EPA o un derivado de EPA en una cantidad superior al 95 % en peso, preferentemente el 97 % en peso.

11. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el derivado de EPA es éster etílico de EPA (EE).

12. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la relación de agua:disolvente orgánico usada en cada etapa de separación se ajusta de forma que los ácidos grasos saturados y/o monoinsaturados presentes en la mezcla de alimentación se extraigan en la primera etapa de separación; y
el producto de PUFA se separe de los diferentes componentes de la mezcla de alimentación en las etapas (ii) y (iii).

13. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la segunda y tercera etapas de separación tiene la misma relación de agua:disolvente orgánico y el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente del eluyente de disolvente orgánico usado en la segunda y tercera etapas de separación,
en el que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación es preferiblemente menor que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la segunda y tercera etapas de separación, y en el que la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente usada en la primera etapa de separación es más preferentemente del 0,1:99,9 al 1:99 % en peso, y la relación de agua:disolvente orgánico del eluyente usada en la segunda y tercera etapas de separación es más preferentemente del 7:93 al 9:91 % en peso.

14. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que parte del extracto o refinado de la primera, segunda o tercera etapa se recircula de nuevo al aparato.

15. Un programa informático para controlar un aparato de cromatografía como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, programa informático que contiene medios de código que, cuando se ejecuta, ordena al aparato llevar a cabo un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

Figura 1

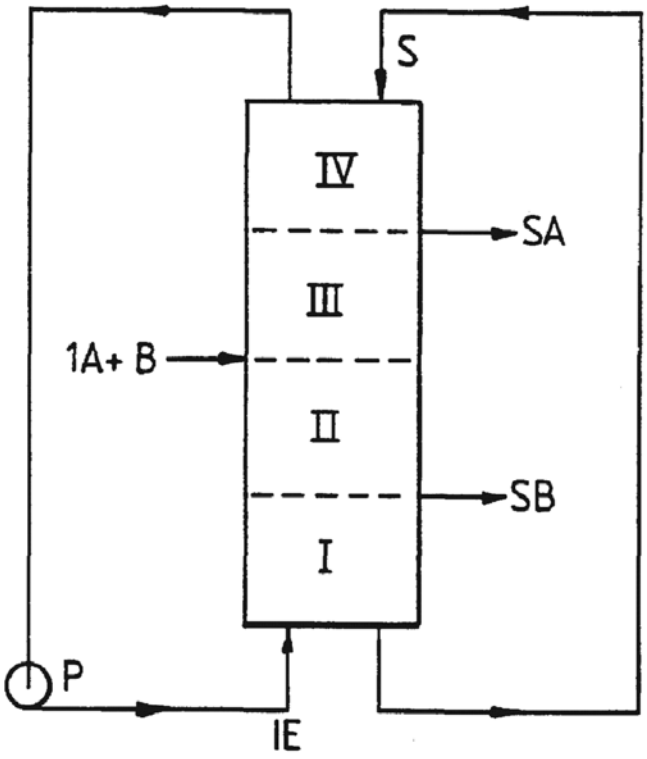


Figura 2

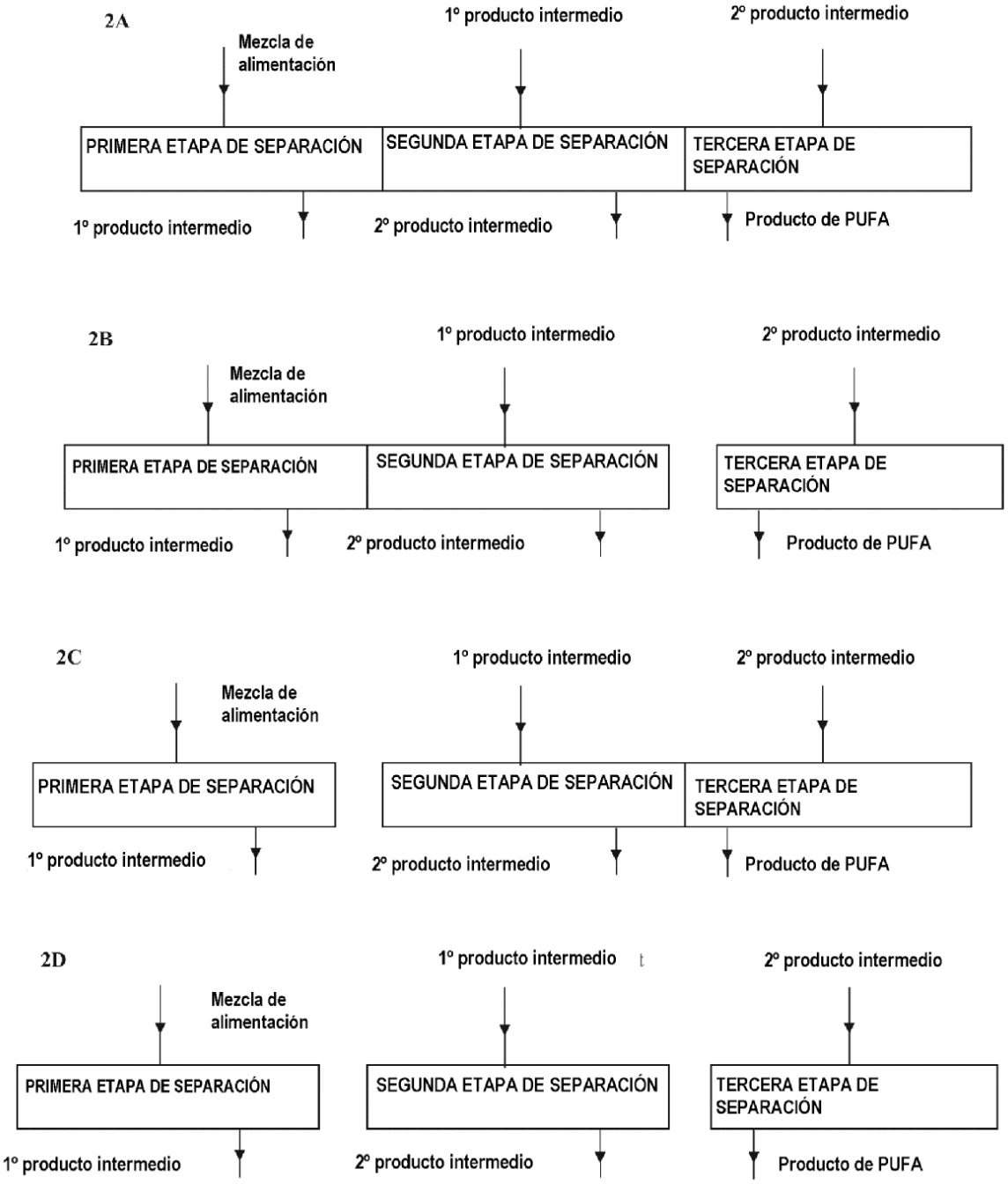

2A
Mezcla de alimentación
1º producto intermedio
2º producto intermedio
PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN
SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN
TERCERA ETAPA DE SEPARACIÓN
1º producto intermedio
2º producto intermedio
Producto de PUFA
2B
Mezcla de alimentación
1º producto intermedio
2º producto intermedio
PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN
SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN
TERCERA ETAPA DE SEPARACIÓN
1º producto intermedio
2º producto intermedio
Producto de PUFA
2C
Mezcla de alimentación
1º producto intermedio
2º producto intermedio
PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN
SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN
TERCERA ETAPA DE SEPARACIÓN
1º producto intermedio
2º producto intermedio
Producto de PUFA
2D
Mezcla de alimentación
1º producto intermedio
2º producto intermedio
PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN
SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN
TERCERA ETAPA DE SEPARACIÓN
1º producto intermedio
2º producto intermedio
Producto de PUFA

Figura 3

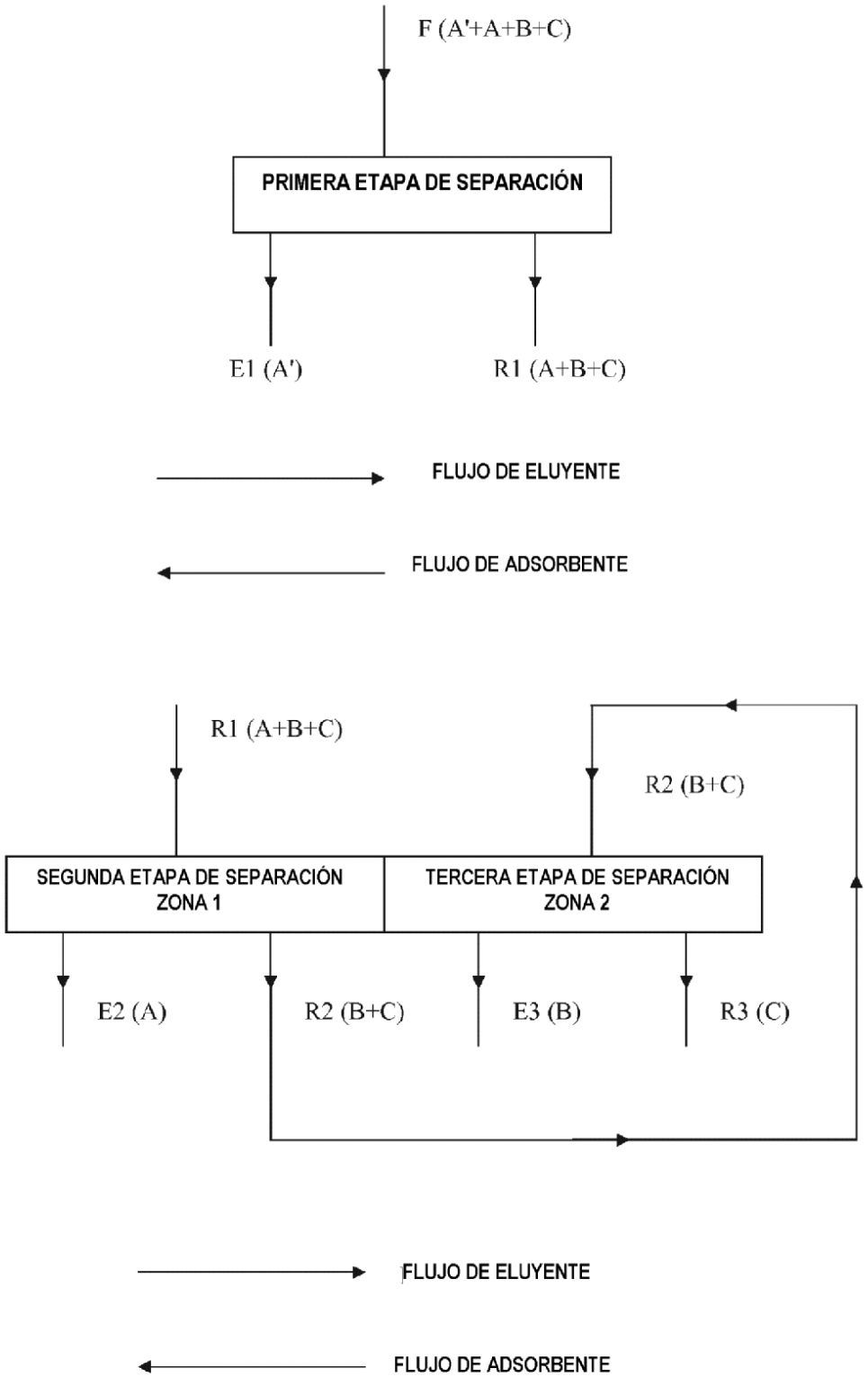

F (A'+A+B+C)
PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN
E1 (A')
R1 (A+B+C)
FLUJO DE ELUYENTE
FLUJO DE ADSORBENTE
R1 (A+B+C)
R2 (B+C)
SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN
ZONA 1
TERCERA ETAPA DE SEPARACIÓN
ZONA 2
E2 (A)
R2 (B+C)
E3 (B)
R3 (C)
FLUJO DE ELUYENTE
FLUJO DE ADSORBENTE

Figura 4

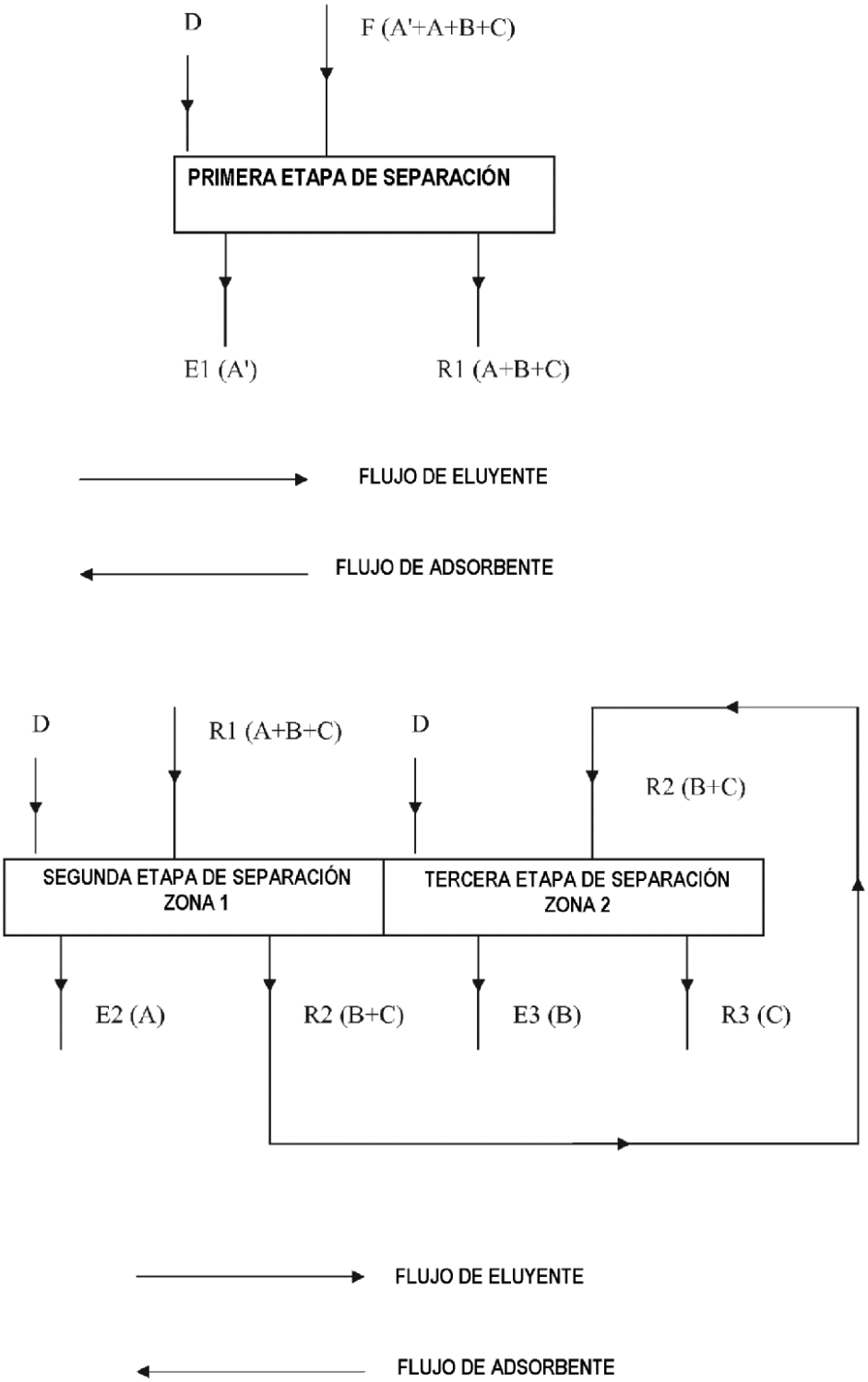

D
F (A'+A+B+C)
PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN
E1 (A')
R1 (A+B+C)
FLUJO DE ELUYENTE
FLUJO DE ADSORBENTE
D
R1 (A+B+C)
D
R2 (B+C)
SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN
ZONA 1
TERCERA ETAPA DE SEPARACIÓN
ZONA 2
E2 (A)
R2 (B+C)
E3 (B)
R3 (C)
FLUJO DE ELUYENTE
FLUJO DE ADSORBENTE

Figura 5

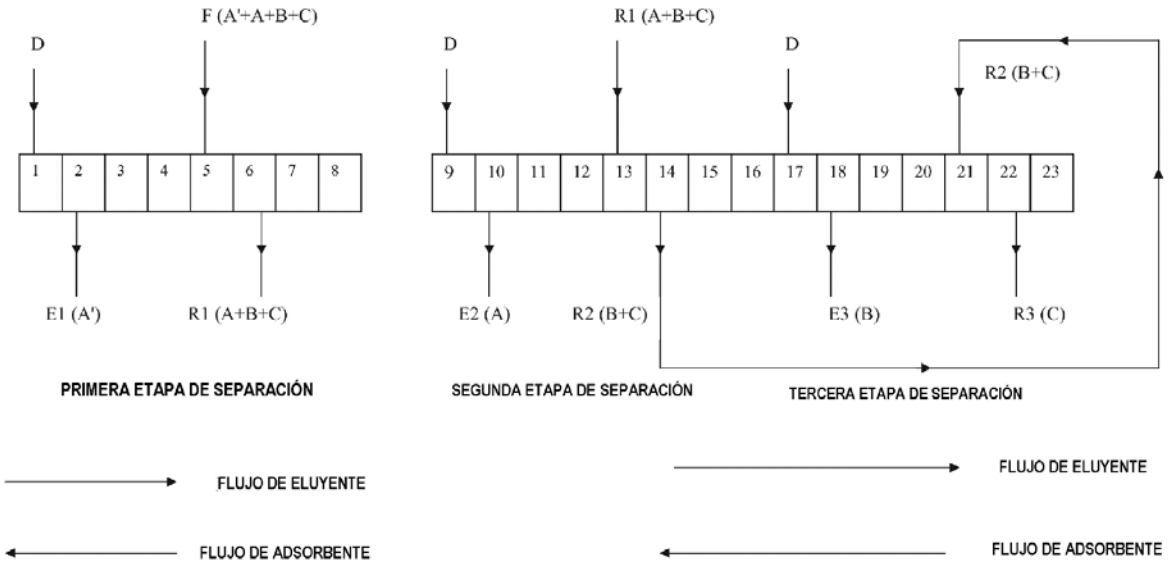

F (A'+A+B+C)
D
1
2
3
4
5
6
7
8
E1 (A')
R1 (A+B+C)
PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN
R1 (A+B+C)
D
D
R2 (B+C)
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
E2 (A)
R2 (B+C)
E3 (B)
R3 (C)
SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN
TERCERA ETAPA DE SEPARACIÓN
FLUJO DE ELUYENTE
FLUJO DE ADSORBENTE
FLUJO DE ELUYENTE
FLUJO DE ADSORBENTE

Figura 6

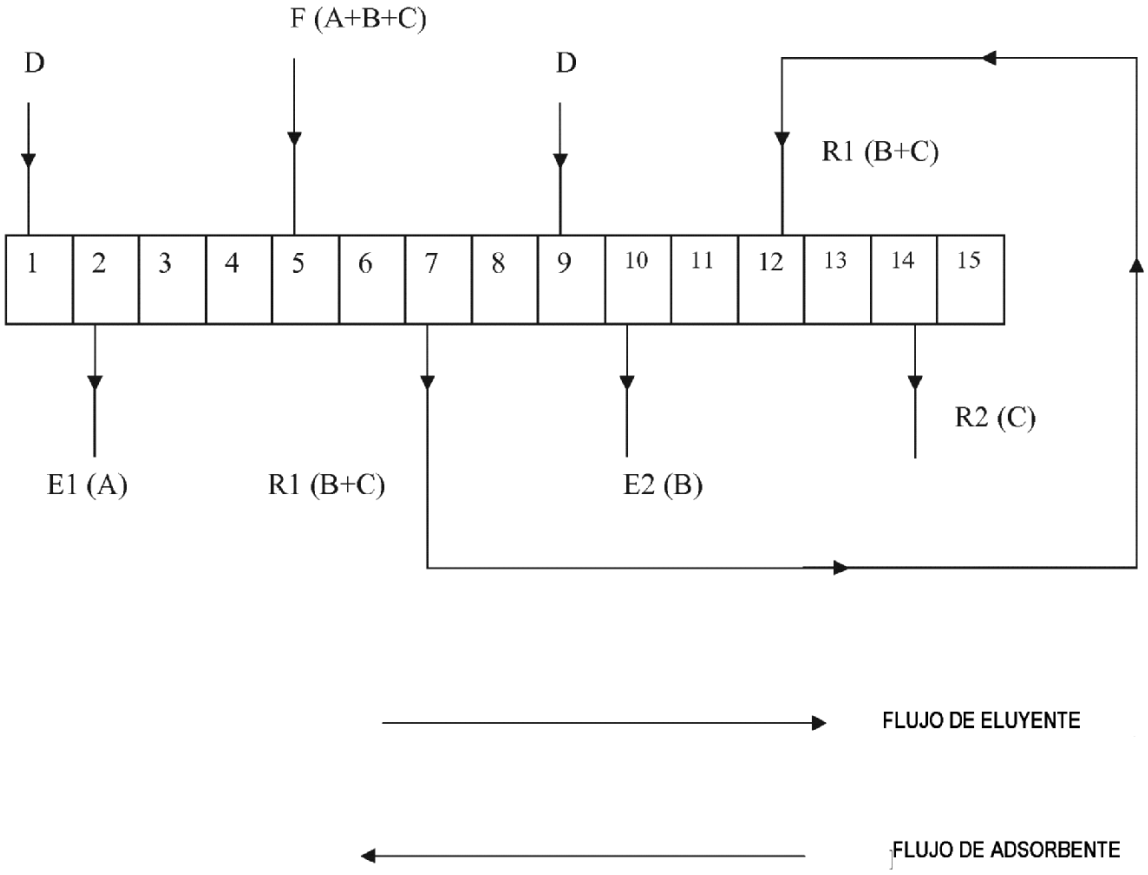

F (A+B+C)
D
D
R1 (B+C)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
R2 (C)
E1 (A)
R1 (B+C)
E2 (B)
FLUJO DE ELUYENTE
FLUJO DE ADSORBENTE

Figura 7

Material de alimentación EPA 55

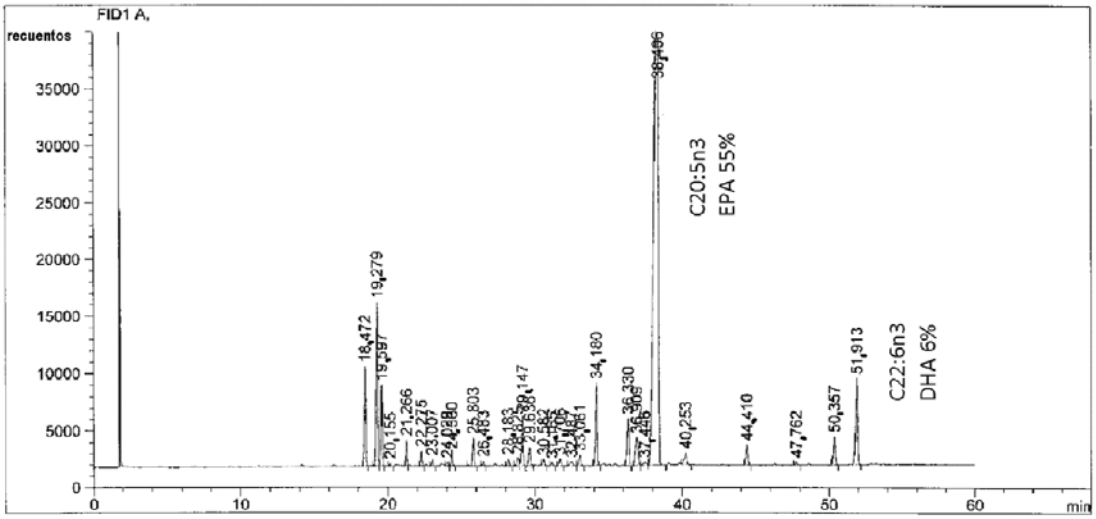


Figura 8

Producto intermedio de EE EPA 85 de la primera etapa de separación

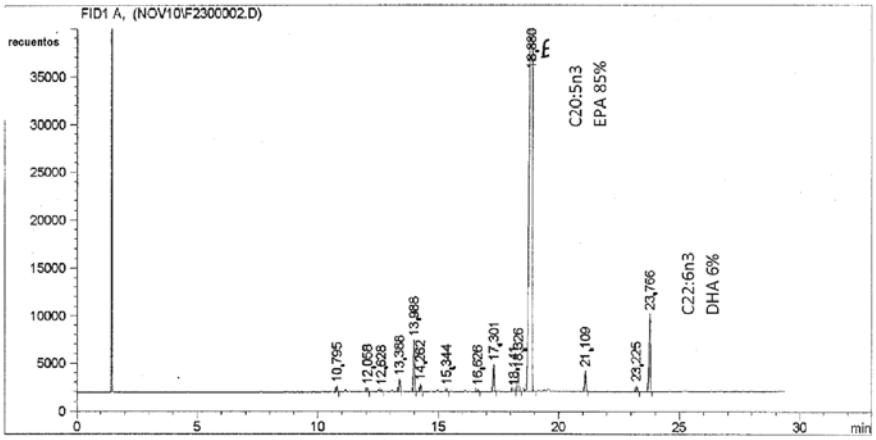


Figura 9

Producto intermedio de EE EPA 93 de la segunda etapa de separación

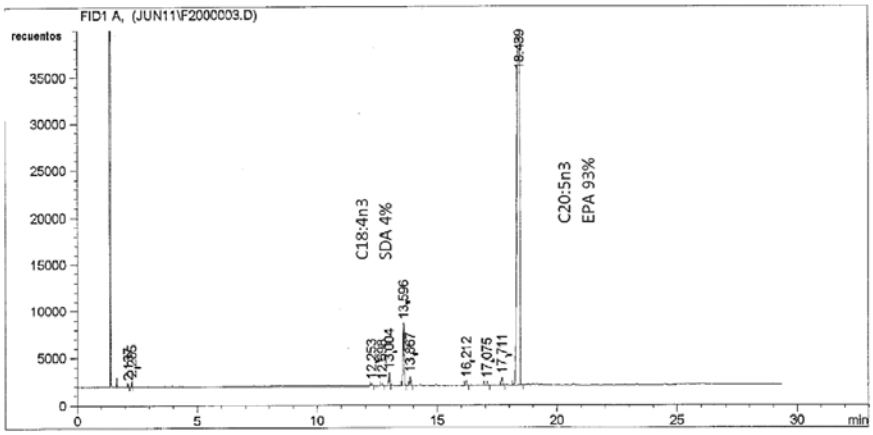
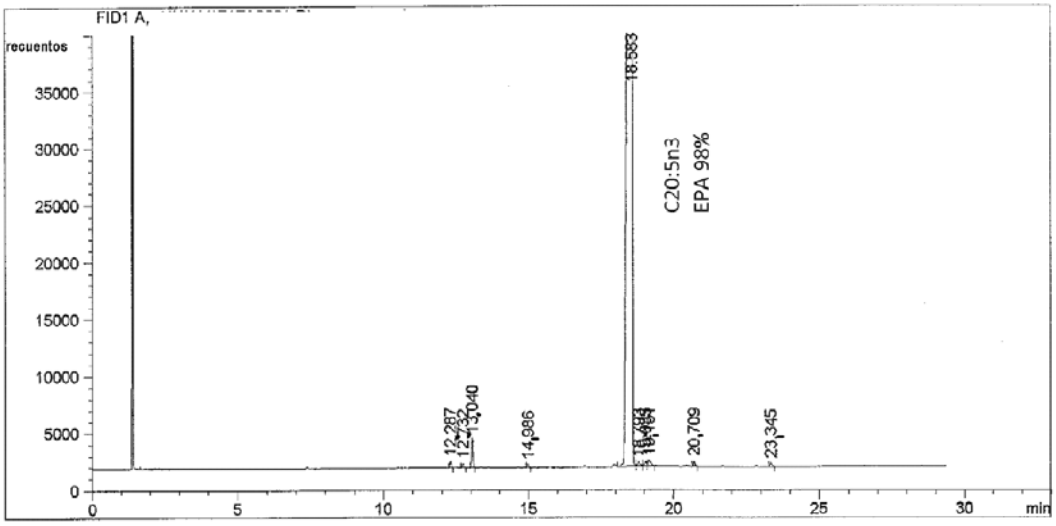


Figura 10

Producto de PUFA final de EE EPA 97