

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 695**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18 (2006.01)
C11B 7/00 (2006.01)
A23D 9/04 (2006.01)
C11B 3/10 (2006.01)
C11C 1/08 (2006.01)
B01D 15/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2014 E 16201772 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 3170543**

54 Título: **Proceso de separación de múltiples etapas**

30 Prioridad:

09.01.2013 GB 201300354
09.01.2013 US 201361750389 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.06.2018

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 y
MORRISON, ANGUS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 671 695 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de separación de múltiples etapas

- 5 La presente invención se refiere a un proceso de separación cromatográfica mejorado para purificar ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y sus derivados. En particular, la presente invención se refiere a un proceso de separación cromatográfica mejorado que emplea un sistema mixto de disolventes.
- 10 Los ácidos grasos, en particular, los AGPI y sus derivados son precursores de moléculas biológicamente importantes, que desempeñan un papel importante en la regulación de funciones biológicas tales como la agregación plaquetaria, la inflamación y las respuestas inmunológicas. De este modo, los AGPI y sus derivados pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de una amplia selección de afecciones patológicas incluyendo afecciones del SNC; neuropatías, incluyendo neuropatía diabética; enfermedades cardiovasculares; afecciones del sistema inmunitario general y afecciones inflamatorias, incluyendo las enfermedades inflamatorias de la piel.
- 15 Los AGPI se encuentran en materias primas naturales tales como los aceites vegetales y los aceites marinos. Sin embargo, dichos AGPI con frecuencia están presentes en dichos aceites en mezcla con ácidos grasos saturados y otras numerosas impurezas. Por lo tanto, sería deseable purificar los AGPI antes de un uso nutricional o farmacéutico.
- 20 Desafortunadamente, los AGPI son sumamente frágiles. Así pues, cuando se calientan en presencia de oxígeno, tienden a la isomerización, peroxidación y oligomerización. Por lo tanto, es difícil el fraccionamiento y la purificación de productos de AGPI para preparar ácidos grasos puros. La destilación, incluso al vacío, puede conducir a una degradación inaceptable del producto.
- 25 Las técnicas de separación cromatográfica son muy conocidas por los expertos en la materia. Las técnicas de separación cromatográfica que implican sistemas de lecho estacionario y sistemas de lecho móvil simulado o real son familiares para un experto en la materia.
- 30 En un sistema cromatográfico de lecho estacionario convencional, se filtra una mezcla cuyos componentes se han de separar a través de un recipiente. En general, el recipiente es cilíndrico, y normalmente se denomina columna. La columna contiene un empaquetamiento de un material poroso (denominado, en general, fase estacionaria) que presenta una alta permeabilidad a los fluidos. La velocidad de filtración de cada componente de la mezcla depende de las propiedades físicas de ese componente de modo que los componentes salen de la columna de forma sucesiva y selectiva. Así pues, algunos de los componentes tienden a fijarse fuertemente a la fase estacionaria y, por tanto, se filtrarán lentamente, mientras que otros tenderán a fijarse débilmente y a salir de la columna más rápidamente. Se han propuesto muchos sistemas cromatográficos de lecho estacionario diferentes, y se usan tanto para fines analíticos como para la producción industrial.
- 35 40 La cromatografía de lecho móvil simulado y real son técnicas conocidas y familiares para los expertos en la materia. El principio de la operación implica el movimiento en contracorriente de una fase eluyente líquida y una fase adsorbente sólida. Esta operación permite un uso mínimo de disolvente, haciendo que el proceso sea económicamente viable. Dicha tecnología de separación ha encontrado varias aplicaciones en diversos campos, incluyendo hidrocarburos, productos químicos industriales, aceites, azúcares y API.
- 45 Así pues, un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado consiste en una serie de columnas individuales que contienen adsorbente, que están conectadas entre sí en serie. El eluyente se hace pasar a través de las columnas en una primera dirección. Los puntos de inyección de la materia prima y el eluyente, y los puntos de recogida de los componentes separados en el sistema se desplazan periódicamente por medio de una serie de válvulas. El efecto general es simular el funcionamiento de una sola columna que contiene un lecho móvil del adsorbente sólido, adsorbente sólido que se mueve en una dirección a contracorriente al flujo del eluyente. Por lo tanto, 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 que se pasa el eluyente, pero en un sistema de lecho móvil simulado, el funcionamiento es tal que simula un lecho móvil continuo a contracorriente.
- 50 55 Se ilustra un aparato cromatográfico de lecho móvil simulado típico con referencia a la Figura 1. El concepto de un proceso de separación cromatográfica de lecho móvil simulado o real se explica considerando una columna cromatográfica vertical que contiene una fase estacionaria S dividida en secciones, más concretamente, en cuatro subzonas I, II, III y IV superpuestas que van de abajo a arriba de la columna. El eluyente se introduce en la parte inferior en IE por medio de una bomba P. La mezcla de los componentes A y B que han de separarse se introduce en IA + B entre la subzona II y la subzona III. Se recoge un extracto que contiene principalmente B en SB entre la subzona I y la subzona II, y se recoge un refinado que contiene principalmente A en SA entre la subzona III y la subzona IV.
- 60 65 En el caso de un sistema de lecho móvil simulado, el movimiento descendente simulado de la fase estacionaria S está provocado por el movimiento de los puntos de introducción y de recogida con respecto a la fase sólida. En el

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

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

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

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

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

El documento WO 2007/075499 describe un método de preparación de composiciones enriquecidas en compuestos que contienen cadenas de átomos de carbono de diversos grados de insaturación usando la cromatografía de argentación, que utiliza una resina catiónica argentizada o alúmina argentizada acondicionada para separar compuestos que contienen cadenas de átomos de carbono saturadas o monoinsaturadas de compuestos que tienen cadenas de átomos de carbono poliinsaturadas presentes en una composición inicial. El documento WO 2007/075499 también describe un método de preparación de un adsorbente de alúmina argentizada acondicionado que tiene una mayor selectividad hacia los compuestos que contienen una o más cadenas de átomos de carbono poliinsaturadas.

El documento WO 94/25552 describe un proceso de recuperación de ácidos grasos poliinsaturados purificados o sus derivados a partir de mezclas que contienen dichos ácidos grasos y sustancias no deseadas, en el que se somete el suministro a una tratamiento preliminar usando bien cromatografía de lecho estacionario, siendo el eluyente posiblemente un fluido a presión supercrítica, o fraccionamiento en columna a contracorriente en múltiples etapas, en el que el disolvente es un fluido a presión supercrítica; y luego se someten una o más fracciones que contienen concentraciones mejoradas de los ácidos grasos de interés recuperados del tratamiento preliminar a fraccionamiento adicional usando cromatografía de lecho móvil a contracorriente continuo simulado, nuevamente, siendo el eluyente posiblemente un fluido a presión supercrítica, en cuyo caso el tratamiento preliminar puede omitirse por completo.

La purificación de los productos de AGPI es particularmente desafiante. Así pues, muchas materias primas adecuadas para preparar productos de AGPI son mezclas sumamente complejas que contienen un gran número de diferentes componentes con tiempos de retención muy similares en aparatos cromatográficos. Por lo tanto, es muy difícil separar ciertos AGPI de dichas materias primas. Sin embargo, se requiere un alto grado de pureza de los productos de AGPI, en particular, para aplicaciones farmacéuticas y nutracéuticas. Históricamente, por tanto, cuando se requieren productos de AGPI de alta pureza, se ha usado la destilación. No obstante, existen importantes inconvenientes en el uso de la destilación como técnica de separación para AGPI delicados como se ha descrito anteriormente.

La solicitud de patente internacional publicada WO-A-2011/080503 desvela un proceso de separación SMB para la recuperación un producto de AGPI a partir de una mezcla de alimentación eficazmente y a muy alta pureza. Se ha encontrado, sin embargo, que puede ser difícil eliminar los ácidos grasos C18, en particular, el ácido alfa-linolénico (ALA) y/o el ácido gamma-linolénico (GLA), de las mezclas de alimentación eficazmente sin usar grandes volúmenes de disolventes acuosos de alcohol. La eliminación eficaz de ácidos grasos C18 es ventajosa, ya que muchas especificaciones para aceites farmacéuticos y dietéticos requieren un bajo contenido de estos ácidos grasos. Por ejemplo, ciertas especificaciones del aceite para su uso en Japón requieren un contenido de ALA inferior al 1 % en peso.

Por consiguiente, existe la necesidad de un proceso de separación cromatográfica que pueda recuperar eficazmente un producto de AGPI de una mezcla de alimentación mientras reduce al mínimo la cantidad de ácidos grasos C18, por ejemplo, de ALA y/o GLA, presente en el producto resultante.

5 Sumario de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que es posible purificar eficazmente un producto de AGPI con bajos niveles de ácidos grasos C18, por ejemplo, ALA y/o GLA, a partir de materias primas disponibles en el mercado tales como aceites de pescado usando un sistema mixto de disolventes.

10 La presente invención proporciona, por tanto, un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de una mezcla de alimentación, que comprende:

- 15 (a) purificar la mezcla de alimentación en una primera etapa de separación cromatográfica usando como eluyente una mezcla de agua y un primer disolvente orgánico, obteniéndose un producto intermedio; y
 (b) purificar el producto intermedio en una segunda etapa de separación cromatográfica usando como eluyente una mezcla de agua y un segundo disolvente orgánico, obteniéndose el producto de AGPI, siendo el segundo disolvente orgánico diferente del primer disolvente orgánico, y

20 en el que la primera etapa de separación cromatográfica comprende introducir la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real y la segunda etapa de separación cromatográfica comprende introducir el producto intermedio en un aparato de cromatografía de lecho estacionario.

Descripción de las figuras

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

30 La Figura 2 ilustra una etapa de separación cromatográfica, que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real, para separar el EPA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

35 La Figura 3 ilustra una etapa de separación cromatográfica, que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real, para separar el DHA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

40 La Figura 4 ilustra una etapa de separación cromatográfica, que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real, para separar el EPA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

La Figura 5 ilustra una etapa de separación cromatográfica, que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real, para separar el DHA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

45 La Figura 6 ilustra una etapa de separación cromatográfica, que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real, para separar el EPA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

50 La Figura 7 ilustra una etapa de separación cromatográfica, que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real, para separar el DHA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

55 La Figura 8 ilustra una etapa de separación cromatográfica, que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real, para separar el EPA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

60 La Figura 9 ilustra una etapa de separación cromatográfica, que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real, para separar el EPA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

La Figura 10 ilustra tres formas en las que se puede llevar a cabo una etapa de separación cromatográfica que comprende dos procesos de lecho móvil simulado o real.

65 La Figura 11 ilustra una etapa de separación cromatográfica para separar el EPA de las impurezas más rápidas y más lentas (es decir, impurezas más polares y menos polares).

La Figura 12 muestra un rastro de GC-FAMES de un producto intermedio producido por la primera etapa de separación del proceso de la presente invención en el que se usa metanol como primer disolvente orgánico.

La Figura 13 muestra un rastro de GC-FAMES de un producto de AGPI producido por la segunda etapa de separación del proceso de la presente invención en el que se usa acetonitrilo como segundo disolvente orgánico.

La Figura 14 muestra un rastro de GC-FAMES de un producto intermedio producido por la primera etapa de separación del proceso de la presente invención en el que se usa acetonitrilo como primer disolvente orgánico.

La Figura 15 muestra un rastro de GC-FAMES de un producto de AGPI producido por la segunda etapa de separación del proceso de la presente invención, en el que se usa metanol como segundo disolvente orgánico.

La Figura 16 muestra un rastro de GC-FAMES de una mezcla de alimentación típica, que contiene el 55 % en peso de etiléster de EPA.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, la expresión "producto de AGPI" se refiere a un producto que comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), y/o derivados de los mismos, normalmente de importancia nutricional o farmacéutica. Por lo general, el producto de AGPI es un solo AGPI o derivado del mismo. Como alternativa, el producto de AGPI es una mezcla de dos o más AGPI o derivados de los mismos.

La expresión "ácido graso poliinsaturado" (AGPI) se refiere a ácidos grasos que contienen más de un doble enlace. Dichos AGPI son muy conocidos para el experto en la materia. Como se usa en el presente documento, un derivado de AGPI es un AGPI en forma de un mono-, di- o triglicérido, éster, fosfolípido, amida, lactona o sal. Se prefieren los mono-, di- y triglicéridos y ésteres. Se prefieren más los triglicéridos y los ésteres. Los ésteres son incluso más preferidos. Los ésteres normalmente son ésteres de alquilo, preferentemente ésteres de alquilo C₁-C₆, más preferentemente ésteres de alquilo C₁-C₄. Los ejemplos de ésteres incluyen metilésteres y etilésteres. Los etilésteres son los más preferidos.

Por lo general, el producto de AGPI es al menos un AGPI ω -3 o ω -6, o un derivado del mismo, preferentemente al menos un AGPI ω -3 o un derivado del mismo.

Los ejemplos de AGPI ω -3 incluyen ácido eicosatrienoico (ETE), ácido eicosatetraenoico (ETA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Se prefieren el EPA, DPA y DHA. El EPA y el DHA son los más preferidos.

Los ejemplos de AGPI ω -6 incluyen ácido eicosadienoico, ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA), ácido araquidónico (ARA), ácido docosadienoico, ácido adrenico y ácido docosapentanoico (ω -6). Se prefieren el ARA y DGLA.

Preferentemente, el producto de AGPI es EPA, DHA, un derivado de los mismos o mezclas de los mismos. Los derivados típicos incluyen mono-, di- y tri-glicéridos de EPA y de DHA, y ésteres de EPA y DHA, preferentemente ésteres alquílicos tales como ésteres de alquilo C₁-C₄.

Más preferentemente, el producto de AGPI es EPA, DHA o un derivado de los mismos. Los derivados típicos incluyen mono-, di- y tri-glicéridos de EPA y de DHA, y ésteres de EPA y DHA, preferentemente ésteres alquílicos tales como ésteres de alquilo C₁-C₄.

Lo más preferentemente, el producto de AGPI es ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), triglicéridos de EPA, triglicéridos de DHA, etiléster de EPA o etiléster de DHA.

De manera particularmente preferida, el producto de AGPI es EPA, DHA, etiléster de EPA o etiléster de DHA.

En una realización, el producto de AGPI es EPA y/o el etiléster (EE) de EPA.

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

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

En una realización más preferida, el producto de AGPI obtenido en la segunda etapa de separación es EPA o un derivado de EPA, por ejemplo, etiléster de EPA, y se obtiene a una pureza superior al 90 % en peso, preferentemente superior al 95 % en peso, más preferentemente superior al 97 % en peso, incluso más preferentemente superior al 98 % en peso, aún más preferentemente superior al 98,4 % en peso. Preferentemente, el producto de AGPI obtenido en la segunda etapa de separación es EPA o un derivado de EPA, por ejemplo, etiléster de la EPA, y se obtiene a una pureza de entre el 98 y el 99,5 % en peso.

Por lo general, además de dicho producto de AGPI, se recoge un producto de AGPI secundario adicional en el proceso de separación cromatográfica de la invención. Preferentemente, el producto de AGPI es EPA o un derivado del mismo, y el producto de AGPI secundario adicional es DHA o un derivado del mismo.

5 En una realización adicional de la invención, el proceso se configura para recoger un producto de AGPI que es una mezcla concentrada de EPA y DHA o de derivados de los mismos. Por lo tanto, se usa una mezcla de alimentación que contiene EPA, DHA, componentes que son más polares que el EPA y el DHA, y componentes que son menos polares que el EPA y el DHA.

10 Por lo general, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de ácido alfa-linolénico (ALA), mono-, di- y tri-glicéridos de ALA e impurezas de ésteres de alquilo C₁-C₄ de ALA. Más normalmente, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas que son ALA y sus derivados. Los derivados de ALA típicos son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI.

15 Por lo general, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas de ácido gamma-linolénico (GLA), mono-, di- y tri-glicéridos de GLA, y ésteres de alquilo C₁-C₄ de GLA. Más normalmente, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas que son GLA y sus derivados. Los derivados de GLA típicos son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI.

20 Por lo general, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas de ácidos grasos C18, impurezas de mono-, di- y tri-glicéridos de ácidos grasos C18 e impurezas de ésteres de alquilo de ácidos grasos C18. Más normalmente, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas que son ácidos grasos C18 y derivados de los mismos. Los derivados de ácidos grasos C18 típicos son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI. Como se usa en el presente documento, un ácido graso C18 es un ácido monocarboxílico alifático C18 que tiene una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada. Los ácidos grasos C18 típicos incluyen ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9), ácido vaccénico (C18:1n7), ácido linoleico (C18:2n6), ácido gamma-linolénico/GLA (C18:3n6), ácido alfa-linoleico/ALA (C18:3n3) y ácido estearidónico/SDA (C18:4n3).

30 Para evitar dudas, en estas realizaciones, la cantidad máxima de todas las impurezas especificadas es del 1 % en peso.

Como se ha explicado anteriormente, normalmente, la cantidad de las impurezas mencionadas anteriormente en el producto de AGPI es inferior al 1 % en peso. Preferentemente, la cantidad de las impurezas mencionadas anteriormente es inferior al 0,5 % en peso, más preferentemente inferior al 0,25 % en peso, incluso más preferentemente inferior al 0,11 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,05 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,01 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,001 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,0001 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,00001 % en peso.

40 En ciertas realizaciones preferidas, el producto de AGPI está esencialmente exento de las impurezas mencionadas anteriormente.

45 El producto de AGPI no es ALA, GLA, ácido linoleico, un mono-, di- o tri-glicérido de ALA, un mono- di- o tri-glicérido de GLA, un mono-, di- o tri-glicérido de ácido linoleico, un éster de alquilo C₁-C₄ de ALA, un éster de alquilo C₁-C₄ de GLA o un éster de alquilo C₁-C₄ de ácido linoleico o una mezcla de los mismos. Por lo general, el producto de AGPI no es ALA, GLA, ácido linoleico, o un derivado o mezclas de los mismos. Los derivados típicos de ALA, GLA y ácido linoleico son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI.

50 Por lo general, el producto de AGPI no es un AGPI C18, un mono-, di- o tri-glicérido de AGPI C18, ni un éster de alquilo de AGPI C18. Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácido graso poliinsaturado (AGPI) de una mezcla de alimentación, que comprende:

(a) purificar la mezcla de alimentación en una primera etapa de separación cromatográfica usando como eluyente una mezcla de agua y un primer disolvente orgánico, obteniéndose un producto intermedio; y
 55 (b) purificar el producto intermedio en una segunda etapa de separación cromatográfica usando como eluyente una mezcla de agua y un segundo disolvente orgánico, obteniéndose el producto de AGPI, en el que el segundo disolvente orgánico es diferente del primer disolvente orgánico y tiene un índice de polaridad que difiere del índice de polaridad del primer disolvente orgánico en entre 0,1 y 20;

60 en el que el producto de AGPI es distinto de un AGPI C18, un mono-, di- o tri-glicérido de AGPI C18, o un éster de alquilo de AGPI C18.

Más normalmente, el producto de AGPI no es un AGPI C18 ni un derivado de AGPI C18. Los AGPI C18 típicos incluyen ácido linoleico (C18:2n6), GLA (C18: 3n6) y ALA (C18: 3n3).

65

- Las mezclas de alimentación adecuadas para la separación mediante el proceso de la presente invención pueden obtenerse de fuentes naturales, incluyendo aceites y grasas vegetales y animales, y de fuentes sintéticas, incluyendo los aceites obtenidos de plantas, animales y microorganismos modificados genéticamente, incluyendo las levaduras. Los ejemplos incluyen aceites de pescado, aceites de algas y de microalgas, y aceites vegetales, por ejemplo, aceite de borraja, aceite de *Echium* y aceite de onagra. En una realización, la mezcla de alimentación es un aceite de pescado. En otra realización, la mezcla de alimentación es un aceite de algas. Los aceites de algas son particularmente adecuados cuando el producto de AGPI deseado es EPA y/o DHA. La levadura genéticamente modificada es particularmente adecuada cuando el producto de AGPI deseado es EPA.
- En una realización particularmente preferida, la mezcla de alimentación es un aceite de pescado o materia prima derivada de aceite de pescado. Se ha descubierto ventajosamente que cuando se usa un aceite de pescado o materia prima derivada de aceite de pescado, se puede producir un producto de AGPI de etiléster de EPA o EPA mediante el proceso de la presente invención con una pureza superior al 90 %, preferentemente pureza superior al 95 %, más preferentemente pureza superior al 97 %, incluso más preferentemente pureza superior al 98 % en peso, aún más preferentemente pureza superior al 98,4 % en peso, por ejemplo, de entre el 98 y 99,5 % en peso.
- La mezcla de alimentación puede someterse a un tratamiento químico antes del fraccionamiento mediante el proceso de la invención. Por ejemplo, puede someterse a transesterificación de glicéridos o hidrólisis de glicéridos seguidas, en ciertos casos, por procesos selectivos tales como cristalización, destilación molecular, fraccionamiento de urea, extracción con nitrato de plata u otras soluciones de sales metálicas, yodolactonización o fraccionamiento de fluidos supercríticos. Como alternativa, una mezcla de alimentación puede usarse directamente sin ninguna etapa de tratamiento inicial.
- Las mezclas de alimentación normalmente contienen el producto de AGPI y al menos un componente más polar y al menos un componente menos polar. Los componentes menos polares tienen una adherencia más fuerte al adsorbente usado en el proceso de la presente invención que el producto de AGPI. Durante la operación, dichos componentes menos polares normalmente se mueven con la fase adsorbente sólida con preferencia a la fase eluyente líquida. Los componentes más polares tienen una adherencia más débil al adsorbente usado en el proceso de la presente invención que el producto de AGPI. Durante la operación, los componentes más polares normalmente se mueven con la fase eluyente líquida con preferencia a la fase adsorbente sólida. En general, los componentes más polares se separarán en una corriente de refinado, y los componentes menos polares se separarán en una corriente de extracto.
- La mezcla de alimentación normalmente contiene el producto de AGPI y al menos una impureza de ácido graso C18 como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, más normalmente, la mezcla de alimentación contiene el producto de AGPI y al menos un ácido graso C18 y/o un derivado del mismo. Los derivados de ácidos grasos C18 típicos son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI. Preferentemente, la mezcla de alimentación contiene el producto de AGPI y al menos una impureza de ácido graso C18 escogida entre ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9), ácido vaccénico (C18:1n7), ácido linoleico (C18:2n6), ácido gamma-linolénico/GLA (C18:3n6), ácido alfa-linolénico (C18:3n3) y ácido estearidónico/SDA (C18:4n3) y sus derivados.
- Preferentemente, la mezcla de alimentación comprende (i) el producto de AGPI, y/o un mono-, di- o tri-glicérido del producto de AGPI y/o un éster de alquilo C₁-C₄ del producto de AGPI; y (ii) ALA y/o un mono-, di- o tri-glicérido de ALA y/o un éster de alquilo C₁-C₄ de ALA.
- Preferentemente, la mezcla de alimentación comprende (i) el producto de AGPI, y/o un mono-, di- o tri-glicérido del producto de AGPI y/o un éster de alquilo C₁-C₄ del producto de AGPI, y (ii) GLA y/o un mono-, di- o tri-glicérido de GLA y/o un éster de alquilo C₁-C₄ de GLA.
- Más preferentemente, la mezcla de alimentación comprende (i) el producto de AGPI, y/o un mono-, di- o tri-glicérido del producto de AGPI y/o un éster de alquilo C₁-C₄ del producto de AGPI; y (ii) ALA y/o GLA y/o un mono-, di- o tri-glicérido de ALA y/o un mono-, di- o tri-glicérido de GLA y/o un éster de alquilo C₁-C₄ de ALA y/o un éster de alquilo C₁-C₄ de GLA.
- En realizaciones en las que el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas de ácido graso C18 especificadas anteriormente, la mezcla de alimentación normalmente contiene las impurezas de ácido graso C18 especificadas. Por lo tanto, es una ventaja particular de la presente invención que la cantidad de impurezas de ácido graso C18 presentes en una mezcla de alimentación puede reducirse a un nivel bajo mediante el proceso de la presente invención. Por ejemplo, cuando el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de ALA, mono-, di- y tri-glicéridos de ALA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de ALA, la mezcla de alimentación normalmente contiene ALA, mono-, di- y tri-glicéridos de ALA y/o ésteres de alquilo C₁-C₄ de ALA. Cuando el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de GLA, mono-, di- y tri-glicéridos de GLA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de GLA, la mezcla de alimentación normalmente contiene GLA, mono-, di- y tri-glicéridos de GLA y/o ésteres de alquilo C₁-C₄ de GLA. Cuando el producto de AGPI contiene menos de 1 % en peso de ácidos grasos C18, mono-, di- y tri-glicéridos de ácido graso C18 y ésteres de alquilo de ácidos grasos C18, la mezcla de alimentación normalmente contiene ácidos grasos C18, mono-, di- y tri-glicéridos de ácido graso C18 y ésteres de alquilo de ácidos grasos C18.

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

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

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

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

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

Una mezcla de alimentación típica para preparar EPA (EE) concentrado mediante el proceso de la presente invención comprende 50-75 % de EPA (EE), 0-1 % de DHA (EE) y otros componentes, incluyendo otros ácidos grasos ω -3 y ω -6 esenciales.

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

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

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

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

40 El proceso de la presente invención implica al menos dos etapas de separación cromatográfica, en el que se usa una mezcla de agua y un disolvente orgánico diferente como eluyente en cada etapa. La primera y segunda etapa de separación se llevan a cabo usando mezclas de agua, y el primer y segundo disolvente orgánico respectivamente.

45 Por lo general, ningún eluyente se encuentra en un estado supercrítico. Por lo general, ambos eluyentes son líquidos.

El primer y el segundo disolvente orgánico se escogen normalmente de entre alcoholes, éteres, ésteres, cetonas y nitrilos. Se prefieren los alcoholes y los nitrilos.

50 Los disolventes de alcohol son muy conocidos por el experto en la materia. Los alcoholes normalmente son alcoholes de cadena corta. Los alcoholes son normalmente de fórmula ROH, en la que R es un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. El grupo alquilo C₁-C₆ preferentemente no está sustituido. Los ejemplos de alcoholes incluyen metanol, etanol, *n*-propanol, *i*-propanol, *n*-butanol, *i*-butanol, *s*-butanol y *t*-butanol. Se prefieren el metanol y el etanol. Se prefiere más el metanol.

60 Los disolventes de éter son muy conocidos por los expertos en la materia. Los éteres son normalmente éteres de cadena corta. Los éteres normalmente son de fórmula R-O-R', en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. El grupo alquilo C₁-C₆ preferentemente no está sustituido. Los éteres preferidos incluyen dietiléter, diisopropiléter y metil-*t*-butiléter (MTBE).

Los disolventes de éster son muy conocidos por los expertos en la materia. Los ésteres son normalmente ésteres de cadena corta. Los ésteres normalmente son de fórmula R-(C=O)O-R', en la que R y R' son iguales o diferentes y representan un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado. Los ésteres preferidos incluyen metilacetato y etilacetato

65

ES 2 671 695 T3

Los disolventes de cetona son muy conocidos por el experto en la materia. Las cetonas normalmente son cetonas de cadena corta. Las cetonas normalmente son 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 preferentemente no está sustituido. Las cetonas preferidas incluyen acetona, metiletilcetona y metilisobutilcetona (MIBK).

5 Los disolventes de nitrilo son muy conocidos por 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 preferentemente no está sustituido. Los nitrilos preferidos incluyen acetonitrilo.

10 El segundo disolvente orgánico es diferente del primer disolvente orgánico.

El índice de polaridad (P') de un disolvente es una medida muy conocida de la polaridad de un disolvente. Una cifra de índice de polaridad más alta indica un disolvente más polar. El índice de polaridad normalmente se determina midiendo la capacidad de un disolvente para interactuar con diversos solutos de ensayo. Más normalmente, el índice de polaridad (P') de un disolvente es como se define en Burdick y Jackson, "Solvent Guide" (AlliedSignal, 1997). Burdick y Jackson clasifican los disolventes por referencia a un índice numérico que clasifica los disolventes de acuerdo con su diferente polaridad. El índice de Burdick y Jackson se basa en la estructura de los disolventes.

20 En la siguiente tabla, se establece el índice de polaridad (P') de una variedad de disolventes comunes conforme a Burdick y Jackson.

Disolvente	Índice de polaridad (P')
Pentano	0,0
1,1,2-Triclorotrifluoroetano	0,0
Ciclopentano	0,1
Heptano	0,1
Hexano	0,1
Iso-octano	0,1
Éter de petróleo	0,1
Ciclohexano	0,2
Cloruro de <i>n</i> -butilo	1,0
Tolueno	2,4
Metil- <i>t</i> -butiléter	2,5
<i>o</i> -Xileno	2,5
Clorobenceno	2,7
<i>o</i> -Diclorobenceno	2,7
Etiléter	2,8
Diclorometano	3,1
Dicloruro de etileno	3,5
Alcohol <i>n</i> -butílico	3,9
Alcohol isopropílico	3,9
Acetato de <i>n</i> -butilo	4,0
Alcohol isobutílico	4,0
Metilisoamilcetona	4,0
Alcohol <i>n</i> -propílico	4,0
Tetrahidrofurano	4,0
Cloroformo	4,1
Metilisobutilcetona	4,2

Disolvente	Índice de polaridad (P')
Acetato de etilo	4,4
Metil- <i>n</i> -propil-cetona	4,5
Metiletilcetona	4,7
1,4-Dioxano	4,8
Acetona	5,1
Metanol	5,1
Etanol	5,2
Piridina	5,3
2-Metoxietanol	5,5
Acetonitrilo	5,8
Carbonato de propileno	6,1
<i>N,N</i> -Dimetilformamida	6,4
Acetamida de dimetilo	6,5
<i>N</i> -Metilpirrolidona	6,7
Dimetilsulfóxido	7,2
Agua	10,2

El segundo disolvente orgánico tiene un índice de polaridad que difiere del índice de polaridad del primer disolvente orgánico en entre 0,1 y 2,0. Por lo tanto, cuando el índice de polaridad del primer disolvente orgánico es P1, el índice de polaridad del segundo disolvente orgánico es P2, $|P1-P2|$ es de 0,1 a 2,0.

5 Por lo general, el segundo disolvente orgánico tiene un índice de polaridad que difiere del índice de polaridad del primer disolvente orgánico en al menos 0,2, preferentemente al menos 0,3, más preferentemente al menos 0,4, aún más preferentemente al menos 0,5 y aún más preferentemente al menos 0,6.

10 Por lo general, el segundo disolvente orgánico tiene un índice de polaridad que difiere del índice de polaridad del primer disolvente orgánico en, como máximo, 1,8, preferentemente como máximo 1,5, más preferentemente como máximo 1,3, todavía más preferentemente, como máximo 1,0, y aún más preferentemente, como máximo, 0,8.

15 Preferentemente, el segundo disolvente orgánico tiene un índice de polaridad que difiere del índice de polaridad del primer disolvente orgánico en entre 0,2 y 1,8, más preferentemente en entre 0,3 y 1,5, aún más preferentemente en entre 0,4 y 1,3, aún más preferentemente en entre 0,5 y 1,0, y lo más preferentemente en entre 0,6 y 0,8. Por lo general, el primer y el segundo disolvente orgánico son miscibles con agua. Más normalmente, el primer y el segundo disolvente orgánico tienen un índice de polaridad de 3,9 o superior. Preferentemente, el primer y el segundo disolvente orgánico se escogen entre tetrahidrofurano, alcohol isopropílico, alcohol *n*-propílico, metanol, etanol, acetonitrilo, 1,4-dioxano, *N,N*-dimetilformamida y dimetilsulfóxido.

20 Por lo general, la proporción de primer disolvente orgánico:agua es de 99,9:0,1 a 75:25 partes en volumen, preferentemente de 99,5:0,5 a 80:20 partes en volumen. Si el primer disolvente orgánico es metanol, la proporción de metanol:agua normalmente es de 99,9:0,1 a 85:15 partes en volumen, preferentemente de 99,5:0,5 a 88:12 partes en volumen. Si el primer disolvente orgánico es acetonitrilo, la proporción de acetonitrilo:agua es normalmente de 99:1 a 75:25 partes en volumen, preferentemente de 96:4 a 80:20 partes en volumen.

30 Por lo general, la proporción de segundo disolvente orgánico:agua es de 99,9:0,1 a 75:25 partes en volumen, preferentemente de 93:7 a 85:15 partes en volumen. Si el segundo disolvente orgánico es metanol, la proporción de metanol:agua normalmente es de 95:5 a 85:15 partes en volumen, preferentemente de 93:7 a 90:10 partes en volumen. Si el segundo disolvente orgánico es acetonitrilo, la proporción de acetonitrilo:agua normalmente es de 90:10 a 80:20 partes en volumen, preferentemente de 88:12 a 85:15 partes en volumen.

35 Por lo general, uno de entre el primer y el segundo disolvente orgánico es acetonitrilo.

Por lo general, uno de entre el primer y el segundo disolvente orgánico es metanol.

Preferentemente, el primer y el segundo disolvente orgánico se seleccionan entre acetonitrilo y metanol. Por lo tanto, es preferible que (i) el primer disolvente orgánico sea metanol y el segundo disolvente orgánico sea acetonitrilo; o (ii) que el primer disolvente orgánico sea acetonitrilo y el segundo disolvente orgánico sea metanol.

5 Más preferentemente, el primer disolvente orgánico es metanol y el segundo disolvente orgánico es acetonitrilo; y (a) la proporción de metanol:agua es de 99,9:0,1 a 85:15 partes en volumen, preferentemente de 99,5:0,5 a 88:12; y/o (b) la proporción de acetonitrilo: agua es de 90:10 a 80:20 partes en volumen, preferentemente de 88:12 a 85:15 partes en volumen. En ciertas realizaciones, es preferible que (a) la proporción de metanol:agua sea de 91: 9 a 93:7 partes en volumen, y/o (b) la proporción de acetonitrilo:agua sea de 86:14 a 88:12 partes en volumen. Como alternativa, el primer disolvente orgánico es acetonitrilo y el segundo disolvente orgánico es metanol; y (a) la proporción de acetonitrilo:agua es de 99:1 a 75:25 partes en volumen, preferentemente de 96:4 a 80:20 partes en volumen; y/o (b) la proporción de metanol:agua es de 95:5 a 85:15 partes en volumen, preferentemente de 93:7 a 90:10 partes en volumen. En ciertas realizaciones, es preferible que (a) la proporción de acetonitrilo:agua sea de 86:14 a 88:12 partes en volumen; y/o (b) la proporción de metanol:agua sea de 87:13 a 89:11 partes en volumen.

15 Cada etapa de separación cromatográfica normalmente implica hacer pasar una mezcla de alimentación a través de uno o más columnas cromatográficas. Por lo tanto, la primera etapa de separación cromatográfica normalmente comprende hacer pasar la mezcla de alimentación a través de una o más columnas cromatográficas que contienen, como eluyente, la mezcla de agua y el primer disolvente orgánico. Por lo general, la segunda etapa de separación cromatográfica comprende hacer pasar el producto intermedio a través de una o más columnas cromatográficas que contienen, como eluyente, la mezcla de agua y el primer disolvente orgánico. Preferentemente, la primera etapa de separación cromatográfica comprende hacer pasar la mezcla de alimentación a través de una o más columnas cromatográficas que contienen, como eluyente, la mezcla de agua y el primer disolvente orgánico; y la segunda etapa de separación cromatográfica comprende hacer pasar el producto intermedio a través de una o más columnas cromatográficas que contienen, como eluyente, la mezcla de agua y el primer disolvente orgánico. En el proceso reivindicado, se puede usar cualquier columna cromatográfica conocida.

20 La una o más columnas cromatográficas normalmente contienen un adsorbente. En el proceso de la presente invención, se pueden usar adsorbentes convencionales conocidos en la técnica para técnicas de separación cromatográfica. Cuando se usa más de una columna cromatográfica, cada columna cromatográfica puede contener el mismo o diferente adsorbente. Por lo general, cuando se usa más de una columna cromatográfica, cada columna contiene el mismo adsorbente. Los ejemplos de dichos materiales comúnmente usados son perlas poliméricas, preferentemente poliestireno reticulado con DVB (divinilbenceno); y gel de sílice, preferentemente gel de sílice unido en fase inversa con alcanos C8 o C18, en especial C18. Se prefiere el gel de sílice en fase inversa unido C18. El adsorbente usado en el proceso de la presente invención es preferentemente no polar.

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

40 Las dimensiones de las columnas usadas no se limitan en particular, y dependerán en cierta medida del volumen de la mezcla de alimentación que se vaya a purificar. Un experto podría fácilmente determinar columnas de tamaño apropiado para su uso. El diámetro de cada columna está normalmente entre 10 y 1.000 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 es de entre 10 y 300 cm, preferentemente de entre 10 y 200 cm, más preferentemente de entre 25 y 150 cm, incluso más preferentemente de entre 70 y 110 cm, y lo más preferentemente de entre 80 y 100 cm.

50 La primera etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real, y la segunda etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo en un aparato de cromatografía de lecho estacionario. El número de columnas cromatográficas usadas en cada etapa de separación no se limita a uno en particular.

60 Por lo general, el proceso de la invención se lleva a cabo a temperatura ambiente o una temperatura superior a la temperatura ambiente. Preferentemente, el proceso se lleva a cabo a una temperatura superior a la temperatura ambiente. La primera y la segunda etapa de separación pueden llevarse a cabo a la misma temperatura o a una temperatura diferente, preferentemente a la misma temperatura.

65

Por lo general, la temperatura de al menos una de las columnas cromatográficas a través de la que se hace pasar la mezcla de alimentación es superior a la temperatura ambiente. Más normalmente, la temperatura de todas las columnas cromatográficas usadas es superior a la temperatura ambiente.

5 Por lo tanto, normalmente, cada etapa de separación cromatográfica que implica en hacer pasar una mezcla de alimentación a través de una o más columnas cromatográficas, y la temperatura de al menos una de esas columnas cromatográficas es superior a la temperatura ambiente. Más normalmente, la temperatura de todas las columnas cromatográficas usadas es superior a la temperatura ambiente.

10 Como se apreciará, si al menos una columna cromatográfica está a una temperatura superior a la temperatura ambiente, es el interior de la columna lo que es importante en el proceso de separación. Por lo tanto, es normalmente el eluyente y el adsorbente del interior de la columna cromatográfica lo que puede estar a la temperatura superior a la temperatura ambiente. Por supuesto, es posible alcanzar la temperatura requerida dentro de al menos una columna cromatográfica por medios internos (por ejemplo, calentando el eluyente y/o la mezcla de alimentación) y/o externos (por ejemplo, calentando el exterior de la columna cromatográfica mediante cualquier medio convencional conocido).

15 Por lo general, se puede obtener una temperatura elevada calentando el eluyente y/o la mezcla de alimentación. Esto tiene el efecto de calentar las columnas internamente.

20 Por lo tanto, la temperatura de al menos una de las columnas cromatográficas a través de la que se hace pasar la mezcla de alimentación también se puede medir como la temperatura del eluyente. Por lo general, por lo tanto, la temperatura del eluyente usado en la primera y/o segunda etapas de separación cromatográfica es superior a la temperatura ambiente.

25 Como alternativa, la temperatura requerida de al menos una de las columnas cromatográficas se puede conseguir mediante el calentamiento de las columnas. El calentamiento se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, una camisa de calefacción eléctrica, una camisa de agua caliente o una bobina o mediante lámparas de calor radiante. Normalmente se calienta el interior y/o exterior de una o más columnas cromatográficas. La temperatura requerida de al menos una de las columnas cromatográficas se puede lograr calentando las columnas y/o el eluyente de disolvente orgánico acuoso, y/o la mezcla de alimentación.

30 Por lo general, la temperatura superior a la temperatura ambiente es superior a 30 °C, preferentemente superior a 35 °C, más preferentemente superior a 40 °C, incluso más preferentemente superior a 45 °C, incluso más preferentemente superior a 50 °C, incluso más preferentemente superior a 55 °C, e incluso más preferentemente superior a 57 °C. En ciertas realizaciones, es útil una temperatura de 56 °C.

35 Por lo general, la temperatura superior a la temperatura ambiente es de hasta 100 °C, preferentemente de hasta 95 °C, más preferentemente de hasta 90 °C, incluso más preferentemente de hasta 85 °C, incluso más preferentemente de hasta 80 °C, todavía más preferentemente de hasta 75 °C, e incluso más preferentemente de hasta 70 °C.

Así pues, los intervalos de temperatura típicos son de 30 a 100 °C, de 35 a 95 °C, de 40 °C a 90 °C, de 45 °C a 85 °C, de 50 a 80 °C, de 55 a 75 °C o de 57 a 70 °C.

40 Los intervalos de temperatura preferidos son de 40 a 70 °C, preferentemente de 50 a 67 °C, más preferentemente de 56 a 65 °C, aún más preferentemente de 57 a 63 °C.

45 En ciertas etapas de separación, se puede usar una sola columna cromatográfica, preferentemente una sola columna cromatográfica estacionaria. La separación de esta manera normalmente se lleva a cabo usando aparatos de cromatografía de lecho estacionario conocidos. La separación de esta manera se puede denominar cromatografía de "lecho estacionario". Por lo general, la segunda etapa de separación cromatográfica implica al menos una, por ejemplo, una etapa de cromatografía de "lecho estacionario".

50 En otras etapas de separación, se usa más de una columna cromatográfica. Esto puede implicar hacer pasar la mezcla de alimentación a través de dos o más columnas cromatográficas, que pueden ser iguales o diferentes, dispuestas en serie o en paralelo. El número de columnas usadas en dichas etapas no está limitado en particular, pero, en general, no supera las treinta columnas.

55 Una separación particular en la que se usan múltiples columnas cromatográficas es la cromatografía de lecho móvil simulado o real.

60 Los expertos en la materia conocen bien los aparatos de cromatografía de lecho móvil simulado y real. Se puede utilizar cualquier aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real conocido para los fines del método de la presente invención, siempre que el aparato se use de acuerdo con el proceso de la presente invención. Todos los aparatos descritos en los documentos US 2.985.589, US 3.696.107, US 3.706.812, US 3.761.533, FR-A-2103302, FR-A-2651148, FR-A-2651149, US 6.979.402, US 5.069.883 y US 4.764.276 pueden usarse si se configuran de

acuerdo con el proceso de la presente invención. También se pueden emplear procesos SMB como los desvelados, por ejemplo, en el documento WO-A-2011/080503.

5 La segunda etapa de separación se lleva a cabo usando un aparato de cromatografía de lecho estacionario, y la primera etapa de separación se lleva a cabo usando uno o más aparatos de cromatografía de lecho móvil simulado o real como se analiza en el presente documento.

10 La primera etapa de separación cromatográfica comprende introducir la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real, y la segunda etapa de separación cromatográfica comprende introducir el producto intermedio en un aparato de cromatografía de lecho estacionario. Por lo tanto, la primera etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo usando un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real y la segunda etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo usando un aparato de cromatografía de lecho estacionario.

15 Dicha primera etapa de separación cromatográfica puede consistir en una sola separación cromatográfica, o dos o más separaciones cromatográficas, con la condición de que cada separación use como eluyente una mezcla de agua y el primer disolvente orgánico.

20 Dicha segunda etapa de separación cromatográfica puede consistir en una sola separación cromatográfica, o dos o más separaciones cromatográficas, con la condición de que cada separación use como eluyente una mezcla de agua y el segundo disolvente orgánico.

25 Por lo general, la primera etapa de separación cromatográfica puede implicar el uso de una sola etapa de separación de SMB usando un aparato convencional, tal como, por ejemplo, el representado en la Figura 1. La separación de esta manera se puede denominar SMB "de una sola pasada". Por lo general, la primera etapa de separación cromatográfica implica al menos una, por ejemplo, una etapa de SMB de "una sola pasada".

30 Como alternativa, la primera etapa de separación cromatográfica puede implicar el uso de múltiples separaciones de SMB.

35 En una realización, la primera etapa de separación cromatográfica puede llevarse a cabo como se describe en los documentos WO-A-2011/080503 y PCT/GB2012/051591. Las condiciones de proceso preferidas especificadas en los documentos WO-A-2011/080503 y PCT/GB2012/051591 son condiciones de proceso preferidas para esta realización.

40 El proceso desvelado en los documentos WO-A-2011/080503 y PCT/GB2012/051591 implica la introducción de una corriente de entrada a un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas cromatográficas unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, en los que el aparato tiene una pluralidad de zonas que comprenden al menos una primera zona y una segunda zona, teniendo cada zona una corriente de extracto y una corriente de refinado de la que se puede recoger líquido de dicha pluralidad de columnas cromatográficas unidas; y en los que (a) una corriente de refinado que contiene el producto de AGPI junto con componentes más polares se recoge de una columna de la primera zona y se introduce a una columna no adyacente en la segunda zona; y/o (b) una corriente de extracto que contiene el producto de AGPI junto con componentes menos polares se recoge de una columna en la segunda zona y se introduce en una columna no adyacente de la primera zona, siendo dicho AGPI separado de diferentes componentes de la corriente de entrada de cada zona. La separación de esta manera se puede denominar proceso de SMB de "doble pasada".

50 En este proceso de SMB de "doble pasada", el término "zona" se refiere a una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, y que tienen uno o más puntos de inyección para un flujo de entrada, uno o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico, una corriente de extracción de refinado desde la que puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas, y una corriente de extracción de extracto de la que puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas. Por lo general, cada zona tiene solo un punto de inyección para una corriente de entrada. En una realización, cada zona tiene solo un punto de inyección para el eluyente de disolvente orgánico acuoso. En otra realización, cada zona tiene dos o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico. En este proceso de SMB de "doble pasada", la referencia a una "corriente de entrada" se refiere a la mezcla de alimentación cuando el proceso de SMB descrito anteriormente se usa en la primera etapa de separación cromatográfica, y se refiere al producto intermedio cuando el proceso de SMB descrito anteriormente se usa en la segunda etapa de separación cromatográfica.

60 En este proceso de SMB de "doble pasada", la referencia a un "disolvente orgánico acuoso" se refiere a la mezcla de agua y el primer disolvente orgánico cuando el proceso de SMB anteriormente descrito se usa en la primera etapa de separación cromatográfica, y se refiere a la mezcla de agua y el segundo disolvente orgánico cuando el proceso de SMB descrito anteriormente se usa en la segunda etapa de separación cromatográfica.

65

5 El término "refinado" es muy conocido por el experto en la materia. En el contexto de la cromatografía de lecho móvil real y simulado, se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase eluyente líquida en comparación con la fase adsorbente sólida. Por lo tanto, una corriente de refinado está normalmente enriquecida en componentes más polares, y empobrecida en componentes menos polares en comparación con una corriente de entrada.

10 El término "extracto" es muy conocido por el experto en la materia. En el contexto de la cromatografía de lecho móvil real y simulado, se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase adsorbente sólida en comparación con la fase eluyente líquida. Por lo tanto, una corriente de extracto normalmente está enriquecida en componentes menos polares, y empobrecida en componentes más polares en comparación con una corriente de entrada.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "no adyacente" se refiere a las columnas, por ejemplo, en 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.

20 El proceso de SMB de "doble pasada" se ilustra en la figura 11. Una corriente F de entrada que comprende el producto de AGPI (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se introduce en la parte superior de la columna 5 en la primera zona. El desorbente de disolvente orgánico acuoso se introduce en la parte superior de la columna 1 de la primera zona. En la primera zona, los componentes menos polares (A) se eliminan como la corriente de extracto E1 de la parte inferior de la columna 2. El producto de AGPI (B) y los componentes más polares (C) se eliminan como la corriente de refinado R1 de la parte inferior de la columna 7. La corriente de refinado R1 se introduce luego en la segunda zona en la parte superior de la columna 12. El desorbente de disolvente orgánico acuoso se introduce en la parte superior de la columna 9 de la segunda zona. En la segunda zona, los componentes más polares (C) se eliminan como la corriente de refinado R2 en la parte inferior de la columna 14. El producto de AGPI (B) se recoge como la corriente de extracto E2 en la parte inferior de la columna 10.

30 En este proceso de SMB de "doble pasada", el disolvente orgánico acuoso normalmente se introduce en la parte superior de la columna 1 de la primera zona.

35 En este proceso de SMB de "doble pasada", el disolvente orgánico acuoso normalmente se introduce en la parte superior de la columna 9 de la segunda zona.

40 En este proceso de SMB de "doble pasada", el flujo de entrada normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 de la primera zona.

45 En este proceso de SMB de "doble pasada", normalmente se recoge una primera corriente de refinado desde la parte inferior de la columna 7 de la primera zona y se introduce en la parte superior de la columna 12 de la segunda zona. La primera corriente de refinado puede recogerse opcionalmente en un recipiente antes de ser introducida en la columna 12.

50 En este proceso de SMB de "doble pasada", normalmente se elimina una primera corriente de extracto de la parte inferior de la columna 2 de la primera zona. La primera corriente de extracto puede recogerse opcionalmente en un recipiente y reintroducirse una porción en la parte superior de la columna 3 de la primera zona. La velocidad de reciclado del líquido recogido a través de la corriente de extracto desde la primera zona de nuevo hasta la primera zona es la velocidad a la que se bombea el líquido desde este recipiente hasta la parte superior de la columna 3.

55 En este proceso de SMB de "doble pasada", normalmente se elimina una segunda corriente de refinado de la parte inferior de la columna 14 de la segunda zona.

60 En este proceso de SMB de "doble pasada", normalmente se recoge una segunda corriente de extracto de la parte inferior de la columna 10 de la segunda zona. Esta segunda corriente de extracto normalmente contiene el producto de AGPI. La segunda corriente de extracto puede recogerse opcionalmente en un recipiente y reintroducirse una fracción en la parte superior de la columna 11 de la segunda zona. La velocidad de reciclado del líquido recogido a través de la corriente de extracto desde la segunda zona de nuevo a la segunda zona es la velocidad a la que se bombea líquido desde este recipiente hasta la parte superior de la columna 11. En este proceso de SMB de "doble pasada", la velocidad a la que se recicla el líquido recogido a través de la corriente de extracto de la primera zona de nuevo a la primera zona es normalmente superior a la velocidad a la que se recicla el líquido recogido a través de la corriente de extracto de la segunda zona de nuevo a la segunda zona. En este proceso de SMB de "doble pasada", el eluyente normalmente es esencialmente el mismo en cada zona.

65 Por lo general, la primera etapa de separación cromatográfica implica al menos uno, por ejemplo, un proceso de SMB de "doble pasada" como se ha definido anteriormente.

En una realización alternativa, la primera etapa de separación cromatográfica puede llevarse a cabo como se describe en la solicitud de patente internacional n.º PCT/GB2012/051596 o PCT/GB2012/051597. Dichas

realizaciones implican:

(i) purificar una corriente de entrada en una primera etapa de SMB en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, obteniéndose un primer producto; y

(ii) purificar el primer producto obtenido en (i) en una segunda etapa de SMB usando un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, obteniéndose un segundo producto; en las que

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

(b) la primera y la segunda etapa de SMB se llevan a cabo en el primer y segundo aparato de cromatografía separado, respectivamente, introduciéndose el primer producto obtenido de la primera etapa de SMB en el segundo aparato de cromatografía, y siendo el producto de AGPI separado de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de SMB. La separación de esta manera se denominará SMB "consecutivo".

Para evitar dudas, si la primera etapa de separación cromatográfica es un proceso de SMB "consecutivo" a lo largo de las líneas anteriores, el eluyente en cada una de las etapas de SMB es una mezcla de agua y el primer disolvente orgánico. En este proceso de SMB "consecutivo", la expresión "aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real" normalmente se refiere a una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, y que tiene uno o más puntos de inyección para una corriente de entrada, uno o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico, una corriente de extracción de refinado de la que puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas, y una corriente de extracción de extracto de la que puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas.

El aparato de cromatografía usado en este proceso de SMB "consecutivo" tiene una sola serie de columnas de cromatografía unidas en serie que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso. Por lo general, cada una de las columnas de cromatografía está unida a las dos columnas del aparato adyacente a esa columna. Por lo tanto, la salida de una columna dada de la serie está conectada a la entrada de la columna adyacente de la serie, que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente de la serie. Por lo tanto, el eluyente puede fluir alrededor de la serie de columnas de cromatografía unidas. Por lo general, ninguna de las columnas de cromatografía está unida a columnas no adyacentes del aparato.

En este proceso de SMB "consecutivo", la referencia a una "corriente de entrada" se refiere a la mezcla de alimentación cuando el proceso de SMB descrito anteriormente se usa en la primera etapa de separación cromatográfica.

En este proceso de SMB "consecutivo", la referencia a un "disolvente orgánico acuoso" se refiere a la mezcla de agua y el primer disolvente orgánico cuando el proceso de SMB "consecutivo" anteriormente descrito se usa en la primera etapa de separación cromatográfica. El disolvente orgánico usado en la primera y segunda etapa de SMB es el mismo. La proporción de disolvente orgánico:agua usada en la primera y segunda etapa de SMB puede ser la misma o diferente.

En este proceso de SMB "consecutivo", la referencia a un "segundo producto" se refiere al producto intermedio cuando el proceso de SMB descrito anteriormente se usa en la primera etapa de separación cromatográfica.

Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", cada aparato solo tiene un punto de inyección para una corriente de entrada. En una realización, cada aparato solo tiene un punto de inyección para el eluyente de disolvente orgánico acuoso. En otra realización, cada aparato tiene dos o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico.

El término "refinado" es muy conocido por el experto en la materia. En el contexto de la cromatografía de lecho móvil real y simulado, se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase eluyente líquida en comparación con la fase adsorbente sólida. Así pues, una corriente de refinado normalmente está enriquecida en componentes más polares, y empobrecida en componentes menos polares en comparación con una corriente de alimentación.

El término "extracto" es muy conocido por el experto en la materia. En el contexto de la cromatografía de lecho móvil real y simulado, se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase adsorbente sólida en comparación con la fase eluyente líquida. Por lo tanto, una corriente de extracto normalmente está enriquecida en componentes más polares y empobrecida en componentes más polares en comparación con una corriente de alimentación.

El número de columnas usadas en cada aparato en este proceso de SMB "consecutivo" no se limita en particular. El experto puede determinar fácilmente un número apropiado de columnas que se vaya a usar. El número de columnas normalmente es de 4 o más, preferentemente de 6 o más, más preferentemente de 8 o más, por ejemplo, de 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 columnas. En una realización preferida, se usan 5 o 6 columnas, más preferentemente 6 columnas. En otra realización preferida, se usan 7 u 8 columnas, más preferentemente 8 columnas. Por lo general, no hay más de 25 columnas, preferentemente no más de 20, más preferentemente no más de 15.

En este proceso de SMB "consecutivo", los aparatos cromatográficos usados en la primera y segunda etapa de separación normalmente contienen el mismo número de columnas. Para ciertas aplicaciones, pueden tener un número de columnas diferente.

En este proceso de SMB "consecutivo", las columnas de los aparatos cromatográficos usados en la primera y segunda etapa de separación normalmente tienen dimensiones idénticas, pero, para ciertas aplicaciones, pueden tener dimensiones diferentes.

Los caudales hacia la columna están limitados por las presiones máximas a través de la serie de columnas, y dependerán de las dimensiones de la columna y del tamaño de partícula de las fases sólidas. Un experto en la materia será capaz de establecer fácilmente el caudal necesario para cada dimensión de columna con el fin de garantizar una desorción eficaz. Las columnas de mayor diámetro, en general, necesitarán flujos más altos para mantener el flujo lineal a través de las columnas.

En este proceso de SMB "consecutivo", para los tamaños de columna típicos esbozados anteriormente, el caudal de eluyente hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es de 1 a 4,5 l/min, preferentemente de 1,5 a 2,5 l/min. Por lo general, el caudal del extracto desde el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es de 0,1 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,5 a 2,25 l/min. En las realizaciones en las que parte del extracto de la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la primera etapa de separación de SMB, el caudal reciclado normalmente es de 0,7 a 1,4 l/min, preferentemente de aproximadamente 1 l/min. Por lo general, el caudal del refinado desde el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es de 0,2 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,3 a 2,0 l/min. En las realizaciones en las que parte del refinado de la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la primera etapa de separación de SMB, el caudal de reciclado normalmente es de 0,3 a 1,0 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,5 l/min. Por lo general, el caudal de introducción de la mezcla de entrada en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es de 5 a 150 ml/min, preferentemente de 10 a 100 ml/min, más preferentemente de 20 a 60 ml/min.

En este proceso de SMB "consecutivo", para los tamaños de columna típicos esbozados anteriormente, el caudal de eluyente hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB normalmente es de 1 a 4 l/min, preferentemente de 1,5 a 3,5 l/min. Por lo general, el caudal del extracto desde el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB es de 0,5 a 2 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,9 l/min. En las realizaciones en las que parte del extracto de la segunda etapa de separación de SMB se recicla al aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB, el caudal de reciclado normalmente es de 0,6 a 1,4 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,1 l/min, más preferentemente de aproximadamente 0,9 l/min. Por lo general, el caudal del refinado del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB es de 0,5 a 2,5 l/min, preferentemente de 0,7 a 1,8 l/min, más preferentemente de aproximadamente 1,4 l/min. En las realizaciones en las que parte del refinado de la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB, el caudal de reciclado normalmente es de 0,3 a 1,0 l/min, preferentemente de aproximadamente 0,5 l/min.

Como apreciará el experto, las referencias a las velocidades a las que se recoge o se retira líquido a través de las diversas corrientes de extracto y refinado se refieren a volúmenes de líquido retirados en una cantidad de tiempo, normalmente en l/minuto. De igual manera, las referencias a las velocidades a las que el líquido se recicla hacia un aparato, normalmente hacia una columna adyacente del aparato, se refieren a volúmenes de líquido reciclado en una cantidad de tiempo, normalmente en l/minuto.

En este proceso de SMB "consecutivo", se prefiere la cromatografía de lecho móvil real.

La duración de la etapa, es decir, el tiempo entre el desplazamiento de los puntos de inyección de la corriente de entrada y el eluyente, y los diversos puntos de extracción de las fracciones recogidas, no se limita en particular, y dependerá del número y de las dimensiones de las columnas usadas y del caudal a través del aparato. El experto puede determinar fácilmente las duraciones de las etapas apropiadas para su uso en el proceso de la presente invención. La duración de la etapa normalmente es de 100 a 1.000 segundos, preferentemente de 200 a 800 segundos, más preferentemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 750 segundos. En algunas realizaciones, es apropiada una duración de la etapa de 100 a 400 segundos, preferentemente de 200 a 300 segundos, más preferentemente de aproximadamente 250 segundos. En otras realizaciones, es apropiada una duración de la etapa de 600 a 900 segundos, preferentemente de 700 a 800 segundos, más preferentemente de aproximadamente 750 segundos.

El proceso de SMB "consecutivo" comprende una primera y una segunda etapa de separación.

Estas dos etapas se pueden llevar a cabo fácilmente en un solo aparato cromatográfico. Por lo tanto, en una realización, (a) la primera y la segunda etapa de separación de SMB se llevan a cabo consecutivamente en el mismo aparato cromatográfico, recuperándose el primer producto entre la primera y la segunda etapa de separación de SMB, y ajustándose las condiciones del proceso en el aparato cromatográfico entre la primera y la segunda etapa de separación de SMB, de manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación. Una realización preferida de este proceso de SMB "consecutivo" se muestra como Figura 10a. Así pues, la primera etapa de separación de SMB (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato de SMB que tiene 8 columnas. Entre la primera y la segunda etapa de separación de SMB, se recupera el primer producto en, por ejemplo, un recipiente, se ajustan las condiciones del proceso en el aparato cromatográfico, de manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB. La segunda etapa de separación de SMB (lado derecho) se lleva a cabo entonces en el mismo aparato de SMB que tiene 8 columnas.

En la realización (a), el ajuste de las condiciones del proceso normalmente se refiere al ajuste de las condiciones del proceso en el aparato en su conjunto, es decir, modificando físicamente el aparato de manera que las condiciones sean diferentes. No se refiere simplemente a la reintroducción del primer producto de nuevo en una parte diferente del mismo aparato en el que las condiciones del proceso podrían ser diferentes.

Como alternativa, se pueden usar un primer y un segundo aparato cromatográfico separados en la primera y segunda etapa de separación de SMB. Por lo tanto, en otra realización, (b) la primera y segunda etapa de separación de SMB se llevan a cabo en un primer y un segundo aparato cromatográfico separados, respectivamente, introduciéndose el primer producto obtenido de la primera etapa de separación de SMB en el segundo aparato cromatográfico, y separándose el producto de AGPI de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB.

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

Por lo tanto, en la realización (b) en caso de que las dos etapas de separación de SMB se lleven a cabo consecutivamente, la primera y segunda etapa de separación de SMB se llevan a cabo consecutivamente en un primer y segundo aparato cromatográficos separados, recuperándose el primer producto entre la primera y la segunda etapa de separación de SMB y ajustándose las condiciones del proceso en el primer y segundo aparato cromatográfico de SMB de manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación. Una realización preferida de este proceso de separación de SMB "consecutivo" se muestra como la Figura 10b. Por lo tanto, la primera etapa de separación de SMB (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato de SMB que tiene 8 columnas, una a ocho. Entre la primera y la segunda etapa de separación de SMB, se recupera el primer producto, por ejemplo, en un recipiente, y después se introduce en un segundo aparato de SMB separado. La segunda etapa de separación de SMB (lado derecho) se lleva a cabo en el segundo aparato de SMB separado que tiene 8 columnas, nueve a dieciséis. Las condiciones del proceso en los dos aparatos cromatográficos se ajustan de manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB. En la realización (b), en caso de que las dos etapas de separación de SMB se lleven a cabo simultáneamente, la primera y la segunda etapa de separación de SMB se llevan a cabo en un primer y un segundo aparato cromatográfico separados, respectivamente, introduciéndose el primer producto en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB, y ajustándose las condiciones del proceso del primer y segundo aparato cromatográfico de modo que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB. Una realización preferida de este proceso de separación de SMB "consecutivo" se muestra como la Figura 10c. Por lo tanto, la primera etapa de separación de SMB (lado izquierdo) se lleva a cabo en un aparato de SMB que tiene 8 columnas, una a ocho. El primer producto obtenido en la primera etapa de separación de SMB se introduce entonces en el segundo aparato cromatográfico separado usado en la segunda etapa de separación de SMB. El primer producto puede pasar de la primera etapa de separación de SMB a la segunda etapa de separación de SMB directa o indirectamente, por ejemplo, a través de un recipiente. La segunda etapa de separación de SMB (lado derecho) se lleva a cabo en el segundo aparato de SMB separado, que tiene 8 columnas, nueve a dieciséis. Las condiciones del proceso de los dos aparatos cromatográficos se ajustan de manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación.

En la realización (b), en caso de que las dos etapas de separación de SMB se lleven a cabo simultáneamente, el eluyente circula por separado en los dos aparatos cromatográficos separados. Por lo tanto, el eluyente no se reparte entre los dos aparatos cromatográficos separados, aparte de qué eluyente pueda estar presente como disolvente en el primer producto que se purifica en la segunda etapa de separación de SMB y que se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. Las columnas cromatográficas no se comparten entre los dos aparatos cromatográficos separados usados en la primera y segunda etapa de separación de SMB.

En este proceso de SMB "consecutivo", tras la obtención del primer producto en la primera etapa de separación de SMB, el eluyente de disolvente orgánico acuoso se puede eliminar parcial o totalmente antes de que el primer

producto se purifique en la segunda etapa de separación de SMB. Como alternativa, el primer producto puede purificarse en la segunda etapa de separación de SMB sin la eliminación de ningún disolvente presente.

5 Como se ha mencionado anteriormente, en este proceso de SMB "consecutivo", el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB. En la realización (a), las condiciones del proceso del aparato de SMB individual usado en ambas etapas de separación de SMB se ajustan entre la primera y la segunda etapa de separación de SMB de manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación. En la realización (b), las condiciones del proceso en los dos aparatos cromatográficos separados usados en la primera y segunda etapa de separación de SMB se ajustan de manera que el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación.

15 Así pues en este proceso de SMB "consecutivo", las condiciones del proceso en la primera y la segunda etapa de separación de SMB varían. Las condiciones del proceso que pueden variar pueden incluir, por ejemplo, el tamaño de las columnas usadas, el número de columnas usadas, el empaquetamiento usado en las columnas, la duración de las etapas del aparato de SMB, la temperatura del aparato, la proporción de agua:disolvente orgánico del eluyente usado en la etapas de separación de los caudales usados en el aparato, en particular, la velocidad de reciclado del líquido recogido a través de las corrientes de extracto o refinado.

20 Preferentemente, en este proceso de SMB "consecutivo", las condiciones del proceso que se pueden variar son la proporción de agua:disolvente orgánico del eluyente usado en las etapas de separación de SMB y/o la velocidad de reciclado del líquido recogido a través de las corrientes de extracto o refinado en las etapas de separación de SMB. Ambas de estas opciones se analizan con más detalle a continuación.

25 En este proceso de SMB "consecutivo", el primer producto obtenido en la primera etapa de separación de SMB normalmente está enriquecido en el producto de AGPI en comparación con la corriente de entrada.

30 En este proceso de SMB "consecutivo", el primer producto obtenido en la primera etapa de separación de SMB se introduce luego en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

En este proceso de SMB "consecutivo", el primer producto normalmente se recoge como corriente de refinado o de extracto del aparato cromatográfico usado en el primer proceso de separación de SMB.

35 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", el primer producto se recoge como corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB, y el segundo producto se recoge como corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB. Por lo tanto, la corriente de refinado recogida en la primera etapa de separación de SMB se usa como corriente de entrada en la segunda etapa de separación de SMB. La corriente de refinado recogida en la primera etapa de separación de SMB normalmente contiene el segundo producto junto con componentes más polares.

40 Como alternativa, en este proceso de SMB "consecutivo", el primer producto se recoge como corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB y el segundo producto se recoge como corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB. Por lo tanto, la corriente de extracto recogida en la primera etapa de separación de SMB se usa como corriente de entrada en la segunda etapa de separación de SMB. La corriente de extracto recogida en la primera etapa de separación de SMB normalmente contiene el segundo producto junto con componentes menos polares.

50 En este proceso de SMB "consecutivo", el producto de AGPI se separa de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB. Por lo general, los componentes separados en cada etapa de separación de SMB del proceso de la presente invención tienen distintas polaridades.

55 Preferentemente, en este proceso de SMB "consecutivo", el producto de AGPI se separa de los componentes menos polares de la corriente de entrada en la primera etapa de separación de SMB y el producto de AGPI se separa de los componentes más polares de la corriente de entrada en la segunda etapa de separación de SMB.

60 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", (a) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la primera etapa de separación de SMB; y/o (b) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la primera etapa de separación de SMB; y/o (c) parte de la corriente de extracto del aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB; y/o (d) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB.

65 Preferentemente, en este proceso de SMB "consecutivo", (a) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la primera etapa de

separación de SMB; y

(b) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la primera etapa de separación de SMB; y

5 (c) parte de la corriente de extracto del aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB; y

(d) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en la segunda etapa de separación de SMB.

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

15 En este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto o de refinado en la primera o segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en esa etapa de SMB es la velocidad a la que el líquido recogido a través de esa corriente es devuelto al aparato usado en esa etapa de SMB, normalmente a una columna adyacente, es decir, la columna aguas abajo con respecto al flujo de eluyente en el sistema.

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

25 parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. En este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad de reciclado del extracto en la segunda etapa de separación de SMB es la velocidad a la que el extracto recogido en la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB se introduce en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB, es decir, el caudal de líquido hacia la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

30 En este proceso de SMB "consecutivo", el reciclado de las corrientes de extracto y/o de refinado en la primera y/o la segunda etapa de separación de SMB normalmente se efectúa introduciendo el líquido recogido a través de esa corriente en esa etapa de separación de SMB en un recipiente, y después bombeando una cantidad de ese líquido desde el recipiente hacia el aparato usado en esa etapa de separación de SMB, normalmente hacia una columna adyacente. En este caso, la velocidad de reciclado del líquido recogido a través de una determinada corriente de extracto o de refinado en la primera y/o segunda etapa de separación de SMB, normalmente de vuelta a una columna adyacente, es la velocidad a la que se bombea el líquido fuera del recipiente de vuelta al aparato de cromatografía, normalmente a una columna adyacente.

35 Como apreciará el experto en la materia, en este proceso de SMB "consecutivo", la cantidad de líquido que se introduce en un aparato cromatográfico a través de las corrientes de eluyente y de entrada se equilibra con la cantidad de líquido extraído del aparato y se recicla hacia el aparato.

40 Por lo tanto, en este proceso de SMB "consecutivo", con referencia a la Figura 9, para la corriente de extracto, el caudal de eluyente (desorbente) hacia el/los aparato/s cromatográfico/s usado/s en la primera y segunda etapa de separación de SMB (D) es igual a la velocidad a la que se acumula el líquido recogido a través de la corriente de extracto en esa etapa de separación de SMB en un recipiente (E1 y E2) más la velocidad a la que el extracto se recicla al aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación de SMB en particular (D-E1 y D-E2).

45 En este proceso de SMB "consecutivo", para la corriente de refinado procedente de una etapa de separación de SMB, la velocidad a la que se recicla el extracto hacia el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación de SMB particular (D-E1 y D-E2) más la velocidad a la que se introduce la materia prima en el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación de SMB en particular (F y R1) es igual a la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en esa etapa de separación de SMB en particular se acumula en un recipiente (R1 y R2) más la velocidad a la que el refinado se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación de SMB en particular (D + F - E1 - R1 y D + R1 - E2 - R2).

50 En este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que se acumula el líquido recogido de una determinada corriente de extracto o de refinado procedente de un aparato cromatográfico en un recipiente también puede considerarse como la velocidad neta de retirada de esa corriente de extracto o de refinado de ese aparato cromatográfico.

55 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y de refinado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en

esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB.

5 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y de refinado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en esa etapa de separación se ajusta de modo que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB.

10 Preferentemente, en este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y de refinado en cada etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en esa etapa de separación de SMB se ajusta de modo que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB.

15 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB difiere de la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB y/o la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB difiere de la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

25 La variación de la velocidad a la que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y/o de refinado en la primera o segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato usado en esa etapa particular de separación de SMB tiene el efecto de variar la cantidad de componentes más polares y menos polares presentes en las corrientes de extracto y de refinado. Así pues, por ejemplo, una velocidad de reciclado de extracto inferior da lugar a que menos de los componentes menos polares en esa etapa de separación de SMB sean transportados a la corriente de refinado. Una velocidad de reciclado de extracto superior da lugar a que más de los componentes menos polares en esa etapa de separación de SMB sean transportados a la corriente de refinado.

30 Esto puede observarse, por ejemplo, en la Figura 6. La velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación de SMB (D-E1) afectará al grado en que cualquiera de los componentes A será transportado a la corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB (R1).

35 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. Preferentemente, se recoge una corriente de refinado que contiene el segundo producto junto con componentes más polares de la primera etapa de separación de SMB y se purifica en una segunda etapa de separación de SMB, y la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

50 Como alternativa, en este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es más lenta que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

55 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. Preferentemente, se recoge una corriente de extracto que contiene el segundo producto junto con componentes menos polares de la primera etapa de separación de SMB y se purifica en una segunda etapa de separación de SMB, y la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

Como alternativa, en este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es más lenta que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

En este proceso de SMB "consecutivo", en el que las velocidades de reciclado se ajustan de manera que el producto de AGPI se puede separar de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB, la proporción de agua:disolvente orgánico de los eluyentes usados en cada etapa de separación de SMB puede ser igual o diferente. Las proporciones típicas de agua:disolvente orgánico del eluyente en cada etapa de separación de SMB son como se han definido anteriormente.

Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en cada etapa de separación de SMB tiene una proporción de agua:disolvente orgánico diferente. El disolvente orgánico usado en cada etapa de separación de SMB es el mismo. La proporción de agua:disolvente orgánico usada en cada etapa de separación de SMB se ajusta preferentemente de modo que el producto de AGPI se pueda separar de diferentes componentes de la corriente de entrada en cada etapa de separación de SMB.

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

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

Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la proporción de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación de SMB es inferior a la proporción de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda etapa de separación de SMB. Por lo tanto, el eluyente en la primera etapa de separación de SMB normalmente contiene más disolvente orgánico que el eluyente en la segunda etapa de separación de SMB.

Se apreciará que las proporciones de agua y disolvente orgánico en cada etapa de separación de SMB mencionadas anteriormente son proporciones medias dentro de la totalidad del aparato cromatográfico.

Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la proporción de agua:disolvente orgánico del eluyente en cada etapa de separación de SMB se controla introduciendo agua y/o disolvente orgánico en una o más columnas en los aparatos cromatográficos usados en las etapas de separación de SMB. Por lo tanto, por ejemplo, para conseguir una proporción más baja de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación de SMB que en la segunda etapa de separación de SMB, el agua normalmente se introduce más lentamente en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB que en la segunda etapa de separación de SMB.

Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", puede introducirse disolvente orgánico esencialmente puro y agua esencialmente pura en diferentes puntos en el aparato cromatográfico usado en cada etapa de separación de SMB. Los caudales relativos de estas dos corrientes determinarán el perfil de disolvente global en el aparato cromatográfico. Como alternativa, en este proceso de SMB "consecutivo", pueden introducirse diferentes mezclas de disolvente orgánico y agua en diferentes puntos en cada aparato cromatográfico usado en cada etapa de separación de SMB. Esto implicará la introducción de dos o más mezclas de disolvente orgánico y agua diferentes en el aparato cromatográfico usado en una etapa de separación de SMB en particular, teniendo cada mezcla de disolvente orgánico/agua una proporción de disolvente orgánico:agua diferente. Los caudales relativos y las concentraciones relativas de las mezclas de disolvente orgánico/agua en este proceso de SMB "consecutivo" determinarán el perfil de disolvente global en el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación de SMB.

Preferentemente, en este proceso de SMB "consecutivo", bien (1) el primer producto que contiene el segundo producto junto con componentes más polares se recoge como corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB y el segundo producto se recoge como corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB; o

(2) el primer producto que contiene el segundo producto junto con componentes menos polares se recoge como corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB y el segundo producto se recoge como corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB.

La opción (1) es adecuada para purificar EPA de una corriente de entrada.

La opción (1) se ilustra en la Figura 2. Una corriente de entrada F que comprende el segundo producto (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se purifica en la primera etapa de separación de SMB. En la primera etapa de separación de SMB, los componentes menos polares (A) se retiran como corriente de extracto E1. El segundo producto (B) y los componentes más polares (C) se recogen como corriente de refinado R1. La corriente de refinado R1 es el primer producto que después se purifica en la segunda etapa de separación de SMB. En la segunda etapa de separación de SMB, los componentes más polares (C) se retiran como corriente de refinado R2. El segundo producto (B) se recoge como corriente de extracto E2.

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

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

En la Opción (1), la separación en corriente de refinado y de extracto se puede potenciar variando la potencia de desorción del eluyente dentro de cada aparato cromatográfico. Esto se puede realizar introduciendo el componente disolvente orgánico (o rico en disolvente orgánico) del eluyente y el componente de agua (o rico en agua) en diferentes puntos en cada aparato cromatográfico. Por lo tanto, normalmente, el disolvente orgánico se introduce aguas arriba del punto de extracción del extracto, y el agua se introduce entre el punto de extracción del extracto y el punto de introducción de la alimentación en el aparato cromatográfico, con respecto al flujo del eluyente en el sistema. Esto se muestra en la Figura 4.

Por lo general, en la opción (1), el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación de SMB contiene más disolvente orgánico que el eluyente usado en la segunda etapa de separación de SMB, es decir, la proporción de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación de SMB es menor que la proporción de agua:disolvente orgánico en la segunda etapa de separación de SMB.

En la opción (1), la separación de SMB se puede potenciar variando las velocidades a las que el líquido recogido a través de las corrientes de extracto y de refinado en la primera y segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en esa etapa de separación de SMB.

Por lo general, en la opción (1), la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

En la opción (1), la primera corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB normalmente se retira aguas abajo del punto de introducción de la corriente de entrada en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB, con respecto al flujo de eluyente.

En la opción (1), la primera corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB normalmente se retira aguas arriba del punto de introducción de la corriente de entrada en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB, con respecto al flujo de eluyente.

En la opción (1), la segunda corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB normalmente se retira aguas abajo del punto de introducción del primer producto en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB, con respecto al flujo de eluyente.

En la opción (1), la segunda corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB normalmente se recoge aguas arriba del punto de introducción del primer producto en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB, con respecto al flujo de eluyente.

Por lo general, en la opción (1), el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB aguas arriba del punto de retirada de la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

Por lo general, en la opción (1), cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación

de SMB aguas arriba del punto de introducción de la corriente de entrada, pero aguas abajo del punto de retirada de la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

5 Por lo general, en la opción (1), el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB aguas arriba del punto de retirada de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

10 Por lo general, en la opción (1), cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB aguas arriba del punto de introducción del primer producto, pero aguas abajo del punto de retirada de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

La opción (2) es adecuada para purificar DHA de una corriente de entrada.

15 La opción (2) se ilustra en la Figura 3. Una corriente de entrada F que comprende el segundo producto (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se purifica en la primera etapa de separación de SMB. En la primera etapa de separación de SMB, los componentes más polares (C) se retiran como corriente de refinado R1. El segundo producto (B) y los componentes menos polares (A) se recogen como corriente de extracto E1. La corriente de extracto E1 es el primer producto que después se purifica en la segunda etapa de separación de SMB. En la
20 segunda etapa de separación de SMB, los componentes menos polares (A) se retiran como corriente de extracto E2. El segundo producto (B) se recoge como corriente de refinado R2.

25 La opción (2) se ilustra con más detalle en la Figura 5. La Figura 5 es idéntica a la Figura 3, a excepción de que se muestran los puntos de introducción del desorbente de disolvente orgánico (D) y agua (W) en cada aparato cromatográfico. Como antes, la fase (D) normalmente es un disolvente orgánico esencialmente puro, pero, en ciertas realizaciones, puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprende principalmente un disolvente orgánico. La fase (W) normalmente es agua esencialmente pura, pero, en ciertas realizaciones, puede ser una mezcla de disolvente orgánico/agua que comprenda principalmente agua, por ejemplo, una mezcla del 98 % de
30 agua/2 % de metanol.

Otra ilustración de la opción (2) se muestra en la Figura 7. En ella, no hay un punto de inyección de agua separado, y en lugar de ello, se inyecta un desorbente de disolvente orgánico acuoso a (D).

35 Por lo general, en la opción (2), la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB se reintroduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB se reintroduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

40 Por lo general, en la opción (2), el eluyente de disolvente orgánico acuoso usado en la primera etapa de separación de SMB contiene menos disolvente orgánico que el eluyente usado en la segunda etapa de separación de SMB, es decir, la proporción de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación de SMB es más alta que en la segunda etapa de separación de SMB.

45 En la opción (2), la primera corriente de refinado en la primera etapa de separación de SMB normalmente se retira aguas abajo del punto de introducción de la corriente de entrada en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB, con respecto al flujo de eluyente.

50 En la opción (2), la primera corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB normalmente se retira aguas arriba del punto de introducción de la corriente de entrada en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB, con respecto al flujo de eluyente. En la opción (2), la segunda corriente de refinado en la segunda etapa de separación de SMB normalmente se retira aguas abajo del punto de introducción del primer producto en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB, con respecto al flujo de eluyente.
55

En la opción (2), la segunda corriente de extracto en la segunda etapa de separación de SMB normalmente se recoge aguas arriba del punto de introducción del primer producto en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB, con respecto al flujo de eluyente.

60 Por lo general, en la opción (2), el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB aguas arriba del punto de retirada de la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

65 Por lo general, en la opción (2), cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB aguas arriba del punto de introducción de la corriente de entrada pero aguas abajo del punto de retirada de

la primera corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

Por lo general, en la opción (2), el disolvente orgánico o disolvente orgánico acuoso se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB aguas arriba del punto de retirada de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

Por lo general, en la opción (2), cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB aguas arriba del punto de introducción del primer producto, pero aguas abajo del punto de retirada de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

En este proceso de SMB "consecutivo", cada uno de los aparatos cromatográficos de lecho móvil simulado o real usados en la primera y segunda etapa de separación de SMB consiste preferentemente en ocho columnas cromatográficas. Estas se denominan columnas 1 a 8. En cada aparato las ocho columnas hay dispuesta en serie de modo que la parte inferior de la columna 1 está unida a la parte superior de la columna 2, la parte inferior de la columna 2 está unida a la parte superior de la columna 3, etc., y la parte inferior de la columna 8 está unida a la parte superior de la columna 1. Estas uniones opcionalmente pueden ser a través de un recipiente de retención, con una corriente de reciclado en la siguiente columna. El flujo de eluyente a través del sistema pasa de la columna 1 a la columna 2 a la columna 3, etc. El flujo eficaz de adsorbente a través del sistema pasa de la columna 8 a la columna 7 a la columna 6, etc.

Esto se ilustra en la Figura 8. Una corriente de entrada F que comprende el segundo producto (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se introduce en la parte superior de la columna 5 en el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. El desorbente de disolvente orgánico se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. Se introduce agua en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. En la primera etapa de separación de SMB, se retiran los componentes menos polares (A) como corriente de extracto E1 de la parte inferior de la columna 2. El segundo producto (B) y los componentes más polares (C) se retiran como corriente de refinado R1 de la parte inferior de la columna 7. La corriente de refinado R1 es el primer producto que después se purifica en la segunda etapa de separación de SMB, introduciéndose en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB en la parte superior de la columna 5. Se introduce desorbente de disolvente orgánico en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. Se introduce agua en la parte superior de la columna 4 en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. En la segunda etapa de separación de SMB, los componentes más polares (C) se retiran como corriente de refinado R2 en la parte inferior de la columna 7. El segundo producto (B) se recoge como corriente de extracto E2 en la parte inferior de la columna 2.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, el disolvente orgánico normalmente se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, el agua normalmente se introduce en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, el disolvente orgánico normalmente se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, el disolvente orgánico normalmente se introduce en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, la corriente de entrada normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, una primera corriente de refinado normalmente se recoge como primer producto de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. Este primer producto se purifica entonces en la segunda etapa de separación de SMB y normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. La primera corriente de refinado se puede recoger opcionalmente en un recipiente antes de purificarse en la segunda etapa de separación de SMB.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, una primera corriente de extracto normalmente se retira de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. La primera corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y reintroducirse en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, una segunda corriente de refinado normalmente se retira de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de

SMB.

5 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, normalmente se recoge una segunda corriente de extracto desde la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. Esta segunda corriente de extracto normalmente contiene el segundo producto. La segunda corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y reintroducirse en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

10 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 8, el eluyente usado es normalmente como se ha definido anteriormente.

15 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la proporción de agua:disolvente orgánico en el aparato de cromatografía usado en el primera etapa separación de SMB es inferior a la proporción de agua:disolvente orgánico en el aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación de SMB. Por lo tanto, el eluyente en la primera etapa de separación de SMB normalmente contiene más disolvente orgánico que el eluyente usado en la segunda etapa de separación de SMB.

20 En este proceso de SMB "consecutivo", la proporción de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación de SMB es normalmente de 0,5:99,5 a 1,5:98,5 partes en volumen. La proporción de agua:disolvente orgánico en el segunda etapa de separación de SMB normalmente es de 2:98 a 6:94 partes en volumen.

En el proceso de SMB "consecutivo", aunque el aparato de la Figura 8 está configurado como se muestra en la Figura 10a, también se podrían usar las configuraciones mostradas en las Figuras 10b y 10c.

25 Este proceso de SMB "consecutivo" también se ilustra en la Figura 9. Una corriente de entrada F que comprende el segundo producto (B) y componentes más polares (C) y menos polares (A) se introduce en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. El desorbente de disolvente orgánico acuoso se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. En la primera etapa de separación de SMB, se retiran los componentes menos polares (A) como corriente de extracto E1 de la parte inferior de la columna 2. El segundo producto (B) y los componentes más polares (C) se retiran como corriente de refinado R1 de la parte inferior de la columna 7. La corriente de refinado R1 es el primer producto que se purifica en la segunda etapa de separación de SMB al introducirse en la parte superior de la columna 4 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. El desorbente de disolvente orgánico acuoso se introduce en la parte superior de la columna 1 en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. En la segunda etapa de separación de SMB, los componentes más polares (C) se retiran como corriente de refinado R2 en la parte inferior de la columna 7. El segundo producto (B) se recoge como corriente de extracto E2 en la parte inferior de la columna 2.

40 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 9, el disolvente orgánico acuoso normalmente se introduce en la parte superior de la columna 1 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB.

45 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 9, el disolvente orgánico acuoso normalmente se introduce en la parte superior de la columna 9 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB.

En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 9, la corriente de entrada normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB.

50 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 9, una primera corriente de refinado normalmente se recoge como primer producto de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. Este primer producto se purifica entonces en la segunda etapa de separación de SMB y normalmente se introduce en la parte superior de la columna 5 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. La primera corriente de refinado se puede recoger opcionalmente en un recipiente antes de purificarse en la segunda etapa de separación de SMB.

60 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 9, una primera corriente de extracto normalmente se retira de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. La primera corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y una parte se reintroduce en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. La velocidad de reciclado del líquido recogido a través de la corriente de extracto en la primera etapa de separación de SMB de vuelta al aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es la velocidad a la que se bombea líquido desde este recipiente a la parte superior de la columna 3.

65 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 9, una segunda corriente de refinado normalmente se retira de la parte inferior de la columna 7 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de

SMB.

5 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 9, normalmente se recoge una segunda corriente de extracto de la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. Esta segunda corriente de extracto normalmente contiene el segundo producto. La segunda corriente de extracto se puede recoger opcionalmente en un recipiente y una parte se reintroduce en la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB. La velocidad de reciclado del líquido recogido a través de la corriente de extracto de la segunda etapa de separación de SMB de vuelta al aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB es la velocidad a la que se bombea líquido desde este recipiente hasta la parte superior de la columna 3.

10 En el proceso de SMB "consecutivo" mostrado en la Figura 9, el eluyente usado es normalmente como se ha definido anteriormente.

15 Por lo general, en este proceso de SMB "consecutivo", la proporción de agua:disolvente orgánico en el aparato de cromatografía usado en el primera etapa separación de SMB es inferior a la proporción de agua:disolvente orgánico en el aparato de cromatografía usado en la segunda etapa de separación de SMB. Por lo tanto, el eluyente usado en la primera etapa de separación de SMB normalmente contiene más disolvente orgánico que el eluyente usado en la segunda etapa de separación de SMB.

20 En este proceso de SMB "consecutivo", la proporción de agua:disolvente orgánico en la primera etapa de separación de SMB es normalmente de 0,5:99,5 a 1,5:98,5 partes en volumen. La proporción de agua:disolvente orgánico en el segunda etapa de separación de SMB normalmente es de 2:98 a 6:94 partes en volumen.

25 En este proceso de SMB "consecutivo", la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto de la primera etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la primera etapa de separación de SMB es normalmente más rápida que la velocidad a la que el líquido recogido a través de la corriente de extracto de la segunda etapa de separación de SMB se recicla hacia el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación de SMB. En este caso, el eluyente de disolvente orgánico acuoso normalmente es esencialmente el mismo en cada etapa de separación de SMB. En este proceso de SMB "consecutivo", aunque el aparato de la Figura 9 está configurado como se muestra en la Figura 10a, también se podrían usar las configuraciones mostradas en las Figuras 10b y 10c.

30 Por lo general, la primera etapa de separación cromatográfica implica al menos uno, por ejemplo, un proceso de SMB "consecutivo" como se ha definido anteriormente.

35 Por lo general, el producto de AGPI está separado de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación cromatográfica.

40 Por lo general, el producto de AGPI se separa de una o más de las impurezas de ácido graso C18 desveladas anteriormente en la primera y/o segunda etapa de separación. Por lo general, el producto de AGPI está separado de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 analizadas anteriormente en solo una de la primera y segunda etapa de separación.

45 Más normalmente, el producto de AGPI se separa de ALA, mono-, di- y tri-glicéridos de ALA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de ALA en la primera y/o segunda etapa de separación.

50 Más normalmente, el producto de AGPI se separa de GLA, mono-, di- y tri-glicéridos de GLA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de GLA en la primera y/o segunda etapa de separación.

55 Preferentemente, el producto de AGPI se separa de ácidos grasos C18, mono-, di- y tri-glicéridos de ácidos grasos C18 y ésteres de alquilo de ácidos grasos C18 en la primera y/o segunda etapa de separación.

60 Por lo general, el producto intermedio tiene una menor concentración de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que la mezcla de alimentación; y/o el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración inferior de una o más de las impurezas de ácido graso C18 desveladas anteriormente que el producto intermedio.

65 Más normalmente, el producto intermedio tiene una menor concentración de impurezas seleccionadas entre ALA, mono-, di- y tri-glicéridos de ALA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de ALA que la mezcla de alimentación; y/o el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de dichas impurezas que el producto intermedio.

Más normalmente, el producto intermedio tiene una menor concentración de impurezas seleccionadas de GLA, mono-, di- y tri-glicéridos de GLA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de GLA que la mezcla de alimentación; y/o el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de dichas impurezas que el

producto intermedio.

Preferentemente, el producto intermedio tiene una menor concentración de ácidos grasos C18 o derivados de ácidos grasos C18 que la mezcla de alimentación; o el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de ácidos grasos C18 o derivados de ácidos grasos C18 que el producto intermedio. En ciertas realizaciones, el producto intermedio tiene una menor concentración de ácidos grasos C18 o derivados de ácidos grasos C18 que la mezcla de alimentación; y el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de ácidos grasos C18 o derivados de ácidos grasos C18 que el producto intermedio.

Una concentración más baja normalmente significa una concentración que es inferior en una cantidad del 5 % en peso o superior, más normalmente del 10 % en peso o superior, preferentemente del 20 % en peso o superior, más preferentemente del 30 % en peso o superior, incluso más preferentemente del 40 % en peso o superior, aún más preferentemente del 50 % en peso o superior, incluso más preferentemente del 60 % en peso o superior, aún más preferentemente del 70 % en peso o superior, todavía más preferentemente del 80 % en peso o superior, aún más preferentemente del 90 % en peso o superior. Así pues, cuando el producto intermedio tiene una concentración menor de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que la mezcla de alimentación, la concentración de las impurezas de ácidos grasos C18 en el producto intermedio normalmente es del 10 % en peso o más, preferentemente del 20 % en peso o más, etc., inferior a la concentración de las impurezas de ácidos grasos C18 en la mezcla de alimentación. Cuando el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que el producto intermedio, la concentración de las impurezas de ácidos grasos C18 en el producto de AGPI es normalmente del 10 % en peso o más, preferentemente del 20 % en peso o más, etc., inferior a la concentración de las impurezas de ácidos grasos C18 del producto intermedio.

Por lo general, el primer disolvente orgánico es acetonitrilo, y el producto intermedio tiene una menor concentración de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que la mezcla de alimentación. Como alternativa, el segundo disolvente orgánico es acetonitrilo, y el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que el producto intermedio.

Preferentemente, el producto de AGPI es etiléster de EPA, y (i) el primer disolvente orgánico es acetonitrilo, y el producto intermedio tiene una concentración menor de una o más de las impurezas de ácido graso C18 desveladas anteriormente que la mezcla de alimentación, o (ii) el segundo disolvente orgánico es acetonitrilo, y el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que el producto intermedio.

Más preferentemente, el producto de AGPI es el etiléster de EPA, y (i) el primer disolvente orgánico es acetonitrilo, el segundo disolvente orgánico es metanol y el producto intermedio tiene una menor concentración de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que la mezcla de alimentación; o (ii) el primer disolvente orgánico es metanol, el segundo disolvente orgánico es acetonitrilo y el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que el producto intermedio.

Más preferentemente, el producto de AGPI es etiléster del EPA, y el primer disolvente orgánico es metanol y el segundo disolvente orgánico es acetonitrilo, la primera etapa de separación cromatográfica comprende introducir la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real y la segunda etapa de separación cromatográfica comprende introducir el producto intermedio en un aparato de cromatografía de lecho estacionario.

Incluso más preferentemente, el producto de AGPI es etiléster de EPA, y el primer disolvente orgánico es metanol, el segundo disolvente orgánico es acetonitrilo, el producto de AGPI producido en la segunda etapa de separación tiene una concentración menor de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente que el producto intermedio, y la primera etapa de separación cromatográfica comprende introducir la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real y la segunda etapa de separación cromatográfica comprende introducir el producto intermedio en un aparato de cromatografía de lecho estacionario.

También se desvela en el presente documento un producto de AGPI, como se ha definido anteriormente, que se puede obtener mediante el proceso de la presente invención.

También se desvela en el presente documento una composición que comprende un producto de AGPI de la presente invención. Dichas composiciones normalmente contienen, como producto de AGPI, EPA o etiléster de EPA.

El producto de AGPI normalmente está presente en las composiciones en una cantidad superior al 90 % en peso, preferentemente superior al 95 % en peso, más preferentemente superior al 97 % en peso, incluso más

preferentemente superior al 98 % en peso, todavía más preferentemente superior al 98,4 % en peso.

Preferentemente, el producto de AGPI es EPA o etiléster de EPA, y está presente en las composiciones en una cantidad superior al 90 % en peso, preferentemente superior al 95 % en peso, más preferentemente superior al 97 % en peso, incluso más preferentemente superior al 98 % en peso, aún más preferentemente superior al 98,4 % en peso, por ejemplo, en una cantidad de entre el 98 y el 99,5 % en peso.

Por lo general, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de una o más de las impurezas de ácidos grasos C18 desveladas anteriormente.

Por lo general, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas de ácido alfa-linolénico (ALA), de mono-, di- y tri-glicéridos de ALA y de ésteres de alquilo C₁-C₄ de ALA. Más normalmente, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas que son ALA y sus derivados. Los derivados de ALA típicos son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI.

Por lo general, el producto de AGPI contiene menos de 1 % en peso de impurezas de ácido gamma-linolénico (GLA), mono-, di- y tri-glicéridos de GLA y de ésteres de alquilo C₁-C₄ de GLA. Más normalmente, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas que son GLA y sus derivados. Los derivados de GLA típicos son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI.

Por lo general, el producto de AGPI contiene menos de 1 % en peso de impurezas de ácidos grasos C18, mono-, di- y tri-glicéridos de ácidos grasos C18 y de alquiléster de ácidos grasos C18. Más normalmente, el producto de AGPI contiene menos del 1 % en peso de impurezas que son ácidos grasos C18 y derivados de los mismos. Para evitar dudas, en esta realización, la cantidad máxima de la totalidad de dichas impurezas es del 1 % en peso. Los derivados de ácidos grasos C18 típicos son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI. Como se usa en el presente documento, un ácido graso C18 es un ácido monocarboxílico alifático C18 que tiene una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada. Los ácidos grasos C18 típicos incluyen ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9), ácido vaccénico (C18:1n7), ácido linoleico (C18:2n6), ácido gamma-linolénico/GLA (C18:3n6), ácido alfa-linoleico/ALA (C18:3n3) y ácido estearidónico/SDA (C18:4n3). Como se ha explicado anteriormente, normalmente la cantidad de las impurezas mencionadas anteriormente en el producto de AGPI es inferior al 1 % en peso. Preferentemente, la cantidad de las impurezas mencionadas anteriormente es inferior al 0,5 % en peso, más preferentemente inferior al 0,25 % en peso, incluso más preferentemente inferior al 0,1 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,05 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,01 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,001 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,0001 % en peso, aún más preferentemente inferior al 0,00001 % en peso.

En ciertas realizaciones preferidas, el producto de AGPI está esencialmente exento de las impurezas mencionadas anteriormente.

El producto de AGPI no es ALA, GLA, ácido linoleico, un mono-, di- o tri-glicérido de ALA o, un mono-, di- o tri-glicérido de GLA, un mono-, di- o tri-glicérido de ácido oleico, un éster de alquilo C₁-C₄ de ALA, un éster de alquilo C₁-C₄ de GLA o un éster de alquilo C₁-C₄ de ácido oleico o una mezcla de los mismos. Por lo general, el producto de AGPI no es ALA, GLA, ácido linoleico, o un derivado o mezclas de los mismos. Los derivados típicos de ALA, GLA y ácido linoleico son como se han definido anteriormente para los derivados de AGPI.

Por lo general, el producto de AGPI no es un AGPI C18, un mono-, di- o tri-glicérido de AGPI C18 o un alquiléster de AGPI C18. Más normalmente, el producto de AGPI no es un AGPI C18 o un derivado de AGPI C18. Los AGPI C18 típicos incluyen ácido linoleico (C18:2n6), GLA (C18: 3n6) y ALA (C18: 3n3).

Por lo general, la composición comprende, como producto de AGPI, EPA o etiléster de EPA presente en una cantidad de entre el 98 y el 99,5 % en peso, conteniendo la composición menos del 1 % en peso de etiléster del ALA.

Por lo general, la composición comprende, como producto de AGPI, EPA o etiléster de EPA presente en una cantidad de entre el 98 y 99,5 % en peso, conteniendo la composición menos del 1 % en peso de etiléster del GLA.

Preferentemente, la composición comprende, como producto de AGPI, EPA o etiléster de EPA presente en una cantidad entre el 98 y 99,5 % en peso, conteniendo la composición del 1 % en peso de ALA, mono-, di- y tri-glicéridos de ALA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de ALA.

Preferentemente, la composición comprende, como producto de AGPI, EPA o etiléster de EPA presente en una cantidad de entre el 98 y el 99,5 % en peso, conteniendo la composición menos del 1 % en peso de GLA, mono-, di- y tri-glicéridos de GLA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de GLA.

Más preferentemente, la composición comprende, como producto de AGPI, etiléster de EPA presente en una cantidad de entre el 98 y 99,5 % en peso, conteniendo la composición menos del 1 % en peso de ALA, mono-, di- y

tri-glicéridos de ALA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de ALA.

Más preferentemente, la composición comprende, como producto de AGPI, etiléster de EPA presente en una cantidad de entre el 98 y 99,5 % en peso, conteniendo la composición menos del 1 % en peso de GLA, mono-, di- y tri-glicéridos de GLA y ésteres de alquilo C₁-C₄ de GLA.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Primera etapa de separación cromatográfica

Se fraccionó una materia prima derivada de aceite de pescado (etiléster (EE) de EPA al 55 % en peso, EE de DHA al 5 % en peso) con perfil de ácidos grasos como se muestra en la Figura 16 usando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice C18 unido (tamaño de partícula de 300 µm, porosidad de partícula 150 Å) como fase estacionaria y metanol acuoso (normalmente del 0,5 % al 10 % de agua) como eluyente a través de un aparato de SMB de "una sola pasada" que consiste en 15 columnas (diámetro: 76,29 mm, longitud: 914,40 mm) conectadas en serie.

Los parámetros de funcionamiento y los caudales son los siguientes.

(Esquema de flujo típico según Figura 8)

Duración de la etapa: 750 s
 Duración del ciclo: 200 min
 Caudal de la mezcla de alimentación (F1): 74 ml/min
 Caudal del desorbente (D1): 6.250 ml/min
 Velocidad de acumulación del extracto (E1): 1.250 ml/min
 Velocidad de reciclado del extracto (D1-E1): 5.000 ml/min
 Velocidad de acumulación del refinado (R1): 1.688 ml/min
 Duración del ciclo: 600 s.

El producto intermedio producido mediante este proceso tiene un rastro de GC-FAMES como se muestra en la Figura 12. El EE de EPA está contenido con una pureza del 96,5 %. La principal impureza es el alfa-linolenoato de etilo (ALA-C18: 3n3) presente al 0,9 %. El ALA está presente en la materia prima al 0,65 %. Por lo tanto, se puede observar que el ALA se eluye junto con el EPA usando metanol/agua como fase móvil. El metanol/agua es, sin embargo, muy eficaz para retirar el componente de docosahexaenoato de etilo (DHAC22:6n3) estrechamente relacionado.

Segunda etapa de separación cromatográfica

Se purificó más el producto intermedio producido en la primera etapa de separación cromatográfica mediante HPLC preparativa en un lecho fijo usando una mezcla de fase móvil de acetonitrilo/agua. Se utilizó acetonitrilo/agua en una proporción de 87:13 en peso. Se usa una columna de HPLC de dimensiones de 600 mm x 900 mm empaquetada con sílice C18 unida (tamaño de partícula de 20 µm) con un volumen de inyección de mezcla de alimentación de 1.400 ml y un caudal de desorbente de 2.200 ml/min.

El producto de AGPI final producido se analizó mediante GC FAMES, y el rastro se muestra en la Figura 13. Se puede ver que ALA se ha eliminado completamente y que la pureza del EPA se ha aumentado hasta el 98,5 %.

Segunda etapa de separación cromatográfica alternativa (referencia)

Se fraccionó el producto intermedio producido en la primera etapa de separación cromatográfica usando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice C8 unido (tamaño de partícula de 300 µm, porosidad de partícula 150 Å) como fase estacionaria y acetonitrilo acuoso (12 % de agua) como eluyente a través de un aparato de SMB de "una sola pasada" que consiste en 8 columnas (diámetro: 76,29 mm, longitud: 914,40 mm) conectadas en serie.

Los parámetros de funcionamiento y los caudales son los siguientes.

(Esquema de flujo típico según Figura 8)

Duración de la etapa: 780 s
 Caudal de la mezcla de alimentación (F1): 90 ml/min
 Caudal del desorbente (D1): 6.500 ml/min
 Velocidad de acumulación del extracto (E1): 1.400 ml/min

Velocidad de reciclado del extracto (D1-E1): 5.100 ml/min
 Velocidad de acumulación del refinado (R1): 1.690 ml/min
 Duración del ciclo: 600 s.

5 Ejemplo 2

Primera etapa de separación cromatográfica (referencia)

10 Se sometió una materia prima derivada de aceite de pescado (EE de EPA al 55 % en peso, EE de DHA al 5 % en peso) con perfil de ácidos grasos como se muestra en la Figura 16 a separación mediante HPLC preparativa usando un eluyente de acetonitrilo/agua. La fase móvil usada en acetonitrilo:agua a 87:13. Se usa una columna de HPLC de dimensiones de 600 mm x 900 mm empaquetada con sílice C18 unida (tamaño de partícula de 20 µm) con un volumen de inyección de mezcla de alimentación de 600 ml y un caudal de desorbente de 2.200 ml/min. El producto intermedio producido se analizó mediante GC FAME, y el rastro se muestra en la Figura 14.

15 Se puede observar que el alfa-linolenato de etilo (ALA-C18:3n3) se retiró por completo de la mezcla de alimentación. Sin embargo, se alcanzó un nivel de pureza de solo el 92,5 % de EE de EPA, principalmente, debido a la presencia de un alto nivel de docosaheptaenoato de etilo (DHA-C22:6n3).

20 *Primera etapa de separación cromatográfica alternativa*

25 Se fraccionó una materia prima derivada de aceite de pescado (EE de EPA al 55 % en peso, EE de DHA al 5 % en peso) con perfil de ácidos grasos como se muestra en la Figura 16 usando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice C18 unido (tamaño de partícula de 300 µm, porosidad de partícula 150 Å) como fase estacionaria y acetonitrilo acuoso (normalmente del 4 % al 18 % de agua) como eluyente a través de un aparato de SMB de "una sola pasada" que consiste en 15 columnas (diámetro: 76,29 mm, longitud: 914,40 mm) conectadas en serie.

30 Los parámetros de funcionamiento y los caudales son los siguientes.

- (Esquema de flujo típico según Figura 8)
- Duración de la etapa: 600 s.
- Caudal de materia prima (F): 105 ml/min
- Caudal de desorbente (D): 4.800 ml/min
- 35 Caudal de extracto: 1.250 ml/min
- Caudal de refinado: 1.800 ml/min.

Segunda etapa de separación cromatográfica

40 Se sometió el producto intermedio producido a purificación adicional usando HPLC preparativa usando un eluyente de metanol/agua a una proporción en peso de 88:12. Se usa una columna de HPLC de dimensiones de 600 mm x 900 mm empaquetada con sílice C18 unida (tamaño de partícula de 20 µm) con un volumen de inyección de mezcla de alimentación de 1.250 ml y un caudal de desorbente de 2.200 ml/min.

45 El producto final producido tiene un rastro de GC FAMES como se muestra en la Figura 15. El producto producido contiene EE de EPA con una pureza del 99 %

50 Por lo tanto, se puede observar que el resultado de realizar la separación con acetonitrilo/agua primero seguida de metanol/agua es esencialmente el mismo que realizarla primero con metanol/agua seguida de acetonitrilo/agua. En cada caso la combinación de una etapa que implica metanol/agua y una etapa adicional que implica acetonitrilo/agua es ventajosa en la preparación de un altamente (EE de) EPA purificado concentrado al ~99 % de pureza con un bajo contenido de impurezas de ácidos grasos C18, por ejemplo, de ALA

Segunda etapa de separación cromatográfica alternativa (referencia)

55 Se fraccionó el producto intermedio producido usando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice C8 unido (tamaño de partícula de 300 µm, porosidad de partícula 150 Å) como fase estacionaria y metanol acuoso (7 % de agua) como eluyente a través de un aparato de SMB de "una sola pasada" que consiste en 8 columnas (diámetro: 76,29 mm, longitud: 914,40 mm) conectadas en serie.

60 Los parámetros de funcionamiento y los caudales son los siguientes.

- (Esquema de flujo típico según Figura 8)
- Duración de la etapa: 960 s
- 65 Caudal de materia prima (F): 45 ml/min
- Caudal de desorbente (D): 3.975 ml/min

Caudal de extracto: 3.655 ml/min
Caudal de refinado: 2.395 ml/min

Ejemplo comparativo 1

- 5 Se fracciona una materia prima derivada de aceite de pescado (EE de EPA al 55 % en peso, EE de DHA al 5 % en peso) con perfil de ácidos grasos como se muestra en la Figura 16 en una primera y una segunda etapa de separación cromatográfica usando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice C18 unido
- 10 (tamaño de partícula de 300 μm , porosidad de partícula 150 Å) como fase estacionaria y metanol acuoso como eluyente en ambas etapas de separación.
- La primera etapa de separación se realizó en una serie de 8 columnas (diámetro: 76,29 mm, longitud: 914,40 mm) conectadas en serie.
- 15 Los parámetros de funcionamiento y los caudales son los siguientes.
- (Esquema de flujo típico según Figura 8)
- Caudal de la mezcla de alimentación (F1): 34 ml/min
Caudal del desorbente (D1): 14.438 ml/min
- 20 Velocidad de acumulación del extracto (E1): 9.313 ml/min
Velocidad de reciclado del extracto (D1-E1): 5.125 ml/min
Velocidad de acumulación del refinado (R1): 1.688 ml/min
Duración del ciclo: 1.200 s.
- 25 La segunda etapa de separación se realizó en una segunda serie de 7 columnas (diámetro: 76,29 mm, longitud: 914,40 mm) conectadas en serie.
- Caudal del segundo producto intermedio (F3): 40 ml/min
Caudal del desorbente (D3): 6.189 ml/min
- 30 Velocidad de acumulación del extracto (E3): 1.438 ml/min
Velocidad de reciclado del extracto (D3-E3): 4.750 ml/min
Velocidad de acumulación del refinado (R3): 1.438 ml/min
Duración del ciclo: 1.080 s.
- 35 El ejemplo comparativo produjo un concentrado de EPA con un perfil de impurezas menos ventajoso. La pureza superior que se puede alcanzar está limitada en particular por la presencia de componentes C18:3 (GLA y ALA).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácido graso poliinsaturado (AGPI) de una mezcla de alimentación, que comprende:
- (a) purificar la mezcla de alimentación en una primera etapa de separación cromatográfica usando como eluyente una mezcla de agua y un primer disolvente orgánico, obteniéndose un producto intermedio; y
(b) purificar el producto intermedio en una segunda etapa de separación cromatográfica usando como eluyente una mezcla de agua y un segundo disolvente orgánico, obteniéndose el producto de AGPI,
- 10 siendo el segundo disolvente orgánico diferente del primer disolvente orgánico, y en el que la primera etapa de separación cromatográfica comprende introducir la mezcla de alimentación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real, y la segunda etapa de separación cromatográfica comprende introducir el producto intermedio en un aparato de cromatografía de lecho estacionario.
- 15 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el primer y el segundo disolvente orgánico se seleccionan de entre alcoholes, éteres, ésteres, cetonas y nitrilos.
- 20 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la cetona es acetona, metiletilcetona o metilisobutilcetona (MIBK), preferentemente, acetona.
4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que uno de entre el primer y el segundo disolvente orgánico es metanol.
- 25 5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo disolvente orgánico es metanol.
6. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proporción del primer disolvente orgánico:agua es de 99,9:0,1 a 75:25 partes en volumen, preferentemente de 99,5:0,5 a 80:20 partes en volumen.
- 30 7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proporción del segundo disolvente orgánico:agua es de 99,9:0,1 a 75:25 partes en volumen, preferentemente de 90:10 a 85:15 partes en volumen.
- 35 8. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo disolvente orgánico es metanol, y la proporción de metanol:agua es de 95:5 a 85:15 partes en volumen, preferentemente de 93:7 a 90:10 partes en volumen.
- 40 9. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de AGPI es al menos un AGPI ω -3 o al menos un derivado de AGPI ω -3.
- 45 10. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de AGPI es ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), triglicérido de EPA, triglicérido de DHA, etiléster de EPA o etiléster de DHA.
11. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de AGPI es EPA o etiléster de EPA.
- 50 12. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de AGPI se obtiene en la segunda etapa de separación a una pureza superior al 95 % en peso, preferentemente superior al 97 % en peso, más preferentemente superior al 98 % en peso, incluso más preferentemente superior al 98,4 % en peso.

Figura 1

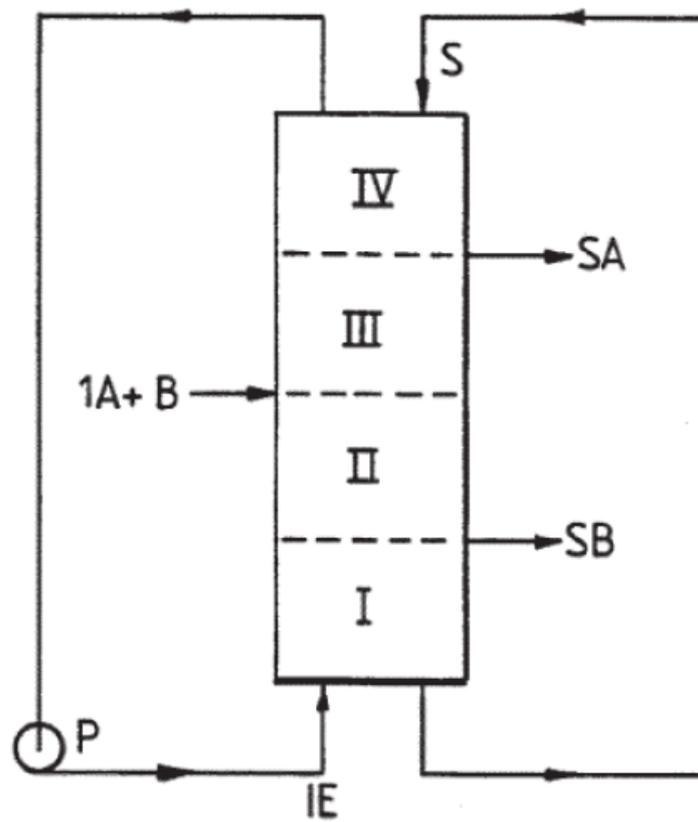


Figura 2

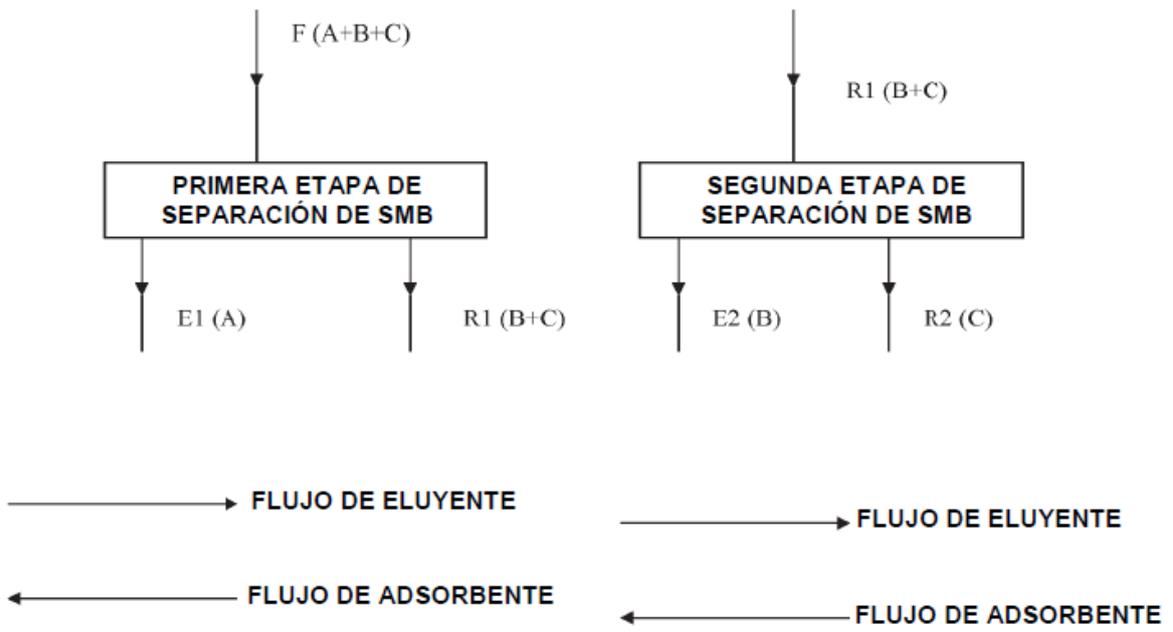


Figura 3

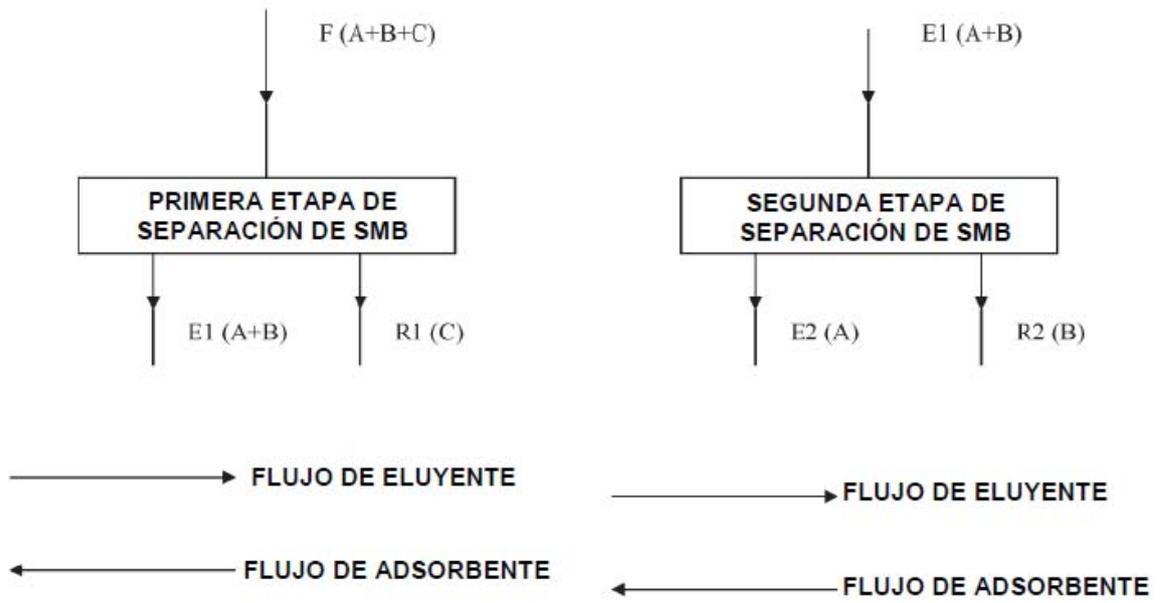


Figura 4

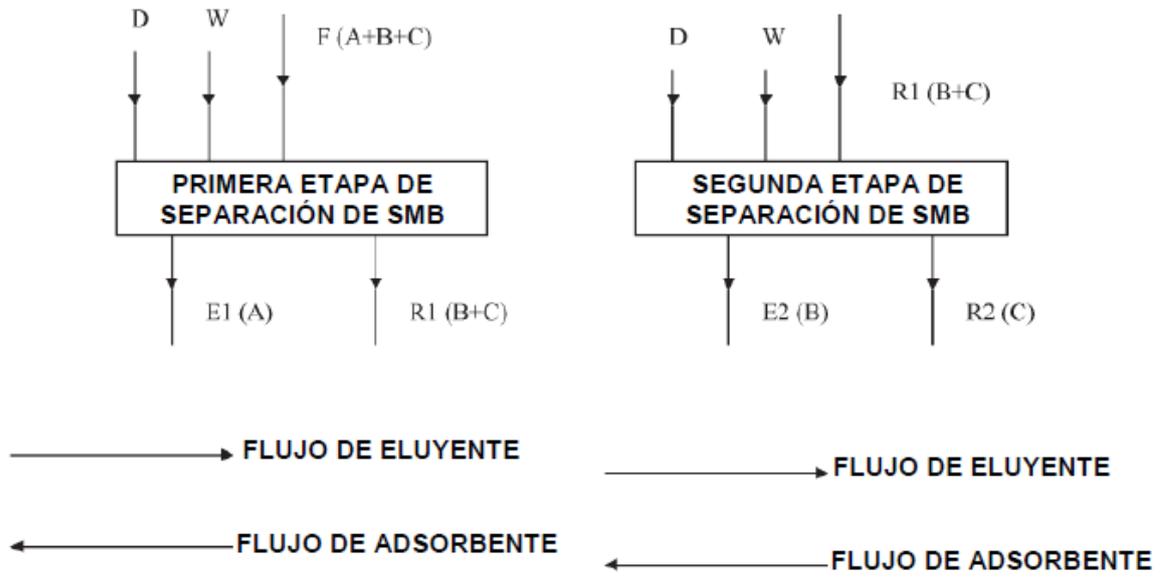


Figura 5

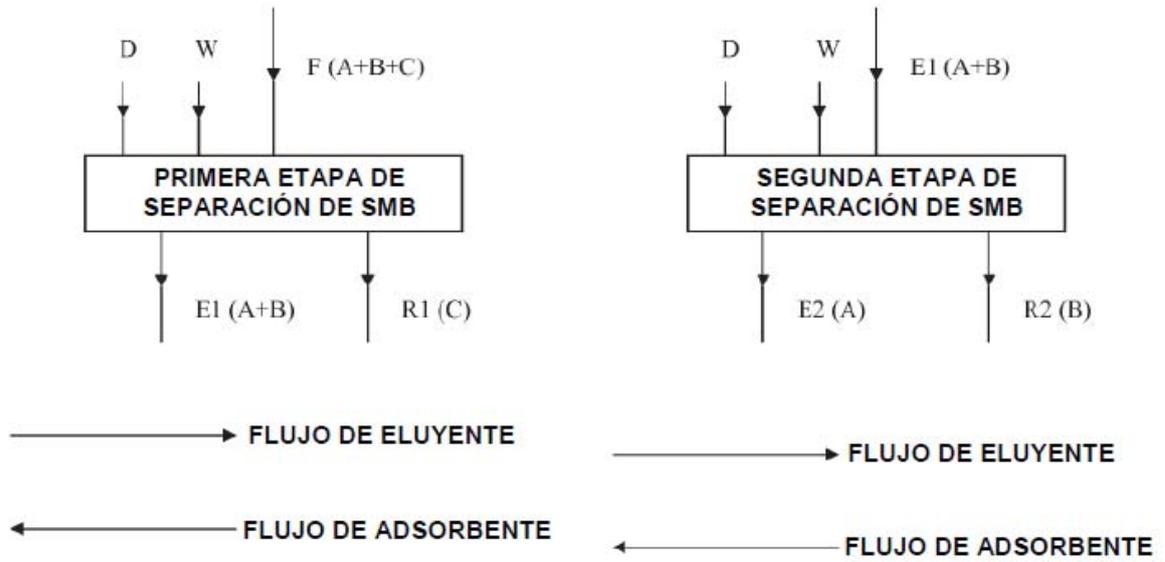


Figura 6

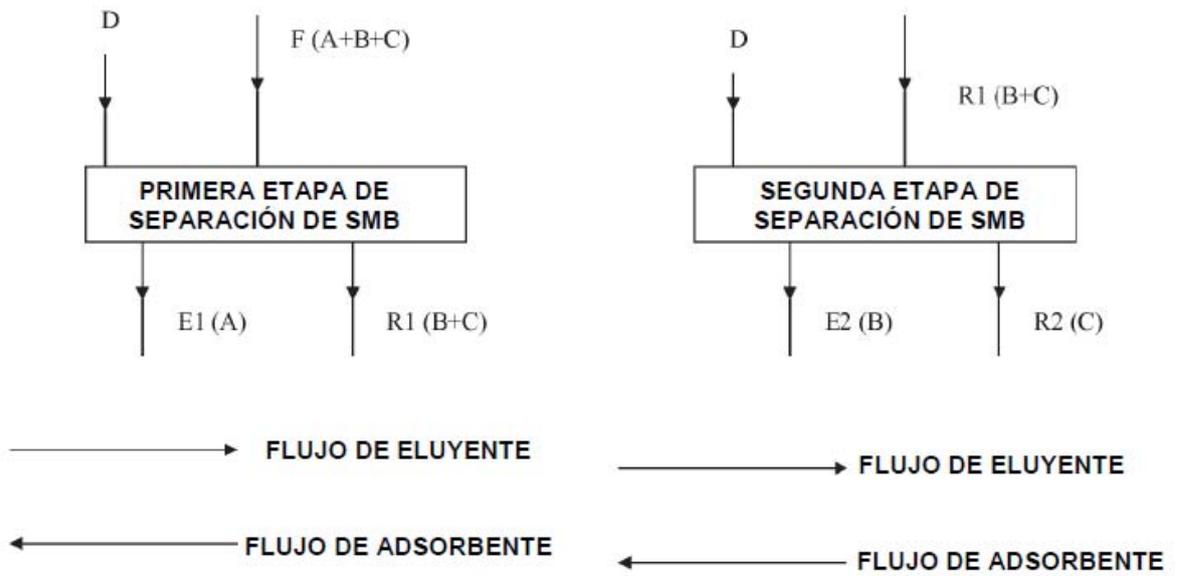


Figura 7

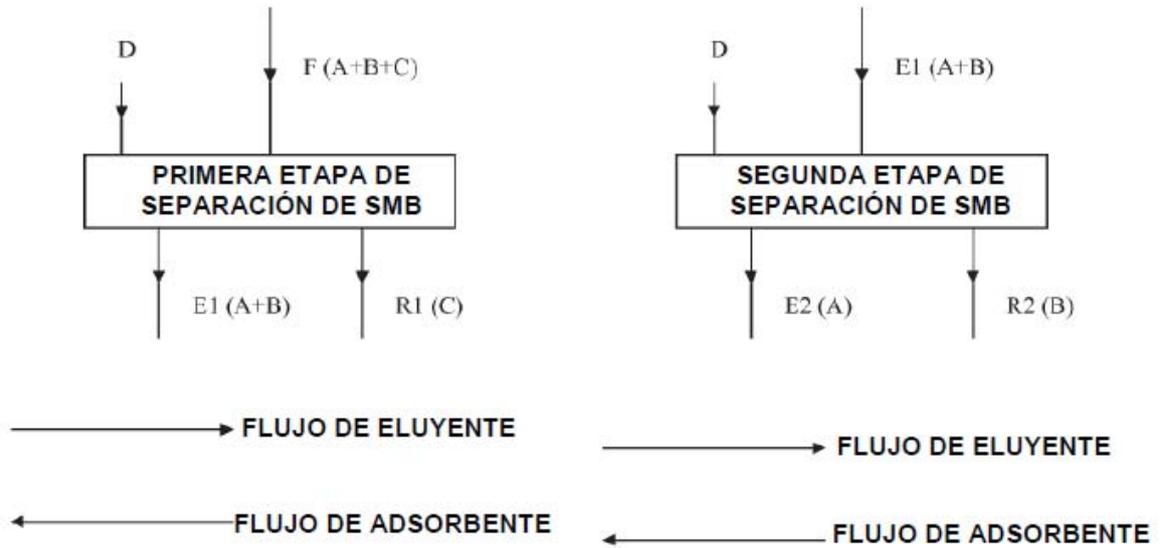


Figura 8

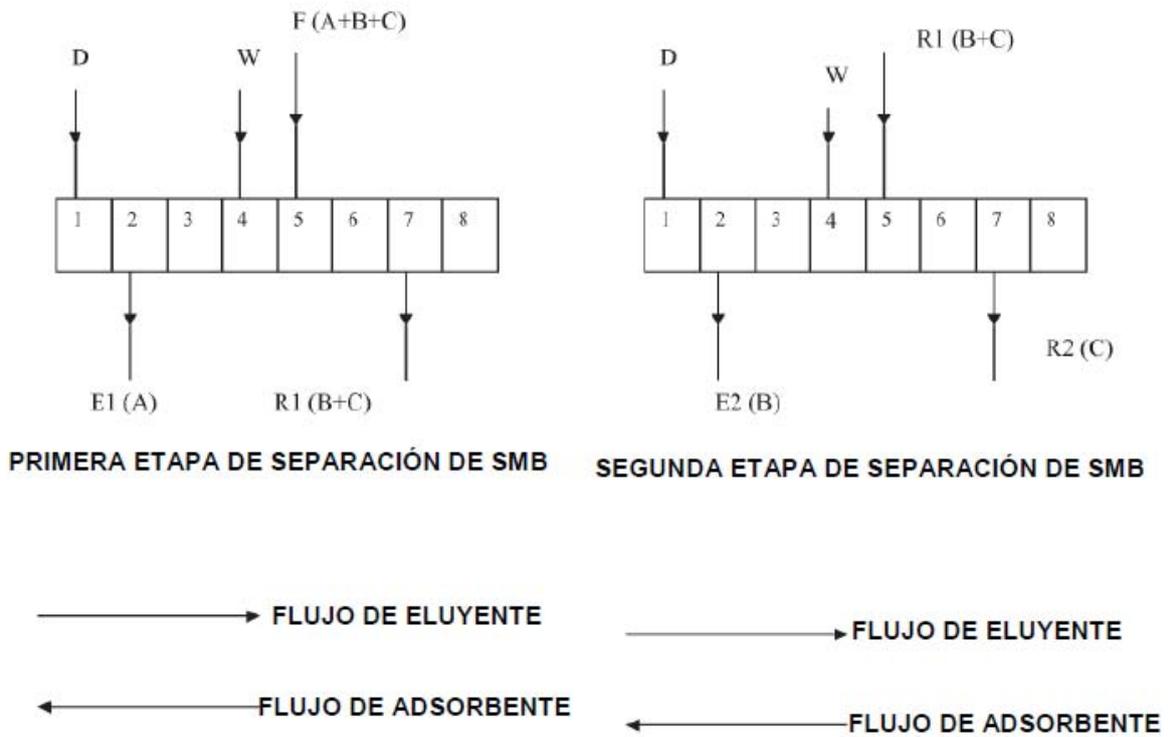


Figura 9

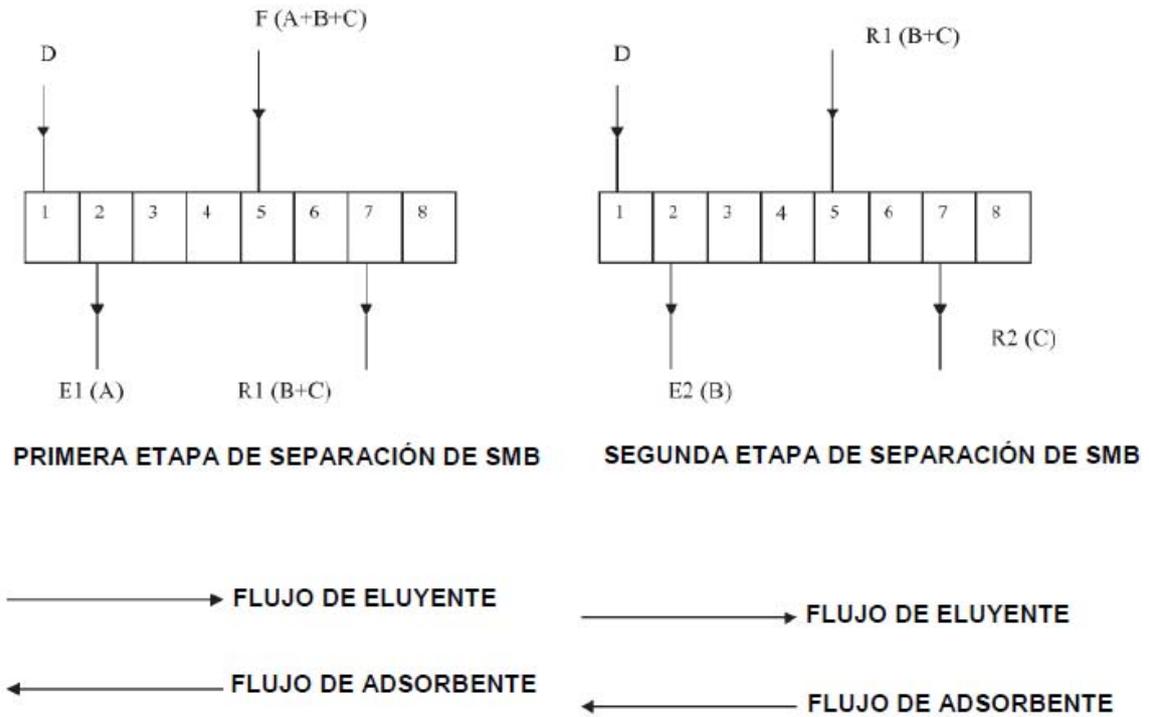


Figura 10

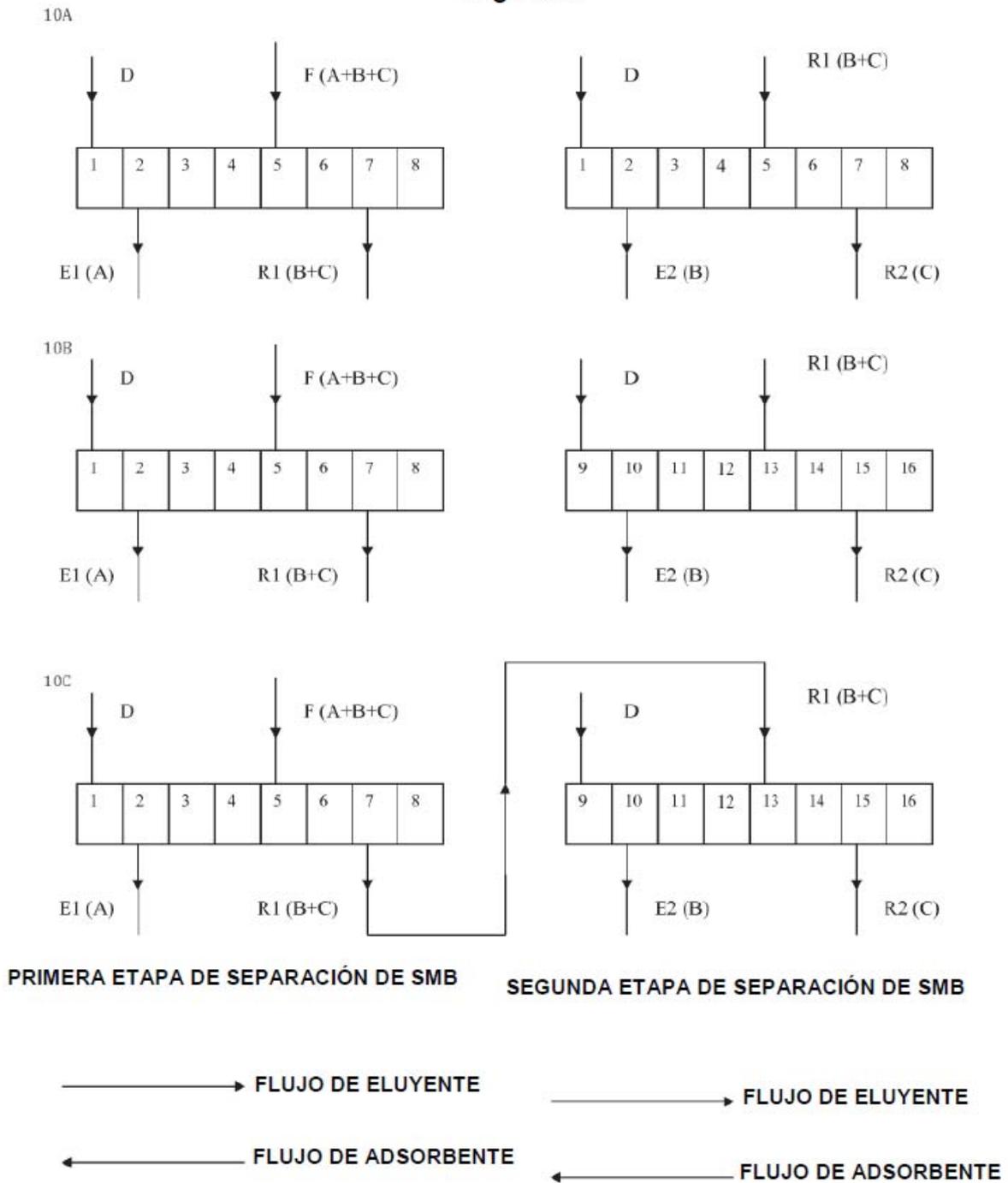


Figura 11

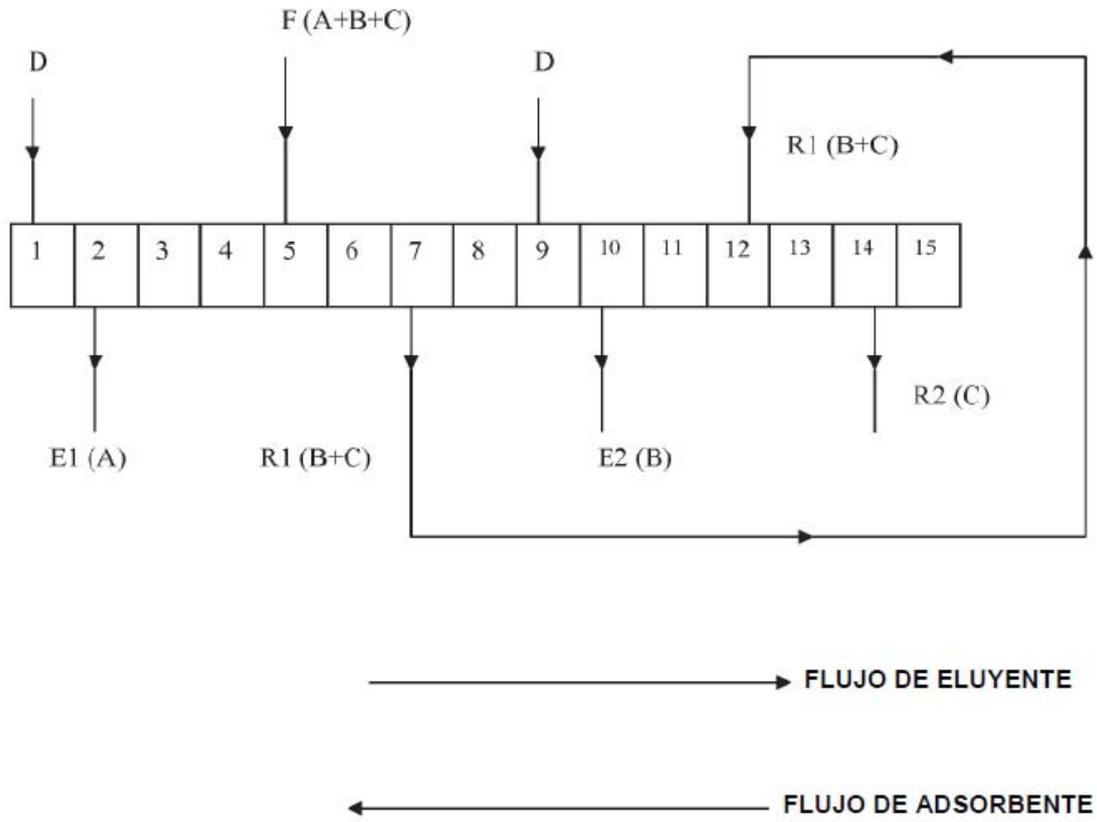


Figura 12

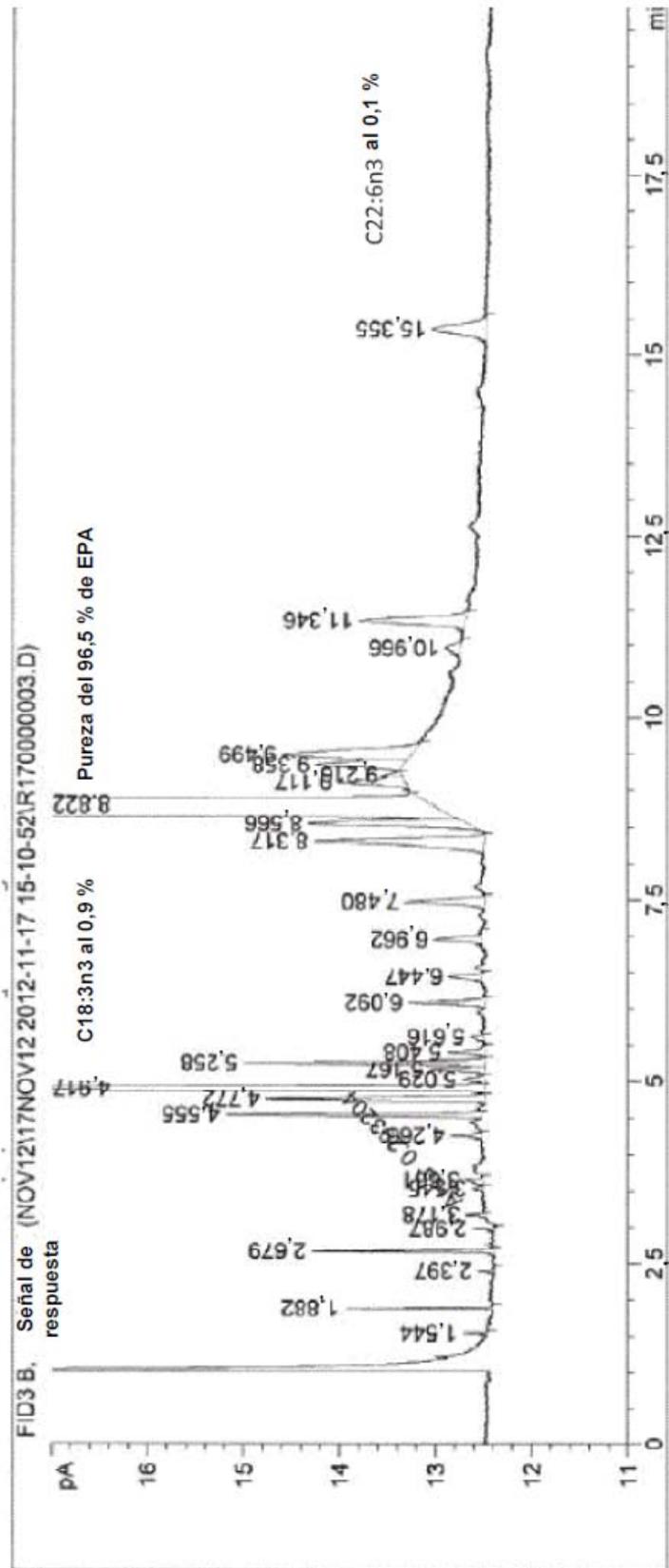


Figura 14

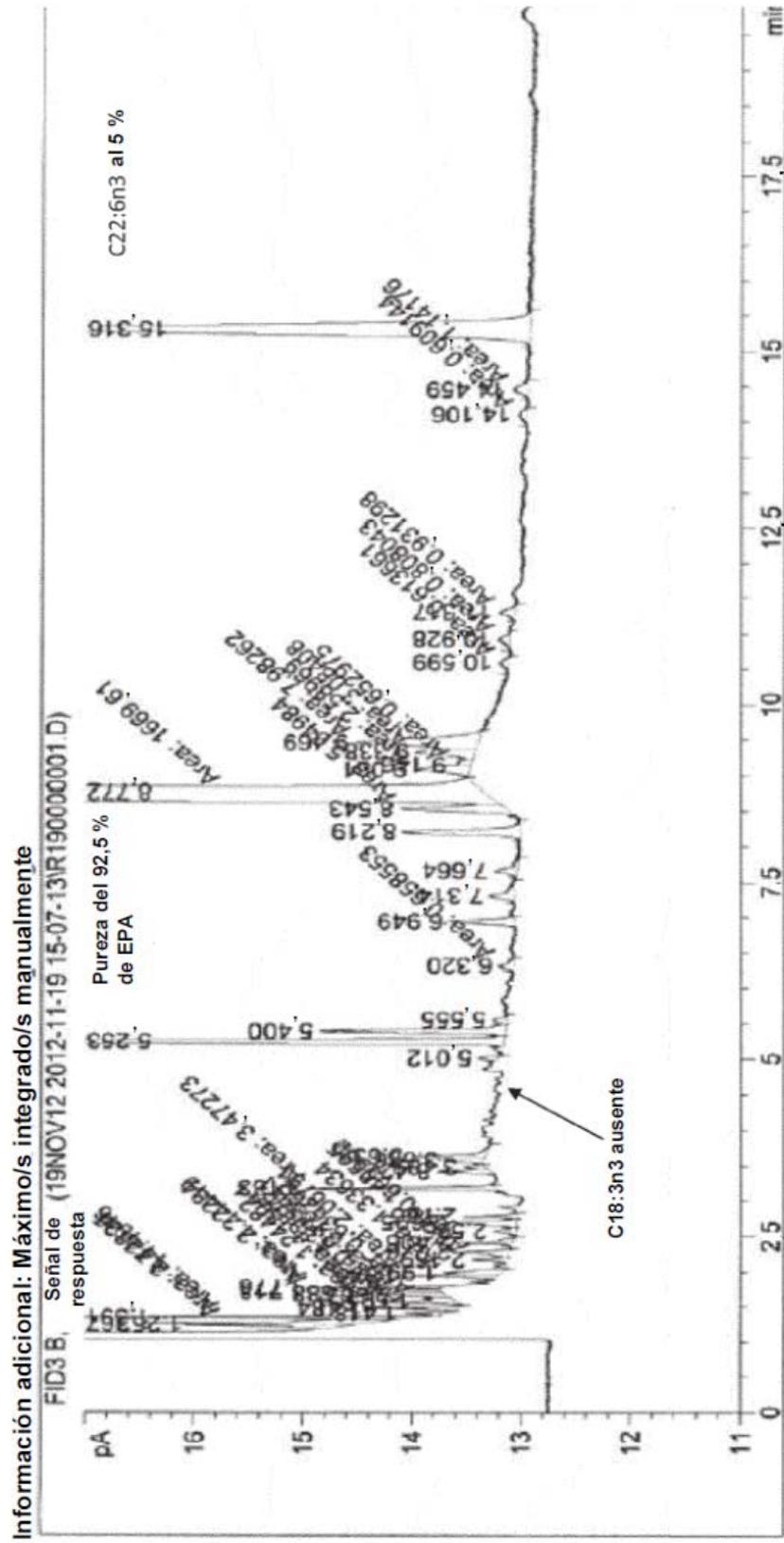


Figura 15

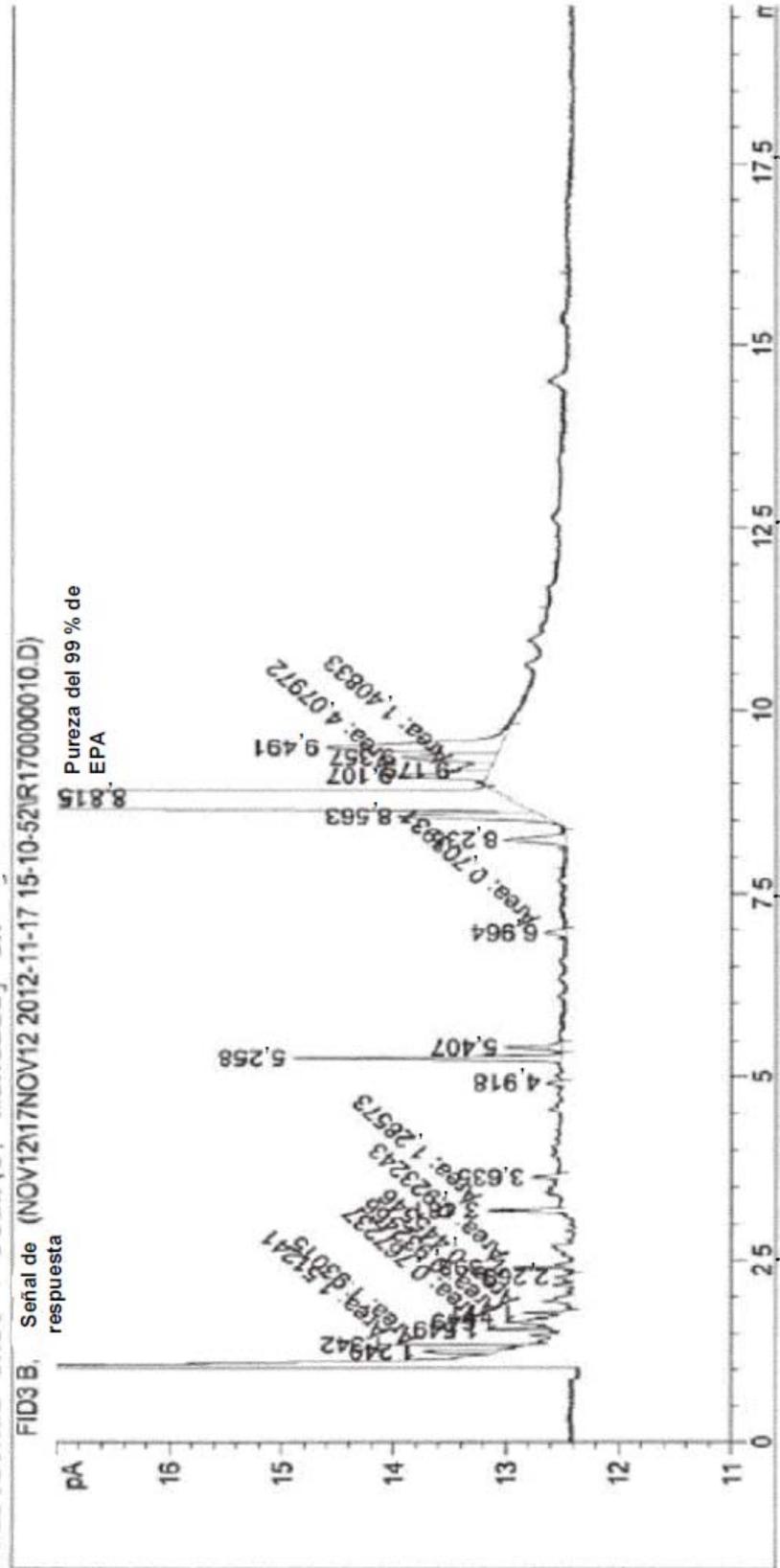


Figura 16

Archivo de la secuencia: C:\Chem32\1\DATA\NOV12\06NOV12 2012-11-06 12-18-47\06NOV12.S
 Método : C:\Chem32\1\DATA\NOV12\06NOV12 2012-11-06 12-18-47\775.M (Método de la secuencia)
 Último cambio : 11/6/2012 12:18:48 PM por Janet Wright
 Información del método : Método de etilésteres cuantitativo 775, JW 13/03/12

