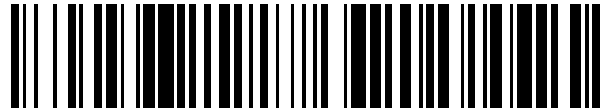


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 652**

51 Int. Cl.:

B01D 15/18	(2006.01)
C11B 7/00	(2006.01)
C11C 1/00	(2006.01)
C11C 1/08	(2006.01)
C11B 3/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/GB2012/051596**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12738160 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2613862**

54 Título: **Nuevo proceso SMB**

30 Prioridad:
06.07.2011 GB 201111589

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2019

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

72 Inventor/es:
**KELLIHER, ADAM;
MORRISON, ANGUS;
OROSKAR, ANIL;
NAIR REMA, RAKESH VIKRAMAN y
AGARWAL, ABHILESH**

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 710 652 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

Nuevo proceso SMB

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

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

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

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

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

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

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

40 Los procesos y el equipo para cromatografía de lecho móvil simulado se describen en varias patentes, como las patentes US-2.985.589, US- 3.696.107, US-3.706.812, US-3.761.533, FR-A-2103302, FR-A-2651148 y FR-A-2651149. El tema también se trata con mayor detalle en el documento "Preparative and Production Scale Chromatography", editado por Ganetsos and Barker, Marcel Dekker Inc, Nueva York, 1993.

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

50 Los procesos y el equipo para cromatografía de lecho móvil real se describen en varias patentes, como las patentes US-6.979.402, US- 5.069.883 y US-4.764.276.

65

El documento WO 2007/075499 describe un método para preparar composiciones usando cromatografía de argentación, que utiliza una resina catiónica argentizada o una alúmina argentizada acondicionada para separar compuestos que contienen cadenas de carbono saturadas o monoinsaturadas de compuestos que tienen cadenas de carbono poliinsaturadas presentes en una composición de partida. El documento WO 2007/075499 también describe un método para preparar un adsorbente de alúmina argentizado condicionado que tiene una mayor selectividad para compuestos que contienen una o más cadenas de carbono poliinsaturadas.

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

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

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

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

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

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

Sumario de la invención

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

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

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

(b) las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en un primer y segundo aparatos de cromatografía independientes respectivamente, introduciéndose el producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación en el segundo aparato de cromatografía, y separando el producto de PUFA de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; y
 en el que el eluyente disolvente orgánico acuoso usado en cada etapa de separación tiene una relación en volumen de agua:disolvente orgánico diferente; y

en el que (1) el producto intermedio se recoge como la corriente de refinado en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como la corriente de extracto en la segunda etapa de separación; o

(2) el producto intermedio se recoge como la corriente de extracto en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como la corriente de refinado en la segunda etapa de separación.

También se divulga en la presente memoria un producto de PUFA que se puede obtener mediante el proceso de la presente invención.

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

La presente invención también proporciona un programa informático para controlar un aparato cromatográfico tal como se define en la presente memoria, programa informático que contiene un medio de código que, cuando se ejecuta ordena al aparato que lleve a cabo el proceso de la invención.

Descripción de las Figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La Figura 10 ilustra tres maneras en las que puede llevarse a cabo el proceso de separación cromatográfica de

la invención.

La Figura 11 muestra un análisis por HPLC de una carga de alimentación rica en EPA que puede usarse adecuadamente como la mezcla de alimentación en el proceso de la presente invención.

La Figura 12 muestra un análisis por HPLC de las corrientes de refinado (R) y del extracto (E) obtenidas en la primera etapa de separación de un proceso de acuerdo con la presente invención.

La Figura 13 muestra un análisis por HPLC de las corrientes de refinado (R) y del extracto (E) obtenidas en la segunda etapa de separación de un proceso de acuerdo con la presente invención.

La Figura 14 muestra un análisis por HPLC más detallado de la corriente del extracto obtenida en la segunda etapa de separación de un proceso de acuerdo con la presente invención.

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

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

Descripción detallada de la invención

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

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

Detalles adicionales de esta realización se pueden consultar en la solicitud de patente internacional n° PCT/GB 10/002339. El proceso de separación cromatográfica de la invención es normalmente diferente de los procesos desvelados en el documento PCT/GB 10/002339.

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

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

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

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

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

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

En una realización la más preferida, el producto de PUFA es EPA o éster etílico del EPA que se produce con una pureza mayor del 90 %, preferiblemente con una pureza mayor del 95 %, y más preferiblemente con una pureza mayor del 97 %.

10 Normalmente, además de dicho producto de PUFA, se recoge un producto de PUFA secundario adicional en el proceso de separación cromatográfica de la invención. Preferiblemente, el producto de PUFA es EPA y el producto de PUFA secundario adicional es DHA.

15 En una realización adicional de la invención, el aparato está configurado para recoger un producto de PUFA que es una mezcla concentrada de EPA y DHA. Por lo tanto, se usa una mezcla de alimentación que contiene EPA, DHA, componentes que son más polares que EPA y DHA, y componentes que son menos polares que EPA y DHA. En la primera etapa de separación, el material menos polar que EPA y DHA se retira normalmente. En la segunda etapa de separación, el material que es más polar que EPA y DHA se retira normalmente, y una mezcla concentrada de
20 EPA y DHA se recoge como el producto de PUFA.

Mezclas de alimentación adecuadas para fraccionamiento mediante el proceso de la presente invención pueden obtenerse de fuentes naturales que incluyen aceites y grasas vegetales y animales, y de fuentes sintéticas que incluyen aceites obtenidos de plantas, animales y microorganismos incluyendo levaduras modificadas genéticamente. Los ejemplos incluyen aceites de pescado, aceites de algas y microalgas y aceites vegetales, por
25 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 PUFA deseado es EPA y/o DHA. El aceite de cártamo genéticamente modificado es particularmente adecuado cuando el producto de PUFA deseado es GLA. La levadura genéticamente modificada es particularmente adecuada cuando el producto de PUFA deseado es EPA.
30

En una realización particularmente preferida, la mezcla de alimentación es un aceite de pescado o carga de alimentación derivada de aceite de pescado. Se ha descubierto ventajosamente que, cuando se usa un aceite de pescado o carga de alimentación derivada de aceite de pescado, puede producirse un producto de PUFA de EPA o éster etílico del EPA mediante el proceso de la presente invención con más del 90 % de pureza, preferiblemente más del 95 % de pureza, y más preferiblemente más del 97 % de pureza.
35

La mezcla de alimentación puede someterse a tratamiento químico antes de fraccionamiento mediante el proceso de la invención. Por ejemplo, puede someterse a transesterificación con glicéridos o hidrólisis de glicéridos seguida en algunos casos de procesos selectivos tales como cristalización, destilación molecular, fraccionamiento con urea, extracción con nitrato de plata u otras soluciones de sales metálicas, yodolactonización o fraccionamiento con fluido supercrítico. Como alternativa, una mezcla de alimentación puede usarse directamente sin ninguna etapa de tratamiento inicial.
40

Las mezclas de alimentación normalmente contienen el producto de PUFA y al menos un componente más polar y al menos un componente menos polar. Los componentes menos polares tienen una adherencia más fuerte al adsorbente usado en el proceso de la presente invención que la del producto de PUFA. Durante el funcionamiento, dichos componentes menos polares normalmente se mueven con la fase adsorbente sólida en preferencia con respecto a la fase eluyente líquida. Los componentes más polares tienen una adherencia más débil al adsorbente usado en el proceso de la presente invención que la del producto de PUFA. Durante el funcionamiento, dichos componentes más polares normalmente se mueven con la fase eluyente líquida en preferencia con respecto a la fase adsorbente sólida. En general, los componentes más polares se separarán en una corriente de refinado, y los componentes menos polares se separarán en una corriente de extracto.
50

Los ejemplos de los componentes más y menos polares incluyen (1) otros compuestos que existen en aceites naturales (por ejemplo aceites marinos o aceites vegetales), (2) subproductos formados durante las etapas de almacenamiento, refinado y concentración previa y (3) contaminantes procedentes de disolventes o reactivos que se utilizan durante etapas previas de concentración o purificación.
55

Los ejemplos de (1) incluyen otros PUFA 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 pesticidas clorados son todos componentes altamente no polares.
60

Los ejemplos de (2) incluyen isómeros y productos de oxidación o descomposición del producto de PUFA, por ejemplo, productos poliméricos de autooxidación de ácidos grasos o sus derivados.
65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

35 Tal como se usa en la presente memoria, 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 tienen uno o más puntos de inyección para una corriente de mezcla de alimentación, uno o más puntos de inyección para agua y/o disolvente orgánico, una corriente de extracción de refinado a partir de la cual puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas, y una corriente de extracción de extracto a partir de la cual puede recogerse líquido de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas.

45 El aparato de cromatografía usado en cada etapa del proceso de la presente invención tiene un único conjunto de columnas de cromatografía unidas en serie que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso. Normalmente, cada una de las columnas de cromatografía está unida a las dos columnas en el aparato adyacentes a esa columna. Por lo tanto, la salida de una columna dada del conjunto está conectada a la entrada de la columna adyacente del grupo, que está aguas abajo con respecto al flujo de eluyente del grupo. Por lo tanto, el eluyente puede fluir alrededor del grupo de columnas de cromatografía unidas. Normalmente, ninguna de las columnas de cromatografía está unida a columnas no adyacentes en el aparato.

50 Tal como se usa en la presente memoria la expresión "no adyacente" se refiere a columnas, en por ejemplo el mismo aparato, separadas por una o más columnas, preferiblemente 3 o más columnas, más preferiblemente 5 o más columnas, lo más preferentemente aproximadamente 5 columnas.

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

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

65 El término "extracto" es bien conocido por el experto en la materia. En el contexto de la cromatografía de lecho móvil real y simulado se refiere a la corriente de componentes que se mueven más rápidamente con la fase adsorbente

sólida en comparación con la fase eluyente líquida. Por lo tanto, una corriente de extracto está normalmente enriquecida en componentes menos polares, y empobrecida en componentes más polares en comparación con una corriente de alimentación.

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

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

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

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

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

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

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

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

65 El tiempo de etapa, es decir el tiempo entre el desplazamiento de los puntos de inyección de la mezcla de alimentación y eluyente, y los diversos puntos de extracción de las fracciones recogidas, no está particularmente limitado, y dependerá del número y las dimensiones de las columnas usadas, y el caudal que fluye a través del

aparato. Un experto en la materia podrá determinar fácilmente los tiempos de etapa apropiados para usar en el proceso de la presente invención. El tiempo de etapa es normalmente de 100 a 1000 segundos, preferiblemente de 200 a 800 segundos, más preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 750 segundos. En algunas realizaciones, un tiempo de etapa apropiado es de 100 a 400 segundos, preferiblemente de 200 a 300 segundos, más preferiblemente aproximadamente 250 segundos. En otras realizaciones, un tiempo de etapa apropiado es de 600 a 900 segundos, preferiblemente de 700 a 800 segundos, más preferiblemente aproximadamente 750 segundos.

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

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

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

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

Normalmente, el proceso de la presente invención se realiza a una temperatura de 15 a 55 °C, preferiblemente de 20 a 40 °C, más preferiblemente a aproximadamente 30 °C. Por lo tanto, el proceso se lleva a cabo normalmente a temperatura ambiente, pero pueden realizarse a temperaturas elevadas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Por lo tanto, las condiciones del proceso en las primera y segunda etapas de separación varían. Las condiciones del proceso que varían pueden incluir, por ejemplo, el tamaño de las columnas usadas, el número de columnas usadas, el relleno usado en las columnas, el tiempo de etapa del aparato de SMB, la temperatura del aparato, o el eluyente usado en las etapas de separación.

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

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

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

En una realización, (1), el producto intermedio se recoge como la corriente de refinado en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como la corriente de extracto en la segunda etapa de separación. Por lo tanto, la corriente de refinado recogida en la primera etapa de separación se usa como mezcla de alimentación en

la segunda etapa de separación. La corriente de refinado recogida en la primera etapa de separación normalmente contiene el producto de PUFA junto con componentes más polares.

5 En otra realización, (2), el producto intermedio se recoge como corriente de extracto en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como corriente de refinado en la segunda etapa de separación. Por lo tanto, la corriente de extracto recogida en la primera etapa de separación se usa como mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación. La corriente de extracto recogida en la primera etapa de separación normalmente contiene el producto de PUFA junto con componentes menos polares.

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

15 Preferiblemente, el producto de PUFA se separa de componentes menos polares de la mezcla de alimentación en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se separa de componentes más polares de la mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación.

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

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

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

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

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

45 El caudal de recirculación de extracto en la segunda etapa de separación es el caudal con el cual el extracto recogido en la parte inferior de la columna 2 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación se alimenta al interior de la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, es decir el caudal de líquido introducido en el interior de la parte superior de la columna 3 del aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación.

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

65

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

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

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

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

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

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

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

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

35 Los disolventes de éster son bien conocidos por el experto 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 acetato de metilo y acetato de etilo.

40 Los disolventes cetónicos son bien conocidos por el experto en la materia. Las cetonas son normalmente 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 C₁-C₆ lineal o ramificado. El grupo alquilo C₁-C₆ está preferiblemente sin sustituir. Las cetonas preferidas incluyen acetona, metiletilcetona y metil isobutil cetona (MIBK).

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

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

50 El disolvente orgánico acuoso es preferiblemente metanol acuoso o acetonitrilo acuoso. El metanol acuoso es más preferido.

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

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

60 Cuando el disolvente orgánico acuoso es acetonitrilo acuoso, el eluyente normalmente contiene hasta el 30 % en peso de agua, el resto acetonitrilo. Preferiblemente, el eluyente contiene del 5 al 25 % en peso de agua, el resto acetonitrilo. Más preferiblemente, el eluyente contiene del 10 al 20 % en peso de agua, el resto acetonitrilo. Aún más

preferiblemente, el eluyente contiene del 15 al 25 % en peso de agua, el resto acetonitrilo.

5 El eluyente de disolvente orgánico acuoso utilizado en cada etapa de separación tiene una relación de agua:disolvente orgánico diferente. La relación de agua:disolvente orgánico utilizada en cada etapa de separación se ajusta preferiblemente de manera que el producto de PUFA se pueda separar de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.

10 La potencia de elución del eluyente utilizado en cada una de las etapas de separación es normalmente diferente. Preferiblemente, la potencia de elución del eluyente usado en la primera etapa de separación es mayor que la del eluyente usado en la segunda etapa de separación. En la práctica, esto se logra variando las cantidades relativas de agua y disolvente orgánico utilizadas en cada etapa de separación.

15 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 un alcohol o acetonitrilo acuoso, la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la primera etapa de separación es normalmente mayor que la cantidad de alcohol o acetonitrilo en el eluyente usado en la segunda etapa de separación.

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

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

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

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

40 Normalmente, la relación agua:disolvente orgánico del eluyente en cada etapa de separación se controla introduciendo agua y/o disolvente orgánico en una o más columnas en los aparatos cromatográficos utilizados en las etapas de separación. Así, por ejemplo, para lograr una relación de agua/disolvente orgánico más baja en la primera etapa de separación que en la segunda etapa de separación, el agua se introduce normalmente más lentamente en el aparato cromatográfico utilizado en la primera etapa de separación que en la segunda etapa de separación.

45 En algunas realizaciones, el disolvente orgánico esencialmente puro y el agua esencialmente pura se pueden introducir en diferentes puntos del aparato cromatográfico utilizado en cada etapa de separación. Los caudales relativos de estas dos corrientes determinarán el perfil global del disolvente en el aparato cromatográfico. En otras realizaciones, se pueden introducir diferentes mezclas de disolvente orgánico/agua en diferentes puntos en cada aparato cromatográfico utilizado en cada etapa de separación. Eso implicará la introducción de dos o más mezclas diferentes de disolvente orgánico/agua en el aparato cromatográfico utilizado en una etapa de separación particular, teniendo cada mezcla de disolvente orgánico/agua una relación diferente de disolvente orgánico:agua. Los caudales relativos y las concentraciones relativas de las mezclas de disolvente orgánico/agua en esta realización determinarán el perfil global del disolvente en el aparato cromatográfico utilizado en esa etapa de separación.

50 En el proceso de separación cromatográfica de la invención, o bien (1) el producto intermedio que contiene el producto de PUFA junto con componentes más polares se recoge como la corriente de refinado en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como la corriente de extracto en la segunda etapa de separación; o (2) el producto intermedio que contiene el producto de PUFA junto con componentes menos polares se recoge como la corriente de extracto en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como la corriente de refinado en la segunda etapa de separación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Normalmente en esta realización, cuando se introduce agua en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación, el agua se introduce en el aparato cromatográfico usado en la segunda etapa de separación

aguas arriba del punto de introducción del producto intermedio pero aguas abajo del punto de eliminación de la segunda corriente de extracto, con respecto al flujo de eluyente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El proceso de la invención permite que se consigan purzas de producto de PUFA mucho mayores de lo que ha sido posible con las técnicas cromatográficas convencionales. Los productos de PUFA producidos mediante el proceso de la invención tienen también perfiles de impureza particularmente ventajosos, que son bastante diferentes de los observados en aceites preparados mediante técnicas conocidas. Por lo tanto, en la presente memoria también se divulgan composiciones que comprenden un producto de PUFA, por ejemplo uno que se puede obtener mediante el proceso de la presente invención.

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

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Una carga de alimentación derivada de aceite de pescado (55 % en peso de EE del EPA, 5 % en peso de EE del DHA) se fracciona usando un sistema de cromatografía de lecho móvil real usando gel de sílice C18 unido (tamaño de partícula 5 μm) como fase estacionaria y metanol acuoso como eluyente de acuerdo con el sistema ilustrado esquemáticamente en la Figura 9. Están en conectadas en serie 8 columnas (diámetro: 4,6 mm, longitud 250 mm), tal como se muestra en la Figura 9.

La mezcla de alimentación se pasó a través del aparato SMB en una primera etapa de separación. En la primera etapa de separación, las condiciones del proceso se ajustaron para purificar el EPA del DHA y otras impurezas de avance lento. El EPA, junto con otras impurezas de avance rápido, se recogió en la corriente de refinado como producto intermedio. Se rechazó la corriente de extracto que contenía DHA y otras impurezas de avance lento.

Las condiciones de proceso del aparato SMB se ajustaron a continuación para la segunda etapa de separación. En la segunda etapa de separación, las condiciones del proceso se ajustaron para purificar el EPA de las impurezas de avance más rápido. El eluyente de metanol acuoso usado en la segunda etapa de separación tenía una relación mayor de agua:disolvente orgánico que el eluyente de metanol acuoso usado en la primera etapa de separación. El producto intermedio se introdujo en el aparato SMB como la mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación. Se recogió EPA de alta pureza como la corriente de extracto. Se rechazó la corriente de refinado que contiene impurezas de avance rápido.

El EPA se produjo con una pureza final de ~95 % y una recuperación de ~ 95%.

Un análisis de HPLC de la materia prima se muestra en la Figura 11.

Los análisis de HPLC de las corrientes de refinado (R) y extracto (E) de la primera etapa de separación se muestran en la Figura 12.

Los análisis de HPLC de las corrientes de refinado (R) y extracto (E) de la segunda etapa de separación se muestran en la Figura 13. Un análisis de HPLC más detallado de la corriente de extracto de la segunda etapa de separación se muestra en la Figura 14.

Las Figuras 12 y 13 también muestran las condiciones del proceso para las etapas de separación primera y segunda.

Ejemplo de referencia 1

5 Se llevó a cabo un experimento para comparar la cantidad de contaminantes ambientales presentes en dos productos de PUFA producidos por SMB con aceites similares preparados por destilación. Los perfiles de los contaminantes de los aceites se muestran en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

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

Ejemplo de referencia 2

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

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

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

Ejemplo de referencia 3

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

Ácido graso	Producto de PUFA producido mediante SMB [1]	Producto de PUFA producido mediante SMB [2]	Aceite destilado [1]	Aceite destilado [2]
EPA (C20:5n-3)	98,33	97,04	98,09	98,14
DHA (C22:6n-3)	0,15	<LOD	0,34	< LOD
C18:3 n-3	< LOD	0,28	0,24	< LOD
C18:4 n-3	0,33	0,20	0,14	0,26
C20:4 n-3	0,14	0,45	0,18	0,46
C21:5 n-3	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

ES 2 710 652 T3

Ácido graso	Producto de PUFA producido mediante SMB [1]	Producto de PUFA producido mediante SMB [2]	Aceite destilado [1]	Aceite destilado [2]
C22:5 n-3	0,32	<LOD	< LOD	< LOD
Total Omega-3	99,27	97,97	98,94	98,86
C18:3n-6	< LOD	< LOD	0,05	< LOD
C20:3 n-6	< LOD	< LOD	0,13	0,11
C20:4 n-6	< LOD	0,21	0,26	0,37
Total Omega-6	< LOD	0,21	0,44	0,48

Ejemplo de referencia 4

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de separación cromatográfica para recuperar un producto de ácido graso poliinsaturado (PUFA) a partir de una mezcla de alimentación, proceso que comprende las etapas de:
- 5
- (i) purificar la mezcla de alimentación en una primera etapa de separación en un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener un producto intermedio; y
- 10
- (ii) purificar el producto intermedio obtenido en (i) en una segunda etapa de separación usando un aparato de cromatografía de lecho móvil simulado o real que tiene una pluralidad de columnas de cromatografía unidas que contienen, como eluyente, un disolvente orgánico acuoso, para obtener el producto de PUFA; en el que
- (a) las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo secuencialmente en el mismo aparato de cromatografía, recuperándose el producto intermedio entre las primera y segunda etapas de separación y ajustándose las condiciones del proceso en el aparato de cromatografía entre las primera y segunda etapas de separación de modo que el producto de PUFA se separa de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; o
- 15
- (b) las primera y segunda etapas de separación se llevan a cabo en un primer y segundo aparatos de cromatografía independientes respectivamente, introduciéndose el producto intermedio obtenido de la primera etapa de separación en el segundo aparato de cromatografía, y separando el producto de PUFA de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación; y
- 20
- en el que el eluyente disolvente orgánico acuoso usado en cada etapa de separación tiene una relación en volumen de agua:disolvente orgánico diferente; y
- (1) el producto intermedio se recoge como la corriente de refinado en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como la corriente de extracto en la segunda etapa de separación; o
- 25
- (2) el producto intermedio se recoge como la corriente de extracto en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se recoge como la corriente de refinado en la segunda etapa de separación.
- 30
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que cada aparato tiene una corriente de extracto y una corriente de refinado a partir de las cuales puede recogerse líquido procedente de dicha pluralidad de columnas de cromatografía unidas.
- 35
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el producto intermedio recuperado de la primera etapa de separación está enriquecido en el producto de PUFA en comparación con la mezcla de alimentación.
4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de PUFA se separa de componentes menos polares de la mezcla de alimentación en la primera etapa de separación, y el producto de PUFA se separa de componentes más polares de la mezcla de alimentación en la segunda etapa de separación.
- 40
5. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de PUFA comprende al menos un PUFA ω -3 y en el que el producto de PUFA comprende preferiblemente EPA y/o DHA.
- 45
6. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el eluyente es una mezcla de agua y un alcohol, un éter, un éster, una cetona o un nitrilo, y en el que el eluyente es preferiblemente una mezcla de agua y metanol.
- 50
7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la mezcla de alimentación es un aceite de pescado o una carga de alimentación derivada de aceite de pescado, el producto de PUFA es EPA o éster etílico del EPA, y el producto de PUFA se produce con una pureza mayor del 90 %, preferiblemente con una pureza mayor del 95 % y más preferiblemente con una pureza mayor del 97 %.
- 55
8. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
- (a) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y/o
- 60
- (b) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la primera etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la primera etapa de separación; y/o
- (c) parte de la corriente de extracto procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación; y/o
- (d) parte de la corriente de refinado procedente del aparato usado en la segunda etapa de separación se recircula de vuelta al interior del aparato usado en la segunda etapa de separación.
- 65

ES 2 710 652 T3

9. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación de agua:disolvente orgánico usada en cada etapa de separación se ajusta de tal manera que el producto de PUFA se puede separar de diferentes componentes de la mezcla de alimentación en cada etapa de separación.
- 5 10. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación en volumen de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación es menor que la relación en volumen de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda etapa de separación.
- 10 11. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación en volumen de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera etapa de separación es de 0,5:99,5 a 1,5:98,5 partes en volumen, y la relación en volumen de agua:disolvente orgánico del eluyente en la segunda etapa de separación es de 4,5:95:5 a 5,5:94,5 partes en volumen.
- 15 12. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la relación en volumen de agua:disolvente orgánico del eluyente en la primera y segunda etapas de separación se controla introduciendo agua y/o disolvente orgánico en una o más columnas en los aparatos usados en la primera y segunda etapas de separación.
- 20 13. Un programa informático para controlar un aparato de cromatografía como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, programa informático que contiene un medio de código que, cuando se ejecuta, indica al aparato que lleve a cabo un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

Figura 1

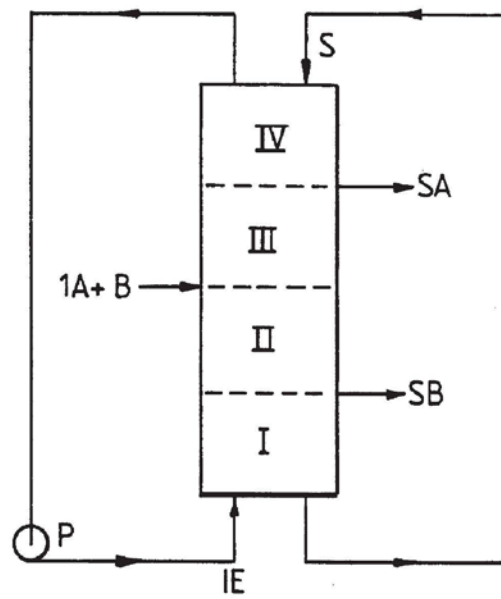


Figura 2

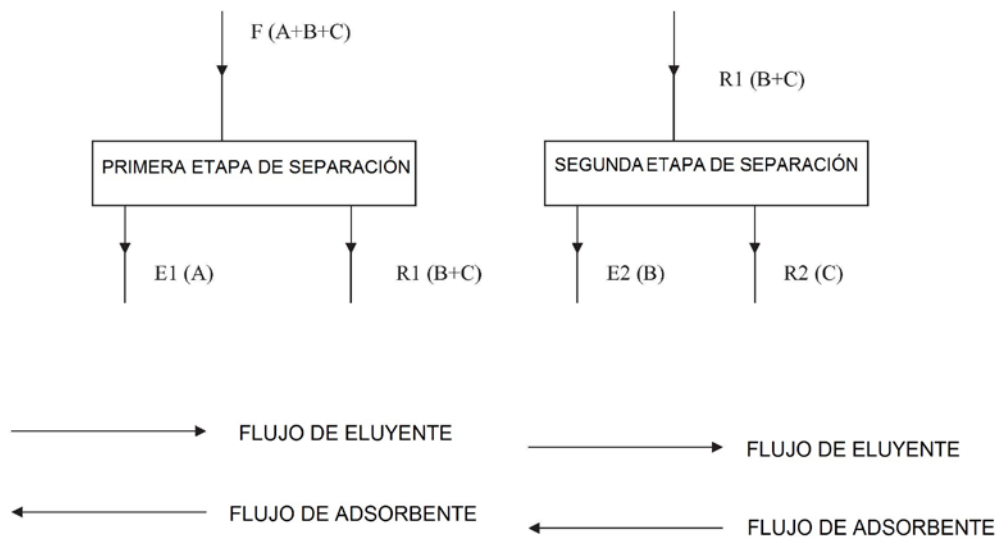


Figura 3

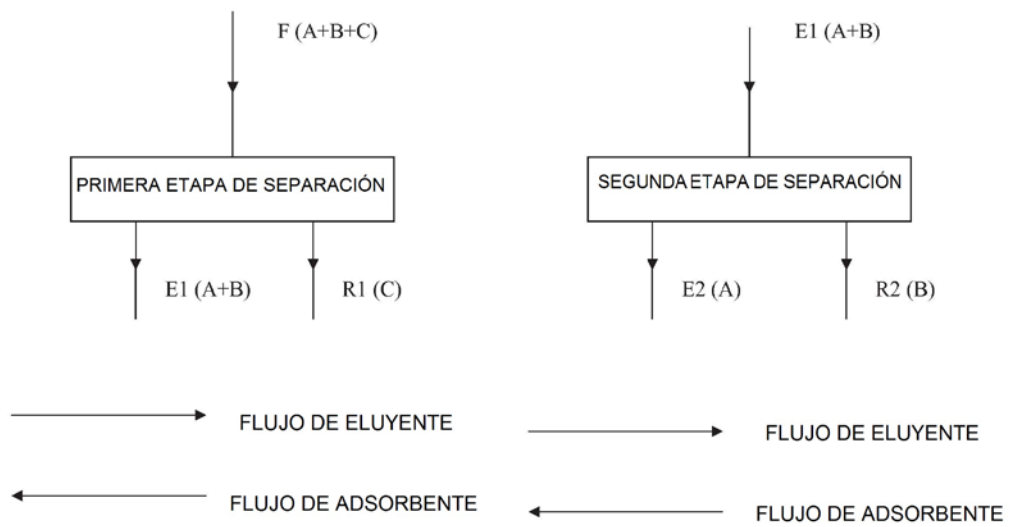


Figura 4

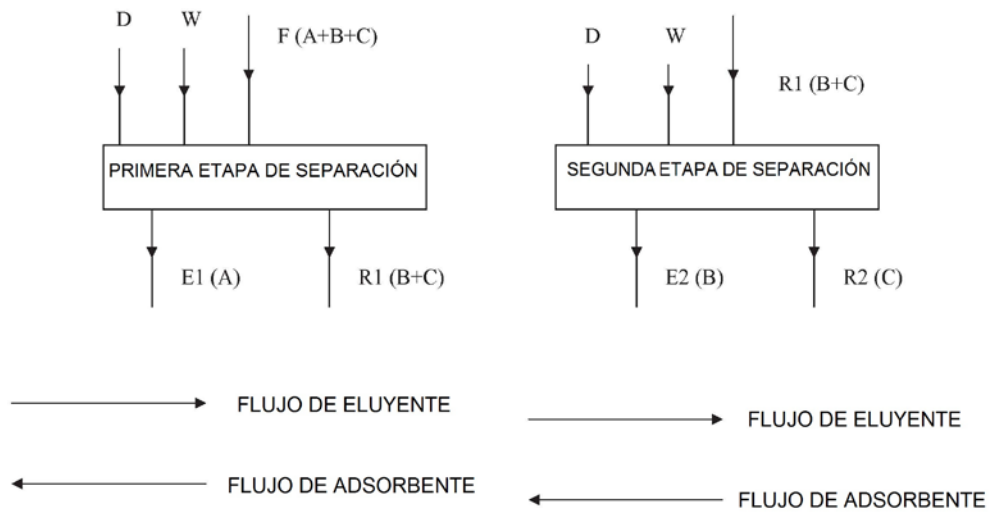


Figura 5

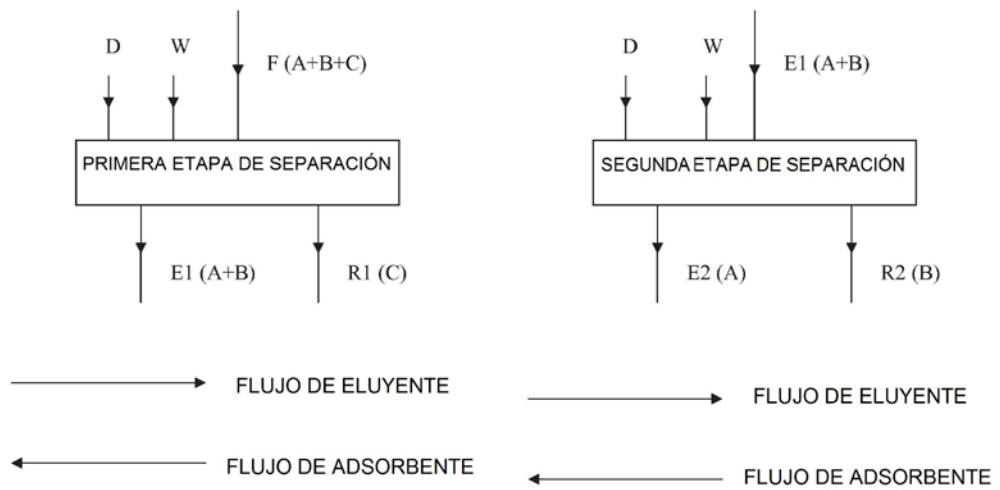


Figura 6

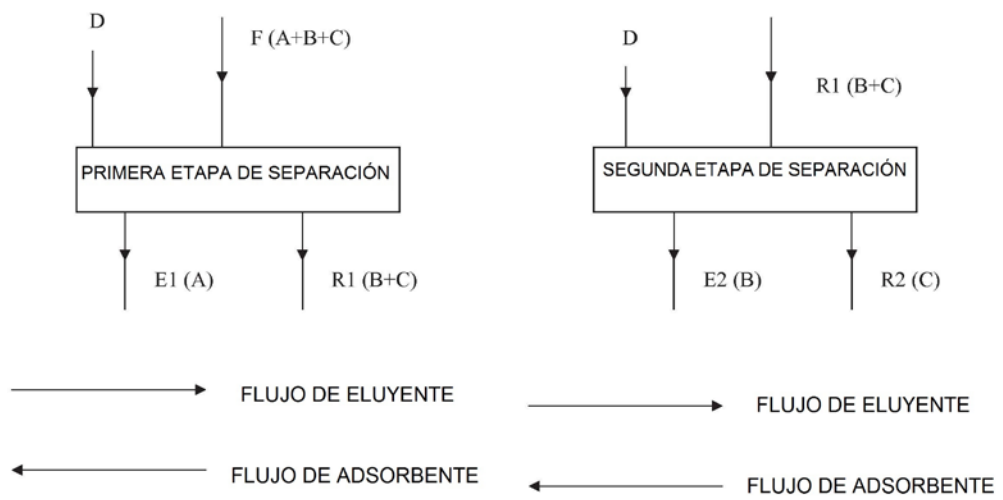


Figura 7

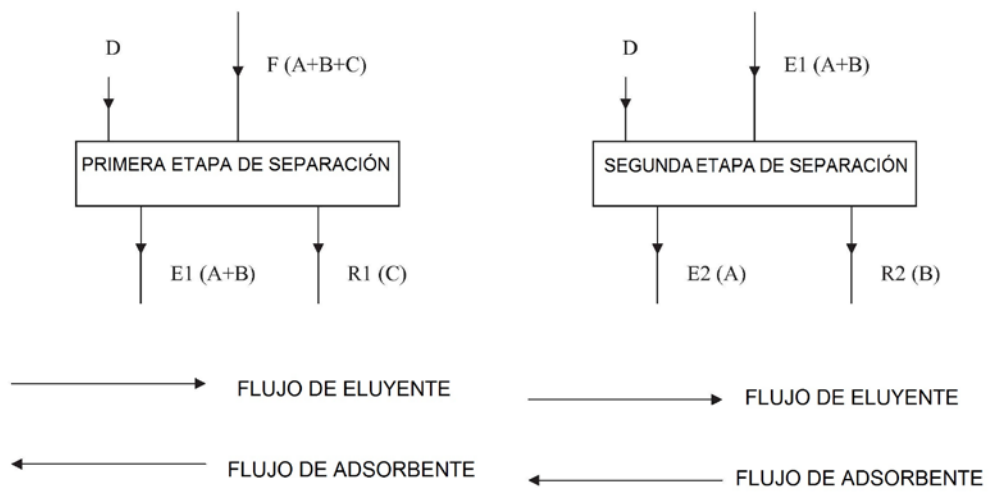


Figura 8

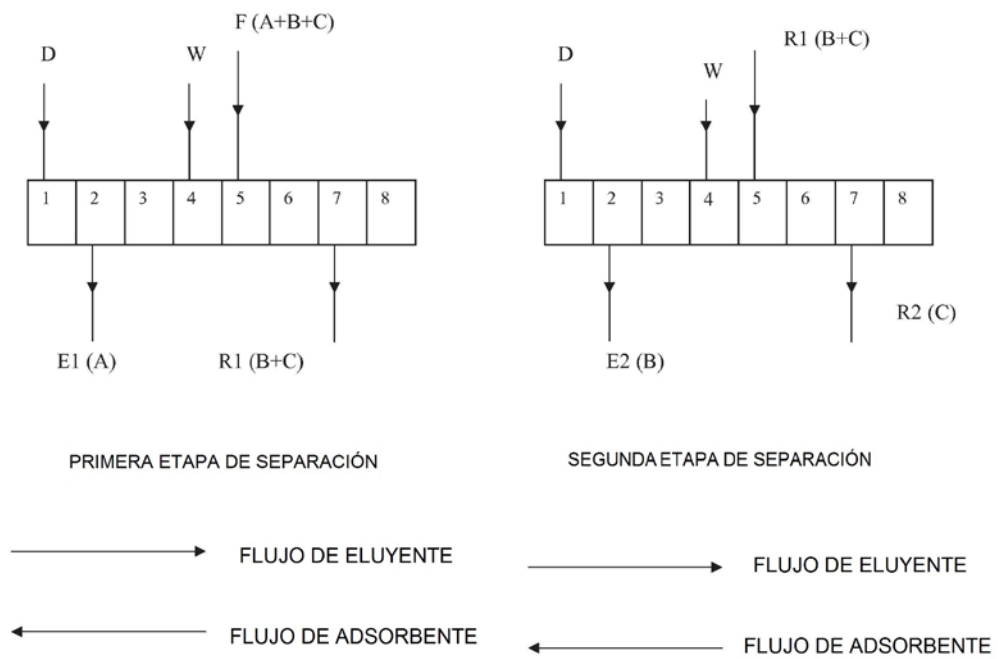


Figura 9

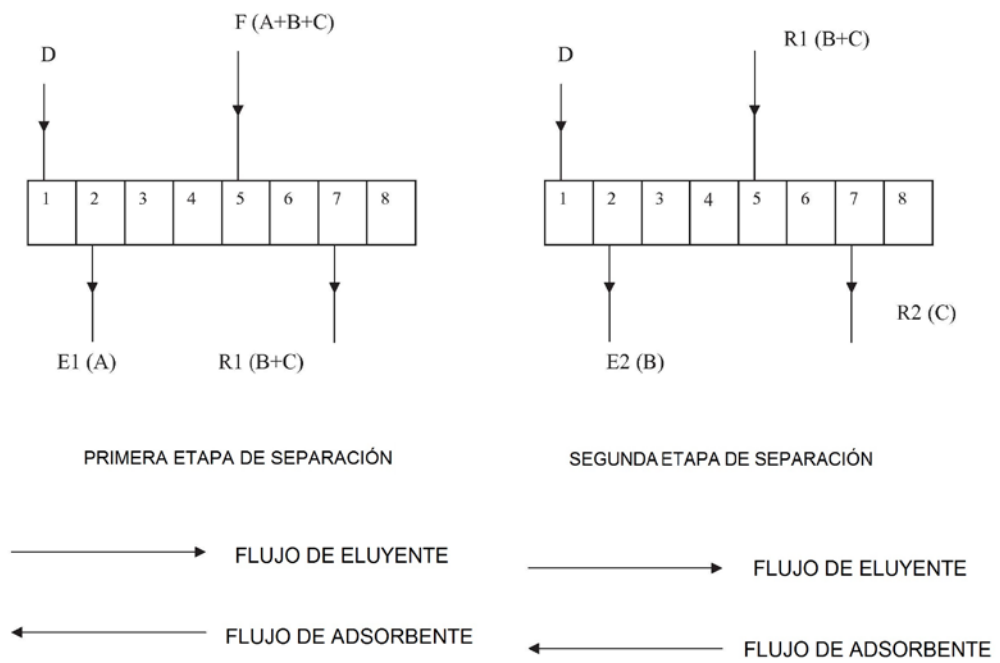
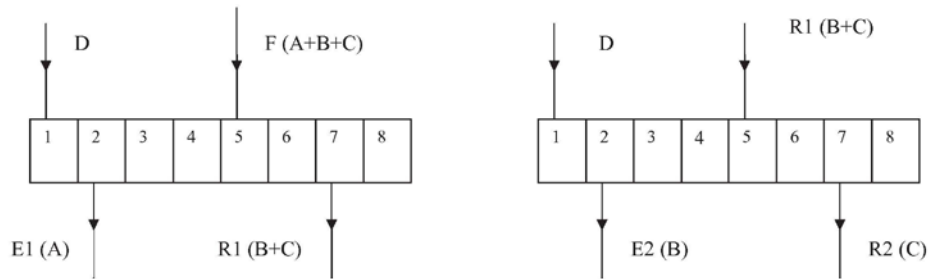
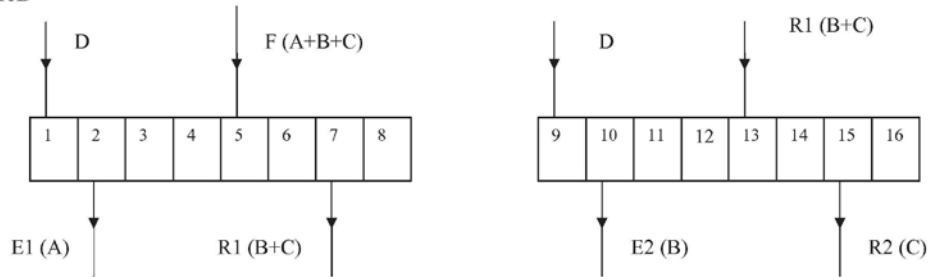


Figura 10

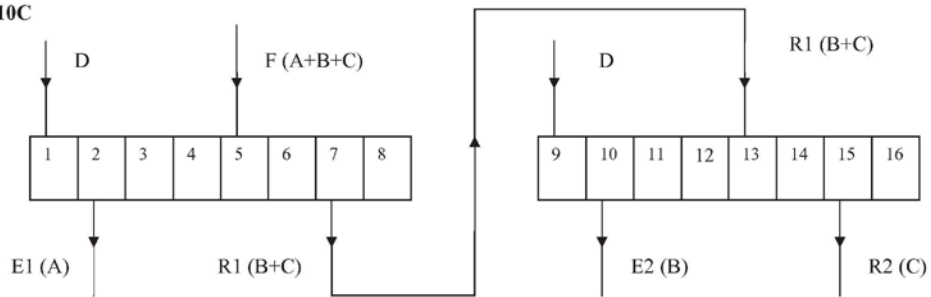
10A



10B



10C



PRIMERA ETAPA DE SEPARACIÓN

SEGUNDA ETAPA DE SEPARACIÓN

→ FLUJO DE ELUYENTE

→ FLUJO DE ELUYENTE

← FLUJO DE ADSORBENTE

← FLUJO DE ADSORBENTE

Figura 11

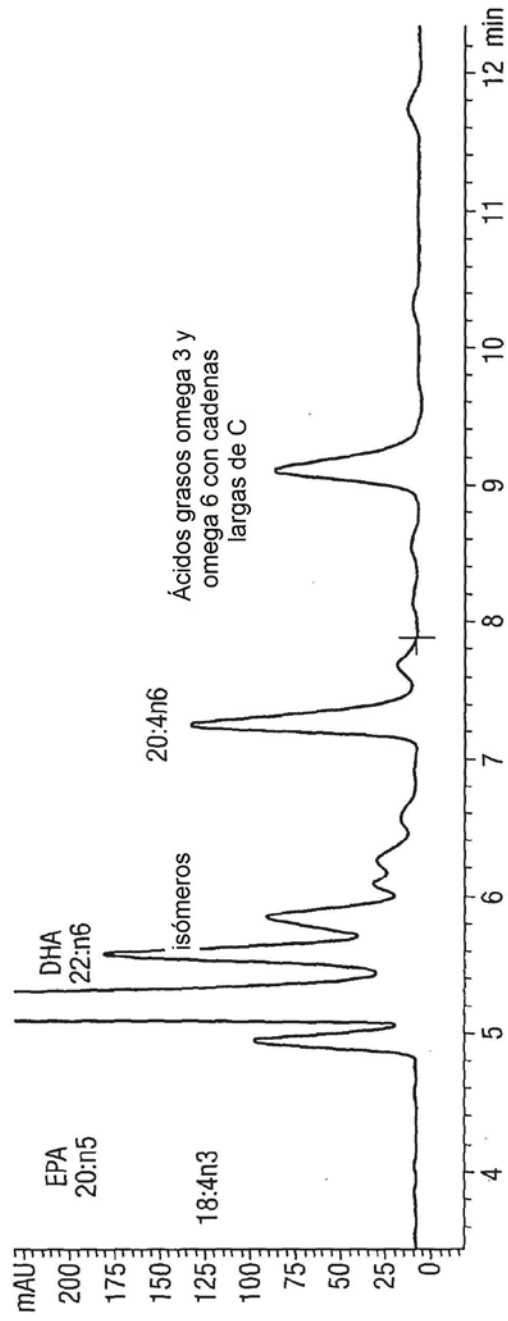


Figura 12

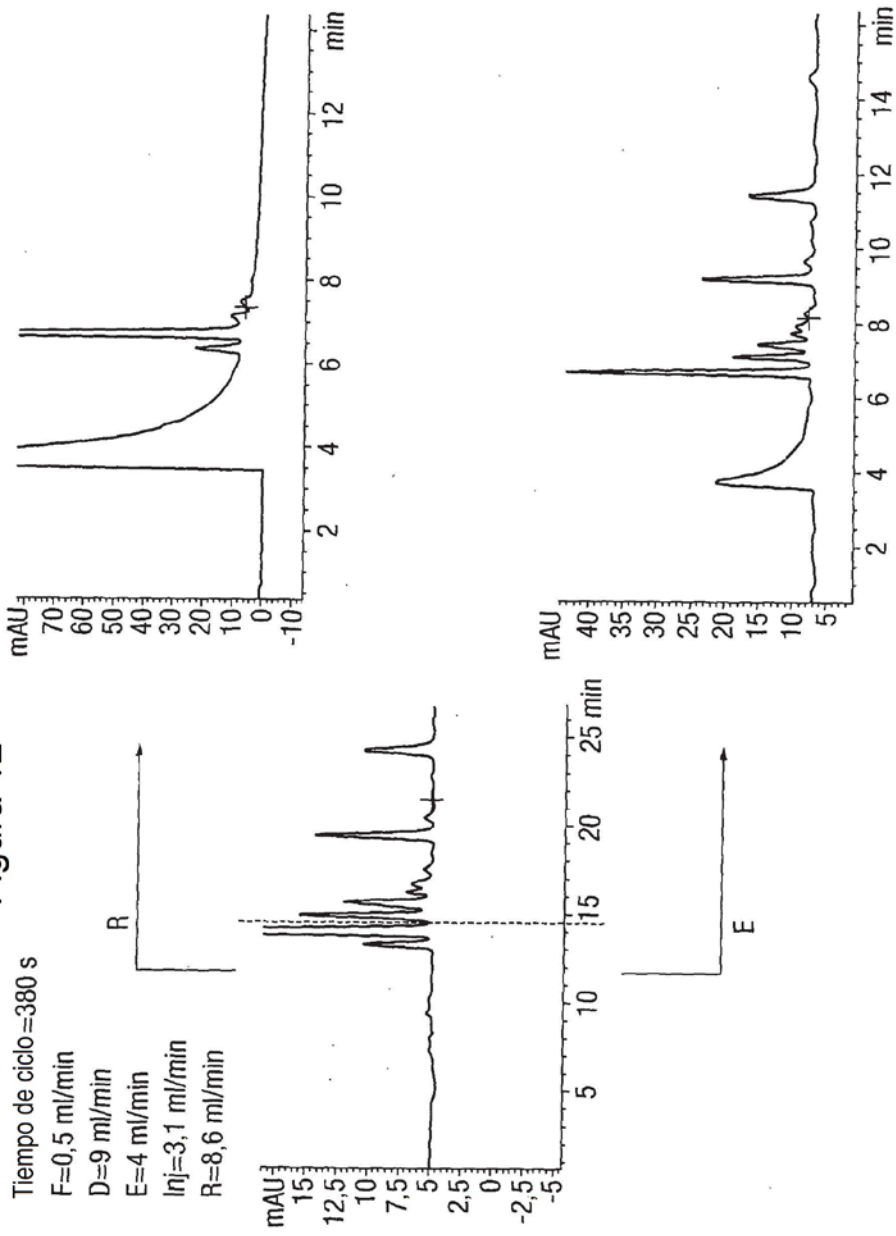


Figura 13

Tiempo de ciclo=380 s

F=0,5 ml/min

D=10,8 ml/min

E=4,1 ml/min

Inj=3,1 ml/min

R=10,3 ml/min

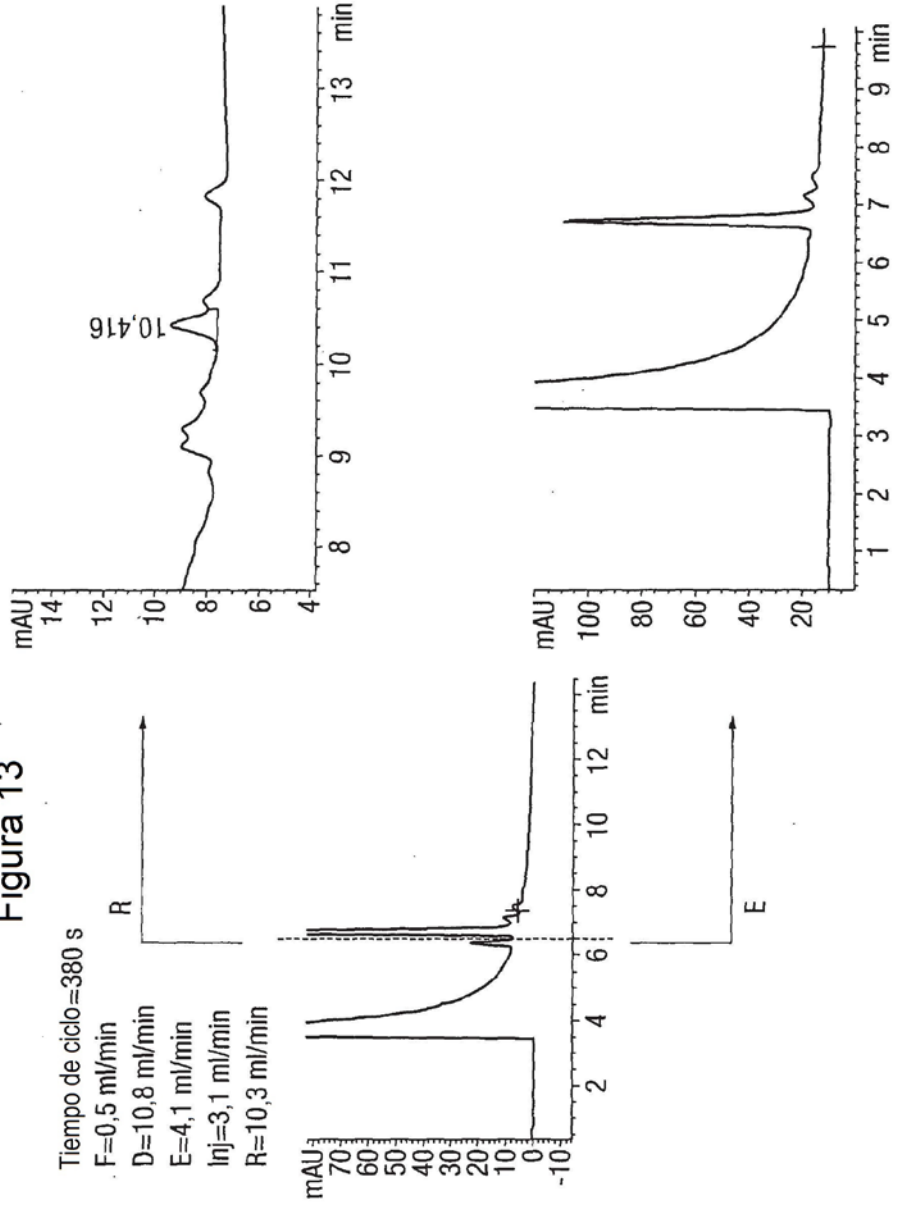


Figura 14

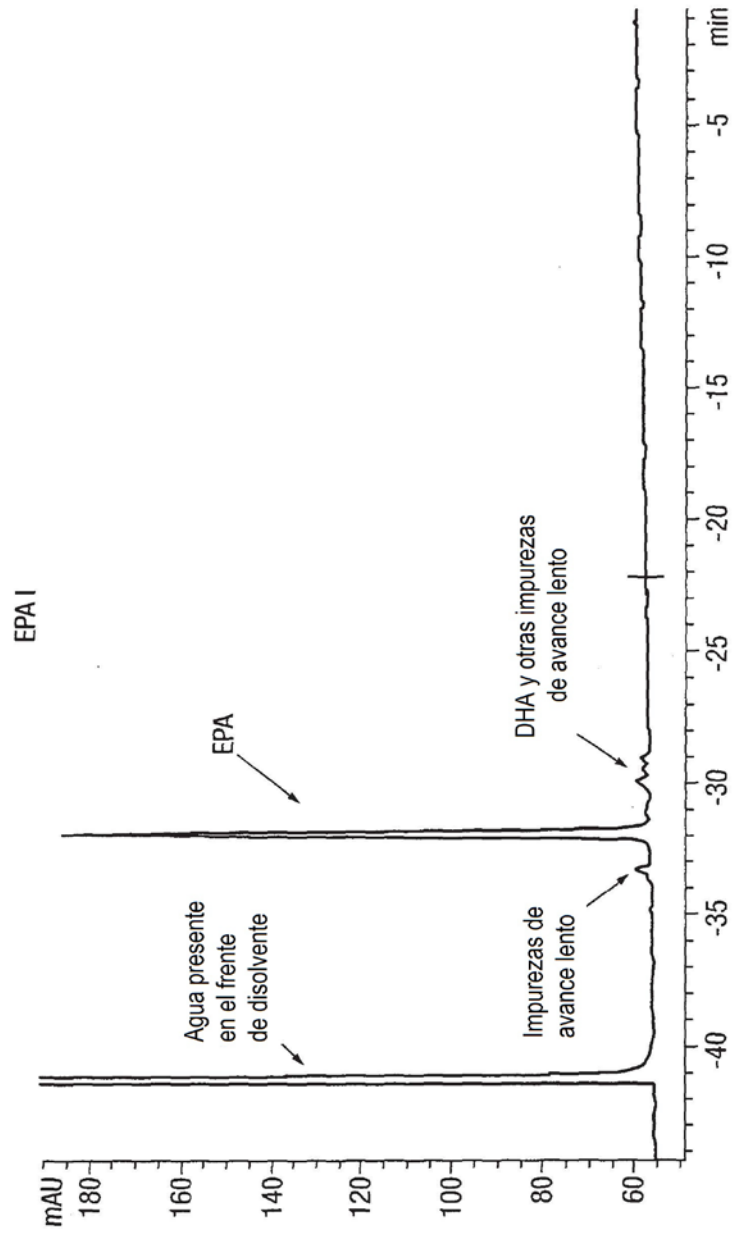
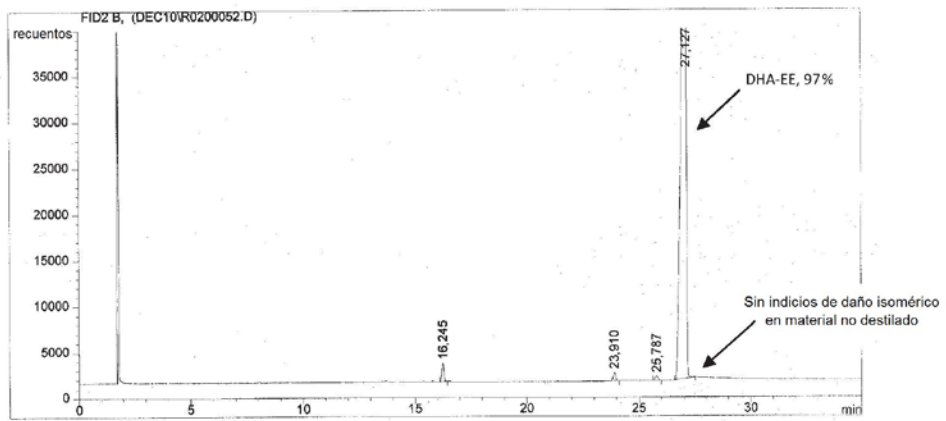


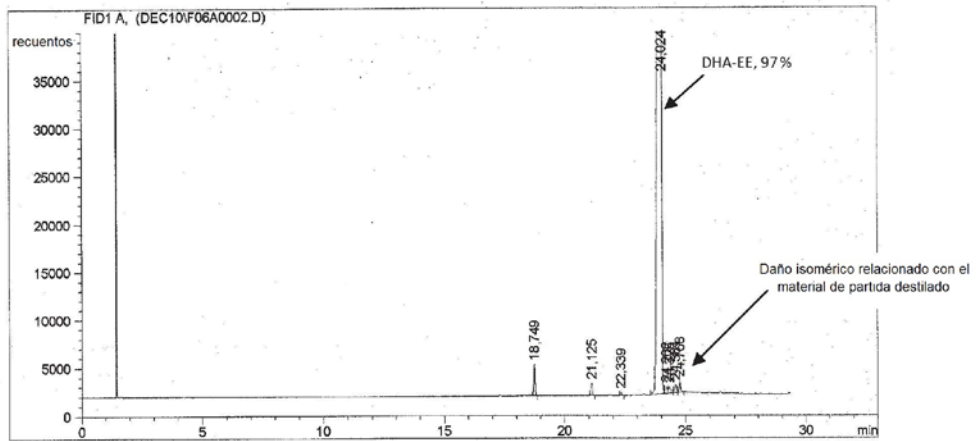
Figura 15

Zona 2 Extracto - DHA 97 %



DHA de alta pureza producido a partir de material de partida no destilado sin indicios de daño isomérico

Figura 16



Producto de DHA de alta pureza procedente del material de partida destilado que contiene 1,5 % de impurezas isoméricas (total de 4 picos por GC FAME)