

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 599**

51 Int. Cl.:

B01D 15/16 (2006.01)

B01D 15/40 (2006.01)

G01N 30/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2007 PCT/EP2007/005379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2007 WO07147554**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2007 E 07764713 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2040810**

54 Título: **Proceso de cromatografía mejorado para recuperar una sustancia o un grupo de sustancias de una mezcla**

30 Prioridad:

19.06.2006 EP 06115656

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

02.12.2019

73 Titular/es:

**K.D. PHARMA BEXBACH GMBH (100.0%)
Am Kraftwerk 4
66450 Bexbach, DE**

72 Inventor/es:

**KRUMBHOLZ, RUDOLF;
LEMBKE, PETER y
SCHIRRA, NORBERT**

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 733 599 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de cromatografía mejorado para recuperar una sustancia o un grupo de sustancias de una mezcla

5 **Campo de la invención.**

La presente invención se refiere a la recuperación de una sustancia o un grupo de sustancias de una mezcla, en particular a la recuperación por medio de métodos de separación por CFS preparativa.

10 En los campos de (i) la química analítica y de (ii) la recuperación de principios activos de fuentes naturales a escala preparativa, el acrónimo "CFS" designa "cromatografía de fluidos supercríticos". La técnica de CFS, que es similar a la HPLC y que, como esta última, puede adoptar el uso de columnas tanto rellenas como tubulares abiertas (es decir, capilares), se remonta a tan pronto como 1962, pero debido a problemas técnicos el método cayó en desuso durante mucho tiempo. La característica que caracteriza a la CFS es que un denominado fluido supercrítico, es decir, una única fase que existe en el diagrama de p,T de una sustancia en el área más allá del denominado punto crítico (p_{crit}, T_{crit}), donde el líquido no puede distinguirse del gas y donde las propiedades físicas son intermedias entre esas dos fases, se emplea como fase móvil cromatográfica. Las fases estacionarias más utilizadas en las columnas empaquetadas empleadas en CFS son, en cambio, fases de HPLC perfectamente convencionales, tales como sílice y ODS. En CFS capilar son predominantes las fases estacionarias a base de polisiloxano.

20 En cuanto a la fase móvil, la fase supercrítica utilizada con más frecuencia es el CO₂, debido a su presión y temperatura críticas comparativamente bajas, su no toxicidad, su compatibilidad con la mayoría de los detectores, su disponibilidad, su bajo precio y su no inflamabilidad.

25 En los últimos años, el interés en esta tecnología se ha renovado y la actividad en el campo de la CFS, principalmente (pero no solo) con respecto a sus aplicaciones analíticas, ha aumentado rápidamente, debido a las ventajas sobresalientes de la CFS sobre la HPLC que incluyen:

- reducción de los costes de compra de disolventes orgánicos,
- 30 - reducción de los costes de eliminación de disolventes orgánicos,
- reducción del tiempo necesario para retirar la fase móvil de los productos,
- reducción del daño a los productos resultantes de la retirada de la fase móvil,
- mejora en la seguridad del laboratorio.

35 **Antecedentes técnicos.**

Aunque se está experimentando un auge de desarrollo en el campo analítico, la técnica de CFS a escala preparativa, sin embargo, por el momento, está mucho menos establecida.

40 Por tanto, muchos productos naturales se recuperan mediante el empleo de tecnologías más tradicionales. Entre la recuperación de productos naturales, en particular de los empleados para fines farmacéuticos, un campo de interés particular es la separación de ácidos grasos, preferentemente insaturados, en particular ácidos grasos poliinsaturados, tales como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) de aceites marinos, en particular de aceites de pescado. Los ácidos grasos mencionados anteriormente se denominan "ácidos grasos omega-3" (más exactamente: C20:5 ω -3 y C22:6-3) y el efecto positivo en la salud provocado por su consumo se ha publicado ampliamente en los últimos 20-25 años.

50 Puesto que la mayoría de los aceites marinos de origen natural no están particularmente concentrados en ácidos grasos omega-3 y puesto que los aceites de pescado sin tratar de contenido medio de ácidos grasos omega-3 tienen inherentemente un olor y sabor a pescado desagradables, en los últimos años se han desarrollado varios procesos para refinar los aceites en bruto y para separar las fracciones de omega-3, tales como proporcionar preparaciones altamente purificadas empleables para fines farmacéuticos. Esto se debe a que la Farmacopea suprime el empleo de preparaciones de menor concentración, de manera que las mismas solo pueden aprovecharse como complementos alimenticios, no como productos farmacéuticos.

55 Por tanto, se han aplicado diversas técnicas de purificación, incluyendo la formación de complejos de urea, la adsorción, la HPLC, la extracción por fluidos supercríticos, la destilación fraccionada y/o molecular, etc., solas o en combinación, para purificar las fracciones de omega-3 de aceites marinos.

60 Un ejemplo de dichas técnicas previas se proporciona en William B. Nilsson et al. "Supercritical Fluid Fractionation of Fish Oil Esters using Incremental Pressure Programming and a Temperature Gradient." JAOCS, vol. 66, n.º 11 (noviembre de 1989). El fraccionamiento por fluidos supercríticos según lo descrito por Nilsson et al. es una técnica de destilación que implica el uso de una columna vertical que tiene una estructura interna o un relleno hechos de un material inerte que proporciona una superficie aumentada, tal como para facilitar conseguir un equilibrio entre las fases fluidas implicadas. El material de relleno inerte (por ejemplo, rellenos Sulzer®, anillos Raschig®, soportes de bolas, etc.) tiene una función exclusivamente geométrica y no participa, como tal, en el equilibrio de fases.

Sin embargo, la mayoría de estas técnicas convencionales son engorrosas y requieren mucho tiempo, especialmente, si se emplean para llegar a preparaciones de EPA y/o DHA altamente purificadas (al 75 % o más). Por tanto, el uso de estos métodos está principalmente indicado para conseguir mezclas purificadas previamente (o refinadas previamente) de ácidos grasos o de sus derivados, más ventajosamente de sus ésteres etílicos, que se han de someter después a una etapa final más eficiente corriente abajo de selectividad mejorada.

Por tanto, los sustratos empleados actualmente en dichas últimas etapas de refinación para la fabricación de productos farmacéuticos a base de ácidos grasos omega-3 son normalmente composiciones de éster etílico enriquecidas previamente derivadas de materiales marinos que tienen concentraciones de EPA y/o DHA inferiores al 75 %.

Entre los intentos tecnológicos más recientes por conseguir la purificación final con métodos de separación modernos que emplean fluidos supercríticos, se encuentra el documento US 5.719.302 de Perrut et al. quien desvela, en un intento por superar la baja productividad conseguida hasta ahora con HPLC de lecho estacionario a gran escala empleada anteriormente en la técnica, un proceso para el fraccionamiento cromatográfico de ácidos grasos y sus derivados, comprendiendo dicho proceso, en una de sus etapas, someter una composición de alimentación a cromatografía en lecho móvil a contracorriente continua simulada con CO₂ supercrítico como eluyente, con el objetivo de recuperar fracciones de ácidos grasos poliinsaturados purificados.

Sin embargo, los costes para la construcción de una planta del tipo utilizado por el documento US 5.719.302 son altos y la reducción a la puesta en práctica del método descrito en el mismo, en particular el ajuste fino de los parámetros del proceso, es difícil, de manera que, hasta donde sabe el solicitante, ninguna preparación obtenida con este método ha llegado al mercado hasta el momento.

Además del método mencionado anteriormente, hace algunos años, se ha propuesto una técnica mixta de CFS/EFS preparativa "en la columna" para recuperar una sustancia o un grupo de sustancias de una mezcla, por primera vez, por el Solicitante de la presente invención con el fin de aumentar el rendimiento de la separación por CFS discontinua, véase el documento EP 712 651. La CFS/EFS es particularmente adecuada para la separación de mezclas de ácidos grasos y de mezclas de sus ésteres etílicos, estando las mismas refinadas previamente (es decir, enriquecidas previamente) como se ha indicado anteriormente, o no. La técnica mixta de CFS/EFS preparativa discontinua puede adoptarse fácilmente mediante la sobrecarga de la columna de CFS empleada de manera controlada y es aplicada satisfactoriamente por el Solicitante que tiene una experiencia de largo tiempo en el campo.

Sin embargo, debido a la demanda cada vez mayor de productos altamente purificados, sigue existiendo una necesidad continua de métodos de separación de alto rendimiento mejorados, así como de los productos obtenidos de este modo.

Por tanto, parece que existe un problema en la técnica, que requiere la provisión de un proceso más mejorado, para recuperar una sustancia o un grupo de sustancias de una mezcla con eficiencia mejorada. El proceso mejorado debería ser capaz de proporcionar productos tan puros como los conocidos en menos tiempo o en mayores cantidades, preferentemente con la posibilidad de proporcionar, simultáneamente, productos aún más purificados.

HIGASHIDATE S, YAMAUCHIY, SAITO M, "ENRICHMENT OF EICOSAPENTAENOIC ACID AND DOCOSA-HEXAENOIC ACID-ESTERS FROM ESTERIFIED FISH OIL BY PROGRAMMED EXTRACTION ELUTION WITH SUPERCRITICAL CARBON-DIOXIDE", *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY*, (19900831), vol. 515, PÁGINAS 295 - 303, XP002463503 [X] 1-20 p. 296 - p. 297 describen la extracción de ésteres metílicos de ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosa-hexaenoico (DHA) en aceite de pescado esterificado mediante extracción por fluidos supercríticos con dióxido de carbono, introducción directa en una columna de gel de sílice recubierta con nitrato de plata y realización de cromatografía de fluidos supercríticos con dióxido de carbono cambiando gradualmente la presión de la salida de la columna. Los ésteres metílicos de EPA y DHA separados de este modo se fraccionaron reduciendo la presión del efluente de la columna a la atmosférica. De esta manera, los ésteres metílicos de EPA y DHA se enriquecieron del 12 % al 93 % y del 13 % al 82 %, respectivamente.

ALKIO M ET AL, "Purification of polyunsaturated fatty acid esters from tuna oil with supercritical fluid chromatography", *JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY*, AOCs PRESS, CHAMPAIGN, IL, EE.UU., (2000), vol. 77, n.º 3, ISSN 0003-021X, PÁGINAS 315 - 321, XP002954048 [Y] 1-20 p. 315 - p. 316, c. R - c. L, p. 315, c. R, 1. 14 -1. 19, analiza métodos que implican la extracción directa de aceite rico en ácidos grasos ω -3 y los usos para la concentración de estos ácidos grasos en forma de éster.

El documento EP0379963A1 describe un método y un aparato de extracción y separación que usan un fluido supercrítico para extraer un componente especificado de una muestra mediante un fluido supercrítico e introducir el fluido supercrítico que contiene el componente extraído en un gel de sílice recubierto con nitrato de plata de manera de separar el componente extraído. Mediante la combinación de la operación de extracción mediante un fluido supercrítico en condiciones suaves y la cromatografía que aprovecha la selectividad de la columna de gel de sílice recubierto con nitrato de plata en olefinas, el extracto se obtiene a una alta concentración sin producir desnaturalización.

Sumario de la invención.

Con el objetivo de resolver el problema mencionado anteriormente, la presente invención proporciona un método para mejorar el rendimiento de una separación cromatográfica por fluidos supercríticos preparativa discontinua para la recuperación de un ácido graso objetivo o un derivado del mismo, o de un grupo de ácidos grasos objetivo o de derivados de los mismos de una mezcla, caracterizado por que dicha separación cromatográfica por fluidos supercríticos emplea una columna cromatográfica cargada con una fase estacionaria elegida entre el grupo que consiste en óxido de aluminio u óxidos de aluminio, óxido de titanio u óxidos de titanio, gel de sílice o geles de sílice, geles de sílice modificados con amino propilo, geles de sílice modificados con diol, geles de sílice modificados con fenilo y fases de "fase inversa", los primeros elegidos a su vez entre el grupo que consiste en RP18, RP8 y RP3, y caracterizado por que dicha separación cromatográfica por fluidos supercríticos emplea adicionalmente una fase móvil elegida entre el grupo que consiste en etileno, propano, amoníaco, dióxido de dinitrógeno y CO₂, en el que en dicho método, durante la ejecución de dicha mezcla en la columna cromatográfica, se aplica un gradiente de presión y/o temperatura a la columna cromatográfica durante la elución del ácido graso objetivo o derivado del mismo, en el que uno o los dos valores objetivo establecidos para el gradiente aplicado se encuentran fuera del área supercrítica del eluyente empleado.

Descripción de las figuras adjuntas.

La Figura 1 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo, hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 97 bar (9,7 MPa) y 46 °C.

La Figura 2 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 97 bar (9,7 MPa) y 46 °C, habiéndose aumentado la presión, después de 80 minutos de elución, en un minuto, 50 bar (5,0 MPa) hasta 147 bar (14,7 MPa).

La Figura 3 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 97 bar (9,7 MPa) y 46 °C, habiéndose aumentado la presión, después de 65 minutos de elución, en un minuto, 50 bar (5,0 MPa) hasta 147 bar (14,7 MPa).

La Figura 4 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de amino propilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 97 bar (9,7 MPa) y 46 °C, habiéndose bajado la temperatura, después de 80 minutos de elución, en un minuto, 6 °C hasta 40 °C.

La Figura 5 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 120 bar (12,0 MPa) y 46 °C.

La Figura 6 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C, habiéndose aumentado la presión, después de 40 minutos de elución, en un minuto, 50 bar (5,0 MPa) hasta 153 bar (15,3 MPa).

La Figura 7 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C, habiéndose bajado la temperatura, después de 40 minutos de elución, en un minuto, 6 °C hasta 40 °C.

La Figura 8.1 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C, habiéndose bajado la temperatura, después de 40 minutos de elución, en un minuto, 26 °C hasta 20 °C.

La Figura 8.2 es una representación gráfica de la cantidad ([g], eje y) de EPA, DHA y SDA obtenida después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C, habiéndose bajado la temperatura, después de 40 minutos de elución, en un minuto, 26 °C hasta 20 °C.

La Figura 9 es una representación gráfica del contenido ([% en peso], eje y) de EPA, DHA y SDA registrado

después de un tiempo de elución especificado ([min], eje x) a la salida de una columna cromatográfica cargada con una fase de aminopropilo hecha funcionar con CFS/EFS usando CO₂ a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C.

Descripción detallada de la invención.

5 La presente invención, como se describe en el presente documento, resuelve el problema mencionado anteriormente proporcionando un método para mejorar el rendimiento de una separación por CFS preparativa discontinua para la recuperación de una sustancia objetivo o un grupo de sustancias objetivo de una mezcla que acelera la recuperación o aumenta el rendimiento de una sustancia o sustancias objetivo, pero sin reducir la selectividad de la separación en curso. Preferentemente, la selectividad incluso se mejora. Preferentemente, la presente invención se emplea para mejorar el rendimiento de las separaciones por CFS/EFS preparativa discontinua en una columna cromatográfica. La presente invención es particularmente adecuada y se emplea preferentemente para la CFS preparativa discontinua, preferentemente la separación por CFS/EFS de ácidos grasos, en particular en la recuperación de ácidos grasos poliinsaturados o de sus derivados, particularmente de sus ésteres, más en particular de sus ésteres etílicos o metílicos derivados de aceites de pescado naturales. Entre los primeros, se prefieren en particular EPA y DHA (o sus ésteres metílicos o etílicos) y/o sus mezclas.

20 Las columnas de CFS (o SCF/EFS) en el método de la invención contienen fases estacionarias elegidas entre el grupo que consiste en óxido de aluminio u óxidos de aluminio, óxido de titanio u óxidos de titanio, gel de sílice o geles de sílice, geles de sílice modificados y fases de "fase inversa". En el grupo mencionado anteriormente, la expresión "geles de sílice modificados" designa a su vez fases estacionarias elegidas entre el grupo que consiste en geles de sílice modificados con amino propilo, geles de sílice modificados con diol y geles de sílice modificados con fenilo. Siempre en el grupo mencionado anteriormente, la expresión "fase inversa" designa a su vez fases estacionarias elegidas entre el grupo que consiste en RP18, RP8 y RP3. Los eluyentes supercríticos empleados en el método de la presente invención se eligen entre el grupo que consiste en etileno, propano, amoníaco, dióxido de dinitrógeno y dióxido de carbono. Es una característica importante de la presente invención que las fases estacionarias y las fases móviles empleadas por la presente invención permitan la recuperación del ácido graso objetivo o el derivado del mismo sin el empleo de un disolvente o cosolvente adicional que sería líquido a presión ambiente y temperatura ambiente. El empleo de disolventes o cosolventes del tipo mencionado anteriormente no es deseable, ya que el ácido graso o derivado objetivo se obtendría entonces en una solución respectiva que requeriría entonces una etapa de separación adicional, por ejemplo, una destilación para obtener el ácido graso o derivado objetivo sin diluir deseado. Entre las fases móviles empleadas por la presente invención, el eluyente supercrítico más preferido es CO₂ (T_{crít} = 31,3 °C, p_{crít} = 73,7 bar (7,37 MPa)).

35 Como se ha mencionado anteriormente, el Solicitante ha empleado metodologías de CFS preparativa discontinua, así como metodologías combinadas de CFS/EFS preparativa durante muchos años para la separación de ésteres etílicos del ácido omega-3, en particular para el "corte" de fracciones éster etílico de EPA y DHA altamente purificadas. Sin embargo, la experiencia muestra que para alcanzar la selectividad necesaria para obtener fracciones, por ejemplo, con un 80 % de pureza (o superior) del éster etílico de EPA o DHA objetivo, las presiones necesarias para hacer funcionar la columna de CFS (o CFS/EFS) preparatoria fueron comparativamente bajas, conduciendo a su vez a tiempos de elución prolongados desde la columna.

45 En la técnica de CFS o CFS/EFS preparativa, la reducción del tiempo de elución de la columna puede conseguirse mediante un aumento de la densidad del eluyente de CO₂ supercrítico. Dicho aumento de densidad puede provocarse mediante un aumento de la presión o una disminución de la temperatura.

50 Sin embargo, el aumento de la presión o la disminución de la temperatura provocan, al mismo tiempo, una disminución de la selectividad, lo que significa que las fracciones obtenidas muestran, entonces, una pureza reducida. En otras palabras, si se ha de conseguir una selectividad objetivo, la presión y/o la temperatura no son ajustables.

55 Por tanto, si se desea reducir el tiempo de operación necesario para la separación de un lote de sustrato aplicado a una columna de CFS, por ejemplo, mediante el aumento de la presión o la disminución de la temperatura, se podría prever aumentar la potencia de elución a través de una o las dos medidas mencionadas anteriormente, exclusivamente cuando el componente objetivo se ha eliminado de la columna. Un enfoque de este tipo se considera particularmente crítico en la práctica industrial, donde las fracciones obtenidas de las ejecuciones individuales de lotes separados tienen por objeto la agrupación, es decir, significa que si se produce una caída de selectividad incluso de forma intermedia durante una sola ejecución haría inaceptable todo el rendimiento de varias operaciones repetidas.

60 Lo anterior se refleja en el hecho de que, si bien la bibliografía informa sobre la adopción de gradientes de presión y temperatura en los métodos de CFS, dicha adopción de gradientes de presión y temperatura está estrictamente limitada, por un lado, a CFS *analítica*, en particular a CFS capilar analítica. Un rasgo característico de los sistemas analíticos es que son abundantemente selectivos (proporcionando las columnas capilares largas normalmente empleadas con fines analíticos varios miles de platos teóricos) y, por tanto, la reducción esperada de selectividad provocada por la aplicación de un gradiente no es particularmente preocupante (siempre en sistemas analíticos), en

comparación con la necesidad más urgente de eliminar las fracciones de la columna en un tiempo razonable.

Por otro lado, el empleo de etapas de temperatura y presión puede encontrarse en la CFS preparativa (donde el mantenimiento de la selectividad óptima es, en cambio, imperativo, puesto que el número de platos teóricos disponibles se mantiene deliberadamente lo más bajo posible), pero existe una asociación exclusiva con la tecnología LMS ("lecho móvil simulado"), es decir, con CFS hecha funcionar *de forma continua*. Es una característica más importante y crítica del LMS, que, si es así, las presiones y temperaturas específicas empleadas en las etapas individuales permanecen, en cualquier caso, estrictamente constantes a lo largo de toda la separación, es decir, se evita cuidadosamente cualquier modulación de la presión y/o la temperatura *dentro de* una etapa individual. Esto se debe a que se ha de temer, aparte de eso, que los cambios de presión y/o temperatura dentro de una sola etapa puedan conducir, durante la separación, a la generación de fracciones no reproducibles o no separadas adecuadamente, estropeando el material recuperado.

Antes de estos antecedentes, era altamente deseable conseguir el objeto de la presente invención, en concreto, reducir el tiempo de elución y/o aumentar el rendimiento de los productos objetivo en los métodos de CFS (o CFS/EFS) hecha funcionar de forma discontinua, pero sin disminuir, al mismo tiempo, la selectividad objetivo de la separación de los componentes individuales. Aún más deseable parecía ser la posibilidad adicional de conseguir, posiblemente, incluso un aumento simultáneo de la selectividad del objetivo.

El Solicitante ha descubierto ahora sorprendentemente que el objetivo mencionado anteriormente, es decir, la mejora del rendimiento de la separación, puede conseguirse en los métodos de separación por CFS preparativa hecha funcionar por lotes y en los métodos de separación por CFS/EFS hecha funcionar de forma discontinua, a través de la aplicación de un gradiente de presión o temperatura al sistema durante la elución de la sustancia objetivo. En concreto, se descubrió inesperadamente que, por ejemplo, cuando se aplica un gradiente de presión a un método de separación por CFS preparativa hecha funcionar de forma discontinua, la selectividad global resultante, en lugar de situarse *entre* las selectividades características asociadas, respectivamente con la presión inicial y la final, se mantiene al menos al nivel asociado a la presión inicial. También se ha descubierto que puede obtenerse el mismo efecto sorprendente aplicando un gradiente de temperatura o aplicando una combinación de gradiente de temperatura y de presión. Los gradientes anteriormente mencionados, solos o en combinación, pueden aplicarse de manera continua o por etapas. Preferentemente, los gradientes pueden aplicarse antes de que se eluya el 85 % de la sustancia objetivo, más preferentemente antes de que se eluya el 50 % de la sustancia objetivo y aún más preferentemente antes de que se eluya el 40 % de la sustancia objetivo.

Con respecto a las diferencias de presión y temperatura realmente introducidas por los gradientes anteriores en los métodos de separación por CFS (o CFS/EFS) hecha funcionar de forma discontinua de la presente invención, también se ha descubierto sorprendentemente que se obtienen resultados particularmente favorables si los valores objetivo de temperatura y/o presión se encuentran *por debajo* de los respectivos valores críticos del medio empleado.

Por tanto, es preferible que al menos uno de los valores objetivo establecidos para el gradiente mencionado anteriormente se encuentre fuera del área supercrítica (en el diagrama de p,T) del medio empleado.

En particular, el Solicitante ha descubierto, que es particularmente ventajoso, si el gradiente de temperatura aplicado durante la elución de la sustancia objetivo es de manera que la temperatura objetivo sea inferior a la temperatura crítica. En concreto, se ha descubierto que la variante anterior es preferible a un enfoque especular con una presión objetivo que sea inferior a la presión crítica y la temperatura crítica.

Esto significa que la introducción de un gradiente durante la elución de la sustancia objetivo, como propone la presente invención, permite, en realizaciones preferidas, incluso para la ejecución de un modo mixto, en concreto, comenzar como CFS (o CFS/EFS) y cambiar durante el funcionamiento (sea de manera continua o por etapas) - siempre durante la elución de la sustancia objetivo- a un modo CFSb (o CFSb/EFSb) o incluso CFL (o CFL/EFI) dependiendo de si solo una de p o T (preferentemente T) o las dos son expulsadas de su intervalo crítico. Sorprendentemente, aplicando dicho modo mixto, el rendimiento de la separación discontinua aumenta más, en comparación con la activación de un gradiente de p y/o T que no abandonan el área crítica, incluso en casos en los que el rendimiento de la separación como tal (es decir, sin aplicar ningún gradiente) fuera del área crítica se sabe que es como máximo comparable o más bajo que dentro del área crítica.

La invención del Solicitante quedará más clara a partir de (pero no limitada por) los Ejemplos que se enumeran en lo sucesivo en el presente documento.

Ejemplos.

A continuación, todos los valores de pureza se indican cómo % en peso.

En todos los ejemplos siguientes para la purificación de cada lote, se aplicaron 1,2 kg de producto de partida a una columna de separación preparativa (inox) de 50 litros (1850 x 240 mm) rellena con los materiales que se

especifican a continuación. El caudal fue en todos los ejemplos siguientes de 300 kg de CO2 por hora.

El producto de partida empleado en todos los ejemplos siguientes fue una mezcla de ésteres etílicos de ácidos grasos enriquecidos con omega 3.

5 Dichos productos de partida están disponibles en el mercado y normalmente se obtienen a través de una secuencia de purificación previa que comienza con la transesterificación de aceites de pescado ricos en omega 3. Posteriormente, el contenido de omega-3 de los ésteres etílicos obtenidos de este modo se aumenta mediante la precipitación con urea y después la mezcla de ésteres etílicos obtenida de este modo se refina previamente
10 adicionalmente por medio de EFS. La fracción de cabeza del tratamiento con EFS se emplea después como producto de partida en los siguientes ejemplos.

Ejemplos 1-5.

15 Los siguientes ejemplos 1-5 se ejecutaron en la columna anterior, rellena con un relleno de gel de sílice modificado, fase de amino propilo, de tamaño de partícula de 20-40 micrómetros.

Ejemplo 1 (comparativo).

20 El producto de partida se aplicó a la columna preparativa hecha funcionar con el CO2 supercrítico como eluyente y se recogieron y analizaron 5 fracciones del eluato (etiquetado como lote n.º 1489/1).

Los resultados pueden observarse en la Figura 1 que muestra que en dicha columna cromatográfica preparativa, ejecutada con métodos de CFS/EFS para separar DHA y EPA el uno del otro y, al mismo tiempo, del ácido estearidónico, con el fin de obtener fracciones respectivas con (redondeado) una pureza de al menos el 85 % de EPA y de al menos el 80 % de DHA, (es decir, de al menos el 80 % de cada uno, EPA y DHA), se necesita un tiempo de elución de 137 min para recuperar ambas fracciones, si se hace funcionar a una presión de 97 bar (9,7 MPa) y a una temperatura de 46 °C.

30 Los resultados se muestran en la tabla 1, que muestra las 5 fracciones que se cortaron y analizaron.

Tabla 1				
Lote n.º 1489 (ejecución a T = 46 °C y p = 97 bar (9,7 MPa))				
Nombre de la fracción	m [g]	EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	90,4	17,9	2,2	14,0
SDA/EPA	157,2	61,4	0,6	0,9
EPA	575,4	85,5	3,3	0,0
EPA/DHA	247,6	57,9	31,9	0,0
DHA	122,0	10,6	79,9	0,0
	1192,6			
Tiempo total de elución:		137,0	Minutos	
por unidad de tiempo*:		EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	90,4	17,9	2,2	14,0
SDA/EPA	157,2	61,4	0,6	0,9
EPA	575,4	85,5	3,3	0,0
EPA/DHA	247,6	57,9	31,9	0,0
DHA	122,0	10,6	79,9	0,0
	1192,6			

* En la parte inferior de la tabla 1, cada fracción se indica con respecto al tiempo de elución relativo (137 min/137 min = 1), que se ha establecido como "1" con fines comparativos con los siguientes ejemplos 2-5.

Ejemplo 2 (comparativo).

35 El producto de partida se aplicó a la misma columna preparativa y se cortaron 5 fracciones del eluato obtenido de este modo (lote n.º 1485) como en el ejemplo 1. Como puede observarse en la tabla 2, si la separación se realiza a 46 °C y a 110 bar (11,0 MPa), el tiempo de elución se reduce a 65 minutos, pero la pureza obtenible (redondeada) de la fracción objetivo de EPA no va más allá del 75 %, mientras que la pureza de la fracción de DHA se reduce incluso al 63 %. Esto demuestra que aumentando la presión, puede obtenerse un tiempo de elución reducido (mayor rendimiento), pero en detrimento de la selectividad.

Tabla 2				
Lote n.º 1485	(ejecución a 46 °C y a 110 bar (11,0 MPa))			
Nombre de la fracción	m [g]	EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	100,0	40,0	2,8	12,7
SDA/EPA	226,0	66,0	7,2	11,0
EPA	580,8	75,0	12,0	3,0
EPA/DHA	174,2	56,8	32,6	0,6
DHA	110,0	19,1	62,5	0,6
	1191,0			
Tiempo total de elución:		65,0	Minutos	
Recuperación por unidad de tiempo *		EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	210,8	40,0	2,8	12,7
SDA/EPA	476,3	66,0	7,2	11,0
EPA	1224,1	75,0	12,0	3,0
EPA/DHA	367,2	56,8	32,6	0,6
DHA	231,8	19,1	62,5	0,6
	2510,3			
* indicado con respecto al "tiempo de elución relativa", es decir, 137 min/65 min = 2,11.				

Ejemplo 3 (invención).

- 5 El producto de partida se aplicó a la misma columna preparativa y se cortaron 5 fracciones del eluato obtenido de este modo (lote n.º 1488) como en el ejemplo 1. Como puede observarse en la Figura 2 y en la tabla 3, si la separación se realiza a 46 °C y a 97 bar (9,7 MPa) durante 80 minutos, después de lo cual, manteniendo siempre la temperatura a 46 °C, la presión se aumenta (en un minuto, es decir, aún durante la elución de la fracción de EPA) a 97 (9,7 MPa) + 50 (5,0 MPa) = 147 bar (14,7 MPa), el tiempo total de elución se reduce a 103 minutos, mientras que la pureza obtenible (redondeada) de las fracciones objetivo de EPA y de DHA vuelve a ser de al menos el 80 %.
- 10

Tabla 3				
Lote n.º 1488	(ejecución a 46 °C durante 80' a 97 bar (9,7 MPa), después de lo cual la presión se aumenta en T en 50 bar (5,0 MPa))			
Nombre de la fracción	m [g]	EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	64,0	13,2	2,8	16,2
SDA/EPA	242,0	66,6	0,9	0,7
EPA	502,0	85,5	4,6	0,0
EPA/DHA	255,0	51,9	38,2	0,0
DHA	109,0	10,0	80,2	0,0
	1172,0			
Tiempo total de elución:		99,0	Minutos	
Recuperación por unidad de tiempo *:		EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	88,6	13,2	2,8	16,2
SDA/EPA	334,9	66,6	0,9	0,7
EPA	694,7	85,5	4,6	0,0
EPA/DHA	352,9	51,9	38,2	0,0
DHA	150,8	10,0	80,2	0,0
	1621,9			
* indicado con respecto al "tiempo de elución relativa", es decir 137 min/99 min = 1,38.				

Ejemplo 4 (invención).

El producto de partida se aplicó a la misma columna preparativa y se cortaron 5 fracciones del eluato obtenido de este modo (lote n.º 1493) como en el ejemplo 1. Como puede observarse en la Figura 3 y en la tabla 4, si la separación se realiza a 46 °C y a 97 bar (9,7 MPa) durante 65 minutos, después de lo cual, manteniendo siempre la temperatura a 46 °C, la presión se aumenta (en un minuto, es decir, aún durante la elución de la fracción de EPA) a 97 (9,7 MPa) + 50 (5,0 MPa) = 147 bar (14,7 MPa), el tiempo total de elución se reduce a 91 minutos, mientras que la pureza obtenible (redondeada) de las fracciones objetivo de EPA y de DHA vuelve a ser de al menos el 80 % (en particular de al menos el 85 % para EPA y de al menos el 80 % para DHA).

Tabla 4				
Lote n.º: 1493	(ejecución a 46 °C durante 65' a 97 bar (9,7 MPa), después de lo cual la presión se aumenta en T en 50 bar (5,0 MPa))			
Nombre de la fracción	M [g]	EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	83,1	18,3	2,3	14,2
SDA/EPA	159,0	60,2	0,8	1,0
EPA	440,6	85,4	2,5	0,0
EPA/DHA	358,7	61,0	29,2	0,0
DHA	128,8	9,2	81,8	0,0
	1170,2			
Tiempo total de elución:		91,0	Minutos	
Recuperación por unidad de tiempo *:		EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	125,1	18,3	2,3	14,2
SDA/EPA	239,4	60,2	0,8	1,0
EPA	663,3	85,4	2,5	0,0
EPA/DHA	540,0	61,0	29,2	0,0
DHA	193,9	9,2	81,8	0,0
	1761,7			

* indicado con respecto al "tiempo de elución relativa", es decir $137 \text{ min}/91 \text{ min} = 1,51$.

Ejemplo 5 (invención).

El producto de partida se aplicó a la misma columna preparativa y se cortaron 5 fracciones del eluato obtenido de este modo (lote n.º 1490) como en el ejemplo 1. Como puede observarse en la Figura 4 y en la tabla 5, si la separación se realiza a 46 °C y a 97 bar (9,7 MPa) durante 80 minutos, después de lo cual, manteniendo siempre la presión a 97 bar (9,7 MPa), la temperatura se reduce (en un minuto, es decir, aún durante la elución de la fracción de EPA) a 40 °C, el tiempo total de elución se reduce a 112 minutos, mientras que la pureza obtenible (redondeada) de las fracciones objetivo de EPA y de DHA vuelve a ser de al menos el 80 %, en particular aumenta incluso a al menos el 84 %. (en particular, al menos el 85 % para EPA y al menos el 84 % para DHA).

Tabla 5				
Lote n.º: 1490	(ejecución a 46 °C durante 80' a 97 bar (9,7 MPa), después de lo cual la temperatura se disminuye en T en 6 °C)			
Nombre de la fracción	M [g]	EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	70,8	12,6	2,5	16,7
SDA/EPA	227,1	61,3	0,6	1,2
EPA	482,7	85,2	2,7	0,0
EPA/DHA	348,4	53,2	36,2	0,0
DHA	106,1	6,2	84,4	0,1
	1235,1			
Tiempo total de elución:		112,0	Minutos	
Recuperación por unidad de tiempo *:		EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)

(continuación)

Lote n.º: 1490	(ejecución a 46 °C durante 80' a 97 bar (9,7 MPa), después de lo cual la temperatura se disminuye en T en 6 °C)			
Nombre de la fracción	M [g]	EPA (%)	DHA (%)	SDA (%)
SDA	113,3	12,6	2,5	16,7
SDA/EPA	363,6	61,3	0,6	1,2
EPA	588,9	85,2	2,7	0,0
EPA/DHA	557,8	53,2	36,2	0,0
DHA	169,9	6,2	84,4	0,1
	1977,3			

indicado con respecto al "tiempo de elución relativa", es decir $137 \text{ min}/112 \text{ min} = 1,22$.

- 5 A partir de los ejemplos anteriores 1-5 parece, por tanto, que en comparación con un enfoque isotérmico/isobárico (ejemplos comparativos 1 y 2), con la adopción de un gradiente de presión o de temperatura aplicado durante la recuperación de la fracción de EPA, se puede obtener un aumento de rendimiento por tiempo, sin pérdida de selectividad.

10 Ejemplos 6-10.

Los siguientes ejemplos 1-5 se ejecutaron en la columna anterior, rellena con un relleno de gel de sílice modificado, fase de aminopropilo, de tamaño de partícula de 20-40 micrómetros.

15 Ejemplo 6 (comparativo).

- El producto de partida se aplicó a la columna preparativa como anteriormente, hecha funcionar a 120 bar (12,0 MPa) y 46 °C. Los resultados pueden observarse en la Figura 5, que muestra que en dicha columna cromatográfica preparativa, ejecutada con métodos de CFS/EFS para separar DHA y EPA el uno del otro y, al mismo tiempo, del ácido estearidónico, con el fin de obtener fracciones respectivas con una pureza máxima (redondeada) del 84 % de EPA, se necesitan 60 minutos de elución para recuperar ambas fracciones. El rendimiento de la fracción de EPA > 80 % fue del 26 %. Véase la Figura 5.

25 Ejemplo 7 (invención).

- El producto de partida se aplicó a la columna preparativa como anteriormente, hecha funcionar a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C durante 40 minutos, después de lo cual la presión se aumentó en un minuto en 50 bar (5,0 MPa) a 153 bar (15,3 MPa) [para una ejecución constante a 103 bar (10,3 MPa), véase el ejemplo comparativo 10 a continuación]. Los resultados pueden observarse en la Figura 6 que muestra que en dicha columna cromatográfica preparativa, ejecutada con métodos de CFS/EFS para separar DHA y EPA el uno del otro y, al mismo tiempo, del ácido estearidónico, fue posible obtener una fracción de EPA con una pureza máxima (redondeada) superior al 90 % de EPA en un tiempo de elución de 67 min necesario para recuperar ambas fracciones. El rendimiento de la fracción de EPA > 90 % fue del 14 %, mientras que el rendimiento de la fracción de EPA > 80 % fue del 52 %, lo que demuestra el rendimiento aumentado del método que se describe en el presente documento. Véase la Figura 6.

35 Ejemplo 8 (invención).

- El producto de partida se aplicó a la columna preparativa como anteriormente, hecha funcionar a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C durante 40 minutos, después de lo cual la temperatura se redujo en un minuto en 6 °C a 40 °C. Los resultados pueden observarse en la Figura 7 que muestra que en dicha columna cromatográfica preparativa, ejecutada con métodos de CFS/EFS para separar DHA y EPA el uno del otro y, al mismo tiempo, del ácido estearidónico, fue posible obtener una fracción de EPA con una pureza máxima (redondeada) del 85 % de EPA en un tiempo de elución de 67 min necesario para recuperar ambas fracciones. Si bien éste no fue un aumento importante de la pureza máxima en comparación con el ejemplo 6, debe señalarse que el rendimiento de la fracción de EPA > 80 % aumentó del 26 % (ejemplo 6) al 47 % (en este caso), lo que demuestra el rendimiento aumentado del método que se describe en el presente documento. Véase la Figura 7.

45 Ejemplo 9 (invención).

- 50 El producto de partida se aplicó a la columna preparativa como anteriormente, hecha funcionar a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C durante 40 minutos, después la temperatura se redujo en un minuto en 26 °C a 20 °C. Al hacerlo, se abandona el área supercrítica del medio (CO₂) y se entra en su etapa fluida ($p > p_{cr}$; $T < T_{cr}$). Los resultados

pueden verse en la Figura 8 que muestra que en dicha columna cromatográfica preparativa, ejecutada con métodos de CFS/EFS para separar DHA y EPA el uno del otro y, al mismo tiempo, del ácido estearidónico, fue posible obtener una fracción de EPA con una pureza máxima (redondeada) del 90 % de EPA en un tiempo de elución de 67 min necesario para recuperar ambas fracciones. En este caso, no solo se informó el aumento de la pureza máxima, sino que el rendimiento de la fracción de EPA > 80 % aumentó al 53 %, mientras que el rendimiento de la fracción de EPA > 90 % fue del 17 %. Esto muestra un aumento notable de la calidad y el rendimiento de la fracción objetivo en el mismo tiempo de ejecución, lo que demuestra el rendimiento particularmente aumentado del método preferido que se describe en el presente documento. Véase la Figura 8.1.

10 La Figura 8.2 muestra el perfil de elución y desvela que el gradiente se aplicó después de haber eluido menos del 40 % de la sustancia objetivo EPA (consúltense las áreas con el pico respectivo hasta y después de 40 minutos).

Ejemplo 10 (comparativo).

15 El producto de partida se aplicó a la columna preparativa como anteriormente, hecha funcionar a 103 bar (10,3 MPa) y 46 °C. Los resultados pueden observarse en la Figura 9 que muestra que en dicha columna cromatográfica preparativa, ejecutada con métodos de CFS/EFS para separar DHA y EPA el uno del otro y, al mismo tiempo, del ácido estearidónico, con el fin de obtener fracciones respectivas con una pureza máxima (redondeada) del 85 % de EPA, se necesita un tiempo de elución de 86 min para recuperar ambas fracciones. El rendimiento de la fracción de EPA > 80 % fue del 50 %. Véase la Figura 9.

Las condiciones aplicadas en los ejemplos 6-10 anteriores se resumen por tanto en la tabla 6.

Tabla 6:

ejemplo 6 (comparativo): Fig. 5 EPA 84 %	DHA 87 %	120 bar (12,0 MPa)	46 °C	después de 40 min
Ejemplo 7 (invención): Fig. 6 EPA > 90DHA > 90		103 bar (10,3 MPa)	46 °C	+ 50 bar (5,0 MPa) (→ 153 bar (15,3 MPa))
Ejemplo 8 (invención): Fig. 7 EPA 85 %	DHA 90 %	103 bar (10,3 MPa)	46 °C	-6 °C (→ 40 °C)
Ejemplo 9 (invención): Fig. 8,1 EPA > 90DHA > 90 Fig. 8.2 perfil de elución		103 bar (10,3 MPa)	46 °C	-26 °C (→ 20 °C)
Ejemplo 10 (comparativo) Fig. 9 EPA 88 %		103 bar (10,3 MPa)	46 °C	---

25

Los resultados obtenidos en los ejemplos 6-10 anteriores se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7:

	tiempo de elución (min.)	Rendimiento "EPA > 80 %"	rendimiento "EPA > 90 %"
Ejemplo 6 (comparativo), Fig. 5 (120 bar (12,0 MPa), 46 °C)	60	26 %	0 %
Ejemplo 7, Fig. 6 (103 bar (10,3 MPa), cambio a 153 bar (15,3 MPa) después de 40 min., 46 °C)	67	52 %	14 %
Ejemplo 8, Fig. 7 (103 bar (10,3 MPa), 46 °C, cambio a 40 °C después de 40 min)	67	47 %	0 %
Ejemplo 9, Fig. 8,1 (103 bar (10,3 MPa), 46 °C, cambio a 20 °C después de 40 min)	67	53 %	17 %
Ejemplo 10 (comparativo), Fig. 9 (103 bar (10,3 MPa), 46 °C)	86	50 %	0 %

30 A partir de los ejemplos anteriores 6-10 parece, por tanto, que en comparación con un enfoque isotérmico/isobárico (ejemplos comparativos 6 y 10), con la adopción de un gradiente de presión o de temperatura aplicado durante la recuperación de la fracción de EPA, se puede obtener un aumento de rendimiento por tiempo, sin pérdida de selectividad.

35 De la tabla 7 se desprende que, tomando el tiempo de elución (ejemplo 6, 60 min) como fijo, la aplicación del gradiente durante la recuperación de la sustancia objetivo como se describe en el presente documento, conduce no solo a un aumento en el rendimiento, sino en algunos casos sorprendentemente incluso a un aumento de la calidad. Por otro lado, tomando el rendimiento (ejemplo 10, aproximadamente del 50 %) como fijo, la aplicación del gradiente durante la recuperación de la sustancia objetivo como se describe en el presente documento, conduce no solo a una
40 disminución en el tiempo de recuperación, sino en algunos casos sorprendentemente incluso a un aumento de la calidad.

Los ejemplos 1-10 muestran, por tanto, que el método inventivo que se describe en el presente documento mejora el rendimiento de una separación por CFS preparativa discontinua para la recuperación de una sustancia objetivo o un grupo de sustancias objetivo de una mezcla, sin disminuir la selectividad de la separación en curso.

5 **Glosario:**

CFS: Método cromatográfico que emplea un fluido supercrítico como fase móvil (medio).

10 CFS/EFS: Método cromatográfico que emplea un fluido supercrítico como fase móvil (medio), en el que la columna está "sobrecargada", tal como para realizar, al mismo tiempo, extracción supercrítica del sustrato, véase el documento EP 712 651.

15 CFSb: Método cromatográfico empleando un gas fluido ($T < T_{cr}$; $p > p_{cr}$ o $T > T_{cr}$; $p < p_{cr}$) como fase móvil (medio), véase el documento EP 1202 785.

CFL: Método cromatográfico que emplea un gas líquido ($T < T_{cr}$; $p < p_{cr}$) como fase móvil (medio), véase el documento EP 1202 785.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para mejorar el rendimiento de una separación cromatográfica por fluidos supercríticos discontinua preparativa para la recuperación de un ácido graso objetivo o derivado del mismo, o de un grupo de ácidos grasos objetivo o derivados de los mismos de una mezcla, **caracterizado por que** durante dicha separación cromatográfica por fluidos supercríticos dicha mezcla se ejecuta a través de una columna cromatográfica cargada con una fase estacionaria elegida entre el grupo que consiste en óxido de aluminio u óxidos de aluminio, óxido de titanio u óxidos de titanio, gel de sílice o geles de sílice, geles de sílice modificados con amino propilo, geles de sílice modificados con diol, geles de sílice modificados con fenilo y fases de "fase inversa", los primeros elegidos a su vez entre el grupo que consiste en RP18, RP8 y RP3, y una fase móvil elegida entre el grupo que consiste en etileno, propano, amoníaco, dióxido de dinitrógeno y CO₂, en el que durante la ejecución de dicha mezcla en la columna cromatográfica, se aplica un gradiente de presión y/o temperatura a la columna cromatográfica durante la elución del ácido graso objetivo o derivado del mismo,
- 10 **caracterizado por que** uno o los dos valores objetivo establecidos para el gradiente aplicado se encuentran fuera del área supercrítica del eluyente empleado.
- 15
- 20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la separación cromatográfica supercrítica discontinua preparatoria se realiza en condiciones que permiten, durante la separación cromatográfica supercrítica, también una extracción por fluidos supercríticos.
- 25 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho gradiente de presión o temperatura o el gradiente de temperatura y presión se aplican de manera gradual.
- 30 4. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho gradiente de presión o temperatura o el gradiente de temperatura y presión se aplican de manera continua.
- 35 5. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones previas, en el que dicho gradiente de presión o temperatura o el gradiente de temperatura y presión se aplican antes de que se eluya el 85 % del ácido graso objetivo o derivado del mismo.
- 40 6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho gradiente de presión o temperatura o el gradiente de temperatura y presión se aplican antes de que se eluya el 50 % del ácido graso objetivo o derivado del mismo.
- 45 7. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho gradiente de presión o temperatura o el gradiente de temperatura y presión se aplican antes de que se eluya el 40 % del ácido graso objetivo o derivado del mismo.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gradiente aplicado es un gradiente de temperatura cuyo valor objetivo es inferior a la temperatura crítica.
9. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores, en el que el eluyente empleado es CO₂.
10. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones anteriores para la separación de fracciones enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados o sus sales o sus ésteres metílicos o etílicos derivados de aceites de pescado naturales.
11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los ácidos grasos poliinsaturados son ácidos omega-3 o sus derivados.

Figura 1
Ejemplo 1

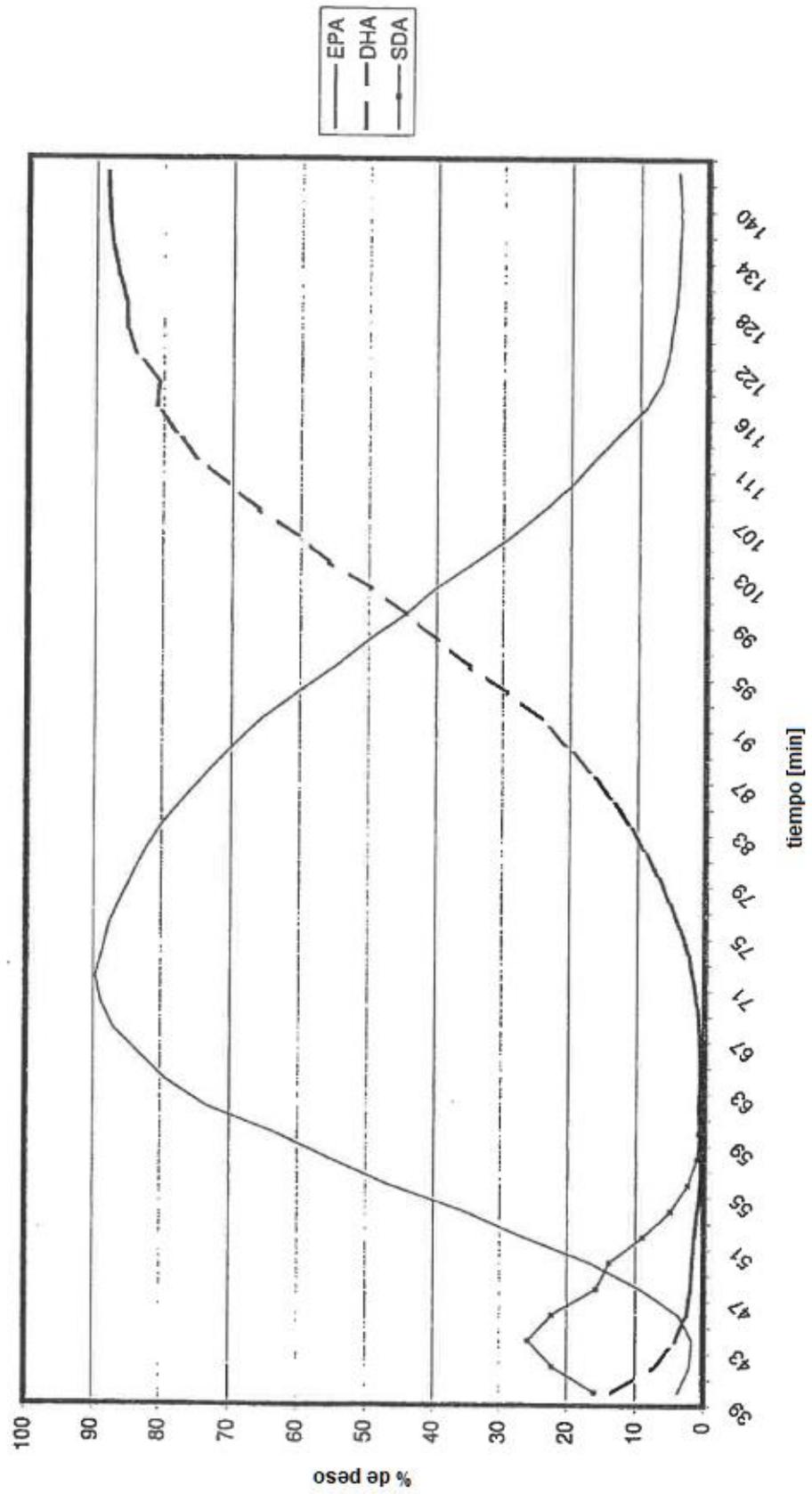


Figura 2
Ejemplo 3

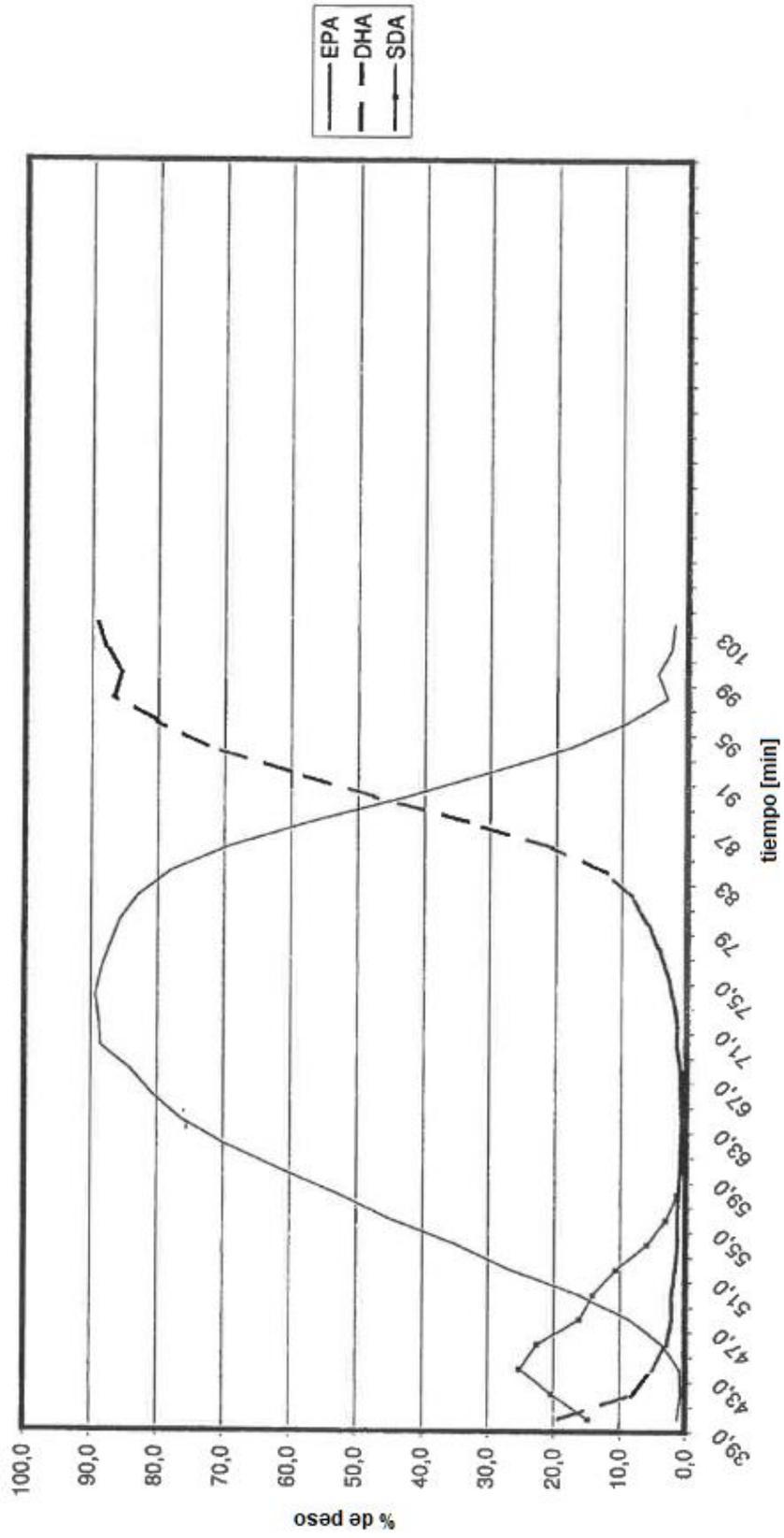


Figura 3
Ejemplo 4

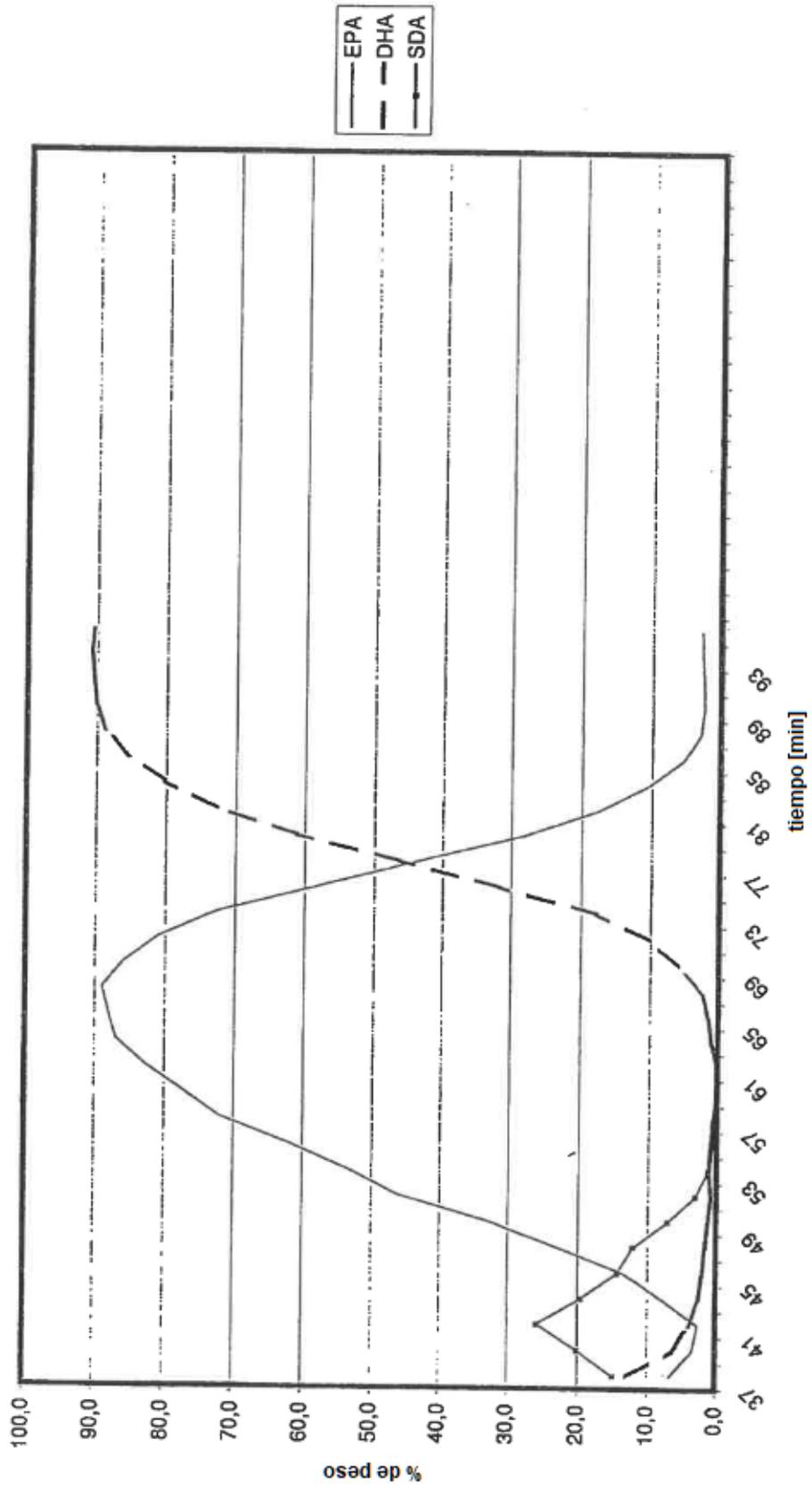


Figura 4
Ejemplo 5

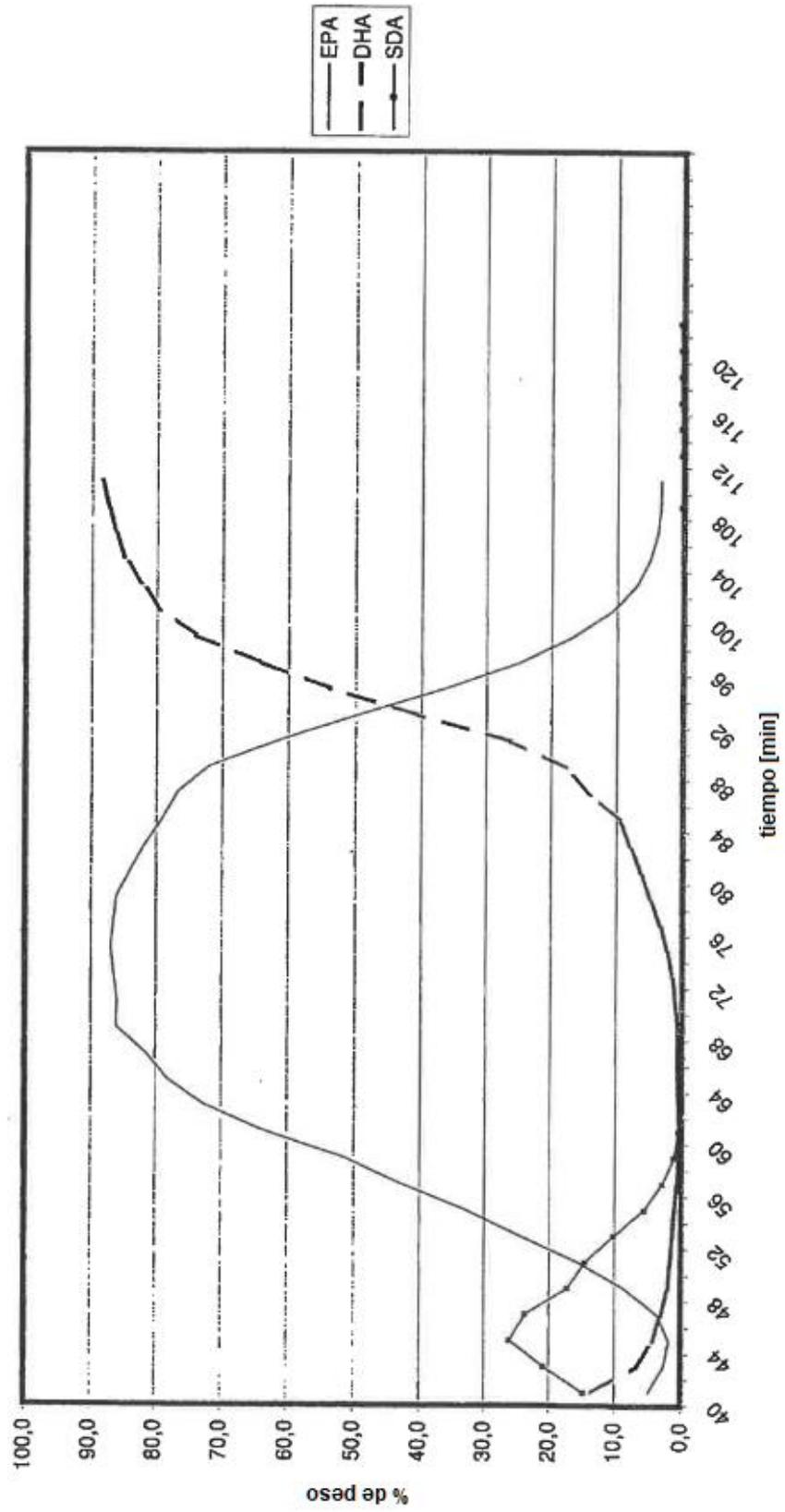


Figura 5
Ejemplo 6

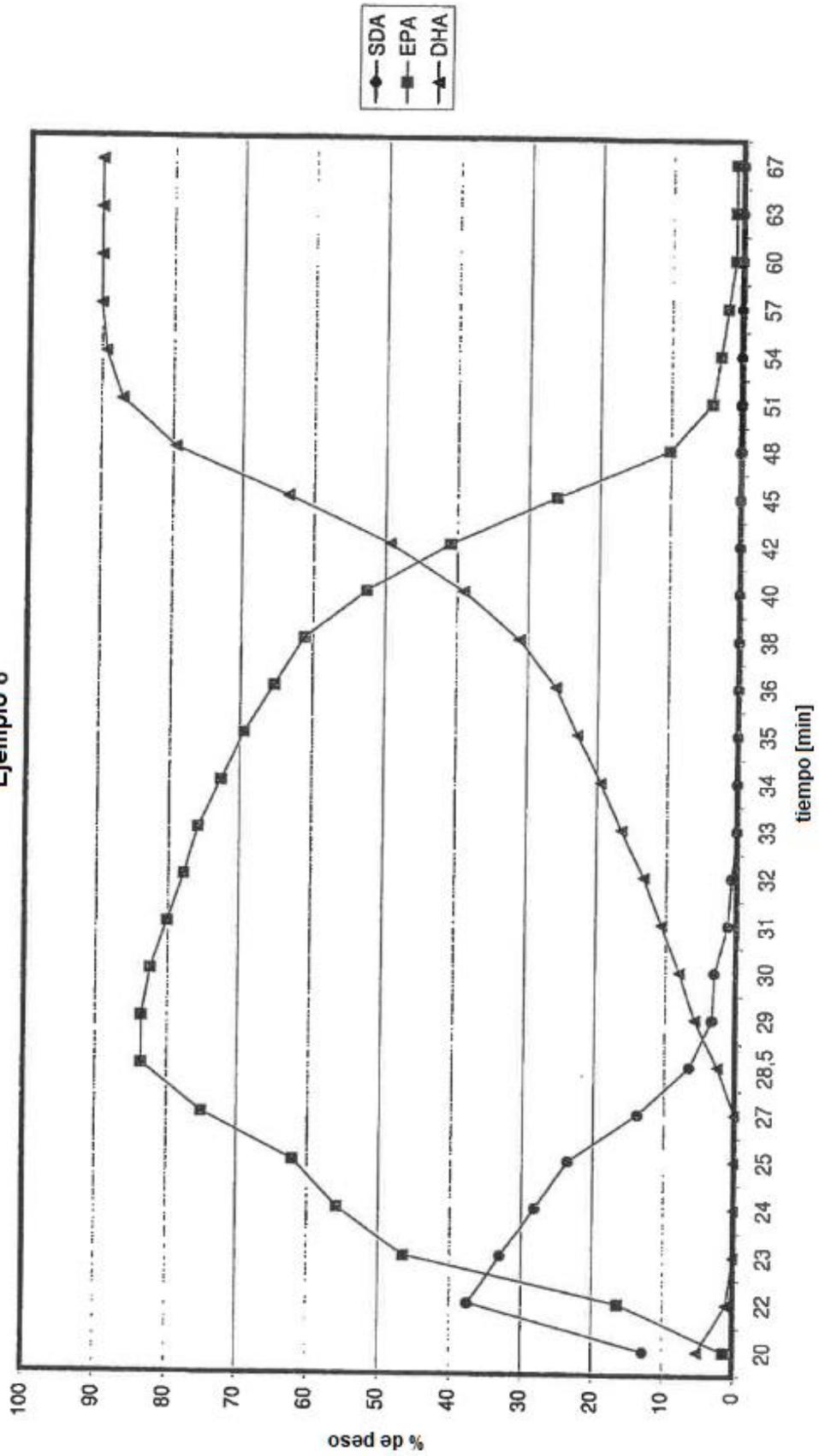


Figura 6
Ejemplo 7

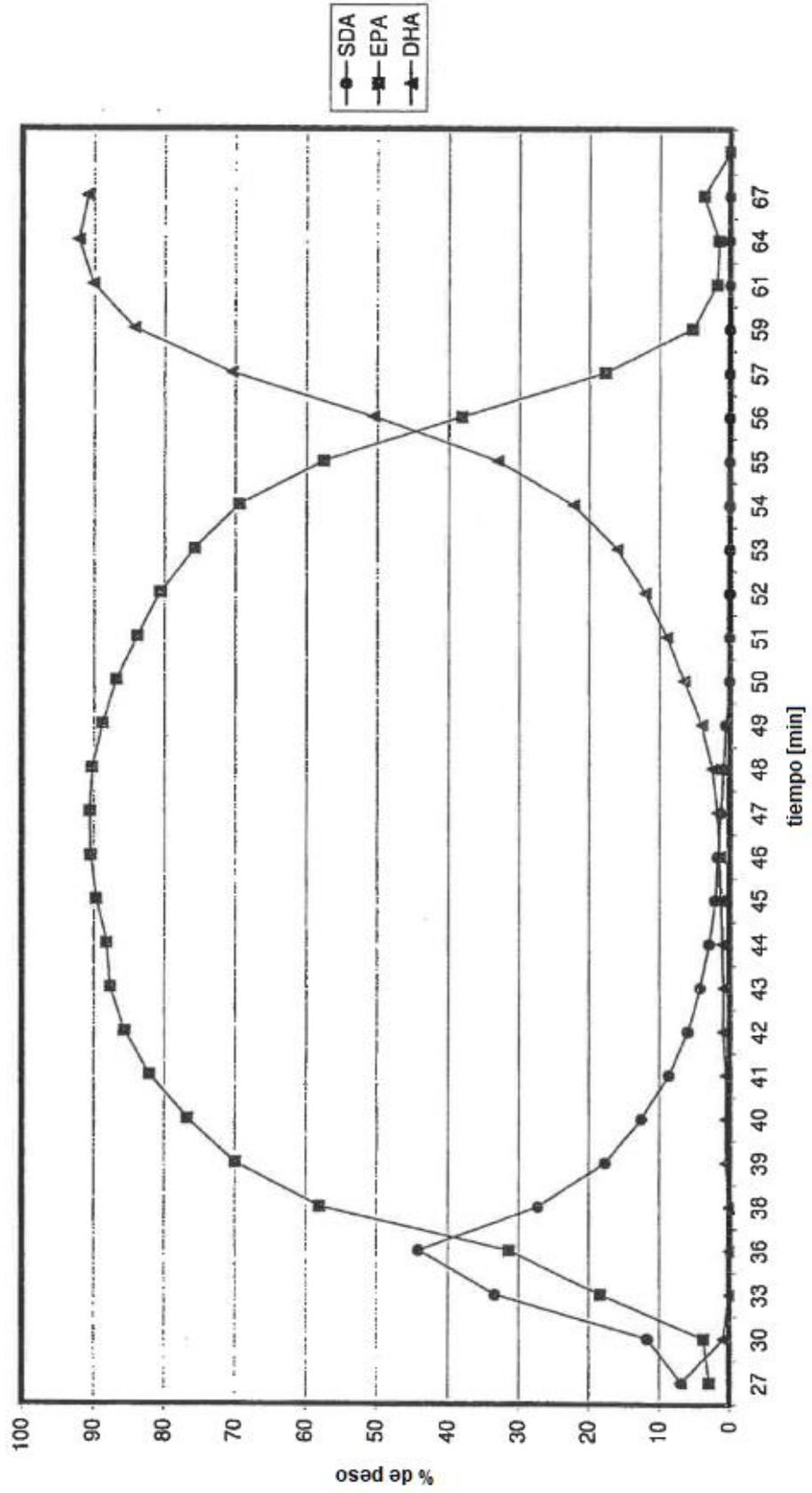


Figura 7
Ejemplo 8

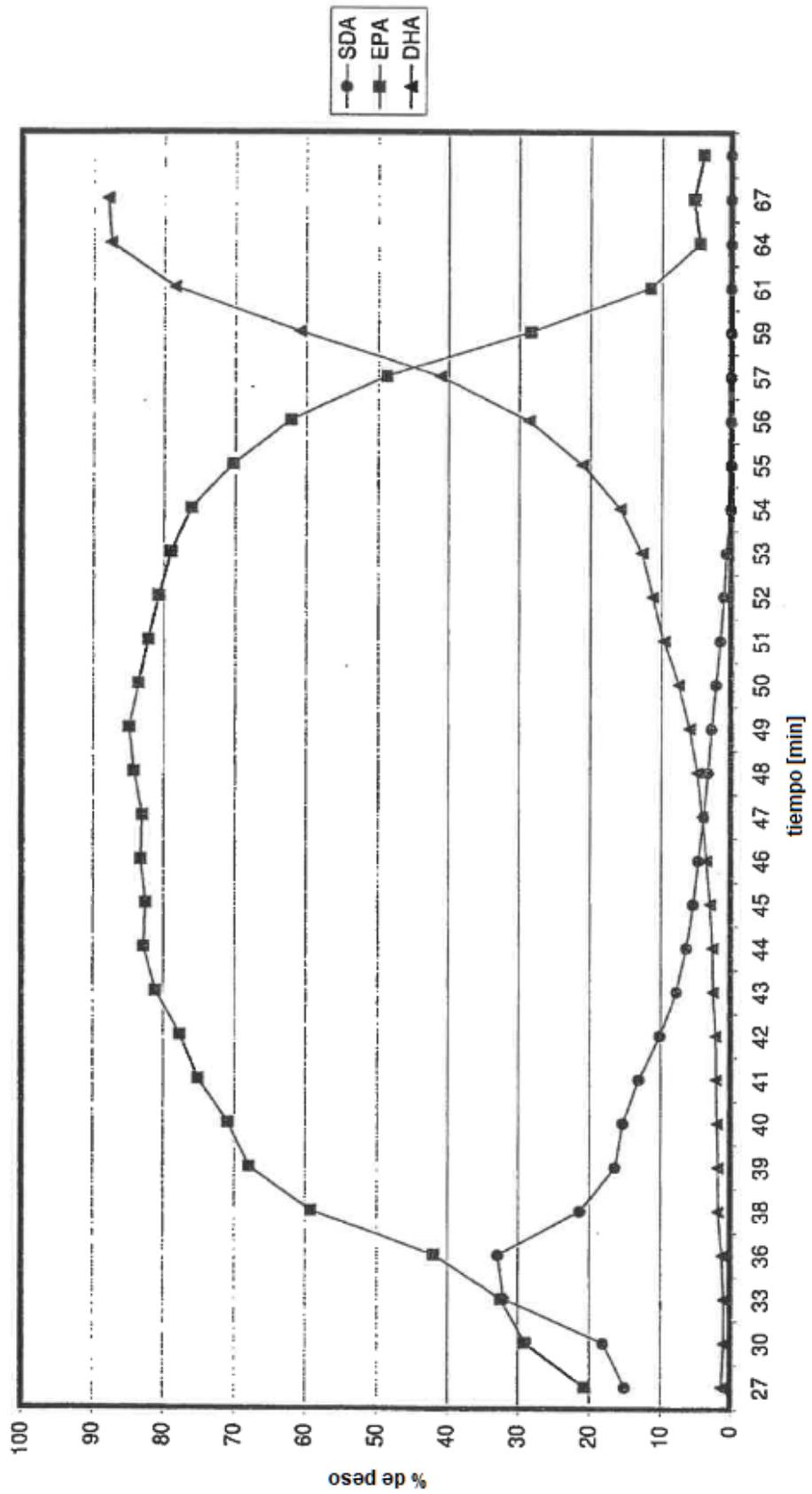


Figura 8.1
Ejemplo 9

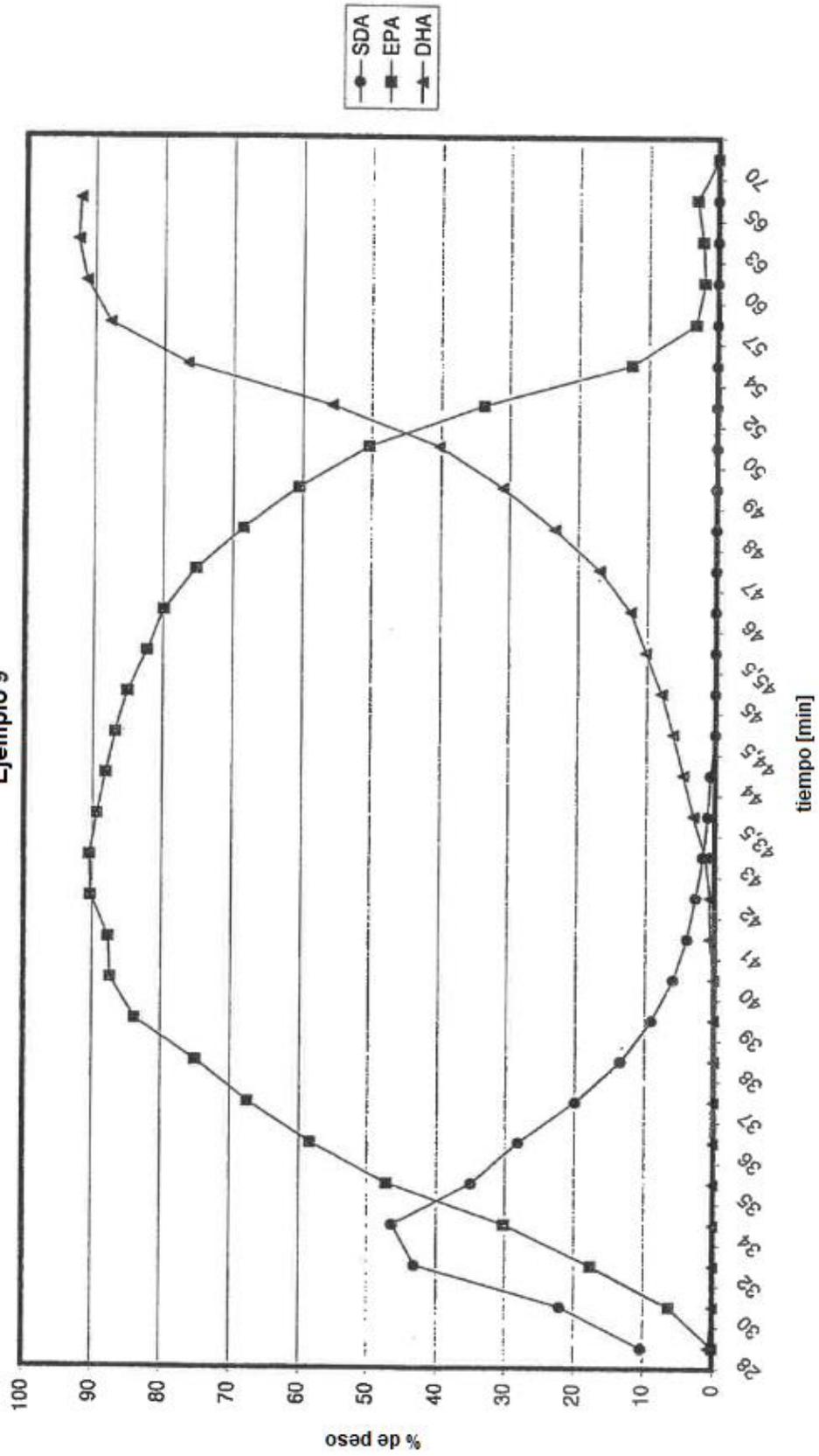


Figura 8.2
Ejemplo 9

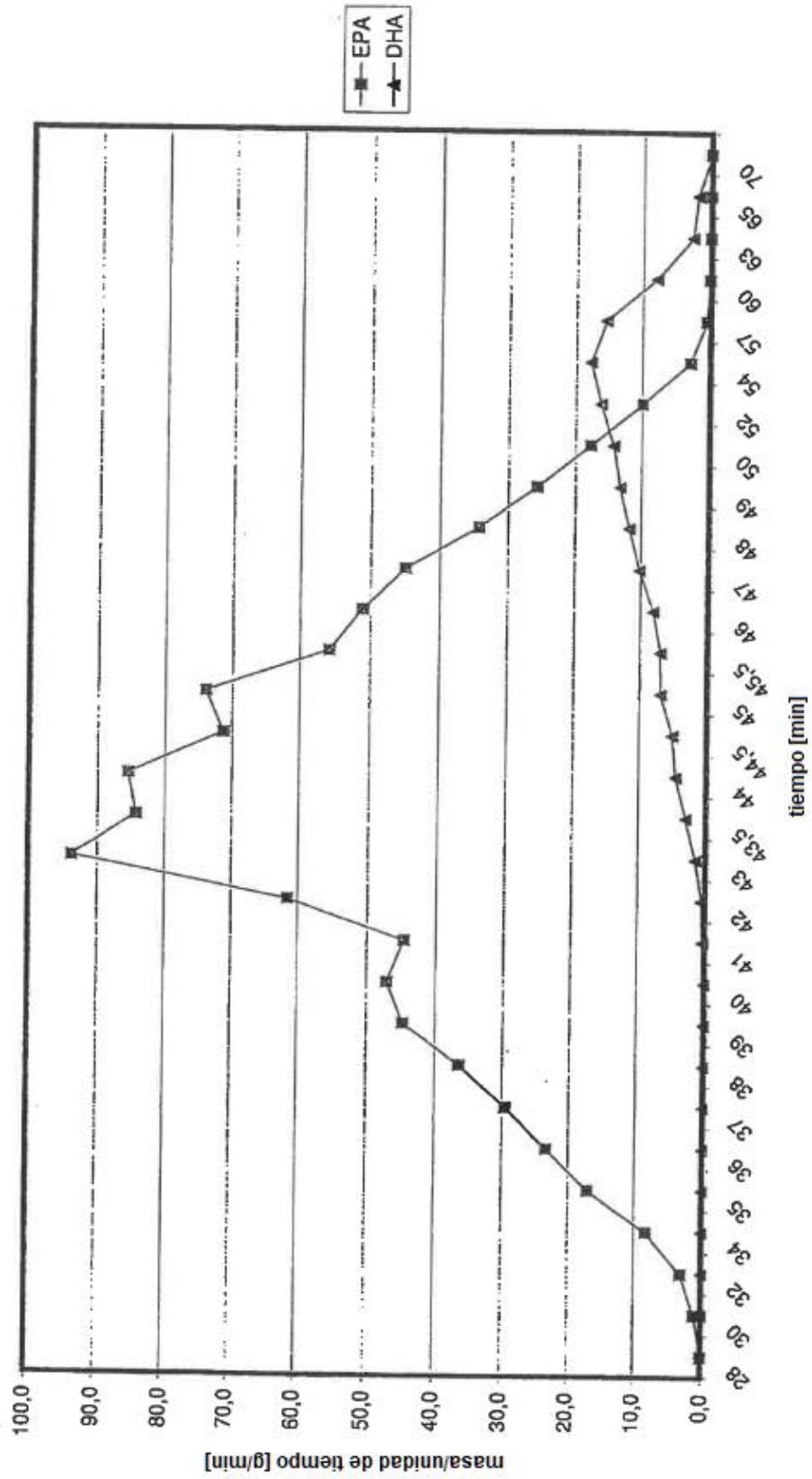


Figura 9
Ejemplo 10

