



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0136940
(43) 공개일자 2024년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B01D 15/18 (2006.01) B01D 15/20 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01) B01J 20/287 (2006.01)
C07C 67/56 (2006.01) C11B 3/10 (2006.01)
C11C 1/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

B01D 15/1821 (2013.01)
B01D 15/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7020992

(22) 출원일자(국제) 2022년12월16일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년06월24일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/086458

(87) 국제공개번호 WO 2023/111317

국제공개일자 2023년06월22일

(30) 우선권주장

21215675.6 2021년12월17일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

바스프 에스이

독일 루트비히스하펜 암 라인 67056 칼-보슈-스트라세 38

(72) 발명자

사 고펜스 페드로

독일 67056 루트비히스하펜 암 라인 칼-보슈-슈트라세 38 바스프 에스이 씨/오

모리슨 앵거스

영국 에이치22 9이디 아일 오브 루이스 웨스턴 아일랜드 브리스클트 바스프 파마 칼라니쉬 리미티드 씨/오

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

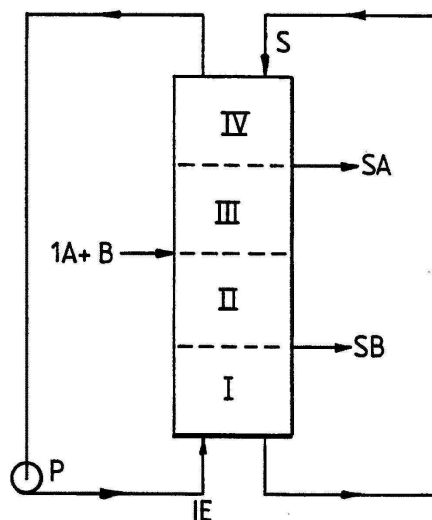
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 다가불포화 지방산의 효율적인 정제를 위한 크로마토그래피 분리 방법

(57) 요약

본 발명은 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물 및 이의 유도체의 정제를 위한 개선된 크로마토그래피 분리 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 공급 혼합물로부터 PUFA 또는 이의 유도체를 정제하기 위한 흡착제 상으로서 특별한 물리적 특징을 갖는 실리카를 사용하는 특히 효율적인 크로마토그래피 분리 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B01J 20/28004 (2013.01)
B01J 20/28011 (2013.01)
B01J 20/28016 (2013.01)
B01J 20/28057 (2013.01)
B01J 20/287 (2013.01)
C07C 67/56 (2013.01)
C11B 3/10 (2013.01)
C11C 1/08 (2013.01)

(72) 발명자

빌링 요한 프레드리크
스웨덴 21176 말뫼 봄가탄 14 1101

맥카더 이시벌

영국 에이치22 9이디 아일 오브 루이스 웨스턴 아
일즈 브리스클트 바스프 파마 칼라니쉬 리미티드
씨/오

명세서

청구범위

청구항 1

공급 혼합물로부터 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물을 회수하기 위한 크로마토그래피 분리 방법으로서, 공급 혼합물을 하기를 함유하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 장치에 도입하여:

(a) 수성 유기 용매인 액체 용리액 상; 및

(b) C18-결합된 실리카인 고체 흡착제 상

(여기서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력은 20 bar 미만임),

이에 의해 공급 혼합물을 정제하는 것을 포함하고, 또한:

(1) 실리카가 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고/갖거나;

(2) 실리카가 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖고/갖거나;

(3) 실리카가 500 m^2/g 이하의 표면적을 갖는 것인,

크로마토그래피 분리 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 실리카가 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖고:

- 실리카가 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고/갖거나;

- 실리카가 500 m^2/g 이하의 표면적을 갖는 것인,

크로마토그래피 분리 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 실리카가 230 내지 270 μm , 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경을 갖는 것인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 실리카가 160 μm 이상의 $D_v(10)$ 및/또는 225 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖고, 바람직하게는 실리카가 165 μm 이상의 $D_v(10)$ 및/또는 215 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖는 것인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 실리카가 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 내지 225 μm 의 $D_v(10)$ 을 가지며, 바람직하게는 실리카가 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 165 내지 215 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖는 것인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 실리카가 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖는 것인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 실리카가 16 내지 22 중량% 의 탄소 로딩을 갖는 것인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 실리카가 $500 \text{ m}^2/\text{g}$ 이하의 표면적 및/또는 $200 \text{ m}^2/\text{g}$ 이상의 표면적을 갖고, 바람직하게는 실리카가 $450 \text{ m}^2/\text{g}$ 이하의 표면적 및/또는 $250 \text{ m}^2/\text{g}$ 이상의 표면적을 갖는 것인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 실리카가:

- (a) $170 \text{ }\mu\text{m}$ 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고/갖거나;
- (b) 250 내지 $260 \text{ }\mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경을 갖고/갖거나;
- (c) 17 내지 18.5 중량% 의 탄소 로딩을 갖고/갖거나;
- (d) 80 내지 $140 \text{ }\text{\AA}$ 의 기공 직경을 갖고/갖거나;
- (e) 0.7 kg/dm^3 이하의 벌크 밀도를 갖는 것인

크로마토그래피 분리 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 부피 기준으로 적어도 80% 의 실리카 입자가 200 내지 $500 \text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는 것인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 유기 용매가 물과 알코올, 에테르, 에스테르, 케톤 또는 니트릴의 혼합물이고, 바람직하게는 수성 유기 용매가 물과 메탄올의 혼합물, 또는 물과 아세토니트릴의 혼합물인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력이 10 bar 미만, 바람직하게는 6 bar 미만인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 크로마토그래피 장치가 실제 또는 모의 이동층 (SMB) 크로마토그래피 장치인 크로마토그래피 분리 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 공급 혼합물이 (i) 적어도 하나의 PUFA 생성물을 포함하는 천연 또는 합성 공급원료, 바람직하게는 어유 공급원료, 식물 오일 공급원료, 또는 미생물 또는 진균에서 유래하는 공급원료이거나, (ii) 천연 또는 합성 공급원료의 부분적 정제로부터 수득한 적어도 하나의 PUFA 생성물을 포함하는 부분적으로 정제된 공급원료이고,

상기 부분적으로 정제된 공급원료가 임의로는 결정화, 분자 증류 또는 분별 증류, 우레아 분별, 은 니트레이트 또는 다른 금속 염 용액으로의 추출, 오오도락톤화, 초임계 유체 분별, 또는 크로마토그래피, 바람직하게는 정지층 크로마토그래피 또는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피에 의해 수득되는 것인

크로마토그래피 분리 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서:

- (a) 공급 혼합물을 크로마토그래피 장치에 도입하는 것이 공급 혼합물을 정제시켜 PUFA 생성물을 산출하거나;

(b) 공급 혼합물을 크로마토그래피 장치에 도입하는 것이 공급 혼합물을 정제시켜 중간 생성물을 산출하며, 여기서 상기 중간 생성물을 추가 정제하여 PUFA 생성물을 수득하고, 바람직하게는 추가 정제가 크로마토그래피 장치에서 수행되며, 보다 바람직하게는 추가 정제가 정지층 크로마토그래피 또는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피를 통해 수행되는 것인

크로마토그래피 분리 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, PUFA 생성물이 PUFA 또는 PUFA 유도체를 포함하고, 유도체가 PUFA 의 모노-, 디- 또는 트리-글리세라이드, 에스테르, 인지질, 아미드, 락톤 또는 염이고, 바람직하게는 PUFA 생성물이 ω -3 PUFA 또는 ω -3 PUFA 의 유도체이고, 가장 바람직하게는:

(a) PUFA 생성물이 EPA 또는 EPA 유도체, 바람직하게는 EPA 의 에스테르, 보다 바람직하게는 EPA 에틸 에스테르이고;

(b) PUFA 생성물이 DHA 또는 DHA 유도체, 바람직하게는 DHA 의 에스테르, 보다 바람직하게는 DHA 에틸 에스테르인

크로마토그래피 분리 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 있어서:

(a) 크로마토그래피 분리 방법으로부터 수득한 PUFA 생성물의 수율이 공급 혼합물에 존재하는 PUFA 생성물의 총 질량을 기준으로 80 중량% 초과, 보다 바람직하게는 90 중량% 초과, 보다 더 바람직하게는 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 98 중량% 초과이고/이거나;

(b) PUFA 생성물이 80 중량% 초과, 바람직하게는 85 중량% 초과, 보다 바람직하게는 90 중량% 초과, 보다 더 바람직하게는 95 중량% 초과, 보다 더욱 바람직하게는 97 중량% 초과, 더욱 더 바람직하게는 98 중량% 초과, 가장 바람직하게는 99 중량% 초과인 순도로 제조되는 것인

크로마토그래피 분리 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물 및 이의 유도체의 정제를 위한 개선된 크로마토그래피 분리 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 공급 혼합물로부터 PUFA 또는 이의 유도체를 정제하기 위한 흡착제 상으로서 특별한 물리적 특징을 갖는 실리카를 사용하는 특히 효율적인 크로마토그래피 분리 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

지방산, 특히 PUFA 및 이들의 유도체는 생물학적으로 중요한 분자를 위한 전구체이며, 이는 혈소판 응집, 염증 및 면역학적 반응과 같은 생물학적 기능의 조절에 중요한 역할을 한다. 따라서, PUFA 및 이의 유도체는 CNS 병상; 당뇨병성 신경병증을 포함하는 신경병증; 심혈관 질환; 염증성 피부 질환을 포함하는 일반 면역계 및 염증성 병상을 포함하는, 광범위한 병리학적 병상을 치료하는데 치료적으로 유용할 수 있다.

[0003]

PUFA 는 식물성 오일 및 해양 오일과 같은 천연 원료에서 발견된다. 그러나, 이러한 PUFA 는 포화 지방산 및 수많은 다른 불순물과의 혼합물로 이러한 오일에 빈번하게 존재한다. 따라서, PUFA 는 바람직하게는 영양적 또는 약학적 사용 전에 정제되어야 한다.

[0004]

불행하게도, PUFA 는 매우 취약하다. 따라서, 산소의 존재 하에 가열될 때, 이들은 이성질체화, 과산화 및 폴리머화되기 쉽다. 따라서 순수한 지방산을 제조하기 위한 PUFA 생성물의 분별 및 정제가 어렵다. 증류는 진공 하에서도 허용불가한 생성물 분해를 초래할 수 있다.

[0005]

크로마토그래피 분리 기법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 정지층 시스템 및 모의 또는 실제 이동층 시스템을 포함하는 크로마토그래피 분리 기법은 둘 모두 당업자에게 친숙하다.

- [0006] 종래의 정지층 크로마토그래피 시스템에서, 성분을 분리해야 하는 혼합물은 용기를 통해 걸러진다. 용기는 일반적으로 원통형이고, 전형적으로 컬럼으로서 지칭된다. 컬럼은 유체에 대해 높은 투과성을 나타내는 다공성의 흡착제 물질 (일반적으로 정지상으로 불림) 의 패킹 (packing) 을 함유한다. 혼합물의 각 성분의 삼출 속도는 그 성분의 물리적 특성에 따라 좌우되어, 성분은 연속적으로 및 선택적으로 컬럼으로부터 배출된다. 따라서, 일부 성분은 정지상에 강하게 고정되어 천천히 걸러지는 반면, 다른 성분은 약하게 고정되고 컬럼에서 더 빠르게 배출되는 경향이 있다. 많은 상이한 다른 정지층 크로마토그래피 시스템이 제안되었으며 분석 및 산업 생산 목적 모두를 위해 사용된다.
- [0007] 모의 및 실제 이동층 크로마토그래피는 당업자에게 친숙한 공지된 기법이다. 작동 원리는 액체 용리액 (또는 탈착제) 상과 고체 흡착제 상의 역류 이동을 포함한다. 이러한 작동은 용매 및 특정 흡착제 인벤토리의 최소 사용을 가능하게 하여, 공정을 경제적으로 실행가능하게 한다. 이러한 분리 기술은 탄화수소, 산업용 화학 물질, 오일, 당 및 API 를 포함하는 다양한 분야에서 여러 적용을 찾아내었다.
- [0008] 따라서, 모의 이동층 크로마토그래피 장치는 직렬로 함께 연결되는 흡착제를 함유하는 다수의 개별 컬럼으로 이루어진다. 용리액은 제 1 방향으로 컬럼을 통과한다. 공급원료 및 용리액의 주입 지점, 및 시스템에서의 분리된 성분 수집 지점은 일련의 밸브 또는 단일 다중-위치 밸브에 의해 주기적으로 이동된다. 전체 효과는 고체 흡착제의 이동층을 함유하는 단일 컬럼의 작동을 모의하는 것이며, 고체 흡착제는 용리액의 유동에 대해 역류 방향으로 이동한다. 따라서, 모의 이동층 시스템은 종래의 정지층 시스템에서와 같이 용리액이 통과하는 고체 흡착제의 정지층을 함유하는 컬럼으로 이루어지지만, 모의 이동층 시스템에서 작동은 연속적인 역류 이동층을 모의하는 것과 같다.
- [0009] 전형적인 모의 이동층 크로마토그래피 장치가 도 1 을 참조하여 예시된다. 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 분리 방법의 개념은 섹션으로, 보다 정확하게는 컬럼의 하부에서 상부로 진행되는 4 개의 중첩된 하위 구역 I, II, III 및 IV 로 분할되는 정지상 S 를 함유하는 수직 크로마토그래피 컬럼을 고려함으로써 설명된다. 용리액은 펌프 P 에 의해 IE 에서 하부에 도입된다. 분리될 성분 A 와 B 의 혼합물을 하위 구역 II 와 하위 구역 III 사이에서 IA + B 에 도입된다. 주로 B 를 함유하는 추출물은 하위 구역 I 과 하위 구역 II 사이에서 SB 에 수집되고, 주로 A 를 함유하는 라피네이트는 하위 구역 III 과 하위 구역 IV 사이에서 SA 에 수집된다.
- [0010] 모의 이동층 시스템의 경우, 정지상 S 의 모의 하향 이동은 고체상에 대한 도입 및 수집 지점의 이동에 의해 야기된다. 실제 이동층 시스템의 경우, 정지상 S 의 모의 하향 이동은 도입 및 수집 지점에 대한 다양한 크로마토그래피 컬럼의 이동에 의해 야기된다. 도 1 에서, 용리액은 상향으로 흐르며 혼합물 A + B 는 하위 구역 II 와 하위 구역 III 사이에 주입된다. 성분은 정지상과의 크로마토그래피 상호작용, 예를 들어 다공성 매질 상의 흡착에 따라 이동할 것이다. 정지상에 대해 더 강한 친화성을 나타내는 성분 B (더 느리게 진행하는 성분) 는 용리액에 의해 더 느리게 비탈 동반될 것이고, 이를 지연시키면서 뒤따를 것이다. 정지상에 대해 더 약한 친화성을 나타내는 성분 A (더 빨리 진행하는 성분) 는 용리액에 의해 쉽게 비탈 동반될 것이다. 올바른 매개변수 세트, 특히 각각의 하위 구역에서의 유량이 제대로 추정되고 제어되는 경우, 정지상에 대해 보다 약한 친화성을 나타내는 성분 A 는 하위 구역 III 과 하위 구역 IV 사이에 라피네이트로서 수집될 것이며, 정지상에 대해 보다 강한 친화성을 나타내는 성분 B 는 하위 구역 I 과 하위 구역 II 사이에 추출물로서 수집될 것이다.
- [0011] 따라서, 도 1 에 개략적으로 도시된 종래의 모의 이동층 시스템은 이원 분별 (binary fractionation) 로 제한된다는 것이 이해될 것이다.
- [0012] 다른 관련된, 소위 모의 이동층 비-통상적 작동 모드, 그 중에서도 예컨대 Improved-SMB, Sequential-SMB, Varicol, Powerfeed, Modicon, MCSGP, Outlet Swing Stream-OSS, JO 또는 pseudo SMB 의 이점은 공지되어 있으며, 다른 곳에서 상세히 설명되는 바와 같이, 숙련된 전문가에 의해 종래의 모의 이동층 방법으로부터 유래할 수 있다 (예를 들어, 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 Sa Gomes and Rodrigues, *Chemical Engineering and Technology Special Issue: Preparative Chromatography and Downstream Processing*, **2012**, 35(1), 17-34 참조). 모의 이동층 크로마토그래피를 위한 방법 및 장비는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 US 2,985,589, US 3,696,107, US 3,706,812, US 3,761,533, FR-A-2103302, FR-A-2651148 및 FR-A-2651149 를 포함하는 여러 특허에 기재되어 있다. 이 주제는 또한 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 ["Preparative and Production Scale Chromatography", edited by Ganetsos and Barker, Marcel Dekker Inc, New York, 1993] 에서 상세히 다루어진다.

- [0013] 실제 이동층 시스템은 모의 이동층 시스템과 작동에 있어서 유사하다. 그러나, 밸브 시스템 또는 단일 다중 위치 밸브에 의해 분리된 성분 수집 지점 및 공급 혼합물과 용리액의 주입 지점을 이동시키기보다는, 대신에 일련의 흡착 유닛 (즉, 컬럼) 이 공급물 및 배수 (drawoff) 지점에 대해 물리적으로 이동된다. 다시금, 작동은 연속적인 역류 이동층을 모의하는 것과 같다.
- [0014] 실제 이동층 크로마토그래피를 위한 방법 및 장비는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 US 6,979,402, US 5,069,883 및 US 4,764,276 을 포함하는 여러 특허에 기재되어 있다.
- [0015] PUFA 생성물의 정제는 특히 어렵다. 따라서, PUFA 생성물을 제조하기 위한 많은 적합한 공급원료는 크로마토그래피 장치에서 매우 유사한 체류 시간을 갖는 다수의 상이한 성분을 함유하는 매우 복잡한 혼합물이다. 따라서 이러한 공급원료로부터 특정 PUFA 를 분리하는 것은 매우 어렵다. 그러나, PUFA 생성물의 높은 순도가 특히 약학 및 기능성 식품 적용에 필요하다. 따라서 역사적으로, 증류는 고순도 PUFA 생성물이 필요할 때 사용되어 왔다. 그러나, 상기 논의된 바와 같이 섬세한 PUFA 에 대한 분리 기법으로서 증류를 사용하는 것은 상당한 단점이 있다.
- [0016] 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 공개된 국제 특허 출원 WO 2011/080503 은 공급 혼합물로부터 PUFA 생성물을 효율적이고 매우 높은 순도로 회수하기 위한 SMB 분리 방법을 개시하고 있다. 이러한 특정 셋업의 조정은 모두 본원에 참조로 포함되는 WO 2013/005046, WO 2013/005047, WO 2013/005048, WO 2013/005051, WO 2013/005052 및 WO 2014/108686 에 기재되어 있다. 그러나, 저압 (즉, 20 bar 미만, 바람직하게는 10 bar 미만) 에서 작동될 때 이러한 크로마토그래피 시스템에서 많은 부피의 용리액이 종종 요구되는 것이 발견되었다. 이는 전형적으로 더 높은 압력 (즉, 20-100 bar) 에서 작동하며 요구되는 용매의 낮은 회석 (즉, 양) 및 높은 생산성으로 공급 혼합물로부터 PUFA 생성물을 추출할 수 있는 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템과 대조적이다. 그러나, 고압에서 작동하는 것은 대규모 상업 공정에서 몇 가지 단점을 갖는다. 특히, 크로마토그래피 컬럼에서의 정지상 (예를 들어, 실리카) 은 증가된 응력 하에 놓이며 보다 빈번한 기준으로 교체되어야 한다.
- [0017] 따라서, 낮은 작동 압력에서 공급 혼합물로부터 PUFA 생성물을 정제하기 위한 보다 효율적인 크로마토그래피 분리 방법을 제공하여 PUFA 생성물을 추출하기 위해 더 적은 용리액이 요구되게 할 필요가 있다.

발명의 내용

- [0018] **발명의 개요**
- [0019] 놀랍게도, 본 발명자들은 특정 물리적 특징을 갖는 실리카 흡착제 상을 사용하는 것이 낮은 압력에서 작동하는 동안 전형적인 PUFA-함유 공급원료에서 상이한 PUFA 생성물을 나타내는 피크의 향상된 분해능을 초래할 수 있다는 것을 발견하였다. 피크 사이의 이러한 향상된 분해능은 보다 효율적인 분리를 초래하여, 용리액의 더 낮은 회석을 필요로 한다. 심지어 HPLC 방법을 사용할 때보다 용리액의 더 낮은 회석이 달성될 수 있는 한편, 또한 허용가능한 (및 비교적, 놀랍게도 양호한) 수준의 생산성을 달성할 수 있다는 것이 발견되었다.
- [0020] 따라서, 본 발명은 공급 혼합물로부터 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물을 회수하기 위한 크로마토그래피 분리 방법을 제공하며, 이는 공급 혼합물을 하기를 함유하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 장치에 도입하여:
- [0021] (a) 수성 유기 용매인 액체 용리액 상; 및
- [0022] (b) C18-결합된 실리카인 고체 흡착제 상
- [0023] (여기서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력은 20 bar 미만임),
- [0024] 이에 의해 공급 혼합물을 정제하는 것을 포함하고, 또한:
- [0025] (1) 실리카는 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고/갖거나;
- [0026] (2) 실리카는 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖고/갖거나;
- [0027] (3) 실리카의 표면적은 500 m^2/g 이하이다.
- [0028] 특정 구현예에서, 본 발명은 공급 혼합물로부터 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물을 회수하기 위한 크로마토그래피 분리 방법을 제공하며, 이는 공급 혼합물을 하기를 함유하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는

크로마토그래피 장치에 도입하여:

- [0029] (a) 수성 유기 용매인 액체 용리액 상; 및
- [0030] (b) 15 내지 24 중량%의 탄소 로딩을 갖는 C18-결합된 실리카인 고체 흡착제 상
- [0031] (여기서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력은 20 bar 미만임),
- [0032] 이에 의해 공급 혼합물을 정제하는 것을 포함하고, 또한:
- [0033] (1) 실리카는 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고/갖거나;
- [0034] (2) 실리카의 표면적은 500 m^2/g 이하이다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 2성분 혼합물을 분리하기 위한 모의 또는 실제 이동층 방법의 기본 원리를 도시한다.
- 도 2는 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 EPA를 분리하기 위한 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 3은 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 DHA를 분리하기 위한 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 4는 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 EPA를 분리하기 위한 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 5는 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 DHA를 분리하기 위한 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 6은 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 EPA를 분리하기 위한 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 7은 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 DHA를 분리하기 위한 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 8은 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 EPA를 분리하기 위한 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 9는 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 EPA를 분리하기 위한 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 10은 2개의 모의 또는 실제 이동층 방법을 포함하는 크로마토그래피 분리 단계가 수행될 수 있는 3가지 방식을 도시한다.
- 도 11은 더 빨리 및 더 느리게 진행하는 불순물 (즉, 더 극성 및 덜 극성의 불순물)로부터 EPA를 분리하기 위한 크로마토그래피 분리 단계를 도시한다.
- 도 12는 상이한 C18 실리카 유형에 대한 입자 직경의 함수로서 실리카 샘플의 입자 부피에 대한 총 기여도를 도시한다. (A) 실리카 1 (참조 실리카), 2개의 개별 뱃치, 및 실리카 2. (B) 실리카 1 (참조 실리카), 2개의 개별 뱃치, 및 실리카 3 및 4.
- 도 13은 (A) 실리카 1; (B) 실리카 2; 및 (C) 실리카 4의 주사 전자 현미경 이미지를 도시한다.
- 도 14는 상이한 실리카를 사용하는 크로마토그래피 컬럼에서 EPA-함유 공급원료의 정제 동안 EPA 피크의 비대칭성을 나타내는 펄스 시험을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 발명의 상세한 설명
- [0037] 가장 일반적인 의미에서, 본 발명은 공급 혼합물로부터 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물을 회수하기 위한 크로마토그래피 분리 방법을 제공하며, 이는 공급 혼합물을 하기를 함유하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 포

합하는 크로마토그래피 장치에 도입하여:

(a) 수성 유기 용매인 액체 용리액 상; 및

(b) C18-결합된 실리카인 고체 흡착제 상

(여기서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력은 20 bar 미만임),

이에 의해 공급 혼합물을 정제하는 것을 포함한다.

고체 흡착제 상

고체 흡착제 상은 전형적으로 역상 실리카이다. 고체 흡착제 상은 전형적으로 C18-결합된 실리카 겔이다. 바람직하게는, 고체 흡착제 상은 역상 C18-결합된 실리카 겔이다. 흡착제 상은 전형적으로 비극성이다.

크로마토그래피 장치는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 컬럼을 포함한다. 일부 구현예에서, 컬럼의 수는 전형적으로 1 개이다. 다른 구현예에서, 컬럼의 수는 전형적으로 1 개 초과, 바람직하게는 4 개 이상, 보다 바람직하게는 6 개 이상, 보다 더 바람직하게는 8 개 이상, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 컬럼이다. 전형적으로, 25 개 이하의 컬럼, 바람직하게는 20 개 이하의 컬럼, 보다 바람직하게는 15 개 이하의 컬럼이 존재한다. 하나 초과와 크로마토그래피 컬럼이 사용되는 경우, 각각의 크로마토그래피 컬럼은 동일하거나 상이한 흡착제를 함유할 수 있다. 전형적으로, 하나 초과와 크로마토그래피 컬럼이 사용되는 경우, 각각의 컬럼은 동일한 흡착제를 함유한다.

고체 흡착제 상 물질의 형상은 예를 들어, 구형 또는 비구형 비드, 바람직하게는 실질적으로 구형 비드일 수 있다.

C18-결합된 실리카는 특정한 물리적 특징을 갖는다.

본 발명의 제 1 구현예에서, C18-결합된 실리카는 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖는다.

본 발명의 제 2 구현예에서, C18-결합된 실리카는 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다.

본 발명의 제 3 구현예에서, C18-결합된 실리카는 500 m^2/g 이하의 표면적을 갖는다.

실리카의 이러한 각각의 특정한 물리적 특징은 PUFA-함유 공급원료의 분리에서 상이한 피크 사이의 분해능 증가를 이끌어내는 것으로 발견되었으며, 여기서 각각의 피크는 상이한 PUFA 생성물에 상응한다. 이는 결국 용매를 덜 사용하면서 높은 수율로 원하는 PUFA 생성물이 보다 효율적으로 정제될 수 있게 한다. 이러한 용매의 감소된 사용은 산업 규모로 수행되는 분리에 대해 보다 비용 효율적이고, 보다 환경 친화적이다. 더욱이, 상대적으로 큰 입자의 실리카를 사용하면서 이러한 이점을 달성하는 능력은 시스템에 더 낮은 압력의 용리액이 사용될 수 있게 한다. 이는 비용 절감 및 장치의 수명, 및 고체 흡착제 상이 교체되어야 하는 빈도 감소 면에서 추가적인 이점을 갖는다.

따라서 제 1 구현예에서, 본 발명은 공급 혼합물로부터 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물을 회수하기 위한 크로마토그래피 분리 방법을 제공하며, 이는 공급 혼합물을 하기를 함유하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 장치에 도입하여:

(a) 수성 유기 용매인 액체 용리액 상; 및

(b) 평균 입자 직경이 230 내지 270 μm 이고 $D_v(10)$ 이 160 μm 이상인 C18-결합된 실리카인 고체 흡착제 상

(여기서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력은 20 bar 미만임),

이에 의해 공급 혼합물을 정제하는 것을 포함한다.

본원에서 정의된 바와 같이, "평균 입자 직경" 은 입자의 부피 모멘트 평균 ($D[4,3]$, 부피-가중 평균 직경 또는 드 브루케르 (De Brouckere) 평균 직경으로도 지칭됨) 을 의미한다. $D_v(10)$ 은 증가하는 입자 직경에 대한 실리카 입자의 누적 부피 분포의 플롯에서 입자 직경의 10 번째 백분위수를 의미한다. 부피 모멘트 평균은 샘플에 존재하는 거친 입자 (즉, 큰 크기의 입자) 의 수에 특히 민감하고, $D_v(10)$ 값은 샘플에 존재하는 미세 입자 (즉, 작은 크기의 입자) 의 수에 특히 민감하다. 따라서, 함께 고려하면, 부피 모멘트 평균 및 $D_v(10)$ 값은 실리카의 평균 입자 크기 및 입자 크기 분포 둘 모두의 효과적인 특징분석을 나타낸다.

- [0057] 부피 모멘트 부피 분율 및 $D_v(10)$ 은 전형적으로 예를 들어 표준 방법 ISO 13320:2020 을 사용하여 레이저 회절에 의해 측정된다. 레이저 회절의 세부사항은 예를 들어 그 내용 전체가 본원에 참조로 포함되는 <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/laser-diffraction> (2021 년 3 월 15 일 액세스됨) 에서 논의된다.

[0058] 평균 입자 직경이 상당히 커서 낮은 압력이 크로마토그래피 분리에 사용될 수 있는 것이 바람직하다. 그러나, 입자 크기 분포가 협소한 것이 또한 바람직한데, 이는 놀랍게도 PUFA-함유 공급원료의 정제에서 상이한 PUFA 피크 사이의 분해능을 향상시켜, 분리에 용리액이 덜 사용될 수 있게 하는 것으로 밝혀졌기 때문이다. 특히, 놀랍게도 실리카 샘플로부터 특히 미세 입자 (즉, 작은 직경을 갖는 입자) 의 "테일 (tail)" 의 감소 또는 제거가 PUFA 피크 사이의 분해능을 증가시키는 것으로 발견되었다. 따라서, 상당히 높은 평균 입자 직경, 높은 $D_v(10)$ 값, 및 평균 입자 직경과 $D_v(10)$ 값 사이의 상대적으로 작은 차이는 모두 이러한 구현예에서 사용을 위한 실리카의 바람직한 특징인 것으로 발견된다.

[0059] 따라서 제 1 구현예에서, 평균 입자 직경은 바람직하게는 235 내지 265 μm , 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm , 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm , 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 이다.

[0060] 제 1 구현예에서, 실리카는 바람직하게는 165 μm 이상, 보다 바람직하게는 170 μm 이상, 보다 더 바람직하게는 175 μm 이상, 보다 더 바람직하게는 180 μm 이상, 가장 바람직하게는 185 μm 이상인 $D_v(10)$ 을 갖는다. 전형적으로, 실리카는 225 μm 이하, 바람직하게는 220 μm 이하, 보다 바람직하게는 215 μm 이하, 가장 바람직하게는 210 μm 이하인 $D_v(10)$ 을 갖는다. 따라서 전형적으로, 실리카는 160 내지 225 μm , 바람직하게는 165 내지 220 μm , 보다 바람직하게는 175 내지 215 μm , 가장 바람직하게는 185 내지 210 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖는다.

[0061] 따라서 제 1 구현예에서, 실리카는 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 165 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 175 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 180 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 185 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖는다.

[0062] 따라서 제 1 구현예에서, 실리카는 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 225 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 220 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 215 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 210 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖는다.

[0063] 따라서 제 1 구현예에서, 실리카는 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 165 내지 225 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 175 내지 220 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 180 내지 215 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 185 내지 210 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖는다.

[0064] 제 1 구현예에서, 실리카는 전형적으로 15 내지 24 중량%, 바람직하게는 16 내지 22 중량%, 보다 바람직하게는 16.5 내지 20 중량%, 보다 더 바람직하게는 17 내지 19.5 중량%, 가장 바람직하게는 17.5 내지 19 중량%, 예를 들어 17.5 내지 18 중량% 의 탄소 로딩 (%) 을 갖는다. 탄소 로딩은 탄소인 고체 흡수체 상의 % 의 측정이다. 전형적으로, 실질적으로 모든 탄소 함량은 실리카 입자의 C18-작용화로부터 유래한다.

[0065] 실리카 입자의 탄소 로딩은 전형적으로 연소 분석에 의해, 예를 들어 표준 ISO 21068-2 에 기재된 유형의 방법 또는 이의 변형을 사용함으로써, 또는 Nguyen *et al.* (*Science and Technology Development Journal*, 2016, 19(4), 162-166, 그 전체가 본원에 참조로 포함됨) 의 방법을 사용함으로써 측정된다.

[0066] 제 1 구현예에서, 실리카는 전형적으로 500 m^2/g 미만, 바람직하게는 450 m^2/g 미만, 보다 바람직하게는 400 m^2/g 미만, 가장 바람직하게는 350 m^2/g 미만의 표면적을 갖는다. 실리카는 전형적으로 100 m^2/g 초과, 바람직하게는 150 m^2/g 초과, 보다 바람직하게는 200 m^2/g 초과, 보다 더 바람직하게는 250 m^2/g 초과, 가장 바람직하게는 300 m^2/g 초과, 가장 바람직하게는 350 m^2/g 초과, 가장 바람직하게는 300 내지 500 m^2/g , 바람직하게는 200 내지 450 m^2/g , 보다 바람직하게는 250 내지 400 m^2/g , 가장 바람직하게는 300 내지 350 m^2/g 의 표면적을 갖는다.

[0067] 실리카 입자의 표면적은 전형적으로 BET 표면적 분석에 의해, 예를 들어 표준 방법 ISO 9277:2010 을 사용하여

측정된다. 방법에서, 표면적은 BET 이론 (Brunauer, Emmett and Teller) 을 사용하여 흡착 데이터, 전형적으로 질소 흡착으로부터 결정된다. 표면적을 측정하는 BET 방법은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 "Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density" by Lowell, Shields, Thomas and Thommes, Springer, Dordrecht, 2006 (pub: Springer) 에서 상세히 기재되어 있다.

- [0068] 이러한 맥락에서 표면적은 실리카 표면을 의미하며, C18 사슬의 결합 전에 베어 (bare) 실리카 상에서 측정된다.
- [0069] 제 2 구현예에서, 본 발명은 공급 혼합물로부터 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물을 회수하기 위한 크로마토그래피 분리 방법을 제공하며, 이는 공급 혼합물을 하기를 함유하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 장치에 도입하여:
- [0070] (a) 수성 유기 용매인 액체 용리액 상; 및
- [0071] (b) 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖는 C18-결합된 실리카인 고체 흡착제 상
- [0072] (여기서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력은 20 bar 미만임),
- [0073] 이에 의해 공급 혼합물을 정제하는 것을 포함한다.
- [0074] 놀랍게도 본 발명자들은 실리카가 더 작은 입자의 "테일" 을 포함하는지 여부와 관계없이 (즉, $D_v(10)$ 값이 상기 제 1 구현예에서 기재된 것보다 낮은지 여부와 관계없이), 이러한 범위의 탄소 로딩을 갖는 실리카가 공급 혼합물로부터의 PUFA 생성물의 분리에서 PUFA 피크 사이에 개선된 분해능을 제공한다는 것을 발견하였다.
- [0075] 제 2 구현예에서, 실리카의 탄소 로딩은 바람직하게는 16 내지 22 중량%, 보다 바람직하게는 16.5 내지 20 중량%, 보다 더 바람직하게는 17 내지 19 중량%, 가장 바람직하게는 17.5 내지 18 중량%, 예를 들어 약 17.8 중량% 또는 17.9 중량% 이다. 전형적으로, 실질적으로 모든 탄소 함량은 실리카 입자의 C18-작용화로부터 유래한다.
- [0076] 실리카 입자의 탄소 로딩은 전형적으로 제 1 구현예와 관련하여 상기 기재된 바와 같이 측정된다.
- [0077] 제 2 구현예에서, 전형적으로 평균 입자 직경은 230 내지 270 μm , 바람직하게는 235 내지 265 μm , 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm , 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm , 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 이다.
- [0078] 제 2 구현예에서, 전형적으로 실리카의 $D_v(10)$ 값은 160 μm 이상, 바람직하게는 165 μm 이상, 보다 바람직하게는 170 μm 이상, 보다 더 바람직하게는 175 μm 이상, 보다 더 바람직하게는 180 μm 이상, 가장 바람직하게는 185 μm 이상이다. 전형적으로, 실리카는 225 μm 이하, 바람직하게는 220 μm 이하, 보다 바람직하게는 215 μm 이하, 가장 바람직하게는 210 μm 이하인 $D_v(10)$ 을 갖는다. 따라서 전형적으로, 실리카는 160 내지 225 μm , 바람직하게는 165 내지 220 μm , 보다 바람직하게는 175 내지 215 μm , 가장 바람직하게는 185 내지 210 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖는다.
- [0079] 따라서 제 2 구현예에서, 실리카는 전형적으로 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고, 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 165 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 175 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 180 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 185 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖는다.
- [0080] 따라서 제 2 구현예에서, 실리카는 전형적으로 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 225 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖고, 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 225 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 220 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 215 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 210 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖는다.
- [0081] 따라서 제 2 구현예에서, 실리카는 전형적으로 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 내지 225 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 165 내지 225 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 175 내지 220 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 180 내지 215 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 185 내지 210 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖는다.

[0082] 평균 입자 직경 및 Dv(10) 값 둘 모두는 전형적으로 제 1 구현예와 관련하여 상기 기재된 바와 같이 측정된다.

[0083] 제 2 구현예에서, 실리카는 전형적으로 $500 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만, 바람직하게는 $450 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만, 보다 바람직하게는 $400 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만, 가장 바람직하게는 $350 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 표면적을 갖는다. 실리카는 전형적으로 $100 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과, 바람직하게는 $150 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과, 보다 바람직하게는 $200 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과, 보다 더 바람직하게는 $250 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과, 가장 바람직하게는 $300 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과,의 표면적을 갖는다. 따라서, 실리카는 전형적으로 100 내지 $500 \text{ m}^2/\text{g}$, 바람직하게는 200 내지 $450 \text{ m}^2/\text{g}$, 보다 바람직하게는 250 내지 $400 \text{ m}^2/\text{g}$, 가장 바람직하게는 300 내지 $350 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 표면적을 갖는다.

[0084] 실리카 입자의 표면적은 전형적으로 제 1 구현예와 관련하여 상기 기재된 바와 같이 측정된다.

[0085] 제 3 구현예에서, 본 발명은 공급 혼합물로부터 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물을 회수하기 위한 크로마토그래피 분리 방법을 제공하며, 이는 공급 혼합물을 하기를 함유하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 장치에 도입하여:

[0086] (a) 수성 유기 용매인 액체 용리액 상; 및

[0087] (b) 500 m²/g 이하의 표면적을 갖는 C18-결합된 실리카인 고체 흡착제 상

[0088] (여기서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력은 20 bar 미만임),

[0089] 이에 의해 공급 혼합물을 정제하는 것을 포함한다.

[0090] 놀랍게도, 본 발명자들은 이 범위의 표면적을 갖는 실리카가 공급 혼합물로부터의 PUFA 생성물의 분리에서 PUFA 피크 사이에 개선된 분해능을 제공한다는 것을 발견하였다.

[0091] 제 3 구현예에서, 실리카는 바람직하게는 $450 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만, 보다 바람직하게는 $400 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만, 가장 바람직하게는 $350 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 표면적을 갖는다. 실리카는 전형적으로 $100 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과, 바람직하게는 $150 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과, 보다 바람직하게는 $200 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과, 보다 더 바람직하게는 $250 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과, 가장 바람직하게는 $300 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과,의 표면적을 갖는다. 따라서, 실리카는 전형적으로 100 내지 $500 \text{ m}^2/\text{g}$, 바람직하게는 200 내지 $450 \text{ m}^2/\text{g}$, 보다 바람직하게는 250 내지 $400 \text{ m}^2/\text{g}$, 가장 바람직하게는 300 내지 $350 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 표면적을 갖는다.

[0092] 실리카 입자의 표면적은 전형적으로 제 1 구현예와 관련하여 상기 기재된 바와 같이 측정된다.

[0093] 제 3 구현예에서, 전형적으로 평균 입자 직경은 230 내지 270 μm , 바람직하게는 235 내지 265 μm , 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm , 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm , 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 이다.

[0094] 제 3 구현예에서, 전형적으로 실리카의 Dv(10) 값은 160 μm 이상, 바람직하게는 165 μm 이상, 보다 바람직하게는 170 μm 이상, 보다 더 바람직하게는 175 μm 이상, 보다 더 바람직하게는 180 μm 이상, 가장 바람직하게는 185 μm 이상이다. 전형적으로, 실리카는 225 μm 이하, 바람직하게는 220 μm 이하, 보다 바람직하게는 215 μm 이하, 가장 바람직하게는 210 μm 이하인 Dv(10) 을 갖는다. 따라서 전형적으로, 실리카는 160 내지 225 μm , 바람직하게는 170 내지 220 μm , 보다 바람직하게는 180 내지 215 μm , 가장 바람직하게는 185 내지 210 μm 의 Dv(10) 을 갖는다.

[0095] 따라서 제 3 구현예에서, 실리카는 전형적으로 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 Dv(10)을 갖고, 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 165 μm 이상의 Dv(10)을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 175 μm 이상의 Dv(10)을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 180 μm 이상의 Dv(10)을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 185 μm 이상의 Dv(10)을 갖는다.

[0096] 따라서 제 3 구현예에서, 실리카는 전형적으로 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 225 μm 이하의 Dv(10)을 갖고, 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 225 μm 이하의 Dv(10)을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 220 μm 이하의 Dv(10)을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 215 μm 이하의 Dv(10)을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균

입자 직경 및 210 μm 이하의 $D_v(10)$ 을 갖는다.

- [0097] 따라서 제 3 구현예에서, 실리카는 전형적으로 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 내지 225 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 바람직하게는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 165 내지 225 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 바람직하게는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 175 내지 220 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 보다 더 바람직하게는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 180 내지 215 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖고, 가장 바람직하게는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 185 내지 210 μm 의 $D_v(10)$ 을 갖는다.
- [0098] 평균 입자 직경 및 $D_v(10)$ 값 둘 모두는 전형적으로 제 1 구현예와 관련하여 상기 기재된 바와 같이 측정된다.
- [0099] 제 3 구현예에서, 실리카는 전형적으로 15 내지 24 중량%, 바람직하게는 16 내지 22 중량%, 보다 바람직하게는 16.5 내지 20 중량%, 보다 더 바람직하게는 17 내지 19 중량%, 가장 바람직하게는 17.5 내지 18 중량%, 예를 들어 약 17.8 중량% 또는 17.9 중량% 의 탄소 로딩 (%C) 을 갖는다. 전형적으로, 실질적으로 모든 탄소 함량은 실리카 입자의 C18-작용화로부터 유래한다.
- [0100] 실리카 입자의 탄소 로딩은 전형적으로 제 1 구현예와 관련하여 상기 기재된 바와 같이 측정된다.
- [0101] 바람직한 구현예에서, 실리카는 제 1 및/또는 제 3 구현예의 특성에 더하여 제 2 구현예의 특성을 갖는다. 따라서 이러한 바람직한 구현예에서, 본 발명은 공급 혼합물로부터 다중불포화 지방산 (PUFA) 생성물을 회수하기 위한 크로마토그래피 분리 방법을 제공하며, 이는 공급 혼합물을 하기를 함유하는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 장치에 도입하여:
- [0102] (a) 수성 유기 용매인 액체 용리액 상; 및
- [0103] (b) 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖는 C18-결합된 실리카인 고체 흡착제 상
- [0104] (여기서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼 내의 압력은 20 bar 미만임),
- [0105] 이에 의해 공급 혼합물을 정제하는 것을 포함하고, 또한:
- [0106] (1) 실리카는 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 $D_v(10)$ 을 갖고/갖거나;
- [0107] (2) 실리카의 표면적은 500 m^2/g 이하이다.
- [0108] 이러한 바람직한 구현예에서, 실리카는 제 1 및 제 2 구현예의 특성을 가질 수 있다. 따라서, 실리카는 전형적으로 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 μm 이상의 $D_v(10)$, 및 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 165 μm 이상의 $D_v(10)$, 및 16 내지 22 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 175 μm 이상의 $D_v(10)$, 및 16.5 내지 20 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 180 μm 이상의 $D_v(10)$, 및 17 내지 19 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 185 μm 이상의 $D_v(10)$, 및 17.5 내지 18.0 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다.
- [0109] 실리카가 제 1 및 제 2 구현예의 특성을 갖는 이러한 바람직한 구현예에서, 전형적으로 실리카는 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 225 μm 이하의 $D_v(10)$, 및 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 225 μm 이하의 $D_v(10)$, 및 16 내지 22 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 220 μm 이하의 $D_v(10)$, 및 16.5 내지 20 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 215 μm 이하의 $D_v(10)$, 및 17 내지 19 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 210 μm 이하의 $D_v(10)$, 및 17.5 내지 18.0 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다.
- [0110] 실리카가 제 1 및 제 2 구현예의 특성을 갖는 이러한 바람직한 구현예에서, 전형적으로 실리카는 230 내지 270 μm 의 평균 입자 직경 및 160 내지 225 μm 의 $D_v(10)$, 및 15 내지 24 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 235 내지 265 μm 의 평균 입자 직경 및 165 내지 225 μm 의 $D_v(10)$, 및 16 내지 22 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 240 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 175 내지 220 μm 의 $D_v(10)$, 및 16.5 내지 20 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 245 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 180 내지 215 μm 의 $D_v(10)$, 및 17 내지 19 중량% 의 탄소 로딩을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 250 내지 260 μm 의 평균 입자 직경 및 185 내지 210 μm 의 $D_v(10)$,

및 17.5 내지 18.0 중량%의 탄소 로딩을 갖는다.

[0111] 대안적으로 이러한 바람직한 구현예에서, 실리카는 제 2 및 제 3 구현예의 특성을 갖는다. 따라서, 실리카는 전형적으로 15 내지 24 중량%의 탄소 로딩, 및 $500 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 16 내지 22 중량%의 탄소 로딩, 및 $450 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 16.5 내지 20 중량%의 탄소 로딩, 및 $400 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 17 내지 19 중량%의 탄소 로딩, 및 $400 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 17.5 내지 18.0 중량%의 탄소 로딩, 및 $350 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다.

[0112] 실리카가 제 2 및 제 3 구현예의 특성을 갖는 이러한 바람직한 구현예에서, 전형적으로 실리카는 15 내지 24 중량%의 탄소 로딩, 및 $100 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 16 내지 22 중량%의 탄소 로딩, 및 $150 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 16.5 내지 20 중량%의 탄소 로딩, 및 $200 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 17 내지 19 중량%의 탄소 로딩, 및 $250 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 17.5 내지 18.0 중량%의 탄소 로딩, 및 $300 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다.

[0113] 실리카가 제 2 및 제 3 구현예의 특성을 갖는 이러한 바람직한 구현예에서, 전형적으로 실리카는 15 내지 24 중량%의 탄소 로딩, 및 100 내지 $500 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 16 내지 22 중량%의 탄소 로딩, 및 150 내지 $450 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 16.5 내지 20 중량%의 탄소 로딩, 및 200 내지 $450 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 17 내지 19 중량%의 탄소 로딩, 및 250 내지 $400 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 17.5 내지 18.0 중량%의 탄소 로딩, 및 300 내지 $350 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다.

[0114] 특히 바람직한 구현예에서, 실리카는 제 1, 제 2 및 제 3 구현예의 모든 특성을 갖는다. 따라서 이러한 특히 바람직한 구현예에서, 전형적으로 실리카는 230 내지 $270 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $160 \mu\text{m}$ 이상의 $D_v(10)$, 15 내지 24 중량%의 탄소 로딩, 및 $500 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 235 내지 $265 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $165 \mu\text{m}$ 이상의 $D_v(10)$, 16 내지 22 중량%의 탄소 로딩, 및 $450 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 240 내지 $260 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $175 \mu\text{m}$ 이상의 $D_v(10)$, 16.5 내지 20 중량%의 탄소 로딩, 및 $400 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 245 내지 $260 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $180 \mu\text{m}$ 이상의 $D_v(10)$, 17 내지 19 중량%의 탄소 로딩, 및 $400 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 250 내지 $260 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $185 \mu\text{m}$ 이상의 $D_v(10)$, 17.5 내지 18.0 중량%의 탄소 로딩, 및 $350 \text{ m}^2/\text{g}$ 미만의 총 표면적을 갖는다.

[0115] 이러한 특히 바람직한 구현예에서, 전형적으로 실리카는 230 내지 $270 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $225 \mu\text{m}$ 이하의 $D_v(10)$, 15 내지 24 중량%의 탄소 로딩, 및 $100 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 235 내지 $265 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $225 \mu\text{m}$ 이하의 $D_v(10)$, 16 내지 22 중량%의 탄소 로딩, 및 $150 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 240 내지 $260 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $220 \mu\text{m}$ 이하의 $D_v(10)$, 16.5 내지 20 중량%의 탄소 로딩, 및 $200 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 245 내지 $260 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $215 \mu\text{m}$ 이하의 $D_v(10)$, 17 내지 19 중량%의 탄소 로딩, 및 $250 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 250 내지 $260 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 $210 \mu\text{m}$ 이하의 $D_v(10)$, 17.5 내지 18.0 중량%의 탄소 로딩, 및 $300 \text{ m}^2/\text{g}$ 초과와 총 표면적을 갖는다.

[0116] 이러한 특히 바람직한 구현예에서, 전형적으로 실리카는 230 내지 $270 \mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 160 내지 225

μm 의 $D_v(10)$, 15 내지 24 중량%의 탄소 로딩, 및 100 내지 $500\text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다. 바람직하게는, 실리카는 235 내지 $265\text{ }\mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 165 내지 $225\text{ }\mu\text{m}$ 의 $D_v(10)$, 16 내지 22 중량%의 탄소 로딩, 및 150 내지 $450\text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다. 보다 바람직하게는, 실리카는 240 내지 $260\text{ }\mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 175 내지 $220\text{ }\mu\text{m}$ 의 $D_v(10)$, 16.5 내지 20 중량%의 탄소 로딩, 및 200 내지 $450\text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다. 보다 더 바람직하게는, 실리카는 245 내지 $260\text{ }\mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 180 내지 $215\text{ }\mu\text{m}$ 의 $D_v(10)$, 17 내지 19 중량%의 탄소 로딩, 및 250 내지 $400\text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다. 가장 바람직하게는, 실리카는 250 내지 $260\text{ }\mu\text{m}$ 의 평균 입자 직경 및 185 내지 $210\text{ }\mu\text{m}$ 의 $D_v(10)$, 17.5 내지 18.0 중량%의 탄소 로딩, 및 300 내지 $350\text{ m}^2/\text{g}$ 의 총 표면적을 갖는다.

[0117] 임의의 전술한 구현예에서 (즉, 이의 임의의 전형적인, 바람직한 또는 특히 바람직한 하위 구현예를 포함하는 임의의 제 1, 제 2 또는 제 3 구현예에서), 실리카 입자는 전형적으로 다공성이다. 전형적으로, 실리카 입자의 평균 기공 직경은 60 내지 $200\text{ }\text{\AA}$ 이다. 바람직하게는, 평균 기공 직경은 65 내지 $160\text{ }\text{\AA}$, 보다 바람직하게는 70 내지 $140\text{ }\text{\AA}$, 보다 더 바람직하게는 80 내지 $130\text{ }\text{\AA}$, 보다 더 바람직하게는 90 내지 $120\text{ }\text{\AA}$, 가장 바람직하게는 95 내지 $115\text{ }\text{\AA}$, 예를 들어 약 $100\text{ }\text{\AA}$ 또는 약 $110\text{ }\text{\AA}$ 이다.

[0118] 임의의 전술한 구현예에서, 전형적으로 실리카 입자는 0.5 내지 1.5 cc/g 의 총 기공 부피를 갖는다. 한 바람직한 구현예에서, 기공 부피는 0.6 내지 0.84 cc/g , 보다 바람직하게는 0.7 내지 0.8 cc/g , 가장 바람직하게는 0.73 내지 0.77 cc/g 이다.

[0119] 총 기공 부피는 전형적으로, 예를 들어 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 "Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density" by Lowell, Shields, Thomas and Thommes, Springer, Dordrecht, 2006 (pub: Springer)에서 기재된 바와 같이 질소 기체 흡착에 의해 측정된다.

[0120] 평균 기공 직경 d 는 방정식 $d = 4*V/A$ 를 사용하여 총 기공 부피 V 및 표면적 A 로부터 계산된다. 이는 동일한 부피와 면적을 갖는 가상의 균일한 원통형 기공의 직경이다.

[0121] 임의의 전술한 구현예에서, 전형적으로 실리카 입자는 수 기준으로 적어도 80%의 입자가 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖도록 뚜렷한 입자 크기 분포를 갖는다. 전형적으로, 수 기준으로 적어도 80%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 수 기준으로 적어도 80%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 바람직하게는, 수 기준으로 적어도 85%의 입자는 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖는다. 전형적으로, 수 기준으로 적어도 85%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 수 기준으로 적어도 85%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 보다 바람직하게는, 수 기준으로 적어도 90%의 입자는 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖는다. 전형적으로, 수 기준으로 적어도 90%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 수 기준으로 적어도 90%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 가장 바람직하게는, 수 기준으로 적어도 95%의 입자는 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖는다. 전형적으로, 수 기준으로 적어도 95%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 수 기준으로 적어도 95%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다.

[0122] 임의의 전술한 구현예에서, 전형적으로 실리카 입자는 부피 기준으로 적어도 80%의 입자가 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖도록 뚜렷한 입자 크기 분포를 갖는다. 전형적으로, 부피 기준으로 적어도 80%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 부피 기준으로 적어도 80%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 바람직하게는, 부피 기준으로 적어도 85%의 입자는 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖는다. 전형적으로, 부피 기준으로 적어도 85%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 부피 기준으로 적어도 85%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 보다 바람직하게는, 부피 기준으로 적어도 90%의 입자는 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖는다. 전형적으로, 부피 기준으로 적어도 90%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 부피 기준으로 적어도 90%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 가장 바람직하게는, 부피 기준으로 적어도 95%의 입자는 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖는다. 전형적으로, 부피 기준으로 적어도 95%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 부피 기준으로 적어도 95%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다.

[0123] 임의의 전술한 구현예에서, 전형적으로 실리카 입자는 질량 기준으로 적어도 80%의 입자가 $200\text{ }\mu\text{m}$ 초과의 직경을 갖도록 뚜렷한 입자 크기 분포를 갖는다. 전형적으로, 질량 기준으로 적어도 80%의 입자는 $500\text{ }\mu\text{m}$ 미만의 직경을 갖는다. 전형적으로, 질량 기준으로 적어도 80%의 입자는 200 내지 $500\text{ }\mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다.

다. 바람직하게는, 질량 기준으로 적어도 85%의 입자는 200 μm 초과를 갖는다. 전형적으로, 질량 기준으로 적어도 85%의 입자는 500 μm 미만을 갖는다. 전형적으로, 질량 기준으로 적어도 85%의 입자는 200 내지 500 μm 의 직경을 갖는다. 보다 바람직하게는, 질량 기준으로 적어도 90%의 입자는 200 μm 초과를 갖는다. 전형적으로, 질량 기준으로 적어도 90%의 입자는 500 μm 미만을 갖는다. 가장 바람직하게는, 질량 기준으로 적어도 95%의 입자는 200 내지 500 μm 의 직경을 갖는다. 전형적으로, 질량 기준으로 적어도 95%의 입자는 500 μm 미만을 갖는다. 전형적으로, 질량 기준으로 적어도 95%의 입자는 200 내지 500 μm 의 직경을 갖는다.

[0124] 임의의 전술한 구현예에서, 전형적으로 실리카 입자는 0.71 kg/dm^3 이하, 바람직하게는 0.70 kg/dm^3 이하, 보다 바람직하게는 0.69 kg/dm^3 이하, 보다 더 바람직하게는 0.68 kg/dm^3 이하, 보다 더 바람직하게는 0.67 kg/dm^3 이하, 가장 바람직하게는 0.66 kg/dm^3 이하의 벌크 (충전층) 밀도를 갖는다. 전형적으로 실리카 입자는 0.4 kg/dm^3 이상, 바람직하게는 0.5 kg/dm^3 이상, 보다 바람직하게는 0.55 kg/dm^3 이상, 보다 더 바람직하게는 0.60 kg/dm^3 이상, 보다 더 바람직하게는 0.63 kg/dm^3 이상, 가장 바람직하게는 0.65 kg/dm^3 이상의 벌크 밀도를 갖는다.

[0125] 따라서 임의의 전술한 구현예에서, 전형적으로 실리카 입자는 0.4 내지 0.71 kg/dm^3 , 바람직하게는 0.5 내지 0.70 kg/dm^3 , 보다 바람직하게는 0.55 내지 0.69 kg/dm^3 , 보다 더 바람직하게는 0.60 내지 0.68 kg/dm^3 , 보다 더 바람직하게는 0.63 내지 0.67 kg/dm^3 , 가장 바람직하게는 0.65 내지 0.66 kg/dm^3 의 벌크 밀도를 갖는다.

[0126] 임의의 전술한 구현예에서, 전형적으로 실리카의 $D_v(90)$ 값은 320 μm 이상이다. $D_v(90)$ 은 증가하는 입자 직경에 대한 실리카 입자의 누적 부피 분포의 플롯에서 입자 직경의 90 번째 백분위수를 의미한다. $D_v(90)$ 은 샘플에 존재하는 거친 입자 (즉, 큰 크기의 입자)의 수에 민감하다. $D_v(90)$ 은 레이저 회절에 의해 결정될 수 있다. 바람직하게는, 실리카의 $D_v(90)$ 값은 325 μm 이상, 보다 바람직하게는 330 μm 이상, 가장 바람직하게는 335 μm 이상이다. 전형적으로, 실리카는 390 μm 이하, 바람직하게는 370 μm 이하, 보다 바람직하게는 350 μm 이하, 가장 바람직하게는 340 μm 이하인 $D_v(90)$ 을 갖는다. 따라서 전형적으로, 실리카는 320 내지 290 μm , 바람직하게는 325 내지 370 μm , 보다 바람직하게는 330 내지 350 μm , 가장 바람직하게는 335 내지 340 μm 의 $D_v(90)$ 을 갖는다.

[0127] 액체 용리액 상

[0128] 본 발명의 방법은 크로마토그래피 분리에서 수성 유기 용리액, 즉 물과 유기 용매의 혼합물을 사용한다. 전형적으로, 용리액은 초임계 상태가 아니다. 전형적으로, 용리액은 액체이다.

[0129] 전형적으로, 유기 용매는 알코올, 에테르, 에스테르, 케톤 및 니트릴에서 선택된다. 알코올, 케톤 및 니트릴이 바람직하다.

[0130] 알코올 용매는 당업자에게 잘 알려져 있다. 알코올은 전형적으로 단쇄 알코올이다. 알코올은 전형적으로 식 ROH 의 것이며, 여기서 R은 직쇄형 또는 분지형 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 기이다. $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 기는 바람직하게는 비치환된다. 알코올의 예는 메탄올, 에탄올, n-프로판올, i-프로판올, n-부탄올, i-부탄올, s-부탄올 및 t-부탄올을 포함한다. 메탄올 및 에탄올이 바람직하다. 메탄올이 보다 바람직하다.

[0131] 에테르 용매는 당업자에게 잘 알려져 있다. 에테르는 전형적으로 단쇄 에테르이다. 에테르는 전형적으로 식 R-O-R' 의 것이며, 여기서 R 및 R'는 동일하거나 상이하고, 직쇄형 또는 분지형 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 기를 나타낸다. $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 기는 바람직하게는 비치환된다. 바람직한 에테르는 디에틸에테르, 디이소프로필에테르 및 메틸 t-부틸 에테르 (MTBE)를 포함한다.

[0132] 에스테르 용매는 당업자에게 잘 알려져 있다. 에스테르는 전형적으로 단쇄 에스테르이다. 에스테르는 전형적으로 식 R-(C=O)O-R' 의 것이며, 여기서 R 및 R'는 동일하거나 상이하고, 직쇄형 또는 분지형 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 알킬 기를 나타낸다. 바람직한 에스테르는 메틸아세테이트 및 에틸아세테이트를 포함한다.

[0133] 케톤 용매는 당업자에게 잘 알려져 있다. 케톤은 전형적으로 단쇄 케톤이다. 케톤은 전형적으로 식 R-

(C=O)-R' 의 것이며, 여기서 R 및 R' 는 동일하거나 상이하고, 직쇄형 또는 분지형 C₁-C₆ 알킬 기를 나타낸다.

C₁-C₆ 알킬 기는 바람직하게는 비치환된다. 바람직한 케톤은 아세톤, 메틸에틸케톤 및 메틸 이소부틸 케톤 (MIBK) 을 포함한다.

[0134] 니트릴 용매는 당업자에게 잘 알려져 있다. 니트릴은 전형적으로 단쇄 니트릴이다. 니트릴은 전형적으로 식 R-CN 의 것이며, 여기서 R 은 직쇄형 또는 분지형 C₁-C₆ 알킬 기이다. C₁-C₆ 알킬 기는 바람직하게는 비치환된다. 바람직한 니트릴은 아세토니트릴을 포함한다.

[0135] 전형적으로, 유기 용매는 물과 혼화성이다. 바람직하게는, 유기 용매는 테트라히드로푸란, 이소프로필 알코올, n-프로필 알코올, 메탄올, 에탄올, 아세토니트릴, 1,4-디옥산, N,N-디메틸 포름아미드 및 디메틸술폭시드에서 선택된다. 메탄올 및 아세토니트릴은 특히 바람직한 유기 용매이다.

[0136] 용리액 중 유기 용매와 물의 비는 특별히 제한되지 않는다. 그러나, 전형적으로 유기 용매:물 비는 99.9:0.1 내지 75:25 부피부, 바람직하게는 99.5:0.5 내지 80:20 부피부이다. 유기 용매가 메탄올인 경우, 메탄올:물 비는 전형적으로 99.9:0.1 내지 85:15 부피부, 바람직하게는 99.5:0.5 내지 88:12 부피부이다. 유기 용매가 아세토니트릴인 경우, 아세토니트릴:물 비는 전형적으로 99:1 내지 75:25 부피부, 바람직하게는 96:4 내지 80:20 부피부이다.

[0137] PUFA 생성물 및 공급 혼합물

[0138] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "PUFA 생성물" 은 전형적으로 영양적 또는 약학적 중요성의 하나 이상의 다중불포화 지방산 (PUFA) 및/또는 이의 유도체를 포함하는 생성물을 의미한다. 전형적으로, PUFA 생성물은 단일 PUFA 또는 이의 유도체이다. 대안적으로, PUFA 생성물은 둘 이상의 PUFA 또는 이의 유도체의 혼합물이다.

[0139] 용어 "다중불포화 지방산" (PUFA) 은 하나 초과와 이중 결합을 함유하는 지방산을 의미한다. 이러한 PUFA 는 당업자에게 잘 알려져 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, PUFA "유도체" 는 모노-, 디- 또는 트리-글리세라이드, 에스테르, 인지질, 아마이드, 락톤 또는 염의 형태의 PUFA 이다. 모노-, 디- 및 트리글리세라이드 및 에스테르가 바람직하다. 트리글리세라이드 및 에스테르가 보다 바람직하다. 에스테르가 보다 더 바람직하다. 에스테르는 전형적으로 알킬 에스테르, 바람직하게는 C₁-C₆ 알킬 에스테르, 보다 바람직하게는 C₁-C₄ 알킬 에스테르이다. 에스테르의 예는 메틸 및 에틸 에스테르를 포함한다. 에틸 에스테르가 가장 바람직하다.

[0140] 전형적으로, PUFA 생성물은 적어도 하나의 ω-3 또는 ω-6 PUFA 또는 이의 유도체, 바람직하게는 적어도 하나의 ω-3 PUFA 또는 이의 유도체이다.

[0141] ω-3 PUFA 의 예는 에이코사트리엔산 (ETE), 에이코사테트라엔산 (ETA), 에이코사펜타엔산 (EPA), 도코사펜타엔산 (DPA) 및 도코사헥사엔산 (DHA) 을 포함한다. EPA, DPA 및 DHA 가 바람직하다. EPA 및 DHA 가 가장 바람직하다.

[0142] ω-6 PUFA 의 예는 에이코사디엔산, 감마-리놀렌산 (GLA), 디호모-감마-리놀렌산 (DGLA), 아라키돈산 (ARA), 도코사디엔산, 아드레닌산 및 도코사펜타엔 (ω-6) 산을 포함한다. ARA 및 GLA 가 바람직하다.

[0143] 바람직하게는, PUFA 생성물은 EPA, DHA, 이의 유도체 또는 이의 혼합물이다. 전형적인 유도체는 EPA 및 DHA 모노-, 디- 및 트리글리세라이드 및 EPA 및 DHA 에스테르, 바람직하게는 알킬 에스테르 예컨대 C₁-C₄ 알킬 에스테르를 포함한다.

[0144] 보다 바람직하게는, PUFA 생성물은 EPA, DHA, 또는 이의 유도체이다. 전형적인 유도체는 EPA 및 DHA 모노-, 디- 및 트리글리세라이드 및 EPA 및 DHA 에스테르, 바람직하게는 알킬 에스테르 예컨대 C₁-C₄ 알킬 에스테르를 포함한다.

[0145] 가장 바람직하게는, PUFA 생성물은 에이코사펜타엔산 (EPA), 도코사헥사엔산 (DHA), EPA 트리글리세라이드, DHA 트리글리세라이드, EPA 에틸 에스테르 또는 DHA 에틸 에스테르이다.

[0146] 특히 바람직하게는, PUFA 생성물은 EPA, DHA, EPA 에틸 에스테르 또는 DHA 에틸 에스테르이다.

[0147] 한 구현예에서, PUFA 생성물은 EPA 및/또는 EPA 에틸 에스테르 (EE) 이다.

- [0148] 또 다른 구현예에서, PUFA 생성물은 DHA 및/또는 DHA 에틸 에스테르 (EE) 이다.
- [0149] 추가의 구현예에서, PUFA 생성물은 EPA 와 DHA 및/또는 EPA EE 와 DHA EE 의 혼합물이다.
- [0150] 전형적으로, PUFA 생성물은 80 GC-면적% 초과, 바람직하게는 85 GC-면적% 초과, 보다 바람직하게는 90 GC-면적% 초과, 보다 더 바람직하게는 95 GC-면적% 초과, 보다 더 바람직하게는 97 GC-면적% 초과, 보다 더 바람직하게는 98 GC-면적% 초과, 가장 바람직하게는 99 GC-면적% 초과,의 순도로 취득되며, 여기서 "GC-면적%" 는 관련 생성물 (여기서, PUFA 생성물) 에 상응하는 기체 크로마토그램 트레이스 하의 면적 % 이다. GC-면적% 는 전형적으로, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 유럽 약전 6.0, 페이지 2552-2554 (<http://www.uspbpep.com/ep60/omega-3-acid%20ethyl%20esters%2090%201250e.pdf> 에서 액세스됨) 에 요약된 오메가-3 지방산 에틸 에스테르에 대한 방법을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0151] 가장 바람직한 구현예에서, PUFA 생성물은 EPA 또는 EPA 유도체, 예를 들어 EPA 에틸 에스테르이고, 90 GC-면적% 초과, 바람직하게는 95 GC-면적% 초과, 보다 바람직하게는 97 GC-면적% 초과, 보다 더 바람직하게는 98 GC-면적% 초과, 보다 더 바람직하게는 98.4 GC-면적% 초과,의 순도로 취득된다. 바람직하게는, PUFA 생성물은 EPA 또는 EPA 유도체, 예를 들어 EPA 에틸 에스테르이고, 98 GC-면적% 와 99.5 GC-면적% 사이의 순도로 취득된다.
- [0152] 대안적인 바람직한 구현예에서, PUFA 는 DHA 또는 DHA 유도체, 예를 들어 DHA 에틸 에스테르이고, 80 GC-면적% 초과, 바람직하게는 85 GC-면적% 초과, 보다 바람직하게는 90 GC-면적% 초과, 보다 바람직하게는 92 GC-면적% 초과, 가장 바람직하게는 95 GC-면적% 초과,의 순도로 취득된다. 바람직하게는, PUFA 생성물은 DHA 또는 DHA 유도체, 예를 들어 EPA 에틸 에스테르이고, 97 GC-면적% 와 99.5 GC-면적% 사이의 순도로 취득된다.
- [0153] 전형적으로, 상기 PUFA 생성물 이외에, 추가의 2차 PUFA 생성물이 본 발명의 크로마토그래피 분리 방법에서 수집된다. 바람직하게는, PUFA 생성물은 EPA 또는 이의 유도체이고, 추가의 2차 PUFA 생성물은 DHA 또는 이의 유도체이다.
- [0154] 따라서 전형적으로, 본 발명의 방법은 EPA 또는 이의 유도체인 PUFA 생성물을 수집하도록 구성된다. 이러한 구현예에서, EPA, EPA 보다 더 극성인 성분, 및 EPA 보다 덜 극성인 성분을 함유하는 공급 혼합물이 전형적으로 사용된다.
- [0155] 대안적으로, 본 발명의 방법은 DHA 또는 이의 유도체인 PUFA 생성물을 수집하도록 구성된다. 이러한 구현예에서, DHA, DHA 보다 더 극성인 성분, 및 DHA 보다 덜 극성인 성분을 함유하는 공급 혼합물이 전형적으로 사용된다.
- [0156] 대안적으로, 방법은 EPA 및 DHA 또는 이의 유도체의 농축된 혼합물인 PUFA 생성물을 수집하도록 구성된다. 이러한 구현예에서, EPA, DHA, EPA 및 DHA 보다 더 극성인 성분, 및 EPA 및 DHA 보다 덜 극성인 성분을 함유하는 공급 혼합물이 사용된다.
- [0157] 전형적으로, PUFA 생성물은 1 GC-면적% 이하, 바람직하게는 0.5 GC-면적% 이하, 보다 바람직하게는 0.25 GC-면적% 이하, 보다 더 바람직하게는 0.1 GC-면적% 이하, 가장 바람직하게는 0.01 GC-면적% 이하의 C18 지방산 불순물, C18 지방산 모노-, 디- 및 트리글리세라이드 불순물 및 C18 지방산 알킬 에스테르 불순물을 함유한다. 보다 전형적으로, PUFA 생성물은 1 GC-면적% 이하, 바람직하게는 0.5 GC-면적% 이하, 보다 바람직하게는 0.25 GC-면적% 이하, 보다 더 바람직하게는 0.1 GC-면적% 이하, 가장 바람직하게는 0.01 GC-면적% 이하의, C18 지방산 및 이의 유도체인 불순물을 함유한다. 전형적인 C18 지방산 유도체는 PUFA 유도체에 대해 상기 정의된 바와 같다. 본원에서 사용되는 바와 같이, C18 지방산은 직쇄형 또는 분지형 탄화수소 사슬을 갖는 C18 지방족 모노카르복실산이다. 전형적인 C18 지방산은 스테아르산 (C18:0), 올레산 (C18:1n9), 바덴산 (C18:1n7), 리놀레산 (C18:2n6), 감마-리놀렌산/GLA (C18:3n6), 알파-리놀렌산/ALA (C18:3n3) 및 스테아리돈산/SDA (C18:4n3) 를 포함한다. 특정 바람직한 구현예에서, PUFA 생성물은 상기 언급된 불순물이 실질적으로 없다.
- [0158] 전형적으로, PUFA 생성물은 C18 PUFA, C18 PUFA 모노-, 디- 또는 트리글리세라이드, 또는 C18 PUFA 알킬 에스테르가 아니다. 보다 전형적으로, PUFA 생성물은 C18 PUFA 또는 C18 PUFA 유도체가 아니다. 전형적인 C18 PUFA 는 리놀레산 (C18:2n6), GLA (C18:3n6) 및 ALA (C18:3n3) 를 포함한다.
- [0159] 본 발명의 방법에서, 공급 혼합물은 전형적으로 (i) 적어도 하나의 PUFA 생성물을 포함하는 천연 또는 합성 공급원료, 또는 (ii) 천연 또는 합성 공급원료의 부분적 정제로부터 취득된 적어도 하나의 PUFA 생성물을 포함하는 부분적으로 정제된 공급원료이다. 따라서 한 구현예에서, 공급 혼합물은 적어도 하나의 PUFA 생성물을

포함하는 천연 또는 합성 공급원료이다. 또 다른 구현예에서, 공급 혼합물은 천연 또는 합성 공급원료의 부분적 정제로부터 수득된 적어도 하나의 PUFA 생성물을 포함하는 부분적으로 정제된 공급원료이다.

- [0160] 본 발명의 방법에 의해 분리하기에 적합한 공급원료는 식물성 및 동물성 오일 및 지방을 포함하는 천연 공급원, 및 유전자 변형된 식물, 동물 및 미생물 (진균 및 효모를 포함함)로부터 수득된 오일을 포함하는 합성 공급원으로부터 수득될 수 있다. 예는 어유, 조류 및 미세조류 오일 및 식물 오일, 예를 들어 보라지 (borage) 오일, 에치움 (Echium) 오일 및 달맞이꽃 오일을 포함한다. 한 구현예에서, 공급 혼합물은 어유이다. 또 다른 구현예에서, 공급 혼합물은 조류 오일이다. 조류 오일 및 미세조류 오일은 원하는 PUFA 생성물이 EPA, ARA 및/또는 DHA 인 경우에 특히 적합하다. 유전자 변형된 효모는 원하는 PUFA 생성물이 EPA 인 경우에 특히 적합하다. 유전자 변형된 식물은 원하는 PUFA 생성물이 EPA, ARA 및/또는 DHA 인 경우에 특히 적합하다.
- [0161] 특히 바람직한 구현예에서, 공급원료는 어유 또는 어유 유래 공급원료이다. 유리하게는, 어유 또는 어유 유래 공급원료가 사용되는 경우, EPA 또는 EPA 에틸 에스테르 PUFA 생성물은 90 GC-면적% 초과, 바람직하게는 95 GC-면적% 초과, 보다 바람직하게는 97 GC-면적% 초과, 보다 더 바람직하게는 98 GC-면적% 초과, 보다 더 바람직하게는 98.4 GC-면적% 초과, 예를 들어 98 GC-면적% 와 99.5 GC-면적% 사이의 순도로 본 발명의 방법에 의해 제조될 수 있다는 것이 발견되었다.
- [0162] 공급 혼합물은 전형적으로 PUFA 생성물 및 적어도 하나 이상의 극성인 성분 및 적어도 하나 이상의 덜 극성인 성분을 함유한다. 덜 극성인 성분은 PUFA 생성물보다 본 발명의 방법에서 사용되는 흡착제에 대해 더 강한 부착을 갖는다. 작동 동안, 이러한 덜 극성인 성분은 전형적으로 액체 용리액 상보다 우선적으로 고체 흡착제 상과 함께 이동한다. 더 극성인 성분은 PUFA 생성물보다 본 발명의 방법에 사용되는 흡착제에 대해 더 약한 부착을 갖는다. 작동 동안, 이러한 더 극성인 성분은 전형적으로 고체 흡착제 상보다 우선적으로 액체 용리액 상과 함께 이동한다. 크로마토그래피 분리 단계가 실제 또는 모의 이동층 크로마토그래피에 의해 수행되는 본 발명의 구현예에서, 전형적으로 더 극성인 성분은 라피네이트 스트림으로 분리될 것이고, 덜 극성인 성분은 추출물 스트림으로 분리될 것이다.
- [0163] 더 극성 및 덜 극성인 성분의 예는 (1) 천연 오일 (예를 들어, 해양 오일 또는 식물성 오일)에서 발생하는 다른 화합물, (2) 저장, 정제 및 이전 농축 단계 동안 형성된 부산물, 및 (3) 이전 농축 또는 정제 단계 동안 사용되는 용매 또는 시약으로부터의 오염물을 포함한다.
- [0164] (1)의 예는 다른 원치 않는 PUFA; 포화 지방산; 스테롤, 예를 들어 콜레스테롤; 비타민; 및 환경 오염물질, 예컨대 폴리클로로바이페닐 (PCB), 폴리방향족 탄화수소 (PAH) 살충제, 염소화 살충제, 다이옥신 및 중금속을 포함한다. PCB, PAH, 다이옥신 및 염소화된 살충제는 모두 매우 비극성인 성분이다.
- [0165] (2)의 예는 PUFA 생성물로부터의 이성질체 및 산화 또는 분해 생성물, 예를 들어 지방산의 자가-산화 중합체 생성물 또는 그의 유도체를 포함한다.
- [0166] (3)의 예는 우레아를 포함하며, 이는 공급 혼합물로부터 포화 또는 모노-불포화 지방산을 제거하기 위해 첨가될 수 있다.
- [0167] 바람직하게는, 공급 혼합물은 PUFA-함유 해양 오일 (예를 들어, 어유), 보다 바람직하게는 EPA 및/또는 DHA 를 포함하는 해양 오일 (예를 들어, 어유)이다.
- [0168] 본 발명의 방법에 의해 농축된 EPA (EE)를 제조하기 위한 예시적인 공급 혼합물은 50-75% EPA (EE), 0 내지 10% DHA (EE), 및 다른 필수 ω -3 및 ω -6 지방산을 포함하는 다른 성분을 포함한다.
- [0169] 본 발명의 방법에 의해 농축된 EPA (EE)를 제조하기 위한 예시적인 공급 혼합물은 55% EPA (EE), 5% DHA (EE), 및 다른 필수 ω -3 및 ω -6 지방산을 포함하는 다른 성분을 포함한다. DHA (EE)는 EPA (EE)보다 덜 극성이다.
- [0170] 본 발명의 방법에 의해 농축된 DHA (EE)를 제조하기 위한 예시적인 공급 혼합물은 50-75% DHA (EE), 0 내지 10% EPA (EE), 및 다른 필수 ω -3 및 ω -6 지방산을 포함하는 다른 성분을 포함한다.
- [0171] 본 발명의 방법에 의해 농축된 DHA (EE)를 제조하기 위한 예시적인 공급 혼합물은 75% DHA (EE), 7% EPA (EE), 및 다른 필수 ω -3 및 ω -6 지방산을 포함하는 다른 성분을 포함한다. EPA (EE)는 DHA (EE)보다 더 극성이다.
- [0172] 본 발명의 방법에 의해 EPA (EE) 및 DHA (EE)의 농축된 혼합물을 제조하기 위한 예시적인 공급 혼합물은 33%

초과의 EPA (EE) 및 22% 초과의 DHA (EE) 를 포함한다.

- [0173] 공급원료는 본 발명의 방법에 의한 분별 전에 화학적 처리를 거칠 수 있다. 예를 들어, 이는 글리세라이드 트랜스에스테르화 또는 글리세라이드 가수분해를 거칠 수 있다.
- [0174] 공급원료는 본 발명의 방법에 의한 분별 전에 부분적으로 정제될 수 있다. 예를 들어, 결정화, 분자 증류 또는 분별 증류, 우레아 분별, 은 니트레이트 또는 다른 금속 염 용액으로의 추출, 요오도락톤화, 초임계 유체 분별, 또는 크로마토그래피, 바람직하게는 정지층 크로마토그래피 또는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.
- [0175] 일부 구현예에서, 공급원료는 화학적 처리 및 부분적 정제 둘 모두를 거칠 수 있다.
- [0176] 다른 구현예에서, 공급원료는 초기 화학적 처리 단계 및 부분적 정제 없이 본 발명의 방법에서 공급 혼합물로서 직접 사용될 수 있다.
- [0177] 따라서 본 발명의 일부 구현예에서, 크로마토그래피 분리 방법은 공급 혼합물로서 공급원료를 크로마토그래피 장치에 직접 도입하는 것을 포함한다. 이들 구현예에서, 방법은 공급 혼합물의 정제를 초래하여 PUFA 생성물을 직접 수득할 수 있다. 대안적으로, 방법은 공급 혼합물의 정제를 초래하여 중간체 생성물을 수득할 수 있고, 여기서 상기 중간체 생성물은 추가 정제하여 PUFA 생성물이 수득된다.
- [0178] 다른 구현예에서, 크로마토그래피 분리 방법은 공급 혼합물로서 화학적으로 처리된 공급원료를 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다. 이들 구현예에서, 방법은 공급 혼합물의 정제를 초래하여 PUFA 생성물을 직접 수득할 수 있다. 대안적으로, 방법은 공급 혼합물의 정제를 초래하여 중간체 생성물을 수득할 수 있고, 여기서 상기 중간체 생성물은 추가 정제하여 PUFA 생성물이 수득된다.
- [0179] 다른 구현예에서, 크로마토그래피 분리 방법은 공급 혼합물로서 부분적으로 정제된 공급원료를 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다. 이들 구현예에서, 방법은 공급 혼합물의 정제를 초래하여 PUFA 생성물을 직접 수득할 수 있다. 대안적으로, 방법은 공급 혼합물의 정제를 초래하여 중간체 생성물을 수득할 수 있고, 여기서 상기 중간체 생성물은 추가 정제하여 PUFA 생성물이 수득된다.
- [0180] 다른 구현예에서, 크로마토그래피 분리 방법은 공급 혼합물로서 부분적으로 정제된 및 화학적으로 처리된 공급원료를 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다. 이들 구현예에서, 방법은 공급 혼합물의 정제를 초래하여 PUFA 생성물을 직접 수득할 수 있다. 대안적으로, 방법은 공급 혼합물의 정제를 초래하여 중간체 생성물을 수득할 수 있고, 여기서 상기 중간체 생성물은 추가 정제하여 PUFA 생성물이 수득된다.
- [0181] 크로마토그래피 분리 방법으로 중간체 생성물이 제조되는 임의의 상기 구현예에서, 중간체 생성물로부터 원하는 PUFA 생성물을 수득하기 위해, 추가의 정제 단계를 수행한다. 전형적으로, 상기 추가 정제는 하나 이상의 크로마토그래피 장치, 바람직하게는 하나 이상의 정지층 크로마토그래피 장치 또는 하나 이상의 실제 또는 모의 이동층 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 보다 바람직하게는, 상기 추가 정제는 하나 이상의 정지층 크로마토그래피 장치에서의 플래시 컬럼 크로마토그래피를 포함한다.
- [0182] 본 발명의 크로마토그래피 분리 방법의 PUFA 생성물은 예를 들어 산화 부산물을 감소시키기 위해 표백토 또는 실리카로 처리함으로써, 또는 산화방지제 (예컨대 토크페롤)의 첨가에 의해, 물리적으로 또는 화학적으로 추가 처리될 수 있다.
- [0183] PUFA 생성물을 수득하기 위한 둘 이상의 크로마토그래피 분리 단계를 포함하는 본 발명의 임의의 구현예에서, 크로마토그래피 분리 단계 중 적어도 하나는 본원에 기재된 바와 같은 고체 흡착제를 포함한다. 바람직하게는, 각각의 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 고체 흡착제를 포함한다.
- [0184] 한 바람직한 구현예에서, 크로마토그래피 분리 방법은 PUFA 생성물을 수득하기 위해 2 개의 크로마토그래피 분리 단계를 포함한다. 바람직하게는 이러한 구현예에서, 제 1 및 제 2 크로마토그래피 분리 단계 둘 모두는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치, 즉 20 bar 이하의 압력에서 작동하고 본원에 기재된 바와 같이 C18-결합된 실리카를 고체 흡착제 상으로서 포함하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 그러나 대안적으로, 제 1 및/또는 제 2 크로마토그래피 분리 단계 중 하나만이 본원에서 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 다른 분리 단계는 상이한 고체 흡착제 상 및/또는 작동 압력을 갖는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.
- [0185] 따라서 이러한 구현예에서, 전형적으로 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그

래피 장치, 즉 20 bar 이하의 압력에서 작동하고 본원에 기재된 바와 같이 C18-결합된 실리카를 고체 흡착제 상으로서 포함하는 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 2 크로마토그래피 단계는 상이한 고체 흡착제 상, 예를 들어 대안적인 실리카, 예컨대 대안적인 C18-결합된 실리카, C8-결합된 실리카, 순수 실리카, 시아노-결합된 실리카 및 페닐-결합된 실리카, 또는 비-실리카계 고체 흡착제 상을 갖는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.

대안적으로, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 2 크로마토그래피 단계는 20 bar 초과 압력에서 작동하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 대안적으로, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 2 크로마토그래피 단계는 상이한 고체 흡착제 상, 예를 들어 대안적인 실리카, 예컨대 대안적인 C18-결합된 실리카, C8-결합된 실리카, 순수 실리카, 시아노-결합된 실리카 및 페닐-결합된 실리카, 또는 비-실리카계 고체 흡착제 상을 갖는 20 bar 초과 압력에서 작동하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.

[0186] 대안적으로, 이러한 구현예에서, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치, 즉 20 bar 이하의 압력에서 작동하고 본원에 기재된 바와 같이 C18-결합된 실리카를 고체 흡착제 상으로서 포함하는 크로마토그래피 장치에서 수행될 수 있고, 제 1 크로마토그래피 단계는 상이한 고체 흡착제 상, 예를 들어 대안적인 실리카, 예컨대 대안적인 C18-결합된 실리카, C8-결합된 실리카, 순수 실리카, 시아노-결합된 실리카 및 페닐-결합된 실리카, 또는 비-실리카계 고체 흡착제 상을 갖는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.

대안적으로, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 1 크로마토그래피 단계는 20 bar 초과 압력에서 작동하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 대안적으로, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 1 크로마토그래피 단계는 상이한 고체 흡착제 상, 예를 들어 대안적인 실리카, 예컨대 대안적인 C18-결합된 실리카, C8-결합된 실리카, 순수 실리카, 시아노-결합된 실리카 및 페닐-결합된 실리카, 또는 비-실리카계 고체 흡착제 상을 갖는 20 bar 초과 압력에서 작동하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.

[0187] 전형적으로 이 구현예에서, 제 1 및 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 상이한 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 대안적으로, 제 1 및 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 장치에서 수행된다.

[0188] 본 발명의 크로마토그래피 방법은 전형적으로 공급 혼합물로부터 수득된 PUFA 생성물의 수율이 공급 혼합물에 존재하는 PUFA 생성물의 총 질량을 기준으로 80 중량% 초과, 보다 바람직하게는 90 중량% 초과, 보다 더 바람직하게는 95 중량% 초과, 가장 바람직하게는 98 중량% 초과가 되도록 구성된다.

[0189] *크로마토그래피 분리 방법의 작동*

[0190] 본 발명의 크로마토그래피 분리를 위해 임의의 공지된 크로마토그래피 장치를 사용할 수 있다. 분리에 사용되는 크로마토그래피 컬럼의 수는 특별히 제한되지 않는다. 크로마토그래피 장치는 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 컬럼을 포함한다. 일부 구현예에서, 컬럼의 수는 전형적으로 1 개이다. 다른 구현예에서, 컬럼의 수는 전형적으로 1 개 초과, 바람직하게는 4 개 이상, 보다 바람직하게는 6 개 이상, 보다 더 바람직하게는 8 개 이상, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 컬럼이다. 전형적으로, 25 개 이하의 컬럼, 바람직하게는 20 개 이하의 컬럼, 보다 바람직하게는 15 개 이하의 컬럼이 존재한다.

[0191] 사용되는 컬럼의 치수는 특별히 제한되지 않으며, 정제될 공급 혼합물의 체적에 어느 정도 의존할 것이다. 당업자는 사용할 적절한 크기의 컬럼을 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 각각의 컬럼의 직경은 전형적으로 50 mm 와 5000 mm, 바람직하게는 100 mm 와 2500 mm 사이, 보다 바람직하게는 250 mm 와 1500 mm 사이, 가장 바람직하게는 250 mm 와 1000 mm 사이이다. 각각의 컬럼의 길이는 전형적으로 10 cm 와 300 cm 사이, 바람직하게는 10 cm 와 200 cm 사이, 보다 바람직하게는 25 cm 와 150 cm 사이, 보다 더 바람직하게는 70 cm 와 110 cm 사이, 가장 바람직하게는 80 cm 와 100 cm 사이이다.

[0192] 전형적으로, 본 발명의 방법은 20 bar 미만의 최대 압력에서 수행된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 7 내지 20 bar, 바람직하게는 7.5 내지 15 bar, 보다 바람직하게는 8 내지 10 bar 의 "중간" 압력에서 수행된다. 대안적으로, 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 7 bar 이하, 바람직하게는 1 내지 7 bar, 보다 바람직하게는 3 내지 6 bar 의 "낮은" 압력에서 수행된다.

[0193] 전형적으로, 본 발명의 방법은 실온, 또는 실온보다 높은 온도에서 수행된다. 바람직하게는, 방법은 실온보다 높은 온도에서 수행된다.

[0194] 전형적으로, 공급 혼합물이 통과하는 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 온도는 실온보다 높다. 보다

전형적으로, 사용되는 모든 크로마토그래피 컬럼의 온도는 실온보다 높다.

- [0195] 이해되는 바와 같이, 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼이 실온보다 높은 온도에 있는 경우, 분리 방법에 중요한 것은 컬럼의 내부이다. 따라서, 이는 전형적으로 실온보다 높은 온도에 있을 수 있는 크로마토그래피 컬럼 내부의 용리액 및 흡착제이다. 물론, 내부 수단 (예를 들어, 용리액 및/또는 공급 혼합물을 가열함으로써) 및/또는 외부 수단 (예를 들어, 임의의 공지된 종래의 수단에 의해 크로마토그래피 컬럼의 외부를 가열함으로써)에 의해 적어도 하나의 크로마토그래피 컬럼 내부에서 요구되는 온도를 달성하는 것이 가능하다.
- [0196] 전형적으로, 상승된 온도는 용리액 및/또는 공급 혼합물을 가열함으로써 달성될 수 있다. 이는 컬럼을 내부적으로 가열하는 효과를 갖는다.
- [0197] 따라서, 공급 혼합물이 통과하는 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 온도는 또한 용리액의 온도로서 측정될 수 있다. 따라서, 전형적으로 크로마토그래피 분리에 사용되는 용리액의 온도는 실온보다 높다.
- [0198] 대안적으로, 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 필요한 온도는 컬럼을 가열함으로써 달성될 수 있다. 가열은 예를 들어 전기 가열 맨틀, 가열 수 재킷 또는 코일을 사용하여 또는 복사 가열 램프에 의해 수행될 수 있다. 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼의 내부 및/또는 외부는 전형적으로 가열될 수 있다.
- [0199] 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 필요한 온도는 컬럼 및/또는 수성 유기 용매 용리액, 및/또는 공급 혼합물을 가열함으로써 달성될 수 있다.
- [0200] 전형적으로, 실온보다 높은 온도는 30℃ 초과, 바람직하게는 35℃ 초과, 보다 바람직하게는 40℃ 초과, 보다 더 바람직하게는 45℃ 초과, 보다 더 바람직하게는 50℃ 초과, 보다 더 바람직하게는 55℃ 초과, 보다 더 바람직하게는 57℃ 초과이다. 56℃의 온도가 특정 구현예에서 유용하다.
- [0201] 전형적으로, 실온보다 높은 온도는 최대 100℃, 바람직하게는 최대 95℃, 보다 바람직하게는 최대 90℃, 보다 더 바람직하게는 최대 85℃, 보다 더 바람직하게는 최대 80℃, 보다 더 바람직하게는 최대 75℃, 보다 더 바람직하게는 최대 70℃이다.
- [0202] 따라서, 전형적인 온도는 30 내지 100℃, 35 내지 95℃, 40 내지 90℃, 45 내지 85℃, 50 내지 80℃, 55 내지 75℃, 또는 57 내지 70℃의 범위이다.
- [0203] 바람직한 온도는 40 내지 70℃, 바람직하게는 50 내지 67℃, 보다 바람직하게는 56 내지 65℃, 보다 더 바람직하게는 57 내지 63℃의 범위이다.
- [0204] 특정 구현예에서, 단일 크로마토그래피 컬럼, 바람직하게는 단일 정지 크로마토그래피 컬럼이 사용될 수 있다. 이러한 방식으로의 분리는 전형적으로 공지된 정지층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행된다. 이러한 방식의 분리는 "정지층" 크로마토그래피로 지칭될 수 있다.
- [0205] 다른 구현예에서, 하나 초과와 크로마토그래피 컬럼이 사용된다. 이는 공급 혼합물을 동일하거나 상이할 수 있으며 직렬 또는 병렬로 배열된 2 개 이상의 크로마토그래피 컬럼을 통과시키는 것을 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서 사용되는 컬럼의 수는 특별히 제한되지 않으나, 전형적으로 30 개 컬럼을 초과하지 않는다.
- [0206] 다중 크로마토그래피 컬럼이 사용되는 한 특정 구현예는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피이다.
- [0207] 모의 및 실제 이동층 크로마토그래피 장치는 당업자에게 잘 알려져 있다. 임의의 공지된 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치는 장치가 본 발명의 방법에 따라 사용되는 한, 본 발명의 방법의 목적을 위해 이용될 수 있다. 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 및 US 4,764,276 에 기재된 이들 장치는 모두 본 발명의 방법에 따라 구성된다면 사용될 수 있다. 예를 들어 WO 2011/080503, WO 2013/005046, WO 2013/005047, WO 2013/005048, WO 2013/005051, WO 2013/005052 및/또는 WO 2014/108686 에서 개시된 바와 같은 SMB 방법이 또한 사용될 수 있다.
- [0208] 전형적으로, 크로마토그래피 분리는 예를 들어 도 1 에 도시된 것과 같은 종래의 장치를 사용하는 단일 SMB 분리 단계의 사용을 포함할 수 있다. 사용을 포함할 수 있다.
- [0209] 이러한 방식의 분리는 "단일 패스 (single pass)" SMB 로 지칭될 수 있다.
- [0210] 도 1 에서, 액상과 고체상 사이의 역류 접촉이 컬럼에서 이루어지며 이는 4 개의 서로 다른 구역으로 나뉠 수 있다.

- [0211] 구역 1 - 용리액 주입 라인과 추출물 배출 라인 사이에 위치하는 모든 것
- [0212] 구역 2 - 추출물 배출 라인과 공급원료 주입 라인 사이에 위치하는 모든 것
- [0213] 구역 3 - 공급원료 주입 라인과 라피네이트 배출 라인 사이에 위치하는 모든 것
- [0214] 구역 4 - 라피네이트 배출 라인과 용리액 주입 라인 사이에 위치하는 모든 것.
- [0215] 유입구/배출구 유속으로 인해, 액체 유속은 구역에 따라 달라지며, Q_I , Q_{II} , Q_{III} 및 Q_{IV} 는 구역 I, II, III 및 IV 에서의 각각의 유속이다.
- [0216] 한 구현예에서, 공급원료 및 용리액 도입 지점은 주기적으로 하류로 (주요 유체의 순환 방향으로) 진전되는 한편, 라피네이트 및 추출물의 배출 지점은 동시에 동일한 증분에 따라 (예를 들어 적어도 하나의 컬럼) 진전된다.
- [0217] 따라서 이 구현예에서, 모든 유입구 및 배출구 라인은 각각의 기간 ΔT 및 주기 시간과 동시에 이동하며 이들이 발견되는 시간 종료시 이들의 초기 위치는 $N_c \cdot \Delta T$ 와 동일하고 여기서 N_c 는 컬럼의 총 수이다.
- [0218] 이 구현예에서, 유입구/배출구 위치는 고정된 간격으로 동시에 이동된다. 라인의 위치는 전형적으로 라인 (n) 으로 표시되며, 이는 주어진 모멘트에 주어진 유입구/배출구 라인이 컬럼 n 의 유입구에 연결된다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 12-컬럼 시스템에서, 공급원료 (9) 는 공급원료 라인이 컬럼 9 의 유입구에 연결된다는 것을 의미하는 한편, 라피네이트 (11) 는 라피네이트 라인이 컬럼 11 의 유입구에 연결된다는 것을 의미한다.
- [0219] 이러한 정의를 사용함으로써, 시스템은 $EI(3)/Ext(6)/공급원료(9)/Raff(11)$ 로 나타낼 수 있다. 이러한 구성을 위해, 구역 1, II, III 및 IV 의 컬럼의 수는 각각 3/3/2/4 이다. 이어서 시스템의 구성은 하기에 의해 완전히 정의된다:
- [0220] 컬럼의 유입구/배출구 번호
- [0221] 시간 0 에서: $EI(3)/Ext(6)/공급원료(9)/Raff(11)$ 3/3/2/4
- [0222] 주어진 시간 후 (기간 (PERIOD)), 모든 유입구/배출구 위치는 하나의 컬럼에 의해 동시에 이동하고, 시스템은 하기와 같이 기술된다:
- [0223] 시간 ΔT 에서: $EI(4)/Ext(7)/공급원료(10)/Raff(12)$ 3/3/2/4
- [0224] 새로운 기간 후, 모든 위치는 다시 하나의 컬럼에 의해 동시에 이동할 것이고, 시스템은 하기와 같이 기술될 것이다:
- [0225] 시간 $2 \cdot \Delta T$ 에서: $EI(5)/Ext(8)/공급원료(11)/Raff(1)$ 3/3/2/4
- [0226] 시간 $2 \cdot \Delta T$ 에서, 라피네이트의 위치는 위치 12 에서 위치 1 로 이동하고, 이는 또한 위치 13 모듈로 (modulo) 12 로 기록될 수 있다. ($[13]_{12}$).
- [0227] 이 제시는 다수의 컬럼 N_c 를 포함하는 모의 이동층으로 일반화될 수 있다. 주어진 모멘트에, 모의 이동층의 구성이 $EI(e)/Ext(x)/공급원료(f)/Raff(r)$ 인 경우, 간단한 추론이 각각의 구역에 함유되는 컬럼의 수가 발견될 수 있게 한다:
- [0228] 구역 1: $Nb1=[x-e]_{N_c}$; 구역 2: $Nb2=[f-x]_{N_c}$
- [0229] 구역 3: $Nb3=[r-f]_{N_c}$; 구역 4: $Nb4=[e-r]_{N_c}$
- [0230] 주입 및 배출 지점은 기간 ΔT 후에 하나의 컬럼만큼 및 N_c 기간 후에 N_c 컬럼만큼 이동된다. 각각의 구역에서 컬럼의 수는 변경되지 않는다. 따라서, 주입 및 배출 지점은 주기 시간 $N_c \cdot \Delta T$ 후에 초기 위치를 회복한다.
- [0231] 또 다른 구현예에서, 크로마토그래피 분리는 US 6,136,198 및 Sa Gomes and Rodrigues, *Chemical Engineering & Technology Special Issue: Preparative Chromatography and Downstream Processing*, 2012, 35, 17-34 에 기재된 바와 같이 수행될 수 있으며, 이의 전체가 본원에 참고로 포함된다. 이들 문헌은 크로마토그래피 분리 방법을 작동하는 비-통상적 방법을 기술한다. 전형적으로 이 구현예에서, 방법은 특히 소위 Varicol,

Powerfeed, ISMB, Modicon, OSS 또는 입자 공급/부분 폐기 (particle feed/partial discard) 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 바람직하게는 이 구현예에서, 방법은 Varicol 법을 사용하여 수행된다. 이 방법은 비동기식 포트 스위치를 사용하는 단일 패스 SMB 방법이며 "비동기식 SMB" 로도 지칭된다. Varicol 방법을 하기에서 더 상세히 설명한다.

[0232] "Varicol" 구현예는 다음과 같은 점에서 단일 패스 SMB 와 상이하다:

[0233] (1) 구역 길이가 일정하지 않음;

[0234] (2) 구역 당 컬럼의 수가 기간 동안 일정하지 않음; 및

[0235] (3) 유입구/배출구 라인은 동시에 이동되지 않음.

[0236] "Varicol" 구현예에서, 기간 동안 및 주기 시간 동안 유체의 유입구 및 배출구의 위치를 동시에 이동시키지 않음으로써, 개선된 결과를 얻을 수 있다. 개선은 추출물 및 라피네이트로서 배출되는 생성물의 순도 증가, 및 분리 비용 감소를 포함한다.

[0237] "Varicol" 구현예에서, 이를 함유하는 혼합물의 적어도 하나의 성분은 흡착제를 함유하고 직렬로 및 폐쇄 루프로 배열되는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 섹션의 세트를 갖는 장치에서 정제되며, 그에 따라 루프는 적어도 하나의 공급원료 주입 지점, 라피네이트 배출 지점, 용리액 주입 지점, 및 추출물 배출 지점을 포함하고, 여기서 크로마토그래피 구역은 주입 지점 및 배출 지점에 의해 결정되거나 또는 그 반대이고, 주어진 기간의 끝에서, 모든 주입 지점 및 배출 지점은 루프를 통해 순환하는 주요 유체의 흐름에 대해 정의되는 주어진 방향으로 하나의 컬럼 또는 컬럼 섹션에 의해 이동되고, 이에 의해 방법은 상기 기간 동안, 컬럼 또는 컬럼 섹션의 상이한 주입 지점 및 배출 지점의 이동이 상이한 시간에 수행되어 상기 상이한 지점에 의해 정의되는 구역의 길이가 가변적인 것을 특징으로 한다.

[0238] 기간은 각 유입구와 배출구가 하나의 컬럼 또는 하나의 컬럼 섹션만큼 이동한 가장 짧은 시간 간격 ΔT 로 정의되며, 그에 따라 모든 유입구와 배출구에 대해 동시에 이동이 발생하지 않았다. 주기 시간 $N_c \cdot \Delta T$ 의 끝에서 시스템이 그의 초기 위치를 회복하였다.

[0239] 흡착제는 일부 양태에서, 흡착 방법에 사용되는, 예를 들어 분자체, 제올라이트체, 또는 흡착제, 예컨대 이온-교환 수지에서 선택될 수 있다. 이는 또한 실리카 베이스 상의 정지상, 역상 흡착제, 및 키랄상일 수 있다.

[0240] "Varicol" 구현예에서, 하기 단계 연속을 적어도 1 회 생성하는 것이 가능하다:

[0241] 상기 기간 ΔT 동안 모멘트 t_1 에서, 주어진 방향에서, 주입 지점 또는 배출 지점의 위치는, 상기 구역의 길이를 증가시키고 상기 구역에 인접한 구역의 길이를 감소시키는 방식으로, 컬럼 또는 컬럼 구역에 의해 적어도 하나의 구역에 대해 이동된 다음, 상기 기간 동안 모멘트 t_2 에서, 적어도 하나의 다른 구역에 대한 주입 지점 또는 배출 지점의 위치는, 상기 다른 구역의 길이를 증가시키고 상기 다른 구역에 인접한 구역의 길이를 감소시키는 방식으로, 컬럼 또는 컬럼 섹션에 의해 동일한 방향으로 이동되고, 작동은 필요시 반복되어, 상기 시간 기간 ΔT 후에, 컬럼 또는 컬럼 섹션의 모든 주입 지점 및 배출 지점 위치의 이동으로 초기 구성과 동일한 컬럼 구성이 회복된다.

[0242] "Varicol" 구현예의 한 양태에서, 컬럼의 구역의 길이를 연속적으로 변화시킬 수 있어, 그에 따라 한 구역의 증가는 다음 구역의 감소에 의해 보상된다 (예를 들어, US 6,136,198 의 표 2 참조).

[0243] "Varicol" 구현예의 또 다른 양태에서, 구역의 길이의 증가는 반대 구역의 감소에 의해 보상될 수 있다 (예를 들어, US 6,136,198 의 표 3 참조).

[0244] 기간 동안, 대략 일정한 시간 위상 변이로, 그리고 유리하게는 적어도 1/4 기간과 동일한 시간 위상 변이로 주입 또는 배출 위치의 이동 모두를 수행할 수 있다.

[0245] "Varicol" 구현예의 일부 양태에서, 일정하지 않은 시간 위상 변이로 주입 또는 배출 지점의 위치 이동 기간 동안 수행하는 것이 가능하다.

[0246] "Varicol" 구현예에서, 주어진 구역에서 순환하는 유체의 유속은 일반적으로 대략 일정하게 유지된다. 또한, 컬럼 또는 컬럼 섹션에서의 흐름과 동일한 방향으로 주입 및 배출 지점의 위치 이동을 수행하는 것이 유리하다. 또한, 주입 또는 배출 라인에서 순환하는 유체의 적어도 하나의 유속은 장치 내의 압력에 의해 모니터링될 수 있다. 바람직하게는, 이는 라피네이트 및/또는 추출물의 유속이며, 그에 따라 다른 유체는 유

속 제어 하에 있다.

- [0247] 유리하게는, "Varicol" 구현예에서 용리액으로서 액체를 사용하는 것이 가능하지만, 초임계 유체 또는 미임계 유체를 사용하여 작동하는 것도 가능하다.
- [0248] 생성물의 분리가 "Varicol" 구현예에서 수행되는 압력의 범위는 0.1 MPa 와 50 MPa 사이, 바람직하게는 0.5 MPa 와 30 MPa 사이일 수 있다. 컬럼에서의 온도는 일반적으로 0°C 와 100°C 사이이다. 전형적으로, 컬럼 또는 컬럼 섹션의 수는 8 개 미만이다. 8 보다 큰 값의 경우, 주기의 기간 동안 이동의 모멘트에 조합되는 각각의 구역에서의 컬럼의 수 및 길이의 영향을 연구함으로써 방법을 최적화하는 것이 매우 유리하다.
- [0249] "Varicol" 구현예에서 사용된 장치는 일련으로 및 폐쇄 루프로 배열된 흡착제를 함유하는 다수의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 섹션을 포함하며, 그로 인해 상기 루프는 유체를 재순환시키기 위한 적어도 하나의 펌프, 적어도 하나의 주입 펌프에 연결되는 각각의 컬럼 또는 컬럼 섹션 내의 다수의 유체 주입 라인 및 적어도 하나의 배출 펌프에 연결되는 각각의 컬럼 또는 컬럼 섹션의 다수의 유체 배출 라인, 각각의 라인 상의 적어도 하나의 밸브를 포함하고, 여기서 상기 루프는 적어도 3 개의 크로마토그래피 구역을 한정하고, 이들 각각은 유체 주입 지점 및 유체 배출 지점에 의해 결정되며, 장치는 상기 밸브에 연결되고 컬럼 또는 컬럼 섹션에 의해 주입 지점 및 배출 지점의 위치를 간헐적 방식으로 이동시키기에 적합한 구역 길이의 시간 변화를 제어하기 위한 수단을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0250] 사용되는 밸브는 유리하게는 전부/전무 (all-or-none) 밸브이다.
- [0251] 상기 기재된 방법에 대한 대안으로서, 크로마토그래피 분리는 다수의 SMB 분리 사용을 수반할 수 있다.
- [0252] 한 구현예에서, 크로마토그래피 분리는 WO 2011/080503 및 WO 2013/005046 에서 기재된 바와 같이 수행될 수 있으며, 이의 전체는 본원에 참고로 포함된다. WO 2011/080503 및 WO 2013/005046 에 명시된 바람직한 방법 조건은 이러한 구현예에 대한 바람직한 방법 조건이며, WO 2011/080503 및 WO 2013/005046 로부터 포함될 수 있다.
- [0253] WO 2011/080503 및 WO 2013/005046 에 개시된 방법은 유입 스트림을 용리액으로서 수성 유기 용매를 함유하는 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼을 갖는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함하며, 여기서 장치는 적어도 제 1 구역 및 제 2 구역을 포함하는 복수의 구역을 갖고, 각각의 구역은 상기 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼으로부터 액체가 수집될 수 있는 라피네이트 스트림 및 추출물 스트림을 갖고, (a) 보다 극성인 성분과 함께 PUFA 생성물을 함유하는 라피네이트 스트림이 제 1 구역에서의 컬럼으로부터 수집되고 제 2 구역에서의 비인접 컬럼에 도입되고/되거나, (b) 덜 극성인 성분과 함께 PUFA 생성물을 함유하는 추출물 스트림이 제 2 구역에서의 컬럼으로부터 수집되고 제 1 구역에서의 비인접 컬럼에 도입되며, 상기 PUFA 생성물은 각각의 구역에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리된다. 이러한 방식의 분리는 "이중 패스 (double pass)" SMB 방법으로 지칭될 수 있다.
- [0254] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 용어 "구역" 은 용리액으로서 수성 유기 용매를 함유하고, 유입 스트림을 위한 하나 이상의 주입 지점, 물 및/또는 유기 용매를 위한 하나 이상의 주입 지점, 액체가 상기 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼으로부터 수집될 수 있는 라피네이트 제거 (take-off) 스트림, 및 액체가 상기 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼으로부터 수집될 수 있는 추출물 제거 스트림을 갖는 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼을 의미한다. 전형적으로, 각각의 구역은 유입 스트림에 대해 단지 하나의 주입 지점을 갖는다. 한 구현예에서, 각각의 구역은 수성 유기 용매 용리액에 대해 단지 하나의 주입 지점을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 각각의 구역은 물 및/또는 유기 용매에 대해 2 개 이상의 주입 지점을 갖는다.
- [0255] 용어 "라피네이트" 는 당업자에게 잘 알려져 있다. 실제 및 모의 이동층 크로마토그래피의 맥락에서, 이는 고체 흡착제 상에 비해 액체 용리액 상과 더 빠르게 이동하는 성분의 스트림을 의미한다. 따라서, 라피네이트 스트림은 전형적으로 유입 스트림과 비교하여 보다 극성인 성분이 풍부하고 덜 극성인 성분이 고갈된다.
- [0256] 용어 "추출물" 은 당업자에게 잘 알려져 있다. 실제 및 모의 이동층 크로마토그래피의 맥락에서, 이는 액체 용리액 상에 비해 고체 흡착제 상과 더 빠르게 이동하는 성분의 스트림을 의미한다. 따라서, 추출물 스트림은 전형적으로 유입 스트림과 비교하여 덜 극성인 성분이 풍부하고, 보다 극성인 성분이 고갈된다.
- [0257] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "비인접" 은 예를 들어 동일한 장치에서, 하나 이상의 컬럼, 바람직하게는 3 개 이상의 컬럼, 보다 바람직하게는 5 개 이상의 컬럼, 가장 바람직하게는 약 5 개의 컬럼에 의해 분리된 컬럼을 의미한다.

- [0258] "이중 패스" SMB 방법은 도 11 에 예시된다. PUFA 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C) 및 덜 극성인 성분 (A) 을 포함하는 유입 스트림 F 를 제 1 구역에서 컬럼 5 의 상부에 도입한다. 수성 유기 용매 탈착제를 제 1 구역에서 컬럼 1 의 상부에 도입한다. 제 1 구역에서, 덜 극성인 성분 (A) 는 컬럼 2 의 하부로부터 추출물 스트림 E1 로서 제거된다. PUFA 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C) 를 컬럼 7 의 하부로부터 라피네이트 스트림 R1 로서 제거한다. 이어서, 라피네이트 스트림 R1 을 컬럼 12 의 상부에서 제 2 구역에 도입한다. 수성 유기 용매 탈착제를 제 2 구역에서 컬럼 9 의 상부에 도입한다. 제 2 구역에서, 보다 극성인 성분 (C) 가 컬럼 14 의 하부에서 라피네이트 스트림 R2 로서 제거된다. PUFA 생성물 (B) 는 컬럼 10 의 하부에서 추출물 스트림 E2 로서 수집된다.
- [0259] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 수성 유기 용매는 전형적으로 제 1 구역에서 컬럼 1 의 상부에 도입된다.
- [0260] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 수성 유기 용매는 전형적으로 제 2 구역에서 컬럼 9 의 상부에 도입된다.
- [0261] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 유입 스트림은 전형적으로 제 1 구역에서 컬럼 5 의 상부에 도입된다.
- [0262] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 제 1 라피네이트 스트림은 전형적으로 제 1 구역에서 컬럼 7 의 하부로부터 수집되고 제 2 구역에서 컬럼 12 의 상부에 도입된다. 제 1 라피네이트 스트림은 임의로는 컬럼 12 에 도입되기 전에 용기에 수집될 수 있다.
- [0263] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 제 1 추출물 스트림은 전형적으로 제 1 구역에서 컬럼 2 의 하부로부터 제거된다. 제 1 추출물 스트림은 임의로는 용기에서 수집될 수 있으며 일부는 제 1 구역에서 컬럼 3 의 상부에 재도입될 수 있다. 제 1 구역으로부터 다시 제 1 구역으로 추출물 스트림을 통해 수집된 액체의 재순환 속도는 액체가 이 용기로부터 컬럼 3 의 상부에 펌핑되는 속도이다.
- [0264] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 제 2 라피네이트 스트림은 전형적으로 제 2 구역에서 컬럼 14 의 하부로부터 제거된다.
- [0265] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 제 2 추출물 스트림은 전형적으로 제 2 구역에서 컬럼 10 의 하부로부터 수집된다. 이러한 제 2 추출물 스트림은 전형적으로 PUFA 생성물을 함유한다. 제 2 추출물 스트림은 임의로는 용기에서 수집될 수 있으며 일부는 제 2 구역에서 컬럼 11 의 상부에 재도입될 수 있다. 제 2 구역으로부터 다시 제 2 구역으로 추출물 스트림을 통해 수집된 액체의 재순환 속도는 액체가 이 용기로부터 컬럼 11 의 상부에 펌핑되는 속도이다.
- [0266] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 제 1 구역으로부터 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 구역으로 다시 재순환되는 속도는 전형적으로, 제 2 구역으로부터 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 구역으로 다시 재순환되는 속도보다 빠르다. 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 용리액은 전형적으로 각각의 구역에서 실질적으로 동일하다.
- [0267] 이러한 "이중 패스" SMB 방법에서, 용매는 증발, 멤브레인 또는 용매 재순환을 위한 당업자를 위한 임의의 다른 방법에 의해 회수될 수 있다. 생성물 또는 폐기물로부터 완전히 또는 부분적으로 고갈된 용매는 부분적으로 또는 완전히 탈착제로서 SMB 로 재순환될 수 있다. 따라서 일부 양태에서, 생성물이 풍부한 추출물/라피네이트 스트림 (경우에 따라) 및/또는 생성물이 고갈된 추출물/라피네이트 스트림 (경우에 따라) 의 농축은 증발, 건조 또는 증류에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, 생성물이 풍부한 추출물/라피네이트 스트림 (경우에 따라) 및/또는 생성물이 고갈된 추출물/라피네이트 스트림 (경우에 따라) 의 농축은 액체 추출, 멤브레인, 결정화, 흡착 또는 다른 용매 회수 기법에 의해 수행될 수 있다.
- [0268] 전형적으로, 제 1 및 제 2 크로마토그래피 분리 단계 중 적어도 하나는 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의, 예를 들어 하나의 "이중 패스" SMB 방법을 수반한다.
- [0269] 대안적인 구현예에서, 크로마토그래피 분리는 WO 2013/005051 및/또는 WO 2013/005052 에서 기재된 바와 같이 수행될 수 있으며, 이의 전체는 본원에 참고로 포함된다. 이러한 구현예는 다음을 포함한다:
- [0270] (i) 용리액으로서 수성 유기 용매를 함유하는 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼을 갖는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에서 제 1 SMB 단계에서 유입 스트림을 정제하여 제 1 생성물을 수득하는 단계; 및
- [0271] (ii) 용리액으로서 수성 유기 용매를 함유하는 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼을 갖는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치를 사용하여 제 2 SMB 단계에서 (i) 에서 수득한 제 1 생성물을 정제하여 제 2 생성물을 수득하는 단계;

- [0272] 여기서
- [0273] (a) 제 1 및 제 2 SMB 단계를 동일한 크로마토그래피 장치에서 순차적으로 수행하며, 제 1 생성물을 제 1 SMB 단계와 제 2 SMB 단계 사이에서 회수하고, PUFA 생성물이 각각의 SMB 단계에서 공급 혼합물의 상이한 성분으로부터 분리되도록 제 1 SMB 단계와 제 2 SMB 단계 사이에서 크로마토그래피 장치 내의 방법 조건을 조정하거나;
- [0274] (b) 제 1 및 제 2 SMB 단계를 각각 별개의 제 1 및 제 2 크로마토그래피 장치에서 수행하며, 제 1 SMB 단계로부터 수득한 제 1 생성물을 제 2 크로마토그래피 장치에 도입하고, PUFA 생성물을 각각의 SMB 단계에서 공급 혼합물의 상이한 성분으로부터 분리한다. 이러한 방식의 분리를 "백투백 (back-to-back)" SMB 로 지칭한다.
- [0275] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 용어 "모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치" 는 전형적으로 용리액으로서 수성 유기 용매를 함유하고, 유입 스트림을 위한 하나 이상의 주입 지점, 물 및/또는 유기 용매를 위한 하나 이상의 주입 지점, 액체가 상기 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼으로부터 수집될 수 있는 라피네이트 제거 스트림, 및 액체가 상기 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼으로부터 수집될 수 있는 추출물 제거 스트림을 갖는 복수의 연결된 크로마토그래피 컬럼을 의미한다.
- [0276] 이 "백투백" SMB 방법에 사용되는 크로마토그래피 장치는 용리액으로서 수성 유기 용매를 함유하는 직렬로 연결된 크로마토그래피 컬럼의 단일 어레이를 갖는다. 전형적으로, 각각의 크로마토그래피 컬럼은 그 컬럼에 인접한 장치에서 2 개의 컬럼에 연결된다. 따라서, 어레이에서의 주어진 컬럼으로부터의 배출구는 어레이에서의 용리액의 흐름에 대해 하류인 어레이에서의 인접한 컬럼의 유입구에 연결된다. 따라서, 용리액은 연결된 크로마토그래피 컬럼의 어레이 주위로 흐를 수 있다. 전형적으로, 크로마토그래피 컬럼 중 어느 것도 장치에서의 비인접 컬럼에 연결되지 않는다.
- [0277] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 각각의 장치는 유입 스트림에 대해 단지 하나의 주입 지점을 갖는다. 한 구현예에서, 각각의 장치는 수성 유기 용매 용리액에 대해 단지 하나의 주입 지점을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 각각의 장치는 물 및/또는 유기 용매에 대해 2 개 이상의 주입 지점을 갖는다.
- [0278] 이러한 "백투백" SMB 방법에서 각각의 장치에 사용되는 컬럼의 수는 특별히 제한되지 않는다. 당업자는 사용할 컬럼의 적절한 수를 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 컬럼의 수는 전형적으로 4 개 이상, 바람직하게는 6 개 이상, 보다 바람직하게는 8 개 이상, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 컬럼이다. 바람직한 구현예에서, 5 또는 6 개의 컬럼, 보다 바람직하게는 6 개의 컬럼이 사용된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 7 또는 8 개의 컬럼, 보다 바람직하게는 8 개의 컬럼이 사용된다. 전형적으로, 25 개 이하의 컬럼, 바람직하게는 20 개 이하의 컬럼, 보다 바람직하게는 15 개 이하의 컬럼이 존재한다.
- [0279] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 및 제 2 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치는 전형적으로 동일한 수의 컬럼을 함유한다. 특정 적용의 경우 이들은 상이한 수의 컬럼을 가질 수 있다.
- [0280] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내의 컬럼은 전형적으로 동일한 치수를 갖지만, 특정 적용의 경우, 상이한 치수를 가질 수 있다.
- [0281] 컬럼으로의 유속은 일련의 컬럼에 걸친 최대 압력에 의해 제한되며, 컬럼 치수 및 고체상의 입자 크기에 따라 좌우될 것이다. 당업자는 효율적인 탈착이 보장되도록 각각의 컬럼 치수에 대해 요구되는 유속을 쉽게 확립할 수 있을 것이다. 더 큰 직경의 컬럼은 일반적으로 컬럼을 통한 선형 유동을 유지하기 위해 더 높은 유동을 필요로 할 것이다.
- [0282] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 상기 개략적으로 나타낸 전형적인 컬럼 크기에 대해, 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 용리액의 유속은 50 내지 300 L/분, 바람직하게는 100 내지 150 L/분이다. 전형적으로, 제 1 SMB 분리 단계에 사용된 크로마토그래피 장치로부터의 추출물의 유속은 5 내지 150 L/분, 바람직하게는 25 내지 130 L/분이다. 제 1 SMB 분리 단계로부터의 추출물의 일부가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되는 구현예에서, 재순환의 유속은 전형적으로 50 내지 100 L/분, 바람직하게는 약 75 L/분이다. 전형적으로, 제 1 SMB 분리 단계에 사용된 크로마토그래피 장치로부터의 라피네이트의 유속은 15 내지 150 L/분, 바람직하게는 20 내지 125 L/분이다. 제 1 SMB 분리 단계로부터의 라피네이트의 일부가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되는 구현예에서, 재순환의 유속은 전형적으로 20 내지 75 L/분, 바람직하게는 약 35 L/분이다. 전형적으로, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 유입 스트림의 도입 유속은 0.3 내지 10 L/분, 바람직하게는 0.5 내지 7.5 L/분, 보다 바람직하게는 1 내지 4 L/분이다.

- [0283] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 상기 개략적으로 나타낸 전형적인 컬럼 크기에 대해, 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 용리액의 유속은 50 내지 250 L/분, 바람직하게는 100 내지 225 L/분이다. 전형적으로, 제 2 SMB 분리 단계에 사용된 크로마토그래피 장치로부터의 추출물의 유속은 25 내지 125 L/분, 바람직하게는 50 내지 120 L/분이다. 제 2 SMB 분리 단계로부터의 추출물의 일부가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되는 구현예에서, 재순환의 유속은 전형적으로 40 내지 90 L/분, 바람직하게는 50 내지 75 L/분, 보다 바람직하게는 약 60 L/분이다. 전형적으로, 제 2 SMB 분리 단계에 사용된 크로마토그래피 장치로부터의 라피네이트의 유속은 25 내지 150 L/분, 바람직하게는 50 내지 100 L/분, 보다 바람직하게는 약 90 L/분이다. 제 2 SMB 분리 단계로부터의 라피네이트의 일부가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되는 구현예에서, 재순환의 유속은 전형적으로 20 내지 60 L/분, 바람직하게는 약 30 L/분이다.
- [0284] 당업자가 인식할 바와 같이, 액체가 다양한 추출물 및 라피네이트 스트림을 통해 수집되거나 제거되는 속도에 대한 언급은 시간량, 전형적으로 L/분으로 제거된 액체의 부피를 의미한다. 유사하게, 액체가 장치 내로, 전형적으로 장치 내의 인접한 컬럼으로 다시 재순환되는 속도에 대한 언급은 시간량, 전형적으로 L/분으로 재순환되는 액체의 부피를 의미한다.
- [0285] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 실제 이동층 크로마토그래피가 바람직하다.
- [0286] 단계 시간, 즉 수집된 분획의 다양한 제거 지점과 유입 스트림 및 용리액의 주입 지점을 이동시키는 것 사이의 시간은 특별히 제한되지 않으며, 사용된 컬럼의 수 및 치수, 및 장치를 통한 유속에 따라 좌우될 것이다. 당업자는 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 적절한 단계 시간을 쉽게 결정할 수 있을 것이다. 단계 시간은 전형적으로 100 내지 1000 초, 바람직하게는 200 내지 800 초, 보다 바람직하게는 약 250 내지 약 750 초이다. 일부 구현예에서, 100 내지 400 초, 바람직하게는 200 내지 300 초, 보다 바람직하게는 약 250 초의 단계 시간이 적절하다. 다른 구현예에서, 600 내지 900 초, 바람직하게는 700 내지 800 초, 보다 바람직하게는 약 750 초의 단계 시간이 적절하다.
- [0287] "백투백" SMB 방법은 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계를 포함한다.
- [0288] 이 두 단계는 단일 크로마토그래피 장치에서 쉽게 수행될 수 있다. 따라서 한 구현예에서, (a) 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계를 동일한 크로마토그래피 장치에서 순차적으로 수행하며, 제 1 생성물을 제 1 SMB 분리 단계와 제 2 SMB 분리 단계 사이에서 회수하고, PUFA 생성물이 각각의 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리되도록 제 1 SMB 분리 단계와 제 2 SMB 분리 단계 사이에서 크로마토그래피 장치 내의 방법 조건을 조정한다. 이러한 "백투백" SMB 방법의 바람직한 구현예를 도 10A 로서 나타낸다. 따라서, 8 개 컬럼을 갖는 SMB 장치에서 제 1 SMB 분리 단계 (좌변) 를 수행한다. 제 1 SMB 분리 단계와 제 2 SMB 분리 단계 사이에서 제 1 생성물은 예를 들어 용기에서 회수되고, 크로마토그래피 장치에서의 방법 조건은 PUFA 생성물이 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리되도록 조정된다. 그런 다음, 8 개의 컬럼을 갖는 동일한 SMB 장치에서 제 2 SMB 분리 단계 (우변) 를 수행한다.
- [0289] 구현예 (a) 에서, 방법 조건을 조정하는 것은 전형적으로, 장치 내의 방법 조건을 전체로서 조정하는 것, 즉 조건이 상이하도록 장치를 물리적으로 변형하는 것을 의미한다. 이는 방법 조건이 상이하게 될 수 있는 동일한 장치의 상이한 부분에 제 1 생성물을 다시 단순히 재도입하는 것을 의미하지 않는다.
- [0290] 대안적으로, 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계에서 제 1 및 제 2 의 별개의 크로마토그래피 장치가 사용될 수 있다. 따라서 또 다른 구현예에서, (b) 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계를 각각 별개의 제 1 및 제 2 크로마토그래피 장치에서 수행하며, 제 1 SMB 분리 단계로부터 수득한 제 1 생성물을 제 2 크로마토그래피 장치에 도입하고, PUFA 생성물을 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리한다.
- [0291] 구현예 (b) 에서, 2 개의 SMB 분리 단계는 순차적으로 또는 동시에 수행될 수 있다.
- [0292] 따라서 구현예 (b) 에서 2 개의 SMB 분리 단계가 순차적으로 수행되는 경우, 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계는 각각 별개의 제 1 및 제 2 크로마토그래피 장치에서 순차적으로 수행되며, 제 1 생성물은 제 1 SMB 분리 단계와 제 2 SMB 분리 단계 사이에서 회수되고, 제 1 및 제 2 SMB 크로마토그래피 장치에서의 방법 조건은 PUFA 생성물이 각각의 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리되도록 조정된다. 이러한 "백투백" SMB 분리 방법의 바람직한 구현예를 도 10B 로서 나타낸다. 따라서, 1 에서 8 까지 8 개의 컬럼을 갖는 SMB 장치에서 제 1 SMB 분리 단계 (좌변) 를 수행한다. 제 1 SMB 분리 단계와 제 2 SMB 분리 단계 사이에서 제 1 생성물은 예를 들어 용기에서 회수된 다음, 제 2 의 별개의 SMB 장치에 도입된다. 제 2 SMB 분리 단계 (우

변) 는 9 에서 16 까지 8 개의 컬럼을 갖는 제 2 의 별개의 SMB 장치에서 수행된다. 2 개의 크로마토그래피 장치에서의 방법 조건은 PUFA 생성물이 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리되도록 조정된다.

[0293] 구현예 (b) 에서 2 개의 SMB 분리 단계가 동시에 수행되는 경우, 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계는 각각 별개의 제 1 및 제 2 크로마토그래피 장치에서 수행되며, 제 1 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입되고, 제 1 및 제 2 크로마토그래피 장치에서의 방법 조건은 PUFA 생성물이 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리되도록 조정된다. 이러한 "백투백" SMB 분리 방법의 바람직한 구현예를 도 10C 로서 나타낸다. 따라서, 1 에서 8 까지 8 개의 컬럼을 갖는 SMB 장치에서 제 1 SMB 분리 단계 (좌변) 를 수행한다. 제 1 SMB 분리 단계에서 수득한 제 1 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 제 2 의 별개의 분리 크로마토그래피 장치에 투입된다. 제 1 생성물은 제 1 SMB 분리 단계에서 제 2 SMB 분리 단계로 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 용기를 통해 전달될 수 있다. 제 2 SMB 분리 단계 (우변) 는 9 에서 16 까지 8 개의 컬럼을 갖는 제 2 의 별개의 SMB 장치에서 수행된다. 2 개의 크로마토그래피 장치에서의 방법 조건은 PUFA 생성물이 각각의 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리되도록 조정된다.

[0294] 구현예 (b) 에서 2 개의 SMB 분리 단계가 동시에 수행되는 경우, 용리액은 2 개의 별개의 크로마토그래피 장치에서 별도로 순환한다. 따라서, 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되고 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입되는 제 1 생성물 중에 용매로서 존재할 수 있는 용리액 이외에, 용리액은 2 개의 별개의 크로마토그래피 장치 사이에서 공유되지 않는다. 크로마토그래피 컬럼은 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 2 개의 별개의 크로마토그래피 장치 사이에서 공유되지 않는다.

[0295] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 생성물이 제 1 SMB 분리 단계에서 수득된 후, 수성 유기 용매 용리액은 제 1 생성물이 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되기 전에 부분적으로 또는 전체적으로 제거될 수 있다. 대안적으로, 제 1 생성물은 존재하는 어떠한 용매도 제거하지 않고 제 2 SMB 분리 단계에서 정제될 수 있다.

[0296] 상기 언급된 바와 같이, 이러한 "백투백" SMB 방법에서 PUFA 생성물은 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리된다. 구현예 (a) 에서, PUFA 생성물이 각각의 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리되도록 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계 사이에서 SMB 분리 단계 둘 모두에 사용된 단일 SMB 장치의 방법 조건을 조정한다. 구현예 (b) 에서, 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 2 개의 별개의 크로마토그래피 장치에서의 방법 조건은 PUFA 생성물이 각각의 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리되도록 설정된다.

[0297] 따라서 이러한 "백투백" SMB 방법에서 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계에서의 방법 조건은 다양하다. 다양한 방법 조건은 예를 들어, 사용된 컬럼의 크기, 사용된 컬럼의 수, 컬럼에 사용된 패킹, SMB 장치의 단계 시간, 장치의 온도, 분리 단계에서 사용된 용리액의 물:유기 용매 비, 또는 장치에서 사용된 유속, 특히 추출물 또는 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체의 재순환 속도를 포함할 수 있다.

[0298] 바람직하게는, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 가변적일 수 있는 방법 조건은 SMB 분리 단계에서 사용된 용리액의 물:유기 용매 비, 및/또는 SMB 분리 단계에서 추출물 또는 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체의 재순환 속도이다. 이들 옵션 둘 모두를 하기에서 상세히 논의한다.

[0299] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 수득된 제 1 생성물은 전형적으로 유입 스트림에 비해 PUFA 생성물에 풍부하다.

[0300] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 수득된 제 1 생성물은 이어서 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.

[0301] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 생성물은 전형적으로 제 1 SMB 분리 방법에서 사용된 크로마토그래피 장치로부터 라피네이트 또는 추출물 스트림으로서 수집된다.

[0302] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 생성물은 제 1 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림으로서 수집되고, 제 2 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림으로서 수집된다. 따라서, 제 1 SMB 분리 단계에서 수집된 라피네이트 스트림은 제 2 SMB 분리 단계에서 유입 스트림으로서 사용된다. 제 1 SMB 분리 단계에서 수집된 라피네이트 스트림은 전형적으로 보다 극성인 성분과 함께 제 2 생성물을 함유한다.

[0303] 대안적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 생성물은 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림으로서 수집되

고, 제 2 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림으로서 수집된다. 따라서, 제 1 SMB 분리 단계에서 수집된 추출물 스트림은 제 2 SMB 분리 단계에서 유입 스트림으로서 사용된다. 제 1 SMB 분리 단계에서 수집된 추출물 스트림은 전형적으로 덜 극성인 성분과 함께 제 2 생성물을 함유한다.

- [0304] 이러한 "백투백" SMB 방법에서 PUFA 생성물은 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리된다. 전형적으로, 본 발명의 방법의 각각의 SMB 분리 단계에서 분리된 성분은 상이한 극성을 갖는다.
- [0305] 바람직하게는, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, PUFA 생성물은 제 1 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 덜 극성인 성분으로부터 분리되고, PUFA 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 보다 극성인 성분으로부터 분리된다.
- [0306] 전형적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서:
- [0307] (a) 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로부터의 추출물 스트림의 일부는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되고/되거나;
- [0308] (b) 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로부터의 라피네이트 스트림의 일부는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되고/되거나;
- [0309] (c) 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로부터의 추출물 스트림의 일부는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되고/되거나;
- [0310] (d) 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로부터의 라피네이트 스트림의 일부는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환된다.
- [0311] 바람직하게는 이러한 "백투백" SMB 방법에서:
- [0312] (a) 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로부터의 추출물 스트림의 일부는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되고;
- [0313] (b) 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로부터의 라피네이트 스트림의 일부는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되고;
- [0314] (c) 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로부터의 추출물 스트림의 일부는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되고;
- [0315] (d) 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로부터의 라피네이트 스트림의 일부는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환된다.
- [0316] 이러한 "백투백" SMB 방법에서의 재순환은 제 1 또는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로부터 추출물 또는 라피네이트 스트림의 일부를 그 SMB 단계에서 사용된 장치로, 전형적으로 인접한 컬럼으로 다시 공급하는 것을 포함한다. 이러한 인접한 컬럼은 시스템에서 용리액의 흐름에 대하여 하류에 있는 인접한 컬럼이다.
- [0317] 이러한 "백투백" SMB 방법에서 제 1 또는 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 또는 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 그 SMB 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 그 스트림을 통해 수집된 액체가 그 SMB 단계에서 사용된 장치로, 전형적으로, 시스템에서 용리액 흐름에 대하여 인접한 컬럼, 즉 하류 컬럼으로 다시 공급되는 속도이다.
- [0318] 이는 도 9 를 참조하여 알 수 있다. 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물의 재순환 속도는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 2 의 하부로부터 수집된 추출물이 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 3 의 상부에 공급되는 속도, 즉 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 3 의 상부로의 액체의 유속이다.
- [0319] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물의 재순환 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 2 의 하부에서 수집된 추출물이 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 3 의 상부에 공급되는 속도, 즉 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 3 의 상부로의 액체의 유속이다.
- [0320] 이러한 "백투백" SMB 방법에서 제 1 및/또는 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 및/또는 라피네이트 스트림의 재순환은 전형적으로 SMB 분리 단계에서 그 스트림을 통해 수집된 액체를 용기에 공급한 다음, 용기로부터 그 SMB

분리 단계에서 사용된 장치, 일반적으로 인접한 컬럼에 일정량의 액체를 펌핑함으로써 시행된다. 이러한 경우, 제 1 및/또는 제 2 SMB 분리 단계에서 특정 추출물 또는 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체의 전형적으로 인접한 컬럼으로의 재순환 속도는 액체가 용기로부터 다시 크로마토그래피 장치, 전형적으로 인접한 컬럼에 펌핑되는 속도이다.

- [0321] 당업자가 인식할 바와 같이, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 용리액 및 유입 스트림을 통해 크로마토그래피 장치에 도입되는 액체의 양은 장치로부터 제거되고 장치로 다시 재순환되는 액체의 양과 균형을 이룬다.
- [0322] 따라서, 도 9 와 관련하여 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 추출물 스트림의 경우, 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계 (D) 에서 사용된 크로마토그래피 장치(들) 로의 용리액 (탈착제) 의 유속은, 추출물이 특정 SMB 분리 단계 (D-E1 및 D-E2) 에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도에 추가된 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 용기 (E1 및 E2) 에서 축적되는 속도와 동일하다.
- [0323] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, SMB 분리 단계로부터의 라피네이트 스트림의 경우, 특정 SMB 분리 단계 (F 및 R1) 에서 사용된 크로마토그래피 장치에 공급원료가 도입되는 속도에 추가된 특정 SMB 분리 단계 (D-E1 및 D-E2) 에서 사용된 크로마토그래피 장치로 추출물이 다시 재순환되는 속도는, 라피네이트가 특정 SMB 분리 단계 (D+F-E1-R1 및 D+R1-E2-R2) 에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도에 추가된 특정 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 용기 (R1 및 R2) 에서 축적되는 속도와 동일하다.
- [0324] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 크로마토그래피 장치로부터의 특정 추출물 또는 라피네이트 스트림으로부터 수집된 액체가 용기에 축적되는 속도는 또한 크로마토그래피 장치로부터 그 추출물 또는 라피네이트 스트림의 순 제거 속도로서 생각될 수 있다.
- [0325] 전형적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 및 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 그 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되는 속도는 PUFA 생성물이 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리될 수 있도록 조정된다.
- [0326] 전형적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 및 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 그 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되는 속도는 PUFA 생성물이 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리될 수 있도록 조정된다.
- [0327] 바람직하게는 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 각각의 SMB 분리 단계에서 추출물 및 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 그 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되는 속도는 PUFA 생성물이 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리될 수 있도록 조정된다.
- [0328] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도와 상이하고/하거나, 제 1 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도와 상이하다.
- [0329] 제 1 또는 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 및/또는 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 그 특정 SMB 분리 단계에서 사용된 장치로 다시 재순환되는 속도를 변화시키는 것은 추출물 및 라피네이트 스트림에 존재하는 보다 극성이고 덜 극성인 성분의 양을 변화시키는 효과를 갖는다. 따라서 예를 들어, 더 낮은 추출물 재순환 속도는 SMB 분리 단계에서 덜 극성인 성분이 라피네이트 스트림을 통해 더 적게 전달되게 한다. 더 높은 추출물 재순환 속도는 SMB 분리 단계에서 덜 극성인 성분이 라피네이트 스트림을 통해 더 많이 전달되게 한다.
- [0330] 이는 예를 들어 도 6 에서 볼 수 있다. 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 그 SMB 분리 단계 (D-E1) 에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 임의의 성분 A 가 제 1 SMB 분리 단계 (R1) 에서 라피네이트 스트림을 통해 전달되는 정도에 영향을 줄 것이다.
- [0331] 전형적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도보다 빠르다. 바람직하게는, 보다 극성인 성분과 함께 제 2 생성물을 함유하는 라피네이트 스트림이 제 1 SMB 분리 단계로부터 수집되고 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되며, 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된

액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도보다 빠르다.

[0332] 대안적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도보다 느리다.

[0333] 전형적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도보다 빠르다. 바람직하게는, 덜 극성인 성분과 함께 제 2 생성물을 함유하는 추출물 스트림이 제 1 SMB 분리 단계로부터 수집되고 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되며, 제 1 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도보다 빠르다.

[0334] 대안적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도보다 느리다.

[0335] PUFA 생성물이 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리될 수 있도록 재순환 속도를 조정하는 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 각각의 SMB 분리 단계에서 사용되는 용리액의 물:유기 용매 비는 동일하거나 상이할 수 있다. 각각의 SMB 분리 단계에서 용리액의 전형적인 물:유기 용매 비는 상기 정의된 바와 같다.

[0336] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 각각의 SMB 분리 단계에서 사용되는 수성 유기 용매 용리액은 상이한 물:유기 용매 비를 갖는다. 각각의 SMB 분리 단계에서 사용되는 유기 용매는 동일하다. 각각의 SMB 분리 단계에서 사용되는 물:유기 용매 비는 바람직하게는 PUFA 생성물이 각각의 SMB 분리 단계에서 유입 스트림의 상이한 성분으로부터 분리될 수 있도록 조정된다.

[0337] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 각각의 SMB 분리 단계에서 사용되는 용리액의 용리력은 전형적으로 상이하다. 바람직하게는, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 용리액의 용리력은 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 용리액의 용리력보다 크다. 실제로 이는 각각의 SMB 분리 단계에서 사용되는 물 및 유기 용매의 상대적인 양을 변화시킴으로써 달성된다.

[0338] 유기 용매의 선택에 따라, 이들은 물보다 더 강력한 탈착제일 수 있다. 대안적으로, 이들은 물보다 덜 강력한 탈착제일 수 있다. 예를 들어, 아세토니트릴 및 알코올은 물보다 더 강력한 탈착제이다. 따라서, 수성 유기 용매가 수성 알코올 또는 아세토니트릴인 경우, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 용리액 중 알코올 또는 아세토니트릴의 양은 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 용리액 중 알코올 또는 아세토니트릴의 양보다 크다.

[0339] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 용리액의 물:유기 용매 비는 제 2 SMB 분리 단계에서 용리액의 물:유기 용매 비보다 낮다. 따라서, 제 1 SMB 분리 단계에서의 용리액은 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서의 용리액보다 더 많은 유기 용매를 함유한다.

[0340] 상기 언급된 각각의 SMB 분리 단계에서 물과 유기 용매의 비는 크로마토그래피 장치 전체 내에서 평균 비라는 것이 이해될 것이다.

[0341] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 각각의 SMB 분리 단계에서 용리액의 물:유기 용매 비는, 물 및/또는 유기 용매를 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 하나 이상의 컬럼에 도입함으로써 제어된다. 따라서 예를 들어, 제 2 SMB 분리 단계에서보다 제 1 SMB 분리 단계에서 더 낮은 물:유기 용매 비를 달성하기 위해, 물은 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서보다 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 더 천천히 도입된다.

- [0342] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 본질적으로 순수한 유기 용매 및 본질적으로 순수한 물은 각각의 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 상이한 지점에서 도입될 수 있다. 이들 두 스트림의 상대적인 유속은 크로마토그래피 장치에서의 전체 용매 프로필을 결정할 것이다. 대안적으로 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 유기 용매 및 물의 상이한 혼합물은 각각의 SMB 분리 단계에서 사용된 각각의 크로마토그래피 장치에서의 상이한 지점에서 도입될 수 있다. 이는 특정 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 유기 용매 및 물의 둘 이상의 상이한 혼합물을 도입하는 것을 포함할 것이며, 각각의 유기 용매/물 혼합물은 상이한 유기 용매:물 비를 갖는다. 이러한 "백투백" SMB 방법에서 유기 용매/물 혼합물의 상대 유속 및 상대 농도는 그 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 전체 용매 프로필을 결정할 것이다.
- [0343] 바람직하게는 이러한 "백투백" SMB 방법에서:
- [0344] (1) 보다 극성인 성분과 함께 제 2 생성물을 함유하는 제 1 생성물은 제 1 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림으로서 수집되고, 제 2 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림으로서 수집되거나;
- [0345] (2) 덜 극성인 성분과 함께 제 2 생성물을 함유하는 제 1 생성물은 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림으로서 수집되고, 제 2 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림으로서 수집된다.
- [0346] 옵션 (1)은 유입 스트림으로부터 EPA를 정제하기에 적합하다.
- [0347] 옵션 (1)은 도 2에서 예시된다. 제 2 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C) 및 덜 극성인 성분 (A)를 포함하는 유입 스트림 F는 제 1 SMB 분리 단계에서 정제된다. 제 1 SMB 분리 단계에서, 덜 극성인 성분 (A)는 추출물 스트림 E1로서 제거된다. 제 2 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C)는 라피네이트 스트림 R1로서 수집된다. 라피네이트 스트림 R1은 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되는 제 1 생성물이다. 제 2 SMB 분리 단계에서, 보다 극성인 성분 (C)는 라피네이트 스트림 R2로서 제거된다. 제 2 생성물 (B)는 추출물 스트림 E2로서 수집된다.
- [0348] 옵션 (1)은 도 4에 보다 상세히 예시된다. 도 4는 각각의 크로마토그래피 장치 내로의 유기 용매 탈착제 (D)와 물 (W)의 도입 지점을 나타낸 것을 제외하고는 도 2와 동일하다. 유기 용매 탈착제 (D) 및 물 (W)은 함께 용리액을 구성한다. (D)상은 전형적으로 본질적으로 순수한 유기 용매이지만, 특정 구현예에서는 주로 유기 용매를 포함하는 유기 용매/물 혼합물일 수 있다. (W)상은 전형적으로 본질적으로 순수한 물이지만, 특정 구현예에서는 주로 물을 포함하는 유기 용매/물 혼합물, 예를 들어 98% 물/2% 메탄올 혼합물일 수 있다.
- [0349] 옵션 (1)의 추가 예시는 도 6에 나타난다. 여기서 별개의 물 주입 지점은 없으며, 대신 수성 유기 용매 탈착제를 (D)에서 주입한다.
- [0350] 옵션 (1)에서, 라피네이트 및 추출물 스트림으로의 분리는 각각의 크로마토그래피 장치 내에서 용리액의 탈착력을 변화시킴으로써 도움받을 수 있다. 이는 용리액의 유기 용매 (또는 유기 용매 풍부) 성분 및 물 (또는 물 풍부) 성분을 각각의 크로마토그래피 장치의 상이한 지점에 도입함으로써 달성될 수 있다. 따라서 전형적으로, 유기 용매는 추출물 제거 지점의 상류에 도입되고, 물은 시스템에서의 용리액의 흐름에 대하여 추출물 제거 지점과 크로마토그래피 장치 내로의 공급물의 도입 지점 사이에 도입된다. 이는 도 4에 나타난다.
- [0351] 전형적으로, 옵션 (1)에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용되는 수성 유기 용매 용리액은 제 2 SMB 분리 단계에서 사용되는 용리액보다 더 많은 유기 용매를 함유하며, 즉 제 1 SMB 분리 단계에서의 물:유기 용매 비는 제 2 SMB 분리 단계에서의 물:유기 용매 비보다 낮다.
- [0352] 옵션 (1)에서, SMB 분리는 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 및 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 그 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도를 변화시킴으로써 도움받을 수 있다.
- [0353] 전형적으로, 옵션 (1)에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도보다 빠르다.
- [0354] 옵션 (1)에서, 제 1 SMB 분리 단계에서의 제 1 라피네이트 스트림은 전형적으로 용리액의 흐름에 대하여 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 유입 스트림의 도입 지점의 하류에서 제거된다.
- [0355] 옵션 (1)에서, 제 1 SMB 분리 단계에서의 제 1 추출물 스트림은 전형적으로 용리액의 흐름에 대하여 제 1 SMB

분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 유입 스트림의 도입 지점의 상류에서 제거된다.

- [0356] 옵션 (1) 에서, 제 2 SMB 분리 단계에서의 제 2 라피네이트 스트림은 전형적으로 용리액의 흐름에 대하여 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 제 1 생성물의 도입 지점의 하류에서 제거된다.
- [0357] 옵션 (1) 에서, 제 2 SMB 분리 단계에서의 제 2 추출물 스트림은 전형적으로 용리액의 흐름에 대하여 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 제 1 생성물의 도입 지점의 상류에서 수집된다.
- [0358] 전형적으로 옵션 (1) 에서, 유기 용매 또는 수성 유기 용매는 용리액의 흐름에 대하여 제 1 추출물 스트림의 제거 지점의 상류에서 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.
- [0359] 전형적으로 옵션 (1) 에서, 물이 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입되는 경우, 물은 용리액의 흐름에 대하여 유입 스트림의 도입 지점의 상류이지만 제 1 추출물 스트림의 제거 지점의 하류에서 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.
- [0360] 전형적으로 옵션 (1) 에서, 유기 용매 또는 수성 유기 용매는 용리액의 흐름에 대하여 제 2 추출물 스트림의 제거 지점의 상류에서 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.
- [0361] 전형적으로 옵션 (1) 에서, 물이 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입되는 경우, 물은 용리액의 흐름에 대하여 제 1 생성물의 도입 지점의 상류이지만 제 2 추출물 스트림의 제거 지점의 하류에서 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.
- [0362] 옵션 (2) 는 유입 스트림으로부터 DHA 를 정제하기에 적합하다.
- [0363] 옵션 (2) 는 도 3 에서 예시된다. 제 2 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C) 및 덜 극성인 성분 (A) 를 포함하는 유입 스트림 F 는 제 1 SMB 분리 단계에서 정제된다. 제 1 SMB 분리 단계에서, 보다 극성인 성분 (C) 는 라피네이트 스트림 R1 로서 제거된다. 제 2 생성물 (B) 및 덜 극성인 성분 (A) 는 추출 스트림 E1 로서 수집된다. 추출물 스트림 E1 은 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되는 제 1 생성물이다. 제 2 SMB 분리 단계에서, 덜 극성인 성분 (A) 는 추출물 스트림 E2 로서 제거된다. 제 2 생성물 (B) 는 라피네이트 스트림 R2 로서 수집된다.
- [0364] 옵션 (2) 는 도 5 에 보다 상세히 예시된다. 도 5 는 각각의 크로마토그래피 장치 내로의 유기 용매 탈착제 (D) 와 물 (W) 의 도입 지점을 나타낸 것을 제외하고는 도 3 과 동일하다. 상기와 같이, (D) 상은 전형적으로 본질적으로 순수한 유기 용매이지만, 특정 구현예에서는 주로 유기 용매를 포함하는 유기 용매/물 혼합물일 수 있다. (W) 상은 전형적으로 본질적으로 순수한 물이지만, 특정 구현예에서는 주로 물을 포함하는 유기 용매/물 혼합물, 예를 들어 98% 물/2% 메탄올 혼합물일 수 있다.
- [0365] 옵션 (2) 의 추가 예시는 도 7 에 나타난다. 여기서 별개의 물 주입 지점은 없으며, 대신 수성 유기 용매 탈착제를 (D) 에서 주입한다.
- [0366] 전형적으로 옵션 (2) 에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 재도입되는 속도는 제 2 SMB 분리 단계에서 라피네이트 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 재도입되는 속도보다 빠르다.
- [0367] 전형적으로 옵션 (2) 에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용되는 수성 유기 용매 용리액은 제 2 SMB 분리 단계에서 사용되는 용리액보다 더 적은 유기 용매를 함유하며, 즉 제 1 SMB 분리 단계에서의 물:유기 용매 비는 제 2 SMB 분리 단계에서보다 높다.
- [0368] 옵션 (2) 에서, 제 1 분리 단계에서의 제 1 라피네이트 스트림은 전형적으로 용리액의 흐름에 대하여 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 유입 스트림의 도입 지점의 하류에서 제거된다.
- [0369] 옵션 (2) 에서, 제 1 SMB 분리 단계에서의 제 1 추출물 스트림은 전형적으로 용리액의 흐름에 대하여 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 유입 스트림의 도입 지점의 상류에서 제거된다.
- [0370] 옵션 (2) 에서, 제 2 SMB 분리 단계에서의 제 2 라피네이트 스트림은 전형적으로 용리액의 흐름에 대하여 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 제 1 생성물의 도입 지점의 하류에서 제거된다.
- [0371] 옵션 (2) 에서, 제 2 SMB 분리 단계에서의 제 2 추출물 스트림은 전형적으로 용리액의 흐름에 대하여 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치 내로의 제 1 생성물의 도입 지점의 상류에서 수집된다.
- [0372] 전형적으로 옵션 (2) 에서, 유기 용매 또는 수성 유기 용매는 용리액의 흐름에 대하여 제 1 추출물 스트림의 제

거 지점의 상류에서 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.

- [0373] 전형적으로 옵션 (2) 에서, 물이 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입되는 경우, 물은 용리액의 흐름에 대하여 유입 스트림의 도입 지점의 상류이지만 제 1 추출물 스트림의 제거 지점의 하류에서 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.
- [0374] 전형적으로 옵션 (2) 에서, 유기 용매 또는 수성 유기 용매는 용리액의 흐름에 대하여 제 2 추출물 스트림의 제거 지점의 상류에서 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.
- [0375] 전형적으로 옵션 (2) 에서, 물이 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입되는 경우, 물은 용리액의 흐름에 대하여 제 1 생성물의 도입 지점의 상류이지만 제 2 추출물 스트림의 제거 지점의 하류에서 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에 도입된다.
- [0376] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 및 제 2 SMB 분리 단계에서 사용되는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치 각각은 바람직하게는 8 개의 크로마토그래피 컬럼으로 이루어진다. 이를 컬럼 1 내지 8 로 지칭한다. 각각의 장치에서, 8 개의 컬럼은 컬럼 1 의 하부가 컬럼 2 의 상부에 연결되고, 컬럼 2 의 하부가 컬럼 3 의 상부에 연결되고, ...등... 컬럼 8 의 하부가 컬럼 1 의 상부에 연결되도록 직렬로 배열된다. 이들 연결은 임의로는 다음 컬럼으로의 재순환 스트림을 갖는 보유 용기를 통해 이루어질 수 있다. 시스템을 통한 용리액의 흐름은 컬럼 1 에서 컬럼 2 로, 컬럼 3 으로 등이다. 시스템을 통한 흡착제의 유효 흐름은 컬럼 8 에서 컬럼 7 로, 컬럼 6 으로 등이다.
- [0377] 이는 도 8 에 예시된다. 제 2 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C) 및 덜 극성인 성분 (A) 를 포함하는 유입 스트림 F 는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 5 의 상부에 도입된다. 유기 용매 탈착제는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용되는 크로마토그래피 장치의 컬럼 1 의 상부에 도입된다. 물은 제 1 SMB 분리 단계에서 사용되는 크로마토그래피 장치의 컬럼 4 의 상부에 도입된다. 제 1 SMB 분리 단계에서, 덜 극성인 성분 (A) 는 컬럼 2 의 하부로부터 추출물 스트림 E1 로서 제거된다. 제 2 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C) 를 컬럼 7 의 하부로부터 라피네이트 스트림 R1 로서 제거한다. 라피네이트 스트림 R1 은 제 1 생성물이며, 이는 이후 컬럼 5 의 상부에서 제 2 SMB 분리 단계에서 사용되는 크로마토그래피 장치에 도입됨으로써 제 2 SMB 분리 단계에서 정제된다. 유기 용매 탈착제는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용되는 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 1 의 상부에 도입된다. 물은 제 2 SMB 분리 단계에서 사용되는 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 4 의 상부에 도입된다. 제 2 SMB 분리 단계에서, 보다 극성인 성분 (C) 가 컬럼 7 의 하부에서 라피네이트 스트림 R2 로서 제거된다. 제 2 생성물 (B) 는 컬럼 2 의 하부에서 추출물 스트림 E2 로서 수집된다.
- [0378] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 유기 용매는 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 1 의 상부에 도입된다.
- [0379] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 물은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 4 의 상부에 도입된다.
- [0380] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 유기 용매는 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 1 의 상부에 도입된다.
- [0381] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 유기 용매는 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 4 의 상부에 도입된다.
- [0382] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 유입 스트림은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 5 의 상부에 도입된다.
- [0383] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 라피네이트 스트림은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 7 의 하부로부터 제 1 생성물로서 수집된다. 그런 다음, 이러한 제 1 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되고, 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 5 의 상부에 도입된다. 제 1 라피네이트 스트림은 임의로는 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되기 전에 용기에 수집될 수 있다.
- [0384] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 추출물 스트림은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 2 의 하부로부터 제거된다. 제 1 추출물 스트림은 임의로는 용기에 수집될 수

있고, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 3 의 상부에 재도입될 수 있다.

- [0385] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 제 2 라피네이트 스트림은 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 7 의 하부로부터 제거된다.
- [0386] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 제 2 추출물 스트림은 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 2 의 하부로부터 수집된다. 이러한 제 2 추출물 스트림은 전형적으로 제 2 생성물을 함유한다. 제 2 추출물 스트림은 임의로는 용기에 수집될 수 있고, 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 3 의 상부에 재도입될 수 있다.
- [0387] 도 8 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 사용된 용리액은 전형적으로 상기 정의된 바와 같다.
- [0388] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 물:유기 용매 비는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 물:유기 용매 비보다 낮다. 따라서, 제 1 SMB 분리 단계에서의 용리액은 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 용리액보다 더 많은 유기 용매를 함유한다.
- [0389] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서의 물:유기 용매 비는 전형적으로 0.5:99.5 내지 1.5:98.5 부피부이다. 제 2 SMB 분리 단계에서의 물:유기 용매 비는 전형적으로 2:98 내지 6:94 부피부이다.
- [0390] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 도 8 의 장치가 도 10a 에 나타난 바와 같이 구성되지만, 도 10b 및 도 10c 에 나타난 구성이 또한 사용될 수 있다.
- [0391] 이러한 "백투백" SMB 방법은 또한 도 9 에서 예시된다. 제 2 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C) 및 덜 극성인 성분 (A) 를 포함하는 유입 스트림 F 는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 5 의 상부에 도입된다. 수성 유기 용매 탈착제는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용되는 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 1 의 상부에 도입된다. 제 1 SMB 분리 단계에서, 덜 극성인 성분 (A) 는 컬럼 2 의 하부로부터 추출물 스트림 E1 로서 제거된다. 제 2 생성물 (B) 및 보다 극성인 성분 (C) 를 컬럼 7 의 하부로부터 라피네이트 스트림 R1 로서 제거한다. 라피네이트 스트림 R1 은 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 4 의 상부에 도입됨으로써 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되는 제 1 생성물이다. 수성 유기 용매 탈착제는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용되는 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 1 의 상부에 도입된다. 제 2 SMB 분리 단계에서, 보다 극성인 성분 (C) 가 컬럼 7 의 하부에서 라피네이트 스트림 R2 로서 제거된다. 제 2 생성물 (B) 는 컬럼 2 의 하부에서 추출물 스트림 E2 로서 수집된다.
- [0392] 도 9 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 수성 유기 용매는 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 1 의 상부에 도입된다.
- [0393] 도 9 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 수성 유기 용매는 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 9 의 상부에 도입된다.
- [0394] 도 9 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 유입 스트림은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 컬럼 5 의 상부에 도입된다.
- [0395] 도 9 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 라피네이트 스트림은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 7 의 하부로부터 제 1 생성물로서 수집된다. 그런 다음, 이러한 제 1 생성물은 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되고, 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 5 의 상부에 도입된다. 제 1 라피네이트 스트림은 임의로는 제 2 SMB 분리 단계에서 정제되기 전에 용기에 수집될 수 있다.
- [0396] 도 9 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 추출물 스트림은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 2 의 하부로부터 제거된다. 제 1 추출물 스트림은 임의로는 용기에 수집될 수 있고, 일부는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 3 의 상부에 재도입될 수 있다. 제 1 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 이 용기로부터 컬럼 3 의 상부에 액체가 펌핑되는 속도이다.
- [0397] 도 9 에 나타난 "백투백" SMB 방법에서, 제 2 라피네이트 스트림은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 7 의 하부로부터 제거된다.

- [0398] 도 9 에 나타낸 "백투백" SMB 방법에서, 제 2 추출물 스트림은 전형적으로 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 2 의 하부로부터 수집된다. 이러한 제 2 추출물 스트림은 전형적으로 제 2 생성물을 함유한다. 제 2 추출물 스트림은 임의로는 용기에 수집될 수 있고, 일부는 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치의 컬럼 3 의 상부에 재도입될 수 있다. 제 2 SMB 분리 단계로부터 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 이 용기로부터 컬럼 3 의 상부에 액체가 펌핑되는 속도이다.
- [0399] 도 9 에 나타낸 "백투백" SMB 방법에서, 사용된 용리액은 상기 정의된 바와 같다.
- [0400] 전형적으로, 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 물:유기 용매 비는 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치에서의 물:유기 용매 비보다 낮다. 따라서, 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 용리액은 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 용리액보다 더 많은 유기 용매를 함유한다.
- [0401] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계에서의 물:유기 용매 비는 전형적으로 0.5:99.5 내지 1.5:98.5 부피부이다. 제 2 SMB 분리 단계에서의 물:유기 용매 비는 전형적으로 2:98 내지 6:94 부피부이다.
- [0402] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 제 1 SMB 분리 단계로부터 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 1 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도는 전형적으로 제 2 SMB 분리 단계에서 추출물 스트림을 통해 수집된 액체가 제 2 SMB 분리 단계에서 사용된 크로마토그래피 장치로 다시 재순환되는 속도보다 빠르다. 이러한 경우, 수성 유기 용매 용리액은 전형적으로 각각의 SMB 분리 단계에서 실질적으로 동일하다.
- [0403] 이러한 "백투백" SMB 방법에서, 도 9 의 장치가 도 10a 에 나타낸 바와 같이 구성되지만, 도 10b 및 도 10c 에 나타낸 구성이 또한 사용될 수 있다.
- [0404] 전형적으로, 본 발명의 크로마토그래피 분리는 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의, 예를 들어 하나의, "백투백" SMB 방법을 포함한다.
- [0405] 한 바람직한 구현예에서, 본 발명의 크로마토그래피 분리 방법은 공급 혼합물로부터 원하는 PUFA 생성물을 수득하기 위해 2 개의 별개의 크로마토그래피 분리 단계를 포함한다. 따라서, 이 구현예에서 크로마토그래피 분리 방법은 하기를 포함한다:
- [0406] (i) 용리액으로서 물과 제 1 유기 용매의 혼합물을 사용하여 제 1 크로마토그래피 분리 단계에서 공급 혼합물을 정제하여 중간 생성물을 수득하는 단계; 및
- [0407] (ii) 용리액으로서 물과 제 2 유기 용매의 혼합물을 사용하는 제 2 크로마토그래피 분리 단계에서 중간 생성물을 정제하여 PUFA 생성물을 수득하는 단계.
- [0408] 전형적으로 이 구현예에서, 제 2 유기 용매는 제 1 유기 용매와 상이하다. 이러한 소위 "혼합 용매" 방법은 원하는 PUFA 생성물로부터 C18 불순물을 제거하는데 특히 효과적이며, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 WO 2014/108686 에 기재되어 있다.
- [0409] 큰 부피의 수성 알코올 용매를 사용하지 않고 공급 혼합물로부터 C18 지방산, 특히 알파-리놀렌산 (ALA) 및/또는 감마-리놀렌산 (GLA) 을 효율적으로 제거하는 것은 어려울 수 있다. C18 지방산의 효율적인 제거는 약학 및 식이 오일에 대한 많은 사양이 낮은 함량의 이러한 지방산을 요구하기 때문에 유리하다. 예를 들어, 일본에서 사용하기 위한 특정 오일 사양은 1 중량% 미만의 ALA 함량을 요구한다. 따라서, 이러한 "혼합 용매" 방법은 생성된 생성물에 존재하는 C18 지방산, 예를 들어 ALA 및/또는 GLA 의 양을 최소화하면서 공급 혼합물로부터 PUFA 생성물을 효율적으로 회수하는데 사용될 수 있기 때문에 특히 유용하다. C18 지방산은 직쇄형 또는 분지형 탄화수소 사슬을 갖는 C18 지방족 모노카르복실산이다. 전형적인 C18 지방산은 스테아르산 (C18:0), 올레인산 (C18:1n9), 바렌산 (C18:1n7), 리놀레산 (C18:2n6), 감마-리놀렌산/GLA (C18:3n6), 알파-리놀렌산/ALA (C18:3n3) 및 스테아리돈산/SDA (C18:4n3) 를 포함한다.
- [0410] 의심의 여지를 피하기 위해, 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치, 즉, 고체 흡착제 상으로서 본원에 기재된 바와 같은 C18-결합된 실리카를 포함하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 전형적으로, 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치, 즉, 고체 흡착제 상으로서 본원에 기재

된 바와 같은 C18-결합된 실리카를 포함하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.

- [0411] 바람직하게는, 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및 제 2 크로마토그래피 분리 단계 둘 모두는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치, 즉 20 bar 미만의 압력에서 작동하고 본원에 기재된 바와 같이 C18-결합된 실리카를 고체 흡착제 상으로서 포함하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 그러나 이러한 "혼합 용매" 방법의 대안적 구현예에서, 제 1 및/또는 제 2 크로마토그래피 분리 단계 중 하나만이 본원에서 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 다른 분리 단계는 상이한 고체 흡착제 상 및/또는 작동 압력을 갖는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.
- [0412] 따라서 "혼합 용매" 방법의 이러한 구현예에서, 전형적으로 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치, 즉 20 bar 미만의 압력에서 작동하고 본원에 기재된 바와 같이 C18-결합된 실리카를 고체 흡착제 상으로서 포함하는 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 2 크로마토그래피 단계는 상이한 고체 흡착제 상, 예를 들어 대안적인 실리카, 예컨대 대안적인 C18-결합된 실리카, C8-결합된 실리카, 순수 실리카, 시아노-결합된 실리카 및 페닐-결합된 실리카, 또는 비-실리카계 고체 흡착제 상을 갖는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 대안적으로, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 2 크로마토그래피 단계는 20 bar 초과 압력에서 작동하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 대안적으로, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 2 크로마토그래피 단계는 상이한 고체 흡착제 상, 예를 들어 대안적인 실리카, 예컨대 대안적인 C18-결합된 실리카, C8-결합된 실리카, 순수 실리카, 시아노-결합된 실리카 및 페닐-결합된 실리카, 또는 비-실리카계 고체 흡착제 상을 갖는 20 bar 초과 압력에서 작동하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.
- [0413] 대안적으로, "혼합 용매" 방법의 이러한 구현예에서, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치, 즉 20 bar 미만의 압력에서 작동하고 본원에 기재된 바와 같이 C18-결합된 실리카를 고체 흡착제 상으로서 포함하는 크로마토그래피 장치에서 수행될 수 있고, 제 1 크로마토그래피 단계는 상이한 고체 흡착제 상, 예를 들어 대안적인 실리카, 예컨대 대안적인 C18-결합된 실리카, C8-결합된 실리카, 순수 실리카, 시아노-결합된 실리카 및 페닐-결합된 실리카, 또는 비-실리카계 고체 흡착제 상을 갖는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 대안적으로, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 1 크로마토그래피 단계는 20 bar 초과 압력에서 작동하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 대안적으로, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 크로마토그래피 장치에서 수행되고, 제 1 크로마토그래피 단계는 상이한 고체 흡착제 상, 예를 들어 대안적인 실리카, 예컨대 대안적인 C18-결합된 실리카, C8-결합된 실리카, 순수 실리카, 시아노-결합된 실리카 및 페닐-결합된 실리카, 또는 비-실리카계 고체 흡착제 상을 갖는 20 bar 초과 압력에서 작동하는 크로마토그래피 장치에서 수행된다.
- [0414] 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 상이한 크로마토그래피 장치에서 수행된다. 대안적으로, 제 1 및 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 동일한 크로마토그래피 장치에서 수행된다.
- [0415] 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 2 유기 용매는 제 1 유기 용매의 극성 지수와 2.0 이하만큼 상이한 극성 지수를 갖는다. 따라서, 제 1 유기 용매의 극성 지수가 P1 이고 제 2 유기 용매의 극성 지수가 P2 인 경우, $|P1-P2|$ 는 최대 2.0 이다. 용매의 극성 지수 (P') 는 용매의 극성을 나타내는 잘 알려진 척도이다. 더 높은 극성 지수 수치는 보다 극성인 용매를 나타낸다. 극성 지수는 전형적으로 다양한 시험 용질과 상호작용하는 용매의 능력을 측정함으로써 결정된다. 보다 전형적으로, 용매의 극성 지수 (P') 는 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 Burdick and Jackson's Solvent Guide (AlliedSignal, 1997) 에 정의된 바와 같다. Burdick 과 Jackson 은 용매를 이들의 상이한 극성에 따라 순위 매기는 수치 지수를 참조로 하여 용매를 순위 매긴다. Burdick 과 Jackson 지수는 용매의 구조를 기반으로 한다.
- [0416] 바람직하게는 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 2 유기 용매는 제 1 유기 용매의 극성 지수와 0.1 과 2.0 사이만큼 상이한 극성 지수를 갖는다. 예를 들어, 제 2 유기 용매는 제 1 유기 용매의 극성 지수와 적어도 0.2, 적어도 0.3, 적어도 0.4, 적어도 0.5, 또는 적어도 0.6 만큼 상이한 극성 지수를 가질 수 있다. 예를 들어, 제 2 유기 용매는 제 1 유기 용매의 극성 지수와 최대 1.8, 최대 1.5, 최대 1.3, 최대 1.0, 또는 최대 0.8 만큼 상이한 극성 지수를 가질 수 있다. 예를 들어, 제 2 유기 용매는 제 1 유기 용매의 극성 지수와 0.2 와 1.8 사이, 0.3 과 1.5 사이, 0.4 와 1.3 사이, 0.5 와 1.0 사이, 또는 0.6 과 0.8 사이만큼 상이한 극성 지수를 가질 수 있다.
- [0417] 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및 제 2 유기 용매는 본원에서 개시된 임의의 유기 용매일 수 있다. 그

러나 전형적으로, 제 1 및 제 2 유기 용매는 물과 혼화성이다. 보다 전형적으로, 제 1 및 제 2 유기 용매는 극성 지수가 3.9 이상이다. 바람직하게는, 제 1 및 제 2 유기 용매는 테트라히드로푸란, 이소프로필 알코올, n-프로필 알코올, 메탄올, 에탄올, 아세토니트릴, 1,4-디옥산, N,N-디메틸 포름아미드 및 디메틸술폰에서 선택된다.

- [0418] 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 유기 용매:물 비는 99.9:0.1 내지 75:25 부피부, 바람직하게는 99.5:0.5 내지 80:20 부피부이다. 제 1 유기 용매가 메탄올인 경우, 메탄올:물 비는 전형적으로 99.9:0.1 내지 85:15 부피부, 바람직하게는 99.5:0.5 내지 88:12 부피부이다. 제 1 유기 용매가 아세토니트릴인 경우, 아세토니트릴:물 비는 전형적으로 99:1 내지 75:25 부피부, 바람직하게는 96:4 내지 80:20 부피부이다.
- [0419] 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 2 유기 용매:물 비는 99.9:0.1 내지 75:25 부피부, 바람직하게는 93:7 내지 85:15 부피부이다. 제 2 유기 용매가 메탄올인 경우, 메탄올:물 비는 전형적으로 95:5 내지 85:15 부피부, 바람직하게는 93:7 내지 90:10 부피부이다. 제 2 유기 용매가 아세토니트릴인 경우, 아세토니트릴:물 비는 전형적으로 90:10 내지 80:20 부피부, 바람직하게는 88:12 내지 85:15 부피부이다.
- [0420] 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및 제 2 유기 용매 중 하나는 아세토니트릴이다.
- [0421] 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및 제 2 유기 용매 중 하나는 메탄올이다.
- [0422] 바람직하게는 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및 제 2 유기 용매는 아세토니트릴 및 메탄올에서 선택된다. 따라서, (i) 제 1 유기 용매가 메탄올이고 제 2 유기 용매가 아세토니트릴이거나, (ii) 제 1 유기 용매가 아세토니트릴이고 제 2 유기 용매가 메탄올인 것이 바람직하다.
- [0423] 보다 바람직하게는 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 유기 용매는 메탄올이고 제 2 유기 용매는 아세토니트릴이며, (a) 메탄올:물 비는 99.9:0.1 내지 85:15 부피부, 바람직하게는 99.5:0.5 내지 88:12 부피부이고/이거나 (b) 아세토니트릴:물 비는 90:10 내지 80:20 부피부, 바람직하게는 88:12 내지 85:15 부피부이다. 특정 구현예에서, (a) 메탄올:물 비가 91:9 내지 93:7 부피부이고/이거나 (b) 아세토니트릴:물 비가 86:14 내지 88:12 부피부인 것이 바람직하다.
- [0424] 대안적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 유기 용매는 아세토니트릴이고 제 2 유기 용매는 메탄올이며, (a) 아세토니트릴:물 비는 99:1 내지 75:25 부피부, 바람직하게는 96:4 내지 80:20 부피부이고/이거나 (b) 메탄올:물 비는 95:5 내지 85:15 부피부, 바람직하게는 93:7 내지 90:10 부피부이다. 특정 구현예에서, (a) 아세토니트릴:물 비가 86:14 내지 88:12 부피부이고/이거나 (b) 메탄올:물 비가 87:13 내지 89:11 부피부인 것이 바람직하다.
- [0425] 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 유기 용매는 아세토니트릴이고, 중간 생성물은 공급 혼합물보다 낮은 농도의 상기 개시된 C18 지방산 불순물 중 하나 이상을 갖는다. 대안적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 2 유기 용매는 아세토니트릴이고, 제 2 분리 단계에서 제조된 PUFA 생성물은 중간 생성물보다 낮은 농도의 상기 개시된 C18 지방산 불순물 중 하나 이상을 갖는다.
- [0426] 바람직하게는 이러한 "혼합 용매" 방법에서, PUFA 생성물은 EPA 에틸 에스테르이고, (i) 제 1 유기 용매는 아세토니트릴이고, 중간 생성물은 공급 혼합물보다 낮은 농도의 상기 개시된 C18 지방산 불순물 중 하나 이상을 갖거나, (ii) 제 2 유기 용매는 아세토니트릴이고, 제 2 분리 단계에서 제조된 PUFA 생성물은 중간 생성물보다 낮은 농도의 상기 개시된 C18 지방산 불순물 중 하나 이상을 갖는다.
- [0427] 보다 바람직하게는, 이러한 "혼합 용매" 방법에서, PUFA 생성물은 EPA 에틸 에스테르이고, (i) 제 1 유기 용매는 아세토니트릴이고, 제 2 유기 용매는 메탄올이고, 중간 생성물은 공급 혼합물보다 낮은 농도의 상기 개시된 C18 지방산 불순물 중 하나 이상을 갖거나, (ii) 제 1 유기 용매는 메탄올이고, 제 2 유기 용매는 아세토니트릴이고, 제 2 분리 단계에서 제조된 PUFA 생성물은 중간 생성물보다 낮은 농도의 상기 개시된 C18 지방산 불순물 중 하나 이상을 갖는다.
- [0428] 임의의 공지된 크로마토그래피 장치가 이러한 "혼합 용매" 방법에서 사용될 수 있다. 전형적으로, 제 1 및/또는 제 2 분리 단계는 본원에 기재된 바와 같은 정지층 크로마토그래피 장치 또는 하나 이상의 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행된다.
- [0429] 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 정지층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함하고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 중간 생성물을 정지층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다. 따라서, 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피

분리 단계는 정지층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행되고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 정지층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행된다.

- [0430] 대안적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 정지층 장치에 도입하는 것을 포함하고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 중간 생성물을 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다. 따라서, 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 정지층 장치를 사용하여 수행되고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행된다.
- [0431] 대안적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함하고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 중간 생성물을 정지층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다. 따라서, 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행되고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 정지층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행된다.
- [0432] 대안적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함하고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 중간 생성물을 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다. 따라서, 전형적으로 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행되고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치를 사용하여 수행된다.
- [0433] 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 상기 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 단일 크로마토그래피 분리 또는 둘 이상의 크로마토그래피 분리로 이루어질 수 있으며, 단, 각각의 분리는 물과 제 1 유기 용매의 혼합물을 용리액으로서 사용한다.
- [0434] 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 상기 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 단일 크로마토그래피 분리 또는 둘 이상의 크로마토그래피 분리로 이루어질 수 있으며, 단, 각각의 분리는 물과 제 2 유기 용매의 혼합물을 용리액으로서 사용한다.
- [0435] 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및 제 2 분리 단계는 동일한 온도 또는 상이한 온도, 바람직하게는 동일한 온도에서 수행될 수 있다.
- [0436] 전형적으로, 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 각각의 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 통과시키는 것을 포함하며, 이들 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 온도는 실온보다 높다. 보다 전형적으로, 사용되는 모든 크로마토그래피 컬럼의 온도는 실온보다 높다. 바람직한 온도는 상기 기재된 바와 같다.
- [0437] 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및/또는 제 2 크로마토그래피 분리 단계가 모의 이동층 장치에서 수행되는 경우, 제 1 및/또는 제 2 크로마토그래피 분리 단계 중 적어도 하나는 전형적으로 상기 기재된 바와 같은 적어도 하나의, 예를 들어 하나의 "단일 패스" SMB 단계를 포함한다.
- [0438] 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및/또는 제 2 크로마토그래피 분리 단계가 모의 이동층 장치에서 수행되는 경우, 제 1 및/또는 제 2 크로마토그래피 분리 단계 중 적어도 하나는 전형적으로 상기 기재된 바와 같은 적어도 하나의, 예를 들어 하나의 "이중 패스" SMB 단계를 포함한다.
- [0439] "혼합 용매" 방법에서, SMB 분리를 작동시키는 "이중 패스" 모드의 맥락에서 상기 "유입 스트림"에 대한 언급은 상기 기재된 SMB 방법이 제 1 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 공급 혼합물을 지칭하고, 상기 기재된 SMB 방법이 제 2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 중간 생성물을 지칭한다.
- [0440] "혼합 용매" 방법에서, SMB 분리를 작동시키는 "이중 패스" 모드의 맥락에서 상기 "수정 유기 용매"에 대한 언급은 상기 기재된 SMB 방법이 제 1 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 물과 제 1 유기 용매의 혼합물을 지칭하고, 상기 기재된 SMB 방법이 제 2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 물과 제 2 유기 용매의 혼합물을 지칭한다.
- [0441] 이러한 "혼합 용매" 방법에서, 제 1 및/또는 제 2 크로마토그래피 분리 단계가 모의 이동층 장치에서 수행되는 경우, 제 1 및/또는 제 2 크로마토그래피 분리 단계 중 적어도 하나는 전형적으로 상기 기재된 바와 같은 "백투백" SMB 단계를 포함한다.

- [0442] 의심의 여지를 피하기 위해, "혼합 용매" 방법에서, 제 1 크로마토그래피 분리 단계가 상기 라인을 따른 "백투백" SMB 방법인 경우, 각각의 SMB 단계에서의 용리액은 물과 제 1 유기 용매의 혼합물이다. 제 2 크로마토그래피 분리 단계가 상기 라인을 따른 "백투백" SMB 방법인 경우, 각각의 SMB 단계에서의 용리액은 물과 제 2 유기 용매의 혼합물이다.
- [0443] "혼합 용매" 방법에서, SMB 분리를 작동시키는 "백투백" 모드의 맥락에서 상기 "유입 스트림"에 대한 언급은 상기 기재된 SMB 방법이 제 1 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 공급 혼합물을 지칭하고, 상기 기재된 SMB 방법이 제 2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 중간 생성물을 지칭한다.
- [0444] "혼합 용매" 방법에서, SMB 분리를 작동시키는 "백투백" 모드의 맥락에서 상기 "수정 유기 용매"에 대한 언급은 상기 기재된 "백투백" SMB 방법이 제 1 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 물과 제 1 유기 용매의 혼합물을 지칭하고, 상기 기재된 "백투백" SMB 방법이 제 2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 물과 제 2 유기 용매의 혼합물을 지칭한다. 제 1 및 제 2 SMB 단계에서 사용되는 유기 용매는 동일하다. 제 1 및 제 2 SMB 단계에서 사용되는 유기 용매:물 비는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0445] "혼합 용매" 방법에서, SMB 분리를 작동시키는 "백투백" 모드의 맥락에서 상기 "제 2 생성물"에 대한 언급은 상기 기재된 SMB 방법이 제 1 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 중간 생성물을 지칭하고, 상기 기재된 SMB 방법이 제 2 크로마토그래피 분리 단계에서 사용될 때 PUFA 생성물을 지칭한다.
- [0446] 바람직하게는 "혼합 용매" 방법에서, PUFA 생성물은 EPA 에틸 에스테르이고:
- [0447] (i) 제 1 유기 용매는 아세트니트릴이고, 제 2 유기 용매는 메탄올이고, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 정지층 장치에 도입하는 것을 포함하고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 중간 생성물을 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함하거나; 또는
- [0448] (ii) 제 1 유기 용매는 메탄올이고, 제 2 유기 용매는 아세트니트릴이고, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함하고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 중간 생성물을 정지층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다.
- [0449] 보다 더 바람직하게는 "혼합 용매" 방법에서, PUFA 생성물은 EPA 에틸 에스테르이고:
- [0450] (i) 제 1 유기 용매는 아세트니트릴이고, 제 2 유기 용매는 메탄올이고, 중간 생성물은 공급 혼합물보다 낮은 농도의 상기 개시된 C18 지방산 불순물 중 하나 이상을 갖고, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 정지층 장치에 도입하는 것을 포함하고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 중간 생성물을 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함하거나; 또는
- [0451] (ii) 제 1 유기 용매는 메탄올이고, 제 2 유기 용매는 아세트니트릴이고, 제 2 분리 단계에서 제조된 PUFA 생성물은 중간 생성물보다 낮은 농도의 상기 개시된 C18 지방산 불순물 중 하나 이상을 갖고, 제 1 크로마토그래피 분리 단계는 공급 혼합물을 모의 또는 실제 이동층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함하고, 제 2 크로마토그래피 분리 단계는 중간 생성물을 정지층 크로마토그래피 장치에 도입하는 것을 포함한다.
- [0452] 하기 실시예는 본 발명을 설명한다.
- [0453] **실시예**
- [0454] *실시예 1: 상이한 실리카의 입자 특징분석*
- [0455] 시험을 위해 4 개의 상이한 실리카를 선택하였다. 이들 실리카 각각의 물리적 매개변수를 먼저 하기 기재된 바와 같이 측정하였다. 결과를 표 1 에 정리한다. 모든 실리카는 상업적으로 이용 가능하며, 각각의 공급자로부터 입수하였다. 실리카 1 이 참조예로서 선택되며, 나머지 3 개의 실리카가 본 발명에 따라 사용하기 위한 실리카의 예이다.

표 1: 5 개 상이한 실리카 사양의 물리적 특성의 비교

실리카	1 (참조예)	2	3	4
탄소 로딩 (%)	24.9	19.8	20.1	17.8
표면적 (m ² /g)	542	417	519	339
Dv(10) (μm)	150	150	168	187
D[4,3] (μm)	228	248	251	257
Dv(90) (μm)	320	365	347	339
벌크 밀도 (kg/dm ³)	0.713	0.543	0.671	0.654

탄소 로딩 % 는 연소 분석에 의해 결정되었다.

표면적은 결합되지 않은 실리카 (즉, 옥타데실 탄소 사슬에 결합되지 않은) 의 표면적의 척도이다. 이는 BET 표면적 분석에 의한 다공성 실험에서 결정되었다.

Dv(10), D[4,3] 및 Dv(90) 은 레이저 회절에 의해 결정되었다. 측정은 Malvern Mastersizer 2000 기기를 사용하여 수성 현탁액에서 수행되었다.

상이한 C18 실리카 유형에 대한 입자 직경의 함수로서 실리카 샘플의 입자 부피에 대한 총 기여도를 나타내는 플롯을 도 12 에 나타낸다. 이들은 각 샘플의 입자 분포의 측정치이다.

도 12A 는 실리카 1 (2 개의 별개 배치) 과 실리카 2 의 입자 분포를 비교한다. 이들 실리카 둘 모두가 10 내지 100 μm 의 직경을 갖는 상당한 수의 더 작은 입자를 함유한다는 것이 관찰될 수 있다 (비록 이들 입자에 상응하는 피크가 작지만, y-축은 존재하는 이러한 직경의 입자의 총 수가 아닌 이들 입자의 전체 샘플에 대한 총 부피 기여도를 반영하고; 이들 입자가 작기 때문에 전체 부피에 대한 이들의 기여도가 작지만, 이들의 수는 상당하다). 따라서, 이들 실리카는 더 작은 입자의 상당한 "테일 (tail)" 을 갖는 넓은 입자 분포를 갖는다.

도 12B 는 실리카 1 (2 개의 별개 배치), 실리카 3 및 실리카 4 의 입자 분포를 비교한다. 실리카 3 및 실리카 4 둘 모두는 실리카 1 과 대조적으로 10 내지 100 μm 의 직경을 갖는 무시할 수 있는 수의 작은 입자를 함유하는 것으로 관찰될 수 있다. 이는 실리카 1 과 비교하여 표 1 의 실리카 3 및 실리카 4 에 대해 보고된 더 높은 Dv(10) 값에 반영된다. 또한 전체적으로, 실리카 3 및 실리카 4 는 실리카 1 보다 입자 크기 분포가 상당히 좁은 것을 알 수 있다.

벌크 입자 밀도는 정의된 부피를 갖는 컬럼에 패키징된 물질의 중량을 기록함으로써 결정되었다.

실리카 1, 2 및 3 의 광 현미경 이미지도 수득하였으며, 이를 도 13 에 나타낸다. 도 13A 및 13B 에서 볼 수 있는 바와 같이, 실리카 1 및 2 는 파손된 입자를 함유하며, 작은 직경을 갖는 다수의 입자가 존재한다. 대조적으로, 실리카 3 (도 13C) 은 파손된 입자의 증거를 나타내지 않으며, 보다 균일한 입자 크기 분포를 갖는다.

실시예 2: 상이한 실리카를 사용한 피크 분해능 및 압력 강하의 비교

어유 유래 공급원료 (약 74 GC-면적% EPA 및 약 10 GC-면적% DHA 를 포함함) 를 각각 10 mm 의 직경 및 250 mm 의 길이를 갖는 3 개의 컬럼으로 직렬로 구성된 단일 정지층 크로마토그래피 장치에 펄스 주입하였다. 표 2 에 기재된 각각의 실리카를 차례로 정지상으로서 사용하고, 메탄올:물의 혼합물 (90:10) 을 용리액으로서 사용하였다.

작동 매개변수 및 유속은 하기와 같았다:

공급 혼합물 펄스: 메탄올에 용해된 25 중량% 의 어유 유래 공급원료 0.5 mL

용리액 공급 속도 (D1): 90:10 부피% 에서 7 mL/분 메탄올:물

각각의 컬럼 펄스 실험에서, 하기 매개변수를 측정하였다:

• 컬럼에 따른 압력 강하 (참조로서 실리카 1 을 사용한 실험을 사용함);

• 참조 실험에 비한 EPA 의 체류 시간;

- α SDA/EPA 피크에 대한 선택성 (즉, 체류 시간에서의 차이);
- α DHA/EPA 피크에 대한 선택성;
- EPA 피크의 비대칭; 및
- EPA 피크에 대한 등가 이론적 플레이트 (HETP) 의 높이.

결과를 표 2 에 나타낸다 (사용된 각각의 실리카는 표 1 에서의 사양에 따른 것이며; 간결성을 위해, 각각의 실리카에 대한 단축된 참조 명칭을 사용하였다).

표 2: EPA-함유 공급 혼합물과 펄스 실험으로부터의 5 개 실리카 샘플 각각의 성능 비교

실리카	1 (참조예)	2	3	4
참조예 대한 압력 강하	100%	88%	115%	70%
선택성 α SDA/EPA	0.76	0.75	0.75	0.75
선택성 α DHA/EPA	1.34	1.35	1.38	1.32
EPA 피크에서의 비대칭	1.25	1.18	1.08	1.04
EPA 피크의 HETP (cm)	3.28	1.96	1.86	1.32

시험한 모든 실리카는 참조예와 비교하여 크로마토그래피 장치의 길이에 걸쳐 허용가능한 압력 강하를 입증하였다. 실리카 2 및 4 는 실리카 1 보다 장치의 길이에 걸쳐 더 낮은 압력 강하를 초래하며, 실리카 4 는 이와 관련하여 특히 유리하다.

시험한 모든 실리카는 DHA 및 SDA 피크에 비해 EPA 피크의 허용가능한 선택성을 입증하였다. 선택성은 관련 피크 쌍의 체류 시간의 비로서 계산되었다.

EPA 피크의 피크 비대칭 (As) 은 피크 중심 이후의 피크 폭을 10% 피크 높이에서의 피크 중심 이전의 피크 폭으로 나눔으로써 결정하였다. 시험한 모든 실리카는 참조예 (실리카 1) 에 비해 EPA 피크의 개선된 대칭성을 나타내었다. 따라서, 이들 실리카 각각은 EPA 의 개선된 피크 형상을 제공하는데, 이는 보다 대칭적인 피크가 EPA 피크가 다른 피크로 너무 많이 "테일" 을 형성하지 않음을 의미하기 때문이다. 이는 더 효율적인 분리를 가능하게 하는데, 특정 순도를 갖는 원하는 생성물의 높은 수율을 수득하기 위해 더 적은 용리액 (즉, 더 낮은 용리액 회석) 이 요구되기 때문이다.

표 2 에서의 값을 계산한 각각의 실리카 1, 2 및 4 에 대한 EPA 피크의 비대칭성의 그래픽적 표시를 도 14 에 나타낸다.

HETP 값은 하기 식을 사용하여 계산하였다:

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{\omega_h} \right)^2 \quad \text{및} \quad HETP = \frac{L}{N}$$

식 중에서:

N = 이론적 플레이트의 수

T_R = 체류 시간

ω_R = 절반 높이에서의 피크 폭 (시간 단위)

L = 컬럼의 길이 (mm)

크로마토그래피 컬럼이 무엇이든 비슷한 물리적 종류 플레이트 또는 다른 유사한 특성을 포함하지 않기 때문에 이론적 플레이트의 수는 수학적 개념이다. 높은 플레이트 수를 갖는 컬럼이 보다 효율적인 것으로 간주되며; 이론적 플레이트의 수가 높은 컬럼은 더 낮은 N 수를 갖는 컬럼 (즉, 더 낮은 HETP) 보다 주어진 체류 시간에서 더 좁은 피크를 가질 것이다. 따라서, 낮은 HETP 값은 더 높은 컬럼 효율로 이어지는 잘-분해된 피크를 나타내며, 이는 특정 순도를 갖는 원하는 생성물의 높은 수율이 수득되도록 더 적은 용리액이 요구된다는 것을 의미한다.

- [0493] 모든 시험 실리카 2 내지 4 는 참조 실리카 1 에 비해 개선된 HETP 를 나타낸다.
- [0494] 표 1 과 표 2 의 데이터로부터 다음과 같은 결론을 도출할 수 있다:
- [0495] • 보다 균일한 입자 크기 분포를 갖는 실리카, 및 특히 적은 수의 특히 작은 입자 (Dv(10) 값에 반영됨) 를 갖는 것들은 PUFA 피크의 개선된 분해능을 나타낸다. 이는 탄소 로딩이 매우 유사한 실리카 2 및 3 의 HETP 값을 비교하여 알 수 있다.
- [0496] • 더 낮은 탄소 로딩을 갖는 실리카는 PUFA 피크의 개선된 분해능을 나타낸다. 이는 실리카 1 및 2 의 HETP 값을 비교하여 알 수 있으며, 이들 둘 모두는 작은 입자의 "테일" 과 유사한 입자 분포를 갖지만, 그럼에도 불구하고 실리카 2 에 대한 HETP 값은 실리카 1 에 대한 것보다 상당히 더 낮다. 마찬가지로, 실리카 3 및 4 는 유사한 입자 크기 분포를 갖지만, 실리카 4 는 더 낮은 탄소 로딩 및 개선된 HETP 값을 갖는다.
- [0497] • 더 낮은 표면적을 갖는 실리카는 PUFA 피크의 개선된 분해능을 나타낸다. 일반적으로, 탄소 로딩과 총 표면적 사이에 양의 상관관계가 관찰된다.
- [0498] 실시예 3: HPLC/벡치 방법과 실리카 4 를 사용하는 SMB 를 통한 저압 EPA 분리의 비교
- [0499] EPA-함유 공급원료의 3 회 정제를 각각 직경 1.6 cm 및 길이 25 cm 인 8 개 컬럼을 갖는 감압에서 작동하는 SMB 방법에서 실리카 4 를 사용하여 수행하였고, 문헌에 보고되는 다양한 실리카를 사용하는 벡치/HPLC 분리와 비교하였다. 각 방법의 생산성 및 용리액 회석을 측정하였다. 결과를 표 3 에 기술한다.
- [0500] EPA 보다 빠르고 느리게 작동하는 성분을 각각 제거하기 위해 "고속" 컷 (패스 1) 및 "저속" 컷 (패스 2) 을 모두 갖는 단일 패스 SMB 또는 이중 패스 SMB 를 사용하여 각각의 3 회 정제를 수행하였다. 각 정제에 대한 작동 매개변수는 하기와 같았다:
- [0501] 시험 작동 A
- [0502] 공급원료: 92 GC-면적% EPA 에틸 에스테르 함량
- [0503] 원하는 생성물: 97 GC-면적% EPA 에틸 에스테르
- [0504] 방법: 단일 패스 SMB
- [0505] 용리액: 메탄올:물 (91:9)
- [0506] 온도: 40℃
- [0507] 압력: <10 bar
- [0508] 공급 혼합물 공급 속도 (F): 메탄올 중 50 중량% 어유 공급원료 0.5 mL/분
- [0509] 용리액 공급 속도 (D): 17.3 mL/분
- [0510] 추출물 속도: 13.2 mL/분
- [0511] 라피네이트 속도: 4.6 mL/분
- [0512] 시험 작동 B
- [0513] 공급원료: 74 GC-면적% EPA 에틸 에스테르 함량
- [0514] 원하는 생성물: 97 GC-면적% EPA 에틸 에스테르
- [0515] 방법: 이중 패스 SMB
- [0516] 용리액 (저속 컷): 메탄올:물 (91:9)
- [0517] 용리액 (고속 컷): 메탄올:물 (90:10)
- [0518] 온도: 40℃
- [0519] 압력: <10 bar
- [0520] 패스 1
- [0521] 공급 혼합물 공급 속도 (F1): 메탄올 중 50 중량% 어유 공급원료 0.5 mL/분

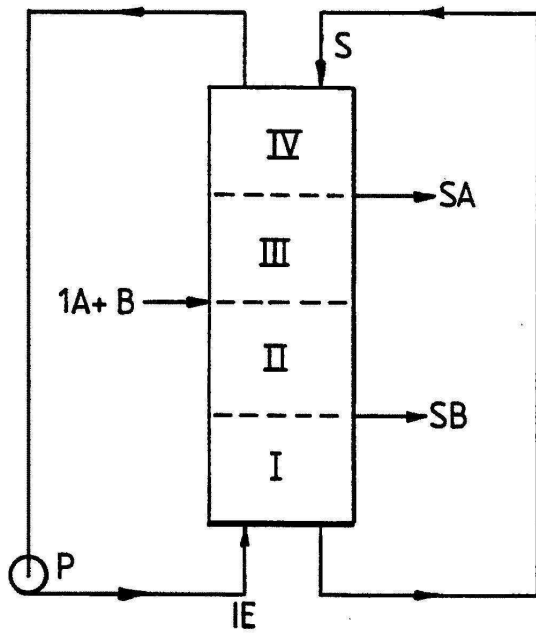
- [0522] 용리액 공급 속도 (D1): 22.0 mL/분
- [0523] 추출물 속도 (E1): 14.8 mL/분
- [0524] 라피네이트 속도 (R1): 7.7 mL/분
- [0525] *패스 2*
- [0526] 공급 혼합물 공급 속도 (F2): 메탄올 중 저속 컷으로부터의 50 중량% 라피네이트 1.0 mL/분
- [0527] 용리액 공급 속도 (D2): 13.5 mL/분
- [0528] 추출물 속도 (E2): 12.3 mL/분
- [0529] 라피네이트 속도 (R2): 2.3 mL/분
- [0530] 시험 작동 C
- [0531] 공급원료: 74 GC-면적% EPA 에틸 에스테르 함량
- [0532] 원하는 생성물: 97 GC-면적% EPA 에틸 에스테르
- [0533] 방법: 이중 패스 SMB
- [0534] 용리액 (저속 컷): 메탄올:물 (90:10)
- [0535] 용리액 (고속 컷): 메탄올:물 (91:9)
- [0536] 온도: 40℃
- [0537] 압력: <6 bar
- [0538] *패스 1*
- [0539] 공급 혼합물 공급 속도 (F1): 메탄올 중 50 중량% 어유 공급원료 0.35 mL/분
- [0540] 용리액 공급 속도 (D1): 13.9 mL/분
- [0541] 추출물 축적 속도 (E1): 10.1 mL/분
- [0542] 라피네이트 축적 속도 (R1): 4.2 mL/분
- [0543] *패스 2*
- [0544] 공급 혼합물 공급 속도 (F2): 메탄올 중 저속 컷으로부터의 50 중량% 라피네이트 0.7 mL/분
- [0545] 용리액 공급 속도 (D2): 8.9 mL/분
- [0546] 추출물 속도 (E2): 8.5 mL/분
- [0547] 라피네이트 속도 (R2): 1.1 mL/분
- [0548] 표 3 으로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 크로마토그래피 분리 방법은 EPA 생성물 kg 당 용매의 상당히 감소된 회석, 즉 더 높은 작동 압력을 이용하는 모든 비교 선행 기술 방법보다 더 적은 용매를 필요로 하는 훨씬 더 효율적인 분리를 초래한다. 동시에, 합리적인 수준의 생산성이 유지되며, 이는 감소된 작동 압력에서 크로마토그래피 분리 생산성의 10 배까지의 감소가 통상적으로 관찰된다는 것이 당업계에 일반적으로 알려져 있기 때문에 놀라운 것이다.
- [0549] 이러한 낮은 수준의 회석 및 높은 수율의 EPA 생성물이 이러한 큰 평균 입자 크기를 갖는 실리카를 사용하여 수득될 수 있다는 것이 또한 주목할 만하다. 더 큰 입자 크기가 더 큰 HETP 및 피크 해상도의 손실을 초래한다는 것이 당업계에 일반적으로 공지되어 있다. 따라서, 더 큰 평균 입자 크기를 갖는 특정 유형의 실리카가 사용될 수 있고 여전히 PUFA 생산에서 높은 수율 및 허용가능한 생산성을 달성하며, 또한 용매의 더 낮은 회석을 제공한다는 본 발명자들의 발견은 놀라운 것이다.
- [0550] **표 3:** 비교 선행 기술 분리 및 본 발명에 따른 EPA 의 크로마토그래피 분리에 대한 작동 매개변수 및 배출 생산성, 회석 및 수율

실시예	A	B	C	D (참조예)	비교예 1 Novasep Cyclojet US 9,802,882 Ex. 1a/2a	비교예 2 Novasep Varicol US 9,802,882 Ex. 1b/2b	비교예 3 Nissui US 5,840,944
선행 기술 참조	-	-	-	-			
분리 유형	SMB	SMB	SMB	SMB	배치/HPLC	Varicol (SMB)	배치
실리카	4	4	4	1	C18 입자 크기 20 μm	C18 입자 크기 20 μm	C18 입자 크기 10-20 μm
압력	<10 bar	<10 bar	<6 bar		HPLC	HPLC	HPLC
패스 1							
용매	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	EtOH
생산성 (kg _{EPA} /kg _{ads} /일)	0.93	0.80	0.55	0.26	2.76	2.46	0.38
회식 (L _{80%} /kg _{EPA})	97	141	131	197	224	258	1204
EPA 회수 (수율)	>97%	>98%	>98%	92%	95%	95%	85%
패스 2							
용매	-	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	아세톤:H ₂ O	아세톤:H ₂ O	-
생산성 (kg _{EPA} /kg _{ads} /일)	-	2.04	1.47	0.39	3.58	3.35	-
회식 (L _{80%} /kg _{EPA})	-	35.2	32.0	96	153	0	-
EPA 회수 (수율)	-	>99%	>99%	98%	95%	95%	-
생산성 (kg _{EPA} /kg _{ads} /일)	0.93	0.58	0.40	0.16	1.56	1.42	0.38
회식 (L _{80%} /kg _{EPA})	97	176	163	293	377	258	1204
EPA 회수 (수율)	>97.0%	>97.0%	>97.0%	90%	90.3%	90.3%	85.0%

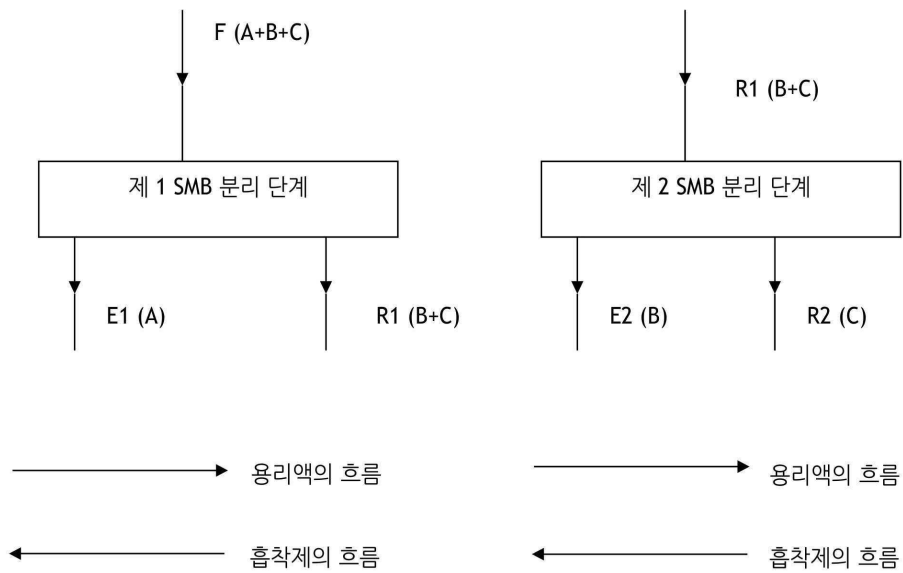
[0551]

도면

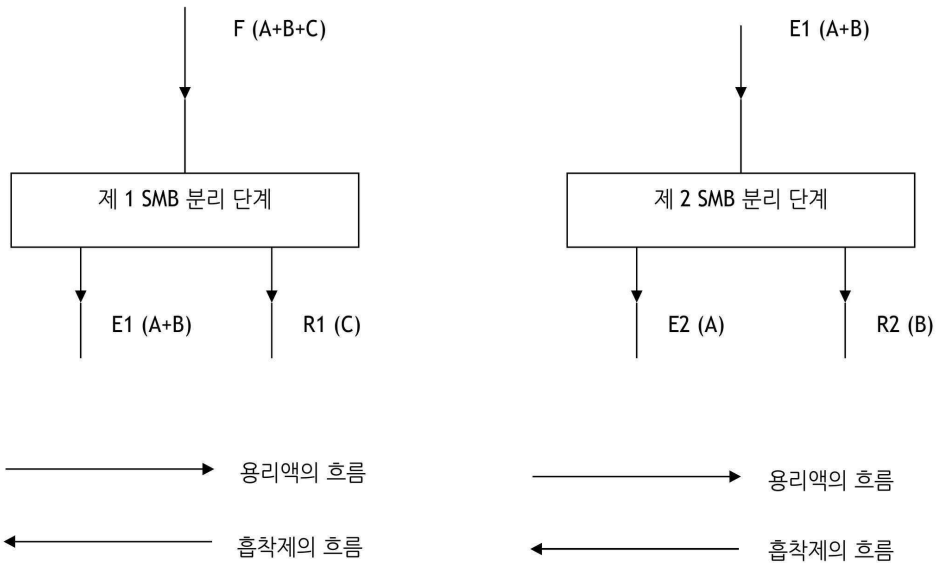
도면1



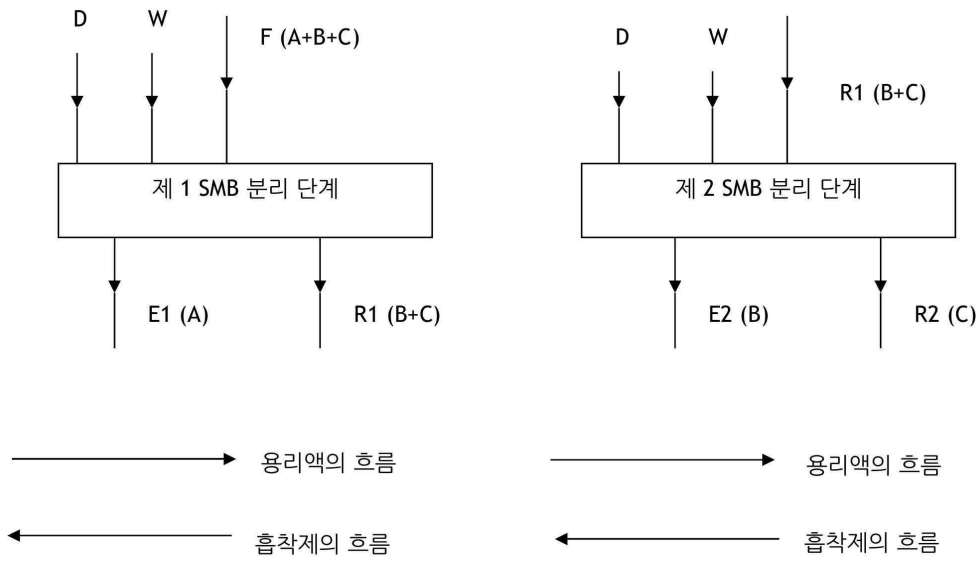
도면2



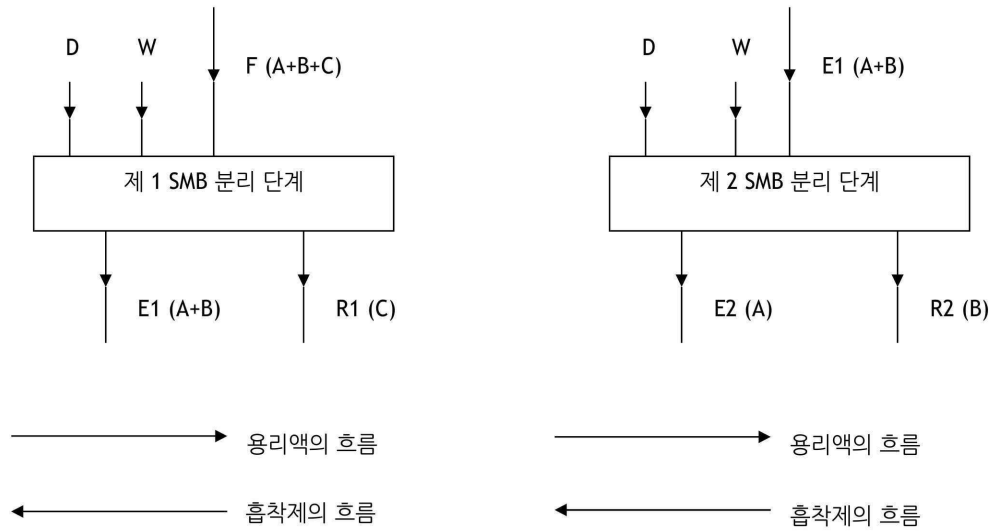
도면3



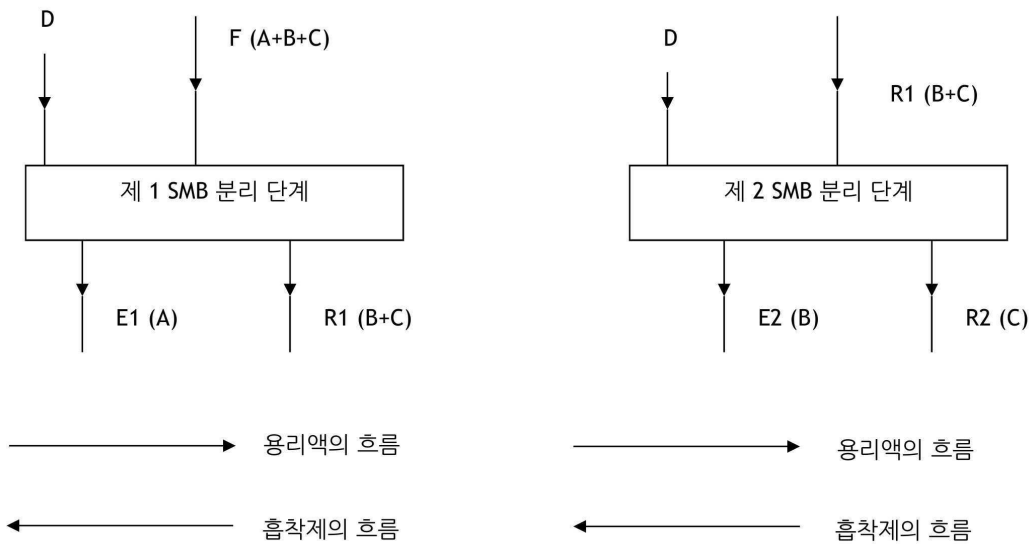
도면4



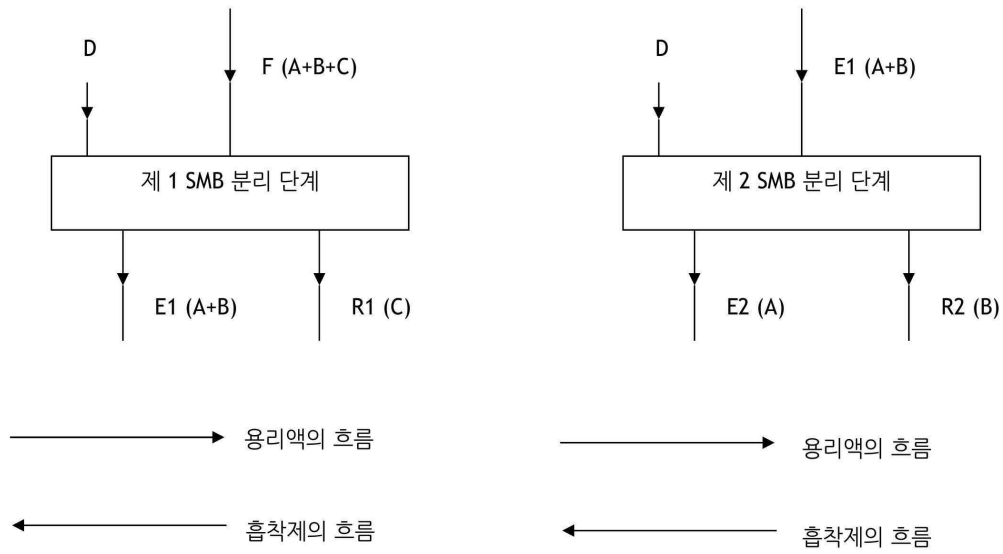
도면5



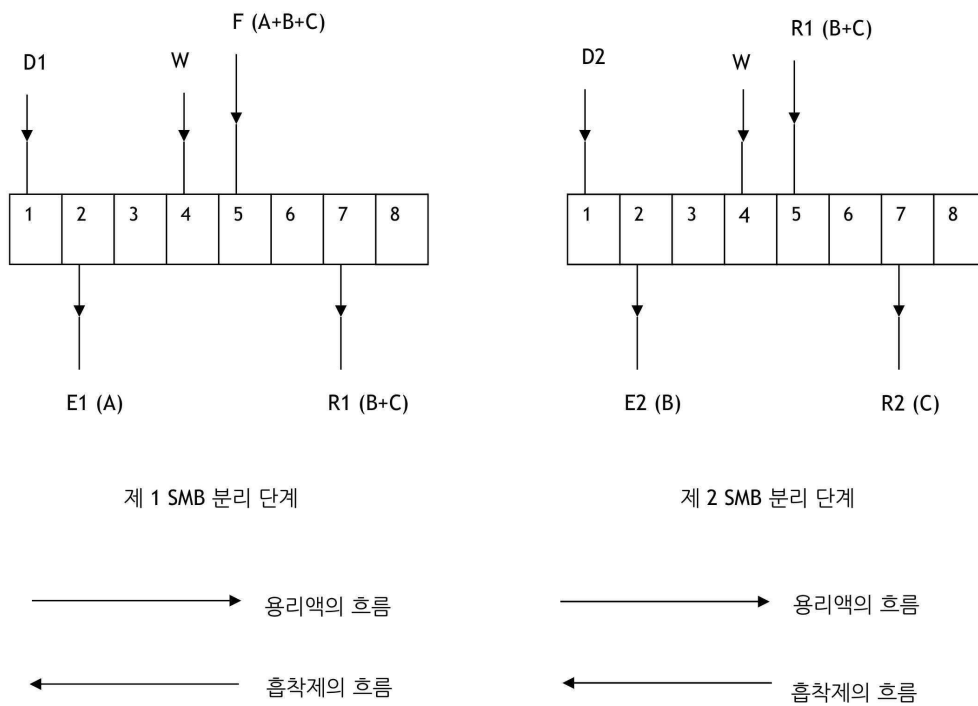
도면6



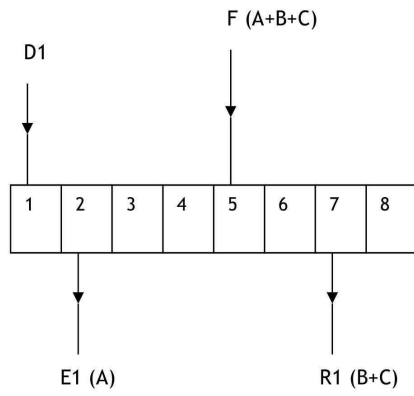
도면7



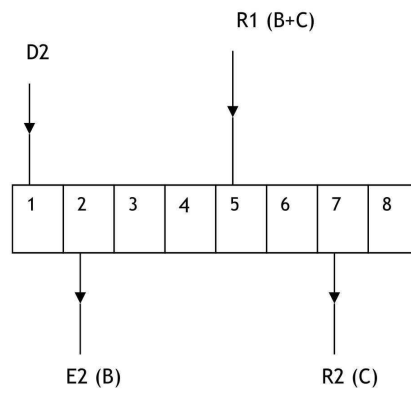
도면8



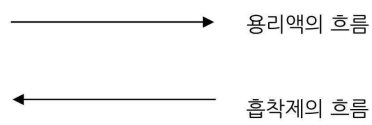
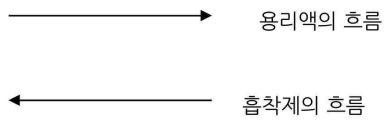
도면9



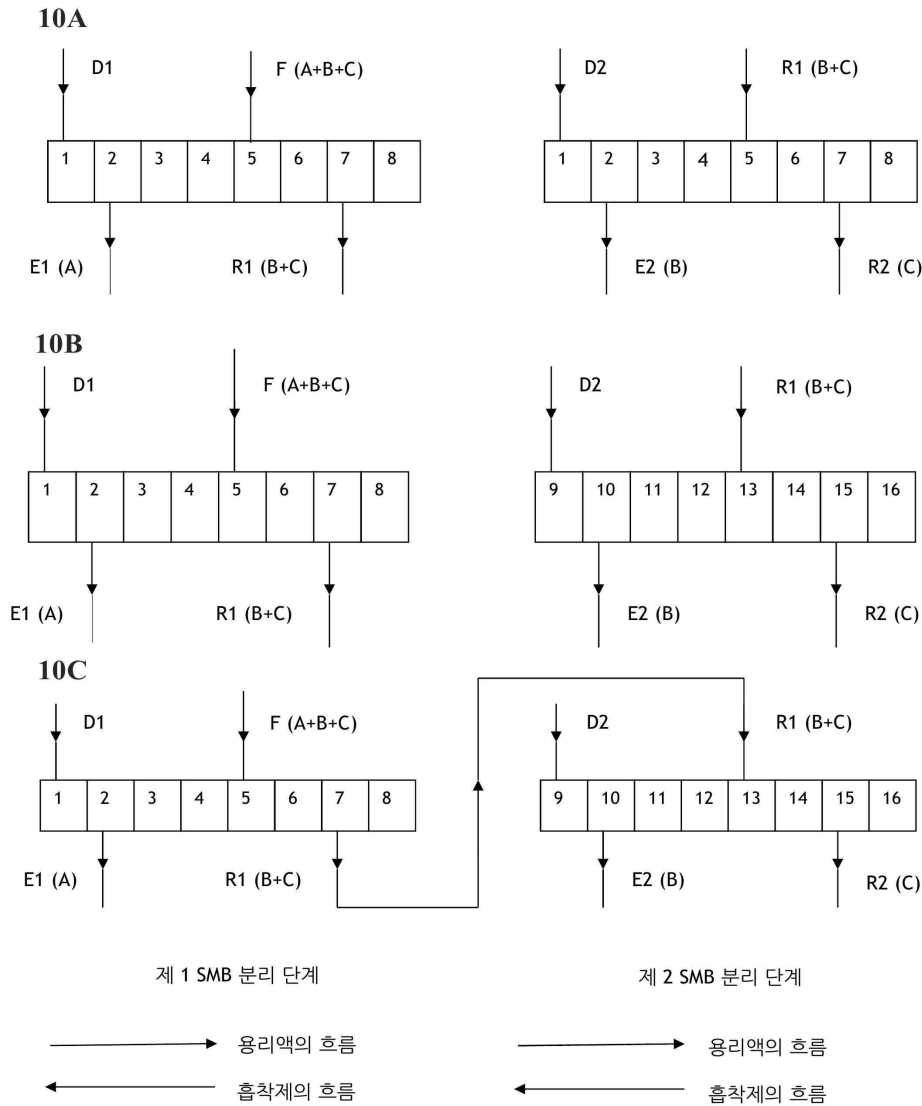
제 1 SMB 분리 단계



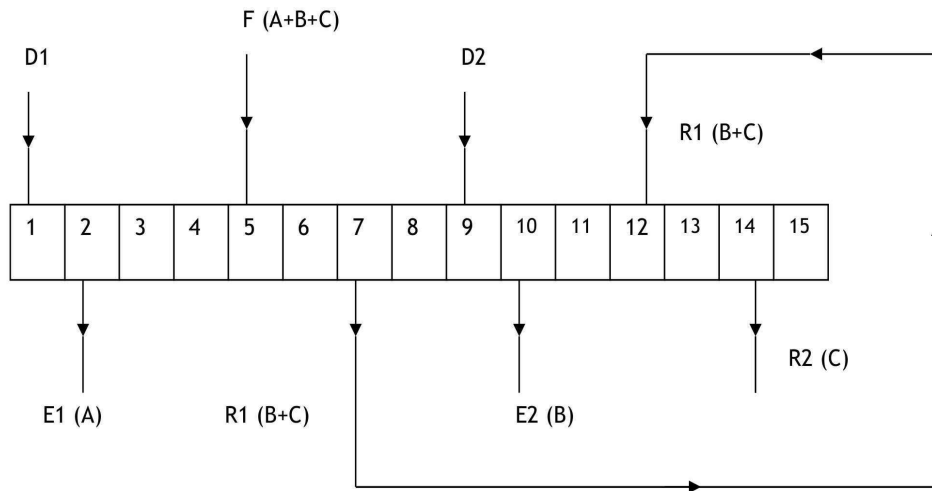
제 2 SMB 분리 단계



도면10



도면11

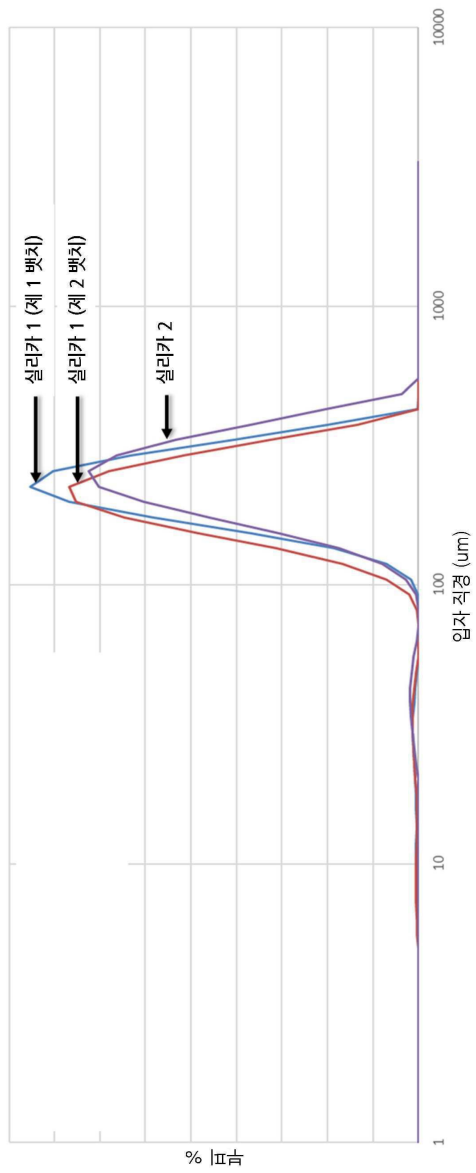


→ 용리액의 흐름

← 흡착제의 흐름

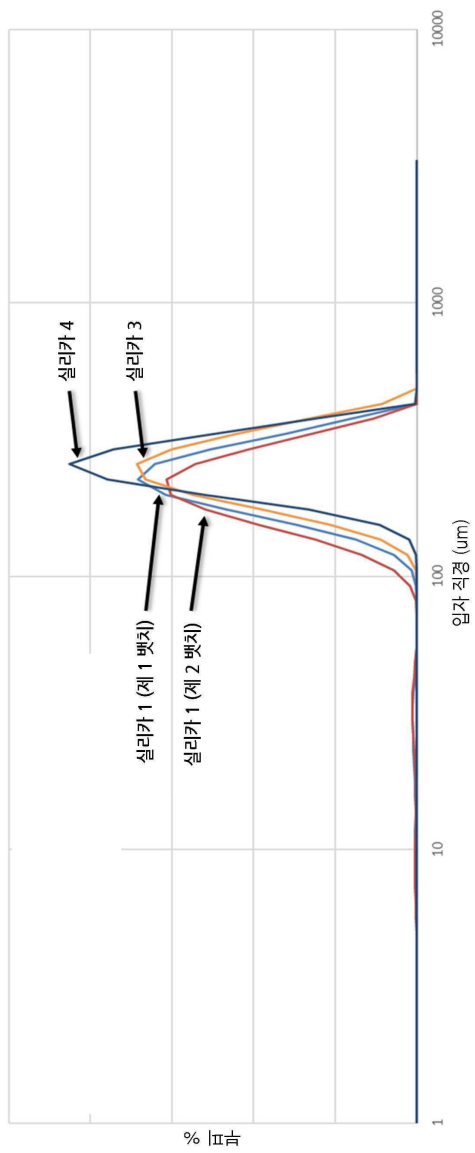
도면12a

12A

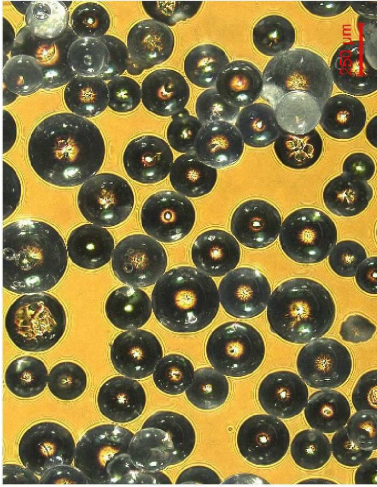


도면12b

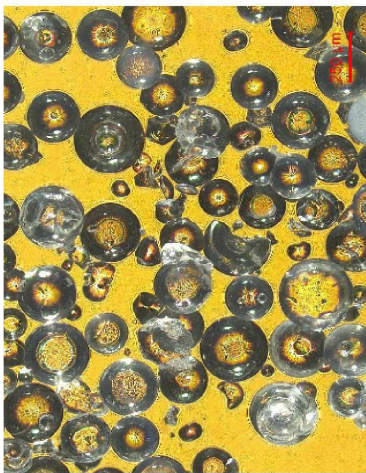
12B



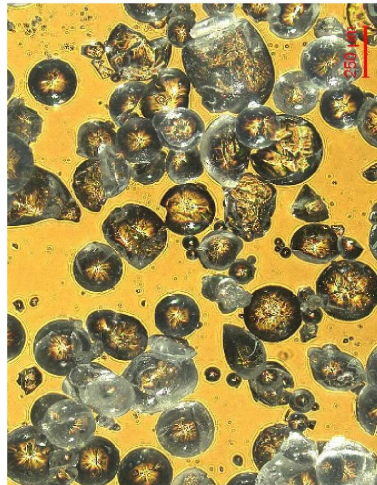
도면13



13C



13A



13B

도면14

