



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118414201 A

(43) 申请公布日 2024. 07. 30

(21) 申请号 202280083562.X

(22) 申请日 2022.12.16

(30) 优先权数据

21215675.6 2021.12.17 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/086458 2022.12.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/111317 EN 2023.06.22

(71) 申请人 巴斯夫欧洲公司

地址 德国路德维希港

(72) 发明人 P·萨戈梅斯 A·莫里森

J·F·比林 I·麦克阿瑟

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

专利代理师 王世娜

(51) Int.Cl.

B01D 15/18 (2006.01)

B01J 20/28 (2006.01)

B01J 20/283 (2006.01)

C11C 1/08 (2006.01)

C11B 3/10 (2006.01)

C07C 67/56 (2006.01)

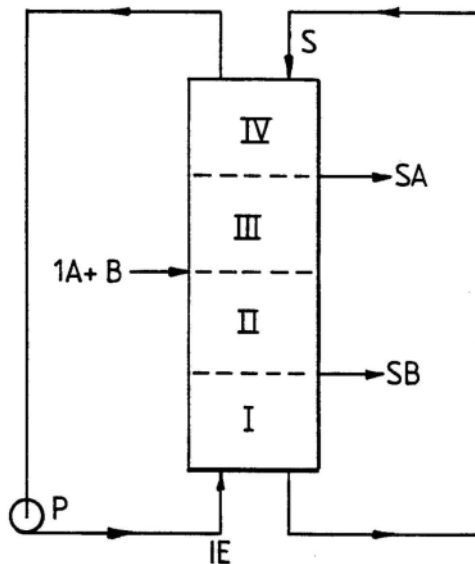
权利要求书2页 说明书43页 附图11页

(54) 发明名称

有效纯化多不饱和脂肪酸的色谱分离方法

(57) 摘要

本发明涉及用于纯化多不饱和脂肪酸 (PUFA) 产物及其衍生物的改进的色谱分离方法。特别地,本发明涉及一种特别有效的色谱分离方法,该方法使用具有特定物理特性的二氧化硅作为吸附剂相,用于从进料混合物中纯化PUFA或其衍生物。



1. 一种从进料混合物中回收多不饱和脂肪酸 (PUFA) 产物的色谱分离方法, 其包括将进料混合物引入色谱装置, 该色谱装置包括一个或多个色谱柱, 所述色谱柱包含:

- (a) 液体洗脱剂相, 其为含水有机溶剂; 和
- (b) 固体吸附剂相, 其为C18键合的二氧化硅,

其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于20巴, 从而导致所述进料混合物的纯化, 进一步地, 其中:

- (1) 所述二氧化硅具有230至270 μm 的平均粒径, 并且具有160 μm 或更大的Dv(10); 和/或
- (2) 所述二氧化硅具有15至24重量%的碳负载量; 和/或
- (3) 所述二氧化硅具有500 m^2/g 或更小的表面积。

2. 根据权利要求1所述的色谱分离方法, 其中所述二氧化硅具有15至24重量%的碳负载量, 并且:

- 所述二氧化硅具有230至270 μm 的平均粒径, 并且具有160 μm 或更大的Dv(10); 和/或
- 所述二氧化硅具有500 m^2/g 或更小的表面积。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的色谱分离方法, 其中所述二氧化硅230至270 μm , 优选240至260 μm 的平均粒径。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的色谱分离方法, 其中所述二氧化硅具有160 μm 或更大的Dv(10) 和/或225 μm 或更小的Dv(10), 优选地, 其中所述二氧化硅具有165 μm 或更大的Dv(10) 和/或215 μm 或更小的Dv(10)。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的色谱分离方法, 其中所述二氧化硅具有230至270 μm 的平均粒径和160至225 μm 的Dv(10), 优选地, 其中所述二氧化硅具有240至260 μm 的平均粒径和165至215 μm 的Dv(10)。

6. 根据权利要求1或3-5中任一项所述的色谱分离方法, 其中所述二氧化硅具有15-24重量%的碳负载量。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的色谱分离方法, 其中所述二氧化硅具有16至22重量%的碳负载量。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的色谱分离方法, 其中所述二氧化硅具有500 m^2/g 或更小的表面积和/或200 m^2/g 或更大的表面积, 优选地, 其中所述二氧化硅具有450 m^2/g 或更小的表面积和/或250 m^2/g 或更大的表面积。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的色谱分离方法, 其中所述二氧化硅:

- (a) 具有170 μm 或更大的Dv(10); 和/或
- (b) 具有250至260 μm 的平均粒径; 和/或
- (c) 具有17至18.5重量%的碳负载量; 和/或
- (d) 具有80至140 \AA 的孔径; 和/或
- (e) 具有0.7 kg/dm^3 或更小的堆积密度。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的色谱分离方法, 其中至少80体积%的二氧化硅颗粒具有200至500 μm 的直径。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的色谱分离方法, 其中所述含水有机溶剂是水与醇、醚、酯、酮或腈的混合物, 优选其中所述含水有机溶剂为水与甲醇的混合物或水与乙腈的混合物。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的色谱分离方法,其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于10巴,优选小于6巴。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的色谱分离方法,其中所述色谱装置是实际的或模拟的移动床(SMB)色谱装置。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的色谱分离方法,其中所述进料混合物是(i)天然或合成原料,其包括至少一种PUFA产物,优选鱼油原料、植物油原料、或衍生自微生物或真菌的原料,或(ii)部分纯化的原料,其包括至少一种从天然或合成原料的部分纯化获得的PUFA产物,

其中所述部分纯化的原料任选地通过结晶、分子蒸馏或分馏、尿素分馏、用硝酸银或其他金属盐溶液萃取、碘内酯化、超临界流体分馏或色谱法获得,优选通过固定床色谱法、或模拟或实际移动床色谱法获得。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的色谱分离方法,其中:

(a) 将所述进料混合物引入色谱装置导致所述进料混合物的纯化,以产生所述PUFA产物;或

(b) 将所述进料混合物引入所述色谱装置导致所述进料混合物的纯化,以产生中间产物,其中对所述中间产物进行进一步纯化以获得所述PUFA产物,优选地,其中在色谱装置中进行进一步纯化,更优选地,其中通过固定床色谱法、或模拟或实际移动床色谱法进行进一步纯化。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的色谱分离方法,其中所述PUFA产物包含PUFA或PUFA衍生物,其中所述衍生物为所述PUFA的甘油一酯、甘油二酯或甘油三酯、酯、磷脂、酰胺、内酯或盐,优选地,其中所述PUFA产物为 ω -3PUFA或 ω -3PUFA的衍生物,并且最优选地,其中:

(a) 所述PUFA产物是EPA或EPA衍生物,优选EPA的酯,更优选EPA乙酯;

(b) 所述PUFA产物是DHA或DHA衍生物,优选DHA的酯,更优选DHA乙酯。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的色谱分离方法,其中:

(a) 基于存在于所述进料混合物中的所述PUFA产物的总质量,从所述色谱分离方法获得的PUFA产物的产率大于80重量%,更优选大于90重量%,还更优选大于95重量%,最优选大于98重量%;和/或

(b) 所述PUFA产物以大于80重量%,优选大于85重量%,更优选大于90重量%,还更优选大于95重量%,再更优选大于97重量%,甚至更优选大于98重量%,最优选大于99重量%的纯度产生。

有效纯化多不饱和脂肪酸的色谱分离方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于纯化多不饱和脂肪酸(PUFA)产物及其衍生物的改进的色谱分离方法。具体地,本发明涉及一种特别有效的色谱分离方法,该方法使用具有特定物理特性的二氧化硅作为吸附剂相,用于从进料混合物中纯化PUFA或其衍生物。

背景技术

[0002] 脂肪酸,特别是PUFA及其衍生物是生物重要分子的前体,这些分子在调节生物功能如血小板聚集、炎症和免疫反应中发挥着重要作用。因此,PUFA及其衍生物可治疗性用于治疗广泛的病理状况,包括CNS状况;神经病,包括糖尿病性神经病;心血管疾病;一般免疫系统和炎症状况,包括炎症性皮肤病。

[0003] PUFA存在于天然原材料中,如植物油和海洋油。然而,这种PUFA经常与饱和脂肪酸和许多其他杂质混合存在于此类油中。因此,PUFA应在营养或药物使用之前进行纯化。

[0004] 不幸的是,PUFA极其脆弱。因此,当在氧气存在下加热时,它们容易发生异构化、过氧化和寡聚化。因此,对PUFA产物进行分馏和纯化以制备纯脂肪酸是困难的。蒸馏,即使在真空下,也可能导致不可接受的产品降解。

[0005] 色谱分离技术是本领域技术人员所熟知的。涉及固定床系统和模拟或实际移动床系统的色谱分离技术都是本领域的技术人员所熟悉的。

[0006] 在传统的固定床色谱系统中,其成分将被分离的混合物通过容器渗滤(peccolate)。容器通常是圆柱形的,并且通常被称为柱。该柱包含对流体具有高渗透性的多孔吸附性材料(通常称为固定相)的填料。混合物中每种组分的渗滤速度取决于该组分的物理性质,从而使组分连续且选择性地离开柱。因此,一些组分倾向于强烈地固定在固定相上,从而缓慢地渗滤,而另一些组分则倾向于较弱地固定并更快地离开柱。已经提出了许多不同的固定床色谱系统,并用于分析和工业生产目的。

[0007] 模拟和实际移动床色谱是本领域技术人员熟悉的已知技术。操作原理涉及液体洗脱剂(或解吸剂)相和固体吸附剂相的逆流移动。这种操作允许溶剂和特定吸附剂库存的最小使用,使该方法在经济上可行。这种分离技术已在不同领域找到了多种应用,包括碳氢化合物、工业化学品、油、糖和API。

[0008] 因此,模拟的移动床色谱装置由多个含有吸附剂的单独柱组成,这些柱串联在一起。使洗脱剂在第一方向上穿过柱。原料和洗脱剂的注入点以及系统中分离的组分收集点通过一系列阀门或单个多位置阀门周期性地移动。总体效果是模拟包含固体吸附剂移动床的单个柱的操作,固体吸附剂以与洗脱剂流逆流的方向移动。因此,模拟移动床系统由柱组成,与传统的固定床系统一样,柱包含固体吸附剂的固定床,洗脱剂通过该固定床,但在模拟移动床系统中,操作是模拟连续逆流移动床。

[0009] 一个典型的模拟移动床色谱装置如图1所示。模拟或实际移动床色谱分离过程的概念是通过考虑包含固定相S的垂直色谱柱来解释的,该色谱柱被划分为多个部分,更准确地说,被划分为从柱的底部到顶部的四个叠加的亚区I、II、III和IV。洗脱剂通过泵P在IE的

底部引入。待分离的组分A和B的混合物在亚区II和亚区III之间的IA+B处引入。主要含有B的萃取液在亚区I和亚区II之间的SB处收集,主要含有A的萃余液在亚区III和亚区IV之间的SA处收集。

[0010] 在模拟移动床系统的情况下,静止相S的模拟向下移动是由引入点和收集点相对于固相的移动引起的。在实际移动床系统的情况下,固定相S的模拟向下移动是由各种色谱柱相对于引入点和收集点的移动引起的。在图1中,洗脱剂向上流动,混合物A+B被注入子区II和子区III之间。组分将根据其与固定相的色谱相互作用而移动,例如在多孔介质上的吸附。对固定相表现出更强亲和力的组分B(运行较慢的组分)将更缓慢地被洗脱剂夹带,并将延迟地跟随洗脱剂。对固定相表现出较弱亲和力的组分A(运行较快的组分)将容易被洗脱剂夹带。如果正确地估计和控制了一组正确的参数,特别是每个子区中的流速,则对固定相表现出较弱亲和力的组分A将作为萃余液收集在子区III和子区IV之间,而对固定相显示出较强亲和力的组分B将作为萃取液收集在子区I和子区II之间。

[0011] 因此,可以理解,图1所示的传统模拟移动床系统仅限于二元分级分离。

[0012] 其他相关的、所谓的模拟移动床非常规操作模式的优点,如改进的SMB、顺序SMB、Varicol、Powerfeed、Modicon、MCSGP、出口摆动流OSS、JO或伪SMB等,是已知的,并且可以由技术专家从常规模拟移动床过程中得出,如在其他地方详述的(参见例如Sa Gomes and Rodrigues, *Chemical Engineering and Technology Special Issue: Preparative Chromatography and Downstream Processing*, 2012, 35(1), 17-34, 其内容通过引用整体并入本文)。用于模拟移动床色谱的方法和设备描述于若干专利中,包括US 2985589、US 3696107、US 3706812、US 3761533、FR-A-2103302、FR-A-2651148和FR-A-2651149,其全部通过引用并入本文。本主题也在Ganetsos和Barker编辑的“*Preparative and Production Scale Chromatography*”(Marcel Dekker Inc, New York, 1993)中进行了详细论述,其全部内容通过引用并入本文。

[0013] 实际移动床系统在操作上类似于模拟移动床系统。然而,不是通过阀系统或单个多位置阀来移动进料混合物和洗脱剂的注入点以及分离的组分收集点,而是一系列吸附单元(即柱)相对于进料点和排出点进行物理移动。同样,操作是为了模拟连续逆流移动床。

[0014] 在包括US 6979402、US 5069883和US 4764276在内的多个专利中描述了用于实际移动床色谱的方法和设备,其全部通过引用并入本文。

[0015] PUFA产物的纯化尤其具有挑战性。因此,用于制备PUFA产物的许多合适的原料是极其复杂的混合物,其包含在色谱装置中具有非常相似的保留时间的大量不同组分。因此,很难将某些PUFA从这种原料中分离出来。然而,需要高纯度的PUFA产物,特别是用于药物和营养品应用。因此,历史上,当需要高纯度PUFA产物时,已经使用蒸馏。然而,如上所述,使用蒸馏作为精细PUFA的分离技术存在显著的缺点。

[0016] 公开的国际专利申请WO 2011/080503(其全部内容通过引用并入本文)公开了一种SMB分离方法,该方法用于从进料混合物中高效且高纯度地回收PUFA产物。在WO 2013/005046、WO 2013/005047、WO 2013/005488、WO 2013/0005051、WO 2013/005052和WO 2014/10686中描述了该特定设置的调整,所有这些都通过引用并入本文。然而,已经发现,当在低压(即,小于20巴,优选小于10巴)下操作时,在这种色谱系统中经常需要大体积的洗脱剂。这与高效液相色谱(HPLC)系统形成对比,该系统通常在更高的压力(即20-100巴)下运行,

并且能够以高生产率和所需溶剂的低稀释度(即量)从进料混合物中萃取PUFA产物。

[0017] 然而,在高压下操作在大规模商业过程中有几个缺点。特别是,色谱柱中的固定相(如二氧化硅)受到增加的应力,必须更频繁地更换。

[0018] 因此,需要提供一种更有效的色谱分离方法,用于在低操作压力下从进料混合物中纯化PUFA产物,从而萃取PUFA产物所需的洗脱剂更少。

发明内容

[0019] 本发明人惊奇地发现,使用具有特定物理特性的二氧化硅吸附剂相在低压下操作的同时,可以增强代表典型的含有PUFA的原料中不同PUFA产物的峰的分辨率。峰之间的这种增强的分辨率导致更有效的分离,需要更低的洗脱剂稀释度。甚至已经发现,与使用HPLC方法相比,可以实现更低的洗脱剂稀释度,同时也实现了可接受的(相对而言,令人惊讶的好)生产率水平。

[0020] 因此,本发明提供了一种从进料混合物中回收多不饱和脂肪酸(PUFA)产物的色谱分离方法,该方法包括将进料混合物引入色谱装置,该色谱装置包括一个或多个色谱柱,该色谱柱包含:

[0021] (a) 液体洗脱剂相,其为含水有机溶剂;和

[0022] (b) 固体吸附剂相,其为C18键合的二氧化硅,

[0023] 其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于20巴,

[0024] 从而导致所述进料混合物的纯化,进一步其中:

[0025] (1) 所述二氧化硅具有230至270 μm 的平均粒径,并且具有160 μm 或更大的Dv(10);和/或

[0026] (2) 所述二氧化硅具有15至24重量%的碳负载量;和/或

[0027] (3) 所述二氧化硅具有500 m^2/g 或更小的表面积。

[0028] 在一个特定的实施方案中,本发明提供了一种用于从进料混合物中回收多不饱和脂肪酸(PUFA)产物的色谱分离方法,该方法包括将进料混合物引入色谱装置中,该色谱装置包括一个或多个色谱柱,该色谱柱包含:

[0029] (a) 液体洗脱剂相,其为含水有机溶剂;和

[0030] (b) 固体吸附剂相,其为碳负载量为15至24重量%的C18键合二氧化硅,

[0031] 其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于20巴,

[0032] 从而导致所述进料混合物的纯化,并且进一步其中:

[0033] (1) 所述二氧化硅具有230至270 μm 的平均粒径,并且具有160 μm 或更大的Dv(10);和/或

[0034] (2) 所述二氧化硅具有500 m^2/g 或更小的表面积。

附图说明

[0035] 图1说明了用于分离二元混合物的模拟或实际移动床过程的基本原理。

[0036] 图2说明了色谱分离步骤,该步骤包括两个模拟或实际的移动床过程,以将EPA与运行较快和较慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0037] 图3说明了色谱分离步骤,该步骤包括两个模拟或实际的移动床过程,以将DHA与

运行更快和更慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0038] 图4说明了色谱分离步骤,该步骤包括两个模拟或实际的移动床过程,以将EPA与运行更快和更慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0039] 图5说明了色谱分离步骤,该步骤包括两个模拟或实际的移动床过程,以将DHA与运行更快和更慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0040] 图6说明了色谱分离步骤,该步骤包括两个模拟或实际的移动床过程,以将EPA与运行更快和更慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0041] 图7说明了色谱分离步骤,该步骤包括两个模拟或实际的移动床过程,以将DHA与运行更快和更慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0042] 图8说明了色谱分离步骤,该步骤包括两个模拟或实际的移动床过程,以将EPA与运行更快和更慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0043] 图9说明了色谱分离步骤,该步骤包括两个模拟或实际的移动床过程,以将EPA与运行更快和更慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0044] 图10说明了色谱分离步骤的三种方式,该步骤包括可以进行两个模拟或实际的移动床过程。

[0045] 图11说明了色谱分离步骤,用于将EPA与运行速度更快和较慢的杂质(即极性更强和极性更低的杂质)分离。

[0046] 图12说明了不同C18二氧化硅类型的二氧化硅样品对颗粒体积的总贡献,作为颗粒直径的函数。(A)二氧化硅1(参考二氧化硅),两个单独的批次,和二氧化硅2。(B)二氧化硅1(参考二氧化硅),两个单独的批次,以及二氧化硅3和4。

[0047] 图13说明了以下物质的扫描电子显微镜图像:(A)二氧化硅1;(B)二氧化硅2;和(C)二氧化硅4。

[0048] 图14说明了脉冲测试,以显示在使用不同二氧化硅的色谱柱中纯化含有EPA的原料期间EPA峰的不对称性。

具体实施方式

[0049] 在最一般的意义上,本发明提供了一种用于从进料混合物中回收多不饱和脂肪酸(PUFA)产物的色谱分离方法,该方法包括将进料混合物引入色谱装置中,该色谱装置包括一个或多个色谱柱,所述色谱柱包含:

[0050] (a) 液体洗脱剂相,其为含水有机溶剂;和

[0051] (b) 固体吸附剂相,其为C18键合的二氧化硅,

[0052] 其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于20巴,

[0053] 从而导致进料混合物的纯化。

[0054] 固体吸附剂相

[0055] 固体吸附剂相通常是反相二氧化硅。固体吸附剂相通常是C18键合的硅胶。优选地,固体吸附剂相是反相C18键合的硅胶。吸附剂相通常是非极性的。

[0056] 色谱装置包括一个或多个色谱柱,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个柱。在一些实施方案中,柱的数量通常是一个。在其他实施方案中,柱的数量通常多于一个,优选4个或更多,更优选6个或更多、甚至更优选8个或更多(例如,4、5、6、7、8、9或10个柱)。通常,不多于

25个柱,优选不多于20个,更优选不多于15个。当使用多于一个色谱柱时,每个色谱柱可含有相同或不同的吸附剂。通常,当使用多于一个色谱柱时,每个柱都含有相同的吸附剂。

[0057] 固体吸附剂相材料的形状可以是,例如,球形或非球形珠,优选基本上球形的珠。

[0058] C18键合的二氧化硅具有特定的物理特性。

[0059] 在本发明的第一个实施方案中,C18键合的二氧化硅的平均粒径为230至270 μm , $D_v(10)$ 为160 μm 或更大。

[0060] 在本发明的第二个实施方案中,C18键合的二氧化硅具有15-24重量%的碳负载量。

[0061] 在本发明的第三个实施方案中,C18键合的二氧化硅具有500 m^2/g 或更小的表面积。

[0062] 已经发现二氧化硅的这些特定物理特性中的每一个都导致在分离含有PUFA的原料时不同峰之间的分辨率增加,其中每个峰对应于不同的PUFA产物。这反过来允许以高产率更有效地纯化所需PUFA产物,同时使用更少的溶剂。这种溶剂使用的减少对于在工业规模上进行的分离来说更具成本效益,并且更环境友好。此外,在使用相对较大的二氧化硅颗粒的同时实现这些优点的能力使得能够在系统中使用较低压力的洗脱剂。这在设备的成本节约和寿命以及固体吸附剂相必须更换的频率降低方面具有额外的优点。

[0063] 因此,在第一个实施方案中,本发明提供了一种从进料混合物中回收多不饱和脂肪酸(PUFA)产物的色谱分离方法,该方法包括将进料混合物引入色谱装置中,该色谱装置包括一个或多个色谱柱,该色谱柱包含:

[0064] (a) 液体洗脱剂相,其为含水有机溶剂;和

[0065] (b) 固体吸附剂相,其为平均粒径为230至270 μm 且 $D_v(10)$ 为160 μm 或更大的C18键合的二氧化硅,

[0066] 其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于20巴,

[0067] 从而导致进料混合物的纯化。

[0068] 如本文所定义,“平均粒径”是指颗粒的体积矩平均值(也称为 $D[4,3]$ 、体积加权平均直径或De Brouckere平均直径)。 $D_v(10)$ 是指二氧化硅颗粒的累积体积分布相对于增加的颗粒直径的图中颗粒直径的第10个百分位。体积矩平均值对样品中存在的粗颗粒(即大尺寸颗粒)的数量特别敏感,并且 $D_v(10)$ 值对样品中出现的细颗粒(即小尺寸颗粒)数量特别敏感。因此,体积矩平均值和 $D_v(10)$ 值合在一起表示二氧化硅的平均粒径和粒径分布的有效表征。

[0069] 体积矩平均值和 $D_v(10)$ 通常通过激光衍射测量,例如使用标准方法ISO 13320:2020。激光衍射的细节例如在<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/laser-diffraction>(2021年3月15日访问)讨论,其内容通过引用整体并入本文。

[0070] 优选的是,平均粒径相当大,从而可以在色谱分离中使用低压。然而,同样优选的是,颗粒尺寸分布窄,因为令人惊讶地发现,这在纯化含有PUFA的原料时提高了不同PUFA峰之间的分辨率,使得能够在分离中使用更少的洗脱剂。特别是,令人惊讶地发现,从二氧化硅样品中减少或消除特别细的颗粒(即具有小直径的颗粒)的“尾部”导致PUFA峰之间的分辨率增加。因此,发现合理高的平均粒径、高的 $D_v(10)$ 值以及平均粒径与 $D_v(10)$ 值之间的相

对小的差异都是本实施方案中使用的二氧化硅的期望特性。

[0071] 因此,在第一实施方案中,平均粒径优选为235至265 μm ,更优选为240至260 μm ,还更优选为245至260 μm ,最优选为250至260 μm 。

[0072] 在第一实施方案中,二氧化硅的 $D_v(10)$ 优选为165 μm 或更大,更优选为170 μm 或更大,甚至更优选为175 μm 或更大,还更优选为180 μm 或更大,最优选为185 μm 或更大。通常,二氧化硅的 $D_v(10)$ 为225 μm 或更小,优选220 μm 或更小,更优选215 μm 或更小,最优选210 μm 或更小。因此,通常,二氧化硅的 $D_v(10)$ 为160至225 μm ,优选165至220 μm ,更优选175至215 μm ,最优选185至210 μm 。

[0073] 因此,在第一实施方案中,二氧化硅优选地具有235至265 μm 的平均粒径和165 μm 或更大的 $D_v(10)$,并且更优选地具有240至260 μm 的平均粒径和175 μm 或更大的 $D_v(10)$,并且甚至更优选地,二氧化硅具有245至260 μm 的平均粒径和180 μm 或更大的 $D_v(10)$ 。并且最优选地,所述二氧化硅具有250至260 μm 的平均粒径和185 μm 或更大的 $D_v(10)$ 。

[0074] 因此,在第一实施方案中,二氧化硅优选地具有235至265 μm 的平均粒径和225 μm 或更小的 $D_v(10)$,并且更优选地具有240至260 μm 的平均粒径和220 μm 或更小的 $D_v(10)$,甚至更优选地具有245至260 μm 的平均粒径和215 μm 或更小的 $D_v(10)$,并且最优选地具有250至260 μm 的平均粒径和210 μm 或更小的 $D_v(10)$ 。

[0075] 因此,在第一实施方案中,二氧化硅优选地具有235至265 μm 的平均粒径和165至225 μm 的 $D_v(10)$,并且更优选地具有240至260 μm 的平均粒径和175至220 μm 的 $D_v(10)$,甚至更优选具有245至260 μm 的平均粒径和180至215 μm 的 $D_v(10)$,并且最优选具有250至260 μm 的平均粒径和185至210 μm 的 $D_v(10)$ 。

[0076] 在第一实施方案中,二氧化硅通常具有15至24重量%,优选16至22重量%,更优选16.5至20重量%,还更优选17至19.5重量%,最优选17.5至19重量%,例如17.5至18重量%的碳负载量(%C)。碳负载量是作为碳的固体吸收相的百分比的量度。通常,基本上所有的碳含量都来源于二氧化硅颗粒的C18官能化。

[0077] 二氧化硅颗粒的碳负载量通常通过燃烧分析来测量,例如通过使用标准ISO 21068-2或其变型中描述的类型的方法,或通过使用Nguyen et al. (Science and Technology Development Journal, 2016, 19(4), 162-166)的方法,其通过引用整体并入本文。

[0078] 在第一实施方案中,二氧化硅通常具有小于500 m^2/g ,优选小于450 m^2/g ,更优选小于400 m^2/g ,最优选小于350 m^2/g 的表面积。二氧化硅通常具有大于100 m^2/g 、优选大于150 m^2/g 、更优选大于200 m^2/g 、还更优选大于250 m^2/g 、最优选大于300 m^2/g 的表面积。因此,二氧化硅通常的表面积为100至500 m^2/g 、优选200至450 m^2/g 、更加优选250至400 m^2/g 、以及最优选300至350 m^2/g 。

[0079] 二氧化硅颗粒的表面积通常通过BET表面积分析来测量,例如通过使用标准方法ISO 9277:2010。在该方法中,表面积是使用BET理论(Brunauer, Emmett和Teller)从吸附数据中确定的,通常是从氮吸附中确定的。测量表面积的BET方法已在Lowell, Shields, Thomas and Thommes, Springer, Dordrecht, 2006 (pub: Springer)的“Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density”中进行了详细描述,其全文通过引用并入本文。

[0080] 本上下文中的表面积是指二氧化硅表面,并且在C18键键合之前在裸二氧化硅上测量。

[0081] 在第二个实施方案中,本发明提供了一种从进料混合物中回收多不饱和脂肪酸(PUFA)产物的色谱分离方法,该方法包括将进料混合物引入色谱装置,该色谱装置包括一个或多个色谱柱,该色谱柱包含:

[0082] (a) 液体洗脱剂相,其为含水有机溶剂;和

[0083] (b) 固体吸附剂相,其为碳负载量为15至24重量%的C18键合的二氧化硅,

[0084] 其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于20巴,

[0085] 从而导致进料混合物的纯化。

[0086] 本发明人惊奇地发现,在从进料混合物中分离PUFA产物的过程中,无论二氧化硅是否包括较小颗粒的“尾部”(即,无论Dv(10)值是否低于上述第一实施方案中所述),碳负载量在该范围内的二氧化硅都提供了PUFA峰之间的提高的分辨率。

[0087] 在第二实施方案中,二氧化硅的碳负载量优选为16至22重量%,更优选为16.5至20重量%,还更优选为17至19重量%,最优选为17.5至18重量%,例如约17.8重量%或17.9重量%。通常,基本上所有的碳含量都来源于二氧化硅颗粒的C18官能化。

[0088] 二氧化硅颗粒的碳负载量通常如上文关于第一实施方案所述进行测量。

[0089] 在第二个实施方案中,通常平均粒径为230至270 μm ,优选235至265 μm ,更优选240至260 μm ,还更优选245至260 μm ,最优选250至260 μm 。

[0090] 在第二实施方案中,二氧化硅的Dv(10)值通常为160 μm 或更大,优选165 μm 或更大,更优选170 μm 或更大,甚至更优选175 μm 或更大,还更优选180 μm 或更大,最优选185 μm 或更大。通常,二氧化硅的Dv(10)为225 μm 或更小,优选220 μm 或更小,更优选215 μm 或更小,最优选210 μm 或更小。因此,通常,二氧化硅的Dv(10)为160至225 μm ,优选165至220 μm ,更优选175至215 μm ,最优选185至210 μm 。

[0091] 因此,在第二实施方案中,二氧化硅通常具有230至270 μm 的平均粒径和160 μm 或更大的Dv(10),并且优选地具有235至265 μm 的平均粒径和165 μm 或更大的Dv(10),并且更优选地具有240至260 μm 的平均粒径和175 μm 或更大的Dv(10),并且甚至更优选地,具有245至260 μm 的平均粒径和180 μm 或更大的Dv(10),并且最优选地具有250至260 μm 的平均粒直径和185 μm 或更大的Dv(10)。

[0092] 因此,在第二个实施方案中,二氧化硅通常具有230至270 μm 的平均粒径和225 μm 或更小的Dv(10),并且优选地具有235至265 μm 的平均粒径和225 μm 或更小的Dv(10),更优选具有240至260 μm 的平均粒径和220 μm 或更小的Dv(10),并且甚至更优选具有245至260 μm 的平均粒径和215 μm 或更小的Dv(10),并且最优选具有250至260 μm 的平均粒径和210 μm 或更小的Dv(10)。

[0093] 因此,在第二个实施方案中,二氧化硅通常具有230至270 μm 的平均粒径和160至225 μm 的Dv(10),优选地具有235至265 μm 的平均粒径和165至225 μm 的Dv(10),更优选具有240至260 μm 的平均粒径和175至220 μm 的Dv(10),并且甚至更优选具有245至260 μm 的平均粒径和180至215 μm 的Dv(10),并且最优选具有250至260 μm 的平均粒径和185至210 μm 的Dv(10)。

[0094] 平均粒径和Dv(10)值都典型地如以上关于第一实施方案所述进行测量。

[0095] 在第二个实施方案中,二氧化硅通常具有小于 $500\text{m}^2/\text{g}$,优选地小于 $450\text{m}^2/\text{g}$,更优选地小于 $400\text{m}^2/\text{g}$,最优选地小于 $350\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积。二氧化硅通常具有大于 $100\text{m}^2/\text{g}$ 、优选地大于 $150\text{m}^2/\text{g}$ 、更优选地大于 $200\text{m}^2/\text{g}$ 、还更优选地大于 $250\text{m}^2/\text{g}$ 、最优选地大于 $300\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积。因此,二氧化硅的表面积通常为 $100-500\text{m}^2/\text{g}$,优选 $200-450\text{m}^2/\text{g}$,更优选 $250-400\text{m}^2/\text{g}$,最优选 $300-350\text{m}^2/\text{g}$ 。

[0096] 二氧化硅颗粒的表面积通常如上文关于第一实施方案所述进行测量。

[0097] 在第三个实施方案中,本发明提供了一种从进料混合物中回收多不饱和脂肪酸(PUFA)产物的色谱分离方法,该方法包括将进料混合物引入色谱装置,该色谱装置包括一个或多个色谱柱,该色谱柱包含:

[0098] (a) 液体洗脱剂相,其为含水有机溶剂;和

[0099] (b) 固体吸附剂相,其为表面积为 $500\text{m}^2/\text{g}$ 或更小的C18键合的二氧化硅,

[0100] 其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于20巴,

[0101] 从而导致进料混合物的纯化。

[0102] 本发明人惊奇地发现,表面积在此范围内的二氧化硅在从进料混合物中分离PUFA产物时提供了PUFA峰之间的提高的分辨率。

[0103] 在第三个实施方案中,二氧化硅优选地具有小于 $450\text{m}^2/\text{g}$ 、更优选地小于 $400\text{m}^2/\text{g}$ 、最优选地小于 $350\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积。二氧化硅通常具有大于 $100\text{m}^2/\text{g}$ 、优选地大于 $150\text{m}^2/\text{g}$ 、更加优选地大于 $200\text{m}^2/\text{g}$ 、仍然更优选地大于 $250\text{m}^2/\text{g}$ 、并且最优选地大于 $300\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积。因此,二氧化硅通常具有从 100 至 $500\text{m}^2/\text{g}$,优选地从 200 至 $450\text{m}^2/\text{g}$,更优选地从 250 至 $400\text{m}^2/\text{g}$,以及最优选地从 300 至 $350\text{m}^2/\text{g}$ 的表面积。

[0104] 二氧化硅颗粒的表面积通常如上文关于第一实施方案所述进行测量。

[0105] 在第三个实施方案中,通常平均粒径为 230 至 $270\mu\text{m}$,优选 235 至 $265\mu\text{m}$,更优选 240 至 $260\mu\text{m}$,还更优选 245 至 $260\mu\text{m}$,最优选 250 至 $260\mu\text{m}$ 。

[0106] 在第三个实施方案中,二氧化硅的 $D_v(10)$ 值通常为 $160\mu\text{m}$ 或更大,优选 $165\mu\text{m}$ 或更大,更优选 $170\mu\text{m}$ 或更大,甚至更优选 $175\mu\text{m}$ 或更大,还更优选 $180\mu\text{m}$ 或更大,最优选 $185\mu\text{m}$ 或更大。通常,二氧化硅的 $D_v(10)$ 为 $225\mu\text{m}$ 或更小,优选 $220\mu\text{m}$ 或更小,更优选 $215\mu\text{m}$ 或更小,最优选 $210\mu\text{m}$ 或更少。因此,通常,二氧化硅的 $D_v(10)$ 为 160 至 $225\mu\text{m}$,优选 170 至 $220\mu\text{m}$,更优选 180 至 $215\mu\text{m}$,最优选 185 至 $210\mu\text{m}$ 。

[0107] 因此,在第三个实施方案中,二氧化硅通常具有 230 至 $270\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $160\mu\text{m}$ 或更大的 $D_v(10)$,并且优选地具有 235 至 $265\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $165\mu\text{m}$ 或更大的 $D_v(10)$,并且更优选地具有 240 至 $260\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $175\mu\text{m}$ 或更大的 $D_v(10)$,并且甚至更优选地,具有 245 至 $260\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $180\mu\text{m}$ 或更大的 $D_v(10)$,最优选地,具有 250 至 $260\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $185\mu\text{m}$ 或更大的 $D_v(10)$ 。

[0108] 因此,在第三个实施方案中,二氧化硅通常具有 230 至 $270\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $225\mu\text{m}$ 或更小的 $D_v(10)$,并且优选地具有 235 至 $265\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $225\mu\text{m}$ 或更小的 $D_v(10)$,更优选具有 240 至 $260\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $220\mu\text{m}$ 或更小的 $D_v(10)$,并且甚至更优选具有 245 至 $260\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $215\mu\text{m}$ 或更小的 $D_v(10)$,并且最优选具有 250 至 $260\mu\text{m}$ 的平均粒径和 $210\mu\text{m}$ 或更小的 $D_v(10)$ 。

[0109] 因此,在第三个实施方案中,二氧化硅通常具有 230 至 $270\mu\text{m}$ 的平均粒径和 160 至

225 μm 的Dv (10), 优选地具有235至265 μm 的平均粒径和165至225 μm 的Dv (10), 更优选具有240至260 μm 的平均粒径和175至220 μm 的Dv (10), 并且甚至更优选具有245至260 μm 的平均粒径和180至215 μm 的Dv (10), 并且最优选具有250至260 μm 的平均粒径和185至210 μm 的Dv (10)。

[0110] 平均粒径和Dv (10) 值都典型地如以上关于第一实施方案所述进行测量。

[0111] 在第三实施方案中, 二氧化硅的碳负载量(%C) 通常为15至24重量%, 优选16至22重量%, 更优选16.5至20重量%, 还更优选17至19重量%, 最优选17.5至18重量%, 例如约17.8重量%或17.9重量%。通常, 基本上所有的碳含量都来源于二氧化硅颗粒的C18官能化。

[0112] 二氧化硅颗粒的碳负载量通常如上文关于第一实施方案所述进行测量。

[0113] 在优选实施方案中, 除了第一和/或第三实施方案的特征之外, 二氧化硅还具有第二实施方案的特征。因此, 在该优选实施方案中, 本发明提供了一种从进料混合物中回收多不饱和脂肪酸(PUFA) 产物的色谱分离方法, 该方法包括将进料混合物引入色谱装置中, 该色谱装置包括一个或多个色谱柱, 该色谱柱包含:

[0114] (a) 液体洗脱剂相, 其为含水有机溶剂; 和

[0115] (b) 固体吸附剂相, 其为碳负载量为15至24重量%的C18键合的二氧化硅,

[0116] 其中所述一个或多个色谱柱内的压力小于20巴,

[0117] 从而导致所述进料混合物的纯化, 并且进一步其中:

[0118] (1) 二氧化硅的平均粒径为230至270 μm , Dv (10) 为160 μm 或更大; 和/或

[0119] (2) 二氧化硅的表面积为500 m^2/g 或更小。

[0120] 在该优选实施方案中, 二氧化硅可以具有第一和第二实施方案的特征。因此, 二氧化硅的平均粒径通常为230至270 μm , Dv (10) 为160 μm 或更大, 碳负载量为15至24重量%。优选地, 二氧化硅的平均粒径为235至265 μm , Dv (10) 为165 μm 或更大, 碳负载量为16至22重量%。更优选地, 二氧化硅的平均粒径为240至260 μm , Dv (10) 为175 μm 或更大, 碳负载量为16.5至20重量%。更优选地, 二氧化硅的平均粒径为245至260 μm , Dv (10) 为180 μm 或更大, 碳负载量为17至19重量%。最优选地, 二氧化硅的平均粒径为250至260 μm , Dv (10) 为185 μm 或更大, 碳负载量为17.5至18.0重量%。

[0121] 在二氧化硅具有第一和第二实施方案的特征的该优选实施方案中, 二氧化硅通常具有230至270 μm 的平均粒径和225 μm 或更小的Dv (10), 以及15至24重量%的碳负载量。优选地, 二氧化硅的平均粒径为235至265 μm , Dv (10) 为225 μm 或更小, 碳负载量为16至22重量%。更优选地, 二氧化硅的平均粒径为240至260 μm , Dv (10) 为220 μm 或更小, 碳负载量为16.5至20重量%。更优选地, 二氧化硅的平均粒径为245至260 μm , Dv (10) 为215 μm 或更小, 碳负载量为17至19重量%。最优选地, 二氧化硅的平均粒径为250至260 μm , Dv (10) 为210 μm 或更小, 碳负载量为17.5至18.0重量%。

[0122] 在二氧化硅具有第一和第二实施方案的特征的该优选实施方案中, 二氧化硅通常具有230至270 μm 的平均粒径和160至225 μm 的Dv (10), 以及15至24重量%的碳负载量。优选地, 二氧化硅的平均粒径为235至265 μm , Dv (10) 为165至225 μm , 碳负载量为16至22重量%。更优选地, 二氧化硅的平均粒径为240至260 μm , Dv (10) 为175至220 μm , 碳负载量为16.5至20重量%。更优选地, 二氧化硅的平均粒径为245至260 μm , Dv (10) 为180至215 μm , 碳负载量为

17至19重量%。最优选地,二氧化硅的平均粒径为250至260 μm ,Dv(10)为185至210 μm ,碳负载量为17.5至18.0重量%。

[0123] 备选地,在该优选实施方案中,所述二氧化硅具有第二和第三实施方案的特征。因此,二氧化硅通常具有15至24重量%的碳负载量和小于500 m^2/g 的总表面积。优选地,所述二氧化硅具有16至22重量%的碳负载量,和小于450 m^2/g 的总表面积。更优选地,所述二氧化硅具有16.5至20重量%的碳负载量和小于400 m^2/g 的总表面积。更优选的是,所述二氧化硅具有17至19重量%的碳负载量,和小于400 m^2/g 的总表面积。最优选地,所述二氧化硅具有17.5至18.0重量%的碳负载量,和小于350 m^2/g 的总表面积。

[0124] 在二氧化硅具有第二和第三实施方案的特征的该优选实施方案中,通常二氧化硅具有15至24重量%的碳负载量和大于100 m^2/g 的总表面积。优选地,二氧化硅具有16至22重量%的碳负载量和大于150 m^2/g 的总表面积。更优选地,所述二氧化硅具有16.5至20重量%的碳负载量,和大于200 m^2/g 的总表面积。还更优选地,二氧化硅具有17至19重量%的碳负载量和大于250 m^2/g 的总表面积。最优选地,该二氧化硅具有17.5至18.0重量%的碳负载量和大于300 m^2/g 的总表面积。

[0125] 在二氧化硅具有第二和第三实施方案的特征的该优选实施方案中,通常二氧化硅具有15至24重量%的碳负载量和100至500 m^2/g 的总表面积。优选地,二氧化硅具有16至22重量%的碳负载量和150至450 m^2/g 的总表面积。更优选地,所述二氧化硅具有16.5至20重量%的碳负载量和200至450 m^2/g 的总表面积。更优选的是,所述二氧化硅具有17至19重量%的碳负载量,和250至400 m^2/g 的总表面积。最优选地,所述二氧化硅具有17.5至18.0重量%的碳负载量,和300至350 m^2/g 的总表面积。

[0126] 在一个特别优选的实施方案中,二氧化硅具有第一、第二和第三实施方案的所有特征。因此,在该特别优选的实施方案中,二氧化硅通常具有230至270 μm 的平均粒径和160 μm 或更大的Dv(10),15至24重量%的碳负载量,以及小于500 m^2/g 的总表面积。优选地,二氧化硅的平均粒径为235至265 μm ,Dv(10)为165 μm 或更大,碳负载量为16至22重量%,总表面积小于450 m^2/g 。更优选地,所述二氧化硅的平均粒径为240至260 μm ,且Dv(10)为175 μm 或更大,碳负载量为16.5至20重量%,且总表面积小于400 m^2/g 。甚至更优选地,所述二氧化硅的平均粒径为245至260 μm ,且Dv(10)为180 μm 或更大,碳负载量为17至19重量%,且总表面积小于400 m^2/g 。最优选地,二氧化硅的平均粒径为250至260 μm ,Dv(10)为185 μm 或更大,碳负载量为17.5至18.0重量%,总表面积小于350 m^2/g 。

[0127] 在该特别优选的实施方案中,二氧化硅通常具有230至270 μm 的平均粒径和225 μm 或更小的Dv(10),15至24重量%的碳负载量,以及大于100 m^2/g 的总表面积。优选地,二氧化硅的平均粒径为235至265 μm ,Dv(10)为225 μm 或更小,碳负载量为16至22重量%,总表面积大于150 m^2/g 。更优选地,二氧化硅具有240至260 μm 的平均粒径和220 μm 或更小的Dv(10),16.5至20重量%的碳负载量,以及大于200 m^2/g 的总表面积。更优选地是,二氧化硅具有245至260 μm 的平均粒径和215 μm 或更小的Dv(10),17至19重量%的碳负载量,和大于250 m^2/g 的总表面积。最优选地,二氧化硅具有250至260 μm 的平均粒径,210 μm 或更小的Dv(10),17.5至18.0重量%的碳负载量,和大于300 m^2/g 的总表面积。

[0128] 在该特别优选的实施方案中,二氧化硅通常具有230至270 μm 的平均粒径和160至225 μm 的Dv(10),15至24重量%的碳负载量,以及100至500 m^2/g 的总表面积。优选地,二氧化

硅具有235至265 μm 的平均粒径和165至225 μm 的Dv(10),16至22重量%的碳负载量和150至450 m^2/g 的总表面积。更优选地,二氧化硅的平均粒径为240至260 μm ,Dv(10)为175至220 μm ,碳负载量为16.5至20重量%,总表面积为200至450 m^2/g 。还更优选地,二氧化硅的平均粒径为245至260 μm ,Dv(10)为180至215 μm ,碳负载量为17至19重量%,总表面积为250至400 m^2/g 。最优选地,二氧化硅的平均粒径为250至260 μm ,Dv(10)为185至210 μm ,碳负载量为17.5至18.0重量%,总表面积为300至350 m^2/g 。

[0129] 在任何前述实施方案中(即,在第一、第二或第三实施方案中的任何实施方案中,包括其任何典型的、优选的或特别优选的子实施方案),二氧化硅颗粒通常是多孔的。通常,二氧化硅颗粒的平均孔径为60至200 \AA 。优选地,平均孔径为65至160 \AA ,更优选70至140 \AA ,还更优选80至130 \AA ,再更优选90至120 \AA ,最优选95至115 \AA ,例如约100 \AA 或约110 \AA 。

[0130] 在任何前述实施方案中,通常二氧化硅颗粒的总孔体积为0.5至1.5 cc/g 。在一个优选的实施方案中,孔体积为0.6至0.84 cc/g ,更优选0.7至0.8 cc/g ,最优选0.73至0.77 cc/g 。

[0131] 总孔体积通常通过氮气吸附来测量,例如,如Lowell,Shields,Thomas and Thommes, Springer, Dordrecht, 2006 (pub:Springer)的“Characterization of Porous Solids and Powders:Surface Area,Pore Size and Density”中所述,该文献通过引用整体并入本文。

[0132] 平均孔径d由总孔体积V和表面积A使用方程 $d=4*V/A$ 计算。这是具有相同体积和面积的假设均匀圆柱形孔的直径。

[0133] 在任何前述实施方案中,通常二氧化硅颗粒具有不同的粒度分布,使得按数量计至少80%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按数量计至少80%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按数量计至少80%的颗粒直径为200至500 μm 。优选地,按数量计至少85%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按数量计至少85%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按数量计至少85%的颗粒直径为200至500 μm 。更优选地,按数量计至少90%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按数量计至少90%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按数量计至少90%的颗粒直径为200至500 μm 。最优选地,按数量计至少95%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按数量计至少95%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按数量计至少95%的颗粒直径为200至500 μm 。

[0134] 在任何前述实施方案中,通常二氧化硅颗粒具有不同的粒度分布,使得按体积计至少80%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按体积计至少80%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按体积计至少80%的颗粒直径为200至500 μm 。优选地,按体积计至少85%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按体积计至少85%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按体积计至少85%的颗粒直径为200至500 μm 。更优选地,按体积计至少90%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按体积计至少90%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按体积计至少90%的颗粒直径为200至500 μm 。最优选地,按体积计至少95%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按体积计至少95%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按体积计至少95%的颗粒直径为200至500 μm 。

[0135] 在任何前述实施方案中,通常二氧化硅颗粒具有不同的粒度分布,使得按质量计至少80%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按质量计至少80%的颗粒直径小于500 μm 。通

常,按质量计至少80%的颗粒直径为200至500 μm 。优选地,按质量计至少85%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按质量计至少85%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按质量计至少85%的颗粒直径为200至500 μm 。更优选地,按质量计至少90%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按质量计至少90%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按质量计至少90%的颗粒直径为200至500 μm 。最优选地,按质量计至少95%的颗粒具有大于200 μm 的直径。通常,按质量计至少95%的颗粒直径小于500 μm 。通常,按质量计至少95%的颗粒直径为200至500 μm 。

[0136] 在任何前述实施方案中,通常二氧化硅颗粒的堆积(填充床)密度(bulk density)为0.71kg/dm³或更小,优选0.70kg/dm³或更小,更优选0.69kg/dm³或更小,还更优选0.68kg/dm³或更小,甚至更优选0.67kg/dm³或更小,最优选0.66kg/dm³或更小。典型地,二氧化硅颗粒的堆积密度为0.4kg/dm³或更大,优选0.5kg/dm³或更大,更优选0.55kg/dm³或更大,还更优选0.60kg/dm³或更大,甚至更优选0.63kg/dm³或更大和最优选0.65kg/dm³或者更大。

[0137] 因此,在任何前述实施方案中,二氧化硅颗粒通常具有0.4至0.71kg/dm³、优选0.5至0.70kg/dm³、更优选0.55至0.69kg/dm³,还更优选0.60至0.68kg/dm³,甚至更优选0.63至0.67kg/dm³和最优选0.65至0.66kg/dm³的堆积密度。

[0138] 在任何前述实施方案中,二氧化硅的Dv(90)值通常为320 μm 或更大。Dv(90)是指二氧化硅颗粒的累积体积分布相对于增加的颗粒直径的图中颗粒直径的第90百分位。Dv(90)对样品中存在的粗颗粒(即大尺寸颗粒)的数量敏感。Dv(90)可以通过激光衍射来确定。优选地,二氧化硅的Dv(90)值为325 μm 或更大,更优选330 μm 或更大,最优选335 μm 或更大。通常,二氧化硅的Dv(90)为390 μm 或更小,优选370 μm 或更小,更优选350 μm 或更小,最优选340 μm 或更小。因此,通常,二氧化硅的Dv(90)为320至290 μm ,优选325至370 μm ,更优选330至350 μm ,最优选335至340 μm 。

[0139] 液体洗脱剂相

[0140] 本发明的方法在色谱分离中使用含水有机洗脱剂,即水和有机溶剂的混合物。通常,洗脱剂不是超临界状态。通常,洗脱剂是液体。

[0141] 通常,有机溶剂选自醇、醚、酯、酮和腈。优选醇、酮和腈。

[0142] 醇溶剂是本领域技术人员熟知的。醇通常是短链醇。醇通常具有式ROH,其中R是直链或支化C₁-C₆烷基。C₁-C₆烷基优选为未取代的。醇的实例包括甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、异丁醇、仲丁醇和叔丁醇。优选甲醇和乙醇。更优选甲醇。

[0143] 醚溶剂是本领域技术人员熟知的。醚通常是短链醚。醚通常为式R-O-R',其中R和R'相同或不同,代表直链或支化C₁-C₆烷基。C₁-C₆烷基优选为未取代的。优选的醚包括二乙醚、二异丙基醚和甲基叔丁基醚(MTBE)。

[0144] 酯溶剂是本领域技术人员熟知的。酯通常是短链酯。酯通常为式R-(C=O)O-R',其中R和R'相同或不同,代表直链或支化C₁-C₆烷基。优选的酯包括乙酸甲酯和乙酸乙酯。

[0145] 酮溶剂是本领域技术人员熟知的。酮通常是短链酮。酮通常为式R-(C=O)-R',其中R和R'相同或不同,代表直链或支化C₁-C₆烷基。C₁-C₆烷基优选为未取代的。优选的酮包括丙酮、甲基乙基酮和甲基异丁基酮(MIBK)。

[0146] 腈溶剂是本领域技术人员熟知的。腈通常是短链腈。腈通常具有式R-CN,其中R表示直链或支化C₁-C₆烷基。C₁-C₆烷基优选为未取代的。优选的腈包括乙腈。

[0147] 通常,有机溶剂可与水混溶。优选地,有机溶剂选自四氢呋喃、异丙醇、正丙醇、甲

醇、乙醇、乙腈、1,4-二噁烷、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷。甲醇和乙腈是特别优选的有机溶剂。

[0148] 洗脱剂中的有机溶剂和水之间的比例没有特别限制。然而,通常有机溶剂:水的比例为99.9:0.1至75:25体积份,优选99.5:0.5至80:20体积份。如果有有机溶剂是甲醇,则甲醇:水的比例通常为99.9:0.1至85:15体积份,优选99.5:0.5至88:12体积份。如果有有机溶剂是乙腈,则乙腈:水的比例通常为99:1至75:25体积份,优选96:4至80:20体积份。

[0149] PUFA产物和饲料混合物

[0150] 如本文所用,术语“PUFA产物”是指包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)和/或其衍生物的产物,通常具有营养或药用意义。通常,PUFA产物是单个PUFA或其衍生物。或者,PUFA产物是两种或多种PUFA或其衍生物的混合物。

[0151] 术语“多不饱和脂肪酸”(PUFA)是指含有多于一个双键的脂肪酸。此类PUFA为本领域技术人员所熟知。如本文所用,PUFA“衍生物”是甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯、酯、磷脂、酰胺、内酯或盐形式的PUFA。甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯和酯是优选的。更优选甘油三酯和酯。更优选酯。酯通常是烷基酯,优选C₁-C₆烷基酯,更优选C₁-C₄烷基酯。酯的实例包括甲酯和乙酯。乙酯是最优选的。

[0152] 通常,PUFA产物是至少一种 ω -3或 ω -6PUFA或其衍生物,优选至少一种 ω -3PUFA或其衍生物。

[0153] ω -3PUFA的例子包括二十碳三烯酸(ETE)、二十碳四烯酸(ETA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)和二十二碳六烯酸(DHA)。优选EPA、DPA和DHA。最优选EPA和DHA。

[0154] ω -6PUFA的例子包括二十碳二烯酸、 γ -亚麻酸(GLA)、二同型 γ -亚麻酸(DGLA)、花生四烯酸(ARA)、二十二碳二烯酸,肾上腺酸和二十二碳五烯酸(ω -6)。优选ARA和GLA。

[0155] 优选地,PUFA产物是EPA、DHA、其衍生物或其混合物。典型的衍生物包括EPA和DHA甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯以及EPA和DHA酯,优选烷基酯,例如C₁-C₄烷基酯。

[0156] 更优选地,PUFA产物是EPA、DHA、或其衍生物。典型的衍生物包括EPA和DHA甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯以及EPA和DHA酯,优选烷基酯,例如C₁-C₄烷基酯。

[0157] 最优选地,PUFA产物是二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、EPA甘油三酯、DHA甘油三酯、EPA乙酯或DHA乙酯。

[0158] 特别优选地,PUFA产物是EPA、DHA、EPA乙酯或DHA乙酯。

[0159] 在一种实施方案中,PUFA产物是EPA和/或EPA乙酯(EE)。

[0160] 在另一个实施方案中,PUFA产物是DHA和/或DHA乙酯(EE)。

[0161] 在又一个实施方案中,PUFA产物是EPA和DHA和/或EPAEE和DHAEE的混合物。

[0162] 通常,以大于80GC面积%、优选大于85GC面积%、更优选大于90GC面积%、还更优选大于95GC面积%,更优选大于97GC面积%,甚至更优选大于98GC面积%,最优选大于99GC面积%的纯度获得PUFA产物。其中“GC面积%”是对应于相关产品(此处为PUFA产品)气相色谱图迹线下的面积%。通常可以使用欧洲药典6.0第2552-2554页(访问<http://www.uspbpep.com/ep60/omega-3-acid%20ethyl%20esters%2090%201250e.pdf>) (其内容通过引用整体并入本文)中概述的omega-3脂肪酸乙酯方法来测量GC面积%。

[0163] 在最优选的实施方案中,PUFA产物是EPA或EPA衍生物,例如EPA乙酯,并且以大于

90GC面积%、优选大于95GC面积%、更优选大于97GC面积%、甚至更优选大于98GC面积%、还更优选大于98.4GC面积%的纯度获得。优选地,PUFA产物是EPA或EPA衍生物,例如EPA乙酯,并且以98至99.5GC面积%的纯度获得。

[0164] 在一个备选的优选实施方案中,PUFA是DHA或DHA衍生物,例如DHA乙酯,并且以大于80GC面积%、优选大于85GC面积%、更优选大于90GC面积%,更优选大于92GC面积%,最优选大于95GC面积%的纯度获得。优选地,PUFA产物是DHA或DHA衍生物,例如EPA乙酯,并且以97至99.5GC面积%的纯度获得。

[0165] 通常,除了所述PUFA产物之外,在本发明的色谱分离方法中还收集另外的次级PUFA产物。优选地,PUFA产物是EPA或其衍生物,另外的次级PUFA产物是DHA或其衍生物。

[0166] 因此,通常,本发明的方法被配置为收集PUFA产物,其是EPA或其衍生物。在此类实施方案中,通常使用含有EPA、比EPA极性更大的组分和比EPA极性更小的组分的进料混合物。

[0167] 或者,本发明的方法被配置为收集PUFA产物,其是DHA或其衍生物。在此类实施方案中,通常使用含有DHA、比DHA极性更大的组分和比DHA极性更小的组分的进料混合物。

[0168] 或者,该方法被配置为收集PUFA产物,该PUFA产物是EPA和DHA或其衍生物的浓缩混合物。在这样的实施方案中,使用的进料混合物含有EPA、DHA、比EPA和DHA极性更大的组分、以及比EPA和DHA极性更小的组分。

[0169] 通常,PUFA产物含有1GC面积%或更少,优选0.5GC面积%或更少,更优选0.25GC面积%或更少,还更优选0.1GC面积%或更少,最优选0.01GC面积%或更少的C18脂肪酸杂质、C18脂肪酸甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯杂质以及C18脂肪酸烷基酯杂质。更典型地,PUFA产物含有1GC面积%或更少,优选0.5GC面积%或更少,更优选0.25GC面积%或更少,还更优选0.1GC面积%或更少,并且最优选0.01GC-面积%或更少的杂质,其为C18脂肪酸及其衍生物。典型的C18脂肪酸衍生物如上文对于PUFA衍生物的定义。如本文所用,C18脂肪酸是具有直链或支化烃链的C18脂族单羧酸。典型的C18脂肪酸包括硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1n9)、异油酸(C18:1n7)、亚油酸(C18:2n6)、 γ -亚麻酸/GLA(C18:3n6)、 α -亚麻酸/ALA(C18:3n3)和十八碳四烯酸/SDA(C18:4n3)。在某些优选的实施方案中,PUFA产物基本上不含上述杂质。

[0170] 通常,PUFA产物不是C18PUFA、C18PUFA甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯,或C18PUFA烷基酯。更典型地,PUFA产物不是C18PUFA或C18PUFA衍生物。典型的C18 PUFA包括亚油酸(C18:2n6)、GLA(C18:3n6)和ALA(C18:3n3)。

[0171] 在本发明的方法中,进料混合物通常是(i)包含至少一种PUFA产物的天然或合成进料,或(ii)包含从天然或合成进料的部分纯化获得的至少一种PUFA产物的部分纯化的进料。因此,在一个实施方案中,进料混合物是包含至少一种PUFA产物的天然或合成原料。在另一个实施方案中,进料混合物是部分纯化的进料,其包括从天然或合成原料的部分纯化获得的至少一种PUFA产物。

[0172] 通过本发明方法分离的合适进料可以从包括植物和动物油和脂肪的天然来源获得,也可以从包括从基因修饰的植物、动物和微生物(包括真菌和酵母)获得的油的合成来源获得。例子包括鱼油、藻类和微藻油以及植物油,例如琉璃苣油、蓝蓟油和月见草油。在一个实施方案中,进料混合物是鱼油。在另一个实施方案中,进料混合物是藻类油。当所需

PUFA产品为EPA、ARA和/或DHA时,藻类油和微藻油特别适合。当所需的PUFA产物是EPA时,基因修饰的酵母特别适合。当所需的PUFA产物是EPA、ARA和/或DHA时,基因修饰的植物特别适合。

[0173] 在特别优选的实施方案中,原料是鱼油或鱼油衍生的原料。已经有利地发现,当使用鱼油或鱼油衍生的原料时,EPA或EPA乙酯PUFA产物可以通过本发明的方法以大于90GC面积%的纯度,优选大于95GC面积%的纯度,更优选大于97GC面积%的纯度,甚至更优选大于98GC面积%的纯度,还更优选大于98.4GC面积%的纯度,例如98至99.5GC面积%的纯度生产。

[0174] 进料混合物通常含有PUFA产物和至少一种极性较高的组分和至少一种极性较低的组分。与PUFA产品相比,极性较低的组分对本发明方法中使用的吸附剂具有更强的粘附性。在操作过程中,这种极性较低的组分通常优先与固体吸附剂相一起移动,而不是与液体洗脱剂相一起移动。极性更强的组分对本发明方法中使用的吸附剂的粘附性比PUFA产品弱。在操作过程中,这种极性更强的组分通常优先与液体洗脱剂相一起移动,而不是与固体吸附剂相一起移动。在本发明的实施方案中,其中色谱分离步骤通过实际或模拟的移动床色谱法进行,通常将更多极性组分分离到萃余液流,而将更少极性组分分离成萃取液流。

[0175] 极性较大和极性较小的组分的实例包括(1)天然油(例如海洋油或植物油)中存在的其他化合物,(2)在储存、精炼和先前浓缩步骤中形成的副产物,以及(3)在先前浓缩或纯化步骤中使用的溶剂或试剂的污染物。

[0176] (1)的实例包括:其他不需要的PUFA;饱和脂肪酸;甾醇,例如胆固醇;维生素;以及环境污染物,如多氯联苯、多环芳烃(PAH)杀虫剂、氯化杀虫剂、二噁英和重金属。多氯联苯、多环芳烃、二噁英和氯化农药都是高度非极性成分。

[0177] (2)的实例包括来自PUFA产物的异构体和氧化或分解产物,例如脂肪酸或其衍生物的自氧化聚合产物。

[0178] (3)的实例包括尿素,其可被添加以从进料混合物中去除饱和或单不饱和脂肪酸。

[0179] 优选地,进料混合物是含有PUFA的海洋油(例如鱼油),更优选地是包含EPA和/或DHA的海洋油。

[0180] 通过本发明的方法制备浓缩EPA(EE)的示例性进料混合物包括50-75%的EPA(EE)、0-10%的DHA(EE)和其他组分,包括其他必需的 ω -3和 ω -6脂肪酸。

[0181] 通过本发明的方法制备浓缩EPA(EE)的示例性饲料混合物包括55%的EPA(EE)、5%的DHA(EE)和其他组分,包括其他必需的 ω -3和 ω -6脂肪酸。DHA(EE)的极性不如EPA(EE)。

[0182] 通过本发明的方法制备浓缩DHA(EE)的示例性进料混合物包括50-75%的DHA(EE)、0-10%的EPA(EE)和其他组分,包括其他必需的 ω -3和 ω -6脂肪酸。

[0183] 通过本发明的方法制备浓缩DHA(EE)的示例性进料混合物包括75%的DHA(EE)、7%的EPA(EE)和包括其他必需 ω -3和 ω -6脂肪酸的其他组分。EPA(EE)比DHA(EE)更具极性。

[0184] 用于通过本发明的方法制备EPA(EE)和DHA(EE)的浓缩混合物的示例性进料混合物包含大于33%的EPA(EE)和大于22%的DHA(EE)。

[0185] 原料可以在通过本发明的方法进行分馏之前进行化学处理。例如,它可以进行甘

油酯交换或甘油酯水解。

[0186] 原料可以在通过本发明的方法进行分馏之前进行部分纯化。例如,它可以通过结晶、分子蒸馏或分馏、尿素分馏、用硝酸银或其他金属盐溶液萃取、碘内酯化、超临界流体分馏或色谱法,优选固定床色谱法或模拟或实际移动床色谱法纯化。

[0187] 在一些实施方案中,原料可以进行化学处理和部分纯化。

[0188] 在其他实施方案中,原料可以直接用作本发明方法中的进料混合物,不需要初始化学处理步骤,也不需要部分纯化。

[0189] 因此,在本发明的一些实施方案中,色谱分离方法包括将原料作为进料混合物直接引入色谱装置中。在这些实施方案中,该方法可导致进料混合物的纯化以直接产生PUFA产物。或者,该方法可导致进料混合物的纯化以产生中间产物,其中对所述中间产物进行进一步纯化以获得PUFA产物。

[0190] 在其他实施方案中,色谱分离方法包括将经化学处理的原料作为进料混合物引入色谱装置中。在这些实施方案中,该方法可导致进料混合物的纯化以直接产生PUFA产物。或者,该方法可导致进料混合物的纯化以产生中间产物,其中对所述中间产物进行进一步纯化以获得PUFA产物。

[0191] 在其他实施方案中,色谱分离方法包括将部分纯化的原料作为进料混合物引入色谱装置。在这些实施方案中,该方法可导致进料混合物的纯化以直接产生PUFA产物。或者,该方法可导致进料混合物的纯化以产生中间产物,其中对所述中间产物进行进一步纯化以获得PUFA产物。

[0192] 在其他实施方案中,色谱分离方法包括将部分纯化和化学处理的原料作为进料混合物引入色谱装置中。在这些实施方案中,该方法可导致进料混合物的纯化以直接产生PUFA产物。或者,该方法可导致进料混合物的纯化以产生中间产物,其中对所述中间产物进行进一步纯化以获得PUFA产物。

[0193] 在色谱分离过程导致中间体产物制备的任何上述实施方案中,为了从中间产物获得所需的PUFA产物,进行进一步的纯化步骤。典型地,所述进一步纯化在一个或多个色谱装置中进行,优选一个或多个固定床色谱装置或一个或多个实际或模拟的移动床色谱装置。更优选地,所述进一步纯化包括在一个或多个固定床色谱装置上的快速柱色谱。

[0194] 本发明色谱分离方法的PUFA产物可以进一步进行物理或化学处理,例如通过用漂白土或二氧化硅处理以减少氧化副产物,或通过添加抗氧化剂(如生育酚)。

[0195] 在涉及两个或多个色谱分离步骤以获得PUFA产物的本发明的任何实施方案中,色谱分离步骤中的至少一个包括本文所述的固体吸附剂。优选地,每个色谱分离步骤包括本文所述的固体吸附剂。

[0196] 在一个优选实施方案中,色谱分离方法包括两个色谱分离步骤以获得PUFA产物。优选地,在该实施方案中,第一和第二色谱分离步骤都在本文所述的色谱装置中进行,即在20巴或更低的压力下操作并包含本文所述C18键合的二氧化硅作为固体吸附剂相的色谱装置。然而,备选地,第一和/或第二色谱分离步骤中只有一个在本文所述的色谱装置中进行,而另一个分离步骤在具有不同固体吸附剂相和/或操作压力的色谱装置内进行。

[0197] 因此,在该实施方案中,第一色谱分离步骤通常在本文所述的色谱装置,即在20巴或更低的压力下操作并包含本文所述C18键合的二氧化硅作为固体吸附剂相的色谱装置中

进行,并且第二色谱分离步骤在具有不同固体吸附剂相的色谱装置中进行,所述不同固体吸附剂相为例如替代性二氧化硅,如替代性C18键合的二氧化硅、C8键合的二氧化硅、纯二氧化硅、氰基键合的二氧化硅和苯基键合的二氧化硅,或非二氧化硅基固体吸附剂相。或者,第一色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,第二色谱步骤在大于20巴的压力下操作的色谱装置内进行。或者,第一色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,第二色谱步骤在具有不同固体吸附剂相在大于20巴的压力下操作的色谱装置内进行,所述不同固体吸附剂相为例如替代性二氧化硅,如替代性C18键合的二氧化硅、C8键合的二氧化硅、纯二氧化硅、氰基键合的二氧化硅和苯基键合的二氧化硅,或非二氧化硅基固体吸附剂相。

[0198] 或者,在该实施方案中,第二色谱分离步骤可以在本文所述的色谱装置,即在20巴或更低的压力下操作并包含本文所述C18键合的二氧化硅作为固体吸附剂相的色谱装置中进行,并且第一色谱分离步骤在具有不同固体吸附剂相的色谱装置中进行,所述不同固体吸附剂相为例如替代性二氧化硅,如替代性C18键合的二氧化硅、C8键合的二氧化硅、纯二氧化硅、氰基键合的二氧化硅和苯基键合的二氧化硅,或非二氧化硅基固体吸附剂相。或者,第二色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,第一色谱步骤在大于20巴的压力下操作的色谱装置内进行。或者,第二色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,第一色谱步骤在具有不同固体吸附剂相在大于20巴的压力下操作的色谱装置内进行,所述不同固体吸附剂相为例如替代性二氧化硅,如替代性C18键合的二氧化硅、C8键合的二氧化硅、纯二氧化硅、氰基键合的二氧化硅和苯基键合的二氧化硅,或非二氧化硅基固体吸附剂相。

[0199] 通常在该实施方案中,第一和第二色谱分离步骤在不同的色谱装置中进行。或者,第一和第二色谱分离步骤在相同的色谱装置中进行。

[0200] 基于存在于进料混合物中的PUFA产物的总质量,本发明的色谱方法通常被配置为使得从进料混合物获得的PUFA产物的产率为大于80重量%,更优选大于90重量%,还更优选大于95重量%,最优选大于98重量%。

[0201] 色谱分离方法的操作

[0202] 任何已知的色谱装置都可以用于本发明的色谱分离。用于分离的色谱柱的数量没有特别限制。色谱装置包括一个或多个色谱柱,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个柱。在一些实施方案中,柱的数量通常是一个。在其他实施方案中,柱的数量通常多于一个,优选4个或更多,更优选6个或更多、甚至更优选8个或更多,例如4、5、6、7、8、9或10个柱。通常,不多于25个柱,优选不多于20个,更优选不多于15个。

[0203] 所使用的柱的尺寸没有特别限制,并且将在一定程度上取决于待纯化的进料混合物的体积。技术人员将能够容易地确定要使用的适当大小的柱。每个柱的直径通常为50至5000毫米,优选100至2500毫米,更优选250至1500毫米,最优选250至1000毫米。每个柱的长度通常为10至300厘米,优选地10至200厘米,更优选地25至150厘米,甚至更优选地70至110厘米,最优选80至100厘米。

[0204] 通常,本发明的方法在小于20巴的最大压力下进行。在一些实施方案中,本发明的方法在7至20巴、优选7.5至15巴、更优选8至10巴的“中等”压力下进行。或者,在一些实施方案中,本发明的方法在7巴或更低,优选1至7巴,更优选3至6巴的“低”压力下进行。

[0205] 通常,本发明的方法在室温或高于室温的温度下进行。优选地,该方法在高于室温的温度下进行。

[0206] 通常,进料混合物通过的至少一个色谱柱的温度高于室温。更典型地,所使用的所有色谱柱的温度都高于室温。

[0207] 如将理解的,如果至少一个色谱柱的温度高于室温,则柱的内部对分离过程是重要的。因此,通常是色谱柱内的洗脱剂和吸附剂的温度可能高于室温。当然,可以通过内部(例如通过加热洗脱剂和/或进料混合物)和/或外部手段(例如通过任何已知的常规手段加热色谱柱的外部)来实现至少一个色谱柱内部所需的温度。

[0208] 通常,可以通过加热洗脱剂和/或进料混合物来实现升高的温度。这具有在内部加热柱的效果。

[0209] 因此,进料混合物通过的至少一个色谱柱的温度也可以测量为洗脱剂的温度。因此,色谱分离中使用的洗脱剂的温度通常高于室温。

[0210] 或者,至少一个色谱柱的所需温度可以通过加热色谱柱来实现。加热可以使用例如电加热套、加热的水套或盘管或通过辐射加热灯来进行。一个或多个色谱柱的内部和/或外部通常可以被加热。

[0211] 至少一个色谱柱的所需温度可以通过加热柱和/或含水有机溶剂洗脱剂和/或进料混合物来实现。

[0212] 通常,大于室温的温度为大于30°C,优选大于35°C,更优选大于40°C,甚至更优选大于45°C,进一步优选大于50°C,更加优选大于55°C,并且甚至更优选大于57°C。56°C的温度在某些实施方案中是有用的。

[0213] 通常,高于室温的温度为不超过100°C,优选不超过95°C,更优选不超过90°C,甚至更优选不超过85°C,进一步优选不超过80°C,更加优选不超过75°C,并且进一步优选不超过70°C。

[0214] 因此,典型的温度范围为30至100°C、35至95°C、40至90°C、45至85°C、50至80°C、55至75°C或57至70°C。

[0215] 优选的温度范围为40至70°C,优选50至67°C,更优选56至65°C,甚至更优选57至63°C。

[0216] 在某些实施方案中,可以使用单个色谱柱,优选单个固定色谱柱。以这种方式进行的分离通常使用已知的固定床色谱装置进行。以这种方式进行的分离可以称为“固定床”色谱法。

[0217] 在其它实施方案中,使用多于一个的色谱柱。这可能涉及使进料混合物通过两个或多个色谱柱,这两个色谱柱可以相同或不同,串联或并联排列。在本实施方案中使用的柱的数量没有特别限制,但通常不超过三十个柱。

[0218] 使用多个色谱柱的一个特定实施方案是模拟或实际的移动床色谱。

[0219] 模拟和实际移动床色谱装置是本领域技术人员众所周知的。任何已知的模拟或实际移动床色谱装置都可以用于本发明方法的目的,只要该装置是根据本发明的方法使用的。如果根据本发明的方法进行配置,则可以全部使用在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和US 4,764,276中描述的那些装置。也可以采用例如WO 2011/080503,WO 2013/005046,WO 2013/005047,WO 2013/005048,WO 2013/005051,WO 2013/005052和/或WO 2014/108686中公开的SMB方法。

[0220] 通常,色谱分离可以包括使用常规装置使用单个SMB分离步骤,例如图1所示。以这种方式进行的分离可以称为“单程”SMB。

[0221] 在图1中,液相和固相之间的逆流接触在柱中进行,柱可分为四个不同的区域。

[0222] 区域1-位于洗脱剂注入线和萃取液抽取线之间的所有东西。

[0223] 区域2-位于萃取液抽取线和原料注入线之间的所有东西。

[0224] 区域3-原料注入线和萃余液抽取线之间的所有东西。

[0225] 区域4-位于萃余液抽取线和洗脱剂注入线之间的所有东西。

[0226] 由于入口/出口流速,液体流速根据区域而变化,其中 Q_I 、 Q_{II} 、 Q_{III} 和 Q_{IV} 分别是区域I、II、III和IV中的流速。

[0227] 在一个实施方案中,原料和洗脱剂引入点周期性地向下游推进(在主流体的循环方向上),而萃余液和萃取液的抽取点同时推进并根据相同的增量(例如,至少一个柱)推进。

[0228] 因此,在该实施方案中,所有的入口和输出线在每个周期 ΔT 和循环时间同时移动,在该时间结束时,它们发现它们的初始位置等于 $N_c * \Delta T$,其中 N_c 是柱子的总数。

[0229] 在该实施方案中,入口/出口位置以固定的间隔同时移动。该线的位置通常由线(n)标记,其指示在给定时刻,给定的入口/出口线连接到柱n的入口。例如,在12柱系统中,原料(9)意味着原料线连接到柱9的入口,而萃余液(11)意味着萃余液线连接到柱11的入口。

[0230] 通过使用这个定义,系统可以表示为:El (3) /Ext (6) /Feedstock (9) /Raff (11)。对于这种配置,区域I、II、III和IV中的柱子数分别为:3/3/2/4。然后,系统的配置完全定义为:

[0231] 柱的入口/出口数量

[0232] 时间0:El (3) /Ext (6) /Feedstock (9) /Raff (11) 3/3/2/4

[0233] 在给定时间(周期)后,所有入口/出口位置同时移动一柱,系统描述如下:

[0234] 在时间 ΔT :El (4) /Ext (7) /Feedstock (10) /Raff (12) 3/3/2/4

[0235] 在新的周期之后,所有位置将再次同时移动一柱,然后系统将被描述如下:

[0236] 在时间 $2 * \Delta T$:El (5) /Ext (8) /Feedstock (11) /Raff (1) 3/3/2/4

[0237] 在时间 $2 * \Delta T$,萃余液的位置已经从位置12移动到位置1,也可以写成位置13取12的模。 $([13]_{12})$ 。

[0238] 此演示可以推广到模拟包括多个柱 N_c 的移动床。如果在给定时刻,模拟的移动床的配置为El (e) /Ext (x) /Feedstock (f) /Raff (r),则通过简单推理可以找到每个区域中包含的柱数:

[0239] 区域1:Nb1 = $[x - e]_{N_c}$; 区域2:Nb2 = $[f - x]_{N_c}$

[0240] 区域3:Nb3 = $[r - f]_{N_c}$; 区域4:Nb4 = $[e - r]_{N_c}$

[0241] 注入点和抽取点在 ΔT 周期后偏移一柱,在 N_c 周期后偏移 N_c 柱。每个区域中的柱数保持不变。因此,注入点和抽取点在循环时间 $N_c * \Delta T$ 之后恢复其初始位置。

[0242] 在另一个实施方案中,色谱分离可以如US 6136198和Sa Gomes and Rodrigues, Chemical Engineering&Technology Special Issue:Preparative Chromatography and Downstream Processing, 2012, 35, 17-34,中所述进行,其全部内容通过引用并入本文。这

些文件描述了操作色谱分离过程的非常规方法。通常在该实施方案中,该过程可以使用所谓的Varicol、Powerfeed、ISMB、Modicon、OSS或颗粒进料/部分丢弃方法等进行。优选地,在该实施方案中,该过程使用Varicol方法进行。此过程是一个带有异步端口交换机的单程SMB过程,也可以称为“异步SMB”。下面将更详细地描述Varicol过程。

[0243] “Varicol”实施方案在以下方面与单程SMB不同:

[0244] (1) 区域长度不是恒定的;

[0245] (2) 每个区域的柱子数在该时段内不是恒定的;和

[0246] (3) 入口/出口线不同时移动。

[0247] 在“Varicol”实施方案中,通过在该周期和循环时间内不同时移动流体入口和出口的位置,可以获得改进的结果。改进包括提高作为萃取液和萃余液抽取的产品的纯度,以及降低分离成本。

[0248] 在“Varicol”实施方案中,含有至少一种组分的混合物的该至少一种组分在一个装置中纯化,该装置具有一组色谱柱或色谱柱部分,这些色谱柱或部分含有吸附剂并串联布置在闭合回路中,其中回路包括至少一个进料注入点、萃余液抽取点、洗脱剂注入点和萃取液抽取点,其中色谱区由注入点和抽取点确定,反之亦然,在给定时间段结束时,所有的注入点和抽取点在给定的方向上偏移一个柱或柱部分,该给定的方向相对于循环通过回路的主流体的流动而限定,由此该过程的特征在于,在所述时间段期间,柱或柱部分的不同注入点和抽取点的偏移在不同的时间进行,使得由所述不同点限定的区域的长度是可变的。

[0249] 该时间段被定义为最小时间间隔 ΔT ,在该时间间隔结束时,每个入口和出口都移动了一个柱或柱部分,因此所有入口和出口的移动都没有同时发生。在循环时间 $N_c * \Delta T$ 结束时,系统已恢复其初始位置。

[0250] 在一些方面,吸附剂可以选自分子筛、例如在吸附过程中使用的沸石筛或诸如离子交换树脂的吸附剂。它也可以是二氧化硅基上的固定相、反相吸附剂和手性相。

[0251] 在“Varicol”实施方案中,可以至少生产一次以下阶段的系列:

[0252] 在所述时间段 ΔT 期间的时刻 t_1 ,在给定的方向上,注入点或抽取点的位置相对于至少一个区域偏移一个柱或柱部分,以增加所述区域的长度并减少与所述区域相邻的区域的长度,则在所述时间段期间的时刻 t_2 相对于至少一个其它区域的注入点或抽取点的位置在相同方向上偏移一个柱或柱部分,以这种方式增加所述另一区域的长度并减少与所述另一区域相邻的区域的长度,并且如果需要则重复所述操作,使得在所述时间段 ΔT 之后,通过柱或柱部分的注入点和抽取点的所有位置的偏移,恢复与初始配置相同的柱配置。

[0253] 在“Varicol”实施方案的一个方面,可以连续地改变柱的区域长度,从而通过减少下一个区域来补偿一个区域的增加(例如,参见US 6136198的表2)。

[0254] 在“Varicol”实施方案的另一个方面,区域长度的增加可以通过相对区域的减少来补偿(例如,参见US 6136198的表3)。

[0255] 在该时间段期间,可以以近似恒定的时间相移并且有利地以至少等于四分之一时间段的时间相移来执行注入或抽取位置的所有偏移。

[0256] 在“Varicol”实施方案的一些方面中,可以在该时段期间以非恒定的时间相移来执行注入点或抽取点的位置的偏移。

[0257] 在“Varicol”的实施方案中,在给定区域中循环的流体的流速通常保持大致恒定。

同样有利的是,在与柱或柱部分中的流动的方向相同的方向上执行注入点和抽取点的位置的偏移。此外,可以通过装置中的压力来监测在注入或抽取点线中循环的流体的至少一个流速。优选地,它是萃余液和/或萃取液的流速,从而使其他流体处于流速控制之下。

[0258] 在“Varicol”实施方案中,有利地可以使用液体作为洗脱剂,但也可以使用超临界流体或亚临界流体。

[0259] 在“Varicol”实施方案中进行产品分离的压力范围可以在0.1至50MPa,优选在0.5至30MPa。柱中的温度通常在0°C至100°C。通常,柱或柱部分的数量小于8。对于大于8的值,通过研究在循环期间的偏移时刻组合的每个区域中的柱的数量和长度的影响来优化过程是非常有利的。

[0260] 在“Varicol”实施方案中使用的装置包括含有吸附剂的多个色谱柱或色谱柱部分,这些色谱柱或色谱柱部分串联布置并处于闭合回路中,其中所述回路包括至少一个用于再循环流体的泵、每个柱或柱部分中连接到至少一个注入泵的多个流体注入线以及每个柱或柱部分的连接到至少一个抽取泵的多个液体抽取线、每条线上的至少一个阀,其中所述回路限定至少三个色谱区,其中每个色谱区由流体注入点和流体抽取点确定,其中所述装置的特征在于,其包括用于控制与所述阀连接的区域的长度随时间变化的装置,所述装置适于通过柱或柱部分以间歇方式偏移注入点和抽取点的位置。

[0261] 所使用的阀有利地是全阀或无阀。

[0262] 作为上述过程的替代方案,色谱分离可以包括使用多个SMB分离。

[0263] 在一个实施方案中,色谱分离可以如WO 2011/080503和WO 2013/005046中所述进行,其全部内容通过引用并入本文。WO 2011/080503和WO 2013/005046中规定的优选方法条件是该实施方案的优选方法,并且可以从WO 2011/0080503和WO 2013/0005046中并入。

[0264] WO 2011/080503和WO 2013/005046中公开的方法包括将输入流引入模拟或实际移动床色谱装置,该装置具有多个连接的色谱柱,该色谱柱含有作为洗脱剂的含水有机溶剂,其中该装置具有包括至少第一区和第二区的多个区,每个区具有萃取流和萃余液流,从其可以从所述多个连接色谱柱收集液体,并且其中(a)从第一区中的柱收集含有PUFA产物和更多极性组分的萃余液流,并将其引入第二区中的非相邻柱,和/或(b)从第二区的柱收集包含PUFA产物与较少极性组分的萃取液流,并将该萃取液流引入第一区的非相邻柱,所述PUFA产物在每个区中与输入流的不同组分分离。以这种方式进行的分离可以称为“双程”SMB方法。

[0265] 在这种“双程”SMB方法中,术语“区”是指多个连接的色谱柱,所述连接的色谱柱包含作为洗脱剂的含水有机溶剂,并且具有一个或多个输入流的注入点、一个或更多个水和/或有机溶剂的注入点,萃余液排出流,从其可以从所述多个连接的色谱柱收集液体,以及萃取液排出流,从其可以从所述多列连接的色谱柱收集液体。通常,每个区域对于输入流只有一个注入点。在一个实施方案中,每个区仅具有一个用于含水有机溶剂洗脱剂的注入点。在另一个实施方案中,每个区具有两个或多个用于水和/或有机溶剂的注入点。

[0266] 术语“萃余液”是本领域技术人员众所周知的。在实际和模拟移动床色谱的背景下,它指的是与固体吸附剂相比,随着液体洗脱剂相更快移动的组分流。因此,与输入流相比,萃余液流通常富含极性较强的组分,而缺乏极性较低的组分。

[0267] 术语“萃取液”为本领域技术人员所熟知。在实际和模拟移动床色谱的上下文中,

它指的是与液体洗脱剂相比,与固体吸附剂相一起更快移动的组分流。因此,与输入流相比,萃取液流通常富含极性较低的组分,而缺少极性较高的组分。

[0268] 如本文所使用的,术语“不相邻”是指在例如相同的装置中由一个或多个柱,优选3个或更多个柱,更优选5个或更多的柱,最优选约5个柱分隔的柱。

[0269] “双程”SMB方法如图11所示。将包含PUFA产物(B)和极性较高(C)和极性较低(A)组分的输入流F引入第一区中的柱5的顶部。将含水有机溶剂解吸剂引入第一区中的柱1的顶部。在第一区中,极性较低的组分(A)作为萃取液流E1从柱2的底部除去。PUFA产物(B)和更多极性组分(C)作为萃余液流R1从柱7的底部除去。然后将萃余液流R1引入柱12顶部的第二区中。将含水有机溶剂解吸剂引入第二区中的柱9的顶部。在第二区中,极性更强的组分(C)作为萃余液流R2在柱14的底部被除去。PUFA产物(B)作为萃取液流E2在柱10的底部被收集。

[0270] 在这种“双程”SMB方法中,通常将含水有机溶剂引入第一区的柱1的顶部。

[0271] 在这种“双程”SMB方法中,含水有机溶剂通常被引入第二区的柱9的顶部。

[0272] 在这种“双程”SMB方法中,输入流通常被引入第一区的柱5的顶部。

[0273] 在这种“双程”SMB方法中,第一萃余液流通常在第一区中从柱7的底部收集并在第二区中引入柱12的顶部。第一萃余液流可任选地在引入柱12中之前收集在容器中。

[0274] 在这种“双程”SMB方法中,第一萃取液流通常从第一区的柱2底部移除。可任选地将第一萃取液流收集在容器中,并将一部分重新引入第一区中的柱3的顶部。经由萃取液流从第一区收集的液体再循环回到第一区的速率是液体从该容器泵送到柱3顶部的速率。

[0275] 在这种“双程”SMB方法中,第二萃余液流通常在第二区中从柱14的底部移除。

[0276] 在这种“双程”SMB方法中,第二萃取液流通常从第二区的柱10的底部收集。该第二萃取液流通常包含PUFA产物。可任选地将第二萃取液流收集在容器中,并将一部分重新引入第二区中的柱11的顶部。经由萃取液流从第二区收集的液体再循环回第二区的速率是液体从该容器泵送到柱11顶部的速率。

[0277] 在这种“双程”SMB方法中,通过萃取液流从第一区收集的液体再循环回第一区的速率通常快于通过萃取液流从第二区收集的液体再循环回第二区的速率。在这种“双程”SMB方法中,每个区的洗脱剂通常基本相同。

[0278] 在这种“双程”SMB方法中,溶剂可以通过蒸发、膜或本领域技术人员的任何其他用于溶剂回收的方法回收。溶剂一旦从产物或废物中完全或部分耗尽,就可以部分或完全作为解吸剂再循环到SMB中。因此,在一些方面,可以通过蒸发、干燥或蒸馏来浓缩富含产物的萃取液/萃余液流(视情况而定)和/或缺乏产物的萃取液/萃余液流。或者,可以通过液体萃取、膜、结晶、吸附或其他溶剂回收技术来浓缩富含产物的萃取液/萃余液流(视情况而定)和/或缺乏产物的萃取液或萃余液流(视情况而定)。

[0279] 通常,第一和第二色谱分离步骤中的至少一个涉及至少一个,例如一个,如上定义的“双程”SMB过程。

[0280] 在备选实施方案中,色谱分离可以如WO 2013/00051和/或WO 2013/00052中所述进行,其全部内容通过引用并入本文。这样的实施方案涉及:

[0281] (i) 在模拟或实际的移动床色谱装置中的第一SMB步骤中纯化输入流,以获得第一产物,所述移动床色谱设备具有多个连接的色谱柱,所述色谱柱含有作为洗脱剂的含水有机溶剂;和

[0282] (ii) 在第二SMB步骤中,使用具有多个连接的色谱柱的模拟或实际移动床色谱装置纯化在(i)中获得的第二产物,所述连接的色谱柱含有作为洗脱剂的含水有机溶剂;

[0283] 其中

[0284] (a) 所述第一和第二SMB步骤在同一色谱装置上顺序进行,所述第一产物在所述第一SMB步骤和所述第二SMB步骤之间回收,并且所述色谱装置中的方法条件在所述第一SMB步骤和所述第二SMB步骤之间调节,使得所述PUFA产物在每个SMB步骤中与所述进料混合物的不同组分分离;或

[0285] (b) 第一SMB步骤和第二SMB步骤分别在分离的第一和第二色谱装置上进行,将从第一SMB步骤获得的第一产物引入第二色谱设备中,并且在每个SMB步骤中将PUFA产物与进料混合物的不同组分分离。以这种方式分离被称为“背靠背”SMB。

[0286] 在这种“背靠背”SMB方法中,术语“模拟或实际移动床色谱装置”通常指多个连接的色谱柱,所述连接的色谱柱包含作为洗脱剂的含水有机溶剂,并且具有用于输入流的一个或多个注入点、用于水和/或有机溶剂的一个或者多个注入点、萃取液排出流,从其可以从所述多个连接的色谱柱收集液体,以及萃取液排出流,从其可以从所述多个连接的色谱柱收集液体。

[0287] 在这种“背靠背”SMB方法中使用的色谱装置具有串联连接的色谱柱的单个阵列,所述单个阵列的色谱柱包含作为洗脱剂的含水有机溶剂。通常,每个色谱柱都连接到设备中与该柱相邻的两个柱。因此,来自阵列中给定柱的输出连接到阵列中相邻柱的输入,该相邻柱相对于阵列中洗脱剂的流动在下游。因此,洗脱剂可以围绕连接的色谱柱阵列流动。通常,没有色谱柱连接到装置中的非相邻柱。

[0288] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,每个装置对于输入流只有一个注入点。在一个实施方案中,每个装置仅具有一个用于含水有机溶剂洗脱剂的注入点。在另一个实施方案中,每个装置具有用于水和/或有机溶剂的两个或多个注入点。

[0289] 在这种“背靠背”SMB方法中,每个装置中使用的柱的数量没有特别限制。技术人员将能够容易地确定要使用的柱的适当数量。柱的数量通常为4或更多,优选6或更多,更优选8或更多,例如4、5、6、7、8、9或10个柱。在优选实施方案中,使用5或6个柱,更优选6个柱。在另一个优选实施方案中,使用7或8个柱,更优选8个柱。通常,不多于25个柱,优选不多于20个,更优选不多于15个。

[0290] 在这种“背靠背”SMB方法中,第一和第二分离步骤中使用的色谱装置通常包含相同数量的柱。对于某些应用,它们可能具有不同数量的柱。

[0291] 在这种“背靠背”SMB方法中,在第一和第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中的柱通常具有相同的尺寸,但对于某些应用,可以具有不同的尺寸。

[0292] 到柱的流速受到柱系列上的最大压力的限制,并且将取决于柱的尺寸和固相的颗粒尺寸。本领域技术人员将能够容易地建立每个柱尺寸所需的流速,以确保有效的解吸。直径较大的柱通常需要更高的流动来维持通过柱的线性流动。

[0293] 在这种“背靠背”SMB方法中,对于上述典型的柱尺寸,通常洗脱剂进入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的流速为50至300L/min,优选100至150L/min。通常,来自第一SMB分离步骤中使用的萃取装置的萃取液的流速为5至150L/min,优选25至130L/min。在将来自第一SMB分离步骤的萃取液的一部分再循环回用于第一SMB分离步骤的装置中的实施方案

中,再循环的流速通常为50至100L/min,优选约75L/min。通常,来自用于第一SMB分离步骤的色谱装置的萃余液的流速为15至150L/min,优选20至125L/min。在将来自第一SMB分离步骤的萃余液的一部分再循环回第一SMB分离步骤中使用的装置中的实施方案中,再循环的流速通常为20至75L/min,优选约35L/min。通常,将输入流引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的流速为0.3至10L/min,优选0.5至7.5L/min,更优选1至4L/min。

[0294] 在这种“背靠背”SMB方法中,对于上述典型的柱尺寸,通常洗脱剂进入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的流速为50至250L/min,优选100至225L/min。通常,第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的萃取液流速为25至125L/min,优选50至120L/min。在将来自第二SMB分离步骤的萃取液的一部分再循环回用于第二SMB纯化步骤的装置中的实施方案中,再循环的流速通常为40-90L/min,优选50-75L/min,更优选约60L/min。典型地,来自用于第二SMB分离步骤的色谱装置的萃余液的流速为25至150L/min,优选50至100L/min,更优选约90L/min。在将来自第二SMB分离步骤的萃余液的一部分再循环回用于第二SMB分离步骤的装置中的实施方案中,再循环的流速通常为20至60L/min,优选约30L/min。

[0295] 如本领域技术人员将理解的,提及经由各种萃取液和萃余液流收集或移除液体的速率是指在一定量时间内移除的液体体积,通常为L/分钟。类似地,提及液体再循环回装置(通常再循环回装置中的相邻柱)的速率,指的是在一定量时间内再循环的液体体积,通常为L/分钟。

[0296] 在这种“背靠背”SMB方法中,优选实际的移动床色谱法。

[0297] 步进时间,即输入流和洗脱剂的注入点和所收集的级分的各种取出点之间的偏移时间,没有特别的限制,并且将取决于所使用的柱的数量和尺寸以及通过装置的流速。本领域技术人员将能够容易地确定在本发明的方法中使用的适当的步进时间。步进时间通常为100至1000秒,优选200至800秒,更优选约250至约750秒。在一些实施方案中,100至400秒,优选200至300秒,更优选约250秒的步进时间是合适的。在其他实施方案中,600至900秒,优选700至800秒,更优选约750秒的步进时间是合适的。

[0298] “背靠背”SMB方法包括第一和第二SMB分离步骤。

[0299] 这两个步骤可以在单个色谱装置上容易地进行。因此,在一个实施方案中,(a)第一和第二SMB分离步骤在同一色谱装置上顺序进行,第一产物在第一和第二SMB分离步骤之间回收,并且色谱装置中的方法条件在第一和第二SMB分离步骤之间调节,使得PUFA产物在每个分离步骤中与输入流的不同组分分离。这种“背靠背”SMB方法的优选实施方案如图10A所示。因此,在具有8个柱的SMB装置上进行第一SMB分离步骤(左手侧)。在第一和第二SMB分离步骤之间,在例如容器中回收第一产物,调节色谱装置中的方法条件,使得PUFA产物在每个SMB分离步骤中与输入流的不同组分分离。然后在具有8个柱的相同SMB装置上进行第二SMB分离步骤(右手侧)。

[0300] 在实施方案(a)中,调节方法条件通常是指将装置中的方法条件作为一个整体进行调节,即物理地修改装置以使条件不同。它并不是指简单地将第一种产品重新引入同一装置的不同部分,在那里方法条件可能恰好不同。

[0301] 备选地,第一和第二分离色谱装置可以用于第一和第二SMB分离步骤。因此,在另一个实施方案中,(b)第一和第二SMB分离步骤分别在分离的第一和第二色谱装置上进行,从第一SMB分离步骤获得的第一产物被引入第二色谱装置,并且PUFA产物在每个SMB分离步

骤中与输入流的不同组分分离。

[0302] 在实施方案 (b) 中,两个SMB分离步骤可以顺序地或同时地进行。

[0303] 因此,在实施方案 (b) 中,在两个SMB分离步骤顺序地进行的情况下,第一和第二SMB分离步骤分别在分离的第一和第二色谱装置上顺序地进行,第一产物在第一和第二SMB分离步骤之间回收,并且第一和第二SMB色谱装置中的方法条件被调节,使得PUFA产物在每个分离步骤中与输入流的不同组分分离。这种“背靠背”SMB分离方法的优选实施方案如图10B所示。因此,第一SMB分离步骤(左手侧)在具有8个柱(1至8)的SMB装置上进行。在第一和第二SMB分离步骤之间,例如在容器中回收第一产物,然后将其引入第二个单独的SMB装置中。第二SMB分离步骤(右手侧)在具有8个柱(9至16)的第二分离SMB装置上进行。调节两个色谱装置中的方法条件,使得PUFA产物在每个SMB分离步骤中与输入流的不同组分分离。

[0304] 在实施方案 (b) 中,在同时进行两个SMB分离步骤的情况下,第一和第二SMB分离步骤分别在分离的第一和第二色谱装置上进行,第一产物被引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中,并且第一和第二色谱装置中的方法条件被调节,使得PUFA产物在每个SMB分离步骤中与输入流的不同组分分离。这种“背靠背”SMB分离方法的优选实施方案如图10c所示。因此,第一SMB分离步骤(左手侧)在具有8个柱(1至8)的SMB装置上进行。然后将在第一SMB分离步骤中获得的第一产物引入第二SMB分离步骤所用的第二分离色谱装置中。第一产物可以直接或间接地(例如经由容器)从第一SMB分离步骤传递到第二SMB分离步骤。第二SMB分离步骤(右手侧)在具有8个柱(9至16)的第二分离SMB装置上进行。调节两个色谱装置中的方法条件,使得PUFA产物在每个分离步骤中与输入流的不同组分分离。

[0305] 在实施方案 (b) 中,在同时进行两个SMB分离步骤的情况下,洗脱剂在两个单独的色谱装置中单独循环。因此,除了第二SMB分离步骤中纯化的第一产物中作为溶剂存在并被引入在第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中的洗脱剂之外,在两个分离的色谱装置之间不共享洗脱剂。在第一和第二SMB分离步骤中使用的两个分离的色谱装置之间不共享色谱柱。

[0306] 在这种“背靠背”SMB方法中,在第一SMB分离步骤中获得第一产物后,在第二SMB分离步骤纯化第一产物之前,可以部分或完全去除含水有机溶剂洗脱剂。或者,第一产物可以在第二SMB分离步骤中纯化,而不去除任何存在的溶剂。

[0307] 如上所述,在这种“背靠背”SMB方法中,在每个SMB分离步骤中将PUFA产物与输入流的不同组分分离。在实施方案 (a) 中,在第一和第二SMB分离步骤之间调节在两个SMB分离步骤中使用的单个SMB装置的方法条件,使得在每个分离步骤中将PUFA产物与输入流的不同组分分离。在实施方案 (b) 中,在第一和第二SMB分离步骤中使用的两个分离的色谱装置中的方法条件被设定为使得PUFA产物在每个分离步骤中与输入流的不同组分分离。

[0308] 因此,在这种“背靠背”SMB方法中,第一和第二SMB分离步骤中的方法条件不同。这种不同的方法条件可以包括,例如,所使用的柱的尺寸、所使用的柱的数量、在柱中使用的填料、SMB装置的步进时间、装置的温度、在分离步骤中使用的洗脱剂的水与有机溶剂的比例、或在装置中使用的流速,特别是通过萃取液或萃余液流收集的液体的再循环速率。

[0309] 优选地,在这种“背靠背”SMB方法中,可以变化的方法条件是SMB分离步骤中使用的洗脱剂的水:有机溶剂比,和/或SMB分离步骤中经萃取液或萃余液流收集的液体的再循环速率。下面将更详细地讨论这两种选择。

[0310] 在这种“背靠背”SMB方法中,与输入流相比,在第一SMB分离步骤中获得的第一产物通常富含PUFA产物。

[0311] 在这种“背靠背”SMB方法中,将在第一SMB分离步骤中获得的第一产物引入第二SMB分离步骤所用的色谱装置中。

[0312] 在这种“背靠背”SMB方法中,第一种产物通常作为萃余液或萃取液流从第一SMB分离方法中使用的色谱装置中收集。

[0313] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,在第一SMB分离步骤中收集第一产物作为萃余液流,在第二SMB分离步骤中收集第二产物作为萃取液流。因此,在第一SMB分离步骤中收集的萃余液流被用作第二SMB分离步骤的输入流。在第一SMB分离步骤中收集的萃余液流通常包含第二产物以及更多极性组分。

[0314] 或者,在这种“背靠背”SMB方法中,在第一SMB分离步骤中收集第一产物作为萃取液流,在第二SMB分离步骤中收集第二产物作为萃余液流。因此,在第一SMB分离步骤中收集的萃取液流被用作第二SMB分离步骤的输入流。在第一SMB分离步骤中收集的萃取液流通常包含第二产物以及极性较低的组分。

[0315] 在这种“背靠背”SMB方法中,PUFA产品在每个SMB分离步骤中与输入流的不同组分分离。通常,在本发明方法的每个SMB分离步骤中分离的组分具有不同的极性。

[0316] 优选地,在该“背靠背”SMB方法中,在第一SMB分离步骤中将PUFA产物与输入流的极性较低的组分分离,并且在第二SMB分离步骤中将PUFA产物从输入流的极性较高的组分分离。

[0317] 通常在这种“背靠背”SMB方法中:

[0318] (a) 将来自在第一SMB分离步骤中使用的装置的萃取液流的一部分再循环回到在第一SMB分离步骤中使用的装置中;和/或

[0319] (b) 将来自在第一SMB分离步骤中使用的装置的萃余液流的一部分再循环回到在第一SMB方法步骤中使用的装置中;和/或

[0320] (c) 将来自在第二SMB分离步骤中使用的装置的萃取液流的一部分再循环回到在第二SMB分离步骤中所使用的装置中;和/或

[0321] (d) 将来自在第二SMB分离步骤中使用的装置的萃余液流的一部分再循环回到在第二SMB分离步骤中所使用的装置中。

[0322] 优选地,在这种“背靠背”SMB方法中:

[0323] (a) 将来自在第一SMB分离步骤中使用的装置的萃取液流的一部分再循环回到在第一SMB分离步骤中使用的装置中;和

[0324] (b) 将来自在第一SMB分离步骤中使用的装置的萃余液流的一部分再循环回到在第一SMB分离步骤中所使用的装置中;和

[0325] (c) 将来自在第二SMB分离步骤中使用的装置的萃取液流的一部分再循环回到在第二SMB分离步骤中所使用的装置中;和

[0326] (d) 将来自在第二SMB分离步骤中使用的装置的部分萃余液流再循环回到在第二SMB分离步骤中所使用的装置中。

[0327] 这种“背靠背”SMB方法中的再循环包括将第一或第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中的部分萃取液或萃余液流送回到该SMB步骤中所使用的装置中,通常送回到相邻的

柱中。该相邻柱是相对于系统中的洗脱剂流在下游的相邻柱。

[0328] 在这种“背靠背”SMB方法中,在第一或第二SMB分离步骤中通过萃取液或萃余液流收集的液体再循环回该SMB步骤中使用的色谱装置的速率是通过该流收集的液体反馈回该SMB步骤中使用的装置,通常反馈到相邻的柱中,即相对于系统中洗脱剂流的下游柱中的速率。

[0329] 参考图9可以看出这一点。第一SMB分离步骤中萃取液的再循环速率是从第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱2的底部收集的萃取液进料到第一SMB分离步骤中使用的萃取装置的柱3的顶部的速率,即液体进入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱3顶部的流速。

[0330] 在这种“背靠背”SMB方法中,第二SMB分离步骤中萃取液的再循环速率是在第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱2底部收集的萃取液被进料到第二SMB分离步骤中所使用的色谱装置的柱3顶部的速率,即,液体进入第二SMB分离步骤中所用色谱装置的柱3顶部的流速。

[0331] 在该“背靠背”SMB方法中,在第一和/或第二SMB分离步骤中的萃取液和/或萃余液流的再循环通常通过将在此SMB分离步骤经由该流收集的液体进料到容器中,然后将一定量的该液体从容器泵送回到该SMB分离步骤中使用的装置中,通常泵送回相邻的柱中来实现。在这种情况下,在第一和/或第二SMB分离步骤中经由特定萃取液或萃余液流收集的液体的再循环速率(通常返回到相邻的柱中)是液体从容器中泵送回到色谱装置(通常泵送回相邻的柱)中的速率。

[0332] 如本领域技术人员将理解的,在这种“背靠背”SMB方法中,经由洗脱剂和输入流引入色谱装置的液体量与从装置中去除的液体量平衡,并再循环回到装置中。

[0333] 因此,在参照图9的这种“背靠背”SMB装置中,对于萃取液流,洗脱剂(解吸剂)进入第一和第二SMB分离步骤(D)中使用的色谱装置的流速等于在该SMB分离步骤中通过萃取液流收集的液体在容器(E1和E2)中积聚的速率,加上萃取液再循环回该特定SMB分离步骤(D-E1和D-E2)所用色谱装置的速率。

[0334] 在这种“背靠背”SMB方法中,对于来自SMB分离步骤的萃余液流,将萃取液再循环回该特定SMB分离步骤(D-E1和D-E2)中使用的色谱装置中的速率加上将原料引入该特定SMB分离步骤(F和R1)中所用的色谱装置的速率,等于在该特定SMB分离步骤中经由萃余液流收集的液体在容器(R1和R2)中积聚的速率加上萃余液再循环回该具体SMB分离步骤(D+F-E1-R1和D+R1-E2-R2)中所使用的色谱装置中的速率。

[0335] 在这种“背靠背”SMB方法中,从色谱装置的特定萃取液或萃余液流中收集的液体在容器中积聚的速率也可以被认为是从该色谱装置中去除该萃取液或萃余液流的净速率。

[0336] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,调节在第一SMB分离步骤中通过萃取液和萃余液流收集的液体再循环回该分离步骤中使用的装置的速率,使得PUFA产物可以与在每个SMB分离步骤从输入流的不同组分分离。

[0337] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,调节在第二SMB分离步骤中通过萃取液和萃余液流收集的液体再循环回该SMB分离步骤所使用的装置的速率,使得PUFA产物可以与在每个SMB分离步骤从输入流的不同组分分离。

[0338] 优选地,在这种“背靠背”SMB方法中,调节在每个SMB分离步骤中经由萃取液和萃

余液流收集的液体再循环回到该SMB分离步骤所用的装置中的速率,使得PUFA产物可以与在每个SMB分离步骤中与输入流的不同组分分离。

[0339] 典型地,在这种“背靠背”SMB方法中,在第一SMB分离步骤中经由萃取液流收集的液体再循环回在第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的速率不同于在第二SMB分离步骤中将经由萃取液流收集的液体再循环回在第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中的速率,和/或在第一SMB分隔步骤中将经由萃余液流收集到的液体再循环回到在第一SMB分离步骤中使用到的色谱装置内的速率不同于在第二SMB分离步骤中将经由萃余液流收集到的液体再循环回在第二SMB分离步骤使用过的萃取装置内的速率。

[0340] 改变在第一或第二SMB分离步骤中经由萃取液和/或萃余液流收集的液体再循环回到该特定SMB分离步骤所用的装置中的速率具有改变存在于萃取液和萃余液流中的极性更强和极性更低的组分的量的效果。因此,例如,较低的萃取液再循环速率导致SMB分离步骤中较少的极性较低的组分被输送到萃余液流。更高的萃取液循环速率导致SMB分离步骤中更多的极性较低的组分被输送到萃余液流中。

[0341] 例如,这可以在图6中看到。在第一SMB分离步骤中经由萃取液流收集的液体再循环回该SMB分离步骤(D-E1)中使用的色谱装置的速率将影响任一组分A在多大程度上在第一SMB分离步骤(R1)中被输送到萃余液流。

[0342] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,通过第一SMB分离步骤中的萃取液流收集的液体再循环回第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的速率快于通过第二SMB分离步骤通过萃取液收集的液体再循环回到第二SMB分离步骤中使用的萃取装置的速率。优选地,从第一SMB分离步骤收集含有第二产物以及更多极性组分的萃余液流,并在第二SMB分离步骤中进行纯化,并且在第一SMB分离步中经由萃取液流收集的液体再循环回在第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的速率快于在第二SMB分离步骤中经由萃取液流收集的液体再循环回在第二SMB分离步骤中所使用的色谱装置的速率。

[0343] 或者,在这种“背靠背”SMB方法中,通过第一SMB分离步骤中的萃取液流收集的液体再循环回第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的速率慢于通过第二SMB分离步骤的萃取液流收集的液体再循环回到第二SMB分离步骤中使用的萃取装置的速率。

[0344] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,通过第一SMB分离步骤中的萃余液流收集的液体再循环回第一分离步骤中使用的色谱装置的速率快于通过第二SMB分离步骤的萃余物流收集的液体循环回第二SMB分离步骤中使用色谱装置的速度。优选地,从第一SMB分离步骤收集含有第二产物和极性较低组分的萃取液流,并在第二SMB分离步骤中纯化,并且在第一SMB分离步骤中经由萃余液流收集的液体再循环回到在第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的速率快于在第二SMC分离步骤中经由萃余液流收集到的液体再循环回在第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的速率。

[0345] 或者,在这种“背靠背”SMB方法中,通过第一SMB分离步骤中的萃余液流收集的液体再循环回第一SMB分离步中使用的色谱装置的速率慢于通过第二SMB分离步骤的萃余液流收集的液体再循环回第二SMB分离步骤中使用的萃取装置的速率。

[0346] 在这种“背靠背”SMB方法中,调节循环速率以使PUFA产物可以在每个SMB分离步骤中与输入流的不同组分分离,每个SMB分离步骤中使用的洗脱剂的水:有机溶剂比率可以相同或不同。在每个SMB分离步骤中洗脱剂的典型水:有机溶剂比率如上所定义。

[0347] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,每个SMB分离步骤中使用的含水有机溶剂洗脱剂具有不同的水:有机溶剂比率。在每个SMB分离步骤中使用的有机溶剂是相同的。优选调节在每个SMB分离步骤中使用的有机溶剂比率,使得PUFA产物可以在每个SMB分离步骤中从输入流的不同组分分离。

[0348] 在这种“背靠背”SMB方法中,每个SMB分离步骤中使用的洗脱剂的洗脱能力通常不同。优选地,在第一SMB分离步骤中使用的洗脱剂的洗脱能力大于在第二SMB分离步骤使用的洗脱剂的洗脱能力。在实践中,这是通过改变在每个SMB分离步骤中使用的水和有机溶剂的相对量来实现的。

[0349] 根据有机溶剂的选择,它们可能是比水更强的解吸剂。或者,它们的解吸能力可以不如水。例如,乙腈和醇类是比水更强的解吸剂。因此,当含水有机溶剂是含水醇或乙腈时,在第一SMB分离步骤中使用的洗脱剂中的醇或乙腈的量通常大于在第二SMB分离步骤使用的洗脱剂中的醇或者乙腈的量。

[0350] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,第一SMB分离步骤中洗脱剂的水:有机溶剂比率低于第二SMB分离步骤的洗脱液的水:有机溶剂比率。因此,第一SMB分离步骤中的洗脱剂通常比第二SMB分离步骤的洗脱剂含有更多的有机溶剂。

[0351] 应当理解,在上述每个SMB分离步骤中的水和有机溶剂的比率是整个色谱装置内的平均比率。

[0352] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,通过将水和/或有机溶剂引入SMB分离步骤中使用的色谱装置中的一个或多个柱中来控制每个SMB分离步骤中的洗脱剂的水:有机溶剂比率。因此,例如,为了在第一SMB分离步骤中实现比在第二SMB分离步骤更低的水:有机溶剂比率,通常将水比在第二SMB分离步骤更缓慢地引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中。

[0353] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,可以在每个SMB分离步骤中使用的色谱装置的不同点引入基本纯的有机溶剂和基本纯的水。这两种流的相对流速将决定色谱装置中的整体溶剂分布。或者,在这种“背靠背”SMB方法中,可以在每个SMB分离步骤中使用的每个色谱装置的不同点引入有机溶剂和水的不同混合物。这将涉及将有机溶剂和水的两种或多种不同混合物引入特定SMB分离步骤中使用的色谱装置中,每种有机溶剂/水混合物具有不同的有机溶剂:水的比率。该“背靠背”SMB方法中有机溶剂/水混合物的相对流速和相对浓度将决定SMB分离步骤中使用的色谱装置中的总体溶剂分布。

[0354] 优选地,在这种“背靠背”SMB方法中:

[0355] (1) 在第一SMB分离步骤中收集包含第二产物以及更多极性组分的第一产物作为萃余液流,在第二SMB分离步骤中将第二产物作为萃取液流收集;或

[0356] (2) 在第一SMB分离步骤中收集包含第二产物以及极性较小组分的第一产物作为萃取液流,并且在第二SMB分离步骤中将第二产物作为萃余液流收集。

[0357] 选项(1)适用于从输入流中纯化EPA。

[0358] 选项(1)如图2所示。在第一SMB分离步骤中纯化包含第二产物(B)和极性更强的(C)和极性更低的(A)组分的输入流F。在第一SMB分离步骤中,极性较低的组分(A)作为萃取液流E1被去除。收集第二产物(B)和极性更强的组分(C)作为萃余液流R1。萃余液流R1是第一产物,其随后在第二SMB分离步骤中纯化。在第二SMB分离步骤中,将极性更强的组分(C)

作为萃余液流R2除去。收集第二产物(B)作为萃取液流E2。

[0359] 选项(1)如图4所示。图4与图2相同,只是显示了将有机溶剂解吸剂(D)和水(W)引入每个色谱装置的点。有机溶剂解吸剂(D)和水(W)一起构成洗脱剂。(D)相通常是基本上纯的有机溶剂,但在某些实施方案中可以是主要包括有机溶剂的有机溶剂/水混合物。(W)相通常基本上是纯水,但在某些实施方案中可以是主要包括水的有机溶剂/水混合物,例如98%的水/2%的甲醇混合物。

[0360] 选项(1)的进一步说明如图6所示。这里没有单独的水注入点,而是在(D)注入含水有机溶剂解吸剂。

[0361] 在选项(1)中,可以通过改变每个色谱装置内洗脱剂的解吸能力来帮助分离成萃余液和萃取液流。这可以通过在每个色谱装置的不同点引入洗脱剂的有机溶剂(或富含有机溶剂)组分和水(或富含水)组分来实现。因此,通常,相对于系统中的洗脱剂流,有机溶剂被引入萃取液抽取点的上游,而水被引入到萃取液抽取点和进料引入色谱装置的点之间。如图4所示。

[0362] 通常,在选项(1)中,在第一SMB分离步骤中使用的含水有机溶剂洗脱剂比在第二SMB分离步骤使用的洗脱剂含有更多的有机溶剂,即,第一SMB分离步骤中的水:有机溶剂比率低于第二SMB分离步骤中的水:有机溶剂比率。

[0363] 在选项(1)中,SMB分离可以通过改变在第一和第二SMB分离步骤中经由萃取液和萃余液流收集的液体再循环回该SMB分离步骤所使用的色谱装置的速率来辅助。

[0364] 典型地,在选项(1)中,在第一SMB分离步骤中经由萃取液流收集的液体再循环回第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的速率快于在第二SMB分离步骤中将经由萃取液流收集的液体再循环回到第二SMB分离步骤中使用的萃取装置的速率。

[0365] 在选项(1)中,相对于洗脱剂的流动,第一SMB分离步骤中的第一萃余液流通常在输入流引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的点的下游被移除。

[0366] 在选项(1)中,相对于洗脱剂的流动,第一SMB分离步骤中的第一萃取液流通常在输入物流引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的点的上游被移除。

[0367] 在选项(1)中,相对于洗脱剂的流动,第二SMB分离步骤中的第二萃余液流通常在将第一产物引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的点的下游被移除。

[0368] 在选项(1)中,相对于洗脱剂的流动,第二SMB分离步骤中的第二萃取液流通常在将第一产物引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的点的上游收集。

[0369] 通常在选项(1)中,相对于洗脱剂的流动,将有机溶剂或含水有机溶剂引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中,该色谱装置位于第一萃取液流的去除点的上游。

[0370] 通常在选项(1)中,当将水引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中时,相对于洗脱剂的流动,将水引入输入流的引入点的上游但第一萃取液流的去除点的下游的第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中。

[0371] 通常在选项(1)中,相对于洗脱剂的流动,将有机溶剂或含水有机溶剂引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中,该色谱装置位于第二萃取液流的去除点的上游。

[0372] 通常在选项(1)中,当将水引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中时,相对于洗脱剂的流动,将水引入第一产物的引入点的上游但第二萃取液流的去除点的下游的第二SMB分离步骤中所用的色谱装置。

[0373] 选项(2)适用于从输入流中纯化DHA。

[0374] 选项(2)如图3所示。在第一SMB分离步骤中纯化包含第二产物(B)和极性更强的(C)和极性更低的(A)组分的输入流F。在第一SMB分离步骤中,极性更强的组分(C)作为萃余液流R1被去除。收集第二产物(B)和极性较低的组分(A)作为萃取液流E1。萃取液流E1是第一产物,其随后在第二SMB分离步骤中纯化。在第二SMB分离步骤中,极性较低的组分(A)作为萃取液流E2被去除。收集第二产物(B)作为萃余液流R2。

[0375] 选项(2)如图5所示。图5与图3相同,除了显示了将有机溶剂解吸剂(D)和水(W)引入每个色谱装置的点。如上所述,(D)相通常是基本上纯的有机溶剂,但在某些实施方案中可以是主要包括有机溶剂的有机溶剂/水混合物。(W)相通常基本上是纯水,但在某些实施方案中可以是主要包括水的有机溶剂/水混合物,例如98%的水/2%的甲醇混合物。

[0376] 选项(2)的进一步说明如图7所示。这里没有单独的水注入点,而是在(D)注入含水有机溶剂解吸剂。

[0377] 通常在选项(2)中,在第一SMB分离步骤中经由萃余液流收集的液体被重新引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的速率快于在第二SMB分离步骤中将经由萃余物流收集的液体重新引入第二SMB分离步骤中使用的萃取装置的速率。

[0378] 通常在选项(2)中,在第一SMB分离步骤中使用的含水有机溶剂洗脱液比在第二SMB分离步骤使用的洗脱剂含有更少的有机溶剂,即,在第一SMB分离步骤中的水:有机溶剂比率高于在第二SMB分离步骤中的水:有机溶剂比率。

[0379] 通常在选项(2)中,相对于洗脱剂的流动,第一分离步骤中的第一萃余液流通常在输入流引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的点的下游被移除。

[0380] 通常在选项(2)中,相对于洗脱剂的流动,第一SMB分离步骤中的第一萃取液流通常在输入物流引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的点的上游被移除。

[0381] 通常在选项(2)中,相对于洗脱剂的流动,第二SMB分离步骤中的第二萃余液流通常在将第一产物引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的点的下游被移除。

[0382] 通常在选项(2)中,相对于洗脱剂的流动,第二SMB分离步骤中的第二萃取液流通常在将第一产物引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的点的上游收集。

[0383] 通常在选项(2)中,相对于洗脱剂的流动,将有机溶剂或含水有机溶剂引入第一萃取液流的去除点上游的第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中。

[0384] 通常在选项(2)中,相对于洗脱剂的流动,当将水引入在第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中时,将水引入到输入流的引入点的上游但在第一萃取液流的去除点的下游的第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中。

[0385] 通常在选项(2)中,相对于洗脱剂的流动,将有机溶剂或含水有机溶剂引入第二萃取液流的去除点上游的第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中。

[0386] 通常在选项(2)中,当将水引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中时,相对于洗脱剂的流动,将水引入第一产物的引入点的上游但第二萃取液流的去除点的下游的第二SMB分离步骤中所用的色谱装置。

[0387] 在这种“背靠背”SMB方法中,在第一和第二SMB分离步骤中使用的每个模拟或实际的移动床色谱装置优选由八个色谱柱组成。这些被称为柱1到8。在每个装置中,八个柱串联排列,使得柱1的底部与柱2的顶部相连,柱2的底部与柱3的顶部相连……等等……并且柱8

的底部与柱1的顶部相连。这些连接可以任选地通过容纳容器与进入下一个柱的再循环流连接。洗脱剂通过该系统的流动为从柱1到柱2到柱3等。吸附剂通过系统的有效流动为从柱8到柱7到柱6等。

[0388] 如图8所示。将包含第二产物(B)和极性较高(C)和极性较低(A)组分的输入流F引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的柱5的顶部。将有机溶剂解吸剂引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱1的顶部。将水引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱4的顶部。在第一SMB分离步骤中,极性较低的组分(A)作为萃取液流E1从柱2的底部除去。第二产物(B)和极性更强的组分(C)作为萃余液流R1从柱7的底部除去。萃余液流R1是第一产物,其然后通过柱5的顶部引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置,在第二SMB纯化步骤中进行纯化。将有机溶剂解吸剂引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中的柱1的顶部。在第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中将水引入柱4的顶部。在第二SMB分离步骤中,极性更强的组分(C)作为萃余液流R2在柱7的底部被除去。第二产物(B)作为萃取液流E2在柱2的底部被收集。

[0389] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,通常将有机溶剂引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱1顶部。

[0390] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,通常将水引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱4顶部。

[0391] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,通常将有机溶剂引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱1的顶部。

[0392] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,通常将有机溶剂引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱4的顶部。

[0393] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,输入流通常被引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱5的顶部。

[0394] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,第一萃余液流通常作为第一个产物从第一个SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱7底部收集。然后在第二SMB分离步骤中纯化该第一产物,并且通常将其引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱5的顶部。第一萃余液流可任选地在第二SMB分离步骤中纯化之前收集在容器中。

[0395] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,通常从第一个SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱2底部移除第一个萃取液流。可任选地将第一萃取液流收集在容器中,并将其重新引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱3的顶部。

[0396] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,第二次萃余液流通常从第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱7底部移除。

[0397] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,第二萃取液流通常从第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱2底部收集。该第二萃取液流通常包含第二产物。可任选地将第二萃取液流收集在容器中,并将其重新引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱3的顶部。

[0398] 在图8所示的“背靠背”SMB方法中,使用的洗脱剂通常如上所述。

[0399] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的水:有机溶剂比率低于第二SMB分离步骤所使用的色谱装置中的水:有机溶剂比率。因此,第一SMB分离步骤中的洗脱剂通常比第二SMB分离步骤使用的洗脱剂含有更多的有机溶剂。

[0400] 在这种“背靠背”SMB方法中,第一SMB分离步骤中的水与有机溶剂的比率通常为0.5:99.5至1.5:98.5体积份。第二SMB分离步骤中的水与有机溶剂的比率通常为2:98至6:94体积份。

[0401] 在这种“背靠背”SMB方法中,尽管图8的装置配置如图10a所示,但也可以使用图10b和10c所示的配置。

[0402] 这种“背靠背”SMB方法也如图9所示。将包含第二产物(B)和极性较高(C)和极性较低(A)组分的输入流F引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的柱5的顶部。将含水有机溶剂解吸剂引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的柱1的顶部。在第一SMB分离步骤中,极性较低的组分(A)作为萃取液流E1从柱2的底部除去。第二产物(B)和极性更强的组分(C)作为萃余液流R1从柱7的底部除去。萃余液流R1是第一产物,其在第二SMB分离步骤中通过引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱4的顶部而被纯化。将含水有机溶剂解吸剂引入第二SMB分离步骤中使用的色谱装置中的柱1的顶部。在第二SMB分离步骤中,极性更强的组分(C)作为萃余液流R2在柱7的底部被除去。第二产物(B)作为萃取液流E2在柱2的底部被收集。

[0403] 在图9所示的“背靠背”SMB方法中,通常将含水有机溶剂引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱1的顶部。

[0404] 在图9所示的“背靠背”SMB方法中,通常将含水有机溶剂引入第二个SMB分离步骤中使用的色谱装置中的柱9的顶部。

[0405] 在图9所示的“背靠背”SMB方法中,通常将输入流引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的柱5的顶部。

[0406] 在图9所示的“背靠背”SMB方法中,第一个萃余液流通常作为第一个产物从第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱7底部收集。然后在第二SMB分离步骤中纯化该第一产物,并且通常将其引入第二SMB纯化步骤中使用的色谱装置的柱5的顶部。第一萃余液流可任选地在第二SMB分离步骤中纯化之前收集在容器中。

[0407] 在图9所示的“背靠背”SMB方法中,第一个萃取液流通常从第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱2底部移除。可任选地将第一萃取液流收集在容器中,并将一部分重新引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱3的顶部。经由第一SMB分离步骤中的萃取液流收集的液体再循环回到第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的速率是液体从该容器泵送到柱3顶部的速率。

[0408] 在图9所示的“背靠背”SMB方法中,第二萃余液流通常从第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱7底部移除。

[0409] 在图9所示的“背靠背”SMB方法中,通常从第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱2底部收集第二萃取液流。该第二萃取液流通常包含第二产物。可任选地将第二萃取液流收集在容器中,并将一部分重新引入第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的柱3的顶部。经由第二SMB分离步骤的萃取液流收集的液体再循环回第二SMB纯化步骤中使用的色谱装置的速率是液体从该容器泵送到柱3顶部的速率。

[0410] 在图9所示的“背靠背”SMB方法中,使用的洗脱剂如上所定义。

[0411] 通常,在这种“背靠背”SMB方法中,第一SMB分离步骤中使用的色谱装置中的水:有机溶剂比率低于第二SMB分离步骤所使用的色谱设备中的水:有机溶剂比率。因此,第一SMB

分离步骤中使用的洗脱剂通常比第二SMB分离步骤所使用的洗脱剂含有更多的有机溶剂。

[0412] 在这种“背靠背”SMB方法中,第一SMB分离步骤中的水与有机溶剂的比率通常为0.5:99.5至1.5:98.5体积份。第二SMB分离步骤中的水与有机溶剂的比率通常为2:98至6:94体积份。

[0413] 在这种“背靠背”SMB方法中,通过来自第一SMB分离步骤的萃取液流收集的液体再循环回第一SMB分离步骤中使用的色谱装置的速率通常快于通过来自第二SMB分离步骤的萃取液流收集的液体再循环回到第二SMB分离步骤中使用的萃取装置的速率。在这种情况下,含水有机溶剂洗脱剂通常在每个SMB分离步骤中基本相同。

[0414] 在这种“背靠背”SMB方法中,尽管图9的装置配置如图10a所示,但也可以使用图10b和10c所示的配置。

[0415] 通常,本发明的色谱分离涉及至少一种,例如一种,如上所定义的“背靠背”SMB方法。

[0416] 在一个优选实施方案中,本发明的色谱分离方法包括两个不同的色谱分离步骤,以便从进料混合物中获得所需的PUFA产物。因此,在该实施方案中,色谱分离方法包括:

[0417] (i) 在第一色谱分离步骤中使用水和第一有机溶剂的混合物作为洗脱剂纯化进料混合物,以获得中间产物;和

[0418] (ii) 在第二色谱分离步骤中使用水和第二有机溶剂的混合物作为洗脱剂纯化中间产物,以获得PUFA产物。

[0419] 典型地,在该实施方案中,第二有机溶剂不同于第一有机溶剂。这种所谓的“混合溶剂”方法在从所需PUFA产物中去除C18杂质方面特别有效,并在WO 2014/10686中进行了描述,其全部内容通过引用并入本文。

[0420] 在不使用大量的含水醇溶剂的情况下,很难有效地从进料混合物中去除C18脂肪酸,特别是 α -亚麻酸(ALA)和/或 γ -亚麻酸(GLA)。有效去除C18脂肪酸是有利的,因为许多药物和膳食油的规格要求这些脂肪酸的含量低。例如,在日本使用的某些油规格要求ALA含量小于1重量%。因此,这种“混合溶剂”方法特别有用,因为它可以用于从进料混合物中有效回收PUFA产品,同时最大限度地减少所得产品中存在的C18脂肪酸,例如ALA和/或GLA的量。C18脂肪酸是具有直链或支化烃链的C18脂族单羧酸。典型的C18脂肪酸包括硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1n9)、异油酸(C18:1n7)、亚油酸(C18:2n6)、 γ -亚麻酸/GLA(C18:3n6), α -亚麻酸/ALA(C18:3n3)和十八碳四烯酸/SDA(C18:4n3)。

[0421] 为避免疑义,通常在这种“混合溶剂”方法中,第一个色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,即色谱装置包括本文所述C18键合的二氧化硅作为固体吸附剂相。通常,在这种“混合溶剂”方法中,第二个色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,即色谱装置包括作为固体吸附剂相的C18键合的二氧化硅,如本文所述。

[0422] 优选地,在该“混合溶剂”方法中,第一和第二色谱分离步骤均在本文所述的色谱装置中进行,即在小于20巴的压力下操作并包含本文所述C18键合的二氧化硅作为固体吸附剂相的色谱装置。然而,在这种“混合溶剂”方法的备选实施方案中,第一和/或第二色谱分离步骤中只有一个在本文所述的色谱装置中进行,而另一个分离步骤在具有不同固体吸附剂相和/或操作压力的色谱装置中进行。

[0423] 因此,在“混合溶剂”方法的该实施方案中,通常第一色谱分离步骤在本文所述的

色谱装置中进行,即在低于20巴的压力下操作并包含本文所述C18键合的二氧化硅作为固体吸附剂相的色谱装置,并且第二色谱步骤在具有不同固体吸附剂相的色谱装置中进行,所述不同固体吸附剂相例如替代二氧化硅,例如替代C18键合的二氧化硅、C8键合的二氧化硅、纯二氧化硅、氰基键合的二氧化硅和苯基键合的二氧化硅,或者非二氧化硅基固体吸附剂相。或者,第一色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,第二色谱步骤在大于20巴的压力下操作的色谱装置内进行。或者,第一色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,第二色谱步骤在具有不同固体吸附剂相(例如,替代二氧化硅、替代C18键合的二氧化硅、C8键合的二氧化硅、纯二氧化硅、氰基键合的二氧化硅和苯基键合的二氧化硅,或者非二氧化硅基固体吸附剂相)、在大于20巴的压力下操作的色谱装置内进行。

[0424] 或者,在“混合溶剂”方法的该实施方案中,第二色谱分离步骤可以在本文所述的色谱装置,即在小于20巴的压力下操作并包括本文所述C18键合二氧化硅作为固体吸附剂相的色谱装置中进行,并且第一色谱步骤在具有不同固体吸附剂相(例如,替代二氧化硅、替代C18键合的二氧化硅、C8键合的二氧化硅、纯二氧化硅、氰基键合的二氧化硅和苯基键合的二氧化硅,或者非二氧化硅基固体吸附剂相)的色谱装置内进行。或者,第二色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,第一色谱步骤在大于20巴的压力下操作的色谱装置内进行。或者,第二色谱分离步骤在本文所述的色谱装置中进行,并且第一色谱步骤在具有不同固体吸附剂相(例如,替代二氧化硅、替代C18键合的二氧化硅、C8键合的二氧化硅、纯二氧化硅、氰基键合的二氧化硅和苯基键合的二氧化硅,或者非二氧化硅基固体吸附剂相)、在大于20巴的压力下操作的色谱装置内进行。

[0425] 通常在这种“混合溶剂”方法中,第一和第二色谱分离步骤在不同的色谱装置中进行。或者,第一和第二色谱分离步骤在相同的色谱装置中进行。

[0426] 通常在这种“混合溶剂”方法中,第二有机溶剂的极性指数与第一有机溶剂的极性指数相差2.0或更小。因此,在第一有机溶剂的极性指数为P1的情况下,第二有机溶剂的极性指数为P2, $|P1 - P2|$ 不超过2.0。溶剂的极性指数(P')是衡量溶剂极性的一个众所周知的指标。极性指数越高表示溶剂的极性越强。极性指数通常通过测量溶剂与各种测试溶质相互作用的能力来确定。更典型地,溶剂的极性指数(P')如Burdick和Jackson的Solvent Guide (AlliedSignal, 1997)中所定义,其全部内容通过引用并入本文。Burdick和Jackson通过参考根据溶剂的不同极性对溶剂进行排序的数字指数对溶剂进行排序。Burdick和Jackson指数基于溶剂的结构。

[0427] 优选地,在这种“混合溶剂”方法中,第二有机溶剂的极性指数与第一有机溶剂的极性指数相差0.1至2.0。例如,第二有机溶剂可以具有与第一有机溶剂的极性指数相差至少0.2、至少0.3、至少0.4、至少0.5或至少0.6的极性指数。例如,第二有机溶剂可以具有与第一有机溶剂的极性指数相差至多1.8、至多1.5、至多1.3、至多1.0或至多0.8的极性指数。例如,第二有机溶剂可以具有与第一有机溶剂的极性指数相差0.2至1.8、0.3至1.5、0.4至1.3、0.5至1.0或0.6至0.8的极性指数。

[0428] 在这种“混合溶剂”方法中,第一和第二有机溶剂可以是本文公开的任何有机溶剂。然而,典型地,第一和第二有机溶剂可与水混溶。更典型地,第一和第二有机溶剂具有3.9或更大的极性指数。优选地,第一和第二有机溶剂选自四氢呋喃、异丙醇、正丙醇、甲醇、乙醇、乙腈、1,4-二噁烷、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷。

[0429] 通常在这种“混合溶剂”方法中,第一有机溶剂与水的比率为99.9:0.1至75:25体积份,优选99.5:0.5至80:20体积份。如果第一有机溶剂是甲醇,则甲醇与水的比率通常为99.9:0.1至85:15体积份,优选99.5:0.5至88:12体积份。如果第一有机溶剂是乙腈,则乙腈与水的比率通常为99:1至75:25体积份,优选96:4至80:20体积份。

[0430] 通常在这种“混合溶剂”方法中,第二有机溶剂与水的比率为99.9:0.1-75:25体积份,优选93:7-85:15体积份。如果第二有机溶剂是甲醇,则甲醇与水的比率通常为95:5至85:15体积份,优选93:7至90:10体积份。如果第二有机溶剂是乙腈,则乙腈与水的比率通常为90:10至80:20体积份,优选88:12至85:15体积份。

[0431] 通常在这种“混合溶剂”方法中,第一和第二有机溶剂之一是乙腈。

[0432] 通常在这种“混合溶剂”方法中,第一和第二有机溶剂之一是甲醇。

[0433] 优选地,在该“混合溶剂”方法中,第一和第二有机溶剂选自乙腈和甲醇。因此,优选(i)第一有机溶剂是甲醇并且第二有机溶剂是乙腈,或者(ii)第一有机溶剂是乙腈并且第二有机溶剂是甲醇。

[0434] 更优选地,在该“混合溶剂”方法中,第一有机溶剂是甲醇,第二有机溶剂是乙腈,并且(a)甲醇:水的比率为99.9:0.1-85:15体积份,优选99.5:0.5-88:12,和/或(b)乙腈:水的比率为90:10-80:20体积份,优选88:12-85:15体积份。在某些实施方案中,优选(a)甲醇:水的比率为91:9至93:7体积份,和/或(b)乙腈:水的比率为86:14至88:12体积份。

[0435] 或者,在该“混合溶剂”方法中,第一有机溶剂为乙腈,第二有机溶剂为甲醇,并且(a)乙腈:水的比率为99:1至75:25体积份,优选96:4至80:20体积份,和/或(b)甲醇:水的比率为95:5至85:15体积份、优选93:7至90:10体积份。在某些实施方案中,优选(a)乙腈:水的比率为86:14至88:12体积份,和/或(b)甲醇:水的比率为87:13至89:11体积份。

[0436] 通常在这种“混合溶剂”方法中,第一有机溶剂是乙腈,并且中间产物具有比进料混合物更低浓度的一种或多种上述公开的C18脂肪酸杂质。或者,在这种“混合溶剂”方法中,第二有机溶剂是乙腈,并且在第二分离步骤中产生的PUFA产物具有比中间产物更低浓度的一种或多种上述公开的C18脂肪酸杂质。

[0437] 优选地,在该“混合溶剂”方法中,PUFA产物是EPA乙酯,并且(i)第一有机溶剂是乙腈,并且中间产物具有比进料混合物更低浓度的一种或多种以上公开的C18脂肪酸杂质,或者(ii)第二有机溶剂是乙腈,并且在第二分离步骤中产生的PUFA产物具有比中间产物更低浓度的一种或更多种以上公开的C18脂肪酸杂质。

[0438] 更优选地,在该“混合溶剂”方法中,PUFA产物是EPA乙酯,并且(i)第一有机溶剂是乙腈,第二有机溶剂是甲醇,并且中间产物具有比进料混合物更低浓度的一种或多种以上公开的C18脂肪酸杂质,或者(ii)第一有机溶剂是甲醇,第二有机溶剂是乙腈并且在第二分离步骤中产生的PUFA产物具有比中间产物更低浓度的以上公开的一种或者多种C18脂肪酸杂质。

[0439] 任何已知的色谱装置都可以用于这种“混合溶剂”方法。典型地,第一和/或第二分离步骤使用本文所述的固定床色谱装置或一个或多个模拟或实际移动床色谱装置进行。

[0440] 通常在这种“混合溶剂”方法中,第一色谱分离步骤包括将进料混合物引入固定床色谱装置,第二色谱分离步骤包含将中间产物引入固定床萃取装置。因此,通常在这种“混合溶剂”方法中,第一色谱分离步骤使用固定床色谱装置进行,第二色谱分离步使用固定床

色谱装置进行。

[0441] 或者,在这种“混合溶剂”方法中,第一色谱分离步骤包括将进料混合物引入固定床装置,第二色谱分离步骤包含将中间产物引入模拟的或实际移动床色谱装置。因此,通常在这种“混合溶剂”方法中,第一个色谱分离步骤使用固定床装置进行,第二个色谱分离步骤使用模拟或实际的移动床色谱装置进行。

[0442] 或者,在这种“混合溶剂”方法中,第一色谱分离步骤包括将进料混合物引入模拟或实际的移动床色谱装置,第二色谱分离步骤包含将中间产物引入固定床色谱装置。因此,通常在这种“混合溶剂”方法中,第一个色谱分离步骤使用模拟或实际的移动床色谱装置进行,第二个色谱分离阶段使用固定床色谱装置。

[0443] 或者,在这种“混合溶剂”方法中,第一色谱分离步骤包括将进料混合物引入模拟或实际的移动床色谱装置,第二色谱分离步骤包含将中间产物引入模拟或实际的移动床萃取装置。因此,通常在这种“混合溶剂”方法中,第一色谱分离步骤使用模拟或实际的移动床色谱装置进行,第二色谱分离步骤则使用模拟或真实的移动床萃取装置进行。

[0444] 在这种“混合溶剂”方法中,所述第一色谱分离步骤可以由一次色谱分离或两次或多次色谱分离组成,前提是每次分离使用水和第一有机溶剂的混合物作为洗脱剂。

[0445] 在这种“混合溶剂”方法中,所述第二色谱分离步骤可以由单次色谱分离或两次或多次色谱分离组成,前提是每次分离使用水和第二有机溶剂的混合物作为洗脱剂。

[0446] 在这种“混合溶剂”方法中,第一和第二分离步骤可以在相同的温度或不同的温度,优选相同的温度下进行。

[0447] 通常,在这种“混合溶剂”方法中,每个色谱分离步骤都涉及使进料混合物通过一个或多个色谱柱,并且这些色谱柱中至少一个的温度高于室温。更典型地,所使用的所有色谱柱的温度都高于室温。优选的温度如上所述。

[0448] 在这种“混合溶剂”方法中,当第一和/或第二色谱分离步骤在模拟移动床装置中进行时,第一和/或者第二色谱分离步骤中的至少一个通常涉及至少一个,例如一个如上所述的“单程”SMB步骤。

[0449] 在这种“混合溶剂”方法中,当第一和/或第二色谱分离步骤在模拟移动床装置中进行时,第一和/或者第二色谱分离步骤中的至少一个通常涉及至少一个,例如一个如上所述的“双程”SMB步骤。

[0450] 在“混合溶剂”方法中,在操作SMB分离的“双程”模式的上下文中,上述“输入流”指的是当在第一色谱分离步骤中使用上述SMB方法时的进料混合物,并且指的是在第二色谱分离步骤使用上述SMB方法时的中间产物。

[0451] 在“混合溶剂”方法中,在操作SMB分离的“双程”模式的上下文中,上文提及的“含水有机溶剂”是指当在第一色谱分离步骤中使用上述SMB方法时水和第一有机溶剂的混合物,并且是指当第二色谱分离步骤使用上述SMB方法时水和第二有机溶剂的混合物。

[0452] 在这种“混合溶剂”方法中,当第一和/或第二色谱分离步骤在模拟移动床装置中进行时,第一和/或者第二色谱分离步骤中的至少一个通常涉及如上所述的“背靠背”SMB方法。

[0453] 为避免疑义,在“混合溶剂”方法中,如果第一色谱分离步骤是沿着上述路线的“背靠背”SMB方法,则每个SMB步骤中的洗脱剂是水和第一种有机溶剂的混合物。如果第二色谱

分离步骤是沿着上述路线的“背靠背”SMB方法,则每个SMB步骤中的洗脱剂是水和第二有机溶剂的混合物。

[0454] 在“混合溶剂”方法中,在SMB分离的“背靠背”操作模式的上下文中,上述“输入流”指的是当在第一色谱分离步骤中使用上述SMB方法时的进料混合物,并且指的是在第二色谱分离步骤使用上述SMB方法时的中间产物。

[0455] 在“混合溶剂”方法中,在SMB分离的“背靠背”操作模式的上下文中,上文提及的“含水有机溶剂”是指当在第一色谱分离步骤中使用上述“背靠背”SMB方法时水和第一有机溶剂的混合物,并且当在第二色谱分离步骤使用上述“背靠背”SMB方法时指水和第二有机溶剂的混合物。在第一和第二SMB步骤中使用的有机溶剂是相同的。在第一和第二SMB步骤中使用的有机溶剂:水的比例可以相同或不同。

[0456] 在“混合溶剂”方法中,在SMB分离的“背靠背”操作模式的上下文中,上文提及的“第二产物”是指当在第一色谱分离步骤中使用上述SMB方法时的中间产物,以及当在第二色谱分离步骤使用上述SMB方法时的PUFA产物。

[0457] 优选在“混合溶剂”方法中,PUFA产物是EPA乙酯,并且:

[0458] (i) 所述第一有机溶剂是乙腈,所述第二有机溶剂是甲醇,并且所述第一色谱分离步骤包括将所述进料混合物引入固定床装置中,并且第二色谱分离步骤包括将所述中间产物引入模拟或实际移动床色谱装置中;或

[0459] (ii) 所述第一有机溶剂是甲醇,所述第二有机溶剂是乙腈,所述第一色谱分离步骤包括将所述进料混合物引入模拟或实际的移动床色谱装置中,并且第二色谱分离步骤包含将所述中间产物引入固定床色谱装置。

[0460] 甚至更优选在这种“混合溶剂”方法中,PUFA产物是EPA乙酯,并且:

[0461] (i) 所述第一有机溶剂是乙腈,所述第二有机溶剂是甲醇,所述中间产物具有比所述进料混合物更低浓度的一种或多种以上公开的C18脂肪酸杂质,并且所述第一色谱分离步骤包括将所述进料混合物引入到固定床装置中,且所述第二色谱分离步骤包括将所述中间产物引入模拟或实际移动床色谱装置中;或

[0462] (ii) 第一有机溶剂是甲醇,第二有机溶剂是乙腈,在第二分离步骤中产生的PUFA产物具有比中间产物更低浓度的一种或多种以上公开的C18脂肪酸杂质,并且第一色谱分离步骤包括将进料混合物引入模拟或实际的移动床色谱装置,并且第二色谱分离步骤包括将中间产物引入固定床色谱装置。

[0463] 以下实施例说明了本发明。

[0464] 实施例

[0465] 实施例1:不同二氧化硅的颗粒表征

[0466] 选择四种不同的二氧化硅进行测试。首先如下所述测量这些二氧化硅中每一种的物理参数。结果整理在表1中。所有的二氧化硅都是市售的,并且都是从各自的供应商处获得的。选择二氧化硅1作为参考实例,其它三种二氧化硅是根据本发明使用的二氧化硅的实例。

[0467] 表1:五种不同规格二氧化硅物理性能的比较

二氧化硅	1 (参考实例)	2	3	4
碳负载(%)	24.9	19.8	20.1	17.8
表面积 (m ² /g)	542	417	519	339
[0468] Dv(10) (μm)	150	150	168	187
D[4,3] (μm)	228	248	251	257
Dv(90) (μm)	320	365	347	339
堆积密度 (kg/dm ³)	0.713	0.543	0.671	0.654

[0469] 通过燃烧分析确定碳负载百分比。

[0470] 表面积是未键合的二氧化硅(即未结合到十八烷基碳链)的表面积的量度。它是通过BET表面积分析在孔隙率实验中确定的。

[0471] 通过激光衍射测定Dv(10)、D[4,3]和Dv(90)。使用Malvern Mastersizer2000仪器在水性悬浮液中进行测量。

[0472] 图12显示了对于不同C18二氧化硅类型,对二氧化硅样品颗粒体积作为颗粒直径的函数的总贡献。这些是对每个样品的颗粒分布的测量。

[0473] 图12A比较了二氧化硅1(2个单独批次)和二氧化硅2的颗粒分布。可以观察到,这两种二氧化硅都含有显著数量的直径为10至100μm的较小颗粒(注意,尽管这些颗粒对应的峰值很小,但y轴反映的是这些颗粒对整个样品的总体积贡献,而不是存在的该直径颗粒的总数量;由于这些颗粒很小,它们对总体积的贡献很小,但是它们的数量是显著的)。因此,这些二氧化硅具有广泛的颗粒分布,具有较小颗粒的显著“尾部”。

[0474] 图12B比较了二氧化硅1(2个独立批次)、二氧化硅3和二氧化硅4的颗粒分布。可以观察到,与二氧化硅1相比,二氧化硅3和二氧化硅4都含有可忽略不计数量的直径为10至100μm的小颗粒。这反映在表1中二氧化硅3和二氧化硅4的Dv(10)值高于二氧化硅1。还可以看出,总体而言,二氧化硅3和二氧化硅4具有比二氧化硅1显著更窄的粒度分布。

[0475] 通过记录填充到具有限定体积的柱中的材料的重量来确定颗粒堆积密度。

[0476] 还获得了二氧化硅1、2和3的光学显微镜图像,并在图13显示。从图13A和13B中可以看出,二氧化硅1和2含有破碎的颗粒,存在许多直径较小的颗粒。相反,二氧化硅3(图13C)没有显示出破碎颗粒的证据,并且具有更均匀的粒度分布。

[0477] 实施例2:使用不同二氧化硅的峰值分辨率和压降的比较

[0478] 将鱼油衍生原料(包含约74GC面积%EPA和约10GC面积%DHA)脉冲注射到由3个串联柱组成的单个固定床色谱装置上,每个柱的直径为10mm,长度为250mm。依次使用表2中列出的每种二氧化硅作为固定相,并使用甲醇:水(90:10)的混合物作为洗脱剂。

[0479] 操作参数和流速如下:

[0480] 饲料混合物脉冲:溶解在甲醇中的0.5mL 25wt.-%的鱼油衍生原料

[0481] 洗脱剂进料速率(D1):7mL/min 90:10体积%的甲醇:水

[0482] 在每个柱脉冲实验中,测量以下参数:

- [0483] • 沿着柱的压降(使用二氧化硅1作为参考的实验);
- [0484] • EPA相对于参考实验的保留时间;
- [0485] • α SDA/EPA峰的选择性(即保留时间的差异);
- [0486] • α DHA/EPA峰的选择性;
- [0487] • EPA峰的不对称性;和
- [0488] • EPA峰的等效理论板(HETP)的高度。

[0489] 结果如表2所示(所用的每种二氧化硅均符合表1中的规格;为简洁起见,使用了每种二氧化硅的缩短参考名称)。

[0490] 表2:使用含EPA的进料混合物的脉冲实验中五种二氧化硅样品每一种的性能比较

二氧化硅	1(参考样品)	2	3	4
相对于参考的压降	100%	88%	115%	70%
选择性 α SDA/EPA	0.76	0.75	0.75	0.75
[0491] 选择性 α DHA/EPA	1.34	1.35	1.38	1.32
EPA峰的不对称性	1.25	1.18	1.08	1.04
EPA 峰的HETP (cm)	3.28	1.96	1.86	1.32

[0492] 与参考实例相比,所有测试的二氧化硅在色谱装置的长度上都表现出可接受的压降。与二氧化硅1相比,二氧化硅2和4在装置的整个长度上导致更低的压降,其中二氧化硅4在这方面是特别有利的。

[0493] 所有测试的二氧化硅都证明EPA峰相对于DHA和SDA峰具有可接受的选择性。将选择性计算为相关的一对峰的保留时间的比率。

[0494] EPA峰的峰不对称性(A_s)是通过将峰中心之后的峰宽度除以10%峰高处的峰中心之前的峰宽度来确定的。与参考实例(二氧化硅1)相比,所有测试的二氧化硅都显示出改进的EPA峰的对称性。因此,这些二氧化硅中的每一种都提供了EPA的改进的峰形状,因为更对称的峰意味着EPA峰不会“拖尾”太多到其他峰中。这允许更有效的分离,因为需要更少的洗脱剂(即更低的洗脱剂稀释度)来获得具有特定纯度的所需产物的高产率。

[0495] 图14显示了每种二氧化硅1、2和4的EPA峰不对称性的图形表示,根据该图形计算了表2中的值。

[0496] 使用以下方程式计算HETP值:

$$[0497] \quad N = 5.545 \left(\frac{t_R}{\omega_h} \right)^2 \text{ 和 } HETP = \frac{L}{N}$$

[0498] 其中:

[0499] N=理论板的数目

[0500] T_R =保留时间

[0501] ω_R =在半高度处的峰宽度(以时间为单位)

[0502] L=柱的长度(mm)

[0503] 理论板的数目是一个数学概念,因为色谱柱不包含任何类似于物理蒸馏塔板或其

他类似特征的东西。具有高板数的柱被认为是更有效的；具有高数量理论板的柱在给定的保留时间将比具有较低N值(即较低HETP)的柱具有更窄的峰。因此,低的HETP值指示导致更高的柱效率的良好分辨的峰,这意味着需要更少的洗脱剂来获得具有特定纯度的所需产物的高产率。

[0504] 与参考二氧化硅1相比,所有测试二氧化硅2至4都显示出改进的HETP。

[0505] 从表1和表2中的数据可以得出以下结论:

[0506] • 具有更均匀粒度分布的二氧化硅,特别是那些具有少量特别小颗粒(反映在Dv(10)值中)的二氧化硅,显示出PUFA峰的分辨率提高。这可以从具有非常相似的碳负载量的二氧化硅2和3的HETP值的比较中看出。

[0507] • 碳负载量较低的二氧化硅显示出PUFA峰的分辨率有所提高。这可以从二氧化硅1和2的HETP值的比较中看出,这两种二氧化硅都具有相似的颗粒分布,具有小颗粒的“尾部”,然而二氧化硅2的HETP值明显低于二氧化硅1的HETP值。同样,二氧化硅3和4具有相似的粒度分布,但二氧化硅4具有较低的碳负载量和改进的HETP值。

[0508] • 具有较低表面积的二氧化硅显示出PUFA峰的分辨率的提高。通常,在碳负载量和总表面积之间观察到正相关。

[0509] 实施例3:使用二氧化硅4通过SMB的低压EPA分离与HPLC/批处理的比较

[0510] 在具有8个柱(每个柱具有1.6cm的直径和25cm的长度)的减压操作的SMB方法中,使用二氧化硅4对含有EPA的原料进行三次纯化,并与文献中报道的使用各种二氧化硅的分批/HPLC分离进行比较。测量每种方法的生产率和洗脱剂稀释度。结果如表3所示。

[0511] 三次纯化中的每一次都使用单程SMB或双程SMB进行,同时具有“快速”切割(第一程)和“慢速”切割(第二程),以分别去除比EPA更快和更慢的运行组分。每次纯化的操作参数如下:

[0512] 测试运行A

[0513] 原料:92GC面积%EPA酯含量

[0514] 所需产品:97GC面积%EPA酯

[0515] 方法:单程SMB

[0516] 洗脱剂:甲醇:水(91:9)

[0517] 温度:40°C

[0518] 压力:<10巴

[0519] 进料混合物进料速率(F):0.5mL/min的溶于甲醇中的50wt.-%的鱼油原料

[0520] 洗脱剂进料速率(D):17.3mL/min

[0521] 萃取液速率:13.2mL/min

[0522] 萃余液速率:4.6mL/min

[0523] 测试运行B

[0524] 原料:74GC面积%EPA酯含量

[0525] 所需产品:97GC面积%EPA酯

[0526] 方法:双程SMB

[0527] 洗脱剂(慢速切割):甲醇:水(91:9)

[0528] 洗脱剂(快速切割):甲醇:水(90:10)

- [0529] 温度:40°C
- [0530] 压力:<10巴
- [0531] 第一程
- [0532] 进料混合物进料速率(F1):0.5mL/min的溶于甲醇中的50wt.%鱼油原料
- [0533] 洗脱剂进料速率(D1):22.0mL/min
- [0534] 萃取液速率(E1):14.8mL/min
- [0535] 萃余液速率(R1):7.7mL/min
- [0536] 第二程
- [0537] 进料混合物进料速率(F2):1.0mL/min的溶于甲醇的50wt.%的来自慢速切割的萃余液
- [0538] 洗脱剂进料速率(D2):13.5mL/min
- [0539] 萃取液速率(E2):12.3mL/min
- [0540] 萃余液速率(R2):2.3mL/min
- [0541] 测试运行C
- [0542] 原料:74GC面积%EPA乙酯含量
- [0543] 所需产品:97GC面积%EPA乙酯
- [0544] 方法:双程SMB
- [0545] 洗脱剂(慢速切割):甲醇:水(90:10)
- [0546] 洗脱剂(快速切割):甲醇:水(91:9)
- [0547] 温度:40°C
- [0548] 压力:<6巴
- [0549] 第一程
- [0550] 进料混合物进料速率(F1):0.35mL/min的溶于甲醇中的50wt.%鱼油原料
- [0551] 洗脱剂进料速率(D1):13.9mL/min
- [0552] 萃取液积累速率(E1):10.1mL/min
- [0553] 萃余液积累速率(R1):4.2mL/min
- [0554] 第二程
- [0555] 进料混合物进料速率(F2):0.7mL/min的溶于甲醇的50wt.%的来自慢速切割的萃余液
- [0556] 洗脱剂进料速率(D2):8.9mL/min
- [0557] 萃取液速率(E2):8.5mL/min
- [0558] 萃余液速率(R2):1.1mL/min
- [0559] 从表3中可以看出,本发明的色谱分离方法导致每kg EPA产品的溶剂稀释度显著降低,即与所有使用更高操作压力的现有技术方法相比,需要更少溶剂的明显更有效的分离。同时,保持了合理的生产率水平,这是令人惊奇的,因为本领域通常已知,在降低的操作压力下,通常观察到色谱分离生产率降低高达十倍。
- [0560] 还值得注意的是,使用这种具有如此大的平均粒径的二氧化硅可以获得如此低的稀释水平和高产率的EPA产物。本领域通常已知,较大的颗粒尺寸导致较大的HETP和峰值分辨率的损失。因此,本发明人发现,可以使用具有较大平均粒径的某些类型的二氧化硅,并

且在PUFA生产中仍然实现高产率和可接受的生产率,并且还提供较低的溶剂稀释度,这是令人惊奇的。

[0561]

表3: 根据本发明的EPA色谱分离和比较性现有技术分离的操作参数和输出生产率、稀释度和产率

实例	A	B	C	D (参考)	比较1 Novasep Cyclojet	比较2 Novasep Varicol	比较3 Nissui
现有技术参考	-	-	-	-	US 9,802,882 Ex. 1a/2a	US 9,802,882 Ex. 1b/2b	US 5,840,944
分离类型	SMB	SMB	SMB	SMB	批/HPLC	Varicol (SMB)	批
二氧化硅	4	4	4	1	C18 粒度 20 μ m	C18 粒度 20 μ m	C18 粒度 10-20 μ m
压力	<10 巴	<10 巴	<6 巴		HPLC	HPLC	HPLC
单程							
溶剂	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
生产率 (kg _{EPA} /kg _{ads} /天)	0.93	0.80	0.55	0.26	2.76	2.46	0.38
稀释度(L _{solvent} /kg _{EPA})	97	141	131	197	224	258	1204
EPA 回收(产率)	>97%	>98%	>98%	92%	95%	95%	85%
双程							
溶剂	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	MeOH:H ₂ O	丙酮:H ₂ O	丙酮:H ₂ O	-
生产率(kg _{EPA} /kg _{ads} /天)	-	2.04	1.47	0.39	3.58	3.35	-
稀释度(L _{solvent} /kg _{EPA})	-	35.2	32.0	96	153	0	-
EPA 回收(产率)	-	>99%	>99%	98%	95%	95%	-
生产率 (kg _{EPA} /kg _{ads} /天)	0.93	0.58	0.40	0.16	1.56	1.42	0.38
稀释度(L _{solvent} /kg _{EPA})	97	176	163	293	377	258	1204
EPA 回收(产率)	>97.0%	>97.0%	>97.0%	90%	90.3%	90.3%	85.0%

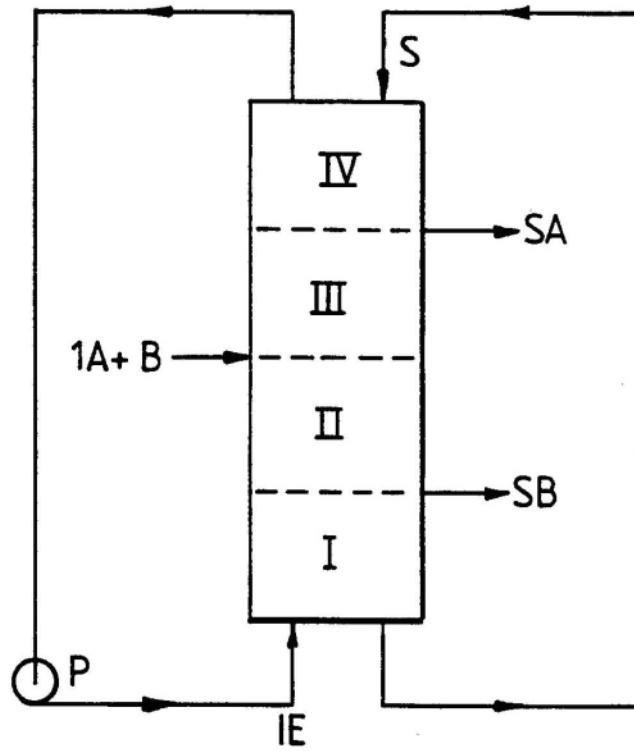


图1

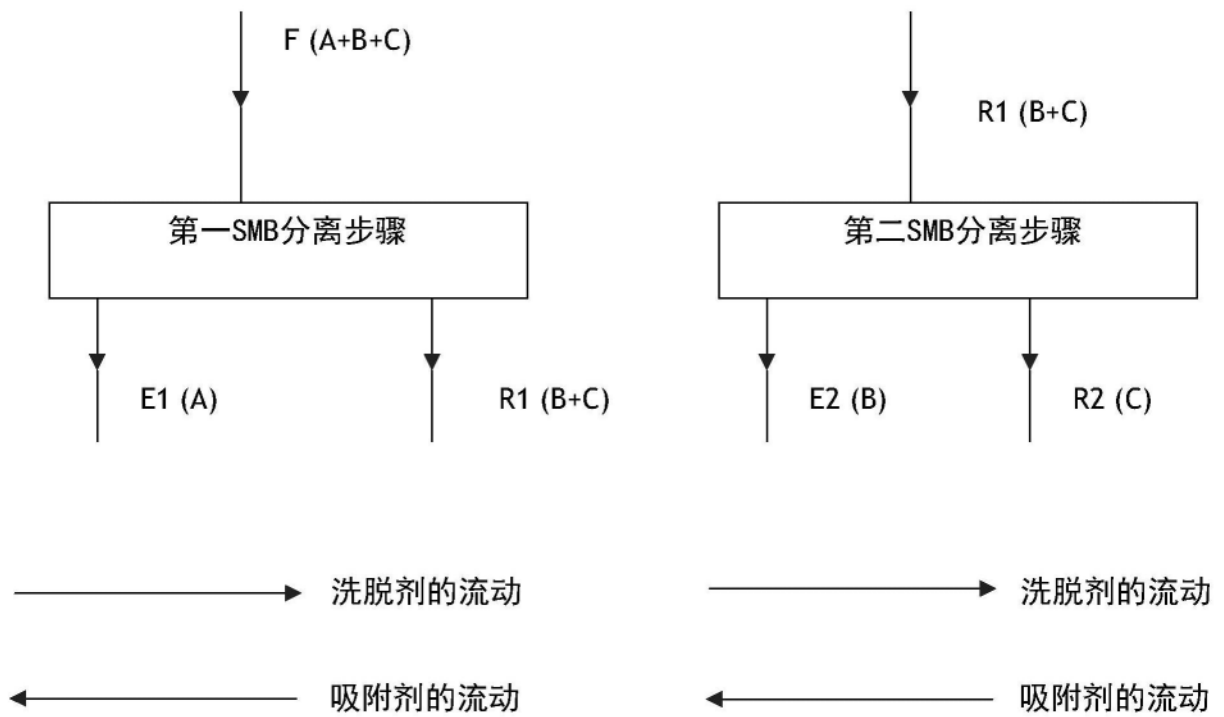


图2

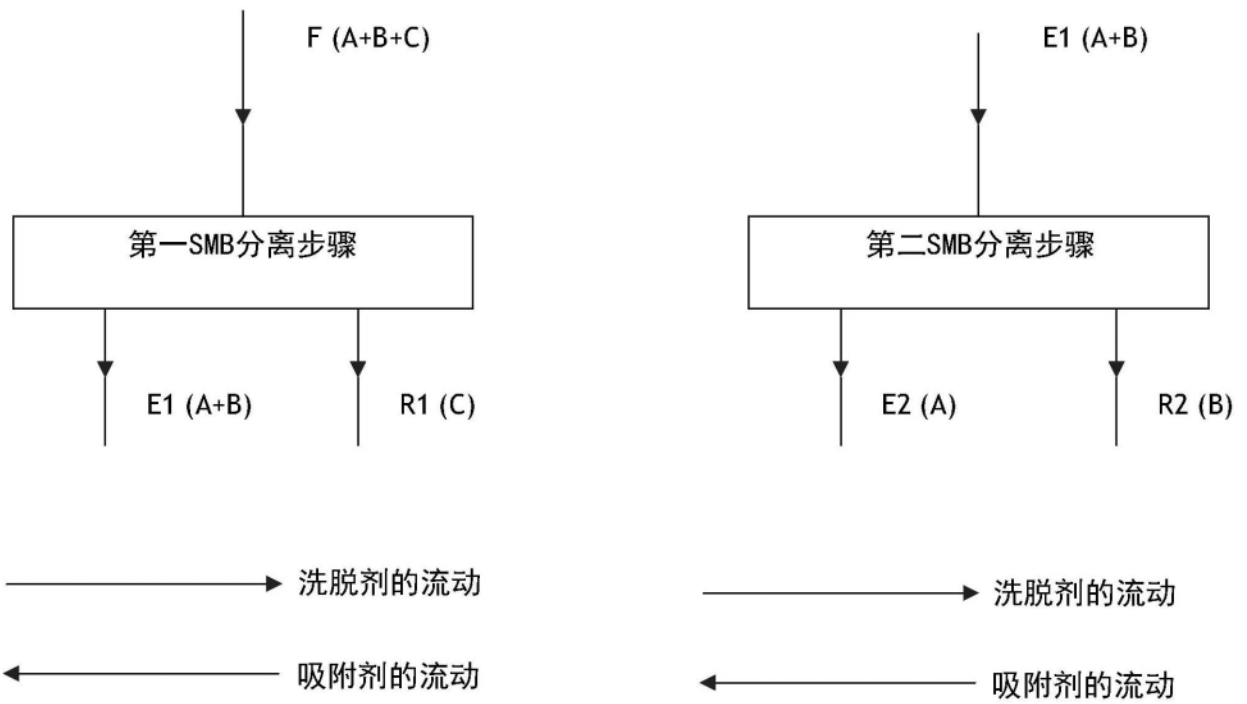


图3

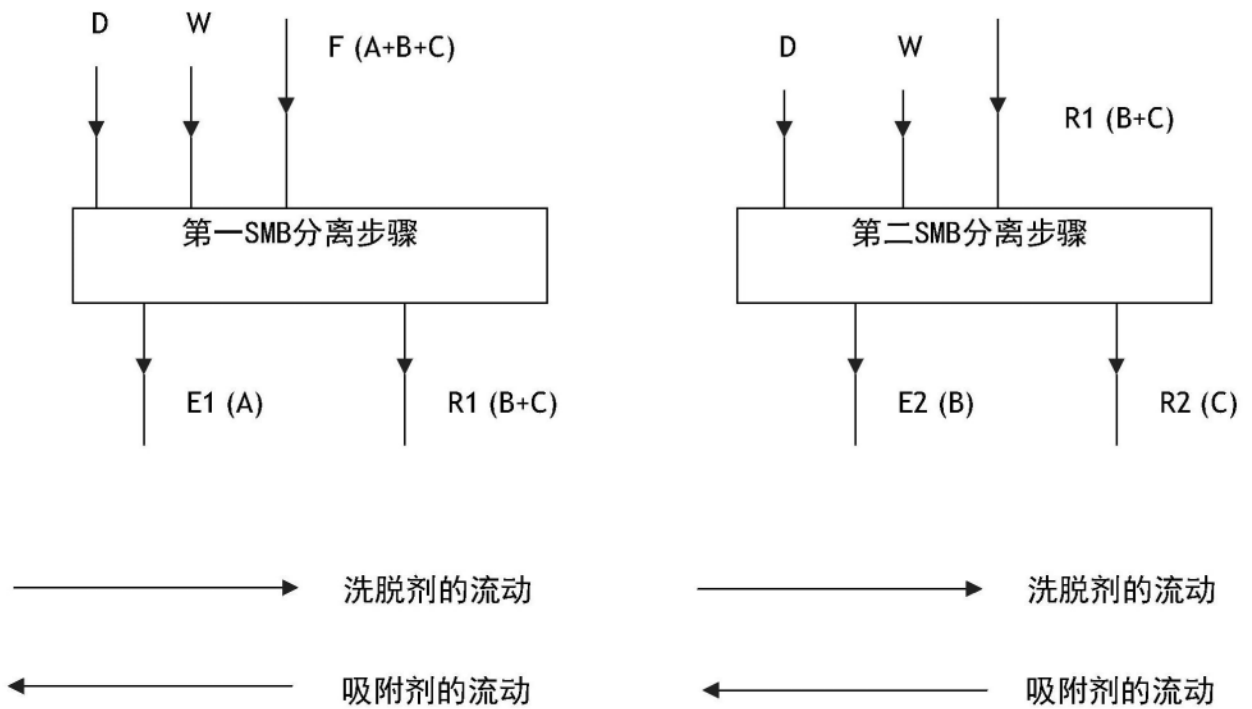


图4

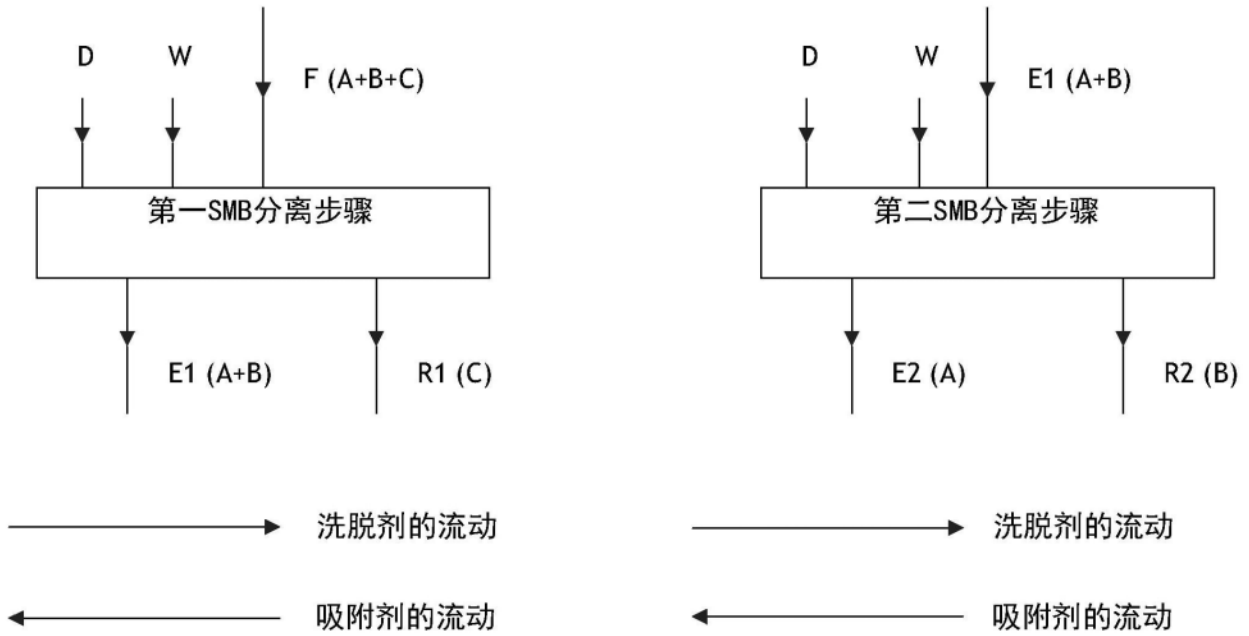


图5

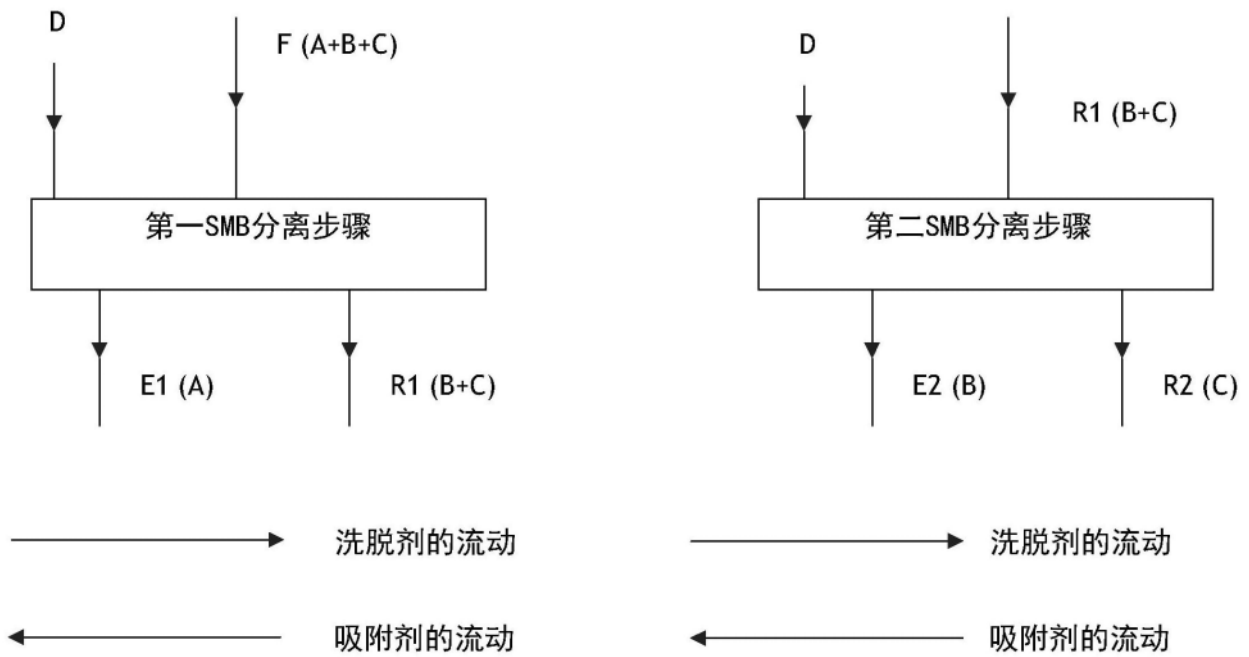


图6

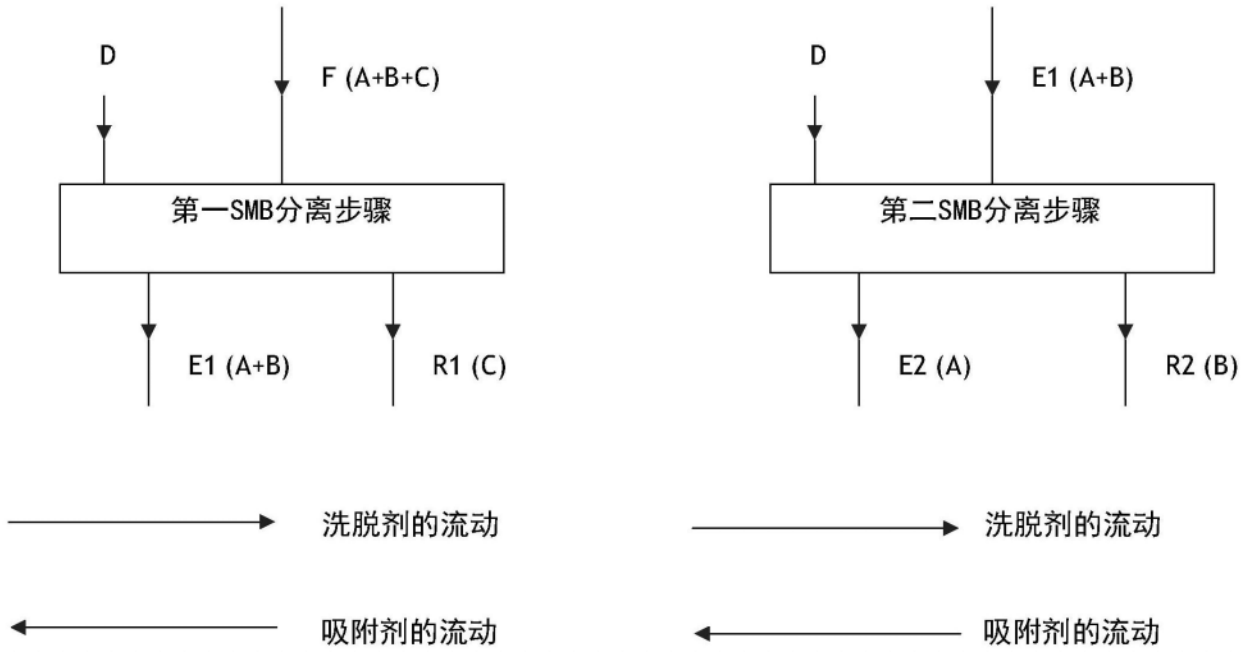


图7

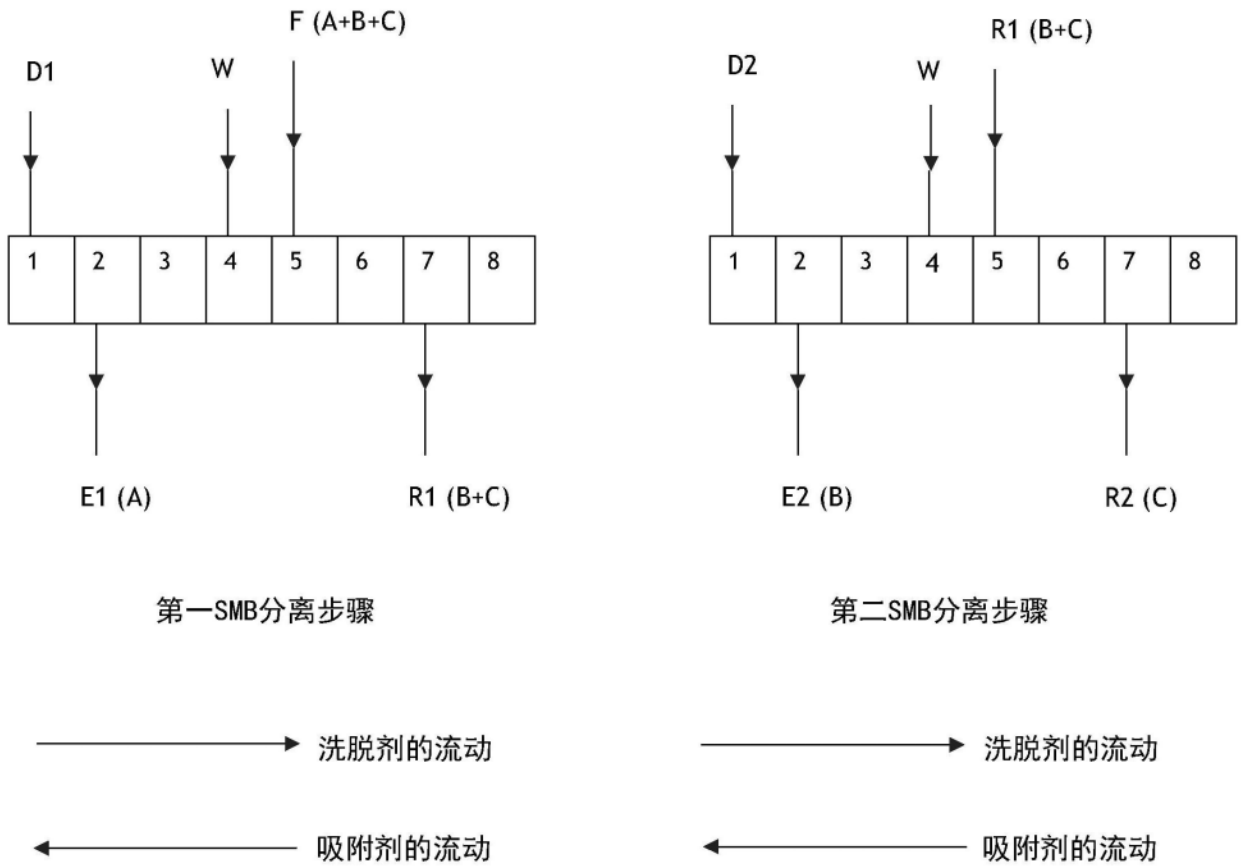


图8

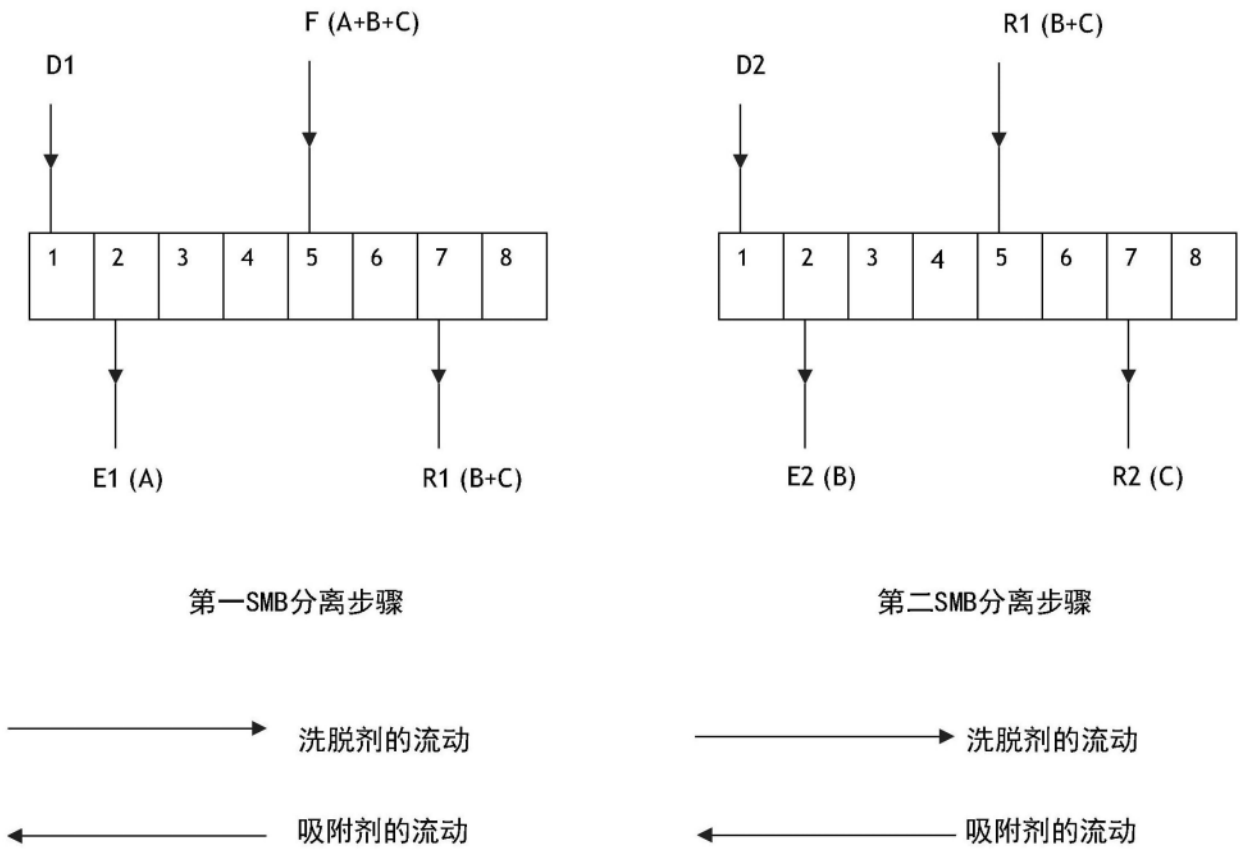


图9

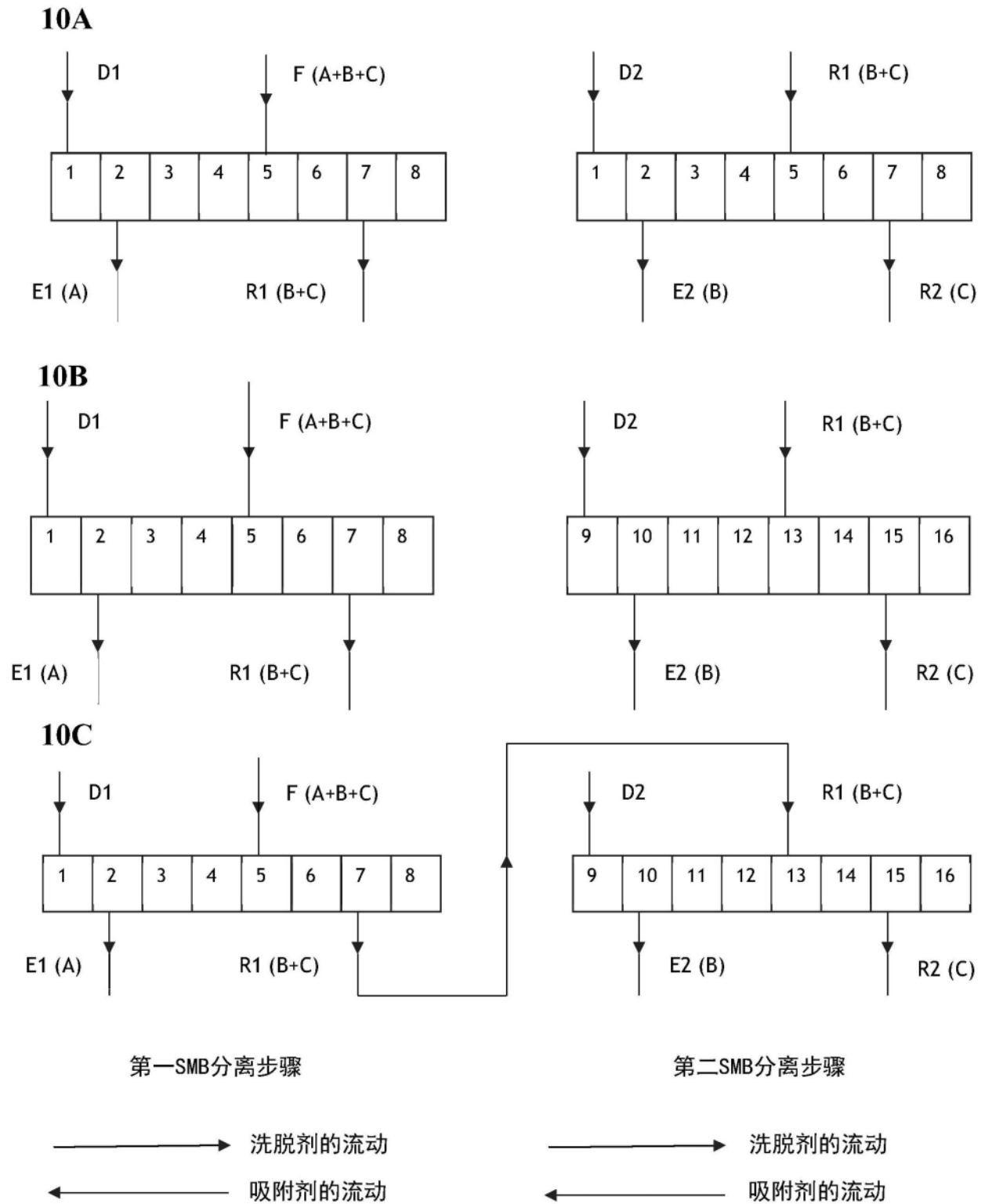


图10

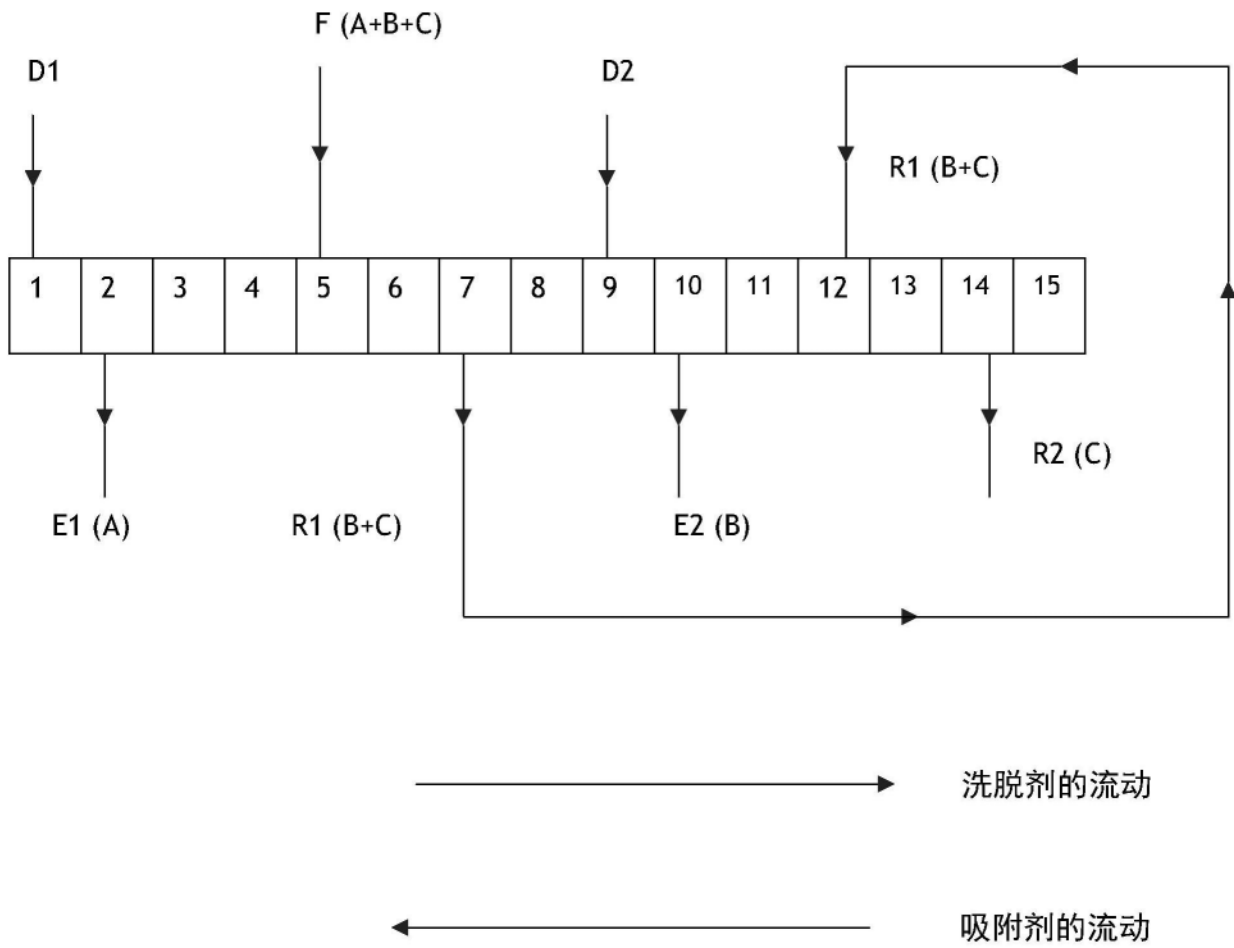


图11

12A

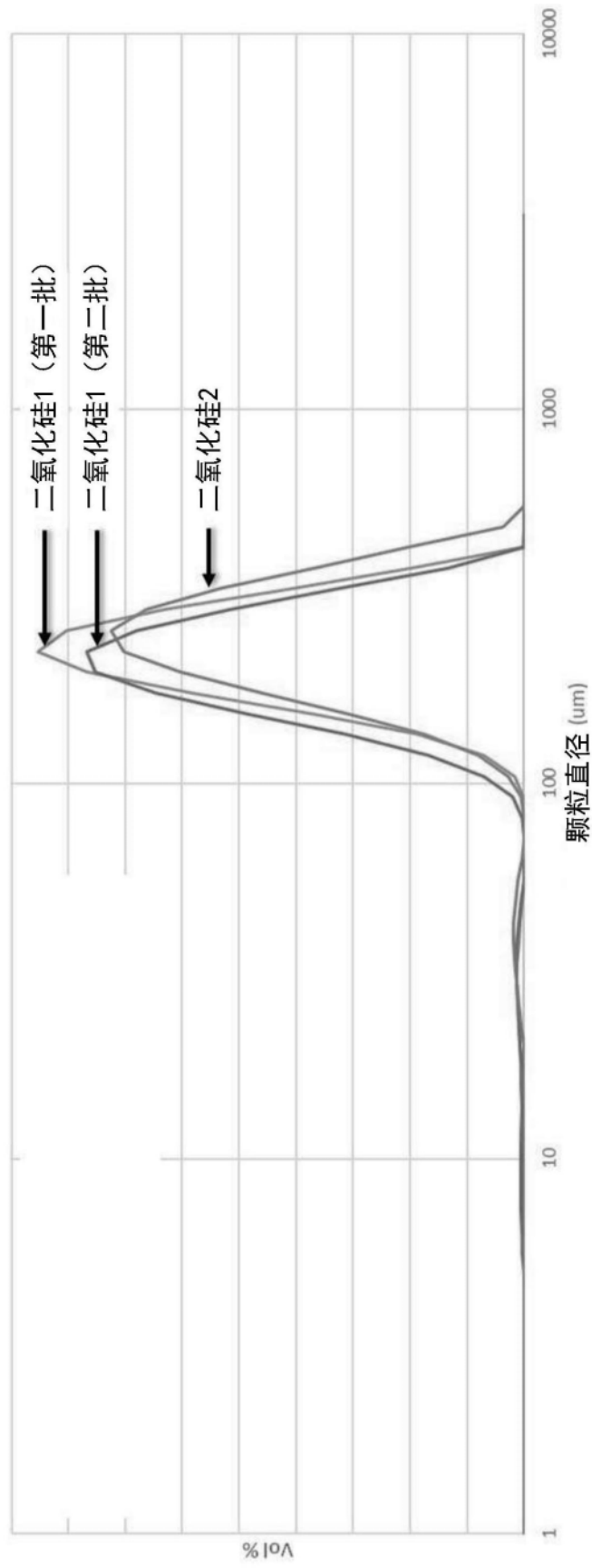


图12

12B

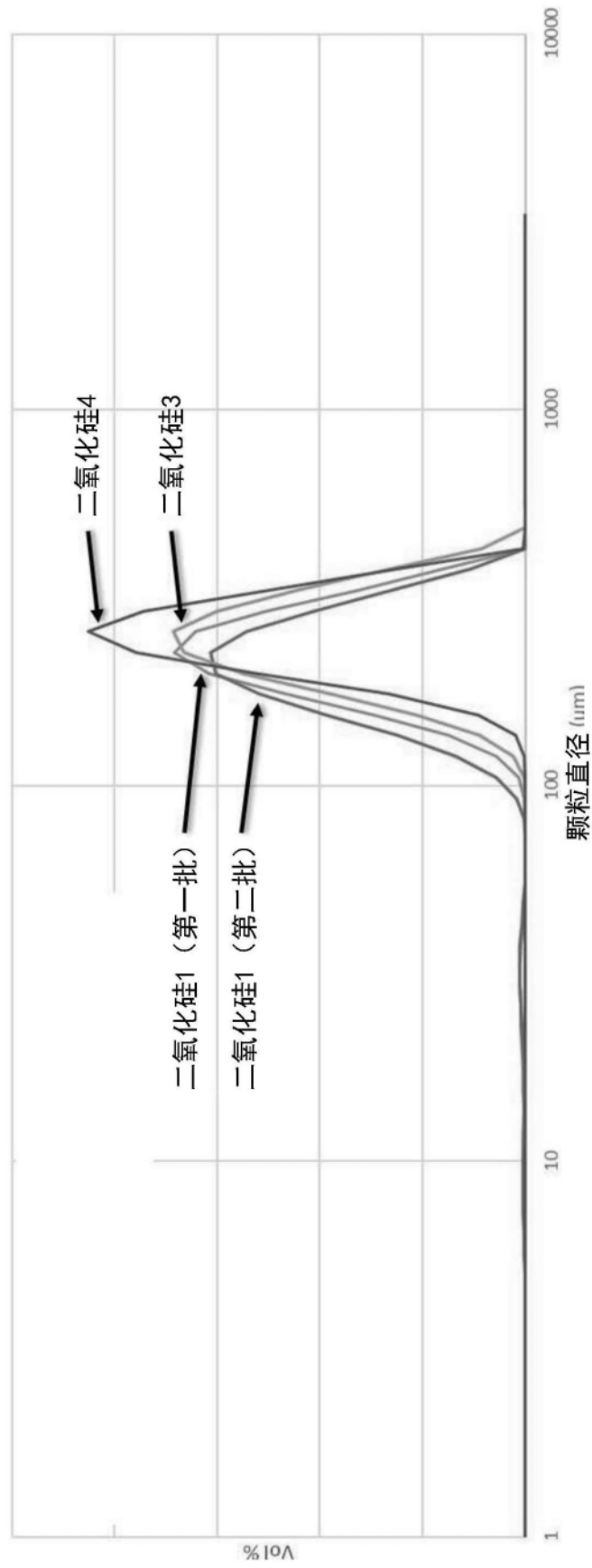
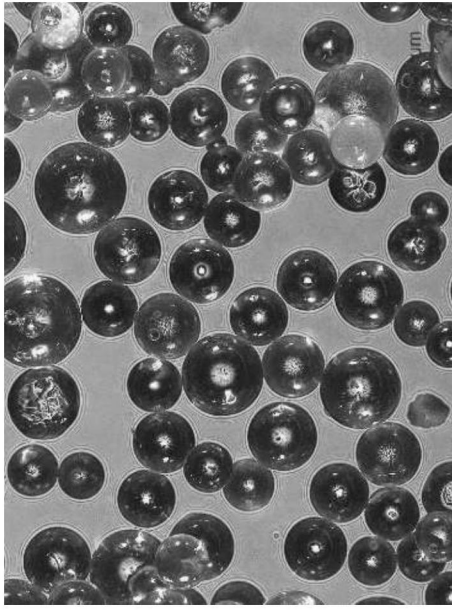
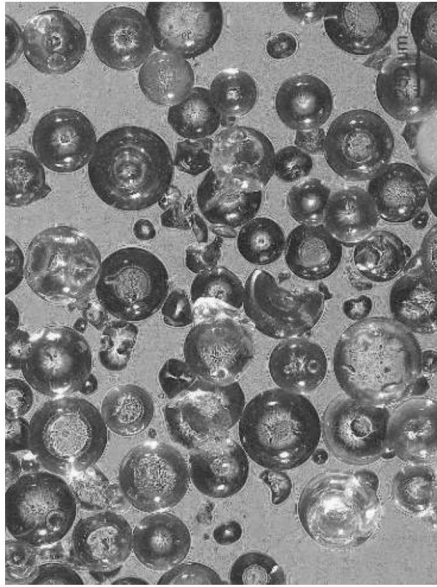


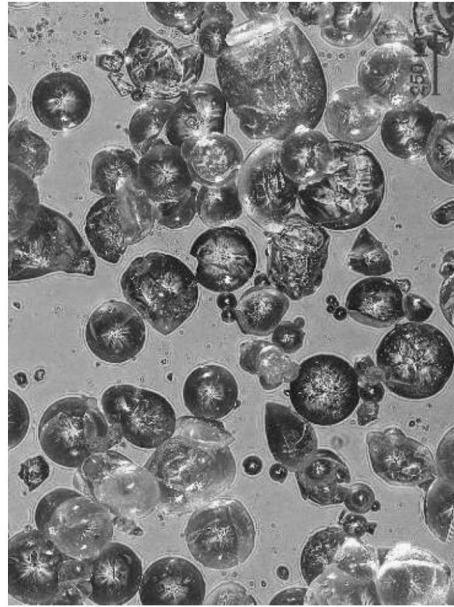
图12



13C



13A



13B

图13

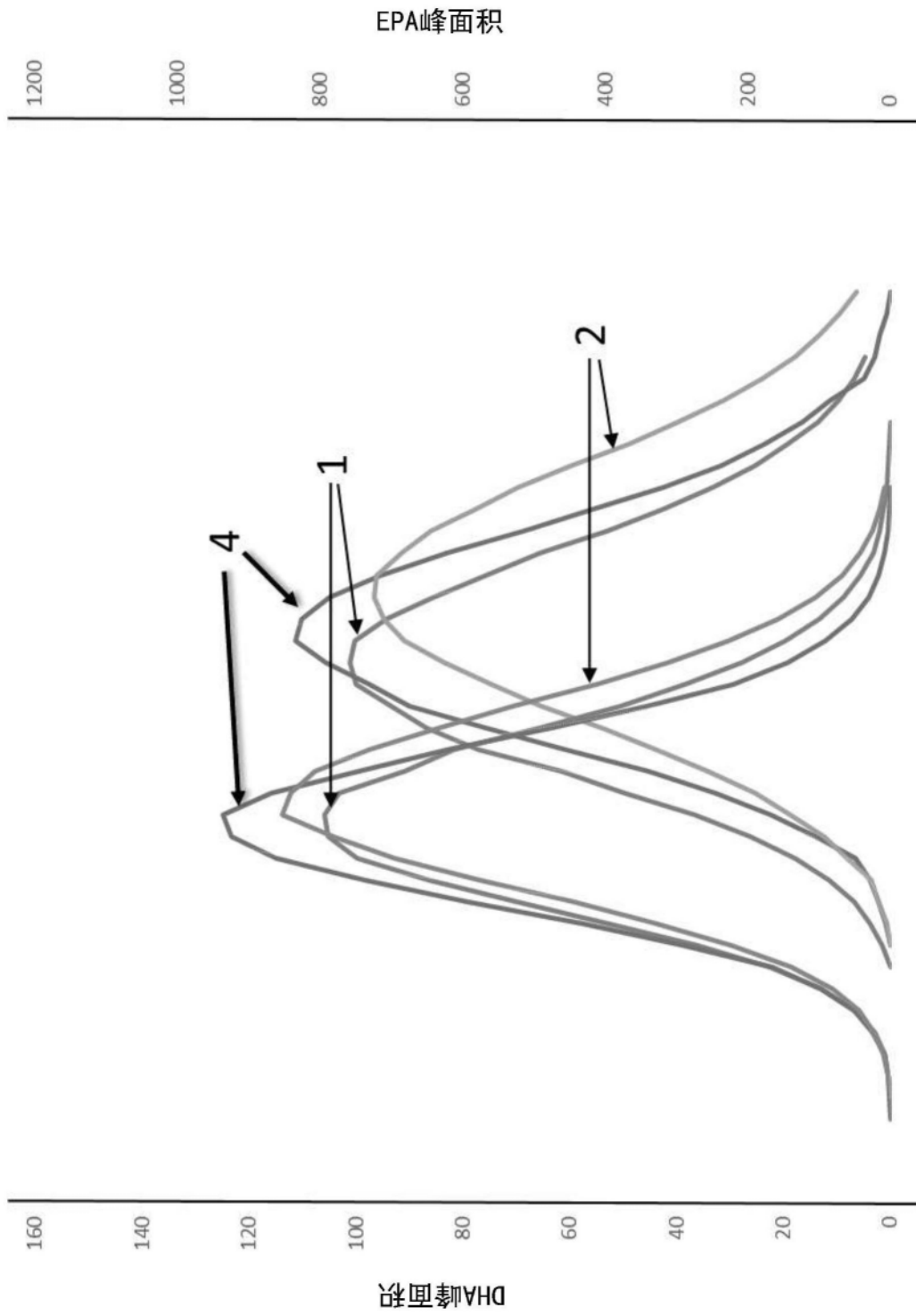


图14