

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
25 de junio de 2020 (25.06.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/128125 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

B01J 20/14 (2006.01) C11B 7/00 (2006.01)
B01J 20/16 (2006.01) A23D 9/04 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01)

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2019/070840

(22) Fecha de presentación internacional:

12 de diciembre de 2019 (12.12.2019)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201831256 20 de diciembre de 2018 (20.12.2018) ES

(71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: **PÉREZ CAMINO, M^a Carmen**; INSTITUTO DE LA GRASA, Campus de la Universidad Pablo de Olavide, Edificio 46 Ctra. de Utrera, km. 1, 41013 Sevilla (ES). **LEÓN CAMACHO, Manuel**; INSTITUTO DE LA GRASA, Campus de la Universidad Pablo de Olavide, Edificio 46 Ctra. de Utrera, km. 1, 41013 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Rubén Darío 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: METHOD FOR ISOLATING THE UNSAPONIFIABLE FRACTION OF OILS OR FATS BY SUPPORTED LIQUID EXTRACTION

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DE ACEITES O GRASAS MEDIANTE EXTRACCIÓN LÍQUIDA SOPORTADA

(57) Abstract: The invention relates to a method for isolating the unsaponifiable fraction of edible oils or fats by means of a supported liquid extraction (SLE) column, and for subsequently purifying the different fractions by means of preparative high-performance liquid chromatography and the analysis thereof by gas chromatography. The main advantage is that the invention allows the use of small amounts of sample and the rapid extraction of the unsaponifiable fraction using a much smaller volume of solvent than the techniques described thus far for such purpose.

(57) Resumen: El objeto de la invención es un procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas comestibles mediante una columna de extracción líquida soportada (ESL), y la posterior purificación de las diferentes fracciones mediante cromatografía líquida de alta eficacia preparativa y su análisis mediante cromatografía de gases. La principal ventaja es que permite el empleo de pequeñas cantidades de muestra y la rápida extracción de la fracción insaponificable utilizando un volumen de disolvente mucho menor que las técnicas hasta ahora descritas a tal fin.



WO 2020/128125 A1

PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN INSAPONIFICABLE DE ACEITES O GRASAS MEDIANTE EXTRACCIÓN LÍQUIDA SOPORTADA

DESCRIPCIÓN

5

SECTOR DE LA TÉCNICA Y OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se enmarca dentro del sector de la química analítica instrumental y en particular en la preparación de columnas empleadas para la separación de compuestos, específicamente para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas comestibles mediante extracción líquida soportada.

El objeto de la invención es un procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas mediante una columna de extracción líquida soportada (ESL), y la posterior purificación de las diferentes fracciones mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) preparativa y su análisis mediante cromatografía de gases. La principal ventaja es que permite el empleo de pequeñas cantidades de muestra y la rápida extracción de la fracción insaponificable utilizando un volumen de disolvente mucho menor que las técnicas descritas a tal fin.

20

ESTADO DE LA TÉCNICA

La autenticación de los alimentos ha ido desarrollándose en función de las tendencias del mercado y las técnicas analíticas han ido evolucionando para solucionar las adulteraciones de cada momento.

25

En el caso concreto de los aceites y grasas comestibles la materia insaponificable es una fuente de información para su caracterización y autenticación. Más concretamente, la determinación de esteroides se ha usado frecuentemente para detectar contaminaciones y adulteraciones en este tipo de materiales.

30

La composición de esteroides de un aceite o grasa es muy característica y se ha convertido, por ello, en una herramienta muy útil para la detección de mezclas con otros aceites vegetales.

35

En numerosas ocasiones el análisis por cromatografía de gases de ciertas fracciones de compuestos de una matriz más o menos compleja, como es el caso de la fracción insaponificable, presenta ciertas dificultades, especialmente cuando estas fracciones poseen un número elevado de compuestos [Señoráns, F.J., Tabera, I y Herraiz, M. "Rapid separation of free sterols in edible oils by on-line coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography". *J. Agric. Food Chem.* (1996), 44, 3189-3192].

Además, existe un problema añadido si resulta imposible realizar sobre la matriz reacciones químicas y derivatizaciones para separar la fracción deseada, debido a la alteración, contaminación o pérdida de esta. En tal caso el aislamiento previo de la fracción mediante la extracción líquido-líquido, a pesar de ser el procedimiento estandarizado u oficial [European Union Commission Regulation EEC 183/93, Off. J. Eur. Commun L22 (1993) 58], es un procedimiento poco adecuado, muy tedioso y largo de llevar a cabo; es necesario emplear una gran cantidad de muestra (entre 5 y 20 g) y de disolventes para la extracción (del orden de 300 ml), el tiempo requerido también resulta excesivo, sobre todo si se forman emulsiones como de hecho suele ocurrir. Finalmente, es preciso eliminar todo el disolvente empleado en la extracción; a continuación, ha de efectuarse una purificación por lo que, antes de efectuarse el análisis por cromatografía de gases, hay que realizar separaciones previas empleando usualmente cromatografía en capa fina (CCF), en columna (CC) [Brewington C.R., Caress, E.A. y Schwartz D.P. (1979). "Isolation and identification of new milk fat". *J. of Lipid Research* 11, 355-361], extracción en fase sólida (SPE) [Amelio M., Rizzo, R. y Varazini F. (1992). "Determination of sterols, erythrodiol, uvaol and alkanols in olive oils using combined solid-phase extraction, high-performance liquid chromatographic and high-resolution gas chromatographic techniques." *J. Chromatography*, 606, 179-185] o las técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) [EEC, 1993; Cert, A., Moreda, W y García-Morena, J. (1997). Determinación de esteroides y dialcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y Aceites*. 48, 207-218]. En resumen, para obtener la fracción del insaponificable de un aceite o grasa y purificarla por un procedimiento convencional se requiere emplear gran cantidad de muestra, disolventes orgánicos y tiempo. Todo esto conlleva que con frecuencia ocurran pérdidas o contaminaciones.

En el caso de utilizar como técnica de separación previa, la HPLC puede ser off-line u on-line, requiriéndose en ambos casos un cromatógrafo líquido donde realizar la separación previa. En la primera modalidad se recolecta la fracción deseada por algún procedimiento,

se elimina la fase móvil y se transfiere la fracción al cromatógrafo de gases mediante algunas de las técnicas de inyección conocidas [León Camacho M. y Morales M.T., Handbook of Olive OH Análisis and Properties; Chapter 7 (2000) Ed Aspen Publishers, Inc.159-208]. Cuando se emplean técnicas de acoplamiento on-line, es necesario una interfase de transferencia más o menos complicada [Grob, K. (1995). Development of the transfer techniques for on-line high-performance liquid chromatography-capillary gas chromatography. *J.Chromatogr. A*, **703**, 265-276]; [Vreuls, J.J., de Jong. G.J.; Ghijsen, R.T. y Brinkman, U.A.Th. (1994). LC coupled on-line with GC: state of the art. *J. AOAC. Int.*, **77**, 306-327] que permita pasar la fracción en estado líquido y alta presión a una fase gaseosa y de baja presión, además, las interfaces son muy diferentes dependiendo de si la cromatografía líquida es de absorción o de reparto [Señoráns F.J., Herraiz M. y Tabera J. (1995a). "On-line reversed-phase liquid chromatography-capillary gas chromatography using a programmed temperature vaporizer as interface." *Journal of Separation Science*, **18**, 433-438]; [Señoráns, F.J.; Reglero, G.; Herraiz, M. (1995b) "Use of a Programmed Temperature Injector for On-Line Reversed-Phase Liquid Chromatography-Capillary Gas Chromatography". *Journal of Chromatographic Science*. **33**, 446-450]; [Homborg E. (1993). Vitamin D-Bestimmung in Lebertram. *Fat Sci. Technol.* **95**, 228-230].

El aislamiento de los compuestos de interés del insaponificable, mediante las técnicas mencionadas es un paso crítico, específicamente en el caso de los aceites de oliva donde esteroides y alcoholes triterpénicos coeluyen en las mismas zonas cromatográficas llevando a resultados erróneos. También lo es el paso previo, el aislamiento de la materia insaponificable de la fracción saponificada y, para ello, Hadorn y Zürcher en 1973 [Hadorn H.; Zürcher (1973). *Der Scheidetrichter, ein mangelhaftes Gerät im analytischen Labor. Gordian* **73**, 198–204] publicaron uno de los primeros intentos de aislamiento utilizando sistemas de columnas con mezcla de adsorbentes, gel en tetrahidrofurano sobre gel S-832.

Se han desarrollado métodos de extracción líquida soportada (ESL) como es el caso de la patente US2018188142 que describe un cartucho que incluye dos compartimentos separados, uno de los cuales comprende una fase de adsorción sólida que es de tierra de diatomeas y la otra comprende al menos una sal. En este caso el método se utiliza para la separación de analitos en muestras biológicas.

Se han desarrollado otras técnicas para la separación de la fracción insaponificable mediante una extracción líquida soportada utilizando para ello cartuchos de tierra de diatomeas (Chem Elut, 20 ml, no tamponado, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)

seguida de una filtración a través de sulfato sódico anhidro y aislamiento de las fracciones mediante extracción de fase sólida (SPE) utilizando cartuchos de sílice (Agilent Mega BE-1, 1 g, 6 ml, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) activada con potasa y eluyendo las fracciones con disoluciones de diferentes proporciones de hexano/ éter dietílico. Las fracciones de esteroides y dialcoholes se silanizaron y se analizaron mediante cromatografía de gases [Mathison, B. and Holstege, D. A "Rapid Method to Determine Sterol, Erthyrodiol, and Uvaol Concentrations in Olive Oil". *J. Agric. Food Chem.*, (2013), 61, 4506-4513].

La empresa Phenomenex ha desarrollado unos cartuchos para este fin [Determination of Sterols in Olive Oil using Supported Liquid Extraction (SLE), Solid Phase Extraction (SPE) and GC-FID] en el que utiliza un cartucho de tierra de diatomeas, Strata®-DE, adaptado a un cartucho de sulfato de sodio anhidro para la separación del insaponificable y otro de sílice activada, Strata Si-1, para la purificación de estos. En este caso, no hace falta la purificación mediante HPLC para la separación de los esteroides y alcoholes triterpénicos, sino que a partir de la columna de Si activada con potasa y utilizando una fase móvil de hexano/éter se consigue la separación.

BREVE EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Constituye el objeto de la presente invención un procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas que comprende:

- saponificar el aceite o grasa mediante la adición de una base y aplicación de temperatura en un rango comprendido entre 75 y 80 °C
- someter el saponificado procedente de la etapa anterior a una extracción líquida soportada para el aislamiento de la fracción insaponificable
- eliminar los ácidos grasos libres de la fracción insaponificable aislada en la etapa anterior mediante una extracción en fase sólida.

La extracción líquida soportada se realiza haciendo pasar el saponificado a través de una columna con un material de relleno que comprende:

- un filosilicato que se selecciona entre sepiolita y atapulgita en proporción comprendida entre un 20% y un 35%
- un material desecante que selecciona entre sílica gel y sulfato sódico en proporción comprendida entre un 30% y un 50%
- tierra de diatomeas en proporción comprendida entre un 20% y un 35%.

En realizaciones preferentes de la presente invención:

- el filosilicato es sepiolita, particularmente sepiolita de granulometría comprendida entre 0,30 y 0,13 mm.
- el filosilicato es atapulgita, particularmente atapulgita calcinada de granulometría 5 comprendida entre 1,21 y 0,60 mm.
- el material desecante es Na_2SO_4 anhidro.
- la tierra de diatomeas es una tierra de diatomeas calcinada con un tamaño de malla de entre 0,25 mm y 3,35 mm, más preferentemente entre 0,3 mm y 1 mm.
- la eliminación de los ácidos grasos libres de la fracción insaponificable aislada en la etapa 10 de extracción líquida soportada se realiza en columna de SiO_2 impregnada en KOH o rellena de un soporte ligado al grupo amino ($-\text{NH}_2$).

La elución en la columna de extracción líquida soportada puede hacerse con disolventes como éter etílico o una mezcla de hexano y acetato de etilo.

15

Cuando la elución se hace con éter etílico, se añade CaCl_2 al material de relleno en proporción comprendida entre un 10 y un 15 %.

20 Cuando la elución en la columna se hace con una mezcla de hexano y acetato de etilo, la proporción empleada es preferentemente 87:13 v/v.

Opcionalmente, se añade un patrón interno a la muestra de aceite o grasa de la que se va a aislar la fracción insaponificable.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Esquema general de la columna de ELS que comprende los siguientes elementos:

- Reservorio de la columna (1)
- Disco filtrante (2)
- 30 - Disco fritado (3)
- Relleno de la columna (4)

Figura 2: Esquema general del sistema de eliminación de ácidos grasos libres que comprende:

- 35 - Columna de vidrio (5)
- Sílice impregnada en potasa (6)

- Colector ("Manifold") para recoger el eluido de la columna (7)

El insaponificable eluido de la columna presentada en la figura 1 se concentra, se redisuelve y se pasa por la columna presentada en la figura 2 para eliminar los ácidos grasos libres.

- 5 **Figura 3:** Cromatograma de HPLC del insaponificable obtenido en el ejemplo de un modo de realización de la invención.

Figura 4: Cromatograma de gases de la fracción de los derivados de silicio de los esteroides recuperados previamente mediante HPLC en el ejemplo de un modo de realización de la invención. 1: Colesterol; I.S.: Patrón Interno; 2: Campesterol; 3: Estigmasterol; 4: Clerosterol; 10 5: β -Sitosterol; 6: Sitostanol; 7: Δ^5 -Avenasterol; 8: $\Delta^{5,24}$ -Estigmastadienol; 9: Δ^7 -Estigmastenol; 10: Δ^7 -Avenasterol; 11: Eritrodiol.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE UN EJEMPLO DE REALIZACION DE LA INVENCION

15

El objeto de la presente invención es un material de relleno para una columna de extracción líquida soportada (ELS) y el uso de dicha columna para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites y grasas libre de ácidos grasos. En la figura 1 se representa el esquema general de la columna de ELS que comprende los siguientes elementos:

- 20
- Reservorio de la columna (1)
 - Disco filtrante (2)
 - Disco fritado (3)
 - Relleno de la columna (4)

El insaponificable eluido de la columna presentada en la figura 1 se concentra, se redisuelve y se pasa por el sistema esquematizado en la figura 2 para eliminar los ácidos grasos libres.

25

Ejemplo: determinación de esteroides en aceite de oliva

Se vierten 80 μ l de un patrón interno (el que corresponda según la determinación) de concentración 1 mg/ml en un vial de 4 ml. Se lleva a sequedad con nitrógeno y se pesa con exactitud del mg entre 0,2-0,4 g de muestra. Se añade 1,5 ml de KOH 1M en etanol, se cierra el vial y se calienta a 80C° durante 45 minutos.

30

Una vez transcurrido el tiempo se añaden 3 ml de agua para detener la reacción y se vierte en la columna de ESL.

35

Preparación de la columna de ESL de 50 ml: la columna se rellena con 36 g de una mezcla homogénea compuesta de un 33,3% de Na₂SO₄ anhidro, 11,1% de CaCl₂ 27,8% de atapulgita 15/30 y 27,8% de diatomea calcinada 0,3/1 mm.

- 5 Una vez añadida la muestra a la columna se esperan 10 minutos. Transcurrido el tiempo se pasan por la columna 55 ml de éter etílico y se colecta.

La disolución recogida se lleva a sequedad en rotavapor y se redisuelve en 1 ml de mezcla hexano/acetato de etilo 87:13 v, se pasa por una columna de 1 g de sílica gel 60 (0,063-
10 0,200 mm) impregnada en KOH 0,2M en etanol y secada, se desecha una primera fracción que eluye con 10 ml de la mezcla hexano/acetato de etilo 87:13 v/v, y finalmente se pasan 6 ml de éter etílico que es recogido. La fracción insaponificable se lleva a sequedad en el rotavapor.

- 15 Para monitorizar el perfil de la fracción seleccionada y recuperada mediante HPLC, se opera en las siguientes condiciones:

- El insaponificable obtenido se redisuelve en 500 µl de la fase móvil del HPLC. Se inyectan 300 µl en el cromatógrafo líquido. Este paso es fundamental, dado que, como se ha comentado, hay importantes interferencias entre las familias de
20 compuestos del insaponificable, especialmente en el caso de aceites de oliva, si este se inyecta sin un aislamiento previo.

Condiciones del HPLC y del cromatógrafo de gases: Fase móvil hexano:acetato de etilo 87/13 v/v; fase estacionaria: Columna de Si 60 de 250 mm de longitud por 4,6 mm de
25 diámetro y 5 µm de tamaño de partículas, temperatura de la columna 20C°, flujo de fase móvil 0,6 ml/min en régimen isocrático, detector de índice de refracción a 30C°, tiempo del cromatograma 40 minutos. El cromatograma resultante se muestra en la Figura 3. Para recoger la fracción de esteroides, por ejemplo, se recolecta entre los 16 y 31 minutos, se lleva a sequedad en el rotavapor y se añaden 150 µl de reactivo de silanización, se esperan 15
30 minutos y se inyecta en el cromatógrafo de gases de acuerdo con las siguientes condiciones: columna cromatográfica DB-5 de 30 metros, 250 µm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase. Gas portador hidrógeno a flujo constante de 1 ml/min. Inyección en modo Split con una relación de 10, temperatura del inyector 310C°. Condiciones de operación del horno cromatográfico:

T. Horno	Rampa °C/min	Tiempo	Tiempo final
275	0	30	30

Detector de ionización de llama a 320°C y gas auxiliar nitrógeno a 25 ml/min.

El cromatograma resultante se muestra en la figura 4.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas que comprende:

- 5
- saponificar el aceite o grasa mediante la adición de una base y aplicación de temperatura en un rango comprendido entre 75 y 80 °C
 - someter el saponificado procedente de la etapa anterior a una extracción líquida soportada para el aislamiento de la fracción insaponificable
 - eliminar los ácidos grasos libres de la fracción insaponificable aislada en la etapa
- 10
- anterior mediante una extracción en fase sólida
- caracterizado porque la extracción líquida soportada se realiza haciendo pasar el saponificado a través de una columna con un material de relleno que comprende:
- un filosilicato que se selecciona entre sepiolita y atapulgita en proporción comprendida entre un 20% y un 35% en peso.
- 15
- un material desecante que selecciona entre sílica gel y sulfato sódico en proporción comprendida entre un 30% y un 50% en peso.
 - tierra de diatomeas en proporción comprendida entre un 20% y un 35% en peso.

20

2.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 1, donde el filosilicato es sepiolita.

3.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 2, donde la sepiolita es sepiolita de granulometría comprendida entre 0,30 y 0,13 mm.

25

4.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 1, donde el filosilicato es atapulgita.

5.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 4, donde la atapulgita es atapulgita calcinada de granulometría comprendida entre 1,21 y 0,60 mm.

30

6.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el material desecante es Na_2SO_4 anhidro.

35

- 7.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la tierra de diatomeas es una tierra de diatomeas calcinada con un tamaño de malla de entre 0,25 mm y 3,35 mm.
- 5 8.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según la reivindicación 7, donde la tierra de diatomeas presenta un tamaño de malla entre 0,3 mm y 1 mm.
- 9.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas
10 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la elución en la columna de extracción líquida soportada se hace con éter etílico.
- 10.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas
15 según la reivindicación 9, donde el material de relleno comprende adicionalmente CaCl_2 en proporción comprendida entre el 10 y el 15% en peso.
- 11.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la elución en la columna de extracción líquida soportada se hace con una mezcla de hexano y acetato de etilo.
- 20 12.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la eliminación de los ácidos grasos libres de la fracción insaponificable aislada en la etapa de extracción líquida soportada se realiza en columna de SiO_2 impregnada en KOH o rellena de un soporte ligado
25 al grupo amino ($-\text{NH}_2$).
- 13.- Procedimiento para el aislamiento de la fracción insaponificable de aceites o grasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde se añade un patrón interno a la muestra de aceite o grasa de la que se va a aislar la fracción insaponificable.
- 30

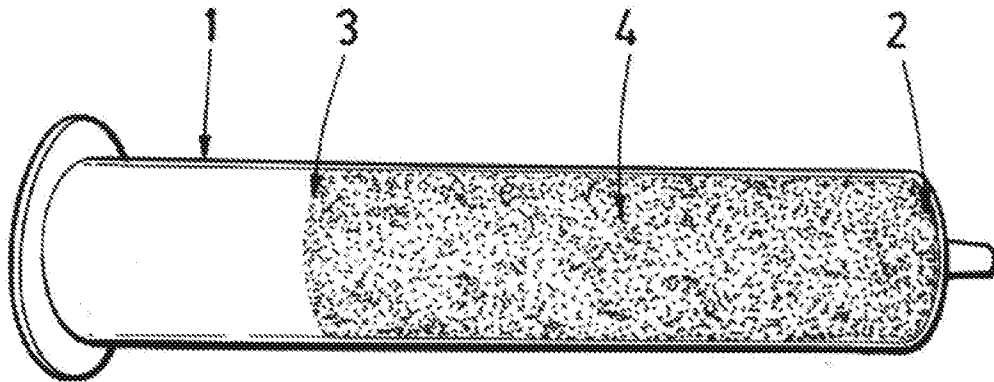


FIG. 1

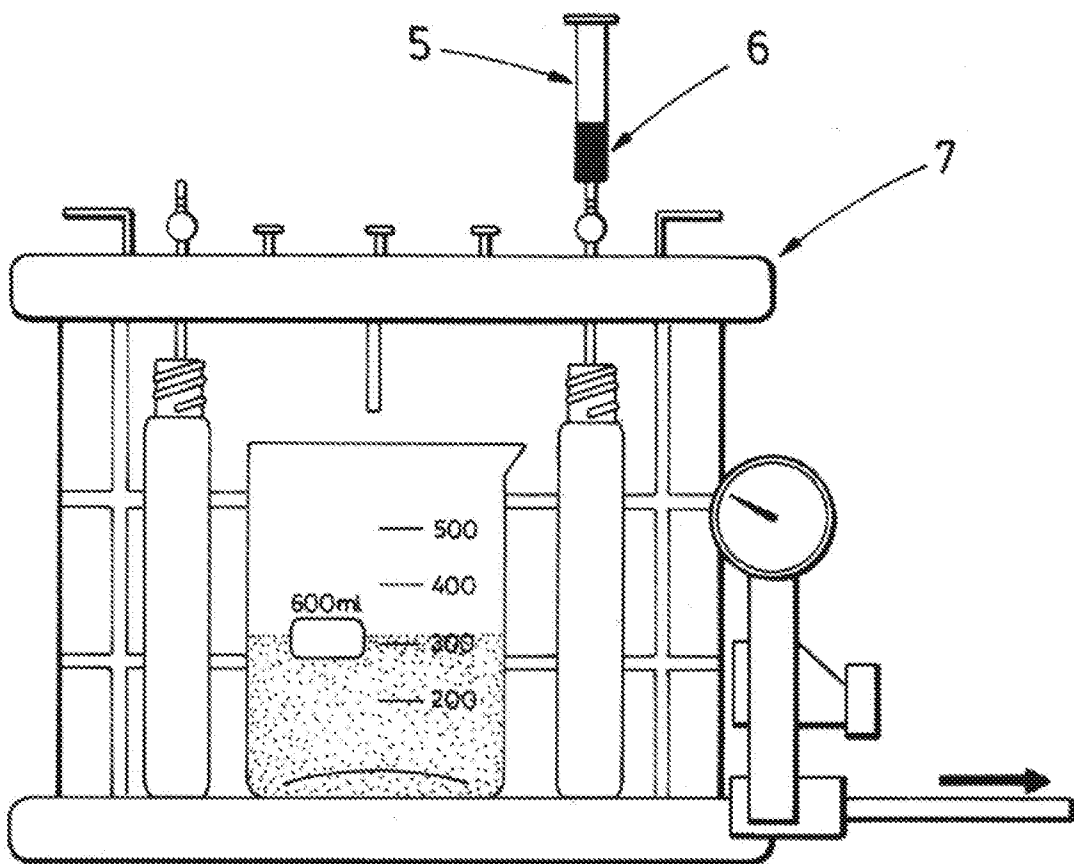


FIG. 2

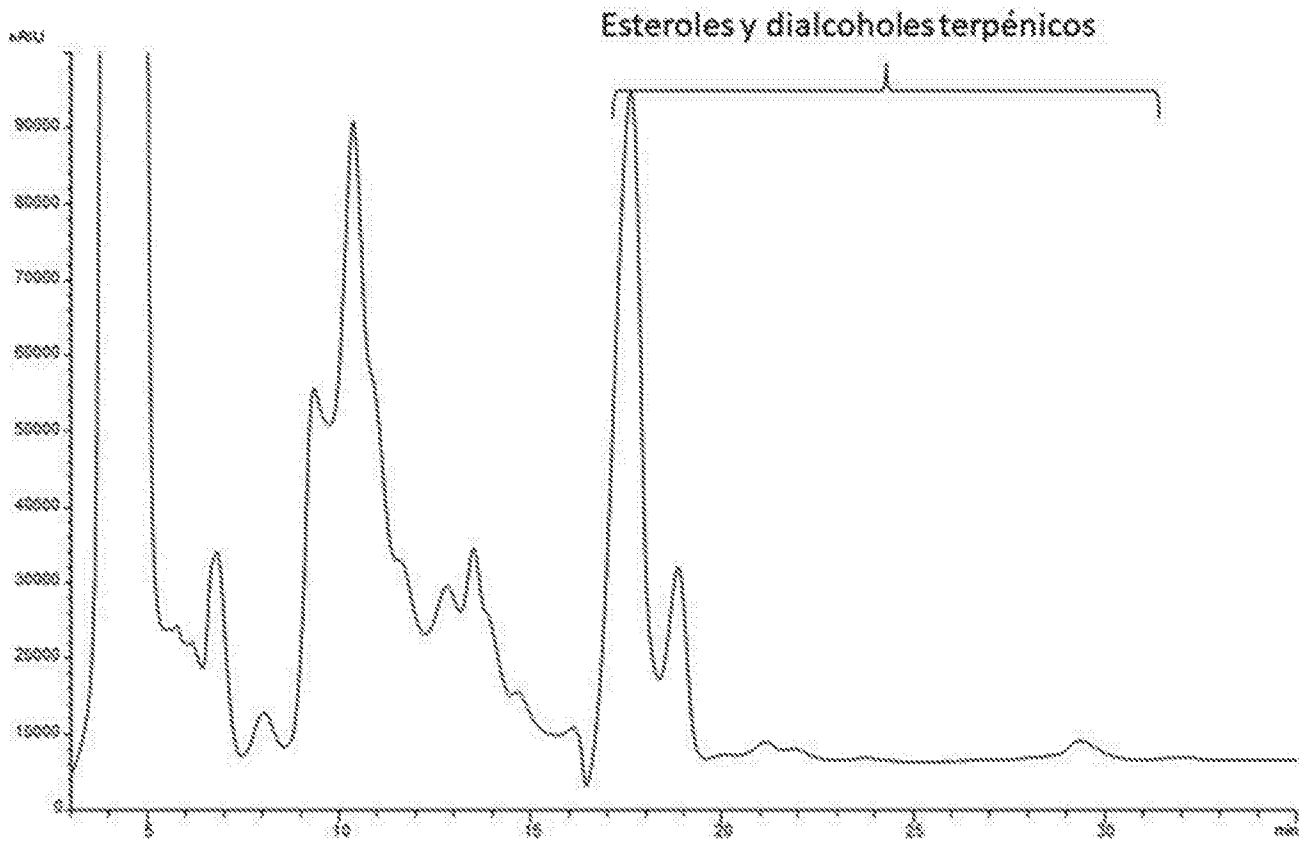


FIG. 3

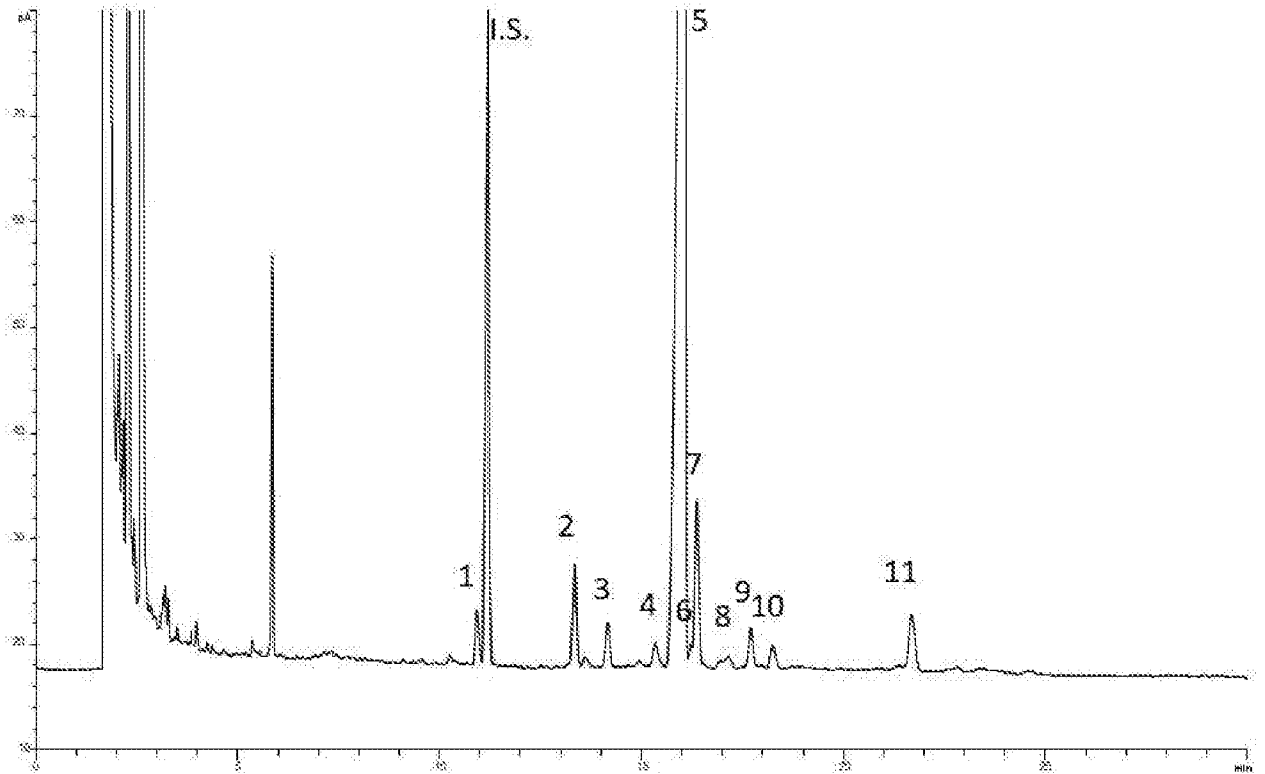


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2019/070840

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B01J, C11B, A23D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC,WPI,TXTE,MEDLINE,BIOSIS,XPESP,REGISTRY,CAPLUS,GOOGLESCHOLAR,NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AQEEL, Z. "Determination of Sterols in Olive Oil using Supported Liquid Extraction (SLE), Solid Phase Extraction (SPE) and GC-FID". SelectScience. Applications Notes. TN-0114. 2017, pages 1-8. [Available online 07.08.2018]. [Retrieved 17.10.2019]. Retrieved from: < https://www.selectscience.net/application-article/determination-of-sterols-in-olive-oil-using-supported-liquid-extraction-(sle)-solid-phase-extraction-(spe)-and-gc-fid/?artid=46975 >. See page 1, Introduction and Materials and Methods; page 2.	1-13
A	MATHISON, B. & HOLSTEGE, D. "A Rapid Method to Determine Sterol, Erythrodiol, and Uvaol Concentrations in Olive Oil". Journal of Agricultural and Food Chemistry 2013, Volume 61, Number 19, pages 4506-4513. [Available online 15.04.2013]. ISSN: 0021-8561. DOI: 10.1021/jf400254k. See page 4506, abstract; page 4507, column 2, paragraph 8-page 4508, column 1, paragraph 3.	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
21/02/2020

Date of mailing of the international search report
(25/02/2020)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
G. Esteban García

Telephone No. 91 3495425

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2019/070840

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>OELLIG, C. & RADOVANOVIC, J. "Screening for 16-O-methylcafestol in roasted coffee by high-performance thin-layer chromatography-fluorescence detection – Determination of <i>Coffea canephora</i> admixtures to <i>Coffea arabica</i>". Journal of Chromatography A 2017, Volume 1525, Number 19, pages 173-180. [Available online 12.10.2017]. ISSN: 0021-9673; 1873-3778. (online). DOI: 10.1016/j.chroma.2017.10.031. [Retrieved 15.10.2019]. Retrieved from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.031>. See page 4507, column 2, paragraph 8-page 4508, column 1, paragraph 3.</p>	1-13
A	<p>SAHU, S. et al. "Isolation of the unsaponifiable matter (squalene, phytosterols, tocopherols, γ-oryzanol and fatty alcohols) from a fatty acid distillate or rice bran oil". Grasas y Aceites 2018 (julio-septiembre), Volumen 69, Número 3, página e262. DOI: 10.3989/gya.1112172. ISSN-L: 0017-3495. [Retrieved 16.10.2019]. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/publication/327258278_Isolation_of_the_unsaponifiable_matter_squalene_phytosterols_tocopherols_g-oryzanol_and_fatty_alcohols_from_a_fatty_acid_distillate_of_rice_bran_oil>. See page 1, abstract; page 4, figure 1.</p>	1-13
A	<p>PHENOMENEX. "Two Unique Options for Supported Liquid Extraction. Having two different Supported Liquid Extraction (SLE) sorbent options can make it easier for you to get a product that works for your unique extractions". [Available online 06.03.2018]. [Retrieved 18.10.2019]. Retrieved from: <https://phenomenex.blog/2018/03/06/supported-liquid-extraction/?pdf=8621>.</p>	1-13
A	<p>ES 2222338 T3 (LABORATOIRES EXPANSCIENCE) 01.02.2005, page 2, lines 5-8, 38-52; examples.</p>	1-13
A	<p>US 2016/0122687 A1 (PICCIRILLI, A.) 05.05.2016, paragraphs [0030]-[0043]; [0045]; claims.</p>	1-13
A	<p>WO 2016/198616 A1 (BIOTAGE AB) 15.12.2016, page 1, lines 3-4; page 4, lines 2-7; claims.</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2019/070840

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES 2222338T3	01.02.2005	EP1246633 A2	09.10.2002
		TNSN01006 A1	03.04.2003
		PE20011069 A1	05.11.2001
		KR20020068399 A	27.08.2002
		KR100719860B B1	21.05.2007
		ZA200205622 B	24.02.2003
		US2003130532 A1	10.07.2003
		US6759543 B2	06.07.2004
		TR200402227T T4	21.10.2004
		PT1246633E E	31.12.2004
		MXPA02006844 A	23.10.2002
		MX226314 B	15.02.2005
		IL150680 A	25.07.2005
		WO0151596 A2	19.07.2001
		WO0151596 A3	28.02.2002
		FR2803598 A1	13.07.2001
		FR2803598 B1	26.04.2002
		DK1246633T T3	29.11.2004
		DE60104390T T2	04.08.2005
		CA2396989 A1	19.07.2001
CA2396989 C	02.08.2011		
BR0107605 A	15.10.2002		
BRPI0107605 B1	01.09.2015		
AU3185901 A	24.07.2001		
AU779040B B2	06.01.2005		
AT271391T T	15.08.2004		
AR026843 A1	26.02.2003		
-----	-----	-----	-----
US 2016122687 A1	05.05.2016	JP2016527336 A	08.09.2016
		CN105358665 A	24.02.2016
		CA2914490 A1	11.12.2014
		EP3004301 A1	13.04.2016
		WO2014195639 A1	11.12.2014
		FR3006329 A1	05.12.2014
		FR3006329 B1	05.06.2015
-----	-----	-----	-----
WO 2016198616 A1	15.12.2016	US2018188142 A1	05.07.2018
		EP3308133 A1	18.04.2018
		EP3104156 A1	14.12.2016
-----	-----	-----	-----

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01J20/14 (2006.01)

B01J20/16 (2006.01)

B01J20/28 (2006.01)

C11B7/00 (2006.01)

A23D9/04 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2019/070840

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
B01J, C11B, A23D

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, TXTE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, CAPLUS, GOOGLESCHOLAR, NCBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	AQEEL, Z. "Determination of Sterols in Olive Oil using Supported Liquid Extraction (SLE), Solid Phase Extraction (SPE) and GC-FID". SelectScience. Applications Notes. TN-0114. 2017, páginas 1-8. [Disponible en línea el 07.08.2018]. [Recuperado el 17.10.2019]. Recuperado de: < https://www.selectscience.net/application-article/determination-of-sterols-in-olive-oil-using-supported-liquid-extraction-(sle)-solid-phase-extraction-(spe)-and-gc-fid/?artid=46975 >. Ver página 1, Introducción y Materiales y Métodos; página 2.	1-13
A	MATHISON, B. & HOLSTEGE, D. "A Rapid Method to Determine Sterol, Erythrodiol, and Uvaol Concentrations in Olive Oil". Journal of Agricultural and Food Chemistry 2013, Volumen 61, Número 19, páginas 4506-4513. [Disponible en línea el 15.04.2013]. ISSN: 0021-8561. DOI: 10.1021/jf400254k. Ver página 4506, resumen; página 4507, columna 2, párrafo 8- página 4508, columna 1, párrafo 3.	1-13

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
21/02/2020

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
25 de febrero de 2020 (25/02/2020)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
G. Esteban García
Nº de teléfono 91 3495425

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2019/070840

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	<p>OELLIG, C. & RADOVANOVIC, J. "Screening for 16-O-methylcafestol in roasted coffee by high-performance thin-layer chromatography-fluorescence detection – Determination of <i>Coffea canephora</i> admixtures to <i>Coffea arabica</i>". Journal of Chromatography A 2017, Volumen 1525, Número 19, páginas 173-180. [Disponible en línea el 12.10.2017]. ISSN: 0021-9673; 1873-3778. (en línea). DOI: 10.1016/j.chroma.2017.10.031. [Recuperado el 15.10.2019]. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.031>. Ver página 4507, columna 2, párrafo 8-página 4508, columna 1, párrafo 3.</p>	1-13
A	<p>SAHU, S. et al. "Isolation of the unsaponifiable matter (squalene, phytosterols, tocopherols, γ-oryzanol and fatty alcohols) from a fatty acid distillate or rice bran oil". Grasas y Aceites 2018 (julio-septiembre), Volumen 69, Número 3, página e262. DOI: 10.3989/gya.1112172. ISSN-L: 0017-3495. [Recuperado el 16.10.2019]. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/327258278_Isolation_of_the_unsaponifiable_matter_squalene_phytosterols_tocopherols_g-oryzanol_and_fatty_alcohols_from_a_fatty_acid_distillate_of_rice_bran_oil>. Ver página 1, resumen; página 4, figura 1.</p>	1-13
A	<p>PHENOMENEX. "Two Unique Options for Supported Liquid Extraction. Having two different Supported Liquid Extraction (SLE) sorbent options can make it easier for you to get a product that works for your unique extractions". [Disponible en línea el 06.03.2018]. [Recuperado el 18.10.2019]. Recuperado de: <https://phenomenex.blog/2018/03/06/supported-liquid-extraction/?pdf=8621>.</p>	1-13
A	<p>ES 2222338 T3 (LABORATOIRES EXPANSCIENCE) 01.02.2005, página 2, líneas 5-8, 38-52; ejemplos.</p>	1-13
A	<p>US 2016/0122687 A1 (PICCIRILLI, A.) 05.05.2016, párrafos [0030]-[0043]; [0045]; reivindicaciones.</p>	1-13
A	<p>WO 2016/198616 A1 (BIOTAGE AB) 15.12.2016, página 1, líneas 3-4; página 4, líneas 2-7; reivindicaciones.</p>	1-13

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2019/070840

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES 2222338T3	01.02.2005	EP1246633 A2	09.10.2002
		TNSN01006 A1	03.04.2003
		PE20011069 A1	05.11.2001
		KR20020068399 A	27.08.2002
		KR100719860B B1	21.05.2007
		ZA200205622 B	24.02.2003
		US2003130532 A1	10.07.2003
		US6759543 B2	06.07.2004
		TR200402227T T4	21.10.2004
		PT1246633E E	31.12.2004
		MXPA02006844 A	23.10.2002
		MX226314 B	15.02.2005
		IL150680 A	25.07.2005
		WO0151596 A2	19.07.2001
		WO0151596 A3	28.02.2002
		FR2803598 A1	13.07.2001
		FR2803598 B1	26.04.2002
		DK1246633T T3	29.11.2004
		DE60104390T T2	04.08.2005
		CA2396989 A1	19.07.2001
		CA2396989 C	02.08.2011
		BR0107605 A	15.10.2002
		BRPI0107605 B1	01.09.2015
		AU3185901 A	24.07.2001
AU779040B B2	06.01.2005		
AT271391T T	15.08.2004		
AR026843 A1	26.02.2003		
-----	-----	-----	-----
US 2016122687 A1	05.05.2016	JP2016527336 A	08.09.2016
		CN105358665 A	24.02.2016
		CA2914490 A1	11.12.2014
		EP3004301 A1	13.04.2016
		WO2014195639 A1	11.12.2014
		FR3006329 A1	05.12.2014
		FR3006329 B1	05.06.2015
-----	-----	-----	-----
WO 2016198616 A1	15.12.2016	US2018188142 A1	05.07.2018
		EP3308133 A1	18.04.2018
		EP3104156 A1	14.12.2016
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

B01J20/14 (2006.01)

B01J20/16 (2006.01)

B01J20/28 (2006.01)

C11B7/00 (2006.01)

A23D9/04 (2006.01)