



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 326 453**

② Número de solicitud: 200702771

⑤ Int. Cl.:

G01N 27/26 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23J 3/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **22.10.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.10.2009**

Fecha de la concesión: **13.07.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **26.07.2010**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.07.2010

⑰ Titular/es: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Martínez Girón, Ana Belén;
Domínguez Vega, Elena;
García Ruiz, Carmen;
Crego Navazo, Antonio L. y
Marina Alegre, María Luisa**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimientos analíticos por electroforesis capilar quiral para la separación rápida de los enantiómeros del aminoácido no proteico ornitina y su determinación en alimentos.**

㉑ Resumen:

Procedimientos analíticos por electroforesis capilar quiral para la separación rápida de los enantiómeros del aminoácido no proteico ornitina y su determinación en alimentos.

La invención consiste en el desarrollo de dos procedimientos en condiciones de análisis diferentes: condiciones básicas utilizando tampón borato conteniendo una ciclodextrina (CD) neutra como selector quiral y (ii) condiciones ácidas empleando tampón fosfato conteniendo un sistema dual de CDs (neutra y aniónica) como selectores quirales. Estos procedimientos analíticos permiten la determinación de la forma L y D de ornitina (Orn) en muestras alimentarias.

Suponen un gran avance porque son los primeros procedimientos en condiciones totalmente distintas que se han desarrollado empleando la técnica de separación de Electroforesis Capilar (CE) para el análisis quiral de Orn en el campo de los alimentos en unos tiempos de separación considerablemente inferiores a los utilizados por otras técnicas de separación. Además, son procedimientos complementarios que permiten contrastar los resultados obtenidos para muestras alimentarias, lo cual es de un gran interés para muestras complejas.

ES 2 326 453 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimientos analíticos por electroforesis capilar quiral para la separación rápida de los enantiómeros del aminoácido no proteico ornitina y su determinación en alimentos.

La invención consiste en el desarrollo de dos procedimientos en condiciones de análisis diferentes: condiciones básicas utilizando tampón borato conteniendo una ciclodextrina (CD) neutra como selector quiral y (ii) condiciones ácidas empleando tampón fosfato conteniendo un sistema dual de CDs (neutra y aniónica) como selectores quirales. Estos procedimientos analíticos permiten la determinación de la forma L y D de ornitina (Orn) en muestras alimentarias. Suponen un gran avance porque son los primeros procedimientos en condiciones totalmente distintas que se han desarrollado empleando la técnica de separación de Electroforesis Capilar (CE) para el análisis quiral de Orn en el campo de los alimentos en unos tiempos de separación considerablemente inferiores a los utilizados por otras técnicas de separación. Además, son procedimientos complementarios que permiten contrastar los resultados obtenidos para muestras alimentarias, lo cual es de un gran interés para muestras complejas.

Estado de la técnica

La determinación del contenido de aminoácidos en alimentos es necesaria por consideraciones de seguridad y calidad nutricional y por los requerimientos en la fabricación de alimentos, por ejemplo, para evaluar productos alimentarios nuevos, para controlar los niveles de enriquecimiento y para identificar o caracterizar productos, su procesado y características organolépticas [1]. La Orn es un aminoácido no proteico quiral y aunque hasta el momento no se conocen estudios de la toxicidad del enantiómero D de este aminoácido, la especificidad de la maquinaria celular conlleva a que no se metabolice por nuestro organismo de la misma forma que el enantiómero L. Además, es importante tener en cuenta que los D-aminoácidos pueden estar presentes en alimentos como consecuencia de someterlos a tratamientos como la tostación, fermentación, pasteurización, etc., por la adición de mezclas racémicas durante la fabricación, por la producción de estos D-aminoácidos por microorganismos, o por la presencia de la forma D por contaminación microbiana ya que los microorganismos contienen D-aminoácidos en la pared bacteriana [2-4].

Aunque la determinación de Orn en alimentos se ha realizado en condiciones aquirales empleando técnicas de separación como HPLC [5-12], GC [13-16] y CE [17-19], la determinación enantioselectiva de Orn, en presencia de otros aminoácidos proteicos, en muestras alimentarias sólo se ha llevado a cabo hasta la fecha por HPLC [20] y GC [20-23].

Por HPLC, se realizó una derivatización con o-ftaldialdehído (OPA) junto con tioles quirales para formar derivados tipo isoindol diastereoméricos que se separan en una columna aquiral. La separación de los derivados de Orn se consiguió en 70 minutos. Con este método se analizaron distintas cervezas con distinto grado de fermentación [20] y zumos de vegetales y frutas [21].

Por GC, los diferentes enantiómeros de los aminoácidos se convirtieron en sus respectivos ésteres y se resolvieron en columnas quirales. La separación de los ésteres de Orn se alcanzó en unos 35 min. La determinación de Orn se ha realizado en cervezas [20], en zumos de vegetales y frutas [21], en queso emmental y habas negras fermentadas [22] y mieles tratadas térmicamente [23].

Por CE sólo hay dos trabajos en la bibliografía en los que se ha conseguido la separación enantiomérica de Orn en presencia de otros seis [24] o siete [25] aminoácidos proteicos. En ambos trabajos se emplearon sistemas micelares, en uno el tensioactivo quiral (S) y (R)-N-dodecoxicarboxilvalina [24] y en otro el tensioactivo no quiral dodecilsulfato sódico en presencia de una CD neutra (γ -CD) como selector quiral [25]. Sin embargo, estos métodos por CE no se han aplicado al análisis de alimentos a pesar de necesitar unos tiempos de análisis cortos (13-15 min) para detectar Orn en comparación con HPLC o GC. Por ello, el desarrollo de procedimientos analíticos rápidos y enantioselectivos para determinar Orn empleando CE supone un gran avance metodológico en el análisis de alimentos. Además, el desarrollo de dos procedimientos analíticos por CE totalmente diferentes para la determinación quiral de Orn en alimentos supone una invención de gran relevancia porque permite contrastar resultados en el caso de muestras complejas con un gran número y variedad de aminoácidos proteicos y contribuye al estudio de la seguridad y la calidad de alimentos.

Descripción de la invención

La invención consiste en dos procedimientos analíticos por CE para la determinación quiral de Orn en alimentos destacando las características que se indican en la tabla 1.

ES 2 326 453 B1

TABLA 1

Resumen de los procedimientos de separación enantiomérica de Orn en condiciones básicas y condiciones ácidas

CONDICIONES	BÁSICAS	ÁCIDAS
Agente Derivatizante	isotiocianato de fluoresceína (FITC)	6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (AQC)
Tampón	Borato 100 mM pH 10.0	Fosfato 50 mM pH 2.0
Selector Quiral	0.13 % γ -CD	5 % β -CD-sulfatada + 2 % acetyl- γ -CD
Voltaje	20 kV	- 25 kV
Temperatura	25 °C	15 °C
Inyección de muestra	50 mbar - 5 s (muestra derivatizada) 50 mbar- 5 s (FITC en acetonitrilo)	50 mbar - 2 s (acetonitrilo) 50 mbar - 3 s (AQC en acetonitrilo) 50 mbar - 5 s (muestra en borato 1:3) 50 mbar- 5s (medio de separación)
Detección UV	240 \pm 5 nm	260 \pm 1 nm
Tiempo de migración (Orn)	< 9 min	< 15 min
Resolución	~ 5	~ 20
Orden de migración	D-Orn < L-Orn	L-Orn < D-Orn

Las ventajas principales de los procedimientos de análisis quiral inventados son las siguientes:

- 1 Los procedimientos objeto de la invención se pueden realizar con una instrumentación básica y son por tanto accesibles a la mayor parte de los laboratorios de análisis.
- 2 Ambos procedimientos permiten la separación rápida de los enantiómeros de Orn en menos de 9 min con una resolución enantiomérica de 5 en condiciones básicas, y en unos 15 minutos y una resolución de 20 en condiciones ácidas.
- 3 Los procedimientos objeto de la invención son aplicables a alimentos con una composición sencilla de aminoácidos como suplementos alimenticios así como alimentos con una matriz más compleja como muestras fermentadas.
- 4 Ambos procedimientos, tanto en condiciones básicas como ácidas, suponen una sencilla separación electroforética utilizando las CDs como selectores quirales que permiten alcanzar una elevada resolución enantiomérica de Orn.
- 5 El método desarrollado en condiciones básicas supone la migración en primer lugar del enantiómero D de Orn lo que supone una ventaja en la determinación de este enantiómero como impureza porque lo más conveniente en estos casos es que migre en primer lugar para evitar solapamientos del pico minoritario (D-Orn) con la cola del pico mayoritario (L-Orn). Se obtiene un orden inverso de migración de los enantiómeros de Orn en condiciones ácidas pero la separación enantiomérica es tan elevada que permite la determinación del enantiómero D que aparece en una zona muy limpia evitando interferencias por solapamiento con otros picos.
- 6 El procedimiento de tratamiento de muestra es simple y rápido en ambos procedimientos. En condiciones básicas se realiza una derivatización previa al capilar (*pre-capillary*) que se acelera 96 veces empleando una sonda de ultrasonidos, mientras que en condiciones ácidas la derivatización es en el propio capilar (*in-*

capillary) y forma parte del método electroforético simplificando notablemente el procedimiento global y disminuyendo los costes totales del procedimiento.

7 Los dos procedimientos electroforéticos permiten el análisis de alimentos de matrices sencillas, como por ejemplo suplementos alimenticios, y matrices complejas, como por ejemplo alimentos fermentados. El enorme potencial de separación, la selectividad de separación y el grado de automatización alcanzado por el procedimiento en condiciones ácidas hace que éste sea el procedimiento a considerar preferentemente para el análisis de alimentos complejos. Además, el tiempo de separación de Orn en este procedimiento puede reducirse notablemente si se reduce la longitud del capilar. Así, al reducir la longitud efectiva del capilar de 64 a 40 cm el tiempo de separación de Orn se reduce de 15 a 6 min.

Descripción de las figuras

Figura 1. Electroforegrama correspondiente a la separación enantiomérica de Orn en presencia de Lys, Arg y Asp en condiciones básicas. Derivatización previa al capilar (*pre-capillary*) con FITC. Condiciones electroforéticas: capilar estándar de sílice fundida, 48.5 cm (40 cm hasta la ventana de detección) x 50 μm de diámetro interno; temperatura de separación, 25°C; voltaje aplicado, + 20 kV; detección UV a 240 nm con un ancho de banda de 10 nm.

Figura 2. Análisis de muestras alimentarias en condiciones básicas: a) electroforegrama correspondiente a un suplemento alimenticio sin enriquecer y enriquecido con 0.100 mM de Orn racémica y b) electroforegrama correspondiente a una muestra de cerveza sin enriquecer y enriquecida con 0.100 mM de Orn racémica. Derivatización previa con FITC. Condiciones electroforéticas de la Figura 1.

Figura 3. Electroforegramas correspondientes a la separación de los enantiómeros de Orn en una mezcla multicomponente formada por 20 aminoácidos proteicos y dos aminoácidos no proteicos (Orn y ácido γ -aminobutírico, GABA) obtenidos en condiciones ácidas: a) primera zona de migración de los aminoácidos y b) segunda zona de migración de los aminoácidos. Derivatización con AQC. Condiciones electroforéticas: capilar estándar de sílice fundida, 72.5 cm (64 cm hasta la ventana de detección) x 50 μm de diámetro interno; temperatura de separación, 15°C; voltaje aplicado, -25 kV; detección UV a 260 nm con un ancho de banda de 2 nm.

Figura 4. Análisis de muestras alimentarias en condiciones ácidas: a) electroforegrama correspondiente a un suplemento alimenticio sin enriquecer y enriquecido con 0.225 mM de Orn racémica y b) electroforegrama correspondiente a una muestra de cerveza sin enriquecer y enriquecida con 0.112 mM de Orn racémica. Derivatización en el capilar con AQC. Condiciones electroforéticas de la Figura 3.

Modo de realización

(I) Procedimiento en condiciones básicas

Este procedimiento se ha llevado a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE equipado con un detector UV-visible con diodos en serie (DAD). El capilar empleado para la separación enantiomérica de Orn es un capilar estándar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo con una longitud efectiva de 40 cm (longitud entre la inyección y la ventana de detección) y 48.5 cm de longitud total. Se realiza una detección UV a 240 nm con una anchura de banda de 10 nm y un tiempo de respuesta de 0.1 s.

La preparación de las disoluciones patrón y de las muestras alimentarias se realiza disolviendo las mismas en tampón borato 100 mM a pH 10.0 en relación 1:2. La Orn presente, así como el resto de compuestos con grupos α -amino, se derivatiza previamente a la inyección en el capilar electroforético (*pre-capillary*) con FITC en acetona. Como esta reacción de derivatización es lenta, requiere 16 horas, se acelera 96 veces empleando una sonda de ultrasonidos (100% de amplitud) durante 10 min previamente a la inyección directa en el equipo de CE.

Las condiciones de separación consisten en un medio de separación (BGE) compuesto por una disolución acuosa de borato 100 mM ajustada con NaOH 1 M hasta pH 10.0 conteniendo un 0.13% (p/v) de γ -CD como selector quiral. El medio de separación se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm antes de inyectarse en el equipo de CE.

La separación enantiomérica se lleva a cabo inyectando hidrodinamicamente los patrones o las muestras (50 mbar durante 5 s) seguidos del BGE (50 mbar durante 5 s) en un capilar previamente acondicionado con NaOH 0.1 M, H₂O y medio de separación, cada uno de ellos mediante la aplicación de una presión de 1 bar durante 2 min. Se establece un voltaje de separación de + 20 kV en un capilar termostaticado a 25°C. La disolución de NaOH se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm antes de ser utilizada para el acondicionamiento del capilar de CE.

La aplicación del método establecido a una disolución de Orn patrón en relación 1:3 de sus enantiómeros permite identificar las formas D y L de Orn y establecer el orden de migración enantiomérica.

El procedimiento de separación y determinación enantioselectiva inventado permite determinar los enantiómeros de Orn en presencia de los aminoácidos proteicos Arg, Lys y Asp que normalmente están presentes en suplementos

ES 2 326 453 B1

alimenticios. Además, es aplicable a la identificación de los enantiómeros de Orn en otros alimentos de matrices más complejas, como por ejemplo, alimentos fermentados.

(II) Procedimiento en condiciones ácidas

5 Este procedimiento se lleva a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE equipado con un detector ultravioleta-visible con diodos en serie (DAD). Se emplea un capilar estándar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo con una longitud efectiva de 64 cm (longitud entre la inyección y la ventana de detección) y 72.5 cm de longitud total. La detección UV se realiza a 260 nm con una anchura de banda de 2 nm y un tiempo de respuesta de 0.1 s.

15 La preparación de las disoluciones patrón y de las muestras sólidas, como los suplementos alimenticios, se realiza disolviéndolas en agua Milli-Q. Las muestras líquidas, como alimentos fermentados, se sonicen previamente a la derivatización si tienen gas disuelto. Estas disoluciones se mezclan en una relación 1:3 con tampón borato (componente de AccQ-FluorTM Reagent Kit de Waters) previamente a la inyección en el sistema de CE. Se inyecta una banda de acetonitrilo seguida de otra de AQC en acetonitrilo (componentes de AccQ-FluorTM Reagent Kit de Waters) previamente a la inyección del analito para realizar la reacción de derivatización en el propio capilar.

20 Las condiciones de separación consisten en un BGE compuesto por una disolución acuosa de fosfato 50 mM ajustada con trietanolamina comercial (99%) hasta pH 2.0 y una mezcla del 5% (p/v) de β -CD sulfatada y 2% (p/v) de acetil- γ -CD. El medio de separación se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm antes de inyectarse en el capilar de CE.

25 La separación enantiomérica se lleva a cabo inyectando en el capilar de forma hidrodinámica acetonitrilo (50 mbar - 2 s), una disolución de AQC en acetonitrilo (50 mbar durante 3 s) y los patrones o muestras en borato (50 mbar durante 5 s). Previamente el capilar se acondiciona con H₂O, H₃PO₄ 0.1 M y medio de separación aplicando en cada uno de los casos 1 bar durante 2 min. Se utiliza una temperatura de trabajo de 15°C y un voltaje de separación de - 25 kV.

30 La aplicación del método establecido a una disolución de Orn patrón preparada en relación 1:3 permite identificar los enantiómeros L y D y establecer el orden de migración enantiomérica.

35 El procedimiento de separación y determinación enantioselectiva inventado es aplicable a la determinación de los enantiómeros de Orn en presencia de los aminoácidos Arg, Lys y Asp en alimentos funcionales, como los suplementos alimenticios. Además, permite la separación de los enantiómeros de Orn en una mezcla multicomponente de 20 aminoácidos proteicos (19 quirales y Glicina) y otro no proteico y no quiral: GABA. Además de la resolución de los enantiómeros de Orn, permite resolver los enantiómeros de 17 de los 19 aminoácidos proteicos quirales y permite observar dos picos para Treonina y uno para Isoleucina a pesar de que estos dos aminoácidos presentan cuatro estereoisómeros debido a sus dos centros estereogénicos. La elevada selectividad de este procedimiento lo hace muy adecuado para la determinación de Orn en alimentos con matrices complejas como por ejemplo los alimentos fermentados.

Aplicación industrial

45 Para el control de calidad de alimentos funcionales o fermentados interesa tanto al fabricante como a la administración determinar la presencia y contenido de las formas D y L de Orn.

Bibliografía

- 50 1. Peace & Gilani, *Journal of AOAC International*, 2005, 88, 881-887.
2. H. Brückner, D. Becker, M. Lüpke, *Chirality*, 1993, 5, 385-392.
3. V. Poinso, C. Bayle, F. Couderc, *Electrophoresis*, 2003, 24, 4047-4062.
- 55 4. A. Cifuentes, *Electrophoresis*, 2006, 27, 283-303.
5. T. Bauza, A. Blaise, F. Dumas, J. C. Cabanis, *J. Chromatogr. A*, 1995, 707, 373-379.
- 60 6. V. Lozanov, S. Petrov, V. Mitev, *J. Chromatogr.A*, 2004, 1025, 201-208.
7. D. Heems, G. Luck, C. Fraudeau, E. Vérette, *J. Chromatogr.A*, 1998, 798, 9-17.
8. A. Vasanits, D. Kutlán, P. Sass, I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr.A*, 2000, 870, 271-287.
- 65 9. T. Garde-Cerdán, M. Arias-Gil, A. R. Marsellés-Fontanet, C. Ancin-Azpoñoceta, O. Martín-Belloso, *Food Control*, 2007, 18, 473-479.

ES 2 326 453 B1

10. A. M. **González Paramás**, J. A. **Gómez Bárez**, C. **Cordón Marcos**, R. J. **García-Villanova**, J. **Sanchez Sánchez**, *Food Chemistry*, 2006, 95, 148-156.
- 5 11. B. **Suárez Valles**, N. **Palacios García**, R. **Rodríguez Madrera**, A. **Picinelli Lobo**, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 6408-6413.
12. D. **Kutlán**, I. **Molnár-Perl**, *J. Chromatogr. A*, 2003, 987, 311-322.
13. K. R. **Kim**, J. H. **Kim**, E. **Cheoung**, C-M. **Jeong**, *J. Chromatogr. A*, 1996, 722, 303-309.
- 10 14. R. **Lizárraga-Guerra**, M. G. **López**, *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 2556-2559.
- 15 15. R. **Mayadunne**, T-T **Nguyen**, P. J. **Marriott**, *Anal. Bional. Chem.*, 2005, 382, 836-847.
16. C-H. **Oh**, J-H. **Kim**, K-R. **Kim**, T. J. **Mabry**, *J. Chromatogr. A*, 1995, 708, 131-141.
17. Q. **Dong**, W. **Jin**, J. **Shan**, *Electrophoresis*, 2002, 23, 559-564.
18. R. M. **Latorre**, J. **Saurina**, S. **Hernández-Cassou**, *J. Chromatogr. A*, 2002, 976, 55-64.
- 20 19. G. **Nouadje**, N. **Simeón**, F. **Dedieu**, M. **Nertz**, P. **Puij**, F. **Couderec**, *J. Chromatogr. A*, 1997, 765, 337-343.
20. T. **Erbe**, H. **Brückner**, *J. Chromatogr. A*, 2000, 881, 81-91.
- 25 21. H. **Brückner**, T. **Westhauser**, *Chromatographia*, 1994, 39, 419-426.
22. H. **Brückner**, M. **Hausch**, *Chromatographia*, 1989, 28, 487-492.
23. R. **Pätzold**, H. **Brückner**, *Eur Food Res Techol*, 2006, 223, 347-354.
- 30 24. M. E. **Swartz**, J. R. **Mazzeo**, E. R. **Grover**, P. R. **Brown**, *Anal. Biochem.*, 1995, 231, 65-71.
25. L. J. **Jin**, I. **Rodríguez**, S. F. Y. **Li**, *Electrophoresis*, 1999, 20, 1538-1545.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimientos analíticos para la determinación de los enantiómeros de Orn que permiten separar y determinar las formas D y L de Orn por electroforesis capilar (CE) en presencia de otros aminoácidos en muestras alimentarias.
- 10 2. Procedimientos, según la reivindicación 1, que comprenden una reacción de derivatización previa para alcanzar sensibilidad de detección y permitir la interacción con el selector quiral. Se realiza una derivatización previa (*pre-capillary*) con FITC, acelerada unas 100 veces con una sonda de ultrasonidos, en condiciones básicas, mientras que se emplea una derivatización en el capilar (*in-capillary*) con AQC en condiciones ácidas.
- 15 3. Procedimientos, según la reivindicación 2, que consisten en el empleo de un medio de separación conteniendo ciclodextrinas (CDs) como selectores quirales: (i) una CD neutra (γ -CD 0.13% (p/v)) para el procedimiento en condiciones básicas y (ii) un sistema dual de CDs compuesto por una CD altamente aniónica (β -CD sulfatada 5% (p/v)) y un derivado de CD neutro (acetil- γ -CD 2% (p/v)) para el procedimiento en condiciones ácidas.
- 20 4. Procedimientos, según la reivindicación 3, **caracterizados** porque el tampón de separación se prepara: (i) con una disolución acuosa de borato 100 mM que se ajusta con NaOH a pH 10.0 en condiciones básicas y (ii) con una disolución acuosa de ácido fosfórico 50 mM ajustada con trietanolamina a pH 2.0 en condiciones ácidas.
- 25 5. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** porque la separación electroforética se realiza en capilares estándar de sílice de 50 μ m de diámetro interno y 375 μ m de diámetro externo. La longitud total y efectiva (desde la inyección hasta la detección) varía según el procedimiento siendo de 48.5 y 40 cm en condiciones básicas y de 72.5 y 64 cm en condiciones ácidas.
- 30 6. Procedimientos, según la reivindicación 5, que comprenden un acondicionamiento entre inyecciones con NaOH 0.1 M, H₂O y medio de separación en condiciones básicas y con H₂O, H₃PO₄ 0.1 M y el medio de separación en condiciones ácidas, aplicando una presión de 1 bar durante 2 minutos en cada una de las etapas.
- 35 7. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** porque se llevan a cabo a una temperatura de 25°C en condiciones básicas y de 15°C en condiciones ácidas.
- 40 8. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** porque se realizan a un voltaje de separación de +20 kV en condiciones básicas y -25 kV en condiciones ácidas.
- 45 9. Procedimientos, según la reivindicación 1, 2, 3 y 4, **caracterizados** porque la detección se lleva a cabo a una longitud de onda de 240 nm con una anchura de banda de 10 nm en condiciones básicas y una longitud de onda de 260 nm con una anchura de banda de 2 nm en condiciones ácidas.
- 50 10. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** porque tanto patrones como muestras son inyectados en el sistema de CE de forma hidrodinámica (50 mbar durante 5 s).
- 55 11. Procedimientos, según la reivindicación 1, **caracterizados** porque permiten determinar los enantiómeros de Orn en alimentos funcionales y alimentos sometidos a procesos de fermentación.

45

50

55

60

65

Figura 1

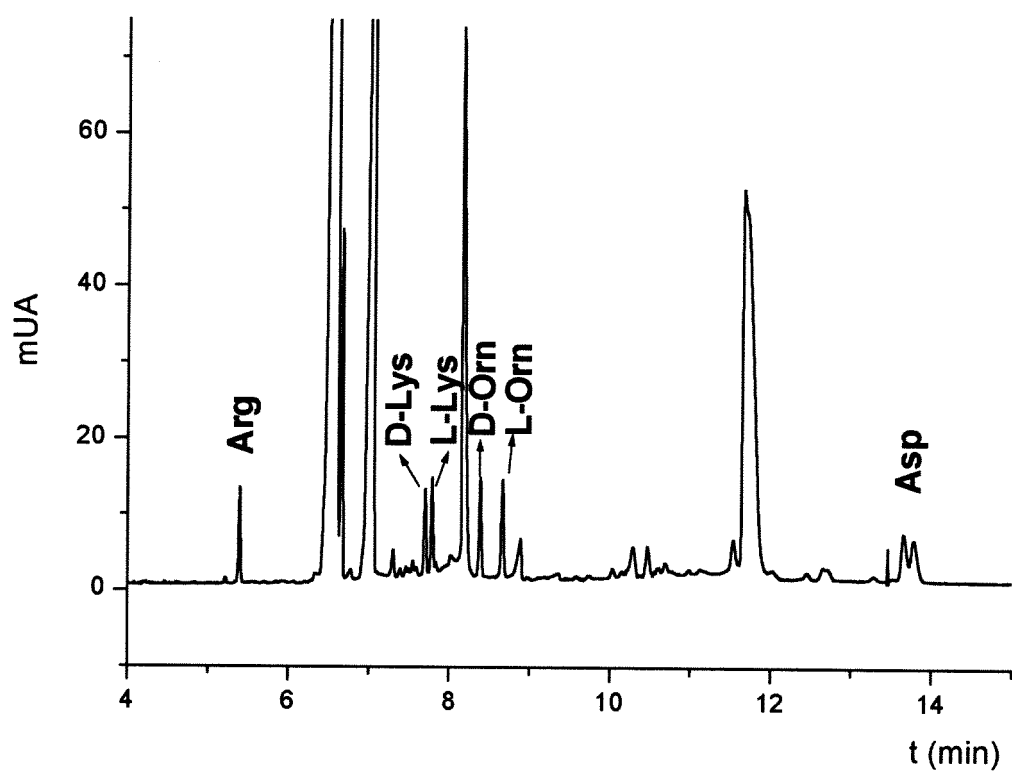
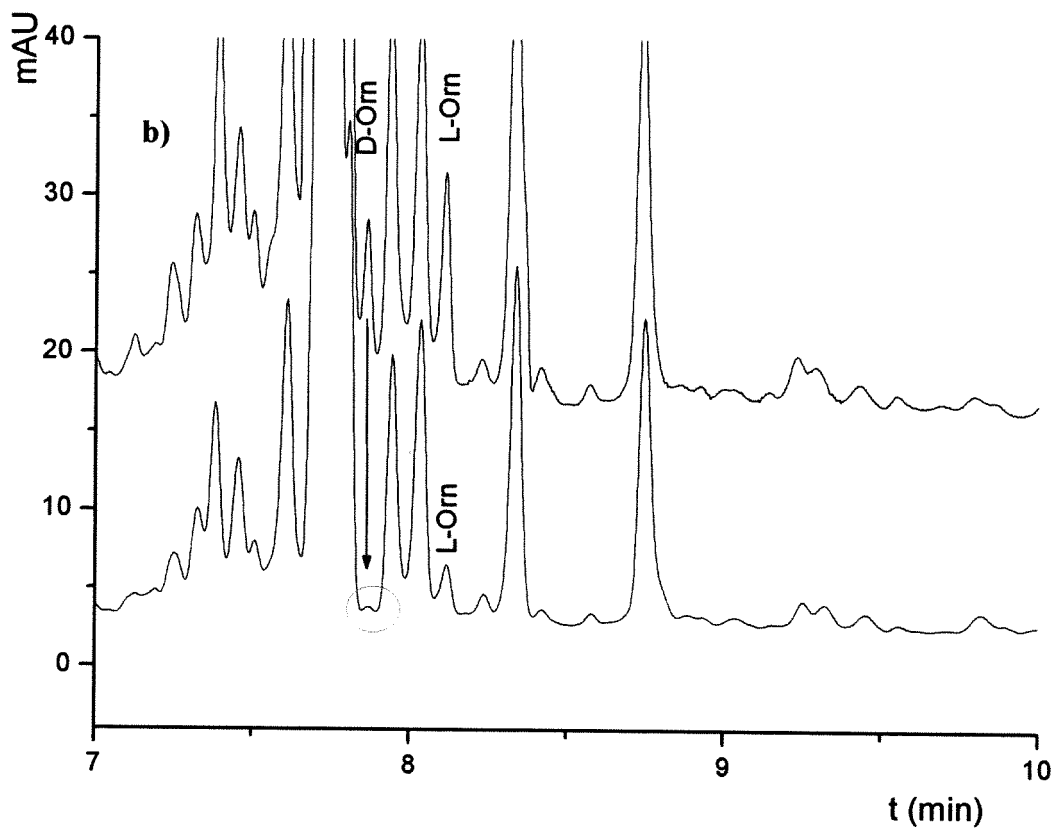
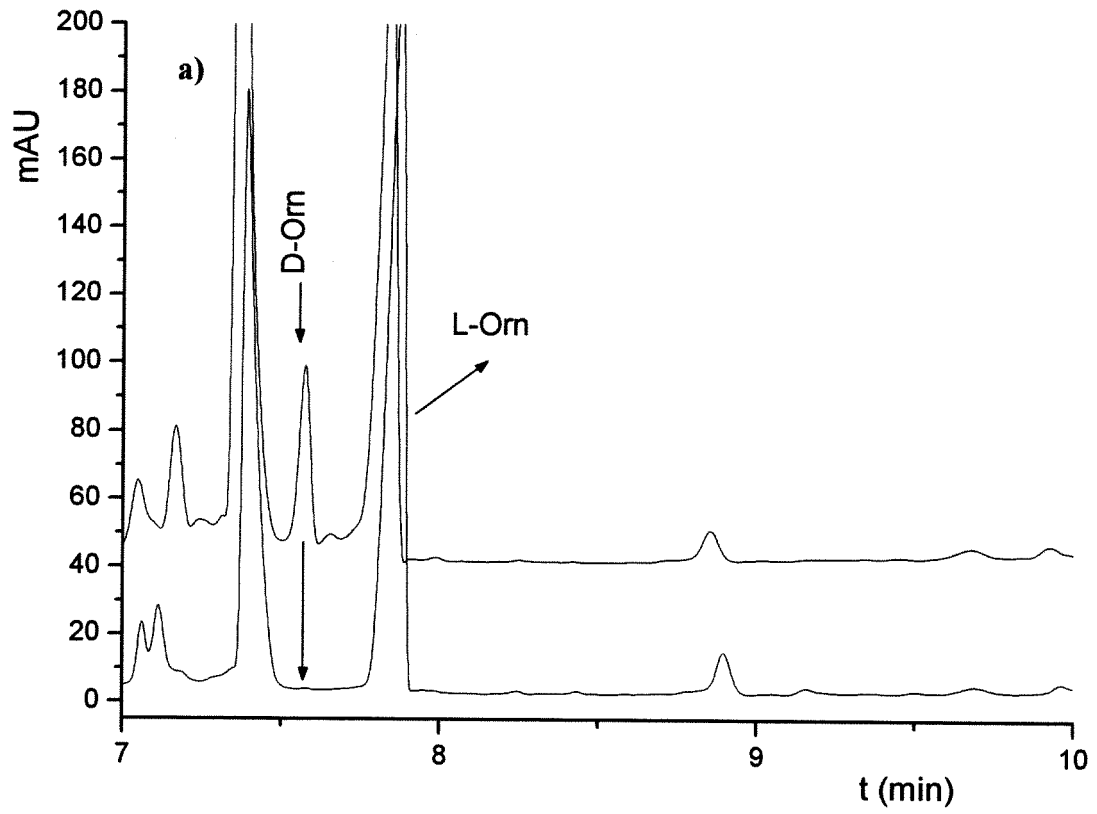


Figura 2



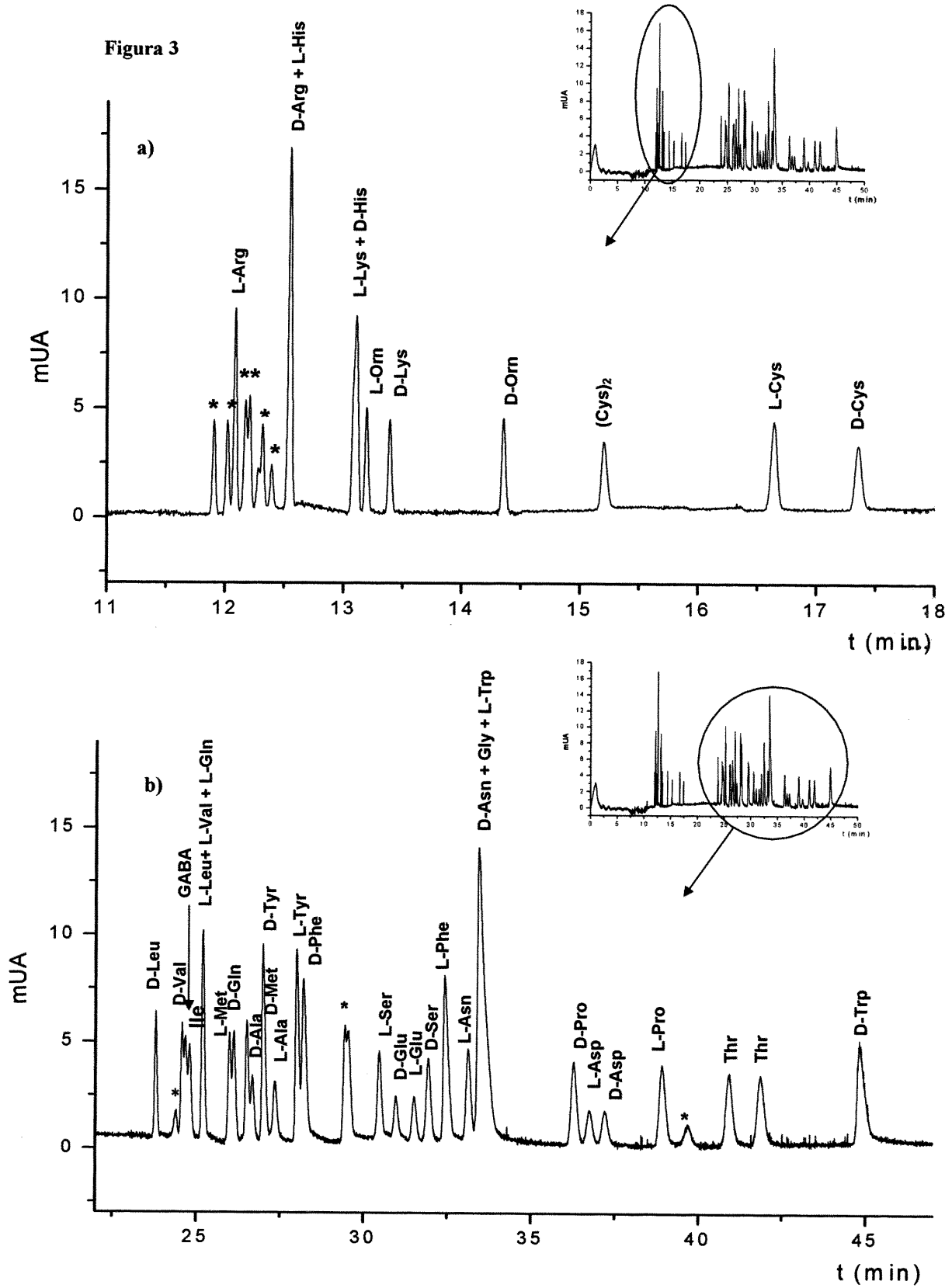
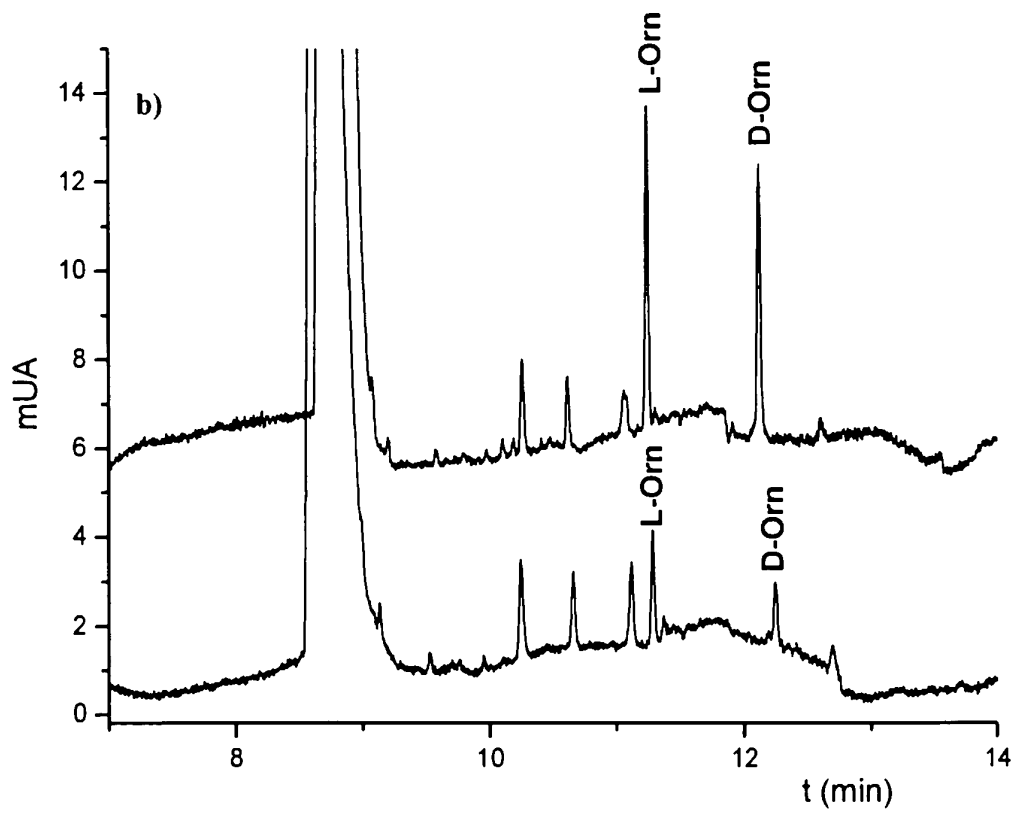
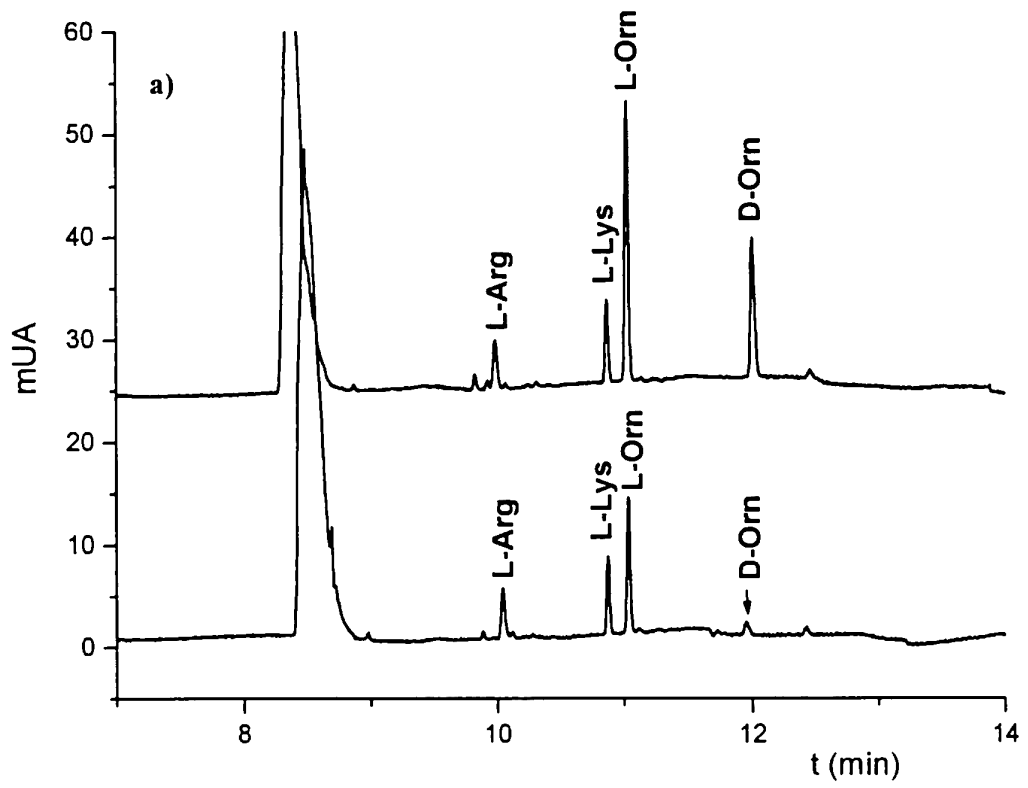


Figura 4





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 326 453

② Nº de solicitud: 200702771

③ Fecha de presentación de la solicitud: 22.10.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MICHAEL E. SWARTZ, JEFFREY R. MAZZEO, EDWARD R. GROVER y PHYLLIS R. BROWN. Separation of amino acid anantiomers by micellar electrokinetic capillary chromatography using synthetic chiral surfactants. Analytical biochemistry, 1995, Vol 231, páginas 65-71.	1-11
A	LIAN JI, JIN, ISABEL RODRIGUEZ, SAM F.Y.LI. enantiomeric Separation of amino acids derivatized with fluoresceine isothiocyanate isomer I by micellar electrokinetic chromatography using beta y gamma ciclodextrins as chiral selectors. Electrophoresis, 1999, Vol 20, páginas 1538-1545.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

21.09.2009

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 27/26 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23J 3/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, A23L, A23J

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.09.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-11	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-11	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Separation of amino acid enantiomers	1995
D02	Enantiomeric separation of amino acids	1999

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a dos procedimientos analíticos por electroforesis capilar quiral para la separación rápida de los enantiómeros de aminoácido de ornitina en condiciones de análisis diferentes, uno en condiciones básicas y otro en condiciones ácidas.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (LP ARTS. 6 Y 8)

El documento D01 hace referencia a la separación de enantiómeros de aminoácidos por cromatografía micelar electrocinética (una modificación de la electroforesis). Dicha técnica utiliza como agente derivatizante el 6-aminoquinil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC), como solución tampón el borato sódico, y separa mezclas racémicas de aminoácidos tales como isoleucina, leucina, lisina y ornitina entre otros.

El documento D02 se refiere a la separación enantiomérica de aminoácidos derivatizados con isómero I de isocianato de fluoresceína (FITC), utilizando beta y gamma-ciclodextrinas como selectores quirales, así como tampón borato. Con dicho procedimiento se puede llevar a cabo la separación enantiomérica de aminoácidos tales como serina, valina y ornitina entre otros.

Ninguno de los documentos citados considerados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-11. Además, en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-11 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con la LP arts. 6 y 8.