



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 305**

51 Int. Cl.:
B01D 15/00 (2006.01)
B01J 20/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08737192 .8**
96 Fecha de presentación : **17.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2134435**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2009**

54 Título: **Extracción en fase sólida de ocratoxinas.**

30 Prioridad: **17.04.2007 GB 0707375**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.04.2011

73 Titular/es: **TOXIMET LIMITED**
Medway Enterprise Hub University of Greenwich
At Medway Central Avenue Chatham Maritime
Kent ME4 4TB, GB

72 Inventor/es: **Coker, Raymond;**
Piletska, Olena y
Piletsky, Sergey

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 305 T3

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

DESCRIPCIÓN

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a un copolímero adecuado para la unión de ocratoxina A. El copolímero puede usarse para la extracción en fase sólida de ocratoxinas y la inmovilización de ocratoxinas en cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) para el análisis cualitativo o cuantitativo de ocratoxinas en soluciones extraídas de productos alimenticios.

Antecedentes de la Invención

10 Una amplia diversidad de alimentos humanos y piensos animales, incluyendo nueces comestibles, semillas oleaginosas, granos de cereales y forrajes y productos derivados de los mismos son susceptibles de contaminación por micotoxinas, que son subproductos metabólicos tóxicos de hongos que pueden aparecer en los cultivos de alimentos y piensos tanto antes como después de la recolección

15 La ocratoxina A es la más importante y la que aparece más comúnmente de un grupo estructuralmente relacionado de compuestos de ocratoxina producidos por algunas especies de *Aspergillus*, tales como *A. ochraceus*, principalmente en regiones tropicales, y por *Penicillium verrucosum*, un hongo del almacenamiento común en áreas templadas tales como Canadá, Europa occidental y noroccidental y partes de Sudamérica. La UE ha propuesto recientemente límites máximos reglamentarios para la ocratoxina A de 5 µg/kg en granos de cereales sin procesar incluyendo arroz y trigo sarraceno, 3 µg/kg para productos de cereales derivados o para granos de cereales para consumo humano directo y 20 10 µg/kg en pasas. Por consiguiente, la determinación directa del nivel de ocratoxina es un aspecto importante del control de calidad en alimentos y piensos.

25 Las mediciones del contenido de micotoxinas se han llevado a cabo convencionalmente mediante el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Sin embargo, en los casos en los que no está disponible o no es apropiado un equipo de HPLC, también es posible la determinación por cromatografía en capa fina (CCF). Están disponibles aparatos de exploración comerciales para la determinación de micotoxinas después de la separación por CCF, usando lámparas de mercurio con una longitud de onda de emisión de 366 nm como fuente de luz para estimular la fluorescencia, que se detecta y cuantifica por fotomultiplicadores. Para el ensayo cuantitativo también existen técnicas de radioinmunoensayo y técnicas basadas en inmunquímica tales como procedimientos de ensayo 30 inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

30 Antes de que una solución obtenida por extracción a partir de una muestra de producto alimenticio se someta a una medición cuantitativa usando HPLC, por ejemplo, la solución puede someterse a un procedimiento de "limpieza" usando una extracción en fase sólida para eliminar los compuestos que puedan interferir con la evaluación de micotoxinas.

35 La detección cualitativa de micotoxinas puede llevarse a cabo usando columnas cromatográficas pequeñas (denominadas "minicolumnas") en las que las micotoxinas se inmovilizan como una capa dentro de un adsorbente mineral en las minicolumnas. Las minicolumnas se observan con luz ultravioleta para provocar la fluorescencia de la micotoxina inmovilizada. Se han adoptado diversos procedimientos de minicolumna como ensayos oficiales de la AOAC International (Association of Official Analytical Communities).

40 El documento WO 2006/123189 describe aparatos para el ensayo fluorométrico cuantitativo de micotoxinas inmovilizadas en capas en minicolumnas y también menciona el uso de polímeros no imprimidos molecularmente (en blanco) y polímeros imprimidos molecularmente como adsorbentes para micotoxinas en cartuchos de EFS.

45 El documento WO 2003/101580 desvela un procedimiento de unión de micotoxinas a un soporte sólido que incluye preparar un polímero imprimido molecularmente (MIP) usando la micotoxina como molde. A partir de las listas exhaustivas de micotoxinas y monómeros funcionales que se mencionan, los únicos MIP que se preparan realmente usan las micotoxinas desoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZON) como moldes. El MIP para el DON se polimeriza a partir de metacrilato de dietilaminoetilo (DEAMA), 4-vinilpiridina (4-VP) o ácido metacrílico (MAA), con etilendíglicol-metacrilato (EDMA) o divinilbenceno (DVP) como reticulante. El MIP para la ZON se polimeriza a partir del ácido trifluorometacrílico (TFM) o 4-VP 50 usando EDMA como reticulante.

55 El documento WO 2006/120381 desvela un sensor que comprende un polímero imprimido molecularmente para la unión del anestésico propofol. El polímero está compuesto por un monómero seleccionado de uno o más de metacrilato de *N,N*-dietilaminoetilo (DEAEM), acrilamida, ácido 2-(trifluorometil)acrílico (TFMAA), ácido itacónico y fosfato de metacrilato de etilenglicol (EGMP) y un reticulante. Durante la polimerización, el propofol se usa como molde para conseguir la impresión

molecular deseada.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un polímero que pueda usarse como un adsorbente de EFS que sea selectivo para ocratoxinas.

Sumario de la Invención

5 La presente invención se basa en el descubrimiento de que un copolímero de metacrilato de dietilaminoetilo y ácido itacónico, preparado sin impresión molecular, es capaz de inmovilizar la ocratoxina A cuando se usa como un adsorbente de EFS.

10 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un copolímero de metacrilato de dietilaminoetilo y ácido itacónico, preparado sin impresión molecular, para su uso como un adsorbente de EFS para inmovilizar la ocratoxina A.

Cuando dichos polímeros son novedosos en sí mismos también constituyen otro aspecto de la presente invención.

15 Los polímeros usados en la invención pueden prepararse por técnicas de polimerización convencionales sin el uso de ocratoxinas, o análogos estructurales, como moldes. Preferentemente, los polímeros se preparan en forma macroporosa, por ejemplo mediante el uso de un porógeno durante la polimerización.

Un aspecto adicional de la presente invención es una unidad adsorbente de EFS que comprende una columna, cubeta, barra, aguja, membrana o superficie plana cargada o revestida con una capa adsorbente de un polímero que contiene restos amido o aminoalquilo y restos ácidos

20 Otro aspecto de la presente invención es el uso de un copolímero de metacrilato de dietilaminoetilo y ácido itacónico, preparado sin impresión molecular, como adsorbente para ocratoxinas.

25 Un aspecto adicional de la presente invención es un análisis fluorométrico para ocratoxinas que comprende adsorber las ocratoxinas sobre un polímero que contiene restos amido o aminoalquilo y restos ácidos cargados en o sobre una cubeta, cartucho, barra o superficie plana, exponiendo las ocratoxinas inmovilizadas a luz UV y detectando la fluorescencia emitida por las ocratoxinas inmovilizadas.

Los monómeros que pueden usarse para la preparación de copolímeros para proporcionar restos apropiados en el polímero incluyen metacrilato de dietilaminoetilo (DEAEM) y un monómero ácido seleccionado de ácido itacónico (IA).

30 Preferentemente, el copolímero está reticulado con un agente reticulante eficaz que no interfiere con la interacción con la ocratoxina. Los reticulantes adecuados incluyen diacrilatos de poliol, tales como dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), bis-acrilamidas tales como *N,N'*-metilbisacrilamida y compuestos de divinilo, tales como divinilbenceno (DVB) y sus análogos.

Ventajosamente, el polímero o copolímero es poroso para aumentar el área superficial disponible para la interacción con las ocratoxinas.

35 Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 es una vista de sección transversal de un cartucho adsorbente de EFS de acuerdo con la invención,

la Figura 2 es una vista de sección transversal de una configuración alternativa del cartucho adsorbente de EFS de la Figura 1.

40 Descripción Detallada de la Invención

Un polímero que comprende unidades que contienen restos aminoalquilo y ácido como componente primario de la presente invención puede prepararse por copolimerización de los monómeros apropiados que contienen, respectivamente, restos aminoalquilo y ácido (los monómeros funcionales), preferentemente en presencia de un agente reticulante.

45 Preferentemente, el polímero se prepara poroso para aumentar el área superficial disponible para la interacción con las ocratoxinas. El polímero poroso puede prepararse por polimerización de un monómero funcional y un reticulante en presencia de un porógeno, es decir, un material que sea dispersable en los monómeros y que permanezca disperso en los polímeros después de la reacción de los monómeros, pero que puede eliminarse después de que se forme el polímero para formar poros dentro del polímero. Normalmente, un aumento en la porosidad conduce a un aumento en el área

superficial que podría usarse para maximizar la capacidad de unión.

5 Normalmente, un porógeno adecuado es inerte en la reacción de polimerización. Los porógenos pueden ser sólidos, líquidos o gases. Los sólidos o líquidos pueden eliminarse por descomposición o eliminarse por disolución con un disolvente adecuado. Normalmente, se usa un porógeno líquido que puede dispersarse finamente en la mezcla de polimerización por agitación, y que puede eliminarse por lavado del polímero con un disolvente adecuado.

El polímero también puede prepararse como un gel, siendo beneficioso para crear artículos ópticamente transparentes.

10 Cuando los monómeros funcionales están reticulados con los reticulantes favoritos dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), *N,N'*-metilenbisacrilamida y divinilbenceno (DVB), entonces un porógeno adecuado es *N,N*-dimetilformamida (DMF). También pueden usarse acetonitrilo, metanol, tolueno, etanol, glicerol u otros disolventes en la práctica para la polimerización de radicales.

15 La reacción del monómero funcional con el agente reticulante seleccionado se lleva a cabo en condiciones convencionales adecuadas para los reactivos. Por ejemplo, la reacción de los monómeros funcionales enumerados con el reticulante dimetacrilato de etilenglicol y divinilbenceno puede llevarse a cabo a temperaturas elevadas (es decir, por encima de la temperatura ambiente) o con irradiación UV en presencia de un iniciador adecuado, tal como 1,1-azobis(ciclohexano-carbonitrilo). La polimerización por UV puede realizarse a baja temperatura (es decir, por debajo de la temperatura ambiente) para dar como resultado la formación de polímeros tipo gel ópticamente transparentes. La polimerización por precipitación también es posible. También pueden usarse además muchas polimerizaciones por iniciadores de radicales, transferencia de átomos e iónicas diferentes para el desarrollo de polímeros adecuados.

25 Los monómeros también pueden usarse para la formación de polímeros de injerto en la superficie de perlas, membranas, superficies u otros artículos usando procedimientos químicos, UV o con plasma conocidos por los expertos en la materia.

30 En el polímero de EFS la proporción de unidades derivadas del monómero funcional respecto a las unidades derivadas del reticulante puede variar de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:100. Se ha descubierto que las proporciones dentro del intervalo de aproximadamente 1:3 a 1:20 son especialmente eficaces. Por ejemplo, una proporción de 1:4 proporciona un adsorbente eficaz en un polímero producido por polimerización térmica y en un polímero producido por polimerización UV a baja temperatura.

35 Aunque el EGDMA, la *N,N'*-metilenbisacrilamida y el divinilbenceno (DVB) son los reticulantes favoritos, pueden usarse otros monómeros capaces de reticular los monómeros funcionales. El reticulante debería ser preferentemente de una reactividad similar a la del monómero funcional. Los reticulantes adecuados incluyen, pero sin limitación, dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), dimetacrilato de glicerol (GDMA), trimetilacrilato de *N,N'*-metilenbisacrilamida (TRIM), divinilbenceno (DVB) y trimetilacrilato de trimetilpropano. Los expertos en la materia serán capaces de seleccionar monómeros y reticulantes adicionales adecuados para un sistema particular.

40 Para su uso analítico en la inmovilización de ocratoxinas, el polímero terminado puede cargarse en, o revestirse sobre o integrarse con una columna, cubeta, aguja, membrana, barra o superficie plana adecuada para su uso como una unidad adsorbente de EFS. El soporte para el adsorbente de EFS se selecciona preferentemente de un material que no presente en ningún caso fluorescencia que interfiera con la detección de fluorescencia de la aflatoxina adsorbida, o que presente fluorescencia a un nivel de fondo manejable. El polímero se carga preferentemente como un polvo o material monolítico que descansa en una capa contra una frita preformada como se encuentra en cartuchos de EFS vacíos disponibles en el mercado, o como una capa uniforme aplicada a una barra, cubeta, aguja, membrana o superficie plana.

50 Se muestra una unidad típica en la Figura 1 de los dibujos adjuntos. Un cartucho de EFS cilíndrico vacío 1 (disponible en el mercado en, por ejemplo, Supelco of Poole, Reino Unido) tiene una boquilla de salida 2 y pestañas de soporte 3 en su entrada. El cartucho está hecho de un material plástico que convenientemente tiene una baja fluorescencia y que de forma ideal no es fluorescente en las condiciones que estimulan la fluorescencia de las ocratoxinas. Una frita porosa 4, preferentemente de un material no fluorescente tal como PTFE, se coloca a través de la abertura dando acceso a la boquilla de salida 2. El polímero adsorbente en forma de polvo se carga en el cartucho para formar una capa de polímero 5. Una frita de retención adicional 6 puede colocarse contra la superficie superior de la capa de polímero 5. Como alternativa, un monolito de una forma adecuada de polímero poroso se coloca sobre la parte superior de la frita 4.

- 5 En el uso de la unidad de EFS, un extracto líquido de un material que contiene potencialmente una aflatoxina se vierte en el cartucho y se deja que drene (de forma natural o con succión) a través de la capa absorbente 5, saliendo del cartucho a través de la boquilla de salida 2. Cualquier aflatoxina en la muestra se absorbe por el polímero y forma una capa o banda en la región superior del polímero, por debajo de la frita 6, si está presente.
- 10 Las unidades adsorbentes de EFS formadas de este modo pueden usarse para el análisis cuantitativo de las ocratoxinas por inserción de la unidad en un fluorímetro analítico, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2006/123189, cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia.
- 15 Para reducir la fluorescencia de fondo durante el análisis, es útil proporcionar un área o tira opaca en la superficie del cartucho para cubrir el polímero justo por debajo de la región en la que aparecerá la banda fluorescente de la aflatoxina adsorbida. El efecto puede complementarse mediante un área o tira opaca adicional en el cartucho justo por encima de la frita 6 o de la región en la que aparecerá la banda fluorescente.
- 20 Las áreas opacas pueden formarse por aplicación de cinta adhesiva, tal como cinta adhesiva opaca o cinta de aislamiento eléctrico, preferentemente cinta negra, a un cartucho después de cargar el polímero. Como alternativa, la cinta puede aplicarse antes de la carga del polímero, si puede predecirse con exactitud el nivel superior del polímero.
- 25 En un procedimiento comercial en el que el polímero se carga en condiciones controladas con gran exactitud, puede usarse un cartucho que tenga áreas opacas formadas durante su fabricación, por ejemplo, por revestimiento o pulverización con un material opacificante.
- Esta técnica para reducir la fluorescencia de fondo es aplicable a otros cartuchos de EFS o a las minicolumnas mencionadas anteriormente con adsorbentes minerales, en las que se genera una banda que puede presentar fluorescencia de compuestos adsorbidos en un material absorbente. Por consiguiente, esto constituye un aspecto adicional de la invención independientemente del uso descrito anteriormente con los adsorbentes poliméricos de la presente invención.
- 30 Las unidades adsorbentes de EFS también pueden usarse para la limpieza de muestras antes de su análisis cuantitativo por HPLC o ELISA.
- Los polímeros pueden tratarse opcionalmente con un aceite mineral para mejorar la unión y la producción de fluorescencia de una banda de ocratoxina inmovilizada en el polímero (véase Piletska E. V., Romero-Guerra M., Guerreiro A. R., Karim K., Turner A. P. F., Piletsky S.A. (2005) Adaptation of the molecular imprinted polymers towards polar environment. *Anal. Chim. Acta*, 542, 47-51.)
- 35 Se ha descubierto que un adsorbente de EFS preparado a partir de un copolímero poroso de metacrilato de dietilaminoetilo (DEAEM) y ácido itacónico (IA) con el reticulante favorito dimetacrilato de etilenglicol o divinilbenceno es especialmente eficaz para inmovilizar la ocratoxina A.
- 40 En otra realización de la invención, mostrada en la Figura 2, puede añadirse una capa de polímero adicional 7 al cartucho sobre la frita 6 por encima del adsorbente de EFS. Ésta puede usarse para proporcionar una limpieza adicional de las soluciones de muestra suministradas al cartucho cuando sea necesario.
- 45 Se proporciona una capa de limpieza adicional adecuada para ocratoxinas mediante un polímero basado en metacrilato de dietilaminoetilo (DEAEM), que se ha descubierto que elimina con éxito compuestos potencialmente interferentes de muestras tomadas de cacahuetes (maníes). Otros materiales y procedimientos de limpieza adecuados serán bien conocidos por los familiarizados con el análisis para la determinación de la presencia de ocratoxinas. Debe tenerse cuidado para evitar disminuir la cantidad de ocratoxinas en una muestra durante la limpieza.
- Además del uso para el análisis cuantitativo descrito anteriormente, el polímero de EFS de la presente invención puede encontrar utilidad como láminas o membranas para unir ocratoxinas, o en sensores como se desvelan en el documento WO 2006/120381.
- 50 El polímero puede usarse como una etapa de limpieza para muestras que se someterán a medición cuantitativa en procedimientos distintos de análisis fluorométrico, tales como cromatografía. Un extracto de muestra líquido de un producto alimenticio que contiene potencialmente ocratoxinas se pone en contacto con el polímero para adsorber cualquier ocratoxina que esté presente, mientras que otros materiales presentes en la muestra se eliminan del polímero por lavado con un disolvente adecuado. Entonces las ocratoxinas se eluyen del polímero y se usan como una solución limpia para la medición
- 55 cuantitativa de cualquier ocratoxina presente, por ejemplo, por HPLC.

La aplicación de la presente invención se entenderá adicionalmente a partir de los Ejemplos siguientes. (La intensidad de la fluorescencia de fondo de los polímeros descritos, y la intensidad fluorescente de la aflatoxina inmovilizada se determinaron utilizando un dispositivo sensor como se desvela en el documento WO 2006/120381).

5 **Ejemplo 1 - Preparación de Polímero**

10 Se preparó una mezcla de polimerización por agitación del monómero funcional metacrilato de dietilaminoetilo (DEAEM), 5 g; un reticulante dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), 20 g; un porógeno *N,N*-dimetilformamida (DMF), 25 g; y un iniciador 1,1-azobis(ciclohexanocarbonitrilo), 500 mg. La mezcla de polimerización se iluminó durante 20 min usando una lámpara Hönle 100 UV (intensidad 0,157 W/cm²) (Hönle UV, Reino Unido), seguido de recocido térmico en un baño de aceite a 80 °C durante 12 horas. El lavado con metanol eliminó el disolvente (DMF). El polímero resultante es un material macroporoso. Los polímeros a granel resultantes se molieron y tamizaron en húmedo en metanol. La fracción con un tamaño de partícula en el intervalo de 25 a 106 µm se recogió y se secó.

15 Después de la preparación, se añadieron 75 mg de polímero a cartuchos de plástico no fluorescente de 1 ml vacíos (Phenomenex; Macclesfield, Reino Unido) entre dos fritas de Teflon (PTFE) no fluorescente. Estos cartuchos rellenos se usaron para la exploración para determinar la adsorción de ocratoxina A.

Ejemplo 2 - Ensayo de polímero basado en DEAEM sobre la unión de OTA

20 Cartuchos de DEAEM preparados como en el Ejemplo 1 se preconditionaron con 2 ml de agua de calidad de HPLC, después se cargaron con 4 ml de una solución de acetonitrilo al 60 % (60:40, acetonitrilo/agua) con adición de 50 ng de OTA. Cartuchos de DEAEM adicionales preparados como en el Ejemplo 1 se preconditionaron con 2 ml de agua de calidad de HPLC, después se cargaron con 4 ml de una solución de acetonitrilo al 15 % (15:85, acetonitrilo/agua) con adición de 50 ng de OTA.

25 En ambos casos el ensayo para determinar la fluorescencia con el aparato como se desvela en el documento WO 2006/123189 mostró una unión muy limitada de OTA.

Ejemplo 3 - Ensayo de polímero basado en ácido itacónico sobre la unión de OTA

Se preparó un polímero basado en ácido itacónico y se cargó en cartuchos de EFS usando los procedimientos del Ejemplo 1. Los cartuchos cargados se lavaron con 2 ml de agua y se cargaron con 4 ml de acetonitrilo al 60 % con adición de 50 ng de OTA.

30 Se descubrió que el polímero de ácido itacónico no muestra ninguna adsorción de OTA a partir de la solución de acetonitrilo al 60 %, posiblemente porque se disminuye la intensidad de fluorescencia de OTA debido a la interacción con grupos ácidos. La adsorción de OTA a partir de acetonitrilo al 15 % también se ensayó sin cambios significativos.

Ejemplo 4 - Ensayo de polímero basado en TFMAA sobre la unión de OTA

35 Se preparó un polímero basado en TFMAA y se cargó en cartuchos de EFS usando los procedimientos del Ejemplo 1. Los cartuchos cargados se lavaron con 2 ml de agua y se cargaron con 4 ml de acetonitrilo al 60 % con adición de 50 ng de OTA.

40 El polímero basado en TFMAA mostraba una unión de OTA próxima a la parte superior de la columna de EFS, pero de nuevo disminuía la intensidad de su fluorescencia, posiblemente por interacciones con grupos ácidos del polímero. La adsorción de OTA a partir de acetonitrilo al 15 % no mostró cambios significativos.

Ejemplo 5 - Ensayo de polímero basado en AMPSA sobre la unión de OTA

45 Se preparó un polímero basado en AMPSA y se cargó en cartuchos de EFS usando los procedimientos del Ejemplo 1. Los cartuchos cargados se lavaron con 2 ml de agua y se cargaron con 4 ml de acetonitrilo al 60 % con adición de 50 ng de OTA.

La medición confirmó que el polímero basado en AMPSA adsorbía la OTA a partir de la solución de extracción. La posición del pico era próxima a la frita superior del cartucho.

Ejemplo 6 - Ensayo de polímero basado en ácido itacónico/DEAEM (IA/DE) sobre la unión de OTA

50 Se preparó un polímero basado en ácido itacónico/DEAEM (IA/DE) usando la composición siguiente:

- 1 g de ácido itacónico
- 1 g de DEAEM
- 8 g de EGDMA
- 10 g de DMF
- 100 mg de iniciador

La mezcla de polímero se desgasificó en un flujo de nitrógeno durante 10 min y se polimerizó usando las condiciones del Ejemplo 1. El polímero obtenido se lavó con metanol, se molió y se tamizó y la fracción de entre 25 y 106 μm se recogió y se secó. Los cartuchos se envasaron con 75 mg del polímero como en el Ejemplo 1.

- 5 Después del precondicionamiento con 2 ml de agua de HPLC, los cartuchos se cargaron con 4 ml de acetonitrilo al 15 % que contenía según el caso 1-300 ng de OTA. Se descubrió que era posible detectar de 5 ng a 300 ng de OTA adsorbida a partir de acetonitrilo al 15 % mediante un polímero basado en IA-DE.
- 10 La posición de la banda estaba más próxima a la frita inferior que en el Ejemplo 5, pero la adsorción era fuerte, permitiendo el lavado del cartucho con 1 ml de acetonitrilo al 15 % sin eliminar la OTA.

Ejemplo 7- Tratamiento con aceite mineral

Se prepararon cartuchos de polímero basado en IA/DE como en el Ejemplo 6. El polímero se trató con aceite mineral mediante el tratamiento siguiente:

- 15
- 1 ml de acetonitrilo
 - 1 ml de cloroformo
 - 2 ml de cloroformo que contenía el 1 % de aceite mineral
 - 1 ml de cloroformo
 - 1 ml de acetonitrilo
- 20
- 2 ml de agua

Se realizó un experimento sobre la adsorción de diferentes cantidades de OTA y se descubrió que la banda de OTA permanecía más alta en la parte superior del polímero, pero la diferencia en la sensibilidad de detección no era muy pronunciada.

Ejemplo 8 - Detección de OTA en matrices de maíz y cacahuete

- 25 Se ensayaron polímeros basados en ácido itacónico-DEAEM con matrices de maíz y cacahuete con adición de OTA. Se descubrió que la OTA se adsorbe más abajo en la capa de polímero que otros compuestos fluorescentes que se encuentran en los extractos de maíz y cacahuete. Esto podría ser ventajoso porque permite cuantificar la OTA independientemente de la presencia de matriz.

Ejemplo 9 - Cartucho de EFS de combinación para OTA:

- 30 A un cartucho preparado como en el Ejemplo 6 se le añadió una capa de polímero superior de 75 mg de polímero basado en metacrilato de dietilaminoetilo (DEAEM) para proporcionar una capa de limpieza para inmovilizar cualquier compuesto interferente al tiempo que permita que la OTA pase a través de la capa de polímero basada en IA/DE. La capa de polímero basada en DEAEM es eficaz para eliminar una proporción significativa de los compuestos interferentes presentes en cacahuetes (maníes).
- 35 Se llevaron a cabo ensayos usando 10 ng de OTA cargada en una matriz de cacahuete en acetonitrilo al 60 % diluido 4 veces con agua, es decir, acetonitrilo al 15 %, y la misma solución de matriz sin OTA. Ambos cartuchos se lavaron con acetonitrilo al 15 % después de la carga. La combinación de capas de los dos polímeros mostraba una eliminación mejorada de interferencias de la matriz.

Ejemplo 10 - Polimerización UV en hielo

- 40 Se realizó una polimerización de una mezcla de 1 g de ácido itacónico, 1 g de DEAEM, 8 g de EGDMA, 10 g de DMF, 100 mg de 1,1-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) usando una lámpara UV débil

(intensidad luminosa 0,015 kW) con la solución de polimerización mantenida a 4 °C (en hielo). La polimerización se realizó durante 4 horas.

5 El DMF se eliminó del polímero por extracción de Soxhlet con metanol (usando aproximadamente 100 ciclos); y después el polímero se secó completamente al vacío. El polímero resultante se molió usando un molino ultracentrífuga (Retsch, Reino Unido) para obtener partículas de un tamaño uniforme más regular. Se recogió una fracción con un tamaño de partícula de 63-125 μm y se analizó en relación con la fluorescencia de fondo y la capacidad para unirse a ocratoxina A.

10 Se descubrió que el polímero obtenido por polimerización UV en este Ejemplo tenía una fluorescencia de fondo significativamente inferior a la de un polímero similar obtenido por termopolimerización como en el Ejemplo 6.

Además, la diferente morfología del polímero por UV proporcionaba una mayor afinidad hacia la ocratoxina A, dando como resultado un pico más agudo en una posición más alta en la parte superior de la capa de polímero respecto al termopolímero.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un copolímero de metacrilato de dietilaminoetilo y ácido itacónico, preparado sin impresión molecular, como un adsorbente de EFS para inmovilizar ocratoxina A.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el copolímero se ha reticulado con un monómero reticulante.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el reticulante es dimetacrilato de etilenglicol, *N/N'*-metilenbisacrilamida o divinilbenceno.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el copolímero se ha obtenido por polimerización UV a una temperatura por debajo de la temperatura ambiente.
- 10 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el copolímero se ha hecho macroporoso por eliminación de un porógeno presente durante la polimerización.
6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el copolímero y la ocratoxina A absorbida sobre el mismo se usan como una muestra en un procedimiento de análisis fluorométrico.
- 15 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la ocratoxina A absorbida se eluye del copolímero y se usa como una muestra en un procedimiento de medición cuantitativa.
- 20 8. Un copolímero macroporoso que puede obtenerse por polimerización de metacrilato de dietilaminoetilo y ácido itacónico con reticulación por dimetacrilato de etilenglicol, *N/N'*-metilenbisacrilamida o divinilbenceno, o una mezcla de los mismos, sin impresión molecular y en presencia de un disolvente de porógeno, seguida de lavado para eliminar el porógeno.
9. Una unidad adsorbente de EFS que comprende una cubeta, cartucho, aguja, membrana, barra o superficie plana cargada o revestida con una capa adsorbente de un copolímero de acuerdo con la reivindicación 8.
- 25 10. Un procedimiento de análisis fluorométrico para ocratoxina A que comprende adsorber la ocratoxina A sobre un copolímero de acuerdo con la reivindicación 8 cargado en o revestido o injertado sobre una cubeta, cartucho, aguja, membrana, barra o superficie plana, exponiendo las ocratoxinas inmovilizadas a luz UV y detectando la fluorescencia emitida por la ocratoxina A inmovilizada.
- 30 11. Un procedimiento de limpieza antes de la medición cuantitativa de ocratoxinas, en el que un líquido de muestra se pone en contacto con un copolímero de acuerdo con la reivindicación 8 cargado en o revestido o injertado sobre una cubeta, cartucho, barra, aguja, membrana o superficie plana para adsorber cualquier ocratoxina que esté presente, y las ocratoxinas se eluyen del polímero para la medición cuantitativa de cualquier ocratoxina presente.

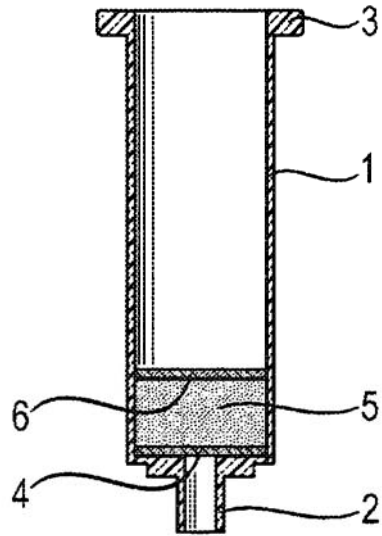


Figura 1

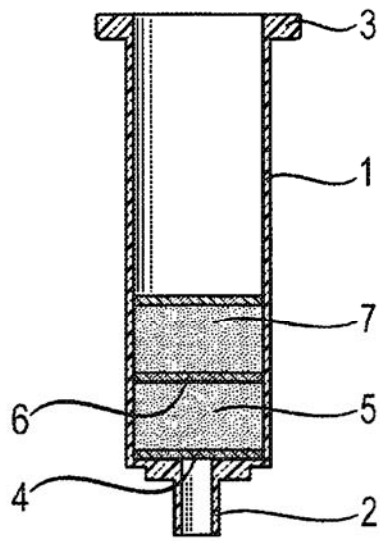


Figura 2