



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 451**

51 Int. Cl.:

**G01N 30/34** (2006.01)

**G01N 30/38** (2006.01)

**G01N 30/32** (2006.01)

**G01N 30/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08803830 .2**

96 Fecha de presentación : **08.09.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2201359**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54

Título: **Dispositivo para la generación de gradientes de micro- y nanoflujos de fase móvil para cromatografía líquida de altas prestaciones.**

30

Prioridad: **16.10.2007 IT VE07A0072**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.07.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.07.2011**

73

Titular/es: **DANI INSTRUMENTS S.p.A.**  
**Viale Brianza, 87**  
**20093 Cologno Monzese, IT**

72

Inventor/es: **Cappiello, Achille**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 362 451 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**

Dispositivo para la generación de gradientes de micro- y nanoflujos de fase móvil para cromatografía líquida de altas prestaciones.

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para la generación de gradientes de micro- y nanoflujos de fase móvil para cromatografía líquida de altas prestaciones.

10 Las últimas décadas han visto una miniaturización progresiva de los sistemas de cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC), en particular con respecto a los flujos de fase móvil utilizados. Esto es así porque la reducción del flujo particularmente permite limitar el consumo de disolventes tóxicos costosos, esto también resulta en una reducción en los volúmenes de inyección y por lo tanto, permite que sean procesadas cantidades se muestra muy pequeñas. Además, si se utilizan sensores sensibles a la concentración, resulta un incremento de la sensibilidad debido a la menor dilución del disolvente en la columna y una mejor relación señal - ruido.

15 Finalmente, las nuevas técnicas de acoplamiento de cromatografía líquida, espectrometría de masas (LC - MS) permiten trabajar a flujos inferiores a 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ , para obtener una sensibilidad más elevada y limitar los posibles riesgos de contaminación.

20 Sin embargo, uno de los problemas que surgen cuando se trabaja con flujos muy bajos consiste en la falta de instrumentación capaz de generar gradientes de fase móvil fiables, con únicamente un pequeño retraso y un mezclado homogéneo de disolventes. La generación de un gradiente a flujos inferiores a 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  ciertamente requiere un sistema de bombeo adecuado, capaz no sólo de mezclar cuidadosamente y homogéneamente las fases móviles, sino también transferirlas al interior de la columna de una manera reproducible y con el mínimo retraso. Sin embargo, bajo estas condiciones, la instrumentación comercialmente disponible está forzada a funcionar a su límite y por lo tanto la fiabilidad de las prestaciones a menudo es cuestionable. Además, el perfil del gradiente eficaz presenta un modelo insatisfactorio comparado con aquello establecido.

30 Uno de los modos más comunes de generación de gradientes de micro- y nanoflujos de fase móvil es la técnica de flujo separado que utiliza un separador insertado entre las bombas HPLC y el inyector. Esta solución está limitada por un pobre control del gradiente realmente transferido al interior de la columna y por consiguiente de una pobre reproducibilidad. Uno de los intentos iniciales para conseguir gradientes de escala nano fue almacenar un gradiente específico en un capilar y transferirlo después al interior de la columna con una bomba de jeringa. Los inconvenientes de este sistema son una puesta en práctica pobre, una elección limitada de gradientes que se van a formar y un pobre control de la forma del gradiente.

Otro sistema conocido, conocido como el procedimiento de dilución exponencial, consiste en pasar rápidamente el flujo de fase móvil desde el eluyente débil, contenido en una cámara de mezclado, al eluyente fuerte, con la generación de un gradiente de un perfil exponencial cóncavo.

40 El inconveniente de este sistema es el número limitado de tipos de gradiente que se pueden generar.

Para superar este inconveniente, ya se ha propuesto llenar la cámara de mezclado con el eluyente débil y causar que el eluyente fuerte fluya de una manera programada al interior del mezclador dinámico, a fin de poder controlar la variación del gradiente con respecto al tiempo.

45 El inconveniente de este sistema es una pobre versatilidad de los perfiles de gradiente que se pueden conseguir.

Otro sistema conocido consiste en la generación de un gradiente de nanoflujo exponencial introduciendo en el interior de dos cámaras de mezclado sucesivas, en primer lugar, el eluyente débil y a continuación, el eluyente fuerte y entonces transportarlos al interior de la columna utilizando una bomba cada vez.

50 El inconveniente de esta solución conocida consiste en una selección limitada del gradiente y del perfil, además de un retraso del gradiente constante.

55 La patente US nº 7.135.111 describe un dispositivo de elución de gradiente de nanoflujo. Comprende una primera bomba para el mezclado de diferentes disolventes y para transportarlos, una segunda bomba para el transporte de una solución de transferencia, un inyector, una columna y un sistema de detección. Dos bucles permiten que mezclas de disolventes diferentes sean almacenadas temporalmente, siendo transferidas éstas por la primera bomba de micro flujo y a continuación, transportadas al interior de la columna de nanoflujo por la segunda bomba, mediante una modificación en las conexiones del sistema interior y de ese modo en la dirección del flujo.

60 La dificultad de esta solución conocida es la dificultad de distribución de la fase móvil a un flujo constante cuando se trabaja con nanolitros/minuto.

65 La patente US nº 7.141.161 describe una disposición de bomba de gradiente capaz de transferir eluyentes a un

5 cromatógrafo continuamente, a intervalos específicos de tiempo y a un flujo constante del orden de nanolitros/minuto mientras se modifica la composición de dos o más eluyentes. La disposición de bomba de gradiente incluye una válvula de múltiples posiciones de diez puertos, un primer bucle conectado a una bomba isocrática y un segundo bucle, a través del cual son transferidos los eluyentes.

El inconveniente de esta solución conocida consiste en una considerable complejidad del sistema de bomba y las válvulas, haciendo particularmente difícil de automatizar la instrumentación.

10 A partir del documento de Cappiello A. *et al.* "Variable-Gradient Generators for Micro and Nano-HPLC", Anal. Chem. 2003, 75, 1173-1179 es conocido un dispositivo para la generación de gradientes de micro- y nanoflujo de fase móvil para cromatografía líquida.

15 La presente invención consiste en un dispositivo para la generación de gradientes de micro- y nanoflujo de fase móvil para cromatografía líquida de altas prestaciones, tal como se define y se caracteriza en la reivindicación 1.

Dos formas de realización preferidas de la presente invención se ponen de manifiesto adicionalmente a continuación en la presente memoria haciendo referencia a los dibujos adjuntos en los cuales:

20 la figura 1 es una vista esquemática de una primera forma de realización del dispositivo de la invención, con dos bombas HPLC convencionales conectadas a un dispositivo separador,

la figura 2 representa cinco réplicas de separación cromatografía de una mezcla de cuatro componentes a una concentración previamente determinada,

25 la figura 3 representa el perfil de un gradiente ajustado continuo,

la figura 4 representa tres perfiles diferentes de un gradiente desde el 0% hasta el 100% de CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O bajo condiciones cromatográficas particulares,

30 la figura 5 representa el modelo teórico esperado de los tres perfiles de la figura 4,

la figura 6 es una vista esquemática de una segunda forma de realización del dispositivo de la invención con dos bombas de jeringa HPLC para micro- y nanoflujos.

35 Haciendo referencia a la figura 1, la primera forma de realización del dispositivo de la invención está destinada a la generación de micro- y nanogradientes.

40 Comprende dos botellas 2, 4 de dos disolventes A y B; aquellas están conectadas a través de dos bombas HPLC alternativas tradicionales 6, 8 a un mezclador 10 conectado a un filtro sinterizado 12 con poros de 0,5 μm. Este filtro está conectado a la entrada de una válvula de múltiples posiciones 16 a través de un circuito separador indicado globalmente mediante 18.

45 Este circuito separador comprende una válvula 14 y los capilares PEEKsil idénticos (25 o 50 μm de diámetro interior) conectados a la válvula a través de un circuito de un volumen muerto pequeño y también conectados a una descarga 22. El circuito separador 18 permite que se obtenga el flujo deseado a partir del flujo alto generado por las bombas HPLC 6, 8 en virtud de la impedancia ofrecida por los dos capilares 20, 20' y por la columna de cromatografía 26, alimentada por el dispositivo de la invención.

50 La válvula de múltiples posiciones 16 es un tipo tradicional, por ejemplo el modelo EMTCS6UW de Valco Instruments Co. Inc., Huston, Tejas, y está provista de catorce puertos, dos de los cuales forman la entrada y la salida, mientras los otros doce representan los puntos de conexión para seis bucles 24<sub>i</sub>, formados con tubos de PEEK (poliéter éter cetona) de 250 μm de diámetro interior, para almacenar la fase móvil.

55 Los cinco primeros bucles 24<sub>1</sub> - 24<sub>5</sub> son de igual volumen de 50 μl, mientras el sexto bucle tiene un volumen de 150 μl. Contiene la composición de gradiente final, su volumen mayor siendo útil para completar el análisis cromatográfico y limpiar la columna 26.

60 El puerto de salida de la válvula de múltiples posiciones 16 está conectado a la entrada de una válvula de dos posiciones 28, que tiene una salida conectada a la descarga 30 y la otra salida conectada a un contador de micro- y nanoflujo 32 conectado a un inyector 34 para la columna cromatográfica 26, con la cual está asociado un detector 36.

65 El funcionamiento de cada componente del dispositivo y en particular de las válvulas de dos posiciones 14 y 28 y la válvula de múltiples posiciones 16, está coordinado por un sistema de control 38, que proporciona un funcionamiento automático organizado del dispositivo.

5 En funcionamiento, la primera operación planificada consiste en la carga de seis bucles  $24_i$  asociados con la válvula de múltiples posiciones 16. Para conseguir esta carga, las dos válvulas de dos posiciones 14 y 28 se establecen con la válvula 14 que cortocircuita el dispositivo separador 16 y conectando la válvula 28 la salida de la válvula de múltiples posiciones 16 a la descarga 30.

10 En esta configuración, las bombas 6 y 8 pueden proveer un flujo alto, de aproximadamente 0,8 - 1,0 ml/min para acelerar el proceso. El sistema de control activa un programa de control para las bombas 6 y 8, correlacionado con un programa de tiempos implantación para la válvula de múltiples posiciones 16, para distribuir las diferentes composiciones de fase móvil de energía de elución creciente con los seis bucles  $24_i$ .

15 Por ejemplo, para generar un gradiente desde el 100% de disolvente A contenido en la botella 2, hasta el 100% de disolvente B contenido en la botella 4, se selecciona el primer bucle  $24_1$  y simultáneamente se programa la bomba 6 para bombear sólo el 100% de disolvente A, para un flujo de 0,8 - 1 ml/min, el tiempo para llenar el bucle en teoría será sólo de unos pocos segundos, sin embargo en la práctica es aconsejable esperar un par de minutos para el acondicionamiento. Por lo tanto, tras unos pocos minutos el bucle  $24_1$  está completamente cargado con su correspondiente composición de fase móvil y el sistema de control activa la válvula de múltiples posiciones 16 para conectar el segundo bucle  $24_2$  a la válvula 14, al mismo tiempo se modifica el funcionamiento de las bombas 6 y 8 de tal modo que la bomba 6 bombea el 80% de disolvente A y la bomba 8 bombea el 20% de disolvente B.

20 Tras otro par de minutos, se selecciona el tercer bucle  $24_3$  y las bombas se modifican adicionalmente, de forma que bombeen el 60% de disolvente A y el 40% de disolvente B.

25 El proceso se repite hasta que se selecciona el sexto bucle  $24_6$ , estando programada la bomba 8 para distribuir sólo el 100% de disolvente B.

30 Habiendo completado la carga de los bucles  $24_i$ , el primer bucle  $24_1$  se selecciona otra vez, con el paso del 100% de disolvente A, el flujo se reduce entonces y las dos válvulas de dos posiciones 14 y 28 se conmutan para insertar el circuito separador y conectar la válvula de múltiples posiciones 16 al circuito analítico. El sistema procesa los datos que llegan desde el contador de nanoflujo 32 y regula el flujo de la bomba 6 para obtener el flujo deseado en la columna 26.

35 En esta configuración, un micro- o nanoflujo de disolvente A, que se origina desde el circuito separador 16, recarga continuamente el primer bucle  $24_1$  con el eluyente de débil (generalmente agua) para acondicionar la columna 26.

40 A continuación de la introducción de la muestra y el inicio del análisis cromatográfico, la válvula de múltiples posiciones 16 se activa para transferir al interior de la columna 26 el contenido del siguiente bucle  $24_2$ , cargado con una composición de fase móvil de mayor potencia eluyente. Este proceso se repite secuencialmente para todos los bucles. El modelo del gradiente el cual se va a generar se obtiene variando los tiempos de implantación y los tiempos de residencia. El disolvente A, el cual se utiliza sin variación para impulsar el contenido de cada bucle hasta la terminación del análisis, permite que sea distribuido un flujo de fase móvil constante.

45 No se requiere modificación alguna del cromatógrafo convencional para instalar el dispositivo de la invención. Este aspecto es particularmente importante, ya que permite que cualquier cromatógrafo HPL convencional comercialmente disponible trabaje eficazmente con micro- y nanoflujos.

50 Debido al bajo flujo utilizado, el diámetro pequeño de los bucles  $24_i$  y los capilares de conexión, no ocurre fenómeno de turbulencia o mezclado, por consiguiente, una vez completamente llenos, los seis bucles  $24_i$  pueden proveer suficiente eluyente para diferentes análisis, dependiendo del flujo.

55 El sistema de control almacena en su memoria las cantidades de disolvente utilizadas para cada bucle  $24_i$  durante cada análisis, según el tipo de gradiente y el flujo utilizado: esto significa que antes de que los bucles  $24_i$  se hayan vaciado completamente de la correspondiente composición de fase móvil y, por lo tanto, antes de que sean incapaces de generar gradiente correcto, un nuevo proceso de carga se inicia automáticamente.

Para evaluar las características y las prestaciones del dispositivo de la invención, se verificó la repetitividad intra diaria llevando a cabo cinco análisis de una mezcla de cuatro compuestos de monurón, difenoxurón, linurón y azinfos-etil cada uno a una concentración de 5 mg/l.

60 Las separaciones se obtuvieron con una columna de Agilent Zorbax de 150 mm x 75  $\mu$ m rellena con partículas de 3,5  $\mu$ m de fase C18, utilizando un gradiente lineal desde el 0% hasta el 100% de  $\text{CH}_3\text{CN}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  en 16 minutos, volumen de inyección 50 nl y detección con ultravioleta a  $\lambda = 230$  nm.

65 La figura 2 representa la repetitividad del alto tiempo de retención en los cinco análisis, la desviación normal relativa siendo inferior al 0,19%.

La tabla 1 presenta los tiempos de retención con relación a los cromatógrafos de la figura 2, para una evaluación más detallada de la repetitividad intra diaria.

Tabla 1

5

Compuesto	Iny 1	Iny 2	Iny 3	Iny 4	Iny 5	$\bar{x}$	SD	RSD (%)
Monurón	19,497	19,473	19,553	19,457	19,507	19,4974	0,03678	0,18864
Difenoxurón	21,847	21,780	21,833	21,847	21,830	21,8274	0,027628	0,12657
Linurón	22,877	22,780	22,847	22,837	22,843	22,8368	0,035302	0,15458
Azinfos-etil	24,657	24,557	24,640	24,630	24,640	24,6248	0,039124	0,15888

A fin de evaluar también la repetitividad interdiaria, se llevaron a cabo diez separaciones cromatográficas por día durante cinco días de trabajo consecutivos. Los compuestos analizados fueron: metomil, monurón, difenoxurón, linurón cada uno a una concentración de 197 mg/l. El gradiente utilizado fue desde el 100% de H<sub>2</sub>O hasta el 100% de CH<sub>3</sub>CN en 16 minutos. El flujo 360 nl/min; la columna de Agilent Zorbax C18 de 3,5  $\mu$ m, 150 mm x 75  $\mu$ m; el volumen de inyección 60 nl; detección con ultravioleta a  $\lambda = 230$  nm.

10

15

La siguiente tabla 2 representa los promedios de los tiempos de retención de cada compuesto para cada día de trabajo y la desviación normal relativa a los promedios diarios. Se puede observar una repetitividad interdiaria excelente para cada componente.

Tabla 2

Compuesto	$\bar{x}$ Día 1	$\bar{x}$ Día 2	$\bar{x}$ Día 3	$\bar{x}$ Día 4	$\bar{x}$ Día 5	RSD (%)
Metomil	10,59	10,55	10,68	10,81	10,44	1,31
Monurón	14,87	14,86	14,71	14,69	14,88	0,63
Difenoxurón	17,21	17,13	16,98	16,94	17,10	0,65
Linurón	19,15	19,04	18,89	18,91	18,99	0,55

En general, es aconsejable utilizar un gradiente sin escalones, a fin de obtener una variación constante en el tiempo en la composición de fase móvil. A este respecto, variaciones de fase móvil repentinas típicas de un modelo escalonado, corresponden a cambios de polaridad rápidos, los cuales pueden interferir de forma inesperada con la separación cromatográfica en términos tanto de resolución como de reproductibilidad.

Con los nanoflujos, las diferentes fases móviles contenidas en bucles continuos se alternan para mezclarse juntas en el interior del espacio de la válvula de múltiples posiciones 16 y las conexiones, para evitar variaciones repentinas en la composición del disolvente.

La figura 3 representa un gradiente ajustado continuo.

30

La figura 4 representa los perfiles de tres gradientes de 12 minutos obtenidos a un flujo de 400 nl/min, utilizando programas diferentes de funcionamiento de la válvula.

Los bucles 24<sub>i</sub> se llenaron con las siguientes composiciones de disolventes: bucle 24<sub>1</sub>: 100% H<sub>2</sub>O - 0% CH<sub>3</sub>CN; bucle 24<sub>2</sub>: 80% H<sub>2</sub>O - 20% CH<sub>3</sub>CN; bucle 24<sub>3</sub>: 60% H<sub>2</sub>O - 40% CH<sub>3</sub>CN; bucle 24<sub>4</sub>: 40% H<sub>2</sub>O - 60% CH<sub>3</sub>CN; bucle 24<sub>5</sub>: 20% H<sub>2</sub>O - 80% CH<sub>3</sub>CN; bucle 24<sub>6</sub>: 0% H<sub>2</sub>O - 100% CH<sub>3</sub>CN.

35

Los programas de funcionamiento fueron los siguientes: bucle 24<sub>2</sub> durante 0,30 minutos, bucle 24<sub>3</sub> durante 1 minuto, bucle 24<sub>4</sub> durante 1,30 minutos, bucle 24<sub>5</sub> durante 9,00 minutos para la curva a, la cual representa el gradiente cóncavo; bucle 24<sub>2</sub> durante 3 minutos, bucle 24<sub>3</sub> durante 3 minutos, bucle 24<sub>4</sub> durante 3 minutos, bucle 24<sub>5</sub> durante 3 minutos para la curva b, la cual representa el gradiente lineal; bucle 24<sub>2</sub> durante 9,00 minutos, bucle 24<sub>3</sub> durante 1,30 minutos, bucle 24<sub>4</sub> durante 1 minuto, bucle 24<sub>5</sub> durante 0,30 minutos para la curva c, la cual representa el gradiente convexo.

40

Los modelos teóricos esperados se representan en la figura 5. Las trazas relativas a la absorbencia están muy bien diferenciadas, como se representa mediante los tiempos de implantación seleccionados. Esto es particularmente importante, considerando el flujo operativo extremadamente pequeño.

45

La alta correspondencia entre el modelo de gradiente esperado y el real bajo diferentes condiciones permite que se establezca la forma del gradiente tanto a través de una tabla de tiempos de implantación como mediante una aproximación gráfica más intuitiva. A este respecto, el sistema de control posibilita y visualiza el perfil del gradiente en la pantalla del ordenador como una función de los tiempos de implantación: cada cambio en los tiempos establecidos se refleja inmediatamente con un cambio correspondiente en el perfil visualizado.

50

De la misma manera, cada modificación del perfil de gradiente, obtenida mediante el desplazamiento del gráfico con el puntero del ordenador, determina una modificación correspondiente en los tiempos de implantación de la tabla. Por consiguiente cada forma de gradiente puede ser fácilmente programada estableciendo los parámetros del tiempo de la tabla o el perfil del gráfico.

5 Cuando se requiere un gradiente lineal se puede utilizar el mandato "gradiente lineal", el cual, sobre la base de la duración seleccionada para el gradiente, calcula automáticamente los tiempos de implantación y visualiza el perfil de gradiente.

10 En la forma de realización representada en la figura 6, el dispositivo de la invención difiere del que se representa en la figura 1 sustituyendo las bombas alternativas 6 y 8 por bombas de jeringa de micro- y nanoflujo 40 y 42. Esto permite que sean obtenidos nanoflujos sin utilizar el circuito separador 18.

15 Para el resto, el dispositivo es similar, con los componentes idénticos llevando los mismos números de referencia.

A partir de lo expresado anteriormente, es evidente que el dispositivo de la invención es particularmente ventajoso, ya que permite que sean generados automáticamente micro- y nanoflujos, con alta flexibilidad en la elección del modelo de gradiente, según los requisitos analíticos y siempre con una precisión y una reproductibilidad muy altas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo para la generación de gradientes de micro- y nanoflujos de fase móvil para cromatografía líquida de altas prestaciones, que comprende:
- 10 - un generador (2, 4, 6, 8, 40, 42, 10) de micro- y nanoflujos de por lo menos dos fases móviles en composiciones de diferentes porcentajes,
  - 15 - un distribuidor de gradiente de n posiciones (16) con un puerto de entrada, un puerto de salida y n pares de puertos para un número similar de bucles de capilares (24<sub>i</sub>), pudiéndose conectar cada uno selectivamente en un extremo con el puerto de entrada y en su otro extremo al puerto de salida, a su vez conectado a un circuito analítico que comprende una columna cromatográfica (26) y un detector (36),
  - 20 - unos medios para controlar el generador de micro- y nanoflujos (2, 4, 6, 8, 40, 42, 10) para crear las diferentes composiciones de mezcla de fase móvil,
  - unos medios de generación de gradiente para controlar dicho distribuidor de gradiente (16), que actúa en los tiempos de implantación y de residencia del mismo,
- 25 caracterizado porque comprende además:
- un contador de micro- y nanoflujos (32) conectado a dicho circuito analítico (26, 36),
  - 30 - un desviador del flujo (28) que tiene su entrada conectada a la salida de dicho distribuidor de gradiente (16), una salida conectada a la descarga (30) y la otra salida conectada a dicho contador de micro- y nanoflujos (32),
  - una unidad de control (38) que comprende dichos medios de control del generador de micro- y nanoflujos (2, 4, 6, 8, 40, 42, 10) para crear las diferentes composiciones de mezcla de fase móvil y dichos medios de generación de gradiente para controlar dicho distribuidor de gradiente (16), así como unos medios para controlar la posición de dicho desviador del flujo (28) y unos medios para controlar la capacidad de tratamiento de dicho generador de micro- y nanoflujos sobre la base de los datos recibidos desde dicho contador de micro- y nanoflujos (32).
- 35 2. Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado porque el generador de micro- y nanoflujos comprende por lo menos dos botellas (2, 4) que contienen diferentes disolventes, una bomba alternativa (6, 8) asociada con cada botella, un mezclador (10) para los flujos generados por dichas bombas y un circuito separador (18).
- 40 3. Dispositivo según la reivindicación 2, caracterizado porque el circuito separador (18) comprende una válvula (14) controlada por dicha unidad de control (38) para conmutar entre una posición de conexión de dicho circuito separador (18) y una posición que cortocircuita este último.
- 45 4. Dispositivo según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho circuito separador comprende por lo menos un capilar (20, 20') conectado a dicha válvula (14) y a la descarga (22).
- 50 5. Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado porque el generador de micro- y nanoflujos comprende por lo menos dos botellas (2, 4) que contienen diferentes disolventes, una bomba de jeringa (40, 42) asociada con cada botella y un mezclador para los micro- y nanoflujos generados por dicha bomba de jeringa.
- 55 6. Dispositivo según las reivindicaciones 2 ó 5, caracterizado porque un filtro (12) está interpuesto entre dicho mezclador (10) y dicho distribuidor de gradiente (16).
7. Dispositivo según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho filtro (12) está fabricado en acero sinterizado con poros del orden de 0,5 µm.
8. Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado porque n-1 bucles (24<sub>1</sub> - 24<sub>5</sub>) del distribuidor de gradiente (16) tienen el mismo volumen, mientras el bucle enésimo (24<sub>6</sub>) tiene un volumen mayor.
9. Dispositivo según la reivindicación 8, caracterizado porque n-1 bucles (24<sub>1</sub> - 24<sub>5</sub>) del distribuidor de gradiente (16) tienen un volumen del orden de 50 µl, mientras el bucle enésimo (24<sub>6</sub>) tiene un volumen del orden de 150 µl.
- 60 10. Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado porque el distribuidor de gradiente (16) consiste en una válvula de n posiciones.

FIG. 1

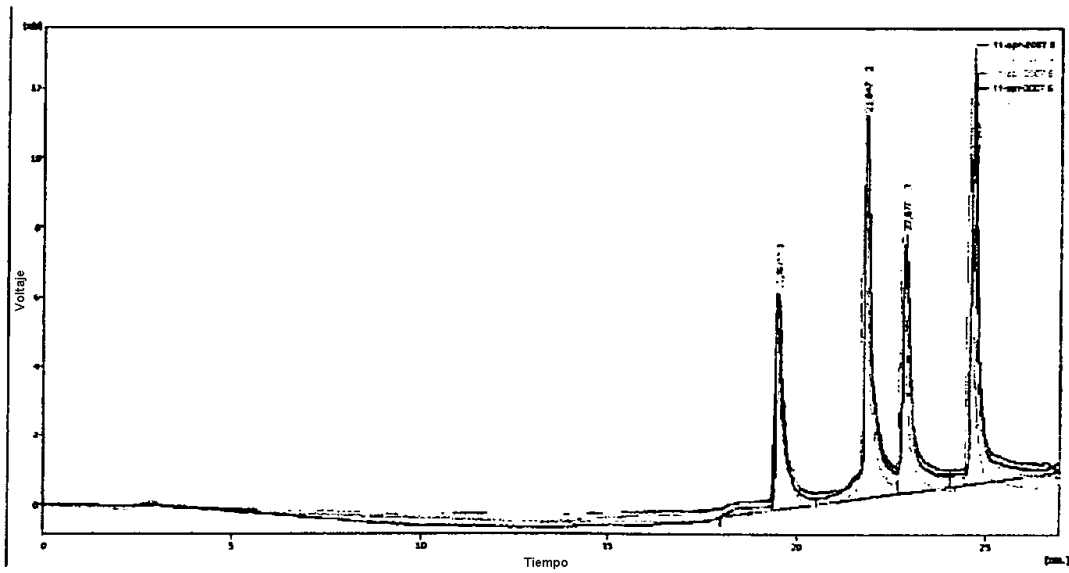
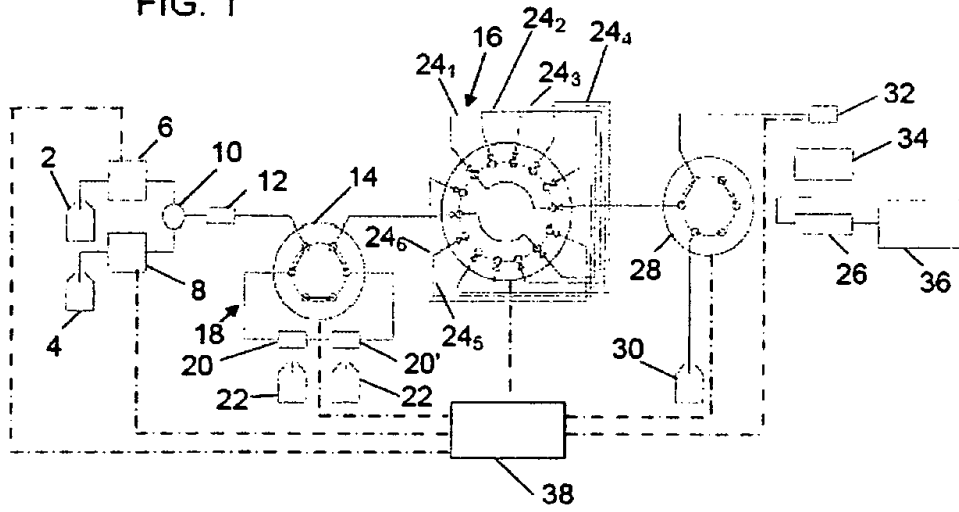


FIG. 2



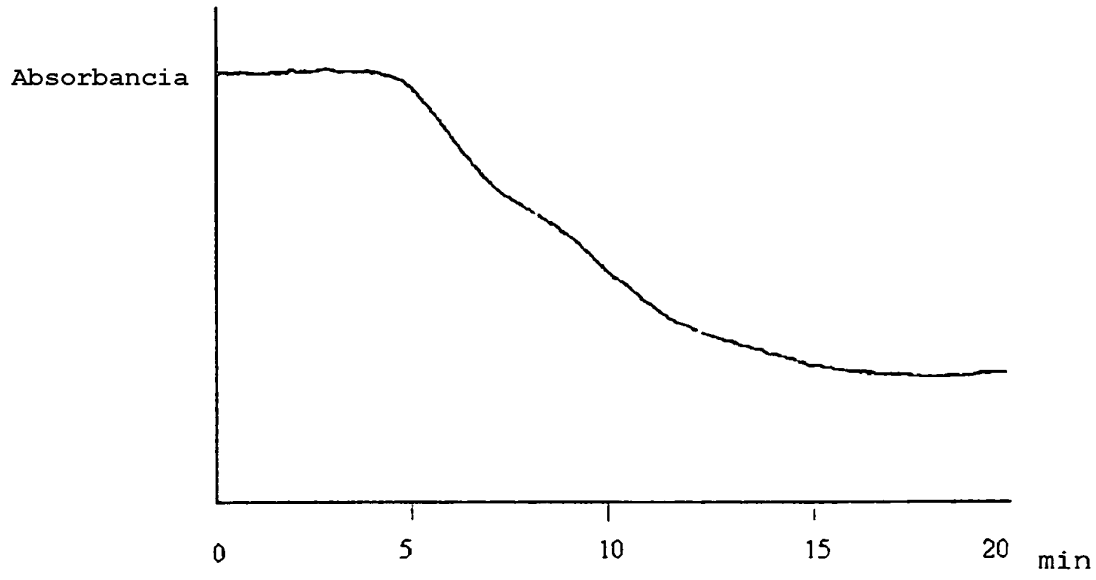


FIG. 3

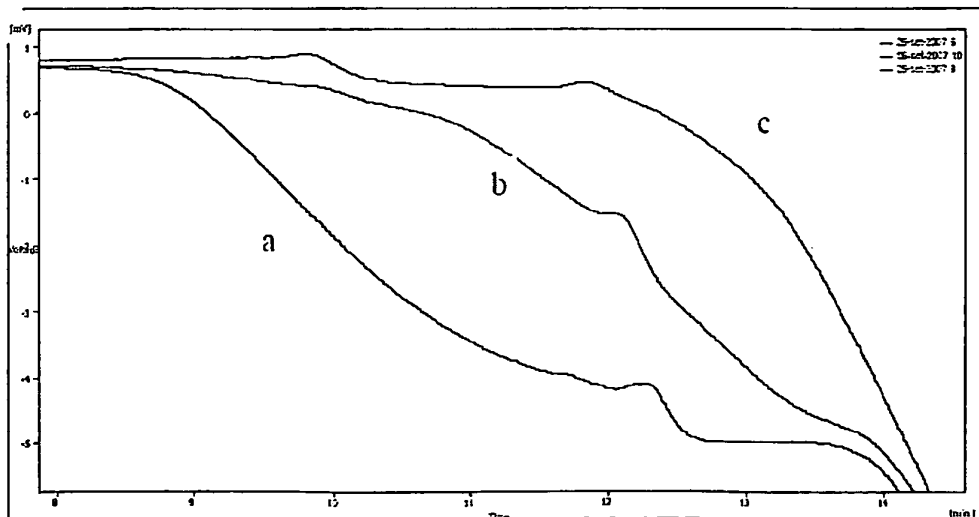


FIG. 4

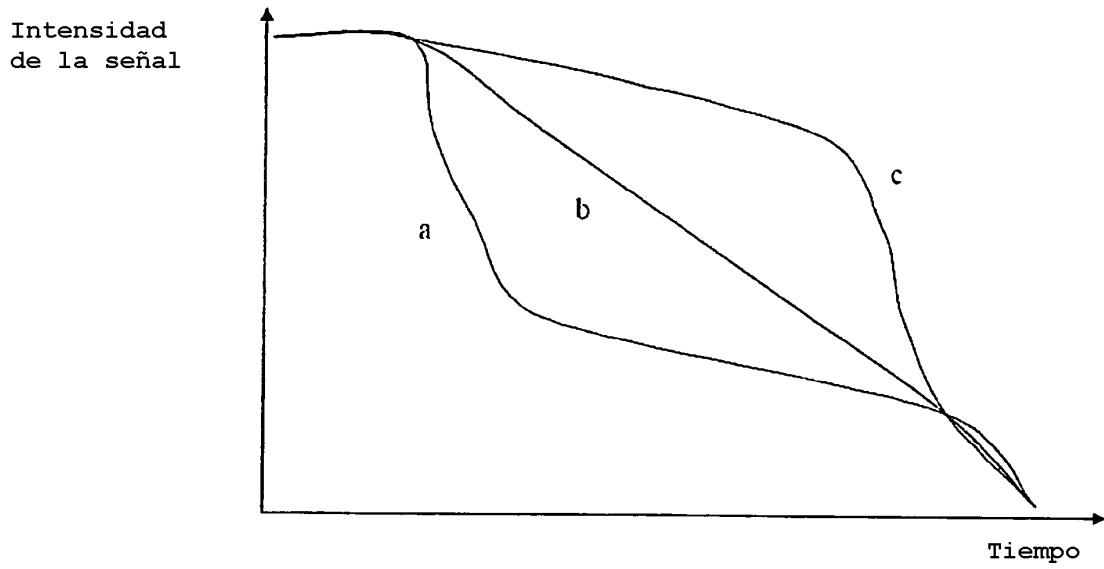


FIG. 5

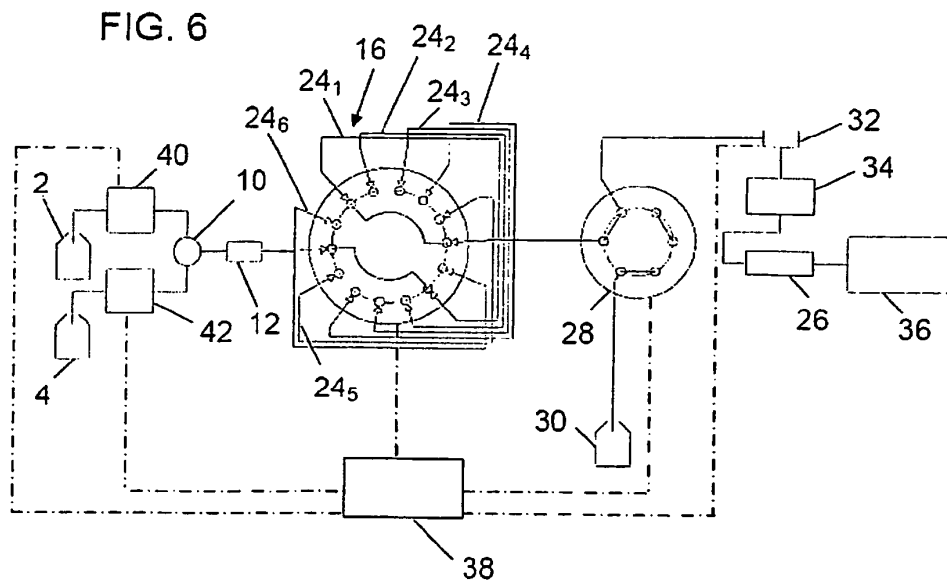


FIG. 6