



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 364 631**

② Número de solicitud: 201030287

⑤ Int. Cl.:  
**B01D 15/08** (2006.01)  
**B01D 15/18** (2006.01)  
**G01N 30/46** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.02.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2011**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**08.09.2011**

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Castilla-La Mancha  
Campus Universitario-Pabellón de Gobierno  
Plaza de la Universidad, 2  
02071 Albacete, ES**

⑦ Inventor/es: **Toledano Torres, Rosa María;  
Andini, Juan Carlos;  
Cortés Simarro, José Manuel;  
Vázquez Molini, Ana María y  
Villén Altamirano, Jesús**

⑦ Agente: **Carpintero López, Mario**

⑤ Título: **Procedimiento para llevar a cabo reacciones en un proceso de análisis por cromatografía de gases.**

⑦ Resumen:

Procedimiento para llevar a cabo reacciones en un proceso de análisis por cromatografía de gases.

La invención define un procedimiento para llevar a cabo reacciones en un proceso de análisis mediante cromatografía de gases que comprende:

- (a) depositar el analito en el interior de una camisa de vidrio alojada en un sistema de inyección de cromatografía de gases que permita programar la temperatura;
- (b) hacer reaccionar dicho analito con un reactivo adicionado a tal fin en dicho sistema de inyección; y
- (c) transferir el producto de reacción obtenido en (b) para su análisis por cromatografía de gases;

en el que la camisa de vidrio alojada en el sistema de inyección comprende un material de retención donde se lleva a cabo la reacción de la etapa (b). Este procedimiento permite analizar compuestos cuyo análisis por cromatografía de gases requiere una reacción previa de un modo más rápido, sencillo, reproducible, fiable, con menos manipulación de la muestra, y con resultados cuantitativos coherentes con una repetibilidad satisfactoria.

ES 2 364 631 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para llevar a cabo reacciones en un proceso de análisis por cromatografía de gases.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de los métodos de análisis empleando la cromatografía de gases. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para llevar a cabo reacciones químicas con fines analíticos empleando en la determinación final la cromatografía de gases. Más en particular, se refiere a un procedimiento en el que se emplea un sistema de inyección con temperatura programable acoplado al cromatógrafo de gases en el que se efectúa una reacción en línea de los analitos de interés previamente a su análisis cromatográfico.

**Antecedentes de la invención**

15 La cromatografía de gases es una técnica analítica que posee una elevada capacidad de separación y que permite emplear detectores con una elevada sensibilidad. Asimismo, es posible acoplarla a técnicas espectroscópicas que permiten elucidar o confirmar la estructura química de los compuestos previamente separados en la etapa cromatográfica, entre las que destaca, como la más empleada, la espectrometría de masas.

20 Sin embargo, en la inmensa mayoría de los casos la muestra no puede ser introducida directamente en el sistema de cromatografía de gases, sino que es necesario llevar a cabo una etapa previa de preparación, que puede incluir diversas operaciones de laboratorio, como la extracción con disolventes, extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, concentración, etc., así como reacciones de diversa índole que suelen llevarse a cabo principalmente con la finalidad de liberar el analito de la estructura en la que se encuentra o bien con la finalidad de conferirle volatilidad y estabilidad, comúnmente denominadas reacciones de derivatización.

Las reacciones que tienen como finalidad la liberación del analito de la estructura en la que se encuentra son de muy diversa índole, y dependen fundamentalmente de la naturaleza del analito y de la matriz en la que se encuentra. Entre ellas, por citar algunos ejemplos, se encuentran la hidrólisis de azúcares con el fin de determinar la composición de monosacáridos (Amelung, W.; Cheshire, M.V. & Guggenberger, G. Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas-liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis. *Soil. Biol. Biochem.* **1996**, 28(12), 1631-1639; Zhang, W.; He, H. & Zhang, X. Determination of neutral sugars in soil by capillary gas chromatography after derivatization to aldonitrile acetates. *Soil. Biol. Biochem.* **2007**, 39, 2665-2669); la hidrólisis de proteínas o péptidos para elucidar la composición de aminoácidos (Kenndler, E.; Schmidt-Beiwil, K.; Mairinger, F. & Pöhm, M. Identification of proteinaceous binding media of easel paintings by gas-chromatography of the amino-acids derivatives after catalytic hydrolysis by a protonated cation exchanger. *J. Anal. Chem.* **1992**, 342, 135-141; Schneider, U. & Kenndler, E. Identification of plant and animal glues in museum objects by GC-MS, after catalytic hydrolysis of the proteins by the use of a cation exchanger with simultaneous separation from the carbohydrates. *J. Anal. Chem.* **2001**, 371, 81-87; Gimeno-Adelantado, J.V.; Mateo-Castro, R.; Domenech-Carbó M.T. & Boch-Reig, F. Analytical study of proteinaceous binding media in works of art by gas chromatography using alkyl chloroformates as derivatising agents. *Talanta* **2002**, 56, 71-77) la saponificación de los aceites con el fin de separar la fracción insaponificable al tiempo que se saponifican los esteroides esterificados pasando a esteroides libres, lo que permite determinar cuantitativamente la composición total de esteroides de un aceite (Codex Alimentarius Commission Fats, oils and derivatives, issued by Joint FAO/WHO Food Standards Program, Rome, **1993**; Vol. 8, pp. 41-46). Se podrían citar otras muchas reacciones, de esterificación, transesterificación, oxidación, etc. que, como se puede ver a través de los ejemplos expuestos, dependen fundamentalmente de la naturaleza de la matriz y de los analitos.

En cuanto a las reacciones de derivatización, la cromatografía de gases exige, lógicamente, vaporizar los analitos para que se encuentren en fase gaseosa, en la que tiene lugar la separación cromatográfica, lo que hace necesario que el proceso transcurra a temperaturas elevadas, tanto más cuanto menor sea la volatilidad de los analitos. A altas temperaturas, muchos analitos se descomponen térmicamente. Además, la vaporización de numerosos analitos necesita temperaturas muy elevadas debido a su elevado peso molecular y/o a elevadas fuerzas de atracción intermoleculares. Estos problemas afectan a analitos de diversa índole, entre los que se encuentran, como grupo muy destacado, los presentes en muestras de origen biológico. Suelen estar asociados a la presencia de cuatro grupos funcionales fundamentalmente: alcoholes (-OH), ácidos carboxílicos (-COOH), aminas (-NH ó NH<sub>2</sub>) y tioles (-SH), aunque también se lleva a cabo algunas veces con otros grupos funcionales, como aldehídos (-CHO) o amidas (-CONH<sub>2</sub>), todos ellos muy abundantes en muestras de origen biológico. Son grupos funcionales que presentan una elevada reactividad por lo que, a elevadas temperaturas, se descomponen fácilmente. Por otra parte, debido a la diferencia de electronegatividad entre el hidrógeno y los elementos a los que se encuentra unido en estos grupos funcionales, se forman enlaces por puente de hidrógeno, lo que disminuye sustancialmente su volatilidad. Las reacciones de derivatización consisten, normalmente, en sustituir el hidrógeno de estos grupos funcionales por otros radicales orgánicos. Los radicales más empleados con este fin son el trimetilsilil, los grupos alquilo (metilo o etilo), o un acetilo, formando los denominados sililderivados (o trimetilsililderivados), alquilderivados o acetilderivados respectivamente. Para conseguir estos derivatizados, se hace reaccionar a los analitos con diversos reactivos, entre los que se encuentran el BSA (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida), el BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida), el HDMS (Hexametildisilazano), el TMCS (Trimetilclorosilano), el TMSI (N-trimetilsililimidazol), etc. para obtener trimetilsililderivados; el DMFDMA (N,N-dimetilformamida dimetil acetal), el TMPAH (hidróxido de trimetilfenilamonio), el BF<sub>3</sub>·MeOH (trifluoruro de boro en metanol), etc. para obtener alquilderivados; el TFAI (trifluoroacetilimidazol), el HFBI (heptafluorobutirilimidazol), el MBTFA (N-metil-bis

(trifluoroacetamida), etc. para obtener acetilderivados (Knapp, D.R. Handbook of analytical derivatization reactions. John Willey and Sons, 1979).

En la mayoría de los casos, las reacciones descritas se llevan a cabo durante la etapa de preparación de la muestra. Estas etapas previas de preparación de la muestra presentan muchos inconvenientes. En primer lugar, el tiempo requerido para la preparación de la muestra es alto, lo que constituye una desventaja importante cuando hay que analizar numerosas muestras. Además, es necesario emplear volúmenes relativamente elevados de disolventes orgánicos tóxicos, con el consiguiente riesgo para la salud del analista y los efectos nocivos que supone en relación con el impacto medioambiental. Por otra parte, durante todo el proceso se pueden introducir impurezas, procedentes del disolvente, de los reactivos empleados, o de los materiales empleados, que se concentran posteriormente junto a los analitos y dan lugar a interferencias y errores analíticos y, en último término, a análisis deficientes en cuanto a su selectividad y sensibilidad.

Como alternativa a los métodos de preparación de la muestra anteriormente comentados, se han desarrollado diversos sistemas que permiten incluir dichas etapas, o parte de ellas, en el sistema cromatográfico, eliminando parte o toda la etapa de preparación de la muestra.

Uno de estos sistemas es el empleo de un inyector PTV (Programmable Temperature Vaporizer o Vaporizador de temperatura programable) con la camisa de vidrio rellena de algún material sólido, o con un soporte recubierto con una fase estacionaria líquida, en el que se depositan los analitos al tiempo que el disolvente es eliminado a través de la salida de división de flujo o bien a través del extremo en el que se conecta la columna cromatográfica. Bajo este esquema se han desarrollado métodos analíticos de contaminantes en agua (Muller, S.; Efer, J. & Engewald, W. Water pollution screening by large-volumen injection of aqueous samples and application to GC/MS analysis of river Elbe sample. *J. Anal. Chem.* **1997**, 357(5), 558-560, Mol, H.G.J.; Janssen, H.G.; Cramers, C.A. & Brinkman, U.A. Th. Use of a temperature programmed injector with a packed liner for direct water analysis and on-line reversed phase LC-GC. *J. High Resol. Chromatogr.* **1993**, 16, 459-463), de análisis de la composición aromática de bebidas alcohólicas como el pisco (Villén, J.; Señoráns, F.J.; Reglero, G. & Herraiz, M. Analysis of volatile components by direct injection of real-life samples by using a programmed temperature vaporizer. *Z. Lebensm. Unters Forsch* **1996**, 202, 270-274) o de la composición aromática del vino (Villén, J.; Señoráns, F.J.; Reglero, G. & Herraiz, M. Analysis of wine aroma by direct injection in gas chromatography without previous extraction. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 717-722).

Otra posible alternativa a los métodos anteriormente comentados de preparación de la muestra consiste en llevar a cabo la etapa de extracción mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). El empleo de HPLC supone disponer de un proceso mucho más rápido, siendo además, menor el consumo de disolventes y el riesgo de que se produzcan interferencias. Sin embargo, una vez obtenido el extracto, es necesario proceder a su concentración por evaporación del disolvente, como fase previa a la GC. Esta etapa provoca cierta variabilidad en la determinación y, por otra parte, sólo es posible introducir en GC una porción de la fracción resultante de la preseparación efectuada en HPLC, lo que disminuye la sensibilidad del método considerado en su conjunto.

Se han puesto de manifiesto las ventajas que, para el análisis de mezclas complejas, posee el acoplamiento directo entre la cromatografía de líquidos de alta eficacia y la cromatografía de gases (LC-GC). La técnica combina la efectividad de la preseparación lograda en HPLC con la de la separación que puede proporcionar la cromatografía de gases (Grob, K. On-line coupled LC-GC. Ed. Hüthig. Heidelberg, **1991**; Hyötyläinen, T. & Riekkola, M.L. Direct coupling of reversed-phase liquid chromatography to gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1998**, 819, 13-24) y permite realizar una limpieza de la muestra mucho más eficaz y rápida que la que proporcionan los métodos de preparación convencionales, lo que igualmente permite disminuir sensiblemente el límite de detección alcanzable en la determinación y lograr unos resultados cuantitativos más reproducibles que los obtenidos con los métodos habituales (Grob, K. & Lafranchi, M. Reproducibility of results from LC-GC of sterols and wax esters in olive oils, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1989**, 12, 624-626).

Grob *et al.* (Grob, **1991**, *supra*) desarrollaron una interfase que permitía llevar a cabo el acoplamiento LC-GC, basada en el empleo de un capilar de sílice fundida sin fase, es decir, el mismo material que se emplea para hacer columnas capilares pero sin la fase estacionaria de dichas columnas. Empleando esta interfase, desarrollaron una metodología que permitía llevar a cabo reacciones con fines analíticos entre las etapas de LC y GC de forma automática (Chappell, C.G.; Colin, A.; Creaser, S. & Shepherd, M.J. On-line derivatisation in combined high-performance liquid chromatography-gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* **1997**, 122, 955-961; Hyötyläinen, T. & Riekkola, M.L. Solid-phase extraction or liquid chromatography in the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B* **2005**, 817, 13-21) y lo aplicaron a diversas determinaciones analíticas como narcóticos en orina (Hyötyläinen, T.; Keski-Hynnälä, H. & Riekkola, M.L. Determination of morphine and its analogues in urine by on-line coupled reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography with on-line derivatisation. *J. Chromatogr. A* **1997**, 771, 360-365), a la determinación de beta-bloqueadores y codeína en orina (Hyötyläinen, T.; Pilvio, R. & Riekkola, M.L. Screening of four beta-blockers and codeine in urine by on-line coupled RPLC-GC with on-line derivatisation. *J. High Resol. Chromatogr.* **1996**, 19, 439-443), o al análisis de ácidos orgánicos y anilinas llevando a cabo una derivatización simultánea a la extracción (Goosens, E.C.; Wolters, M.H.; Strijker, R.E.; Dejong, D.; Dejong, G.J. & Brinkman, U.A.T. A continuous 2-phase reaction system coupled online with capillary chromatography for the determination of polar solutes in water. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1992**, 15, 242-248).

Sin embargo, esta interfase tenía el inconveniente de que sólo permitía trabajar en cromatografía de líquidos en fase normal (empleando como eluyente disolventes apolares), mientras que la inmensa mayoría de las aplicaciones de LC se llevan a cabo en fase inversa. Para obviar este problema desarrollaron un sistema que permitía cambiar el disolvente (intercambiador de fases) entre las etapas de LC y GC (Ballesteros, E.; Gallego, M & Valcárcel, M. Automatic determination of N-methylcarbamate pesticides by using a liquid-liquid extractor derivatization module coupled on-line to a gas chromatograph equipped with a flame ionization detection. *J. Chromatogr.* **1993**, *663*, 169-176; Hyötylainen, T., **1996** *supra*; Hyötylainen, T., **1997** *supra*), pero el sistema global resultaba muy complejo. Además, este sistema de acoplamiento LC-GC tiene otros inconvenientes, como son la variabilidad en los tiempos de retención en GC, o la corta duración de las columnas cromatográficas y de los capilares empleados para la evaporación del disolvente. Todos estos inconvenientes han impedido que los laboratorios de análisis rutinarios hayan incorporado los distintos métodos de análisis mediante este sistema de acoplamiento LC-GC, que desde hace ya bastantes años se han venido desarrollando. Aunque las expectativas que despertó este acoplamiento hicieron que saliera al mercado un equipo para llevarlo a cabo, los problemas encontrados han provocado que dicho equipo haya sido retirado del mercado.

El grupo de investigación de los presentes inventores ha participado en el desarrollo de diversos métodos de análisis mediante inyección de grandes volúmenes en cromatografía de gases y mediante acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases llevando a cabo la etapa de LC tanto en fase inversa (RPLC-GC) como en fase normal (NPLC-GC). Para los primeros trabajos se empleó un inyector PTV como interfase. La camisa de vidrio del PTV se rellenaba con un material de retención adecuado (que puede ser material inerte, un adsorbente, o un absorbente), en el que se retenían los analitos mientras que el disolvente se eliminaba a través del punto de conexión de la columna cromatográfica al inyector, por lo que había que desconectar y conectar la columna manualmente en cada análisis, lo que impedía la automatización. Con este sistema se desarrollaron métodos de análisis de componentes minoritarios de aceites comestibles, como esteroides (Señoráns, F.J.; Villén, J.; Tabera, J. & Herraiz, M. Simplex optimization of the direct analysis of free sterols in sunflower oil by on-line coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1022-1026), eritrodiol y uvaol (Blanch, G.P.; Villén, J. & Herraiz, M. Rapid analysis of the free erythrodiol and uvaol in olive oil by coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1027-1030) y de esteroides, tocoferoles y escualeno (Villén, J.; Ruiz del Castillo, M.L. & Herraiz, M. Rapid and simultaneous analysis of the free sterols, tocopherols and squalene in edible oils by coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1419-1422). Estos métodos, que empleaban el PTV como interfase, sin embargo, no implicaban una reacción química en el sistema cromatográfico, sino que suponían una mera separación del analito de interés.

Tzing *et al.* (Tzing, S.H.; Ghule, A.; Liu, J.Y. & Ling, Y.C. On line derivatization gas chromatography with furan chemical ionization tandem mass spectrometry for screening of amphetamines in urine. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1137*, 76-83) emplearon un PTV para llevar a cabo una reacción pero, a diferencia del sistema empleado por el grupo de investigación de los presentes inventores previamente descrito, en el que los analitos quedan retenidos en un material de retención, en este sistema se emplea un microvial, colocado en el PTV, en el cual se había introducido previamente la muestra y el reactivo derivatizante en un disolvente adecuado y, por tanto, la reacción se lleva a cabo en el microvial que se sitúa en el interior del PTV.

Pérez-Pavón *et al.* (Pérez-Pavón, J.L.; Casas-Ferreira, A.M.; Fernández-Laespada, M.E. & Moreno-Cordero, B. Use of a programmed temperature vaporizer and an *in situ* derivatization reaction to improve sensitivity in headspace-gas chromatography. Application to the analysis of chlorophenols in water. *J. Chromatogr. A*, **2009**, *1216*, 1192-1199) emplearon un PTV con una camisa de vidrio para analizar clorofenoles en agua. En este caso la reacción de derivatización se llevó a cabo fuera del inyector PTV en un vial donde a la muestra se le añadió el agente derivatizante y se agitó hasta que la reacción tuvo lugar. Dicho vial se depositó en el interior del inyector PTV, que se usó como inyector "headspace".

El grupo de investigación de los presentes inventores desarrolló posteriormente una interfase automatizable para el acoplamiento LC-GC, que fue denominada interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) en la literatura científica, y que se basa en el empleo de un inyector PTV ampliamente modificado. Con esta interfase se desarrolló inicialmente un método de análisis de residuos de plaguicidas en agua por RPLC-GC tras una etapa de concentración por extracción en fase sólida (Pérez, M.; Alario, J.; Vázquez, A. & Villén, J. On-line reversed phase LC-GC coupling by using the new TOTAD (through oven transfer adsorption desorption) interface. Application to parathion residue analysis. *J. Microcol. Sep.* **1999**, *11*, 582-589; Pérez, M.; Alario, J.; Vázquez, A. & Villén, J. Pesticide residue analysis by off-line SPE and on-line reversed phase LC-GC using the new through oven transfer adsorption desorption interface. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 846-852) o por inyección de grandes volúmenes de muestra (Alario, J.; Pérez, M.; Vázquez, A. & Villén, J. Very large volume sampling of water in GC using the Through Oven transfer Adsorption Desorption (TOTAD) interface for pesticide residue analysis. *J. Chrom. Sci.* **2001**, *39*, 65-69).

La interfase TOTAD fue patentada en España (Patente nº ES 2 152 153) y extendida a Estados Unidos (Patente nº 6,402,947). Desde que se licenció esta patente, los esfuerzos del grupo de investigación se han dirigido al desarrollo de aplicaciones LC-GC y a la automatización y perfeccionamiento de la interfase. Como resultado de dicho perfeccionamiento, se obtuvo otro sistema mejorado que también fue patentado en España (Patente nº ES 2 263 387) y en otros países (Estados Unidos, Europa, Brasil, Rusia, India, China y Japón). La interfase TOTAD es, a nivel mundial, la única interfase actualmente comercializada, que además permite llevar a cabo el acoplamiento LC-GC tanto en fase normal como, lo que supone una ventaja sustancial, en fase inversa.

En cuanto al desarrollo de aplicaciones empleando la interfase TOTAD, entre otras, se ha desarrollado un método de análisis de residuos de plaguicidas en aceite de oliva (Díaz-Plaza, E.M.; Cortés, J.M.; Vázquez, A. & Villén, J. Automated determination of pesticide residues in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface with electrón-capture and nitrogen-phosphorus detectors operating simultaneously. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1174*, 145-150), de compuestos minoritarios (eritrodiol, uvaol, escualeno, esteroides y tocoferoles) en aceites (Cortés, J.M.; Sánchez, R.; Villén, J. & Vázquez, A. Analysis of unsaponifiable compounds of edible oils by automated on-line coupling reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the Through Oven Transfer Adsorption Desorption interface. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6963-6968), de residuos de plaguicidas en frutos secos (Cortés, J.M.; Toledano, R.M.; Villén, J. & Vázquez, A. Analysis of pesticides in nuts by on line reversed phase liquid chromatography-gas chromatography using the Through Oven Transfer Adsorption Desorption Interface. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5544-5549). Los métodos citados implican el acoplamiento directo RPLC-GC. Asimismo, se ha desarrollado un método de análisis de residuos de plaguicidas en frutas y verduras por introducción de grandes volúmenes de extracto en GC (Cortés, J.M.; Sánchez, R.; Díaz-Plaza, E.M.; Villén, J. & Vázquez, A. Large volume GC injection for the analysis of organophosphorus pesticides in vegetables using the Through Oven Transfer Adsorption Desorption (TOTAD) interface. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1997-2002). Estos métodos que empleaban la TOTAD como interfase no implicaban tampoco una reacción química en el sistema cromatográfico, sino una simple separación del analito de interés.

Recientemente, el grupo de investigación de los presentes inventores ha empezado a trabajar en el desarrollo de métodos para el control analítico del dopaje. Como se ha comentado anteriormente, un elevado porcentaje de analitos presentes en muestras biológicas presentan grupos funcionales que provocan su descomposición térmica y una baja volatilidad. Entre estos grupos se encuentran los narcóticos y las hormonas esteroideas, objeto de la investigación. Como también se ha comentado anteriormente, estos problemas se pueden solucionar mediante una reacción de derivatización. Llevar a cabo esta reacción en la etapa de preparación de la muestra supondría dar un paso atrás en cuanto que se perdería la ventaja que tiene el sistema LC-GC con la interfase TOTAD de disminuir sustancialmente dicha etapa de preparación de muestra. Además, en muchos casos las reacciones se tienen que llevar a cabo una vez que los analitos han sido separados de la matriz, lo que supone, cuando se emplea el acoplamiento LC-GC, tener que llevar a cabo dichas reacciones entre la etapa de LC y la de GC. Es por ello que, con el objetivo de incorporar las citadas reacciones al sistema automático LC-GC, se ha desarrollado una metodología objeto de la presente patente, que puede ser aplicada en un sistema de inyección de cromatografía de gases con temperatura programable (inyector PTV o interfase TOTAD, por ejemplo), en el que las reacciones con fines analíticos se llevan a cabo cuando los analitos se encuentran comprendidos en el material de retención (inerte, adsorbente o absorbente) con el que se rellena la camisa de vidrio del inyector de temperatura programable. Dicha metodología, además, puede aplicarse exclusivamente a GC, sin que tenga que estar necesariamente acoplado a una etapa previa de cromatografía líquida. En cualquier caso, el problema a resolver para llevar a cabo una inyección de grandes volúmenes en GC y el acoplamiento en línea LC-GC es básicamente el mismo: eliminar una elevada cantidad de disolvente al tiempo que se retienen los analitos para su análisis por GC (Grob, Jr.K.; Karrer, G. & Riekkola, M.L. On-column injection of large sample volumes using the retention gap technique in capillary-gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **1985**, 129-155.; Grob, K. & Artho, A. Carbowax-deactivated GC precolumns capable of resisting water. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1991**, 212-214). Así, en el caso de la inyección de grandes volúmenes, hay que eliminar el disolvente en el que se encuentran disueltos los analitos, mientras que en el acoplamiento en línea LC-GC, el disolvente a eliminar es el eluyente de cromatografía de líquidos.

Los presentes autores, por tanto, proponen ahora un procedimiento para llevar a cabo reacciones en el material de retención comprendido en la camisa de vidrio de un sistema de inyección en GC con programación de temperatura que, habitualmente, se realizan de modo manual en la etapa de preparación de la muestra para su análisis por cromatografía de gases.

La reacción en el procedimiento de la invención se produce en fase heterogénea, ya que el disolvente se elimina en el sistema de inyección antes de añadir el reactivo. Sin embargo, en contra de lo que cabría esperar, la reacción se produce con un rendimiento cuantitativo y es prácticamente instantánea, por lo que el tiempo total del análisis es bastante reducido. Otra ventaja del método es el bajo consumo tanto de muestra como de disolventes y de reactivo.

Así pues, los presentes autores han desarrollado un procedimiento alternativo para analizar compuestos cuyo análisis por cromatografía de gases requiere una reacción previa, que es más rápido, sencillo, reproducible, fiable, con menos manipulación de la muestra, y que proporciona resultados cuantitativos coherentes con una repetibilidad satisfactoria.

### Objeto de la invención

La presente invención, por tanto, tiene por objeto proporcionar un procedimiento para llevar a cabo reacciones con fines analíticos empleando en la determinación final la cromatografía de gases.

### Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el esquema del sistema de inyección (interfase TOTAD) durante la etapa de reacción (derivatización) del procedimiento de la invención. En dicho esquema se puede ver que la diferencia con el sistema de interfase TOTAD descrito en la patente ES 2 2 63 387 es que se añade una válvula de inyección (10) en la que se inyecta el agente derivatizante, situada entre la válvula de inyección de la muestra (9) y la válvula de seis vías (11).

## ES 2 364 631 A1

Los números que aparecen en la figura 1 corresponden a:

- (1) Vaporizador con temperatura programable (PTV) modificado
- 5 (2) Camisa de vidrio
- (3) Material de retención
- (4) Lana de vidrio
- 10 (5) Contracono
- (6) Cono de grafito
- 15 (7) Tapón calefactor
- (8) Bomba de HPLC
- (9) Válvula inyección de la muestra
- 20 (10) Válvula inyección del reactivo derivatizante
- (11) Válvula seis vías
- 25 (12) Desecho HPLC
- (13) Desecho Capilar Transferencia
- (14) Electroválvula de apertura-cierre 1
- 30 (15) Tubo de transferencia
- (16) Columna de GC
- 35 (17) Detector de GC
- (18) Horno de GC
- (19) Controlador electrónico de presión/flujo
- 40 (20) Depósito de gas portador
- (21) Regulador de presión
- 45 (22) Regulador de flujo
- (23) Electroválvula de apertura-cierre 2
- (24) Válvula de aguja
- 50 (25) Tubo de salida
- (26) Disolvente
- 55 (27) Analitos

Líneas discontinuas: Flujo de líquidos

60 Líneas continuas: Flujo de gases

La figura 2a muestra el cromatograma de gases obtenido al analizar una muestra patrón con tres narcóticos (pentazocina, codeína y morfina) sin emplear el procedimiento de la invención (sin la etapa de reacción).

65 La figura 2b muestra el cromatograma de gases obtenido al analizar una muestra patrón con tres narcóticos (pentazocina, codeína y morfina) mediante el procedimiento de la invención.

La Figura 3a muestra el cromatograma de gases obtenido al analizar una disolución patrón de colesterol sin emplear el procedimiento de la invención (sin la etapa de reacción).

5 La Figura 3b muestra el cromatograma de gases obtenido al analizar una disolución patrón de colesterol mediante el procedimiento de la invención.

### Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona un procedimiento para llevar a cabo reacciones en un proceso de análisis mediante cromatografía de gases, en adelante “procedimiento de la invención”, que comprende las etapas de:

- (a) depositar el analito en el interior de una camisa de vidrio alojada en un sistema de inyección de cromatografía de gases que permita programar la temperatura;
- 15 (b) hacer reaccionar dicho analito con un reactivo adicionado a tal fin en dicho sistema de inyección; y
- (c) transferir el producto de reacción obtenido en (b) para su análisis por cromatografía de gases;

20 en el que la camisa de vidrio alojada en el sistema de inyección comprende un material de retención donde se lleva a cabo la reacción de la etapa (b).

Así, el procedimiento de la invención tiene como fin llevar a cabo reacciones con fines analíticos empleando en la determinación final la cromatografía de gases. Dicho procedimiento comprende depositar el analito, mediante la introducción de la muestra que lo comprende, en el interior de la camisa de vidrio de un sistema de inyección de GC con programación de temperatura en la que se encuentra el material de retención; llevar a cabo la reacción introduciendo en dicho material de retención el reactivo que reacciona con el analito y, por último, someter los productos de reacción obtenidos a cromatografía de gases, en el que el sistema de inyección de GC con temperatura programable puede ser un inyector PTV (Programmable Temperature Vaporizer) o la interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption).

En una realización particular del procedimiento de la invención, el sistema de inyección de la etapa (a) es un inyector PTV (vaporizador con temperatura programable). En otra realización particular del procedimiento de la invención, el sistema de inyección de la etapa (a) es una interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption).

En el contexto de la invención, el término “depositar el analito” se refiere a introducir la muestra que comprende el analito o analitos. Igualmente, en el contexto de la invención, el término “muestra que comprende el analito” se refiere a una disolución, una suspensión, un extracto, una fracción que eluye de cromatografía de líquidos, etc. que contiene el analito de interés siendo necesario, en muchos casos, eliminar el disolvente y retener el analito. En una realización particular, la muestra que comprende el analito es de origen biológico. Así por ejemplo, el procedimiento de la invención puede emplearse para determinar narcóticos en orina, colesterol en sangre, ácidos orgánicos en alimentos, hormonas esteroideas en sangre u orina, etc.

En el contexto de la invención, el término “reacción” se refiere a cualquier reacción con fines analíticos cuyo objetivo final sea el análisis por cromatografía de gases. El procedimiento de la invención permite realizar diferentes reacciones adicionando un reactivo a los compuestos que se encuentren retenidos en un material de retención situado en el interior de una camisa de vidrio, para posteriormente realizar el análisis de los productos de la reacción por cromatografía gaseosa. Así, por ejemplo, la reacción a efectuar puede ser una derivatización, una esterificación, una transesterificación, una oxidación, etc., dependiendo fundamentalmente de la naturaleza de la matriz y de los analitos, tal y como se ha señalado previamente. En una realización particular del procedimiento de la invención, la reacción de la etapa (b) es una derivatización. En una realización preferida, la reacción de derivatización es una sililación.

El material de retención puede ser un material inerte, un adsorbente o un absorbente. Tanto los materiales inertes como los adsorbentes son sólidos. Por el contrario, los absorbentes se encuentran en fase líquida, pero en estos casos la fase líquida se encuentra anclada o unida a un soporte sólido formando una fina película, por lo que el manejo (la introducción del material en la camisa de vidrio, su inmovilización con lana de vidrio, etc.) y el comportamiento aparente de dichos materiales de retención absorbentes es semejante al de los materiales sólidos. De hecho, salvo alguna excepción, dichos materiales absorbentes se encuentran en fase sólida a temperatura ambiente, y pasan a fase líquida al calentarlos, más o menos dependiendo de la naturaleza del material absorbente en cuestión.

Como se ha citado anteriormente, la interfase TOTAD consiste en un vaporizador de temperatura programable (PTV) ampliamente modificado.

Por tanto, el procedimiento de la invención se refiere a una reacción que tiene lugar sobre un material de retención alojado, e inmovilizado por cualquiera de los procedimientos ampliamente conocidos por el experto medio en la materia, en el interior de una camisa de vidrio. En el contexto de la invención el término “camisa de vidrio”, se refiere a una camisa de vidrio o de cuarzo que se encuentra a su vez en el interior de un sistema que regula la temperatura respondiendo a un programa, y que permite la circulación de gases y/o líquidos, de los que actualmente hay dos sistemas

## ES 2 364 631 A1

ampliamente descritos y conocidos, un inyector PTV o una interfase TOTAD, sin perjuicio de cualquier otro sistema que trabaje de modo semejante. En dicho material de retención se depositan los compuestos que quedan retenidos, y posteriormente se introduce un reactivo que entra en contacto con los compuestos retenidos produciéndose la reacción. Por último, el procedimiento de la invención se refiere al análisis por cromatografía gaseosa de los productos de la reacción que ha tenido lugar en el material de retención y que, tras su desorción, pasan a ser analizados por cromatografía gaseosa empleando un detector seleccionado a tal fin de entre cualquiera de los detectores empleados en cromatografía de gases.

Así pues, en la etapa (a) del procedimiento de la invención, los compuestos a analizar son introducidos en el interior de la camisa de vidrio que se encuentra en el interior del PTV o de la interfase TOTAD. Para ello, se pueden seguir diversas metodologías, entre las que se citan a continuación las cuatro más empleadas.

Una primera metodología es la inyección convencional de muestra en un PTV. Cuando se van a emplear columnas cromatográficas capilares en el análisis de GC, el volumen de muestra habitualmente introducido es del orden de un microlitro. En este caso, para llevar a cabo el procedimiento de la invención, el inyector PTV puede estar tanto en modo de división de flujo (split) como sin división de flujo (splitless). En cualquiera de las dos modalidades, el PTV se encuentra durante dicha introducción de muestra a una temperatura lo suficientemente baja para que se produzca la retención de los analitos por el material de retención, y que depende de la naturaleza de los compuestos a retener, principalmente de su volatilidad. Para introducir la muestra siguiendo esta metodología se emplea normalmente una jeringa. En este caso, el inyector PTV opera en modo de división de flujo (split). Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa (a) el analito se deposita en el interior de la camisa de vidrio mediante inyección convencional en un inyector PTV.

Una segunda metodología es la inyección de grandes volúmenes empleando un PTV, denominada así cuando el volumen de muestra es tal que hay que proceder a eliminar la mayor parte de disolvente antes de que los analitos, junto con el resto de disolvente no eliminado, entren en la columna de cromatografía de gases, puesto que si no se lleva a cabo dicha eliminación de disolvente, la columna cromatográfica se inundaría, lo que provocaría el deterioro de la misma y la pérdida de la capacidad de separación en la determinación analítica que se esté llevando a cabo. Dicha eliminación de disolvente es necesaria cuando el volumen de muestra introducido para su análisis empleando columnas capilares es superior a los dos microlitros aproximadamente, aunque los volúmenes habitualmente introducidos cuando se emplea esta técnica suelen oscilar entre los diez y los cincuenta microlitros. En este caso, el inyector PTV opera en modo de división de flujo (split) con objeto de que el disolvente pueda ser eliminado en estado gaseoso a través de la salida de división de flujo, arrastrado por el gas portador que circula hacia dicha salida de división de flujo, mientras que los compuestos son retenidos por el material de retención alojado en el interior de la camisa de vidrio. Cuando se emplea esta metodología, la muestra puede ser introducida mediante una jeringa o mediante un sistema de bombeo a través de un tubo, generalmente capilar, cuyo extremo se introduce en el inyector PTV. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa (a) el analito se deposita en el interior de la camisa de vidrio mediante inyección de grandes volúmenes empleando un inyector PTV.

La tercera metodología es la inyección de grandes volúmenes empleando la interfase TOTAD. En este caso, la muestra es impulsada por un sistema de bombeo, generalmente por la bomba de un cromatógrafo de líquidos, a través del tubo de transferencia, que está conectado al extremo del inyector más próximo al horno del cromatógrafo de gases. El disolvente es eliminado a través del tubo de salida, bien en fase gaseosa o bien parcialmente evaporado, parte en fase gaseosa y parte en fase líquida, al tiempo que los compuestos son retenidos por el material de retención alojado en la camisa de vidrio. Los volúmenes que habitualmente se introducen empleando esta metodología oscilan entre los diez microlitros y unos pocos mililitros. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa (a) el analito se deposita en el interior de la camisa de vidrio mediante inyección de grandes volúmenes empleando la interfase TOTAD.

Por último, la cuarta metodología es la que se sigue cuando se lleva a cabo un acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases empleando la interfase TOTAD. Esta cuarta metodología es exactamente igual a la tercera metodología anteriormente descrita, con la única diferencia de que lo que se impulsa hasta el interior de la camisa de vidrio no es una muestra, sino la fracción de cromatografía de líquidos que contiene los compuestos de interés, y que ha sido seleccionada mediante la válvula de seis vías de dicha interfase. En este caso, los compuestos de interés se encuentran disueltos en el disolvente o mezcla de disolventes que se han empleado para conseguir la deseada separación en la etapa de cromatografía de líquidos, denominado el eluyente. Al igual que en la tercera metodología, el eluyente es eliminado a través del tubo de salida, también en fase gaseosa o, más habitualmente, parcialmente evaporado. Los volúmenes de eluyente que se introducen, esto es, que se transfieren de cromatografía de líquidos a cromatografía de gases, oscilan normalmente entre unos cientos de microlitros hasta unos mililitros. Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, en la etapa (a) el analito se deposita en el interior de la camisa de vidrio mediante acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases empleando la interfase TOTAD. Por tanto, en una realización particular, el procedimiento de la invención comprende una etapa previa de cromatografía de líquidos de alta eficacia.

Existen asimismo otras metodologías para introducir la muestra en el interior de una camisa de vidrio rellena con un material de retención, pero se emplean mucho menos. Por citar un ejemplo, se ha descrito el empleo de un inyector PTV para inyección de grandes volúmenes en cromatografía de gases y para acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases pero, a diferencia de la segunda metodología anteriormente descrita, el disolvente se



## ES 2 364 631 A1

elimina a través del punto de conexión de la columna al inyector PTV. No obstante, esta metodología exige conectar y desconectar la columna en cada análisis, lo que impide su automatización, motivo por el que se dejó de emplear cuando se desarrolló la interfase TOTAD.

5 Siguiendo cualquiera de las posibles metodologías anteriormente comentadas, se consigue que los compuestos comprendidos en la muestra introducida queden retenidos por el material de retención que se encuentra en el interior de la camisa de vidrio. A continuación se introduce el reactivo que producirá la reacción con dichos compuestos, en adelante reactivo, de manera que dicho reactivo entre en contacto durante un tiempo con los compuestos retenidos a fin de que tenga lugar la reacción entre los compuestos que se encuentran retenidos en el material de retención y el reactivo introducido posteriormente. El tiempo que tienen que estar en contacto los compuestos con el reactivo es más o menos largo en función de la naturaleza de la reacción. Puesto que dicha reacción tiene fines analíticos, por calentamiento posterior se produce la desorción térmica de los productos de la reacción, que pasan a la columna cromatográfica de gases para su análisis.

15 Como se ha comentado anteriormente, el procedimiento de la invención puede emplear, como sistema de inyección de cromatografía de gases, un inyector PTV o bien el dispositivo de interfase denominada interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption) para el acoplamiento directo de la cromatografía de líquidos y la cromatografía de gases (patente española ES 2 152 153; patente en EE.UU. 6,402,947 licenciada a la empresa KONIK Tech, Sant Cugat del Vallés, Barcelona); o bien el sistema mejorado, que también sigue denominándose interfase TOTAD y que fue objeto de la posterior patente española ES 2 263 387, actualmente en proceso de internacionalización. Dicha interfase TOTAD es totalmente automática y se maneja desde el software del ordenador. Por tanto, el procedimiento de la invención cuando se emplea esta interfase también es automático.

25 Finalmente, el cromatógrafo de gases va acoplado a un detector adecuado de modo que se obtiene un cromatograma de los productos de la reacción que se ha transferido a la columna cromatográfica y que tras su separación llegan al citado detector.

30 Así, en una realización particular del procedimiento de la invención, la muestra que comprende los analitos se introduce en la etapa (a) por inyección de grandes volúmenes en cromatografía de gases. En una realización preferida, la muestra que comprende los analitos se introduce en la etapa (a) por inyección de grandes volúmenes en cromatografía de gases empleando un inyector PTV. En otra realización preferida, la inyección de la etapa (a) se realiza por inyección de grandes volúmenes en cromatografía de gases empleando la interfase TOTAD. El analito, por tanto, se deposita en el interior de la camisa de vidrio que se encuentra en el interior del inyector PTV o de la interfase TOTAD.

35 El interior de la camisa de vidrio alojada en el sistema de inyección está relleno con un material de retención de una determinada longitud y sujeto con lana de vidrio por ambos extremos para impedir su desplazamiento. Tal y como se ha indicado, dicho material de retención puede ser cualquier material inerte, un adsorbente o un absorbente, del estado de la técnica que retenga los compuestos y que permita el paso del gas portador utilizado en el cromatógrafo de gases y del disolvente utilizado en la inyección de grandes volúmenes. De este modo, el material de retención retiene a los compuestos y el disolvente es eliminado, tanto en estado líquido como en estado de vapor, arrastrado por la corriente de gas. En una realización particular del procedimiento de la invención, dicho material de retención se selecciona de entre un material inerte, un material adsorbente y un material absorbente. En una realización preferida, se selecciona de entre fibra de vidrio, volaspher y chromosorb (entre otros materiales inertes), tenax, carbón activo, gaschrom (entre otros materiales adsorbentes), polidimetilsiloxano sobre volaspher, OV-17 sobre volaspher y polietilenglicol sobre chromosorb (entre otros materiales adsorbentes).

45 Después, en la etapa (b) del procedimiento de la invención se procede a inyectar el reactivo en el interior de la camisa de vidrio que contiene el material de retención en el que se han quedado retenidos los compuestos introducidos en la etapa (a). Dicho reactivo se tiene que introducir de un modo tal que permita que éste entre en contacto con los compuestos retenidos en el material de retención.

50 En una realización particular del procedimiento de la invención, la reacción de la etapa (b) es una derivatización. Para ello efectuar dicha derivatización se añade un reactivo derivatizante adecuado del estado de la técnica. En una realización preferida, el reactivo derivatizante se selecciona de entre hexametildisilazano, trimetilclorosilano, N,O-bis(trimetilsilil)acetamida, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, N-trimetilsililimidazol, clorometildimetilclorosilano, N-metil-N-trimetilsilil-heptafluoroamida, dimetilclorosilano, N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida, N-trifluoroacetilimidazol, N-heptafluorobutirilimidazol, N-metil-bis(trifluoroacetamida), pentafluoropropanol, anhídrido heptafluorobutírico, anhídrido pentafluoropropiónico, anhídrido trifluoroacético, N,N-dimetilformamida dimetil acetal, hidróxido de trimetilnilina, trifluoruro de boro, metóxido sódico y mezclas de los mismos.

60 La reacción de derivatización se lleva a cabo a una temperatura adecuada durante un tiempo apropiado. Así, en una realización particular, la reacción de derivatización se efectúa a una temperatura de 10-200°C durante un tiempo de 0,1 min a 5 horas. En una realización preferida, la reacción de derivatización se efectúa a una temperatura de 125°C durante un tiempo de 1 min.

65 Tanto en la etapa (a) como en la (b) se hace circular un gas por el interior de la camisa de vidrio que permita la eliminación del disolvente y favorezca el contacto del reactivo con los compuestos.

## ES 2 364 631 A1

Por último, en la etapa (c) el producto de reacción obtenido en la etapa (b) se somete a cromatografía de gases. Así, en una realización preferida, las etapas (a) a (c) son totalmente automáticas.

5 El cromatógrafo de gases se encuentra equipado con un sistema de detección adecuado de modo que se obtiene un cromatograma de los productos de la reacción obtenidos. En una realización particular del procedimiento de la invención, el sistema de detección del cromatógrafo de gases es un detector seleccionado de entre un detector fotométrico de llama, un detector de nitrógeno-fósforo, un detector de captura electrónica, un detector de ionización de llama y un espectrómetro de masas. En una realización preferida, el sistema de detección empleado es un detector de ionización de llama.

10 De una manera general se pueden distinguir las siguientes etapas en el sistema de inyección del procedimiento de la invención:

15 1) *Estabilización*: Antes de iniciar la inyección, se estabiliza la temperatura a la que se debe encontrar la camisa de vidrio, que debe ser la adecuada para que los compuestos queden retenidos en el material de retención que rellena la camisa interior de vidrio del sistema de inyección con control de temperatura. El gas circula a través de dicho tubo en modo adsorción.

20 2) *Inyección*: Se realiza la inyección de la muestra que comprende los compuestos (una disolución, por ejemplo) o, en su caso, la transferencia de una fracción de cromatografía de líquidos a cromatografía de gases. El gas que circula a través de la camisa de vidrio elimina el eluyente o disolvente, total o parcialmente evaporado, y favorece la retención de los compuestos en el material de relleno.

25 3) *Reacción*: Cuando los compuestos están retenidos en el material de retención se introduce el reactivo de manera que se ponga en contacto con los compuestos. El helio que circula a través de la camisa de vidrio favorece la puesta en contacto del reactivo con los compuestos, al mismo tiempo que elimina el reactivo sobrante. El reactivo debe estar en contacto con los compuestos el tiempo suficiente para que el rendimiento de la reacción sea satisfactorio.

30 4) *Eliminación de los restos del disolvente*: Una vez que la etapa de reacción ha finalizado, se mantienen las válvulas de salida de disolvente abiertas hasta asegurarnos de que la eliminación de disolvente es tal que el remanente no interfiere en la cromatografía de gases.

35 5) *Desorción térmica*: Pasado el tiempo necesario para la eliminación del disolvente y del exceso de reactivo, las salidas de eliminación de disolvente se cierran. Además se cierra la entrada de gas que atraviesa el material de retención y se modifica el flujo por la entrada de gas al valor adecuado de modo que el sistema queda preparado para la desorción. En este momento se calienta rápidamente el sistema de inyección hasta la temperatura necesaria para producir la desorción térmica de los productos de la reacción, que son arrastrados por la corriente de gas inerte a la columna cromatográfica de gases, donde tiene lugar el análisis cromatográfico en las condiciones previamente programadas.

40

Las ventajas que presenta el procedimiento de la invención son las siguientes:

45 - El procedimiento de la invención sustituye una preparación manual de la muestra para su análisis por cromatografía de gases por un proceso automático.

- El procedimiento de la invención minimiza la manipulación de la muestra por parte del analista, por lo que reduce los errores y contaminaciones causados en dicha manipulación.

50 - El procedimiento de la invención permite emplear un menor volumen de muestra.

- El procedimiento de la invención es especialmente adecuado cuando la cantidad de muestra es limitada, como obras de arte, muestras biológicas, etc.

55 - El procedimiento de la invención no requiere el empleo de cantidades elevadas de disolventes orgánicos perjudiciales para la salud del analista y para el medio ambiente.

- El procedimiento de la invención es especialmente adecuado para determinaciones analíticas de rutina.

60 - El procedimiento de la invención permite utilizar numerosas veces la misma camisa de vidrio rellena con el material de retención, sin que tenga que ser sustituida en cada determinación analítica.

- En el procedimiento de la invención no se produce el deterioro del sistema de cromatografía de gases causado por la adición del reactivo.

65 - El procedimiento de la invención permite utilizar diferentes sistemas de detección en cromatografía de gases.

## ES 2 364 631 A1

- El tiempo total del análisis cuando se emplea el procedimiento de la invención es significativamente menor que el tiempo que se requiere cuando se utiliza el método convencional, que consume mucho tiempo en llevar a cabo la reacción.

5

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

### 10 Ejemplo 1

*Análisis de narcóticos por inyección de grandes volúmenes en GC mediante la interfase TOTAD con sililación en línea previa al análisis por GC*

#### 15 *Materiales*

Los patrones de los narcóticos fueron facilitados por el Laboratorio de la Agencia Estatal Antidopaje de Madrid (España). Los narcóticos usados para la experimentación fueron: pentazocina, codeína y morfina.

20 El hexano y acetato de etilo, usados como eluyentes, y el metanol y acetato de etilo, usados como disolventes, fueron de grado HPLC (LabScan, Dublín, Irlanda).

El agente derivatizante empleado fue Silan-esterol-1-GC (piridina:hexametildisililazano:trimetilclorosilano; 9:3:1), que se obtuvo de Panreac (Montcada, España).

25

Como material adsorbente dentro de la camisa de vidrio en la interfase se usó Tenax TA, 80-100 mesh (Chrompack, Middelburg, Holanda). En la camisa de vidrio se colocó 1 cm de Tenax TA, sujeto a ambos lados por lana de vidrio. Éste se acondicionó bajo una corriente de helio, aumentando la temperatura desde 50°C, a 10°C/min hasta 350°C manteniendo esta temperatura final durante una hora.

30

Se prepararon tres disoluciones patrón de los narcóticos en metanol a 1000 mg/l. A partir de éstas, se prepararon dos disoluciones, una disolución en acetato de etilo con los tres narcóticos a 100 mg/l (disolución stock). Dicha disolución se almacenó a 4°C hasta su uso. A partir de esta disolución, por dilución en acetato de etilo, se preparó otra (disolución de trabajo) que contenía los narcóticos a 10 mg/l, que fue utilizada para la experimentación.

35

#### *Instrumentación*

Los análisis se realizaron por inyección de grandes volúmenes en GC mediante la interfase TOTAD empleando la derivatización en línea previa al análisis por GC.

40

Para la introducción de grandes volúmenes se empleó una válvula de inyección manual (modelo 7125, Rheodyne) con un volumen de la lazo de 20  $\mu$ l. Una bomba cuaternaria (modelo Konik 550) fue utilizada para empujar la muestra hasta la interfase TOTAD, así como para empujar el derivatizante. El derivatizante se inyecta en una válvula manual (modelo 7125, Rheodyne) con un lazo de 20  $\mu$ l. Dicha válvula se sitúa entre la válvula de inyección de la muestra y la válvula de seis vías, tal como se muestra en la figura 1.

45

El cromatógrafo de gases fue Konik 4000B (Konik-Tech, Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España) equipado con una interfase TOTAD (patentada, con derechos exclusivos asignados a Konik-Tech) y un detector FID (detector de ionización de llama).

50

El software usado para obtener y procesar los datos de GC, fue Konikrom Plus (Konik-Tech, Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España).

55 La columna utilizada en cromatografía de gases tenía la fase estacionaria 5% Fenil Metil Silicona, una longitud de 30 m, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu$ m de espesor de película de fase (Quadrex, Weybridge, Reino Unido). Como gas portador se empleó helio a un flujo por columna de 1,8 ml/min.

#### 60 *Modo de operación de la interfase TOTAD*

Durante las cinco etapas de operación de la interfase TOTAD, las condiciones usadas fueron las siguientes:

65  $\diamond$  *Estabilización.* La interfase y el horno del cromatógrafo de gases se estabilizaron a 125°C y 60°C respectivamente. El helio, utilizado como gas portador, entraba en la camisa de vidrio por el extremo más próximo al horno a un flujo de 500 ml/min, y por la entrada de gas más alejada del horno circulaba el mismo flujo de helio para evitar la acumulación del disolvente en la zona externa del PTV modificado que forma parte de la interfase. La bomba de HPLC se estabilizó al caudal de inyección, que fue 0,3 ml/min.

## ES 2 364 631 A1

5  $\diamond$  *Inyección.* La disolución de trabajo se introdujo en la válvula de inyección manual. Cuando se giró esta válvula, el eluyente fue empujado por la bomba y arrastró la muestra hasta la válvula de seis vías, que giró automáticamente, con lo que la disolución de trabajo fue empujada hasta el PTV modificado que forma parte de la interfase. El caudal de inyección utilizado fue de 0,3 ml/min. El tiempo de inyección fue de 6 minutos, que es el tiempo necesario para que, a dicho caudal, toda la disolución de trabajo haya llegado al material de retención de la camisa de vidrio atravesando todos los tubos y capilares comprendidos entre la válvula de inyección y el PTV modificado que forma parte de la interfase. El helio empujó la muestra a través del adsorbente quedando los analitos retenidos y el disolvente enviado al desecho.

10  $\diamond$  *Derivatización.* Una vez transcurridos 5 minutos de la etapa anterior, la válvula que contenía el agente derivatizante giró y éste fue arrastrado, igualmente, por el eluyente hasta ser introducido en la camisa de vidrio, donde se encontraban los compuestos retenidos en el adsorbente. El agente derivatizante fue empujado por el mismo disolvente empleado para preparar la disolución de trabajo. Se tarda 1 minuto en introducir el reactivo derivatizante. El caudal utilizado para empujar el agente derivatizante fue de 0,3 ml/min.

15  $\diamond$  *Eliminación de los restos de disolvente.* Una vez que terminó la introducción del agente derivatizante, la válvula de seis vías volvió a girar automáticamente de manera que el disolvente empujado por la bomba de HPLC se envió de nuevo al desecho. El disolvente que permanecía en el tubo de transferencia también fue empujado al desecho por el caudal de helio. Estas condiciones se mantuvieron durante dos minutos para asegurar la completa eliminación de los restos de disolvente y del exceso de agente derivatizante, tanto del PTV modificado que forma parte de la interfase TOTAD como del tubo de transferencia.

20  $\diamond$  *Desorción térmica.* Después de la eliminación del disolvente se cerraron las válvulas de apertura y cierre de la interfase. Se interrumpió el flujo de helio que atravesaba el adsorbente y se cambió el flujo por la otra entrada a 1,8 ml/min. El PTV modificado de la interfase TOTAD se calentó rápidamente hasta 300°C, manteniéndose esta temperatura durante 5 minutos para asegurar la desorción de los solutos retenidos, que fueron transferidos a la columna de cromatografía de gases.

### 30 *Condiciones de GC*

Durante las etapas de inyección y de eliminación de disolvente la temperatura del horno fue de 60°C. Durante el análisis, la temperatura del horno se mantuvo a 60°C durante 1 minuto, se calentó a 40°C/min hasta 190°C manteniéndose esta temperatura durante un minuto, después a 3°C/min hasta 245°C y por último a 17°C/min hasta 320°C, manteniéndose durante 20 minutos. La temperatura del detector FID fue de 325°C.

35 La Figura 2 muestra el cromatograma de gases obtenido, en el que se identifican los picos indicados. En la Figura 2a se observa el cromatograma cuando se lleva a cabo el análisis sin la etapa de reacción, mientras que en la Figura 2b se puede observar el cromatograma de gases cuando se lleva a cabo el procedimiento de la invención. Además del pico del disolvente (primer pico de la izquierda), en el cromatograma de la Figura 2a se pueden ver los picos correspondientes a la pentazocina y a la codeína, siendo este muy pequeño. La morfina no proporciona ningún pico porque este compuesto es termolábil, por lo que, sin derivatizar, se descompone. En la Figura 2b se pueden observar los picos correspondientes a los tres compuestos derivatizados que, como era de esperar, salen a distinto tiempo de retención al tratarse de compuestos distintos a los de la Figura 2a. Como puede observarse, aumenta la sensibilidad de la pentazocina y de la codeína, lo que permite determinar estos compuestos a menor concentración. No obstante, la ventaja fundamental es que la morfina, que no puede ser analizada sin llevar a cabo la etapa de derivatización, puede ser determinada cuando se lleva a cabo la reacción en las condiciones del proceso de la invención. Además, el proceso se ha llevado a cabo de modo automático, con un consumo muy bajo de muestra y de reactivo, y la reacción proporciona un rendimiento cuantitativo, como se deduce al comparar los cromatogramas de las figuras 2a y 2b, y comprobar que en el cromatograma de los productos de la reacción no se observan los picos correspondientes a los narcóticos sin derivatizar.

### 55 *Ejemplo 2*

*Análisis de colesterol por inyección de grandes volúmenes en GC empleando un inyector PTV, con sililación previa al análisis por GC*

#### 60 *Materiales*

El patrón de colesterol fue obtenido de Sigma-Aldrich, (Steinheim, Alemania).

El agente derivatizante empleado fue MFSTA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida), que fue obtenido de Supelco (Bellefonte, PA, Estados Unidos).

65 El hexano usado como disolvente fue de grado HPLC (LabScan, Dublín, Irlanda).

## ES 2 364 631 A1

Como material de retención dentro de la camisa de vidrio en el PTV se usó Volaspher A2 80-100 mesh (Merck, Darmstadt, Alemania). Se colocó 1,2 cm de Volaspher A2, sujeto a ambos lados por lana de vidrio y se acondicionó bajo una corriente de helio, aumentando la temperatura 5°C/min hasta 350°C y manteniendo esta temperatura final durante una hora.

Se prepararon dos disoluciones patrón del colesterol en hexano. La primera contenía el colesterol a 1000 mg/l, y la segunda, preparada por dilución de la primera, contenía el colesterol a 100 mg/l. Dichas disoluciones se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### *Instrumentación*

Los análisis se realizaron por inyección de grandes volúmenes en GC empleando un PTV, con derivatización en línea previa al análisis por GC.

El cromatógrafo de gases fue Perkin Elmer Clarus 500 (Shelton, Estados Unidos) equipado con un PTV y un detector FID (detector de ionización de llama).

El software usado para obtener y procesar los datos fue el TotalChrom Workstation Versión 6.3.1.

La columna utilizada en cromatografía de gases tenía la fase estacionaria 50% Fenil Metilpolisiloxano, una longitud de 30 m, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de película de fase (Elite-17, Perkin Elmer, Shelton, Estados Unidos). Como gas portador se empleó nitrógeno.

### *Modo de operación*

Durante las diferentes etapas de operación, las condiciones usadas fueron:

◇ *Etapa 1.* El horno se mantuvo a 100°C, al igual que el inyector PTV que se encontraba a 100°C para permitir la evaporación del disolvente. Se puso una relación de división de flujo 50:1, con un caudal por columna de 1 ml/min (y eliminando 50 ml/min a través de la salida de división de flujo). Se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  de la disolución de colesterol, empleando para ello una jeringa de 10  $\mu\text{l}$ . El colesterol quedó retenido en el interior de la camisa de vidrio y el disolvente se eliminó a través de la salida de división de flujo en casi su totalidad. Este proceso duró 1 minuto.

◇ *Etapa 2.* Una vez evaporado el disolvente se procedió a la inyección del agente derivatizante MFSTA (n-metil-n-trimetilsililtrifluoroacetamida). Se inyectaron 10  $\mu\text{l}$  de forma lenta (30 segundos) empleando una jeringa. Se reguló el flujo en columna a 0,5 ml/min durante 30 segundos con relación de división de flujo 1:1, y posteriormente se cerró el flujo de helio durante 3 minutos con objeto de conseguir que el reactivo derivatizante estuviera en contacto con el colesterol retenido y se produjera la reacción.

◇ *Etapa 3.* Las temperaturas de la camisa de vidrio y del horno se mantuvieron. Se cambió el flujo por columna a 1 ml/min, y la relación de división de flujo a 100:1, con el fin de eliminar los restos de disolvente y el exceso de reactivo derivatizante, pero manteniendo retenidos los productos de la reacción. En estas condiciones se mantuvo el sistema durante dos minutos.

◇ *Etapa 4.* Se cerró la válvula de división de flujo, se inició la rampa de calentamiento del inyector PTV hasta 300°, con lo que el colesterol derivatizado pasó a la columna cromatográfica y se llevó a cabo la determinación.

### *Condiciones de GC*

Durante las etapas de inyección y de eliminación de disolvente la temperatura del horno fue de 100°C. Durante el análisis, la temperatura del horno se mantuvo a 100°C durante 2 minutos, se calentó a 30°C/min hasta 290°C manteniéndose esta temperatura durante diez minutos. La temperatura del detector FID fue de 350°C.

La Figura 3 muestra los cromatogramas de gases obtenidos, El cromatograma de la Figura 3a corresponde al análisis del colesterol cuando se lleva a cabo el análisis sin la etapa de reacción, mientras que en la Figura 3b se puede observar el cromatograma de gases cuando se lleva a cabo el procedimiento de la invención, en el que se puede ver el pico correspondiente al trimetilsililderivado del colesterol.

Se puede ver que en la Figura 3b no aparece pico alguno correspondiente al colesterol sin derivatizar, lo que indica que la reacción es cuantitativa. Asimismo, se puede ver que el colesterol derivatizado se eluye de la columna cromatográfica a un tiempo menor (menor tiempo de retención), lo que indica que, como era de esperar, el colesterol derivatizado es más volátil que el colesterol sin derivatizar. También se puede ver que el pico correspondiente al colesterol derivatizado se aproxima más a la ideal forma gaussiana de los picos cromatográficos, que era, en este caso, el objetivo perseguido al llevar a cabo la reacción de derivatización.

## ES 2 364 631 A1

Así pues, puede concluirse que el procedimiento de la invención ilustrado en estos ejemplos es un método sencillo, reproducible, fiable, con menos manipulación de la muestra, y que proporciona resultados cuantitativos coherentes y con una repetibilidad satisfactoria.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para llevar a cabo reacciones en un proceso de análisis mediante cromatografía de gases que comprende las etapas de:

(a) depositar el analito en el interior de una camisa de vidrio alojada en un sistema de inyección de cromatografía de gases que permita programar la temperatura;

10 (b) hacer reaccionar dicho analito con un reactivo adicionado a tal fin en dicho sistema de inyección; y

(c) transferir el producto de reacción obtenido en (b) para su análisis por cromatografía de gases;

15 **caracterizado** porque la camisa de vidrio alojada en el sistema de inyección comprende un material de retención donde se lleva a cabo la reacción de la etapa (b).

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el sistema de inyección es un inyector PTV (vaporizador con temperatura programable).

30 3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el sistema de inyección es una interfase TOTAD (Through Oven Transfer Adsorption Desorption).

25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque en la etapa (a) se emplea una técnica de introducción de grandes volúmenes en cromatografía de gases.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende una etapa previa de cromatografía de líquidos de alta eficacia.

30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el material de retención situado en el interior de la camisa de vidrio alojada en el sistema de inyección se selecciona de entre materiales inertes, materiales adsorbentes y materiales absorbentes.

35 7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el material de retención situado en el interior de la camisa de vidrio alojada en el sistema de inyección se selecciona de entre fibra de vidrio, volaspher, chromosorb, tenax, carbón activo, gaschrom, polidimetilsiloxano sobre volaspher, OV-17 sobre volaspher y polietilenglicol sobre chromosorb.

40 8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la reacción de la etapa (b) es una derivatización.

45 9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el reactivo derivatizante se selecciona de entre hexametildisilazano, trimetilclorosilano, N,O-bis(trimetilsilil)acetamida, N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro-acetamida, N-trimetilsililimidazol, clorometildimetil-clorosilano, N-metil-N-trimetilsililheptafluoroamida, dimetilclorosilano, N-metil-N-trimetilsililtrifluoro-acetamida, N-trifluoroacetilimidazol, N-heptafluorobutirilimidazol, N-metil-bis(trifluoroacético), pentafluoropropanol, anhídrido heptafluorobutírico, anhídrido pentafluoropropiónico, anhídrido trifluoroacético, N,N-dimetilformamida dimetil acetal, hidróxido de trimetilnilina, trifluoruro de boro, metóxido sódico y mezclas de los mismos.

50 10. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra que comprende el analito es de origen biológico.

11. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la reacción de la etapa (b) se efectúa a una temperatura de 10-200°C durante un tiempo de 0,1 min a 5 horas.

55 12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la reacción de la etapa (b) se efectúa a una temperatura de 125°C durante un tiempo de 1 min.

60 13. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las etapas (a) a (c) son totalmente automáticas.

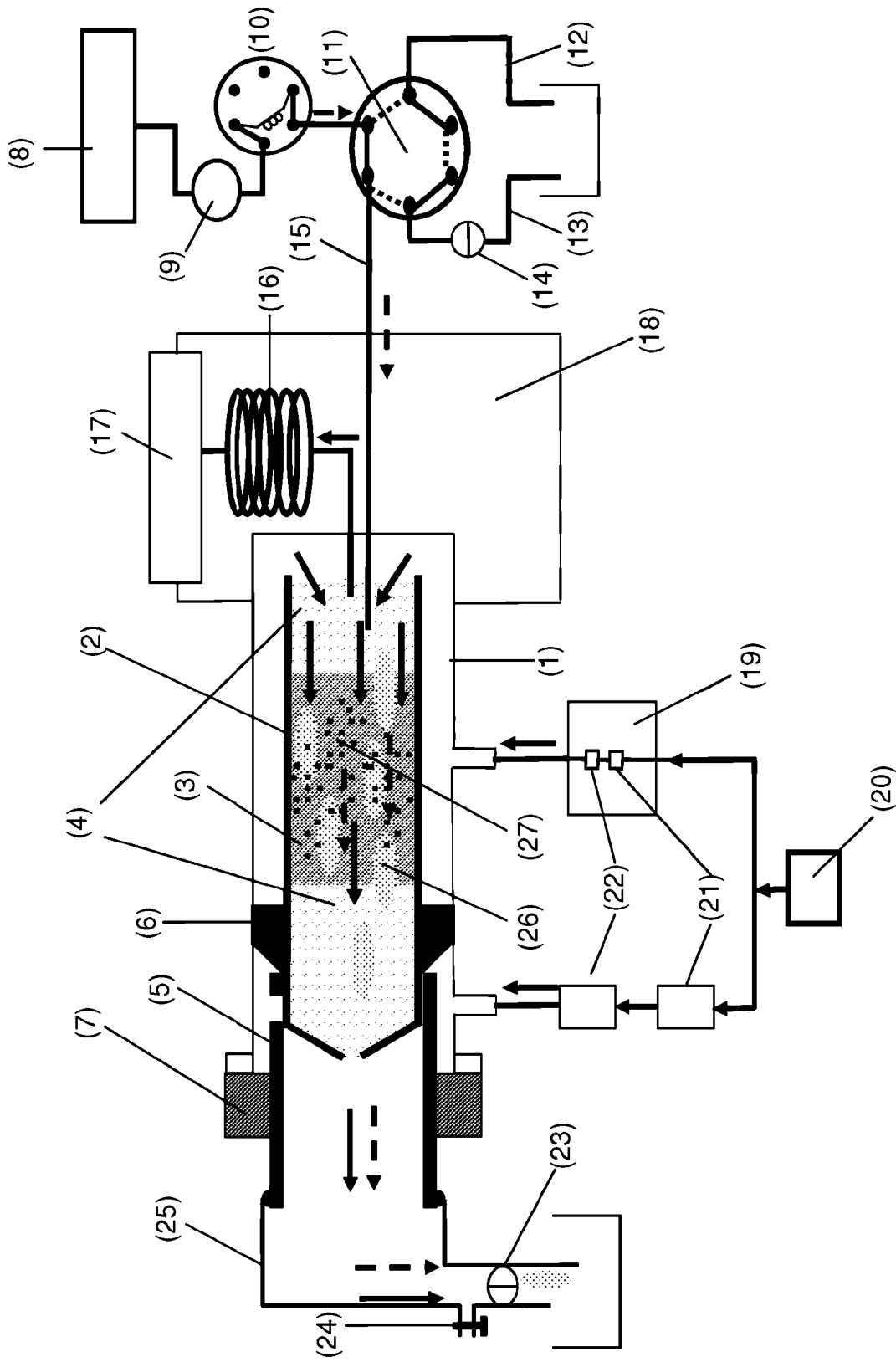


Fig. 1



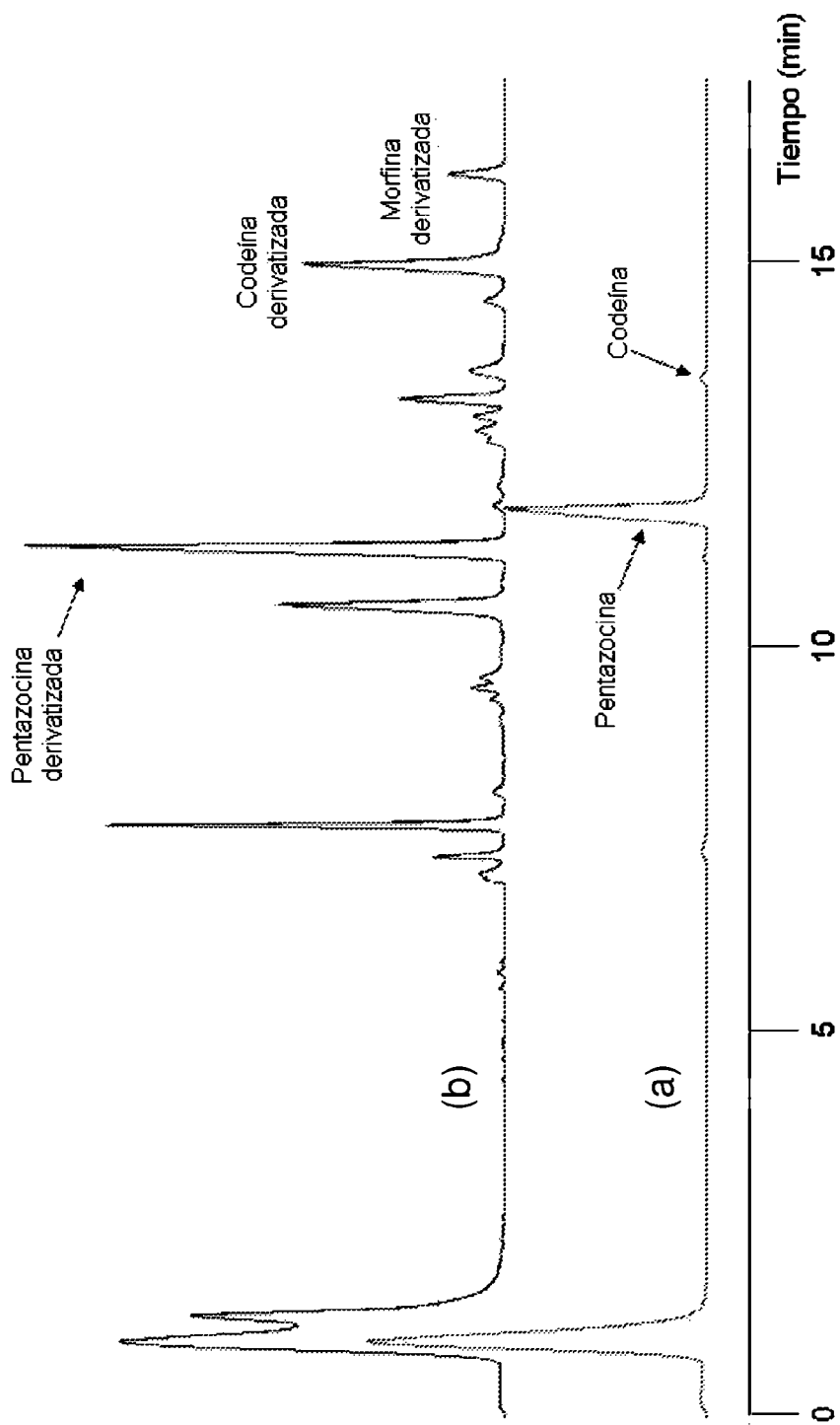


Fig. 2

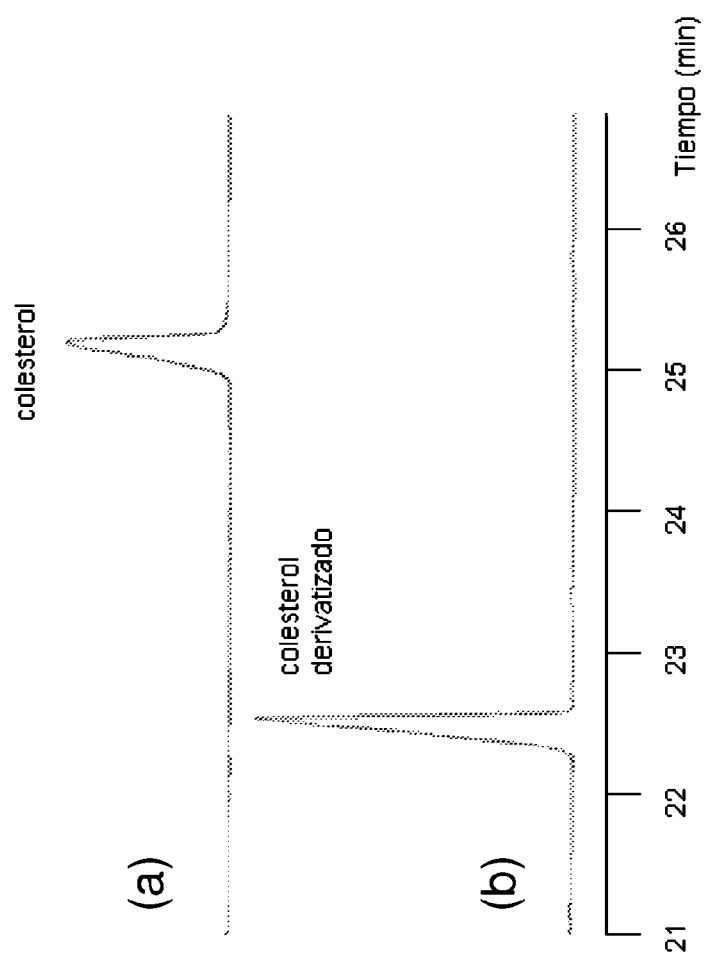


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030287

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.02.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HOH E., MASTOVSKA K. "Large volume injection techniques in capillary gas chromatography." Journal of Chromatography. Vol. 1186 (2008) pages 2-15.	1-13
A	CORTÉS J. M., SÁNCHEZ R., DIAZ-PLAZA E. M., VILLÉN J., AND VÁZQUEZ A. "Large volume GC injection for the analysis of organophosphorus pesticides in vegetables using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface." J. Agric. Food. Chem. (2006) Vol. 54, pages 1997-2002.	1-13
A	ALARIO J., PÉREZ M., VÁZQUEZ A., AND VILLÉN J. "Very-large-volume sampling of water in gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface for pesticide-residue analysis." Journal of Chromatography Science (2001) Vol. 39, pages 65-69.	1-13

#### 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  
31.03.2011

Examinador  
M. García Bueno

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**B01D15/08** (2006.01)

**B01D15/18** (2006.01)

**G01N30/46** (2006.01)

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

B01D, G01N

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, TXTE, TXTF, NPL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.03.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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 se publica.

**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	HOH E., MASTOVSKA K. "Large volume injection techniques in capillary gas chromatography." Journal of Chromatography. Vol. 1186 (2008) pages 2-15.	2008
D02	CORTÉS J. M., SÁNCHEZ R., DIAZ-PLAZA E. M., VILLÉN J., AND VÁZQUEZ A. "Large volume GC injection for the analysis of organophosphorus pesticides in vegetables using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface." J. Agric. Food. Chem. (2006) Vol. 54, pages 1997-2002.	2006
D03	ALARIO J., PÉREZ M., VÁZQUEZ A., AND VILLÉN J. "Very-large-volume sampling of water in gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface for pesticide-residue analysis." Journal of Chromatography Science (2001) Vol. 39, pages 65-69.	2001

**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 presente solicitud de invención consiste en un procedimiento para llevar a cabo reacciones en un proceso de análisis mediante cromatografía de gases que comprende depositar el analito en el interior de una camisa de vidrio alojada en un sistema de inyección de cromatografía de gases que permita programar la temperatura, hacer reaccionar dicho analito con un reactivo adicionado en dicho sistema de inyección y transferir el producto de reacción obtenido para su análisis por cromatografía de gases en el que la camisa de vidrio alojada en el sistema de inyección comprende un material de retención donde se lleva a cabo la reacción mencionada (reivindicaciones 1-13).

El documento D01 divulga técnicas de inyección de grandes volúmenes que pueden servir como interfaz para la conexión en línea de una cromatografía de gases con una cromatografía líquida. Los métodos más comunes son aquellos que utilizan un vaporizador de temperatura programada (PTV) e incluyen también nuevas técnicas como TOTAD (ver resumen, páginas 2-3, 5-7 y 10, figura 9 y tabla 1).

El documento D02 divulga un método para la determinación de los plaguicidas organofosforados en vegetales. Los análisis son realizados con grandes volúmenes de inyección en cromatografía de gases a través de TOTAD y utilizando también un inyector PTV (ver resumen y página 1998).

El documento D03 divulga la utilidad de la interfaz TOTAD para introducir directamente grandes cantidades de agua en una cromatografía de gases utilizando un inyector PTV (ver resumen, páginas 65-67 y figuras 1 y 2).

1.- NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6 y 8 de Ley 11/1986).

1.1.- REIVINDICACIONES 1-13.

Ninguno de los documentos citados o cualquier combinación relevante de ellos revela el procedimiento para llevar a cabo reacciones en un proceso de análisis mediante cromatografía de gases con las etapas y características técnicas reivindicadas en la reivindicación 1 de la presente solicitud de invención.

Por lo tanto, los documentos D01-D03 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia las reivindicaciones 1-13 de la presente solicitud de invención son nuevas y se considera que implican actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.