

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 861**

51 Int. Cl.:

B01D 61/38 (2006.01)

G01N 1/40 (2006.01)

G01N 1/34 (2006.01)

B01D 61/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06769424 .0**

96 Fecha de presentación: **30.06.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1907104**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Procedimiento para la migración electrocinética a través de membranas líquidas**

30 Prioridad:

30.06.2005 NO 20053226

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73 Titular/es:

PEDERSEN-BJERGAARD, STIG (50.0%)

Neptunvn 25K

0493 Oslo, NO y

RASMUSSEN, KNUT EINAR (50.0%)

72 Inventor/es:

PEDERSEN-BJERGAARD, STIG y

RASMUSSEN, KNUT EINAR

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 861 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

Procedimiento para la migración electrocinética a través de membranas líquidas

Campo de la invención.

5 La presente invención se refiere a nuevos procedimientos para el aislamiento, la purificación, la concentración y/o el enriquecimiento de un compuesto orgánico o bioquímico por medio de migración electrocinética, así como a un dispositivo para ser usado en dicho procedimiento.

Fundamento de la invención.

10 La química orgánica y la bioquímica analíticas se enfrentan con el problema de proporcionar un compuesto que ha de ser detectado en una solución que es adecuada para la detección por uno o más de los métodos conocidos comúnmente. Un problema puede ser que el compuesto aparece en una mezcla compleja a partir de la cual debe ser aislado. Otro problema puede ser que el compuesto puede estar presente en una concentración muy baja. Un problema más puede ser que la muestra que incluye el compuesto que se ha de detectar es muy pequeña.

15 Por tanto, se han desarrollado muchos métodos diferentes para separar, aislar, concentrar y purificar compuestos orgánicos. Estos son procedimientos bien conocidos por los profesionales expertos en la técnica, y ejemplos de ellos son la extracción en dos fases (por ejemplo, fase acuosa-fase orgánica), y extracciones en 3 fases (por ejemplo, fase acuosa-fase orgánica-fase acuosa).

20 Por el documento WO0033050 se conocen métodos y aparatos para la microextracción en 2 fases líquidas y en 3 fases líquidas para obtener un enriquecimiento elevado de un analito en la solución de aceptor. Sin embargo, el procedimiento de microextracción se basa en la difusión del analito y este es un proceso lento. Además, la concentración final de analito que puede alcanzarse depende de las condiciones de equilibrio para cada uno de los sistemas de 2 fases, y puede tener como resultado rendimientos muy bajos, si es que hay alguno.

Aun cuando los procedimientos antes mencionados han sido automatizados, todavía requieren mucho tiempo y generan una gran cantidad de residuos de disolventes orgánicos.

25 Para mejorar el tiempo necesario para este tipo de procedimientos de aislamiento, ha constituido un desarrollo adicional la introducción de la migración electrocinética. Es bien sabido que las sustancias químicas y bioquímicas ionizadas migran en solución bajo la aplicación de una diferencia de potencial eléctrico. Este tipo de transporte, que se denomina migración electrocinética, es la base para la electroforesis y se utiliza también ampliamente con fines de aislamiento, tanto en aplicaciones industriales (purificación) como en el campo de la química analítica (preparación de una muestra).

30 Con frecuencia, el aislamiento basado en la migración electrocinética se lleva a cabo en un sistema acuoso de una fase. Un ejemplo importante de esto es la electrodiálisis, en la que las sustancias químicas ionizadas son transferidas desde un compartimento del donador acuoso, a través de los poros de una membrana de intercambio iónico llena con el mismo medio acuoso, y en un compartimento aceptor acuoso. En la electrodiálisis, la selectividad de la migración, que es responsable de aislamiento, se consigue por la presencia de pequeños poros en la membrana polimérica, que impiden que las moléculas más grandes entren en el compartimento aceptor. La electrodiálisis es un importante procedimiento industrial de purificación y de desalinización, y también se ha descrito como una técnica de preparación de muestras en química analítica (1-4). Sin embargo, las membranas de intercambio iónico utilizadas en los procedimientos de electrodiálisis se contaminan fácilmente y deben ser reemplazadas con frecuencia.

40 La migración electrocinética se ha realizado también (23-24) en un dializador de 5 compartimentos con dos electrodos de platino y una membrana de intercambio aniónico rígida, donde se demostró que los iones níquel podían atravesar dos barreras de dos fases. El trabajo publicado se ha enfocado sobre la teoría de la migración fundamental de los iones níquel en un sistema con membranas de disolvente orgánico relativamente gruesas ($\approx 0,2$ cm).

45 Existe la necesidad de procedimientos nuevos mejorados y de dispositivos para el aislamiento, la purificación, el enriquecimiento y/o la concentración de un compuesto orgánico a partir de una solución, en los que el compuesto orgánico está presente en una mezcla compleja o en bajas concentraciones. Existe además la necesidad de nuevos procedimientos que den un elevado rendimiento del compuesto orgánico requerido. También existe la necesidad de nuevos procedimientos que hagan posible conseguir una elevada pureza, y, finalmente, pero de forma no menos importante, está la necesidad de nuevos procedimientos por los cuales la etapa de aislamiento o purificación tiene lugar mucho más rápidamente. También, existe la necesidad de nuevos procedimientos en los que se haya resuelto el problema medioambiental de la gran cantidad de disolventes orgánicos residuales.

50

Sumario de la invención.

Estos problemas se resuelven por medio de la presente invención a través de los procedimientos y dispositivos según esta invención, como se define en las reivindicaciones anexas.

Así, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un dispositivo, que comprende

5 una primera solución de donante hidrófilo, que tiene un pH preestablecido, que comprende al menos un compuesto orgánico ionizado o parcialmente ionizado

y una segunda solución de aceptor hidrófilo que tiene un pH predeterminado;

10 una membrana líquida que comprende un disolvente orgánico inmovilizado, la cual membrana se pone en contacto fluido tanto con dicha solución de donante como con dicha solución de aceptor, de forma que separa dicha solución de donante y dicha solución de aceptor, y a través del cual disolvente orgánico puede pasar una corriente y dicho al menos un compuesto orgánico ionizado;

un primer electrodo que se ha de poner en contacto con la solución de donante;

un segundo electrodo que se ha de poner en contacto con la solución de aceptor;

y una fuente de voltaje para aplicar un voltaje sobre dichos electrodos.

15 La invención proporciona además un procedimiento para la migración electrocinética de un compuesto orgánico en un sistema de 3 fases, que comprende las etapas de

proporcionar una primera solución de donante hidrófilo que comprende al menos un compuesto orgánico que ha de ser transferido desde dicha solución de donante a una solución de aceptor;

20 ajustar opcionalmente el pH de dicha solución de donante a un nivel en el que dicho compuesto orgánico se ioniza, bien sea positivamente o bien negativamente;

proporcionar una segunda solución de aceptor hidrófilo;

ajustar opcionalmente el pH de dicha solución de aceptor en un nivel en el que dicho compuesto se ioniza, para ser transferido de la solución de donante a la solución de aceptor;

25 proporcionar una membrana líquida que comprende un disolvente orgánico inmovilizado, que es sustancialmente inmiscible con el agua, a través de la cual puede pasar una corriente y dicho al menos un compuesto orgánico ionizado;

y poner dicha membrana en contacto fluido con dicha solución de donante y dicha solución de aceptor, de forma que separe dicha solución de donante y dicha solución de aceptor;

proporcionar un primer electrodo que se pone en contacto fluido con la solución de donante y un segundo electrodo que se pone en contacto fluido con la solución de aceptor;

30 aplicar un voltaje sobre dichos electrodos para promover la migración de dicho compuesto orgánico desde la solución de donante a través de la membrana líquida a la solución de aceptor.

La invención proporciona además un procedimiento para la concentración y/o el enriquecimiento de al menos un compuesto orgánico, que comprende las etapas de

35 proporcionar una primera solución de donante hidrófilo que comprende al menos un compuesto orgánico que ha de ser transferido desde dicha solución de donante a una solución de aceptor;

ajustar opcionalmente el pH de dicha solución de donante a un nivel en el que dicho compuesto orgánico se ioniza, bien sea positivamente o bien negativamente;

proporcionar una segunda solución de aceptor hidrófilo;

40 ajustar opcionalmente el pH de dicha solución de aceptor en un nivel el que se ioniza dicho compuesto que ha de ser transferido de la solución de donante a la solución de aceptor;

- proporcionar una membrana líquida que comprende un disolvente orgánico inmovilizado, que es sustancialmente inmiscible con el agua, a través de la cual puede atravesar una corriente y dicho al menos un compuesto orgánico ionizado;
- y poner dicha membrana en contacto fluido con dicha solución de donante y dicha solución de aceptor, de forma que separe dicha solución de donante y dicha solución de aceptor;
- 5 proporcionar un primer electrodo que se ha de poner en contacto fluido con la solución de donante y un segundo electrodo que se ha de poner en contacto fluido con la solución de aceptor;
- aplicar un voltaje sobre dichos electrodos para promover la migración de dicho compuesto orgánico desde la solución de donante a través de la membrana líquida a la solución de aceptor.
- 10 La invención proporciona además un procedimiento para preparar una muestra para análisis, que comprende las etapas de
- proporcionar una primera solución de donante hidrófilo que comprende al menos un compuesto orgánico que ha de ser transferido desde dicha solución de donante a una solución de aceptor;
- opcionalmente ajustar el pH de dicha solución de donante en un nivel en el que dicho compuesto orgánico es ionizado bien sea positivamente o bien negativamente;
- 15 proporcionar una segunda solución de aceptor hidrófilo;
- ajustar opcionalmente el pH de dicha solución de aceptor en un nivel en el que se ioniza dicho compuesto que ha de ser transferido desde la solución de donante a la solución de aceptor;
- proporcionar una membrana líquida que comprende un disolvente orgánico inmovilizado, que es sustancialmente inmiscible con agua, a través de la cual puede pasar una corriente y dicho al menos un compuesto orgánico ionizado;
- 20 y poner dicha membrana en contacto fluido con dicha solución de donante y dicha solución de aceptor, de forma que separe dicha solución de donante y dicha solución de aceptor;
- proporcionar un primer electrodo que se ha de poner en contacto fluido con la solución de donante y un segundo electrodo que se ha de poner en contacto fluido con la solución de aceptor;
- 25 aplicar un voltaje sobre dichos electrodos para promover la migración de dicho compuesto orgánico de la solución de donante a través de la membrana líquida a la solución de aceptor;
- opcionalmente ajustar el pH de la solución de aceptor para transferir dicho compuesto orgánico de un estado ionizado a uno no ionizado y/o transferir el compuesto orgánico a un disolvente orgánico,
- y detectar dicho compuesto orgánico mediante un sistema detector adecuado y/o comprobar la actividad biológica en un sistema de ensayo biológico.
- 30 La invención proporciona además un procedimiento para la purificación de una muestra, que comprende las etapas de
- proporcionar una primera solución de donante hidrófilo que comprende al menos un compuesto orgánico que ha de ser transferido desde dicha solución de donante a una solución de aceptor;
- ajustar opcionalmente el pH de dicha solución de donante a un nivel en el que dicho compuesto orgánico se ioniza bien sea positivamente o bien negativamente;
- 35 proporcionar una segunda solución de aceptor hidrófilo;
- opcionalmente ajustar el pH de dicha solución de aceptor a un nivel en el que es ionizado dicho compuesto que ha de ser transferido desde la solución de donante a la solución de aceptor;
- proporcionar una membrana líquida que comprende un disolvente orgánico inmovilizado, que es sustancialmente inmiscible con agua, a través de la cual puede pasar una corriente y dicho al menos un compuesto orgánico ionizado;
- 40 y poner dicha membrana en contacto fluido con dicha solución de donante y dicha solución de aceptor, de forma que separe dicha solución de donante y dicha solución de aceptor;

proporcionar un primer electrodo que se ha de poner en contacto fluido con la solución de donante y un segundo electrodo que se ha de poner en contacto fluido con la solución de aceptor;

aplicar un voltaje sobre dichos electrodos para promover la migración de dicho compuesto orgánico desde la solución de donante a través de la membrana líquida a la solución de aceptor;

- 5 opcionalmente aislar dicho al menos un compuesto orgánico mediante la eliminación o sustitución del disolvente, opcionalmente después de ajustar el pH de la solución.

Definiciones

10 Los procedimientos y el dispositivo de la presente invención son útiles para el aislamiento, la purificación, la concentración y/o el enriquecimiento de un compuesto orgánico en una muestra. En el contexto de esta solicitud, los términos aislar o aislamiento se utilizan generalmente cuando describen y definen características de dichos procedimientos y dispositivo, lo que también es válido para los procedimientos o dispositivos para la purificación, la concentración o el enriquecimiento de un compuesto orgánico de acuerdo con esta invención.

15 La expresión "compuesto orgánico" en el presente contexto tiene el significado habitual en la técnica. Especialmente, en el contexto de la presente solicitud, se entiende que la expresión "compuesto orgánico" especifica un compuesto orgánico que tiene una entidad ácida o básica. A través de tal entidad el compuesto puede ser transferido a su contrapartida iónica por medio del ajuste del pH de la solución de donante.

20 Se entiende además en el presente contexto que los compuestos orgánicos abarcan tanto los compuestos no biológicos como los biológicos. Son ejemplos de compuestos orgánicos no biológicos los productos farmacéuticos orgánicos, medicamentos, agentes colorantes, venenos, contaminantes, aditivos alimentarios y metabolitos de estos. Son ejemplos de un compuesto biológico de acuerdo con esta invención el DNA, proteínas, péptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos.

Se entiende que la expresión "solución de donante" especifica una solución que comprende al menos un compuesto orgánico en un disolvente hidrófilo, en el que dicho compuesto orgánico está en estado disuelto en dicho disolvente.

25 Además, la solución de donante puede ser una muestra tomada directamente de una fuente, en la que el compuesto orgánico está ya en estado disuelto en un disolvente hidrófilo. Esto puede ser por ejemplo una muestra biológica de uno de los fluidos biológicos de una persona, una muestra de agua de beber o de aguas residuales, una muestra de un proceso bioquímico, orgánico o de fermentación, preparativo o industrial. Son ejemplos de muestras biológicas la sangre, suero, orina, saliva, esputo, semen, lisado de células, fluido celular, leche materna o líquido cefalorraquídeo.

30 La solución de donante puede ser alternativamente una solución preparada a partir de una muestra disuelta mediante la dilución adicional con un disolvente hidrófilo adecuado.

Además, también se puede preparar una solución de donante a partir de una muestra no disuelta, tal como una muestra sólida o semi-sólida, por medio de la disolución de dicha muestra o partes de dicha muestra en un disolvente adecuado o una mezcla de disolventes adecuada, a partir de la cual puede prepararse una solución de donante de acuerdo con esta invención, directamente o por uno o más pasos intermedios.

35 La expresión "disolvente hidrófilo", como se usa en el contexto de esta solicitud, tiene el significado habitual en la técnica. Especialmente, se entiende que esta expresión especifica el agua o un disolvente orgánico hidrófilo o una mezcla de un disolvente hidrófilo y agua.

40 El disolvente hidrófilo es más preferentemente el agua. Sin embargo, el disolvente hidrófilo puede ser agua en mezcla con un disolvente orgánico hidrófilo, en la que el disolvente orgánico puede estar presente en el intervalo de 0% a 100% en peso, más preferentemente en el intervalo de 0 a 50% en peso, y aún más preferentemente de 0 a 20% en peso. Ejemplos de las adiciones de disolvente orgánico hidrófilo a una solución acuosa de donante pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% en peso.

45 El disolvente orgánico hidrófilo puede ser cualquier disolvente hidrófilo que disuelva el al menos un compuesto orgánico. Además, el disolvente orgánico hidrófilo es preferentemente miscible con el agua. Sin embargo, puede ser inmisible con el agua si se crea una única fase hidrófila a la concentración elegida de dicho disolvente orgánico inmisible con el agua en una solución de donante sustancialmente acuosa. Son ejemplos de disolventes orgánicos preferidos el metanol, etanol, acetonitrilo y DMSO.

50 La expresión "solución de aceptor" como se usa en el contexto de la presente solicitud es una solución hidrófila que es adecuada para aceptar un compuesto orgánico ionizado después de que dicho compuesto orgánico ionizado ha pasado a través de la membrana líquida.

- 5 Ambas, soluciones, la de donante y la de aceptor, han de tener un pH al cual el compuesto orgánico esté parcial o totalmente ionizado. Esto puede conseguirse mediante la adición de un ácido o una base adecuados, como es bien sabido en la técnica. Así, tal ácido adecuado es cualquier ácido que pueda ajustar el pH de la solución de donante en un nivel dentro del intervalo de pH 1 a 6, con lo que un compuesto orgánico que lleva un grupo básico se ioniza formando un catión. En correspondencia, tal base adecuada es cualquier base que pueda ajustar el pH de la solución de donante en un nivel dentro del intervalo de pH 8 a 14, con lo que un compuesto orgánico que lleve un grupo ácido se ioniza formando un anión. Ejemplos de ácidos adecuados son HCl, HBr, HCOOH, CH₃COOH, H₂SO₄ y H₃PO₄. Ejemplos de bases adecuadas son NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃ y NH₃.
- 10 Se entiende que la expresión "membrana líquida" tiene el significado habitual en la técnica. Especialmente, se entiende que la expresión membrana líquida especifica una fase orgánica inmovilizada fina. La delgadez de la membrana es esencial para conseguir una migración con éxito de una molécula orgánica ionizada a través de dicha membrana.
- El tamaño real de tal membrana líquida dependerá de varios factores, tales como el compuesto orgánico que se ha de aislar, el disolvente orgánico de la membrana líquida, la conductividad de dicho disolvente orgánico, y el voltaje aplicado.
- 15 El espesor de la membrana líquida está en el intervalo de 0,01 a 1000 µm, dependiendo del uso que se pretende hacer.
- Así, para la preparación de una muestra a escala de laboratorio, el espesor de la membrana está normalmente en el intervalo de 1 a 500 µm.
- Para su uso en la presente invención en sistemas de análisis de micro-chip, el espesor de la membrana estará normalmente en el intervalo de 1 a 300 µm, especialmente de 5 a 50 µm.
- 20 Para el aislamiento de compuestos orgánicos a partir de una célula individual, el espesor de la membrana estará presumiblemente en el intervalo de 0,01 a 10 µm, o de 0,05 a 1,0 µm.
- Para aislamientos, purificaciones y concentraciones o enriquecimientos a gran escala, tal como en procesos orgánicos, bioquímicos o de fermentación a escala industrial o preparativa, se considera que el espesor de las membranas líquidas esté en el extremo superior del intervalo, tal como de 100 a 1000 µm. Sin embargo, los procesos a gran escala de acuerdo con la presente invención pueden también realizarse con varios dispositivos pequeños de acuerdo con esta invención agrupados entre sí, y en este caso cada una de las membranas estará en el intervalo mencionado anteriormente para las preparaciones de muestras en escala de laboratorio.
- 25 La fase orgánica puede ser inmovilizada en cualquier estructura adecuada que no interfiera con dicha migración electrocinética, y en la cual el disolvente orgánico puede ser inmovilizado de forma estable a lo largo de la duración del proceso de migración electrocinética. La estructura ha de permitir también que una corriente eléctrica, así como dicho al menos un compuesto orgánico ionizado, atraviesen el disolvente orgánico inmovilizado en dicha estructura.
- 30 La forma más preferida de realizar la inmovilización es usando fibras huecas microporosas, en cuyos poros se inmoviliza un disolvente orgánico sumergiendo la fibra hueca en tal disolvente. Actualmente se dispone de una amplia gama de fibras huecas distintas. Una fibra hueca para ser usada en la presente invención ha de elegirse en consideración al disolvente orgánico a incluir en la membrana líquida, de forma que la fibra hueca elegida pueda inmovilizar el disolvente orgánico durante el tiempo necesario para el proceso de migración electrocinética en cuestión.
- 35 Los fibras huecas adecuadas para esta invención son fibras huecas tanto polares como no polares. Ejemplos de fibras huecas no polares son las fibras huecas de polipropileno, Teflon™ y polietileno.
- Los ejemplos de materiales porosos adecuados para la inmovilización de un disolvente orgánico incluyen poliolefinas, polímeros de sulfona tales como polisulfona o poliétersulfona, o poliacrilato, polímeros fluorados tales como poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), polímeros acrílicos, poliamidas o nilones, poliésteres, poliuretanos, policarbonatos, poliestirenos, poli(cloruros de vinilo), poliacrilonitrilos, o copolímeros de los mismos o mezclas de los mismos.
- 40 En una realización particularmente preferida, el polímero es una poliolefina, tal como polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE), poli(tetrafluoroetileno-coetileno), o copolímero de polietileno-poli(cloruro de vinilo).
- 45 Se mencionan también, por ejemplo, los documentos WO 02/088672 y WO 00/33050 para detalles acerca de las fibras huecas.
- Otra estructura de inmovilización para la membrana líquida es una película polimérica que puede hincharse en un disolvente orgánico. Tal película puede tener cualquier forma adecuada, como, por ejemplo, una lámina o un tubo. Ejemplos de tales películas poliméricas hinchables son las películas de polietileno o poliacrilato. La inmovilización de disolventes orgánicos se realiza sumergiendo dicha película polimérica en el disolvente orgánico y dejándola que se hinche.
- 50

Se entiende que la expresión "disolvente orgánico" en la membrana líquida como se usa en el contexto de la presente solicitud, tiene el significado habitual para un profesional experto en la técnica. Especialmente se entiende que la expresión disolvente orgánico significa cualquier disolvente orgánico que tiene una conductividad que permite que lo atraviese una corriente eléctrica así como un compuesto orgánico ionizado. En algunos casos esto puede conseguirse añadiendo al disolvente orgánico al menos un aditivo promotor de la conductividad.

Así pues, dicho disolvente orgánico debe ser un disolvente con una cierta polaridad o contenido de agua, con el fin de conseguir una conductividad suficiente y de asegurar la penetración en el campo eléctrico.

En una realización, dicho disolvente orgánico es distinto del disolvente de la solución de donante o de aceptor. Más preferentemente, dicho disolvente orgánico es inmiscible con el disolvente del donante y/o del aceptor, más preferentemente inmiscible con el agua.

Ejemplos de disolventes orgánicos adecuados para el aislamiento de sustancias alcalinas son nitrobenzono, 1-isopropil nitrobenzono, 2-nitrofenil octil éter, nitropentano, nitropropano, 1-etil-2-nitrobenzono y 2-nitrofenil pentiléter. Ejemplos de disolventes para el aislamiento de sustancias ácidas son octanol, heptanol, nonanol y decanol. Un ejemplo de disolvente orgánico especialmente adecuado es el 2-nitrofenil octil éter (NPOE).

La corriente eléctrica que atraviesa la membrana líquida puede ser en principio cualquier corriente eléctrica que no de lugar a procesos electrolíticos turbulentos. Se considera preferible que esté en el margen inferior de los microamperios, es decir, preferentemente menos de 100 μA , pero normalmente más de 0,01 μA .

Se entiende que la expresión "aditivo mejorador de la conductividad" como se usa en el presente contexto significa un agente que mejora la solubilidad del compuesto orgánico ionizado en la membrana líquida.

Los compuestos que tienen las propiedades correctas para un aditivo mejorador de la conductividad serán evidentes para un profesional experto en la técnica. Ejemplos de tales aditivos mejoradores de la conductividad son las aminas terciarias y los fosfatos, tales como N-trioctilamina y di(2-etil hexil)-fosfatos.

El agente mejorador de la conductividad puede ser añadido al disolvente orgánico de la membrana líquida en cualquier margen adecuado para conseguir una solubilidad y migración mejoradas de dicho compuesto orgánico. Normalmente, dicho agente mejorador de la conductividad será añadido en una cantidad en el intervalo de 0 a 50% en volumen del disolvente orgánico, tal como en el intervalo de 5 a 20% o de 10 a 30% en volumen.

Los electrodos cuyo uso es adecuado en la presente invención pueden ser cualquier electrodo disponible comercialmente.

El voltaje aplicado a dichos electrodos está normalmente en el intervalo de 0,01 V a 30.000 V; más preferentemente de 0,1 V a 10.000 V, incluso más preferentemente de 1 V a 1000 V, aún más preferentemente de 1 a 500V; y de forma especialmente preferente de 1 V a 300 V. Lo más preferido es que el voltaje aplicado sea un voltaje CC. En algunos casos el voltaje aplicado es un voltaje pulsado.

Puede añadirse al dispositivo un sistema para agitar al menos una de las soluciones, tal como la solución de donante o la solución de aceptor, o ambas. Tales medios deben ser cualquier medio adecuado conocido por los profesionales expertos en la técnica. Tales medios pueden ser, por ejemplo, medios de agitación o de sacudida.

Realizaciones.

Una realización de la presente invención es un procedimiento para la preparación de muestras en la escala analítica habitual. En tal realización, el tamaño de la muestra está normalmente en el intervalo de 10 μL a 1000 mL.

Otra realización es un procedimiento para el aislamiento de un compuesto orgánico en conexión con la síntesis orgánica preparativa o síntesis bioquímica. Otra realización es un procedimiento para la purificación de un compuesto orgánico en conexión con la síntesis orgánica preparativa o síntesis bioquímica. Otra realización es un procedimiento para la concentración y/o el enriquecimiento en un compuesto orgánico en conexión con la síntesis orgánica preparativa o síntesis bioquímica. En tales realizaciones el tamaño de la muestra estará normalmente en el intervalo de 1 mL a 10 L.

Una realización de la presente invención es un procedimiento para la concentración y/o enriquecimiento industriales de un compuesto orgánico, en el que el tamaño de la muestra es normalmente muy grande, por ejemplo de 100 L en adelante. En una realización para la concentración o el enriquecimiento industriales, la solución de donante se alimenta en continuo. En otra realización para la concentración o el enriquecimiento industriales, la solución de donante se alimenta intermitentemente, por ejemplo en función de la concentración del compuesto orgánico en la solución de aceptor que alcanza un cierto nivel. En otra realización más, tanto la solución de aceptor como la solución de donante se alimentan

continuamente o intermitentemente después de un tiempo preestablecido o cuando se ha alcanzado una cierta concentración del compuesto orgánico en la solución de aceptor.

5 Otra realización de la presente invención es un procedimiento para la purificación industrial de un compuesto orgánico, en el que el tamaño de la muestra es normalmente muy grande, por ejemplo de 100 L en adelante. En una realización para la purificación industrial, la solución de donante se alimenta en continuo. En otra realización para la purificación industrial, la solución de donante se alimenta intermitentemente, por ejemplo en función de la concentración del compuesto orgánico en la solución de aceptor que alcanza un cierto nivel. En otra realización más, tanto la solución de aceptor como la solución de donante se alimentan continuamente o intermitentemente después de un tiempo preestablecido o cuando se ha alcanzado una cierta concentración del compuesto orgánico en la solución de aceptor.

10 Otra realización es un procedimiento para la purificación de una muestra por eliminación del compuesto orgánico deseado, a la solución de aceptor. Otra realización es un procedimiento para la purificación de al menos un compuesto orgánico por eliminación de al menos un compuesto orgánico no deseado transfiriéndolo a la solución de aceptor.

15 Otra realización más es un procedimiento para el aislamiento industrial de al menos un compuesto orgánico deseado, en el que el tamaño de la muestra es normalmente muy grande, por ejemplo de 100 L en adelante. En una realización para el aislamiento industrial, la solución de donante se alimenta en continuo. En otra realización para el aislamiento industrial, la solución de donante se alimenta intermitentemente, por ejemplo en función de la concentración del compuesto orgánico en la solución de aceptor que alcanza un cierto nivel. En otra realización más, tanto la solución de aceptor como la solución de donante se alimentan continuamente o intermitentemente después de un tiempo preestablecido o cuando se ha alcanzado una cierta concentración del compuesto orgánico en la solución de aceptor.

20 Otra realización más de la invención es un procedimiento que comprende además una etapa en la que la solución de aceptor se usa para la detección cuantitativa y/o cualitativa del compuesto orgánico, opcionalmente después de ajustar el pH de la solución en un nivel en el que dicho al menos un compuesto orgánico es transferido a un estado no ionizado, y/o transfiriendo dicho compuesto orgánico a uno o más disolventes orgánicos. Tal detección puede incluir además una detección de la actividad biológica de dicho al menos un compuesto orgánico en un sistema de ensayo biológico. Otras realizaciones de la invención son dispositivos para su uso en los procedimientos de la presente invención. Una de estas realizaciones es un dispositivo para la preparación de muestras analíticas a escala de laboratorio; una segunda realización es un dispositivo para la purificación de una muestra procedente de un proceso orgánico preparativo; una tercera de estas realizaciones es un dispositivo para la purificación de una muestra procedente de un proceso bioquímico.

30 Otra realización más es un dispositivo para la concentración y/o el enriquecimiento de al menos un compuesto orgánico. Otra realización es un dispositivo para la concentración y/o el enriquecimiento en escala industrial de al menos un compuesto orgánico.

Otra realización es un dispositivo para el aislamiento de al menos un compuesto orgánico a partir de una célula individual.

35 Otra realización es un dispositivo para análisis de micro-chip, en el que un dispositivo de acuerdo con la presente invención se combina con un analizador de micro-chip.

La invención proporciona un dispositivo que comprende, en una primera característica, una solución de donante que es una solución sustancialmente acuosa.

40 En otra característica de esta invención la solución de donante es una solución acuosa que tiene una adición de un disolvente orgánico miscible con el agua en el intervalo de 0,1 a 50% en peso, especialmente de 1 a 20%; o de 2 a 10 o de 0,1 a 0.5%.

En otra característica más, la solución de donante es una solución sustancialmente no acuosa que comprende un disolvente orgánico hidrófilo.

En otra característica, dicho disolvente no acuoso de la solución de donante tiene una adición de una solución acuosa o de agua en el intervalo de 0,1 a 50% en peso, especialmente de 1 a 20%; o de 2 a 10 o de 0,1 a 0.5%.

45 En otra característica más, la solución de donante es una mezcla de una solución acuosa y una solución hidrófila no acuosa. En tales características la relación de solución acuosa a solución orgánica hidrófila de la mezcla está en el intervalo de 2:1 a 1:2, especialmente 1:1.

50 En otra característica de la invención, la solución de aceptor es una solución sustancialmente acuosa. En otra característica de la invención la solución de aceptor tiene una adición de disolvente orgánico miscible con el agua en el intervalo de 0,1 a 50% en peso, especialmente de 1 a 20%; o de 2 a 10 o 0,1 a 0.5%.

En otra característica más, la solución de aceptor es una solución sustancialmente no acuosa que comprende un disolvente orgánico hidrófilo.

En otra característica, la solución de aceptor tiene una adición de una solución acuosa o agua en el intervalo de 0,1 a 50% en peso, especialmente de 1 a 20%; o de 2 a 10 o de 0,1 a 0.5%.

5 En otra característica más de la invención, la solución de aceptor es una mezcla de una solución acuosa y una solución hidrófila no acuosa.

En tales características la relación de solución acuosa a solución orgánica hidrófila de la mezcla está en el intervalo de 2:1 a 1:2, especialmente 1:1.

10 La invención proporciona además un dispositivo en el que la solución de donante está comprendida en un primer compartimento y la solución de aceptor está comprendida en un segundo compartimento, y los dos compartimentos tienen volúmenes relativos de compartimento de donante a compartimento de aceptor en el intervalo de 10.000:1 a 1:100, o de 1000:1 a 1:10, más preferentemente 100:1 a 1:1. Tal dispositivo que tiene un compartimento de donante mucho mayor en comparación con el compartimento de aceptor es especialmente adecuado para concentrar y/o enriquecer al menos un compuesto orgánico en una muestra, en donde dicho al menos un compuesto orgánico aparece en una concentración muy baja en la solución de donante.

15 La invención proporciona además un dispositivo en el que la solución de donante está comprendida en un primer compartimento y la solución de aceptor está comprendida en un segundo compartimento, y los dos compartimentos tienen volúmenes relativos de 1:2 a 2:1, o 1:1. Tal dispositivo es especialmente adecuado para aislar o purificar al menos un compuesto orgánico, en casos en los que la concentración alcanzable del al menos un compuesto orgánico en la solución de aceptor es satisfactoria. Se considera que este puede ser el caso cuando el compuesto orgánico es un intermedio en un procedimiento preparativo orgánico o bioquímico. En tales casos la solución de aceptor puede seguir siendo sometida a una o más etapas de reacción para preparar un producto final deseado.

20 La invención proporciona además un dispositivo en el que las soluciones primera y segunda se ponen en uno o más compartimentos en donde al menos uno de dichos compartimentos son móviles en relación con el otro compartimento y/o con la membrana líquida. Lo más preferido es que el compartimento de la primera solución, es decir la solución de donante, sea móvil en relación con la membrana líquida.

Es especialmente preferido que un dispositivo de acuerdo con la presente invención tenga una membrana líquida desechable.

Descripción de las Figuras.

30 **Figura 1.** Ilustración esquemática de una realización para el aislamiento electrocinético en membrana transversal (electrokinetic cross-membrane isolation: ECMI), que tiene una membrana de forma tubular.

Figura 2. Ilustración esquemática de otra realización de un dispositivo de la invención que tiene una membrana plana.

35 **Figura 3.** Electroferogramas que demuestran el intenso efecto del voltaje sobre el transporte en membrana transversal: a) fase de aceptor al cabo de 5 minutos de ECMI a 300 V, b) fase de aceptor al cabo de 5 minutos de extracción sin voltaje y con pH 2 tanto en la solución de muestra como en la de aceptor, y c) fase de aceptor al cabo de 5 minutos de extracción sin voltaje y con pH 13 en la solución de muestra y pH 2 en el aceptor.

Figura 4. Efecto del tiempo sobre el transporte en membrana transversal.

Figura 5. Efecto del voltaje sobre el transporte en membrana transversal.

Figura 6. ECMI a partir de plasma y orina humanos.

40 **Figure 7.** Ilustración esquemática de una realización en la que un dispositivo de acuerdo con la presente invención es incorporado en una unidad de análisis de micro-chip.

Figure 8: Ilustración esquemática de un dispositivo de acuerdo con esta invención para su uso en la extracción directamente a partir de una célula individual.

45 En lo que sigue, la invención se aclarará mediante la discusión de experimentos realizados por sus autores. Esta sección experimental dará además una explicación detallada de algunas de las figuras mencionadas anteriormente.

Sección Experimental.

Aislamiento electrocinético en membrana transversal (ECMI).

El equipo usado para el aislamiento electrocinético en membrana transversal (ECMI) se ilustra en la Figura 1. El suministrador de potencia CC usado fue un modelo XFR 300-9 (Xantrex, Burnaby, BC, Canadá) con un voltaje programable en el intervalo de 0 a 300 V, que proporciona valores de la intensidad en el intervalo de 0 a 9 A. Se usaron como electrodos alambres simples de acero con un diámetro de 0,2 mm en las soluciones de muestra y de aceptor, y se conectaron a la fuente de potencia. Como compartimento de la muestra, se usaron frascos de 800 µL de polipropileno con tapón, con una altura de 35 mm y con un diámetro interior de 5,2 mm (suministrador desconocido). En algunos experimentos se utilizó un frasco de 1 ml de polipropileno con un diámetro interior de 7 mm. La fibra hueca porosa usada para la inmovilización de la membrana líquida artificial y para albergar la solución de aceptor era una fibra hueca PP Q3/2 de polipropileno (Membrana, Wuppertal, Alemania) con un diámetro interior de 1,2 mm, con un espesor de pared de 200 µm, y con poros de 0,2 µm. El ECMI se agitó a 1200 rpm durante los experimentos con un agitador Vibramax 100 (Heidolph, Kelheim, Alemania).

El ECMI se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento: se introdujeron 300 µl de solución de muestra acidificada en un frasco de polipropileno, y se puso en la muestra el electrodo positivo. Un trozo de 3,1 cm de fibra hueca de polipropileno se cerró en el extremo inferior mediante presión mecánica, mientras que el extremo superior se conectó a una punta de pipeta de 2,2 cm de longitud de polipropileno como tubo de guía. La fibra hueca y el tubo de guía se insertaron después a través del tapón del frasco de muestra. La fibra hueca se sumergió durante 5 s en el disolvente orgánico que sirve de membrana líquida artificial (típicamente 2-nitrofenil octil éter, nitrobenzono, 1-isopropil nitrobenzono, octanol o heptanol), y el exceso de disolvente se eliminó con una toallita médica. Con una microjeringa, se introdujeron 30 µL de solución de aceptor en la fibra hueca, y el electrodo negativo se puso en la solución de aceptor. Finalmente, la fibra hueca con la solución de aceptor se puso en la muestra y se aplicó voltaje (típicamente 300 V) durante 5 minutos. Después del aislamiento electrocinético en membrana transversal, la solución de aceptor se recogió con una microjeringa, y se transfirió a una microinserción para el instrumento de electroforesis capilar.

Electroforesis capilar.

Se llevó a cabo la electroforesis capilar con un instrumento MDQ (Beckman, Fullerton, CA, EE.UU.) equipado con un detector UV. Las separaciones se realizaron en un capilar de sílice fundida de 75 µm de diámetro interior con una longitud efectiva de 20 cm (Beckman). El tampón de desarrollo era fosfato 15 mM ajustado a pH 2,7 con ácido ortofosfórico. El instrumento se hizo funcionar a 20 kV, lo que generó un nivel de intensidad de aproximadamente 50 µA. Las muestras se introdujeron por inyección hidrodinámica a 3,45 KPa durante 5 s. La detección se realizó a 200 nm utilizando una rendija de 100 x 800 µm.

Reactivos.

El hidrocloreto de petidina, hidrocloreto de nortriptilina, hidrocloreto de metadona, haloperidol, hidrocloreto de loperamida, sulfato de anfetamina, sulfato de metanfetamina, hidrocloreto de hidralazina, hidrocloreto de metaraminol, cimetidina, sotadol, practolol y atenolol fueron obtenidos todos ellos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El 2-nitrofenil octil éter, dihexil éter, 2-octanona, aceite de silicona AS 4, y di(2-etilhexil)fosfato eran de Fluka (Buchs, Suiza). El 1-octanol y el acetato de dodecilo fueron adquiridos de Sigma, el queroseno era de Norsk Medisinaldepot (Oslo, Noruega), el aceite de haba de soja y el aceite de menta eran de una farmacia local. El ácido clorhídrico, el hidrógeno fosfato disódico dodecahidrato, y el dihidrógeno fosfato sódico monohidrato eran de Merck (Darmstadt, Alemania), y el ácido fórmico era de Fluka. El plasma humano se obtuvo del hospital Ullevål (Oslo, Noruega).

Soluciones patrón y muestras biológicas.

Se preparó una solución madre que contiene 1 mg/mL de cada uno de los productos petidina, nortriptilina, metadona, haloperidol y loperamida en etanol y se almacenó a -20°C al abrigo de la luz. Se prepararon soluciones de muestra (en agua pura) por dilución de esta solución madre mediante HCl 10 mM. Esta solución madre se utilizó también para añadirla a las muestras de plasma humano y orina.

Cálculo de la recuperación y el enriquecimiento.

La recuperación (R) durante el aislamiento con membrana transversal se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación para cada analito:

$$R = n_{a,final} / n_{s,inicial} \times 100\% = (V_a/V_s) (C_{a,final} / C_{s,inicial}) \cdot 100\% \quad (1)$$

en la que $n_{s,inicial}$ y $n_{a,final}$ son el número de moles de analito presente originalmente en la muestra y el número de moles de analito recogido finalmente en la solución de aceptor, respectivamente. V_a es el volumen de fase de aceptor, V_s es el

volumen de muestra, $C_{a,final}$ es la concentración final de analito en la fase de aceptor, y $C_{s,inicial}$ es la concentración inicial de analito en la muestra.

El enriquecimiento (E) durante el aislamiento con membrana transversal se calculó de acuerdo con la ecuación siguiente para cada analito:

$$E = C_{a, final} / C_{s, inicial} \quad (2)$$

Resultados y discusión.

Experimentos iniciales.

Los experimentos básicos se realizaron en un dispositivo para el aislamiento electrocinético con membrana transversal (ECMI) como se ilustra en la Figura 1. La solución de muestra (300 μ L), que se acidificó con HCl (pH \approx 2) antes del ECMI para ionizar los analitos básicos que interesan, o se alcalinizó con NaOH para ionizar los analitos ácidos que interesan, fue introducida en un pequeño tubo de polipropileno, y se puso un electrodo positivo en esta solución, y se conectó a la fuente de potencia. Una fibra hueca porosa de polipropileno, que fue sellada en el extremo inferior, fue bañada en 2-nitrofenil octil éter durante 5 segundos para inmovilizar el disolvente en los poros en la pared de la fibra hueca. Esta capa fina de disolvente orgánico sirvió de membrana líquida artificial, el volumen era aproximadamente 15 μ L, y el espesor era aproximadamente 200 μ m correspondiente al espesor de pared de la fibra hueca. Dentro de la luz de la fibra hueca, se inyectaron 30 μ L de una solución 10 mM de ácido clorhídrico en agua, que sirvió de solución de aceptor, y un electrodo negativo conectado a la fuente de potencia se puso en esta solución de aceptor. Finalmente, la fibra hueca se puso en la muestra, y se aplicaron 300 V sobre los electrodos durante 5 minutos. La solución de aceptor se recogió después de esto mediante una microjeringa y se transfirió para su análisis mediante electroforesis capilar. Se eligieron veinte fármacos básicos diferentes como analitos modelo, a saber: practolol, metaraminol, sotalol, atenolol, cimetidina, hidralazina, nortriptilina, anfetamina, metanfetamina, metadona, hidroxizina, petidina, mepiramina, prometazina, haloperidol, flufenazina, fenciclidina, clomipramina, loperamida y clemastina. Los analitos modelo tenían varios grados de hidrofobicidad como se demuestra por sus valores de log P (coeficientes de reparto 1-octanol/agua) en la Tabla 5.

En la Figura 3 se muestra un electroferograma de la solución de aceptor al cabo de 5 minutos de ECMI a 300 V. Esta Figura demuestra que cinco analitos modelo, petidina, nortriptilina, metadona, haloperidol y loperamida, fueron transportados eficazmente a través de la membrana líquida artificial y atrapados en la solución de aceptor cuando se aplicó una diferencia de potencial eléctrico. Los valores de la recuperación estaban en el intervalo de 70 a 79 %. En un segundo experimento (Figura 3b), la operación se repitió sin aplicar el voltaje. En este caso, la única fuerza impulsora para el transporte transversal en la membrana fue la difusión pasiva, y esto tuvo por resultado picos no detectables. Claramente, la diferencia de potencial eléctrico fue la fuerza impulsora en el ECMI, mientras que la difusión pasiva era indetectable. En otro experimento sin voltaje, el pH de la solución de muestra se ajustó en aproximadamente 13 para desionizar los analitos modelo, y la razón para ello fue optimizar su transporte transversal por la membrana por difusión pasiva.²⁵ Un electroferograma procedente de este experimento se muestra en la Figura 3c. En este caso, los valores de la recuperación para cuatro de los analitos modelo oscilaron en el intervalo entre 18 y 26 %, mientras que la loperamida no fue detectada. Este experimento demostró que incluso si se optimizaban las condiciones para el transporte transversal en la membrana basándose en la difusión pasiva, este procedimiento era significativamente menos eficaz que el transporte transversal en la membrana basado en la migración electrocinética con una diferencia de potencial eléctrico. En otras palabras, el ECMI parece ser una técnica de aislamiento muy rápida capaz de altas recuperaciones de analito.

Se encontró que la agitación de todo el sistema es importante para el transporte transversal en la membrana. Sin agitación, los valores de la recuperación para los cinco fármacos modelo estaban en el intervalo de 8 a 10 %, mientras que mejoraron hasta 70 a 79 %, como se mencionó antes, cuando se realizó la agitación a 1200 rpm. Esta velocidad de agitación fue el valor máximo obtenible con el actual sistema de agitación usado.

Interpretación teórica.

Sin desear vincularse a ninguna teoría, los autores de la presente invención consideran que lo que sigue es la base teórica del presente concepto de la invención: Para hacer posible el ECMI, el sistema completo que comprende la solución de muestra, la membrana líquida artificial, y la solución de aceptor, debe servir como circuito eléctrico. La principal resistencia eléctrica del sistema se enfocó en la membrana líquida artificial, y el disolvente usado aquí era crítico para asegurar la penetración de la energía eléctrica. Así, debe usarse un disolvente con una cierta polaridad o contenido de agua para dar una suficiente conductividad eléctrica, y para asegurar la penetración del campo eléctrico. Básicamente, el transporte transversal en la membrana de analitos modelo aumentó al disminuir la resistencia eléctrica de la membrana líquida artificial. Sin embargo, siempre y cuando la membrana líquida artificial y los analitos modelo fueran inertes a reacciones de electrodo, los siguientes procesos de electrodo ocurrieron en la muestra y en las soluciones de aceptor, respectivamente:

Solución de muestra: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{e}^-$

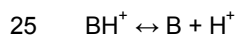
Solución de aceptor: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

Así pues, se generó O_2 y H_2 en los dos electrodos, y esta formación de burbujas aumentó al aumentar el flujo de corriente en el sistema (disminuyendo la resistencia eléctrica de la membrana líquida artificial). En otras palabras, para suprimir la sustancial formación de burbujas, la conductividad eléctrica de la membrana líquida artificial no debe ser muy elevada, sino más bien un compromiso entre la eficiencia del transporte y la tendencia a la formación de burbujas. El 2-nitrofenil octil éter entre otros pareció ser un compromiso exitoso en términos de conductividad eléctrica, y con este disolvente no se observó formación perjudicial de burbujas durante la inspección visual.

Ejemplo: Analitos básicos.

En la solución de muestra, el pH fue ajustado en el intervalo ácido para asegurarse de que los analitos modelo básicos (B) estaban totalmente protonados (BH^+). Al tener lugar la aplicación de la diferencia de potencial eléctrico, los analitos modelo protonados iniciaron su migración electrocinética desde la solución de muestra, y en dirección al electrodo negativo puesto en la solución de aceptor. En la solución acuosa de muestra, la fuerza del campo eléctrico (V/cm) era relativamente baja debido a la baja resistencia eléctrica de esta fase, si bien, dado que los analitos modelo estaban totalmente protonados, migraron rápidamente hacia la membrana líquida artificial. Esta rápida migración fue también favorecida usando un frasco de muestra fino que aseguraba una corta distancia de emigración hasta la membrana artificial. Los diferentes analitos modelo migraron con diferentes velocidades en la solución de muestra basándose en su relación de carga a tamaño, pero se esperaba que esto fuera solamente un factor minoritario responsable de las diferencias observadas en sus eficiencias de transporte individuales (valores de la recuperación).

En segundo lugar, los analitos modelo atravesaron la interfase hasta la membrana líquida artificial. En esta fase, la fuerza del campo eléctrico (V/cm) era alta debido a la elevada resistencia eléctrica del disolvente orgánico usado. A pesar de ello, su migración electrocinética estaba fuertemente reprimida en este medio a causa de la desprotonación de las sustancias básicas ocurrida en el medio no polar. En otras palabras, la migración dentro de la membrana líquida artificial estaba fuertemente controlada por el siguiente equilibrio:



Para los compuestos con un grado de desprotonación bajo, la migración electrocinética a través de la membrana artificial fue relativamente alta, mientras que los compuestos fuertemente desprotonantes mostraron una migración electrocinética muy baja y fueron eficazmente discriminados por la membrana líquida artificial. Se esperaba que este fenómeno fuese la razón principal para las diferencias observadas en las recuperaciones de extracción. Además, era también de esperar que las diferencias en las relaciones de carga a tamaño afecten a las eficacias de transporte individual en la membrana líquida artificial.

Optimización de la fase orgánica.

Con el fin de investigar más intensamente el sistema de ECMI, se realizaron experimentos con distintos disolventes orgánicos como membrana líquida artificial para optimizar esta parte del sistema. Los resultados para los experimentos realizados con los frascos de 5,2 mm se resumen en la Tabla 1. Como disolventes puros, se probaron 2-nitrofenil octil éter, dihexil éter, 1-octanol, 2-octanona, y acetato de dodecilo como candidatos a ECMI. El 2-nitrofenil octil éter proporcionó recuperaciones altas (70 a 79 %) para todos los analitos modelo, el 1-octanol tuvo como resultado recuperaciones bajas (3 a 7 %), mientras que no se observó transporte de analito a través del dihexil éter y el acetato de dodecilo. Con 2-octanona, se observó en algunos casos migración electrocinética, pero los resultados eran poco fiables, con una gran desviación estándar. Con el fin de mejorar la conductividad eléctrica de la membrana líquida artificial, se añadió un 5 % de di(2-etilhexil) fosfato al 2-nitrofenil octil éter, pero esto tuvo como resultado la disminución de las recuperaciones en comparación con el 2-nitrofenil octil éter puro.

Además de disolventes puros, los autores de la presente invención probaron también algunos aceites comerciales como membrana líquida artificial, como se muestra en la Tabla 1. El queroseno, el aceite de silicona (fenil-metil polisiloxano), y el aceite de soja fallaron todos ellos y no proporcionaron migración electrocinética de los analitos modelo, mientras que se observaron recuperaciones elevadas para 4 de los analitos modelo basadas en el uso de aceite de menta. Así, el aceite de menta pareció ser una interesante alternativa de química verde al 2-nitrofenil octil éter. Como el 2-nitrofenil octil éter proporcionó una alta recuperación para todos los analitos modelo estudiados, se usó este disolvente como membrana líquida artificial en el resto de este trabajo.

En un segundo experimento, la solución de donante de muestra contenía los 7 compuestos orgánicos siguientes en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$: anfetamina, metanfetamina, petidina, nortriptilina, metadona, haloperidol y loperamida. Es interesante que la recuperación para metanfetamina era solamente el 11 %, mientras que la recuperación para el compuesto anfetamina, estrechamente relacionado, era inferior al 1 %. Ambos compuestos son ligeramente más hidrófilos

que las sustancias fármaco discutidas anteriormente, y esto indica que la migración electrocinética a través de la membrana de NPOE era altamente selectiva.

5 En un tercer experimento, la membrana de NPOE fue modificada con los agentes mejoradores de la conductividad 5 % (p/p) de di(2-etilhexil) fosfato (DEHP) y 10 % (p/p) de tris(2-etilhexil) fosfato (TEHP). Con esta membrana, la Anfetamina y la metanfetamina fueron recuperadas eficazmente en la solución de aceptor con valores de recuperación de 85 y 77 % respectivamente al cabo de 5 minutos de operación. Por otra parte, las sustancias más hidrófobas fueron ahora discriminadas, y sus valores de recuperación bajaron significativamente. En un cuarto experimento, se añadieron 6 fármacos hidrófilos: hidralazina, metaraminol, cimetidina, sotalol, practolol y atenolol a la solución de donante, de forma que contenía cada uno de ellos en una concentración de 1 µg/ml. Con NPOE y NPOE modificado con 5 % de DEHP y 10 % de
10 TEHP, no se observó recuperación para los fármacos hidrófilos. Sin embargo, con una mezcla 1:1 (p/p) de NPOE y DEHP, los fármacos hidrófilos fueron eficazmente recuperados en la solución de aceptor con valores de recuperación entre 14 y 73 %. Así, la migración a través de la membrana líquida fue altamente selectiva, y la selectividad se ajustó fácilmente mediante modificaciones químicas de la membrana líquida.

15 Como otro ejemplo de la variación de la fase orgánica de la membrana líquida, la Tabla 5 resume experimentos realizados en los frascos de 7 mm y demuestra que los fármacos básicos polares son escasamente extraídos con 2-nitrofenil octil éter puro como fase orgánica, mientras que la adición de di-(2-etilhexil) fosfato proporcionó una fase orgánica eficaz para la extracción de fármacos básicos polares. Este hallazgo sugiere que la fase orgánica puede variarse para enfocar diferentes tipos de analitos.

20 La Tabla 6 resume el efecto de la adición de tris-(2-etilhexil) fosfato (TEHP) a la fase orgánica (2-nitrofenil octil éter) y apoya la Tabla 5. La Tabla 7 demuestra que la adición tanto de di-(2-etilhexil) fosfato como de tris-(2-etilhexil) fosfato (TEHP) a la fase orgánica (2-nitrofenil octil éter) puede dar lugar a una fase orgánica capaz de extraer al mismo tiempo tanto los fármacos básicos no polares como los polares.

Optimización del pH en la solución de aceptor.

25 En una segunda serie de experimentos para analitos básicos, diferentes tipos de solución de aceptores fueron evaluados en cuanto al comportamiento en el ECMI. Los resultados se resumen en la Tabla 2, e indicaron que el HCl 10 mM proporcionó las recuperaciones más elevadas. A medida que descendía la concentración de HCl, descendieron las recuperaciones. Es interesante indicar que también el ácido fórmico 10 mM sirvió como solución de aceptor eficaz para proporcionar resultados comparables con el HCl. Aunque se usó HCl 10 mM durante el resto de este trabajo, el ácido fórmico puede ser muy interesante en combinación con LC-MS, y para aplicaciones en las que los analitos son inestables en soluciones fuertemente ácidas. También se ensayaron diferentes tampones de fosfato con pH en el intervalo de 6,0 a 8,0, pero estos indicaron un pobre comportamiento. Con el pH en aumento, la migración electrocinética a la solución de aceptor se redujo debido a la desprotonación parcial de los analitos modelo, y la retrodifusión basada en el transporte pasivo desde el aceptor a la solución de muestra fue acelerada por la misma razón.

Optimización del pH en la muestra.

35 En un tercer experimento para analitos básicos, se ensayaron como muestra diferentes soluciones ácidas y soluciones tampón, y en todos los casos los analitos modelo fueron añadidos a estas soluciones a un nivel de concentración constante. Los resultados se resumen en la Tabla 3. Como se observa en la tabla, todas las soluciones de muestra diferentes proporcionaron recuperaciones relativamente elevadas, lo que indicaba que el pH en la muestra no era muy crítico para el proceso de ECMI. Sorprendentemente, incluso el tampón de fosfato a pH 8,0 dio recuperaciones elevadas, incluso cuando el valor del pH en este caso era próximo a los valores de pK_a para varios de los analitos modelo básicos. Lo más probablemente, esto apoyaba la discusión teórica anterior de que la migración electrocinética en la muestra, que se redujo a pH 8,0 debido a la desprotonación de los analitos modelo, no era el paso limitante que controla el transporte transversal en la membrana, y que las limitaciones del transporte en el sistema estaban asociadas con la membrana líquida artificial. Para el resto de este trabajo se utilizó HCl 10 mM como compartimento de la muestra.

45 Optimización del tiempo y el voltaje.

Para continuar la optimización del ECMI, la recuperación de los diferentes analitos modelo fue estudiada en función del tiempo de ECMI. Los resultados se resumen en la Figura 4. En general, las recuperaciones aumentaron al aumentar el tiempo de ECMI hasta 5 minutos, a partir de los cuales las recuperaciones se nivelaron o incluso disminuyeron al aumentar el tiempo de ECMI. La razón para el efecto de nivelación era, como ya se mencionó antes, que la migración electrocinética se equilibraba por retrodifusión a la solución de muestra debido a la inversión del gradiente de concentración. El ligero descenso de las recuperaciones después de un tiempo largo de ECMI era debido probablemente a imprecisiones experimentales o debido a una pequeña pérdida de membrana líquida artificial. Las recuperaciones para metadona y loperamida aumentaron muy rápidamente con el tiempo de extracción, mientras que los otros analitos modelo respondieron más lentamente. Lo más probablemente, el comportamiento observado de este último era el resultado de una estabilidad relativamente fuerte de sus especies protonadas dentro de la membrana líquida artificial, que a su
55

vez tuvo por resultado una migración electrocinética superior. Un experimento similar acerca de la recuperación en función del tiempo fue realizado para el transporte basado solamente en difusión pasiva, sin aplicación de la diferencia de potencial eléctrico y ajuste del pH de la muestra en aproximadamente 12. En este caso se requirieron de 30 a 45 minutos de extracción antes de que se nivelasen las recuperaciones de la extracción. Así pues, la velocidad de transporte a través de la membrana líquida artificial fue mejorada drásticamente al aplicar la diferencia de potencial eléctrico. Durante el resto de este trabajo, se eligieron 5 minutos como tiempo de ECMI.

En otro experimento se investigaron las recuperaciones en función de la diferencia de potencial eléctrico aplicada. Estos resultados se demuestran en la Figura 5. Para la petidina, el haloperidol, y la nortriptilina, se obtuvieron recuperaciones relativamente altas con tan solo 10 V como diferencia de potencial, pero las recuperaciones aumentaron más a medida que se aumentó el voltaje hasta el límite superior en 300 V para el suministro de potencia. En su forma protonada, la estabilidad en la membrana líquida artificial era relativamente escasa, y se hicieron necesarias diferencias de potencial eléctrico elevadas para favorecer la migración eficaz a través de la membrana artificial. En cambio, para la metadona y la loperamida, se obtuvo la recuperación más alta a 10 V, mientras que las recuperaciones disminuyeron ligeramente cuando el voltaje aplicado se aumentó hasta 300 V. Lo más probablemente, los últimos compuestos mostraron una estabilidad más alta que las especies protonadas en la membrana líquida artificial, y en consecuencia se precisaron diferencias de potencial eléctrico más bajas para una migración electrocinética efectiva. En el resto de este trabajo, se usó 300 V como diferencia de potencial.

La Tabla 9 demuestra que las extracciones pueden realizarse también a potenciales muy bajos (1 V) con nitrobenzono como fase orgánica. Puede haber varias ventajas al realizar el proceso a voltajes bajos en vez de a 300 V.

20 Características de rendimiento y validación.

Basándose en los experimentos discutidos anteriormente, el ECMI óptimo de los analitos modelo se obtuvo utilizando 2-nitrofenil octil éter como membrana líquida artificial, una solución de aceptor de HCl 10 mM, una solución de muestra que contiene HCl 10 mM, una diferencia de potencial de 300 V, y 5 minutos de tiempo de ECMI. En este caso, los analitos modelo fueron transferidos a la solución de aceptor con recuperaciones de 70 a 79 %. Dado que los analitos modelo fueron transferidos desde un volumen de muestra de 300 μ l a 30 μ l de solución de fase de aceptor, el enriquecimiento correspondiente (E) osciló dentro del intervalo entre 7,0 y 7,9.

Para evaluar la aplicabilidad práctica de la técnica de ECMI propuesta, se investigaron la repetibilidad y la linealidad utilizando soluciones patrón de los analitos modelo en HCl 10 mM. En un primer experimento, se estudió la repetibilidad ($n = 6$) a dos niveles de concentración diferentes (100 ng/ml y 1000 ng/ml). Como se ilustra en la Tabla 4, las desviaciones estándar relativas estaban en el intervalo de 4,6 a 10,5 % en el nivel de 100 ng/ml, y en el intervalo de 5,4 a 16,0 % en el nivel de 1000 ng/ml. La repetibilidad fue aceptable y comparable con valores publicados para procedimientos de extracción analítica miniaturizados.

Como validación preliminar final, se realizó el ECMI de 1 μ g/ml de metadona desde 1) HCl 10 mM puro, 2) HCl 10 mM que contiene 10 μ g/ml de petidina, y 3) HCl 10 mM que contiene 2 % (p/p) de NaCl. Los correspondientes valores de recuperación para la metadona fueron 77, 80 y 83 %, y, dentro de las imprecisiones experimentales del experimento, no se observó que el ECMI de la metadona estuviese afectado por la presencia de los componentes de la matriz antes mencionados.

La Tabla 8 expone los datos de la validación analítica para fármacos polares y no polares, que apoyan que el concepto puede ser usado con fines analíticos.

40 Compatibilidad con muestras biológicas.

Para finalizar la evaluación del ECMI, los analitos modelo fueron añadidos a muestras de plasma sanguíneo humano y orina. En ambos casos, se mezclaron 100 μ l de fluido biológico con 200 μ l de HCl 15 mM para dar una concentración final de HCl 10 mM en el compartimento de muestra. Subsiguientemente, las muestras fueron sometidas a ECMI con las mismas condiciones que se expusieron antes. La Figura 6 muestra los electroferogramas después del análisis de las soluciones de aceptor resultantes. Claramente, los analitos modelo fueron extraídos eficazmente incluso de muestras biológicas, y se encontró que el sistema era compatible con las muestras complicadas. Los resultados de la orina fueron comparables con resultados similares de soluciones de muestra puras HCl 10 mM. Así pues, en el caso de la orina, se encontró que la matriz de muestra no afectaba a las recuperaciones obtenidas. También para el plasma, las recuperaciones eran comparables con resultados similares de soluciones de muestra puras de HCl 10 mM, excepto para la nortriptilina, en la que los experimentos con plasma tuvieron como resultado recuperaciones ligeramente más bajas. Lo más probablemente, esto era consecuencia de la unión de proteína del fármaco.

Es interesante que muy pocos componentes de la matriz fueron observados en los correspondientes electroferogramas de orina y plasma libres de fármaco. Esto apoyaba que la mayoría de sustancias endógenas fueron eficazmente descri-

minadas o bloqueadas por la membrana líquida artificial, y a su vez sugiere que el ECMI puede ser un método de preparación de muestras altamente selectivo que produce extractos muy limpios.

Extracción de fármacos ácidos.

5 El dispositivo y el método de la presente invención pueden ser aplicados a cualquier compuesto orgánico capaz de ser parcial o totalmente ionizado. Así pues, para los fármacos ácidos se prefieren condiciones alcalinas en las soluciones de muestra y de aceptor. La solución de muestra se alcalinizó a pH 12 con NaOH. Se puso un electrodo negativo en la solución de muestra y se conectó a la fuente de potencia. La fibra hueca porosa se bañó en n-octanol durante 5 segundos para inmovilizar el disolvente en los poros de la fibra, y se añadió a la luz de la fibra NaOH 10 mM como solución de aceptor. La fibra hueca se puso en la muestra y el electrodo positivo se puso en la luz de la fibra. El electrodo positivo se conectó a la fuente de potencia y se aplicó un potencial de 15 V sobre los electrodos durante 5 min. La Tabla 10 expone el éxito de la extracción de los compuestos ácidos.

Conclusiones.

15 La presente invención ha demostrado por primera vez que la migración electrocinética a través de membranas líquidas artificiales puede ser un concepto muy poderoso para el aislamiento, el enriquecimiento y la purificación de sustancias farmacológicas a partir de muestras complicadas. Esta técnica se ha denominado aislamiento electrocinético por membrana transversal (ECMI). Comparada con la difusión pasiva, la migración electrocinética parecía ser un mecanismo de transporte mucho más eficaz, proporcionando elevadas recuperaciones de analito en tiempos muy cortos. Se encontró que el ECMI es compatible con muestras biológicas complicadas como el plasma y la orina humanos, y los datos preliminares de validación apoyaron que este concepto puede ser utilizado como técnica de preparación de muestras para medidas analíticas. En método de preparación de muestras de la presente invención proporciona un aislamiento muy rápido, simple y selectivo de sustancias químicas y bioquímicas a partir de muestras complicadas sin apenas consumo de disolventes orgánicos.

Tabla 1. Recuperación con diferentes membranas líquidas orgánicas. Recuperación (%)^a

| | Petidina | Nortriptilina | Metadona | Haloperidol | Loperamida |
|---|----------|---------------|----------|-------------|------------|
| 2-Nitrofenil octil éter | 70 | 70 | 79 | 72 | 76 |
| Dihexil éter | nd | nd | nd | nd | nd |
| 1-Octanol | 3 | 4 | 7 | 3 | 7 |
| 2-Octanona | * | * | * | * | * |
| Acetato de dodecilo | nd | nd | nd | nd | nd |
| 2-Nitrofenil octil éter + 5% de di(2-etilhexil) fosfato | 57 | 13 | 26 | 3 | 4 |
| Queroseno | nd | nd | nd | nd | nd |
| Aceite de silicona AS 4 | nd | nd | nd | nd | nd |
| Aceite de soja | nd | nd | nd | nd | nd |
| Aceite de menta | 13 | 73 | 73 | 78 | 79 |

^a(n = 3), las desviaciones estándar relativas eran todas inferiores al 15% de RSD
*Se observó recuperación pero los resultados eran poco fiables debido a las grandes desviaciones estándar.

Tabla 2 Recuperación con diferentes soluciones de aceptor. Recuperación (%)^a

| | Petidina | Nortriptilina | Metadona | Haloperidol | Loperamida |
|----------------------|----------|---------------|----------|-------------|------------|
| HCl 100 mM | 60 | 40 | 83 | 72 | 80 |
| HCl 10 mM | 70 | 70 | 79 | 72 | 76 |
| HCl 1 mM | 44 | 27 | 31 | 23 | 22 |
| HCOOH 100 mM | 56 | 70 | 63 | 52 | 61 |
| Fosfato 10 mM pH 6,0 | 24 | 24 | 26 | 9 | 15 |
| Fosfato 10 mM pH 7,0 | 19 | 8 | 9 | nd | 4 |
| Fosfato 10 mM pH 8,0 | nd | nd | nd | nd | nd |

^a(n = 3), las desviaciones estándar relativas eran todas inferiores al 15% de RSD

Tabla 3. Recuperación con diferentes composiciones de la solución de muestra. Recuperación (%)^a

| | Petidina | Nortriptilina | Metadona | Haloperidol | Loperamida |
|----------------------|----------|---------------|----------|-------------|------------|
| HCl 100 mM | 72 | 65 | 78 | 65 | 68 |
| HCl 10 mM | 70 | 70 | 79 | 72 | 76 |
| HCl 1 mM | 64 | 59 | 71 | 63 | 65 |
| HCOOH 100 mM | 68 | 69 | 76 | 69 | 73 |
| Fosfato 10 mM pH 6,0 | 61 | 57 | 73 | 58 | 57 |
| Fosfato 10 mM pH 7,0 | 63 | 62 | 71 | 58 | 49 |
| Fosfato 10 mM pH 8,0 | 63 | 60 | 72 | 60 | 50 |

^a(n = 3), las desviaciones estándar relativas eran todas inferiores al 15% de RSD

| | Petidina | Nortriptilina | Metadona | Haloperidol | Loperamida |
|----------------------------------|----------|---------------|----------|-------------|------------|
| Recuperación (%) | 70 | 70 | 79 | 72 | 76 |
| Enriquecimiento | 7,0 | 7,0 | 7,9 | 7,2 | 7,6 |
| Repetibilidad (n 0 6) 100 ng/ml | 9,5 | 6,0 | 4,6 | 5,5 | 10,5 |
| Repetibilidad (n 0 6) 1000 ng/ml | 9,3 | 16,0 | 13,1 | 10,1 | 5,4 |

Tabla 5. Adición de di-(2-etilhexil) fosfato (DEHP) a la fase orgánica (2-nitrofenil octil éter).

Condiciones

- 5 Muestra: 300 µl de muestra de agua acidificada a pH 2,0 con HCl
 Fase orgánica: Véase la tabla
 Fase de aceptor: 30 µl de HCl 10 mM
 Voltaje: 300 V

| Compuesto | log P ¹ | pK _a ¹ | Pm | Recuperación (%) ² | | | | |
|---------------|--------------------|------------------------------|-------|-------------------------------|----|-----|-----|-----|
| | | | | Contenido de DEHP % (p/p) | | | | |
| | | | | 0% | 5% | 10% | 25% | 50% |
| Practolol | -1,3 | 9,5 | 266,3 | nd | 3 | 9 | 27 | 30 |
| Metaraminol | -0,3 | 8,6 | 167,2 | nd | nd | nd | 6 | 7 |
| Sotalol | 0,2 | 8,2, 9,8 | 272,4 | nd | 7 | 16 | 29 | 23 |
| Atenolol | 0,2 | 9,6 | 266,3 | nd | 9 | 18 | 38 | 37 |
| Cimetidina | 0,4 | 6,8 | 252,4 | nd | 13 | 22 | 39 | 30 |
| Hidralazina | 1,0 | 0,5, 7,1 | 160,2 | nd | 59 | 54 | 75 | 71 |
| Nortriptilina | 1,7 | 9,7 | 263,4 | 33 | 2 | 2 | nd | - |
| Anfetamina | 1,8 | 10,1 | 135,2 | nd | 30 | 38 | 24 | - |
| Metanfetamina | 2,1 | 10,1 | 149,2 | nd | 31 | 30 | 12 | - |
| Metadona | 2,1 | 8,3 | 309,4 | 78 | 5 | 9 | 4 | - |
| Hidroxizina | 2,4 | 2,1, 7,1 | 374,9 | 69 | nd | 3 | nd | - |
| Petidina | 2,7 | 8,7 | 247,3 | 16 | 30 | 33 | 9 | - |
| Mepiramina | 2,8 | 4,0, 8,9 | 285,4 | 64 | 53 | 20 | 9 | - |
| Prometazina | 2,9 | 9,1 | 284,4 | 59 | nd | nd | nd | - |
| Haloperidol | 3,2 | 8,3 | 375,9 | 53 | nd | nd | nd | - |
| Flufenazina | 3,5 | 3,9, 8,1 | 437,5 | 24 | 10 | nd | nd | - |
| Fenciclidina | 4,7 | 8,5 | 243,3 | 83 | 13 | nd | nd | - |
| Clomipramina | 5,2 | 9,5 | 314,9 | 67 | nd | nd | nd | - |
| Loperamida | 5,2 | 8,1 | 477,0 | 73 | nd | - | nd | - |
| Clemastina | 5,7 | 10,2 | 343,9 | 73 | - | - | - | - |

¹Clarks Analysis of Drugs and Poisons, A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, 3^a edición, Pharmaceutical Press, Londres, RU
²Basado en 4 replicados

10 **Tabla 6. Adición de tris-(2-etilhexil) fosfato (TEHP) a la fase orgánica (2-nitrofenil octil éter).**

Condiciones

- Muestra: 300 µl de muestra de agua acidificada a pH 2,0 con HCl
 Fase orgánica: Véase la tabla
 Fase de aceptor: 30 µl de HCl 10 mM
 15 Voltaje: 300 V

| Compuesto | Recuperación (%) ¹ | | |
|-------------|-------------------------------|----|-----|
| | 0% | 5% | 10% |
| Practolol | nd | nd | nd |
| Metaraminol | nd | nd | nd |
| Sotalol | nd | nd | nd |
| Atenolol | nd | nd | nd |
| Cimetidina | nd | nd | nd |
| Hidralazina | nd | nd | nd |

| | | | |
|-------------------------------------|----|----|----|
| Nortriptilina | 33 | 78 | 76 |
| Anfetamina | nd | 17 | 44 |
| Metanfetamina | nd | 53 | 72 |
| Metadona | 78 | 91 | 80 |
| Hidroxizina | 69 | 70 | 61 |
| Petidina | 16 | 78 | 88 |
| Mepiramina | 64 | 54 | 49 |
| Prometazina | 59 | 58 | 53 |
| Haloperidol | 53 | 83 | 79 |
| Flufenazina | 24 | 31 | 33 |
| Fenciclidina | 83 | 71 | 95 |
| Clomipramina | 67 | 59 | 54 |
| Loperamida | 73 | 53 | - |
| Clemastina | 73 | - | - |
| ² Basado en 4 replicados | | | |

Tabla 7. Adición de di-(2-etilhexil) fosfato (DEHP) y tris-(2-etilhexil) fosfato (TEHP) a la fase orgánica (2-nitrofenil octil éter).

Condiciones

- 5 Muestra: 300 µl de muestra de agua acidificada a pH 2,0 con HCl
 Fase orgánica: Véase la tabla
 Fase de aceptor: 30 µl de HCl 10 mM
 Voltaje: 300 V

| Compuesto | Recuperación (%) ¹ | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 0% de DEHP + 0% de TEHP | 10% de DEHP + 10% de TEHP | 25% de DEHP + 25% de TEHP |
| Practolol | nd | 10 | 16 |
| Metaraminol | nd | 6 | 14 |
| Sotalol | nd | 26 | 27 |
| Atenolol | nd | 21 | 26 |
| Cimetidina | nd | 23 | 26 |
| Hidralazina | nd | 44 | 35 |
| Nortriptilina | 33 | 7 | 10 |
| Anfetamina | nd | 69 | 78 |
| Metanfetamina | nd | 64 | 60 |
| Metadona | 78 | 39 | 25 |
| Hidroxizina | 69 | - | 14 |
| Petidina | 16 | 61 | 63 |
| Mepiramina | 64 | 55 | 53 |
| Prometazina | 59 | - | 4 |
| Haloperidol | 53 | 5 | 4 |
| Flufenazina | 24 | - | 41 |
| Fenciclidina | 83 | 43 | 23 |
| Clomipramina | 67 | - | 1 |
| Loperamida | 73 | nd | 4 |
| Clemastina | 73 | 43 | 23 |
| ² Basado en 4 replicados | | | |

10 **Tabla 8. Datos de validación para fármacos polares.**

Condiciones

- Muestra: 300 µl de muestra de agua acidificada a pH 2,0 con HCl
 Fase orgánica: Véase la tabla
 Fase de aceptor: 30 µl de HCl 10 mM
 15 Voltaje: 300 V

| | Repetibilidad % RSD (n = 8&6) | | Linealidad (r ²) (250 ng/ml – 5 µg/ml) |
|---------------------------|-------------------------------|------------|--|
| | 250 ng/ml | 1000 ng/ml | |
| Practolol ¹ | 18 | 14 | 0,9978 |
| Sotalol ¹ | 20 | 13 | 0,9988 |
| Atenolol ¹ | 15 | 13 | 0,9984 |
| Cimetidina ¹ | 9 | 9 | 0,9969 |
| Hidralazina ¹ | 15 | 10 | 0,9972 |
| Prometazina ² | 20 | 14 | 0,9985 |
| Clomipramina ² | 13 | 14 | 0,9976 |

¹ Realizado con 25% (p/p) de DEHP en 2-nitrofenil octil éter como fase orgánica
² Realizado con 2-nitrofenil octil éter puro como fase orgánica

Tabla 9. Extracción a potenciales bajos.

Condiciones

- 5 Muestra: 300 µl de muestra de agua acidificada a pH 2,0 con HCl
 Fase orgánica: Véase la tabla
 Fase de aceptor: 30 µl de HCl 10 mM
 Voltaje: 1 V

| Compuesto | Recuperación (%) ¹ | | | |
|---------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------|------------|
| | Nitrobencono | 1-isopropil nitro-benceno | 2-Nitrofenil éter | octil éter |
| Anfetamina | nd | nd | nd | nd |
| Metanfetamina | 7 | 26 | nd | nd |
| Petidina | 28 | nd | nd | nd |
| Nortriptilina | 43 | 3 | 1 | 1 |
| Metadona | 50 | 27 | 8 | 8 |
| Haloperidol | 40 | 6 | 1 | 1 |
| Loperamida | 16 | 36 | 8 | 8 |

Tabla 10. Extracción de compuestos ácidos.

10 Condiciones

- Muestra: 300 µl de muestra de agua acidificada a pH 2,0 con HCl
 Fase orgánica: Véase la tabla
 Fase de aceptor: 30 µl de NaOH 10 mM
 Voltaje: 15 V

| Compuesto | Recuperación (%) |
|------------|------------------|
| Ibuprofeno | 49 % |
| Naproxeno | 64 % |

15

Referencias bibliográficas

- (1) Cox, J. A.; Carlson, R. Anal. Chim. Acta 1981, 130, 313.
 (2) Debets, A. J. J.; Kok, W. Th.; Hupe, K. P.; Brinkman, UA Th. Chromatographia 1990, 30, 361.
 (3) Buscher, B. A. P.; Tjaden, U. R.; van der Greef, J. J. Chromatogr. A 1997, 764, 135.
 20 (4) Buscher, B.A.P.; Tjaden, U. R.; van der Greef, J. J. Chromatogr. A 1997, 788, 165. (5) Levine, M. L.; Bier, M. Electrophoresis 1990,11, 605.
 (6) Clark, W. M. Chemtech. 1992, 22, 525.
 (7) Marando, M. A.; Clark, W. M. Sep. Sci. Technol. 1993, 28, 1561.

- (8) Thoës, C. W.; Clark, W. M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1995, 54, 143.
- (9) Thoës, C. W.; Clark, W. M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1995, 54, 143.
- (10) Oehler, R. D.; Clark, W. M. *Biotechnol. Prog.* 1996, 12, 873.
- (11) Zhai, S. L.; Luo, G. S.; Liu, J. G. *Chem. Ing. J.* 2001, 83, 55.
- 5 (12) Stichlmair, J.; Schmidt, J.; Proplesch, Chem. Ing. Sci. 1992, 47, 3015.
- (13) Luo, G. S.; Yu, M. J.; Jiang, W. B.; Zhu, S. L.; Dai, Y.Y. *Sep. Sci. Technol.* 1999, 34, 781
- (14) Luo, G. S.; Jiang, W. B.; Lu, Y. C.; Zhu, S. L.; Daf, Y. Y. *Chem. Ing. J.* 1999, 73, 137.
- (15) Luo, G. S.; Wu, F. Y.; *Sep. Sci. Technol.* 2000, 35, 2485.
- (16) Luo, G. S.; Pan, S.; Liu, J. G.; Daf, Y. Y. *Sep. Sci. Technol.* 2001, 36, 2799.
- 10 (17) Pan, S.; Luo, G. S.; Liu, J. G.; Wang, J. D. *Sep. Sci. Technol.* 2003, 38, 3731.
- (18) Luo, G. S.; Liu, J. G.; Lu, Y. C.; Pan, S.; Wang, J. D. *Sep. Sci. Technol.* 2004, 39, 1267.
- (19) Luo, G. S.; Shan, X.Y.; Qi, X.; Lu, Y. C. *Sep. Purif. Technol.* 2004, 38, 265.
- (20) van der Vliet, E.; Mazereeuw, M.; Tjaden, U. R.; Irth, H.; van der Greef, J. J. *Chromatogr. A* 1994, 687, 333.
- (21) van der Vliet, E.; Mazereeuw, M.; Tjaden, U. R.; Irth, H.; van der Greef, J. J. *Chromatogr. A* 1995, 712, 227.
- 15 (22) van der Vliet, E.; Mazereeuw, M.; Tjaden, U. R.; Irth, H.; van der Greef, J. J. *Chromatogr. A* 1996, 741, 13.
- (23) Serga, VE; Kulikova, LD; Purin, BA *Sep. Sci. Technol.* 2000, 35, 299.
- (24) Kulikova, L.; Petrichenko, O.; Serga, V.; Jansone, A. J. *Appl. Electrochem.* 2004, 34, 103.
- (25) Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E. *Anal. Chem.* 1999, 71, 2650.
- (26) Ho, T. S.; Halvorsen, T. G.;) Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E. *J. Chromatogr. A* 2003, 998, 61 - 72.

REIVINDICACIONES

- 1 Sistema que comprende
- una primera solución de donante hidrófilo, que tiene un pH predeterminado, que comprende al menos un compuesto orgánico ionizado o parcialmente ionizado
- 5 y una segunda solución de aceptor hidrófilo que tiene un pH predeterminado;
- una membrana líquida cuyo espesor está en el intervalo de 0,01 a 1000 μm , que comprende un disolvente orgánico inmovilizado, la cual membrana se pone en contacto fluido tanto con dicha solución de donante como con dicha solución de aceptor de forma que separa dicha solución de donante y dicha solución de aceptor, y a través del cual disolvente orgánico puede pasar una corriente y dicho al menos un compuesto orgánico ionizado;
- 10 un primer electrodo que se ha de poner en contacto con la solución de donante;
- un segundo electrodo que se ha de poner en contacto con la solución de aceptor;
- y una fuente de voltaje para aplicar un voltaje sobre dichos electrodos.
2. Sistema según la reivindicación 1ª, en el que dicho disolvente orgánico es diferente del disolvente presente en dicha solución de donante y/o de aceptor.
- 15 3. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el disolvente orgánico de la membrana líquida es inmiscible con el disolvente de dichas soluciones de donante y/o de aceptor.
4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el espesor de la membrana está en el intervalo de 1 a 500 μm .
5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el espesor de la membrana está en el
- 20 intervalo de 1 a 300 μm .
6. Sistema según las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que el espesor de la membrana está en el intervalo de 0,01 a 10 μm , o de 0,05 a 1,0 μm .
7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se añade al disolvente orgánico un aditivo mejorador de la conductividad.
- 25 8. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la membrana es una fibra hueca microporosa.
9. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la membrana está formada por una película polimérica hinchada con dicho disolvente orgánico.
10. Sistema según la reivindicación 1ª, en el que dicho compuesto orgánico pertenece a un grupo que comprende
- 30 productos farmacéuticos, fármacos, sustancias biológicas, contaminantes orgánicos, aditivos alimentarios, colores y venenos, y metabolitos de los mismos.
11. Sistema según la reivindicación 1ª, en el que dicho compuesto orgánico se elige entre el grupo que consiste en compuestos hidrosolubles y liposolubles, y ligeramente hidrosolubles.
12. Sistema según la reivindicación 9ª, en el que la sustancia biológica se elige entre el grupo consistente en DNA,
- 35 proteínas, péptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos.
13. Sistema según la reivindicación 1ª, en el que la solución de donante es una solución sustancialmente acuosa.
14. Sistema según la reivindicación 12ª, en el que la solución de donante tiene una adición de un disolvente orgánico miscible con el agua en el intervalo de 0,1 a 50% en peso, especialmente de 1 a 20%, o de 2 a 10 o 0,1 a 0,5%.
15. Sistema según la reivindicación 1ª, en el que la solución de donante es una solución sustancialmente no acuosa que comprende un disolvente orgánico hidrófilo.
- 40

16. Sistema según la reivindicación 14^a, en el que la solución de donante tiene una adición de una solución acuosa o agua en el intervalo de 0,1 a 50% en peso, especialmente de 1 a 20%, o de 2 a 10 o 0,1 a 0,5%.
17. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la solución de donante es una mezcla de una solución acuosa y una solución hidrófila no acuosa.
- 5 18. Sistema según la reivindicación 16^a, en el que la mezcla está en la relación de solución acuosa a solución orgánica hidrófila en el intervalo de 2:1 a 1:2, especialmente 1:1.
19. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la solución de aceptor es una solución sustancialmente acuosa.
20. Sistema según la reivindicación 18^a, en el que la solución de aceptor tiene una adición de un disolvente orgánico miscible con el agua en el intervalo de 0,1 a 50% en peso, especialmente de 1 a 20%, o de 2 a 10 o de 0,1 a 0,5%.
- 10 21. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la solución de aceptor es una solución sustancialmente no acuosa que comprende un disolvente orgánico hidrófilo.
22. Sistema según la reivindicación 20^a, en el que la solución de aceptor tiene una adición de una solución acuosa o agua en el intervalo de 0,1 a 50% en peso, especialmente de 1 a 20%, o 2 a 10 o de 0,1 a 0,5%.
- 15 23. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la solución de aceptor es mezcla de una solución acuosa y una solución hidrófila no acuosa.
24. Sistema según la reivindicación 22^a, en el que la mezcla está en la relación de solución acuosa : solución orgánica hidrófila en el intervalo de 2:1 a 1:2, especialmente de 1:1.
25. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la solución de donante está comprendida en un primer compartimento y la solución de aceptor está comprendida en un segundo compartimento y los dos compartimentos tienen volúmenes relativos en el intervalo de compartimento de donante : compartimento de aceptor de 10.000:1 a 1:100, más preferentemente de 100:1 a 1:1.
- 20 26. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la solución de donante está comprendida en un primer compartimento y la solución de aceptor está comprendida en un segundo compartimento y los dos compartimentos tienen volúmenes relativos de 1:2 a 2:1, o de 1:1.
- 25 27. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la primera y la segunda soluciones se ponen en compartimentos en los que al menos uno de dichos compartimentos es desplazable en relación con el otro compartimento y/o con la membrana líquida.
28. Sistema según la reivindicación 1^a, que comprende además medios para agitar al menos una de dichas soluciones.
- 30 29. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la membrana líquida es una membrana líquida desechable.
30. Sistema según la reivindicación 1^a, en el que la membrana líquida es una membrana líquida reutilizable.
31. Procedimiento para la migración electrocinética de un compuesto orgánico en un sistema de 3 fases, que comprende las etapas de:
- 35 proporcionar una primera solución de donante hidrófilo que comprende al menos un compuesto orgánico que ha de ser transferido desde dicha solución de donante a una solución de aceptor;
- estando el pH de dicha solución de donante en un nivel en el que dicho compuesto orgánico es ionizado bien sea positivamente o bien negativamente, si es necesario, mediante el ajuste del pH;
- proporcionar una segunda solución de aceptor hidrófilo;
- 40 estando el pH de dicha solución de aceptor en un nivel en el que dicho compuesto que ha de ser transferido desde la solución de donante a la solución de aceptor es ionizado, si es necesario, mediante el ajuste del pH;
- proporcionar una membrana líquida cuyo espesor está en el intervalo de 0,01 a 1000 μm que comprende un disolvente orgánico inmovilizado, que es sustancialmente inmiscible con el agua, a través de la cual puede pasar una corriente y dicho al menos un compuesto orgánico ionizado:

- y poner dicha membrana en contacto fluido con dicha solución de donante y dicha solución de aceptor, de forma que separa dicha solución de donante y dicha solución de aceptor;
- proporcionar un primer electrodo que se ha de poner en contacto fluido con la solución de donante y un segundo electrodo que se ha de poner en contacto fluido con la solución de aceptor;
- 5 aplicar un voltaje sobre dichos electrodos para promover la migración de dicho compuesto orgánico desde la solución de donante, a través de la membrana líquida, a la solución de aceptor.
32. Procedimiento según la reivindicación 31^a, en el que dicho disolvente orgánico es distinto del disolvente en dicha solución de donante y/o de aceptor.
- 10 33. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31^a y 32^a, en el que el disolvente orgánico de la membrana líquida es inmiscible con el disolvente de dichas soluciones de donante y/o de aceptor.
34. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31^a a 33^a, en el que el voltaje está en el intervalo de 0,01 V a 30.000 V; más preferentemente de 0,1 V a 10.000 V, incluso más preferentemente de 1 V a 1000 V, aún más preferentemente de 1 a 500V; de forma especialmente preferida de 1V a 300V.
35. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31^a a 34^a, en el que se aplica un voltaje de CC.
- 15 36. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31^a a 35^a, en el que se aplica un voltaje pulsante.
37. Procedimiento según la reivindicación 31^a, en el que la solución de donante se prepara a partir de una muestra biológica tal como sangre, suero, orina, saliva, esputo, semen, lisado de células, fluidos celulares, leche materna o líquido cefalorraquídeo.
- 20 38. Procedimiento según la reivindicación 31^a, en el que la solución de donante se prepara a partir de una muestra acuosa, tal como agua de beber, aguas residuales, una solución de un proceso de preparación orgánico o industrial, un proceso bioquímico o un proceso de fermentación.
39. Procedimiento según la reivindicación 31^a, en el que se prepara una solución de donante ajustando el pH de una solución de donante para transferir un compuesto orgánico desde un estado neutro a un estado iónico ionizado.
- 25 40. Procedimiento según la reivindicación 39^a, en el que se prepara una solución de donante transfiriendo un compuesto orgánico a su contrapartida aniónica ajustando el pH en un intervalo de 8 a 14.
41. Procedimiento según la reivindicación 39^a, en el que se prepara una solución de donante transfiriendo un compuesto orgánico a su contrapartida catiónica ajustando el pH en un intervalo de 1 a 6.
42. Procedimiento según la reivindicación 31^a, en el que se prepara una solución de aceptor ajustando el pH en un intervalo de 8 a 14 con el fin de aceptar un compuesto orgánico aniónico.
- 30 43. Procedimiento según la reivindicación 31^a, en el que se prepara una solución de aceptor ajustando el pH en un intervalo de 1 a 6 con el fin de aceptar un compuesto orgánico catiónico.
44. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31^a a 43^a, para el aislamiento selectivo de al menos un compuesto orgánico procedente de una solución de donante preparada a partir de una muestra.
- 35 45. Procedimiento según la reivindicación 31^a, para aumentar la concentración de al menos un compuesto orgánico en dicha solución de aceptor, en comparación con la concentración de dicho compuesto en la solución de donante, en el que dicho aumento de la concentración se consigue proporcionando un compartimiento para la solución de aceptor, que es relativamente más pequeño que el compartimiento de la solución de donante.
- 40 46. Procedimiento según la reivindicación 31^a, en el que la solución de aceptor se utiliza para la detección cuantitativa y/o cualitativa del compuesto orgánico, opcionalmente después de ajustar el pH de la solución en un nivel en el que dicho al menos un compuesto orgánico es transferido a un estado no ionizado y/o de transferir dicho compuesto orgánico a uno o varios disolventes orgánicos.
47. Procedimiento según la reivindicación 31^a para la concentración y/o el enriquecimiento de al menos un compuesto orgánico.

48. Procedimiento según la reivindicación 47^a, en el que la primera solución se alimenta de una manera continua o intermitente pasada dicha membrana fluida.
49. Procedimiento según la reivindicación 47^a, en el que la segunda solución se alimenta de manera continua o intermitente pasada la membrana fluida.
- 5 50. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 47^a a 49^a, en el que el procedimiento se lleva a cabo como un procedimiento industrial a gran escala.
51. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 47^a a 50^a, en el que el procedimiento se lleva a cabo en un sistema que comprende múltiples dispositivos según la reivindicación 1^a.
52. Procedimiento según la reivindicación 31^a, para preparar una muestra para análisis.
- 10 53. Procedimiento según la reivindicación 52^a, en el que el procedimiento se lleva a cabo en un sistema según la reivindicación 1^a incorporado en un dispositivo analítico de micro-chip.
54. Procedimiento según la reivindicación 31^a para la purificación de una muestra.
55. Proceso para la purificación de una muestra según la reivindicación 54^a, en el que dicho al menos un compuesto orgánico se detecta después ajustar opcionalmente el pH de la solución de aceptor y/o transfiriendo el compuesto orgánico a un disolvente orgánico, mediante un sistema detector adecuado.
- 15 56. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31^a a 54^a, en el que dicho al menos un compuesto orgánico después de la transferencia a la solución de aceptor se somete a un ensayo para la actividad bioquímica.
57. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31^a a 54^a, en el que dicho al menos un compuesto orgánico después de la transferencia a la solución de aceptor se somete a una o varias etapas de reacción más, para la modificación química de dicho al menos un compuesto orgánico.
- 20 58. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 31^a a 54^a, en el que dicho procedimiento comprende una etapa adicional de agitación de por lo menos una de dichas soluciones de donante o de aceptor.

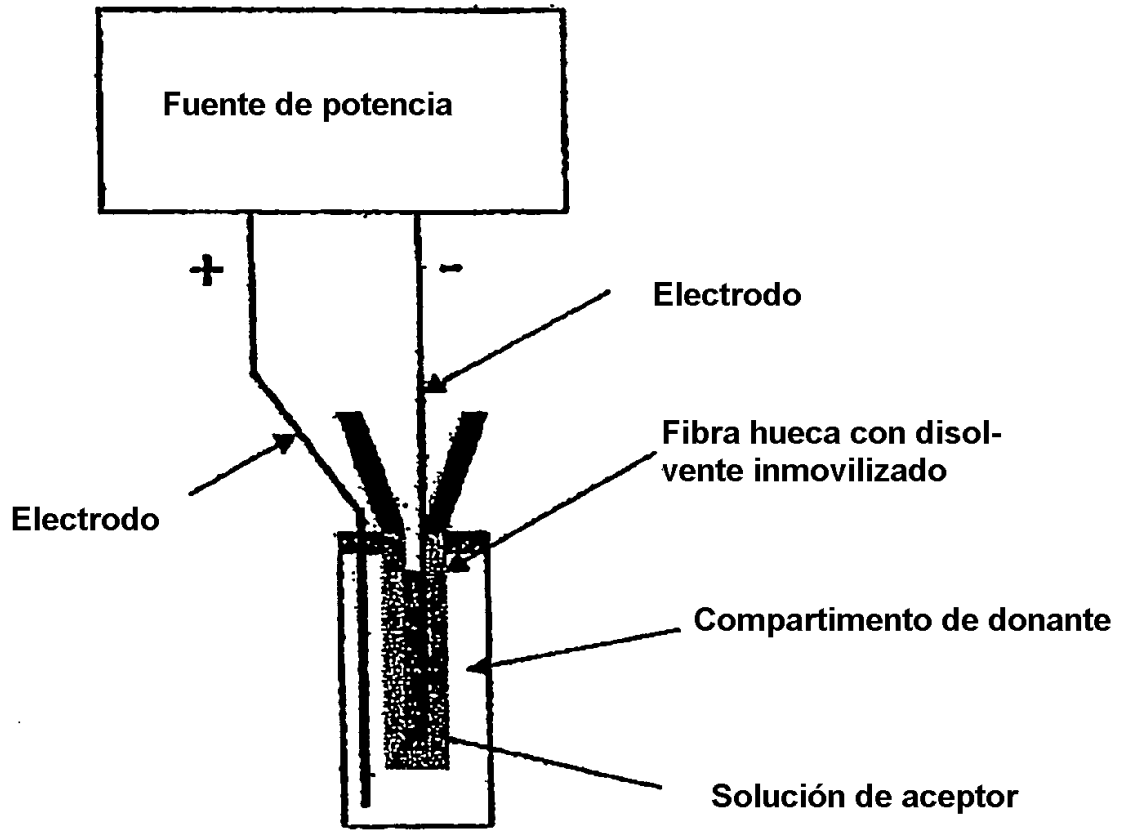


Fig. 1

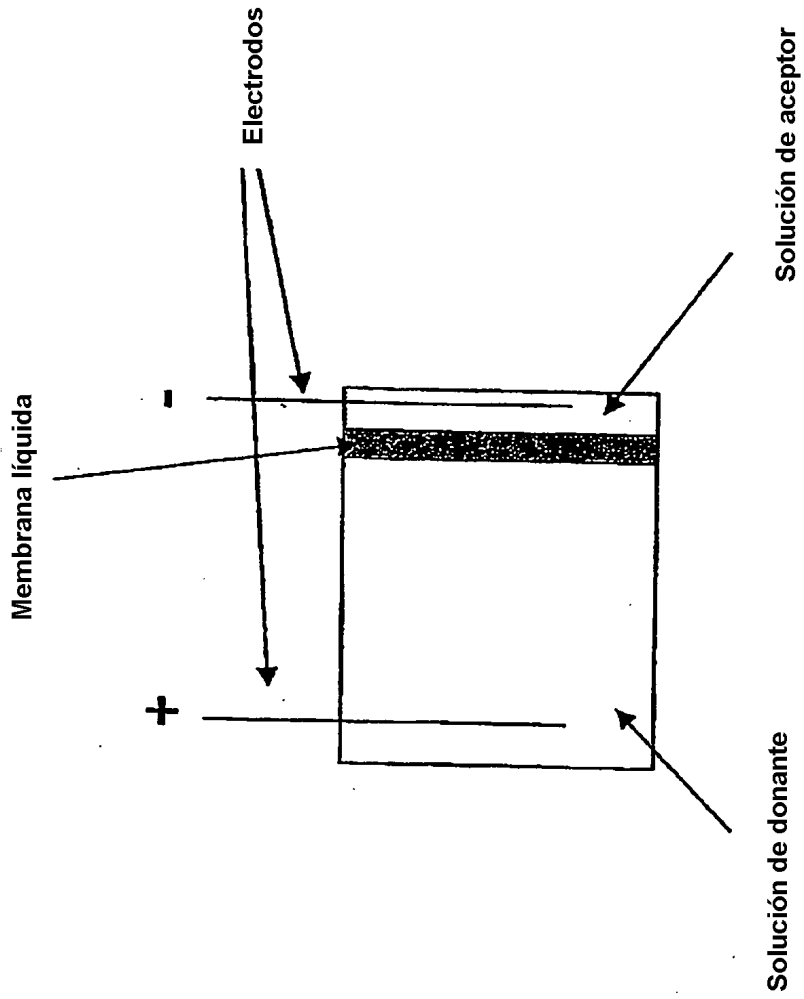


Fig. 2

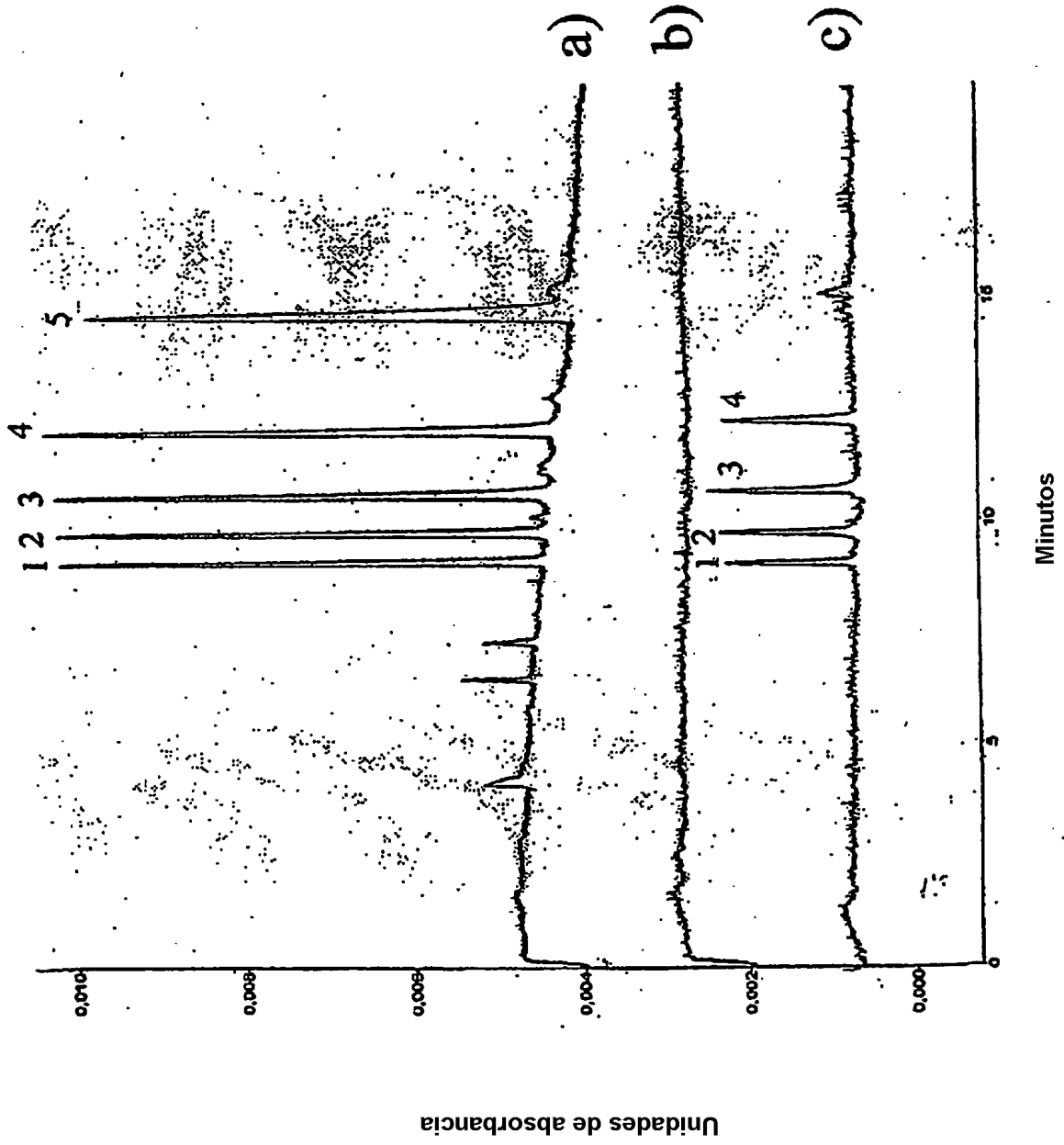


Fig. 3

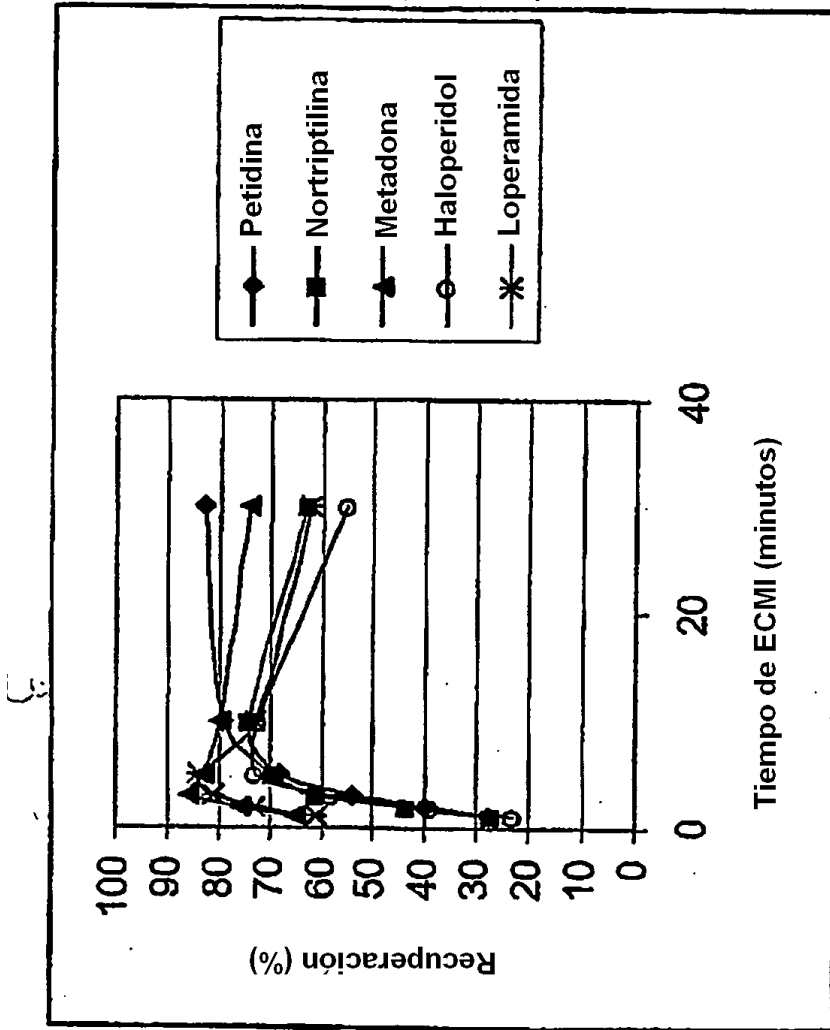


Fig. 4

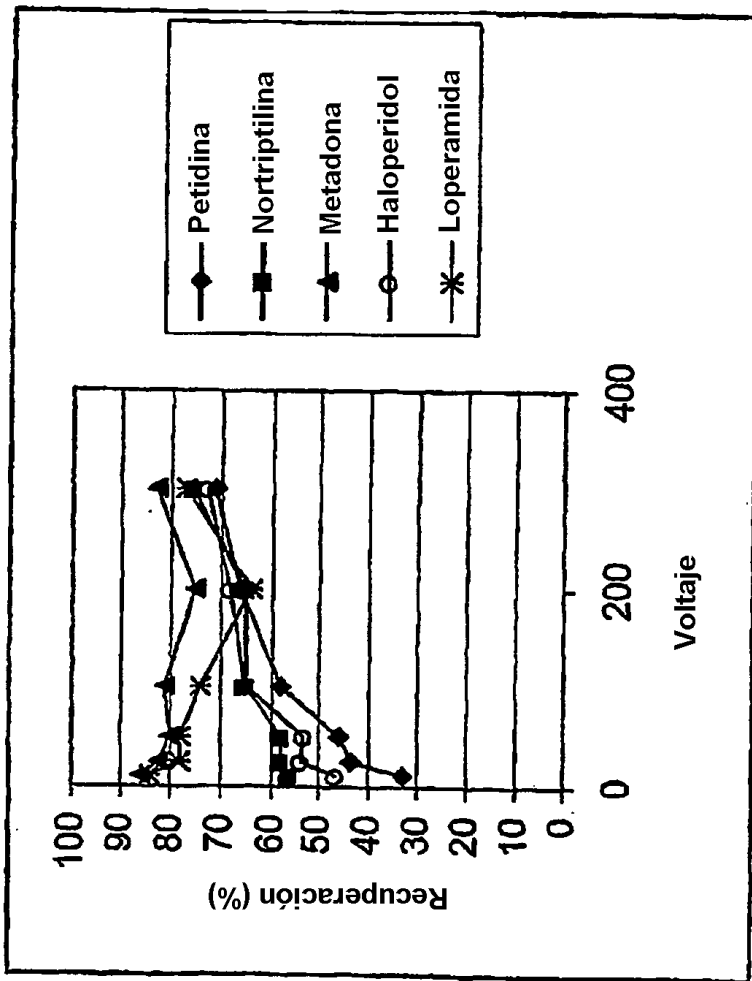


Fig. 5

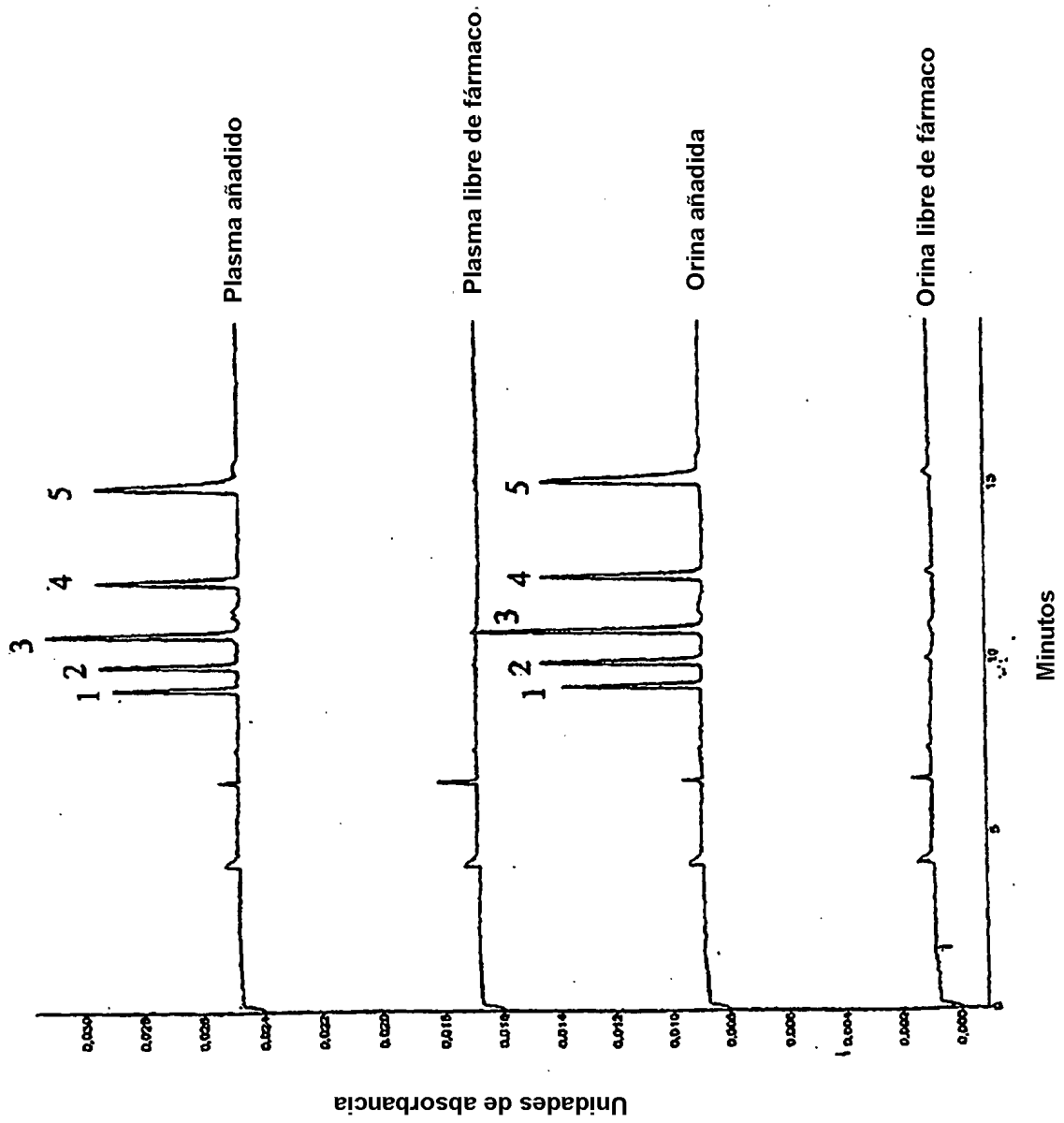


Fig. 6

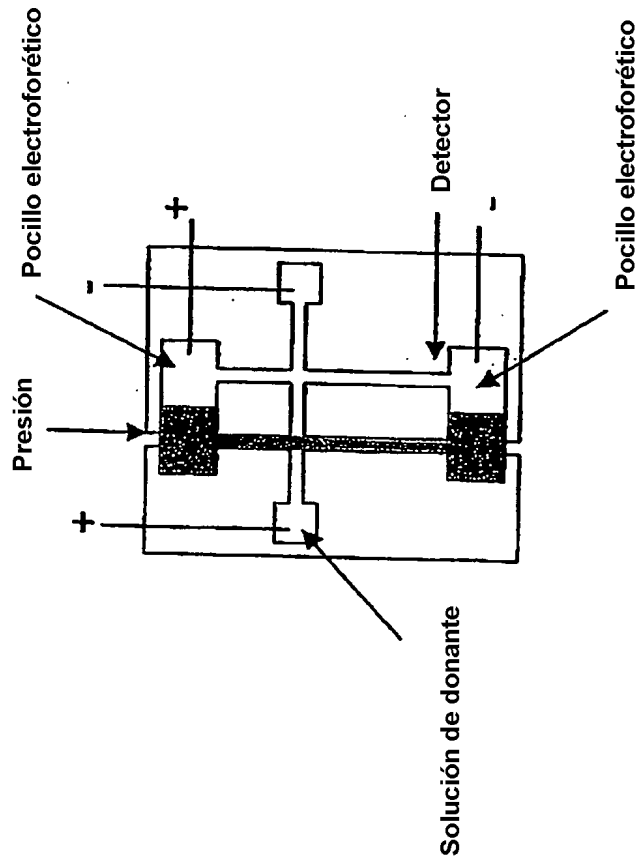


Fig. 7

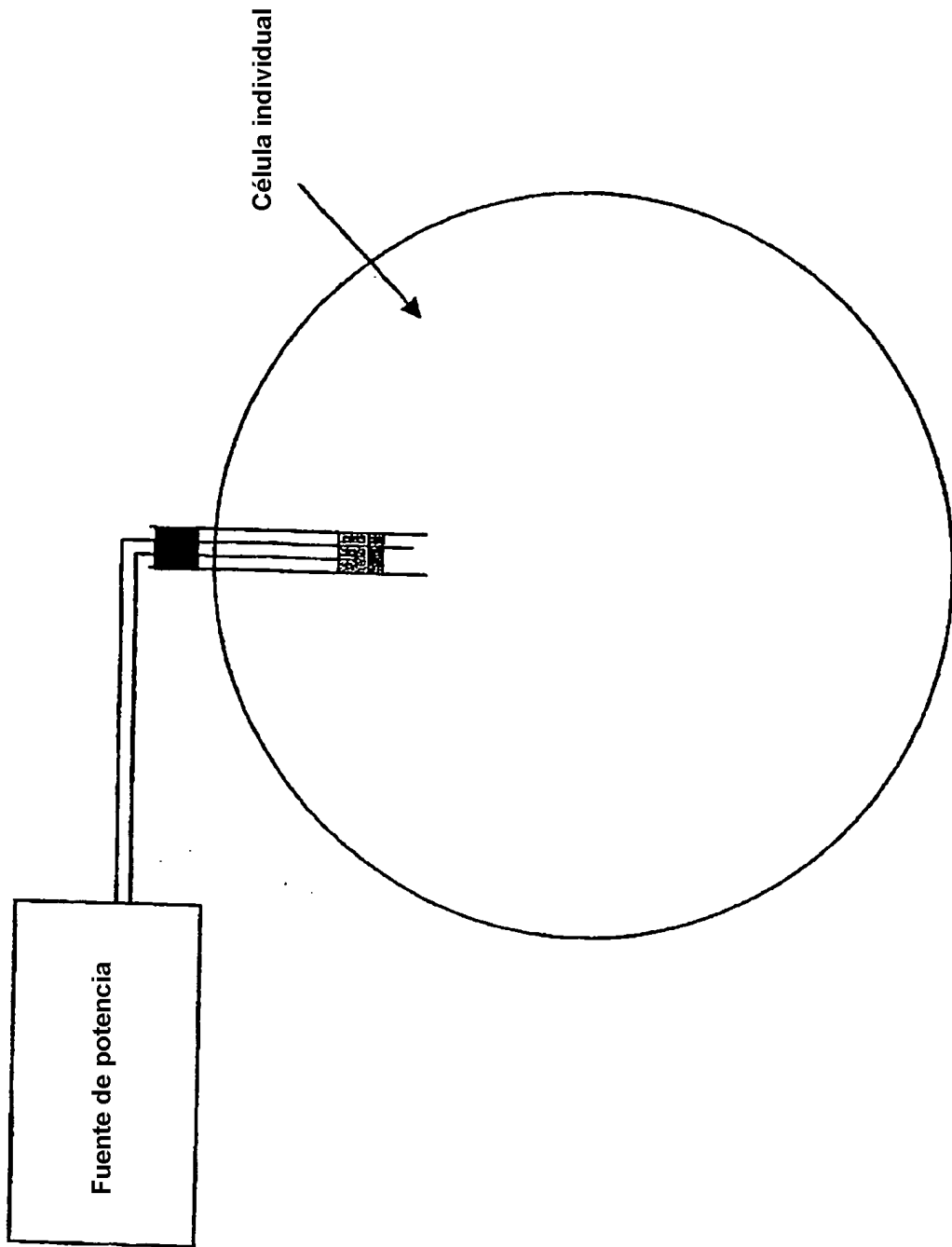


Fig. 8