(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 596 127**

(51) Int. CI.:

G01N 30/08 (2006.01)
G01N 30/20 (2006.01)
G01N 30/40 (2006.01)
G01N 30/46 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2011 PCT/EP2011/058145**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2012 WO12013380**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2011 E 11723399 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2598872**

(54) Título: **Procedimiento basado en una disposición de columna cromatográfica HILIC y disposición de enriquecimiento por SPE para la preparación de muestras y el análisis de pesticidas**

(30) Prioridad:

30.07.2010 DE 102010036770

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.01.2017

(73) Titular/es:

JOINT ANALYTICAL SYSTEMS GMBH (100.0%)
Carl-Zeiss-Strasse 49
47445 Moers, DE

(72) Inventor/es:

KITTLAUS, STEFAN y
RADTKE, JOERG

(74) Agente/Representante:

ARPE FERNÁNDEZ, Manuel

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 basado en una disposición de columna cromatográfica HILIC y disposición de enriquecimiento por SPE para la preparación de muestras y el análisis de pesticidas

CAMPO TÉCNICO

[0001] La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de muestras y el análisis de pesticidas en muestras mediante cromatografía. Los pesticidas se emplean para proteger plantas contra plagas. Dado que éstos pueden entrar en forma de residuos en la cadena alimentaria, se fijan valores legales límite, cuyo cumplimiento se controla mediante análisis. El análisis de pesticidas se realiza para distintas muestras con distintas matrices de muestra. Por lo tanto, un objetivo del análisis es separar lo mejor posible de la matriz los pesticidas de las muestras y a continuación analizarlos. El objetivo del desarrollo es, además de alcanzar una gran exactitud, automatizar la preparación y el análisis de muestras y mantener pequeños el gasto de trabajo y el consumo de sustancias químicas para el análisis.

ESTADO ACTUAL DE LA TÉCNICA

[0002] La publicación "Validation of a Simple and Rapid Multiresidue Method (QuEChERS) and its Implementation in Routine Pesticide Analysis" de M.Anastassiades, E. Scherbaum y D. Bertsch, póster en el simposio MGPR, mayo de 2003 en Aix en Provence, Francia, da a conocer un procedimiento simplificado para la preparación de muestras para el análisis instrumental de pesticidas mediante GC-MSD o LC-MS. El procedimiento sustituye varias etapas por etapas más sencillas. En éstos se realiza la adición de distintas sustancias químicas, como $MgSO_4$, NaCl y acetonitrilo, y se llevan a cabo distintas etapas de tratamiento, teles como una agitación o una centrifugación, para la preparación de las muestras.

[0003] El método de determinación de residuos múltiples modular conocido como "S19" para la determinación de residuos de productos fitosanitarios en productos alimenticios de Specht, comprende en esencia la extracción y distribución, una cromatografía por permeación de gel (GPC), una cromatografía en una columna de gel de sílice pequeña y una determinación subsiguiente por cromatografía en fase gaseosa con distintos detectores.

[0004] En el método ChemElut según Alder, la muestra homogeneizada se extrae con metanol después de ajustar un contenido de agua uniforme y a continuación se depura el extracto centrifugado mediante una distribución líquido-líquido en tierra de diatomeas. De este modo es posible separar los pesticidas a analizar de los componentes de la matriz que interfieren. Finalmente se concentra la cantidad relativamente grande de diclorometano necesaria para la elución y se absorbe el residuo en un disolvente adecuado para la medición, en la mayoría de los casos metanol.

[0005] El documento US 2010/024527 A1 (LAMARR WILLIAM A [US] ET AL, 4 de febrero de 2010) revela una disposición y un método para la preparación de muestras y el análisis de muestras, que incluyen un sistema de múltiples columnas, un detector y una disposición de válvulas para el control de la corriente de muestra y de matriz.

[0006] En todos los procedimientos ya conocidos, una automatización se realiza imitando las etapas de procedimiento efectuadas habitualmente a mano. En éstos, la extracción de la muestra se realiza con distintos disolventes. La depuración y medición del extracto requiere una pluralidad de etapas diferentes en el laboratorio (distribución líquido-líquido, SPE, GPC, ...).

[0007] Para simplificar la costosa preparación de muestras se dispone de potentes detectores. La automatización se realiza según el estado actual de la técnica antes mencionado.

[0008] Todos los procedimientos ya conocidos presentan la desventaja de un gran gasto de trabajo y un alto consumo de material. En algunos procedimientos, la exactitud de los resultados y el número de pesticidas analizables son limitados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0009] El objetivo de la invención es configurar la preparación de muestras de manera que sea más económica y reducir el gasto de trabajo y el consumo de material. Según la invención, el objetivo se logra con un procedimiento con las etapas de:

(a) aplicación de una muestra, disuelta en un eluyente preponderantemente pobre en agua y/u homopolar, en una columna cromatográfica HILIC con un eluyente preponderantemente pobre en agua y/u homopolar;
(b) enriquecimiento de al menos una gran parte de los pesticidas contenidos en la muestra en una disposición de enriquecimiento por SPE (extracción en fase sólida);
(c) conducción de la parte de muestra enriquecida con pesticidas en la disposición de enriquecimiento por SPE en dirección opuesta a la disposición de enriquecimiento por SPE, a través de la segunda columna cromatográfica con un eluyente preponderantemente rico en agua y/o polar, mediante la conmutación de una disposición de válvulas después de un tiempo de enriquecimiento seleccionado; y
(d) detección de los componentes de la muestra separados en la segunda columna cromatográfica.

[0010] En una configuración ventajosa de la invención, en un primer estado de conmutación de una disposición de válvulas el eluyente preponderantemente rico en agua y/o polar se bombea con una segunda bomba en dirección opuesta a través de una segunda columna cromatográfica y a continuación se desvía.

[0011] La disposición según la invención permite una automatización completa de la preparación de muestras y el análisis. Los extractos brutos se depuran, es decir se libran de la matriz que interfiere, y se analizan directamente. La extracción de la muestra antes de la aplicación se realiza con un disolvente pobre en agua y/u homopolar. Para ello es muy adecuado el acetonitrilo (ACN). Se ha comprobado que resulta muy ventajosa una relación de mezcla de un 95% en volumen de ACN y un 5% de agua. El extracto puede utilizarse directamente para la medición. La depuración del extracto se realiza por cromatografía en la columna cromatográfica HILIC y de manera automatizada.

[0012] La utilización de una columna HILIC resulta ventajosa especialmente porque en ésta pueden separarse bien los pesticidas de los componentes de la matriz que interfieren. Los pesticidas se eluyen antes que la matriz y se recogen en la disposición de enriquecimiento por SPE. La matriz permanece en la columna cromatográfica HILIC y puede eluirse posteriormente.

[0013] Puede verse que, a diferencia de los intentos de automatización realizados hasta ahora, aquí no se imita un método ya existente, sino que se aplica un nuevo procedimiento. En lugar de efectuar una distribución líquido-líquido, se emplea una columna cromatográfica HILIC. Mientras se analizan los pesticidas en el segundo paso en una segunda columna cromatográfica analítica puede limpiarse la columna cromatográfica HILIC.

[0014] La segunda columna cromatográfica analítica se hace funcionar preferentemente como columna cromatográfica de fase inversa (RP). Sorprendentemente se ha comprobado que el acoplamiento de una columna cromatográfica HILIC con una columna cromatográfica RP como método de determinación de residuos múltiples de pesticidas proporciona resultados muy reproducibles con buenos límites de detección y buenas sensibilidades.

[0015] La invención permite registrar el espectro de sustancias activas de los procedimientos clásicos ya conocidos sin una preparación manual de las muestras. El enriquecimiento en la disposición de enriquecimiento por SPE tiene la ventaja adicional de que es posible realizar grandes volúmenes de inyección. De este modo se aumentan aun más los límites de detección y la sensibilidad.

[0016] Los componentes enriquecidos se transfieren en el segundo estado de conmutación con un gradiente incipiente en un proceso de inversión de flujo a la segunda columna analítica. Al mismo tiempo se eluye la matriz de la columna cromatográfica HILIC y se acondiciona la columna para el siguiente análisis. Para la limpieza no se emplean "artículos desechables". Esto protege el medio ambiente y hace que el procedimiento sea particularmente económico.

[0017] Una configuración preferida de la invención utiliza como eluyente rico en agua y/o polar, al menos un 90% en volumen de agua al principio del análisis. Además, el eluyente rico en agua y/o polar puede contener entre un 3 y un 7% en volumen, preferentemente un 5% en volumen, de acetonitrilo y/o MeOH. Con este eluyente, los pesticidas enriquecidos se conducen de la disposición de enriquecimiento por SPE, en un proceso de inversión de flujo, a la segunda columna cromatográfica analítica.

[0018] La segunda columna cromatográfica puede ser una columna *High Performance Liquid Column* (HPLC (cromatografía líquida de alta resolución)). Sin embargo, también puede emplearse una columna de cromatografía en fase gaseosa (GC). La elución se efectúa entonces en la disposición de enriquecimiento por SPE fuera de línea. A continuación se analiza el eluato en la columna GC. En otras palabras: la columna cromatográfica HILIC y la disposición de enriquecimiento por SPE sirven para preparar las muestras para una columna GC. En esta utilización, la muestra enriquecida procedente de la disposición de enriquecimiento por SPE se lava en un recipiente con un eluyente, por ejemplo ácido acético y/o acetona, y a continuación se analiza con la columna GC.

[0019] En una configuración particularmente ventajosa de la invención, una parte de la corriente de muestra que en un primer estado de conmutación fluye a través de la disposición de enriquecimiento por SPE durante un tiempo de enriquecimiento seleccionado se conduce directamente al detector. Se trata especialmente de pesticidas polares no aptos para el enriquecimiento, que se conducen directamente al detector y se miden en el mismo. Al mismo tiempo se separa la matriz. Como detector resulta particularmente adecuado un espectrómetro de masas.

[0020] Con ello, una parte de la corriente de muestra que fluye a través de la disposición de enriquecimiento por SPE durante un tiempo de enriquecimiento seleccionado se detecta ventajosamente de forma directa.

[0021] El procedimiento es particularmente ventajoso si la columna cromatográfica HILIC, se regenera durante una parte del tiempo de análisis en el segundo estado de conmutación con la bomba en el espectrómetro de masa, y durante el tiempo de análisis restante se elabora una parte de muestra de pesticida para la cromatografía en fase gaseosa mediante la columna. La consecuencia de esto es que durante la analítica por LC-MS puede tener lugar inmediatamente la preparación de muestras para la analítica por GC.

[0022] Las reivindicaciones subordinadas tienen por objeto configuraciones de la invención. A continuación se explica un ejemplo de realización haciendo referencia a los dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023]

La figura 1, es una representación esquemática de una disposición para la preparación de muestras y el análisis de pesticidas en una primera posición de conmutación.
La figura 2, muestra la disposición de la figura 1 en una segunda posición de conmutación.

DESCRIPCIÓN DEL EJEMPLO DE REALIZACIÓN

[0024] Las figuras 1 y 2 muestran una disposición para el análisis automático de pesticidas en muestras, que de manera general lleva el número de referencia 10. La disposición comprende una bomba de gradiente 12, que al

principio bombea con un eluyente compuesto de un 5% en volumen de agua y un 95% en volumen de ACN hacia una columna cromatográfica HILIC 14 en un horno 16. La disposición comprende otra bomba de gradiente 18, que bombea un eluyente que al principio está compuesto de un 5% en volumen de ACN y/o MeOH y un 95% en volumen de agua hacia una válvula 20.

[0025] En el estado de conmutación mostrado en la figura 1, la salida de la columna cromatográfica HILIC 14 está conectada mediante la válvula 20 a una disposición de enriquecimiento por SPE 22. En el presente ejemplo de realización, la disposición de enriquecimiento por SPE es una columna C8 corta. Añadiendo agua por mezcla antes de la columna de enriquecimiento por SPE (no representada) se aumenta la polaridad del eluato, de manera que es posible enriquecer los pesticidas.

[0026] La salida de la disposición de enriquecimiento por SPE conduce, a través de otra válvula 24 dispuesta en un horno 26, al compartimento de muestras de un detector LC-MS 32. En el horno 26 está dispuesta una columna RP-HPLC (columna C18) 28. En el estado de conmutación mostrado en la figura 1, la corriente de eluyente fluye de la bomba 18, a través de la válvula 24, a la columna HPLC 28. La salida de la columna HPLC 28 está conectada mediante la válvula 20 a una eliminación 30.

[0027] La figura 2 muestra la misma disposición que la de la figura 1. Sin embargo, aquí las válvulas 20 y 24 están conmutadas de otro modo. El eluyente se conduce con la bomba de gradiente 12 por la columna HILIC 14, a través de la válvula 20, hasta la eliminación 30. Con ello se limpia la columna HILIC y se prepara así para el siguiente análisis.

[0028] El eluyente rico en agua se conduce con la bomba de gradiente 18, a través de la válvula 24, a la disposición de enriquecimiento por SPE 22. En ésta fluye en dirección opuesta a la representada en la figura 1, a través de la disposición de enriquecimiento por SPE 22, a la válvula 20. La válvula 20 está conmutada de tal manera que la muestra con los pesticidas fluye, a través de la válvula 20, al análisis en la columna HPLC 28. La salida de la columna HPLC 28 está conectada mediante la válvula 24 al detector LS-MS 32.

La disposición funciona de la siguiente manera:

[0029] El procedimiento comienza con la inyección de 5 µl de la solución de extracto sin depurar. En la primera posición de las válvulas 20 y 24, la muestra (extracto bruto), disuelta en ACN y agua en una relación volumétrica de 95:5, con los pesticidas a analizar se conduce mediante la bomba 12 a través de la columna cromatográfica HILIC 14. En ésta se separa de los pesticidas la mayor parte de la matriz que interfiere y no interesa. La matriz permanece en su mayoría en la columna cromatográfica HILIC 14. Los pesticidas se eluyen aquí en su mayor parte todos muy temprano, aproximadamente después de 1 a 4 minutos. En este momento aún se hallan en la columna HILIC grandes partes de la matriz. La parte de muestra remanente fluye a la disposición de enriquecimiento por SPE 22. En ésta se enriquecen la mayoría de los pesticidas. Una pequeña parte de los pesticidas, especialmente los pesticidas polares de bajo peso molecular, no permanecen en la disposición de enriquecimiento por SPE 22, sino que fluyen durante este periodo de enriquecimiento (figura 1), a través de la disposición de enriquecimiento por SPE 22, directamente al detector 32. Así pues se detectan ya en esta posición de las válvulas.

[0030] Después de aproximadamente 4 minutos, la matriz ya se ha separado en la HILIC suficientemente de los pesticidas a analizar. A continuación se conmutan las válvulas 20 y 24, de lo que resulta la situación representada en la figura 2. En esta posición de conmutación, los pesticidas enriquecidos en la disposición de enriquecimiento por SPE se conducen, con el eluyente rico en agua compuesto de un 95% en volumen de agua y un 5% en volumen de ACN, en dirección opuesta, de la disposición de enriquecimiento por SPE 22 a la columna HPLC 28. La bomba de gradiente 2 eluye los componentes de la disposición de enriquecimiento por SPE en un principio de inversión de flujo a la columna HPLC analítica. En ésta, los pesticidas liberados en esencia de la matriz se separan y se detectan con el detector 32. Esto sucede a través del gradiente utilizado para la separación en la columna HPLC 28. Comenzando con un alto contenido en agua, la fuerza de elución se aumenta lentamente aumentando el contenido en metanol y/o ACN. Al mismo tiempo se regenera o se limpia la columna cromatográfica HILIC 14 con la bomba de gradiente 12.

[0031] En un ejemplo de realización alternativo, no representado, se efectúa un análisis por GC, en lugar de conducir la muestra separada de la matriz a una columna HPLC. Para ello se lava en primer lugar en un recipiente separado la muestra de la disposición de enriquecimiento por SPE. A continuación, la muestra así preparada puede analizarse de forma ya conocida mediante una cromatografía en fase gaseosa.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de muestras y el análisis de pesticidas en muestras, **caracterizado por** las etapas de:
(a) aplicación de una muestra, disuelta en un eluyente preponderantemente pobre en agua y/u homopolar, en una columna cromatográfica HILIC (14) con un eluyente preponderantemente pobre en agua y/u homopolar;
(b) enriquecimiento de al menos una gran parte de los pesticidas contenidos en la muestra en una disposición de enriquecimiento por SPE (22);
(c) conducción de la parte de muestra enriquecida con pesticidas en la disposición de enriquecimiento por SPE en dirección opuesta a la disposición de enriquecimiento por SPE, a través de la segunda columna cromatográfica con un eluyente preponderantemente rico en agua y/o polar, mediante la conmutación de una disposición de válvulas después de un tiempo de enriquecimiento seleccionado; y
(d) detección de los componentes de la muestra separados en la segunda columna cromatográfica.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** una parte de la corriente de muestra que fluye a través de la disposición de enriquecimiento por SPE (22) durante un tiempo de enriquecimiento seleccionado se detecta directamente.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque**, en el segundo estado de conmutación de la disposición de válvulas (20, 24), la bomba (12) regenera y/o limpia la columna cromatográfica HILIC (14).

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la columna cromatográfica HILIC (14) se regenera durante una parte del tiempo de análisis en el segundo estado de conmutación con la bomba (18) en el espectrómetro de masas (32), y durante el tiempo de análisis restante se elabora una parte de muestra de pesticida para la cromatografía en fase gaseosa mediante la columna (14).

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el eluyente pobre en agua y/u homopolar de la bomba (12) contiene al principio al menos un 90% en volumen de acetonitrilo (ACN).

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el eluyente pobre en agua y/u homopolar de la bomba (12) contiene al principio entre un 0 y un 10% en volumen, preferentemente un 5% en volumen, de agua.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el eluyente rico en agua y/o polar de la bomba (18) contiene al menos un 90% en volumen de agua.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el eluyente rico en agua y/o polar de la bomba (18) contiene entre un 3 y un 10% en volumen, preferentemente un 5% en volumen, de acetonitrilo y/o MeOH.

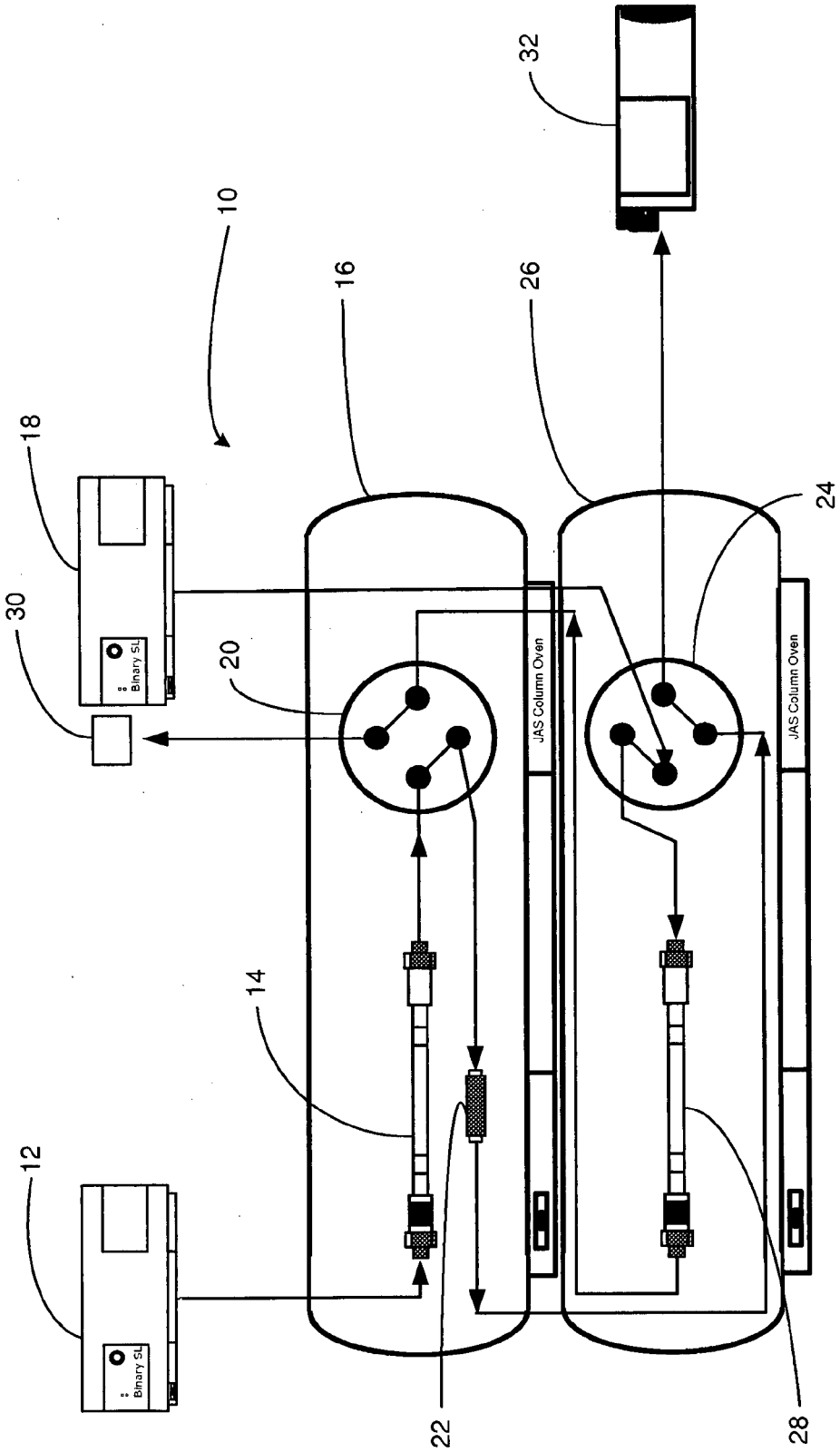
32
10
16
26
18
24
30
20
JAS Column Oven
JAS Column Oven
Binary SL
14
12
Binary SL
22
28

Figura 1

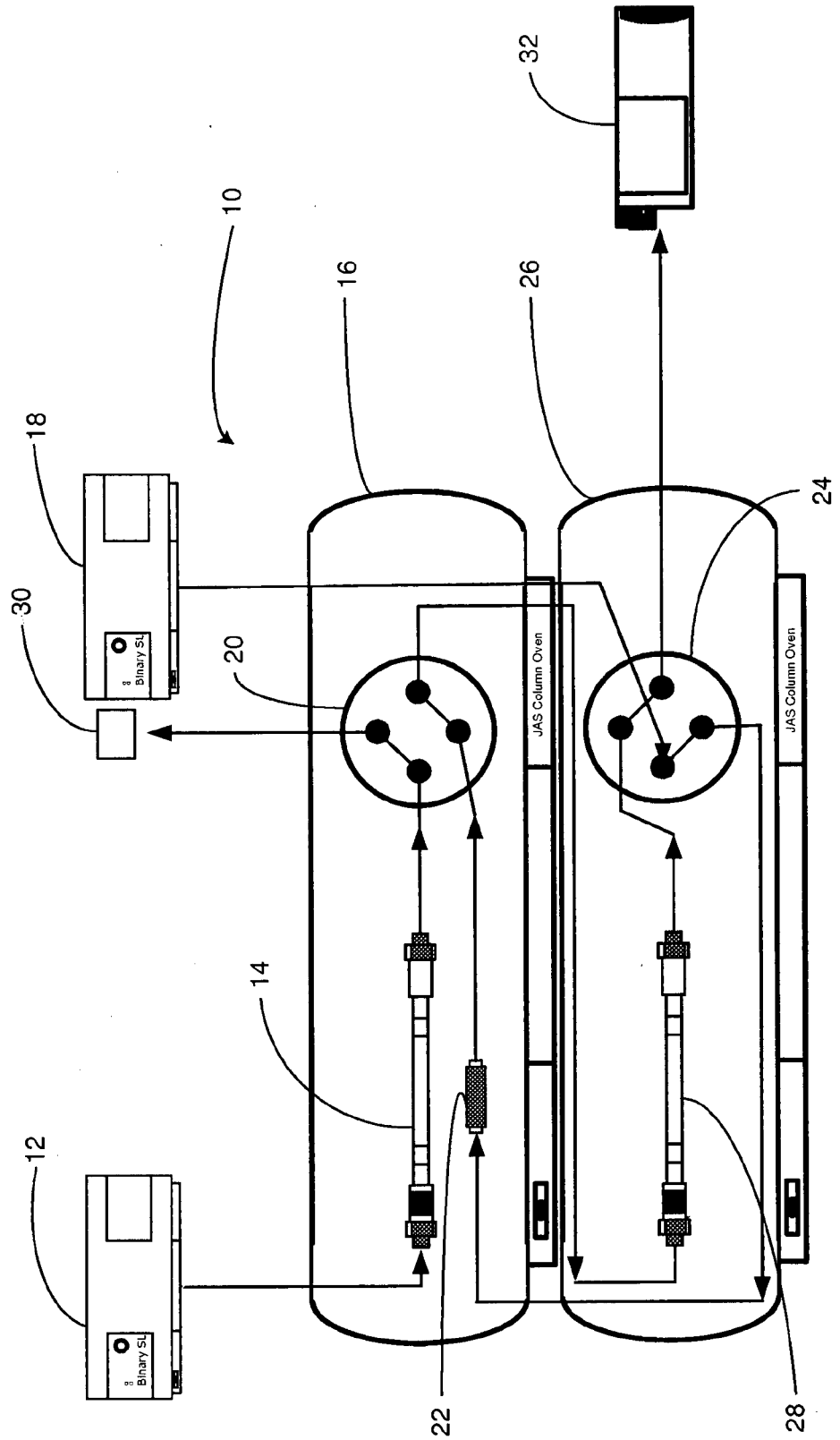
32
10
16
26
18
24
30
20
JAS Column Oven
JAS Column Oven
14
12
Binary SL
Binary SL
22
28

Figura 2

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citada por el solicitante lo es solamente para utilidad del lector, no formando parte de los documentos de patente europeos. Aún cuando las referencias han sido cuidadosamente recopiladas, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citado en la descripción

• US 2010024527 A1, LAMARR WILLIAM A
[0005]

Bibliografía no de patentes citada en la descripción

• **VON M.ANASTASSIADES ; E. SCHERBAUM ; D. BERTSCH.** Validation of a Simple and Rapid Multiresidue Method (QuEChERS) and its Implementation in Routine Pesticide Analysis. *Poster auf dem MGPR Symposium,* Mai 2003
[0002]