

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 031**

51 Int. Cl.:

G01N 30/46 (2006.01)

G01N 30/32 (2006.01)

B01D 53/02 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2011 PCT/EP2011/058404**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11147801**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2011 E 11722783 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2577287**

54 Título: **Método e instrumentación para separaciones por cromatografía multidimensional integral mediante un modulador de microflujo**

30 Prioridad:
27.05.2010 IT ME20100011

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2018

73 Titular/es:
**MONDELLO, LUIGI (100.0%)
Via Consolare Pompea 1831 bis
98165 Vill. Ganzirri (Messina), IT**

72 Inventor/es:
MONDELLO, LUIGI

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 683 031 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

Método e instrumentación para separaciones por cromatografía multidimensional integral mediante un modulador de microflujo

5 La presente invención se refiere a un modulador, para ser utilizado para separaciones cromatográficas multidimensionales integrales, para atrapar y liberar fracciones de soluto con muestra (atrapadas en un bucle capilar de volumen fijo o variable), que derivan de una columna capilar con un diámetro interno que oscila entre 0.01 mm a 0.53 mm, en otra columna capilar con un diámetro interno que varía de 0.01 mm a 0.53 mm. El microdispositivo se ha integrado en un sistema de cromatografía de gases, compuesto por dos hornos para el control de temperatura independiente para las dos columnas; el microdispositivo se caracteriza, internamente, por un sistema de canales que
10 permite la división controlada del flujo de gas, la entrada al segundo capilar, para generar una velocidad lineal de gas óptima y para liberar la presión en exceso, con el objetivo de alcanzar la máxima eficiencia de separación en la segunda columna. Además, el sistema está equipado con un segundo dispositivo, para dividir el flujo que sale de la segunda columna en dos detectores diferentes que operan a la misma o a diferentes presiones.

15 La cromatografía de gases (CG) generalmente se logra mediante el uso de una columna capilar para la separación de los constituyentes de una mezcla. La cromatografía de gases multidimensional integral (GCxGC) es ciertamente la técnica más revolucionaria e innovadora en el campo de la cromatografía de gases. En un sistema integral de cromatografía de gases multidimensional ideal, la capacidad pico es igual al producto de las dos capacidades individuales pico ($n_1 \times n_2$) en las dos dimensiones. Aunque tal valor es optimista, la capacidad pico generada por los sistemas GCxGC ciertamente no tiene precedentes y es particularmente adecuada para la separación de mezclas
20 complejas de volátiles, antes del sistema de detección. Las ventajas de estos métodos, en comparación con los convencionales (unidimensionales) son principalmente tres:

- aumento de poder de separación
- sensibilidad mejorada
- formación de cromatogramas bidimensionales con regiones ocupadas por compuestos químicamente similares.

25 Este aspecto es particularmente importante para la identificación de compuestos desconocidos, en ausencia de bibliotecas espectrales de masas o cuando los espectros de masas son muy similares (por ejemplo, series homólogas de compuestos tales como ácidos grasos, terpenos, etc.).

30 Entre todos los métodos integrales de cromatografía multidimensional, la GCxGC ha sido probablemente el más aplicado y desarrollado. Una separación GCxGC normalmente se obtiene en dos columnas capilares, unidas en serie, y con un dispositivo de transferencia, definido como modulador, posicionado entre las dos columnas. La función del modulador es aislar, volver a concentrar e introducir fracciones de efluente de la columna primaria en la columna capilar secundaria, de forma continua durante todo el análisis. El tiempo requerido para completar este proceso se define como el período de modulación (generalmente entre 1 y 10 segundos). La columna primaria es generalmente
35 apolar y, por lo tanto, la separación se basa en las diferencias de punto de ebullición (no solo en éstas) entre los diferentes analitos. Cada modulación genera fracciones que experimentan una separación rápida adicional en la segunda columna, generalmente de química polar: los compuestos isovolátiles se resuelven sobre la base de interacciones basadas en la polaridad (dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, efectos de polarización).

40 La GCxGC fue introducida en 1991 por John B. Phillips y Zaiyou Liu (Z. Lui et al. J. Chromatogr. Sci. 29, 227, 1991., Patente de los Estados Unidos 5,135,549 Ago. 9, 1992) usando un modulador térmico. Más tarde, se introdujeron otros moduladores que usaban fluidos criogénicos, principalmente (R.M. Kinghorn et al. J. High Resolut. Chromatogr. 21, 620, 1998; E.B. Ledford et al. J. High Resolut. Chromatogr. 23, 202, 2000; J. Beens et al. J. Chromatogr. A 919, 127 2001, Patente de los Estados Unidos 6,838,288 B2, Jan. 5, 2005; y M. Adahchour et al. Analyst 128, 213 2003, Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2005/0106743 A1 May 19, 2005). Los moduladores anteriormente
45 mencionados requieren fluidos criogénicos y dispositivos adecuados para introducir los fluidos criogénicos en el horno de cromatografía de gases. En la última década, los moduladores que utilizan fluidos criogénicos, como el CO₂ y el N₂, han ganado popularidad. Sin embargo, se debe enfatizar que el uso de fluidos criogénicos es bastante costoso, considerando las cantidades empleadas.

50 En consecuencia, el desarrollo de técnicas de GCxGC sin criogénicos siempre ha generado interés en diversos grupos de investigación.

El primer modulador neumático para GCxGC, sin necesidad de fluidos criogénicos, fue descrito por Bruckner et al. Anal. Chem. 70, 2796 1998, y luego modificado por J. Seeley (J. V. Seeley, et al. Anal. Chem. 72, 4346 2000; Patente de los Estados Unidos 6,632,268 Feb. 4, 2002).

55 El último sistema se basa en el empleo de una válvula de 6 puertos, ubicada entre la primera y la segunda dimensión. Dos etapas caracterizan el proceso de modulación: una primera etapa de acumulación, durante la cual se acumula una banda de cromatografía de la primera dimensión en un ciclo de muestra, seguida de una etapa de reinyección, durante la cual la banda se introduce en la cabeza de la segunda columna, a través de un alto flujo de gas. La válvula

se mantiene en la posición de acumulación durante aproximadamente el 80% del período de modulación, y el 20% restante de tiempo se usa para la reinyección; durante el último período, el efluente de la columna primaria se dirige a los desechos. Usando tal configuración, las bandas de cromatografía de columna primaria se comprimen en el tiempo, más que en el espacio. El tiempo de análisis en la segunda dimensión es muy rápido y en condiciones no óptimas para un análisis rápido. Un inconveniente adicional está relacionado con la posición de la válvula de diafragma dentro del horno, lo que limita el uso de una columna de cromatografía a la temperatura operativa máxima de la válvula. Se llevaron a cabo otros experimentos usando moduladores neumáticos con límites de temperatura mejorados (por ejemplo, colocando la cabeza de la válvula dentro del horno y dejando las partes restantes afuera). Más tarde, otros enfoques de GCxGC sin agente criogénico, usando otro sistema modulador neumático, fueron estudiados por el mismo autor (Bueno P.A. et al. J. Chromatogr. A 1027, 3, 2004, Patente de los Estados Unidos 7,247,189 B2 Jul. 24, 2007). El modulador contiene dos bucles de muestreo, que se conectan a través de dos ramas metálicas a una válvula solenoide de 3 vías, que recibe un gas auxiliar, a través de un sistema electrónico de control de presión. Uno de los dos bucles de muestra se llena con el efluente de la primera columna cuando la válvula solenoide está en la etapa de recolección; el tiempo requerido para llenar el ciclo generalmente es inferior a 2 segundos, y esto depende del flujo de gas de la columna primaria. Al final de la etapa de recolección, el bucle se vacía usando un flujo de gas alto (alrededor de 20 mL/min), cambiando el solenoide a la fase de reinyección, cuya duración es de aproximadamente 0.1 segundos. Esta etapa de recopilación y reinyección se produce en un modo alternativo en cada ciclo.

En los experimentos de GCxGC convencionales, los capilares de primera y segunda dimensión siempre se operan en condiciones de flujo de gas de compensación, es decir, casi ideal en la columna primaria y demasiado alto en la segunda. Tal aspecto negativo fue eludido por Tranchida P.Q. et al. in 2009 (Analytical Chemistry, vol. 81(20), 2009, pages 8529-8537). Los autores describen un sistema GCxGC modulado criogénicamente que consiste en un apolar de 30 m x 0.25 mm i.d. columna unida, por medio de una unión en T, a un detector de ionización de llama conectado de alta resolución de 1 m x 0.05 mm i.d. uno polar y a 0.20 m x 0.05 mm i.d. segmento capilar sin recubrimiento; este último está conectado a una válvula dividida de accionamiento manual, ubicada en la parte superior del segundo GC. La generación de velocidades lineales óptimas de gas en ambas dimensiones se logra mediante la regulación de la válvula de aguja, por lo tanto, se dividen los flujos de gas a la salida de la primera.

El documento US 2010/0101411 (TIPLER) describe un dispositivo de microfluidos de la técnica anterior (FIGURA 46) que puede usarse como modulador en cromatografía multidimensional.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un dispositivo de cromatografía de acuerdo con la reivindicación 1.

En las reivindicaciones 1-7 se definen aspectos adicionales de dicho dispositivo. En las reivindicaciones 8-9 se definen diversos usos de dicho dispositivo.

Dicho dispositivo opera con un objetivo diferente con respecto al sistema introducido por Tranchida et al (Analytical Chemistry, vol. 81(20), 2009, pages 8529-8537) donde el objetivo del dispositivo de flujo dividido era solo reducir la velocidad lineal en la segunda dimensión.

Descripción detallada de las figuras

El modulador para cromatografía multidimensional integral (GCxGC) se ilustra en las FIGURAS 1-3, de acuerdo con la presente invención. En resumen, el modulador atrapa y libera fracciones de soluto de una muestra (recogidas en un bucle capilar de volumen variable (FIGURAS 1, 2) o fijo (FIGURA 3), derivadas de una columna capilar con un diámetro interno que varía entre 0.01 mm. a 0.53 mm, en otra columna capilar con un diámetro interno que varía de 0.01 mm a 0.53 mm. El microdispositivo se ha integrado en un sistema de cromatografía de gases, compuesto por dos hornos para el control de temperatura independiente de las dos columnas; el microdispositivo se caracteriza, internamente, por un sistema de canales (FIGURAS 1-3) que permite la división controlada del flujo de gas, que entra en el segundo capilar, para generar una velocidad lineal de gas óptima y para liberar la presión en exceso, con el objetivo de alcanzar la máxima eficiencia de separación en la segunda columna. Además, el sistema está equipado con un segundo dispositivo, para dividir el flujo que sale de la segunda columna en dos detectores diferentes que operan a la misma o a diferentes presiones. En referencia a la FIGURA 1, los sistemas comprenden dos hornos 1,6 de cromatografía de gases, dos reguladores 2,7 de presión automáticos, dos inyectores 3,9, dos columnas 4,22 capilares separativas, que están unidas al modulador 10, un detector 28 que funciona a presión ambiente o a cualquier otra presión. El dispositivo 20 puede consistir, alternativamente, en un detector o en una válvula de aguja, que se puede conectar a una válvula (21) solenoide de dos posiciones, usando el capilar 19 como una columna de separación o desactivada, respectivamente. Al final de la segunda columna (22), un segundo dispositivo (23), regulado mediante el uso de una válvula (30) de aguja, permite la división del flujo en dos capilares (24, 26) diferentes, unidos a dos detectores (25, 28) que operan a presiones iguales o diferentes. Además, un aspecto particularmente importante está representado por la división del flujo, del efluente recogido en el bucle 14 capilar de acumulación, que permite la optimización de la velocidad lineal de la columna (22) secundaria y la liberación de la presión en exceso, cuando el ciclo se vacía mediante un aumento de presión, que se genera al cambiar la válvula 8 de 3 vías. La división del flujo se obtiene a través de canales, localizados internamente en el dispositivo 10, conectados a dos capilares

5 caracterizados por una longitud y/o diámetro diferente (uno representado por la columna 22 y la otra mediante un capilar 19, conectado al dispositivo 20,21). La división del flujo se regula mediante una válvula (29) de aguja integrada en el dispositivo 10, y el dispositivo 20 funciona como un detector (en tal configuración, el dispositivo 21 no está presente). En un aspecto que no forma parte de la presente invención, la función de la válvula 29 de aguja puede sustituirse por el dispositivo 20, que, en tal caso, no es un detector sino una válvula de aguja.

10 En resumen, el sistema permite la introducción de una mezcla de compuestos, a través del inyector 3 y en la columna 4, donde se produce la primera separación a la temperatura independiente del cromatógrafo 1 de gases. Los compuestos se transfieren al segundo cromatógrafo (6) de gases, ubicación del modulador, a través de una línea (5) de transferencia calentada, que se mantiene a una temperatura adecuada. Un esquema del modulador, con un bucle (38) interno integrado, se presenta en la FIGURA 3. En este caso, el mecanismo de modulación del dispositivo 35 es equivalente al descrito previamente (10), con la excepción del número de puertos. Una ampliación del dispositivo 35 se ilustra en la FIGURA 4, enfatizando el punto de introducción de la válvula (29) de aguja.

15 En resumen, los compuestos separados en la columna 4 capilar, entran en el modulador 10 (o 35) a través del puerto 11 (o 37), después de dejar la primera cromatografía de gases, a través de la línea (5) de transferencia. La modulación se divide en dos etapas, ilustradas en la FIGURAS 2, 3A y B. En detalle, los componentes se acumulan en los canales de comunicación del modulador 11-12-13, localizados internamente, y en el bucle 14 de muestra (o bucle 38 interno, a través del canal que conecta 37 a 38), para un período variable entre 1-10 segundos, empujado por el flujo derivado del dispositivo 2, mientras que la válvula 8 está en la posición (31) "normalmente cerrada" y en la posición (32) "normalmente abierta", es decir, con un flujo de gas en la rama 34 (FIGURAS 2A, 3A), que está conectado al dispositivo de modulación a través del puerto 16 (o 39). Al final de la etapa de acumulación, la válvula 8 se conmuta a la posición 32, es decir, con un flujo de gas en la rama 33, permitiendo el lavado del capilar 14 (o del bucle 38 interno), a través de los canales 12-13 y 15- 16-17/18 (o 36-38-40/41) internos (FIGURAS 2B, 3B). La duración de la etapa de descarga es variable, es decir, entre 0.1 y 1 segundo. Al final de la etapa de descarga, la válvula 8 se conmuta, permitiendo una nueva etapa de acumulación en el capilar 14 (o bucle interno 38), y, al mismo tiempo, permitiendo una separación rápida en la columna 22 y/o 19 y elución del efluente en los dispositivos 20, 25 y 28. Las particularidades de caracterización de la invención están representadas por los canales de flujo dividido, localizados internamente en el dispositivo, concretamente 16-17 y 16-18 (o 38-40 y 38-41), regulando la válvula (29) de aguja integrada apropiadamente, en el caso de que dispositivo 20 se emplee como detector. En el caso de que el dispositivo 20 sea una válvula de aguja, la división del flujo depende de la regulación de la válvula. Tal procedimiento es de la mayor importancia, ya que permite la optimización de la velocidad lineal en la segunda columna (22) y, sobre todo, liberar la presión en exceso en la rama 16-17 (o 38-40) y, en consecuencia, en la columna 22. En este caso, se puede usar la válvula (21) solenoide de dos posiciones (abierta/cerrada). Durante el enjuague del capilar 14 (o 38), la válvula 21 puede dejarse abierta, o en la posición cerrada, permitiendo el paso completo de los compuestos eluidos desde la columna primaria, que se transfieren a la segunda columna (22). En este punto, la válvula 21 solenoide se abre durante toda la duración del análisis de segunda dimensión, permitiendo la liberación de la presión en exceso.

Una vez lograda la separación en la segunda columna, el microdispositivo 23, equipado con la válvula 30 de aguja, permite la división del efluente de la columna (22) secundaria, utilizando dos capilares 24 y 26, de dimensiones adecuadas, entre dos detectores (25 y 28), operados a presiones iguales o diferentes.

40 Una separación típica obtenida usando el sistema representado en la FIGURA 1, objeto de la invención, se ilustra en la FIGURAS 5 y 6. En particular, la FIGURA 5 muestra la separación de un aceite esencial de menta, obtenida con un espectrómetro de masas de cuadrupolo, mientras que la FIGURA 6 muestra la separación de la misma muestra con un detector de ionización de llama. Los dos cromatogramas bidimensionales se obtuvieron simultáneamente, utilizando las siguientes condiciones experimentales:

columna de la primera dimensión (4): 20 m x 0.1 mm i.d. x 0.1 µm de espesor de película de 0.1 µm (quiral);

45 programa de temperatura: 50 - 200°C a 5°C/min;

columna de segunda dimensión (22): 2.5 m x 0.1 mm i.d. x 0.1 µm de espesor de película (polar);

programa de temperatura: 50 (3 min)-200°C a 5°C/min;

capilar (19): 0.1 m x 0.1 mm i.d.;

capilar (24): 0.5 m x 0.1 mm i.d.;

50 capilar (26): 1 m x 0.1 mm i.d.;

bucle de muestra (14): 0.1 m x 0.51 mm i.d.;

controlador de flujo automático (2), velocidad lineal constante: 751 kPa;

ES 2 683 031 T3

controlador de flujo automático (7), velocidad lineal constante: 620 kPa;

volumen inyectado: 3 μ L;

relación de división: 10:1.

Temperatura de la interfaz del espectrómetro de masas (27): 250°C;

5 frecuencia de muestreo del espectrómetro de masas (28): 25 Hz;

frecuencia de muestreo del detector de ionización de llama (25): 125 Hz.

Periodo de modulación: 5.5 segundos, de los cuales 5.3 segundos para la acumulación + 0.2 segundos para la reinyección.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para cromatografía que comprende:

5 - un modulador (10) que tiene (i) un puerto (11,37) de entrada para recibir el efluente de una primera columna (4) de cromatografía, y (ii) dos puertos independientes (12, 16, respectivamente 36, 39) para recibir un flujo desde uno o más dispositivos (7) de control de flujo y/o presión electrónicos situados externamente con respecto a dicho modulador (10);

10 - uno o dos bucles (14) de acumulación de muestra capilar situados externamente con respecto a dicho modulador (10), o uno o dos bucles (14) de acumulación de muestra capilar integrados en dicho modulador (10); comprendiendo el modulador (10) además un sistema de canales integrados, por lo que dichos bucles capilares de acumulación de muestra se conectan entre dichos primer (11,36) y segundo (16, 39) puertos independientes y a dicho puerto (11,37) de entrada;

- un inyector (9) directamente conectado al modulador (10);

caracterizado porque el dispositivo comprende además:

15 - una válvula (29) de aguja integrada en el modulador (10), para regular el flujo que sale de dichos bucles (14) capilares de acumulación de muestra, y

20 - primer y segundo canales (16-17, 16-18, respectivamente 38-40, 38-41) conectados a bucles (14) capilares de acumulación de muestra, integrados dichos canales en dicho modulador (10), conectado el primer canal además a una segunda columna (22) de cromatografía, conectado el segundo canal además a una columna (19) capilar, para dividir, de forma controlada, utilizando la válvula de aguja, el flujo que sale de los bucles (14) capilares de acumulación y para liberar la presión en exceso en el primer canal y, en consecuencia, en la segunda columna (22) de cromatografía, al vaciar dicho bucle capilar (14) de acumulación.

2. Un dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende uno o dos bucles (14) capilares de muestra situados externamente con respecto al modulador (10), **caracterizados por** una relación entre la longitud capilar y el diámetro interno entre 5 y 40.

25 3. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende uno o dos canales de acumulación integrados internamente, con un volumen fijo.

4. Un dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en el sistema de canales integrados, los canales de conexión internos están dispuestos en grupos y de manera discontinua y estos grupos están conectados entre sí a través de uno o dos capilares de acumulación situados externamente con respecto al modulador (10).

30 5. Un dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde en el sistema de canales integrados, los canales de conexión internos están dispuestos de manera continua, a través de un canal de acumulación interno.

6. Un dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las dos columnas (4, 22) de cromatografía están instaladas en uno o más hornos (1, 6) de cromatografía de gases.

35 7. Un dispositivo, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inyector (9) está conectado a un controlador de flujo automático o a un controlador (7) de presión automático.

8. Uso de un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 en un método de GCxGC que comprende un espectrómetro de masas en la salida de la segunda columna, o cualquier otro detector de GC.

40 9. Uso de un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 en cromatografía de gases unidimensional, como sistema rápido de inyección a alta presión de muestras vaporizadas dentro del inyector (9), conectado directamente al modulador (10), y cuando el puerto (11) de entrada está cerrado.

FIG. 1

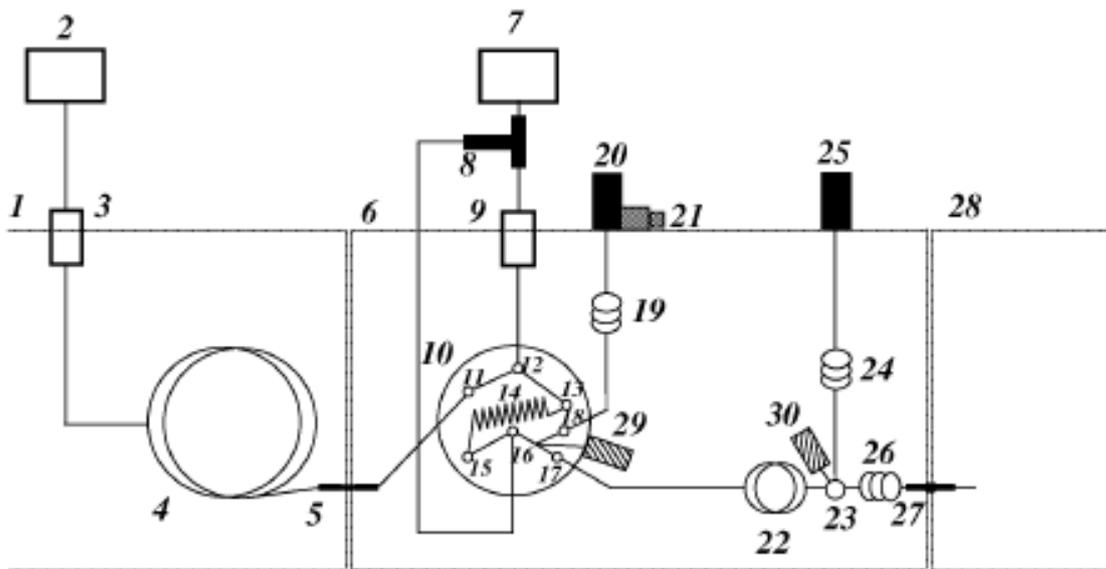


FIG. 2

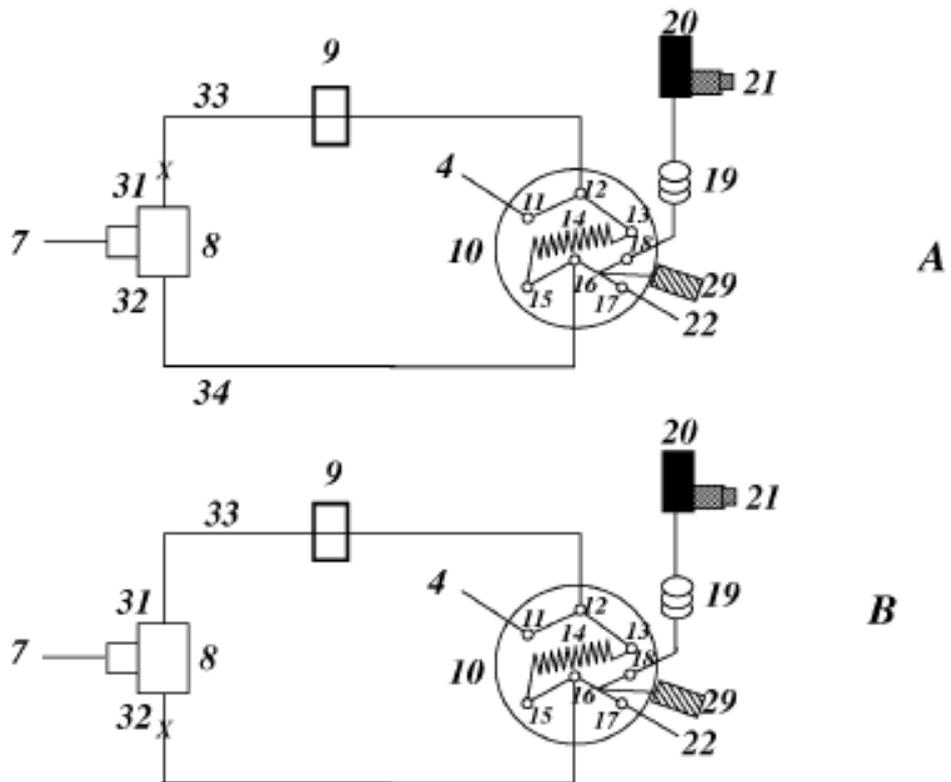


FIG. 3

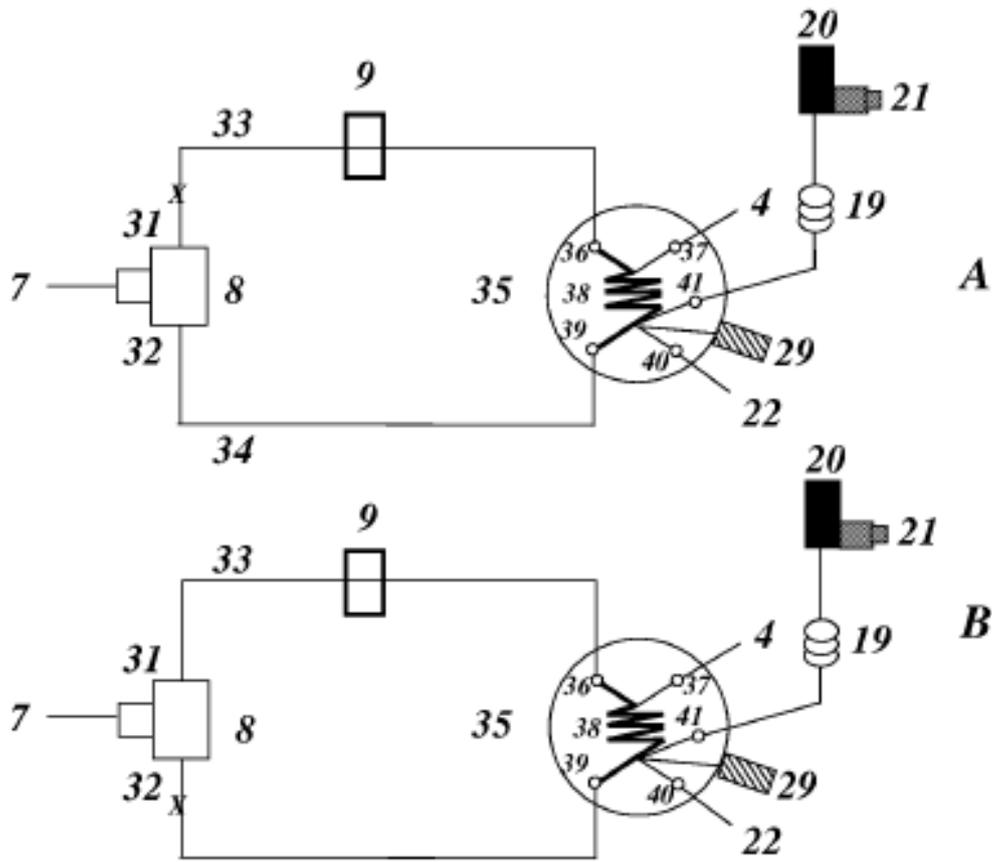


FIG. 4

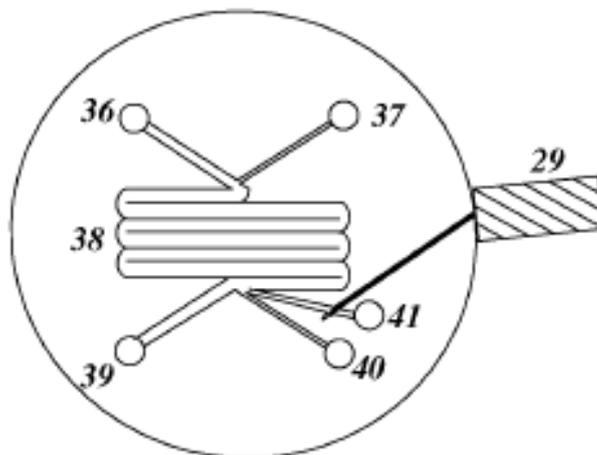


FIG. 5

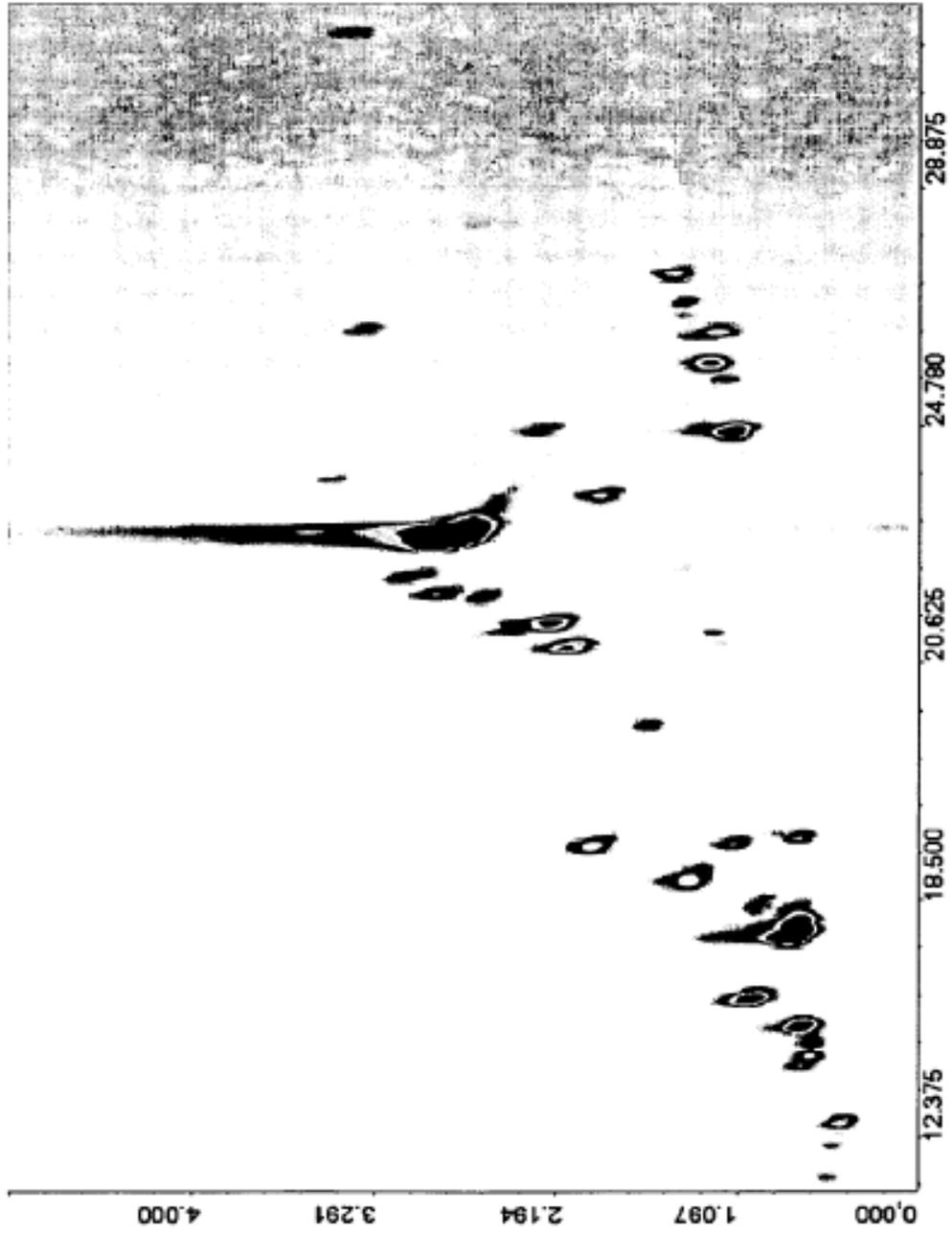


FIG. 6

