

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 481**

51 Int. Cl.:

B01J 20/26 (2006.01)

G01N 1/40 (2006.01)

B01J 20/30 (2006.01)

B01J 20/28 (2006.01)

G01N 30/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2013** **E 13161362 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 2783748**

54 Título: **Uso de un sorbente para extraer micotoxinas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2019

73 Titular/es:

BIOTAGE AB (100.0%)
Kungsgatan 76
753 18 Uppsala, SE

72 Inventor/es:

NIVHEDE, DAVID;
RUDOLFSSON, MARKUS;
LEEMAN, MATS;
BILLING, JOHAN;
YILMAZ, ECEVIT y
SENIOR, ADAM

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 732 481 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

Uso de un sorbente para extraer micotoxinas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de un sorbente en la extracción en fase sólida para extraer micotoxinas polares.

10 ANTECEDENTES

La extracción en fase sólida (SPE) es un método de separación donde varios compuestos disueltos o suspendidos en una mezcla se separan de otros compuestos en la mezcla al ponerlos en contacto con un material en fase sólida definido químicamente. La separación se basa en las propiedades físicas y químicas de los compuestos, y en su capacidad para interactuar más o menos fuertemente con el material en fase sólida. Los laboratorios analíticos utilizan la extracción en fase sólida para concentrar y purificar muestras de compuestos específicos, o analitos, para su análisis. La extracción en fase sólida se puede utilizar para aislar analitos de interés a partir de una amplia variedad de matrices, que incluyen orina, sangre, agua, bebidas, alimentos, suelo y tejido animal.

Para separar una mezcla en componentes deseados y no deseados, SPE explota las diferencias en la afinidad de los solutos individuales en una mezcla que se disuelven o suspenden en un líquido para un formar material sólido, típicamente poroso, a través del cual se pasa la muestra (conocida como la fase sólida). El resultado es que, típicamente, los analitos de interés deseados y/o las impurezas no deseadas en la muestra se retienen en la fase sólida durante una fase de carga. La exposición posterior del material en fase sólida a disolventes o mezclas de disolventes de "fuerzas" de elución crecientes conduce a la elución del material débilmente unido, típicamente impurezas, seguido del analito o analitos de interés. La porción que pasa a través de la fase sólida se recolecta o se desecha, dependiendo de si contiene el analito o analitos deseados o impurezas no deseadas.

Cuando se va a extraer un compuesto polar en un medio acuoso, se puede emplear una fase estacionaria que contenga funcionalidades no polares, que pueden consistir en cadenas cortas de carbono unidas a un material inorgánico tal como la sílice u otras entidades hidrófobas incluidas químicamente en un polímero utilizando monómeros o compuestos apropiados. Este tipo de fase estacionaria adsorberá moléculas polares que luego se pueden eluir y recolectar a medida que la polaridad del disolvente eluyente disminuye progresivamente.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por una o más especies de hongos portadores de esporas que colonizan o bien los cultivos alimenticios en el campo o bien los productos alimenticios después de la cosecha. Algunas especies de hongos producen más de una micotoxina y los productos alimenticios pueden estar contaminados por más de una especie. Además de su toxicidad, muchas micotoxinas también han sido implicadas como carcinógenos y genotoxinas. Las micotoxinas exhiben una amplia gama de estructuras químicas y propiedades fisicoquímicas asociadas, lo que crea desafíos significativos para su extracción y posterior detección y cuantificación. La regulación y la legislación para el análisis de la contaminación por micotoxinas ha establecido que micotoxinas son importantes a nivel mundial para una variedad de productos alimenticios. Las regulaciones de la UE incluyen extensa información de los problemas de contaminación de los alimentos con las micotoxinas y los límites recomendados de contaminación, véase 2006R1881: 20100701.

Los métodos actuales para la extracción de micotoxinas pueden emplear anticuerpos anti-toxina específicos, utilizados frecuentemente en columnas de inmunoafinidad, o SPE con un copolímero con equilibrio hidrófilo -lipofílico (HLB). La desventaja de estos métodos es que la extracción con anticuerpos es costosa y sensible a las condiciones de almacenamiento, mientras que los copolímeros HLB son ineficientes debido a los problemas con la retención de las micotoxinas adsorbidas durante los procedimientos de lavado, especialmente cuando se utilizan solventes de elución fuerte, lo que produce recuperaciones inaceptablemente bajas.

El documento WO03101580 describe un método para unir micotoxinas a un portador sólido poniendo en contacto una solución, suspensión o aerosol que contiene micotoxinas con un polímero impreso en micotoxinas y separando a continuación la micotoxina unida de la solución, suspensión o aerosol.

El documento EP2189213 describe un adsorbente para eliminar las sustancias tóxicas de la sangre o el plasma. El adsorbente comprende una esfera porosa basada en divinil benceno en la que los monómeros o polímeros se unen covalentemente a grupos vinilo colgantes de la esfera porosa dejando los monómeros o polímeros que sobresalen de la superficie de la esfera. Los monómeros adecuados pueden ser aminas primarias, secundarias o terciarias, por ejemplo, 4-vinilimidazol y 2-vinilpiridina. Según los inventores del documento EP2189213, estos monómeros o polímeros hacen que el adsorbente sea más hemocompatible, al minimizar la adsorción de proteínas y células en la

superficie de los adsorbentes.

El documento US20060058413 describe un material adsorbente poroso para eliminar toxinas, fármacos o productos farmacéuticos unidos a la albúmina. El adsorbente comprende del 5 al 30 de % en peso de monómeros de 5 vinilimidazol y del 50 al 85 de % en peso de divinilbenceno.

El documento US2011/0054132 describe un material sorbente impreso molecularmente para la absorción de micotoxinas, que comprende un polímero basado en varios monómeros, tales como ácido acrílico y derivados, ácido metacrílico y derivados, estirenos, vinil imidazol, vinilpiridinas, etc.

10

RESUMEN DE LA INVENCION

Para extraer compuestos polares tales como micotoxinas utilizando SPE, incluso cuando se utilizan solventes eluyentes fuertes, la fase estacionaria debe tener preferiblemente una alta afinidad por el(los) compuesto(s) a 15 extraer y unirse al(los) compuesto(s) lo suficientemente fuerte como para soportar los pasos de lavado durante los cuales se eliminan las impurezas no deseadas.

La presente invención se refiere al uso de un sorbente en extracción en fase sólida (SPE) para extraer micotoxinas polares, donde el sorbente comprende: una porción de núcleo que incluye una esfera de núcleo, la esfera de núcleo 20 que incluye estireno y divinilbenceno (DVB); y una porción más externa, donde la porción central y la porción más externa del sorbente incluyen diferentes composiciones de uno o más polímeros, donde al menos la porción más externa del sorbente comprende un polímero reticulado y el polímero reticulado incluye un imidazol polimerizado con monómero, donde la relación en peso del monómero que contiene imidazol incluida en la parte más externa a la esfera de núcleo es de al menos 0,05.

25

También se describe un método para extraer un compuesto polar de una muestra utilizando extracción en fase sólida, que comprende:

- proporcionar un sorbente según la presente invención;
- 30 • proporcionar una muestra en fase líquida;
- opcionalmente, equilibrar y humedecer el sorbente usando un disolvente o solución adecuada;
- poner el sorbente en contacto con la muestra en fase líquida permitiendo que el compuesto a extraer se una al sorbente;
- opcionalmente, lavar el sorbente utilizando uno o más disolventes o soluciones adecuadas y opcionalmente 35 recoger las muestras lavadas; y
- opcionalmente, eluir el compuesto polar extraído utilizando un disolvente o solución adecuada.

Se describe además un método para producir el sorbente según la presente invención, que comprende:

- 40 a) proporcionar al menos un compuesto aromático que contenga nitrógeno, un agente de reticulación, un disolvente y un iniciador de polimerización;
- b) opcionalmente, proporcionar esferas preformadas;
- c) opcionalmente, proporcionar un estabilizador;
- d) mezclar los componentes del paso a) con las esferas del paso b) o con el estabilizador del paso c);
- 45 e) dejar que la mezcla del paso d) se polimerice; y
- f) aislar el sorbente obtenido.

La descripción incluye también un cartucho de extracción en fase sólida que comprende el sorbente, una columna de separación que comprende el sorbente y un monolito que comprende un polímero parcialmente reticulado 50 basado en compuestos aromáticos que contienen nitrógeno.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1, estructura química de diversas micotoxinas.

55

Figura 2, muestra una comparación de la unión de micotoxinas mediante diferentes materiales y pasos de lavado. Las cifras son el promedio de 12 micotoxinas diferentes: Aflatoxina B1, aflatoxina G1, ergotamina, ergocriptina, ergocornina, esterigmatocistina diacetoxiscirpenol, ochatoxina A, fumonisina B1, zearalenona (ZON), ácido ciclopiazónico y citrina.

60

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente invención, los términos "compuestos aromáticos que contienen nitrógeno" y "monómeros aromáticos que contienen nitrógeno" significan lo mismo y se utilizan indistintamente.

Las micotoxinas son a menudo polares o altamente polares y no se extraen con facilidad de disolventes acuosos utilizando polímeros comunes o materiales de fase sólida de SPE a base de sílice (sorbentes). Cuando las micotoxinas se unen a los sorbentes de SPE comunes, se unen típicamente con afinidades débiles que limitan severamente la discriminación entre las impurezas y los analitos deseados que se puede lograr con los disolventes de lavado comunes.

10 Los inventores de la presente invención han descubierto que se puede utilizar una resina polimérica reticulada que comprende nitrógeno que contiene compuestos aromáticos para extraer compuestos polares o incluso altamente polares, tales como las micotoxinas.

La resina polimérica reticulada se puede utilizar como un sorbente de extracción en fase sólida (SPE) por sí sola o en combinación con otros materiales u otros sorbentes, y cuando el compuesto polar se une al sorbente en presencia de otras impurezas o compuestos de matriz, se observa poca o ninguna pérdida de compuesto unido durante los pasos de lavado. El material sorbente es mucho menos costoso de producir que los sorbentes de inmunoafinidad comúnmente utilizados y el material es superior al de otros sorbentes poliméricos o a base de sílice comúnmente utilizados para la SPE con afinidad y que retienen compuestos polares. La composición de la resina permite que se puedan aplicar pasos de lavado razonablemente fuertes sin riesgo de sufrir elución prematura del compuesto extraído. Esto permite obtener una mayor pureza de la muestra, ya que se pueden usar más etapas de lavado o disolventes de elución más fuertes para eliminar los componentes no deseados en la mezcla, mientras se mantienen los compuestos deseados en la fase SPE.

25 Además, la resina se puede usar para eliminar micotoxinas de un material líquido tal como un alimento u otro material destinado al consumo humano, animal u otro tipo de uso en contacto con seres humanos o animales.

El sorbente de SPE según la presente invención comprende una porción de núcleo y una porción más externa en la que al menos la porción más externa del sorbente comprende un polímero reticulado que incluye un monómero que contiene imidazol polimerizado.

La parte del núcleo incluye una esfera de núcleo, y esta esfera del núcleo incluye estireno y divinil benceno.

El polímero reticulado está basado parcialmente en compuestos aromáticos que contienen nitrógeno, seleccionados a partir de monómeros que contienen imidazol. Ejemplos no taxativos de compuestos aromáticos que contienen nitrógeno: 1-vinilimidazol, 4-vinilimidazol, 1-vinil-2-metilimidazol, 1-vinil-2-etilimidazol, 1-propenil-2-metilimidazol, 1-alil-2-metilimidazol, N-vinil-2-etilimidazol y N-vinil-2-etilimidazol o mezclas de los mismos. En una realización, el polímero reticulado comprende 1-vinilimidazol.

40 El polímero reticulado puede comprender una mezcla de compuestos aromáticos que contienen nitrógeno. La mezcla puede ser una mezcla de diferentes copolímeros que comprenden dos o más compuestos aromáticos que contienen nitrógeno, o puede ser una mezcla de copolímeros que comprenden compuestos aromáticos que contienen nitrógeno.

45 La cantidad total de monómero que contiene imidazol en la parte más externa debe ser lo suficientemente alta como para asegurar la afinidad por el compuesto polar que se va a extraer, y como para que se pueda retener el compuesto extraído durante las etapas de lavado. En una realización, la relación en peso de monómero que contiene imidazol con respecto a la esfera de núcleo es de al menos 0,05, o al menos 0,10, o al menos 0,20, o al menos 0,33 o al menos 0,50. En una realización, la relación en peso es de al menos 0,75, y en otra realización, la relación en peso es de al menos 1.

La cantidad total de monómero que contiene imidazol en el polímero reticulado debe ser preferiblemente 10 % en peso o más, o 20 % en peso o más, o 40 % en peso o más, o 60 % en peso o más, u 80 % en peso o más, o 90 % en peso o más. Cuando la porción central del sorbente comprende una esfera de otro material, la cantidad de compuestos aromáticos que contienen nitrógeno es mayor en comparación con cuando la porción central comprende el mismo material que la porción más externa u otro material parcialmente basado en compuestos aromáticos que contienen nitrógeno. Cuando la porción de núcleo comprende una esfera de otro material, la cantidad de compuestos aromáticos que contienen nitrógeno en la porción más externa será preferiblemente 60 % en peso o más, u 80 % en peso o más, o 90 % en peso o más.

60 Un agente de reticulación es un componente que promueve o regula la unión covalente intermolecular entre cadenas de polímero. En una realización, el polímero comprende un componente o un monómero que puede formar

puntos de reticulación, por ejemplo, al tener dos o más grupos funcionales que puedan participar en la reacción de polimerización, siendo tal componente un agente de reticulación. Ejemplos de dichos monómeros son los monómeros que contienen divinil, diacrilato, dimetacrilato o trimetacrilato, tales como el divinil benceno, dimetacrilato de etilenglicol (EDMA), bis-acrilamidas y trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM). Otros ejemplos de agentes de reticulación son componentes que pueden activarse cuando se exponen al calor o la radiación, como varios peróxidos o vinilsilanos.

La parte del núcleo comprende una esfera de núcleo y la esfera de núcleo incluye estireno y divinil benceno (DVB).

10 El sorbente de la presente invención se utiliza para extraer compuestos polares de una muestra. El compuesto puede ser una micotoxina o cualquier otro compuesto polar o altamente polar. En una realización, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en patulina, aflatoxina B1, B2, G1 y G2, ocratoxina, citrinina, alcaloides de ergot, micotoxinas de fusarium como fumonisinas, tricotecenos y zearalenona, ergocriptina y ergocornina. La figura 1 describe la estructura química de algunas micotoxinas.

15 Un método para extraer un compuesto polar de una muestra usando un sorbente incluye el suministro de una muestra en fase líquida. La muestra puede estar en fase acuosa. Preferiblemente, el sorbente se equilibra y se humedece con un disolvente o solución adecuados antes de poner la muestra en contacto con el sorbente. El compuesto a extraer se deja unir al sorbente y a continuación se realiza un lavado opcional. El lavado se puede realizar una o más veces utilizando disolventes o soluciones iguales o diferentes. Se puede recoger la muestra lavada. El compuesto extraído unido al sorbente puede entonces eluirse lavando el sorbente con un disolvente o solución adecuados.

20 Los disolventes y soluciones adecuados para equilibrar, humedecer, lavar y eluir pueden ser alcoholes tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, diversos tampones tales como los tampones de acetato de amonio, o acetonitrilo, y mezclas de los mismos o con agua. En una disposición se utiliza un 10 % de alcohol isopropílico en agua, y en otra disposición se utiliza un 20 % de alcohol isopropílico en agua para lavar el sorbente con el compuesto extraído. El acetonitrilo puede tener una concentración del 5 % o más en agua, o del 10 % o más en agua o del 20 % o más en agua.

30 Puede purificarse utilizando la presente invención cualquier muestra que pueda transferirse a la fase líquida. Una relación no taxativa de lo que se puede probar o purificar incluye: alimentos, harina, trigo, maíz, cebada, nueces como la nuez y el maní de Brasil, especias como el chile, bebidas, el suelo, el agua, la orina, la sangre y los tejidos.

35 La Figura 2 muestra una comparación de la unión de micotoxinas mediante diferentes materiales. EX224 y EXVPY contienen 4-vinilpiridina y EX202 y EX225 contienen 1-vinilimidazol. Estos polímeros se unen a la micotoxina con más fuerza que la mayoría de los materiales y solo se libera muy poco, incluso con un 20 % de alcohol isopropílico. El HLB puede considerarse representativo de los materiales típicos del HLB y une las micotoxinas de forma mucho más débil, con pérdidas incluso en la etapa de carga. EX227 y EXIDA IDA también se unen bien a las micotoxinas, pero son diferentes tipos de materiales. EX227 es un intercambiador de aniones y EXIDA es una resina quelante.

Los materiales en la figura 2 son:

HLB	20 % NVP/0,2 % EDMA/79,8 % BB
EH016	6 % 4-VPy/36 % DVB/59 % BB
EH018	5 % 4-VPy/32 % DVB/63 % BB
EH028	4 % 4-VPy/38 % EDMA/58 % BB
EX105	10 % MAA/90 % PETRA
EX202	9 % 1-Vim/91 % EDMA
EX224	24 % 4-VPy/76 % TRIM
EX225	22 % 1-VIm/78 % TRIM
EX227	7 % 1-APip/93 % TRIM
HLB-SCX	7 % AMPSA/24 % NVP/6 % DVB/63 % BB
HLB-SAX	2 % VBTMAC/27 % NVP/7 % DVB/64 % BB
EXVPY	14 % 4-Vpy/86 % DVB
EA118	10 % MAA/90 % DVB
EXSO3	24 % VBSO3H/76 % DVB
EXIDA	26 % VBIDA/74 % DVB
EA117	10 % MAA/90 % DVB

45 Las abreviaturas anteriores indican:

4-Vpy	4-vinil-piridina
1-Vim	1-vinil-imidazol
DVB	divinil benceno
NVP	N-vinil pirrolidona
EDMA	acrilato de dimetil etilenglicol
MAA	ácido metacrílico
PETRA	triacrilato de pentaeritritilo
TRIM	trimetilacrilato de trimetilolpropano
1-Apip	1-alil-piperazina
AMPSA	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico
VBTMAC	cloruro de vinilbencil trimetilamonio
VBSO3H	ácido 4-vinilbencenosulfónico
VBIDA	ácido vinilbenciliminodiacético
BB	base preformada (DVB/PS)

El sorbente de la presente invención se puede producir mediante un procedimiento en cual que las esferas absorben los monómeros o una solución de monómeros, o mediante un procedimiento en el cual las esferas se hinchan en los monómeros o una solución de monómeros. El método de dos etapas incluye proporcionar una esfera preformada 5 antes de la etapa de polimerización.

El disolvente puede ser cualquier disolvente orgánico donde los reactivos pueden estar parcial o totalmente disueltos. Ejemplos de disolventes: tolueno, naftaleno, benceno, ciclohexano, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, tetrahidrofurano, acetato de etilo dimetilsulfóxido, dimetilformamida y ácido fórmico o mezclas de los mismos. La 10 cantidad de disolvente utilizada puede estar en el intervalo de 100 a 400 % en peso en relación con la mezcla de monómeros, preferiblemente del 150 al 250 % en peso. La mezcla de monómeros es una mezcla de los compuestos aromáticos que contienen nitrógeno, otros monómeros y el agente de reticulación.

Como iniciador de polimerización adecuado puede utilizarse cualquier de los conocidos por los expertos en la 15 materia y podrían ser, por ejemplo, diferentes peróxidos, diversos componentes que contienen azo o persulfatos. Ejemplos no taxativos: peróxido de bencilo, azoisobutilnitrilo (AIBN), 2,2-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo) o persulfato de potasio. La cantidad de iniciador se añade en el intervalo de 0,1 a 4,0 % en peso con respecto a la mezcla de monómeros.

20 En una realización, se proporciona una esfera preformada donde la esfera puede ser porosa. La esfera preformada puede tener un tamaño de 10 a 400 μm , preferiblemente de 30 a 90 μm . La relación en peso de las esferas preformadas con respecto a la solución de monómero podrá ser de 1: 1 a 1:10, por ejemplo 1: 1.5 o menos, o 1: 2 o menos, o 1: 3 o menos, o 1: 9 o más, o 1: 7 o más. La solución de monómero se puede agregar de una vez o en dos o más porciones.

25 En una disposición, se añade un estabilizador. La función del estabilizador de suspensión es prevenir la coagulación de las gotitas durante la polimerización. Los estabilizantes de suspensión adecuados de esta invención comprenden polímeros sintéticos y naturales solubles en agua como, por ejemplo, poli (alcohol vinílico), poli (acetato de vinilo) parcialmente saponificado, metil celulosa, hidroxietilcelulosa u otros derivados de celulosa, sales de sodio del ácido 30 poliacrílico, sal sódica de carboximetilcelulosa y polivinil pirrolidona, entre otros.

Todos los componentes añadidos se mezclan a continuación, por ejemplo, agitando o removiendo, y la mezcla se deja polimerizar. La polimerización se puede realizar a cualquier temperatura adecuada dependiendo del disolvente, el iniciador o los monómeros utilizados. En una realización, la temperatura de polimerización es 20 °C o más, o 30 35 °C o más, o 50 °C o más, o 80 °C o más. La polimerización puede continuar durante 1 hora o más, o 5 horas o más, o 12 horas o más, o 24 horas o más, o 36 horas o más. La polimerización también se puede realizar a dos o más intervalos de temperatura diferentes, es decir, la polimerización se puede realizar primero, por ejemplo, a 50 °C durante 24 h y luego a 70 °C durante 12 h. En una realización, el primer intervalo de temperatura puede ser entre 40 y 60 °C durante 15-24 h, y el segundo intervalo de temperatura puede ser entre 65 y 80 °C durante 5-15 h.

40 La mezcla de polimerización se puede dejar enfriar antes de aislar el sorbente obtenido. Preferiblemente, el sorbente obtenido se lava con uno o más disolventes adecuados, por ejemplo, metanol, etanol, acetato de etilo, ácido fórmico y acetonitrilo, y luego, preferiblemente, se seca el sorbente. El secado se puede realizar a una temperatura elevada y/o a presión reducida. El sorbente obtenido puede ser particulado, por ejemplo, esférico, y tener un tamaño de 45 partícula de 20 a 500 μm , preferiblemente de 30 a 90 μm , y si el sorbente es poroso, el tamaño de poro estará preferiblemente en el intervalo de 50 a 1000 Å, preferiblemente de 50 a 500 Å.

Cuando se utiliza una esfera porosa preformada y la esfera absorbe los monómeros o la solución de monómeros o

se hincha en los monómeros o la solución de monómeros, los monómeros, el agente de reticulación y el iniciador se ubicarán parcialmente en el sistema poroso de la esfera. La polimerización y la reticulación de los monómeros formarán una red polimérica físicamente unida o anclada alrededor y dentro de la esfera. De esta manera, no solo la superficie exterior de la esfera puede capturar el componente polar, sino también los poros.

5

El sorbente de la presente invención puede estar en forma de esferas, pero también puede estar en forma de monolito. Además, el sorbente se puede mezclar con otros sorbentes o disolventes para optimizar el efecto de separación deseado. La presente descripción se refiere además a un cartucho de extracción en fase sólida que comprende el sorbente de la presente invención, y se refiere a una columna de separación que comprende el

10

sorbente. La presente invención se refiere además al uso de un sorbente que tiene una porción central y una porción más externa, y donde al menos la porción más externa del sorbente comprende un polímero reticulado parcialmente basado en monómero que contiene imidazol y donde la porción del núcleo comprende otro material parcialmente basado en monómero que contiene imidazol, para extraer compuestos polares tales como micotoxinas.

15

EXPERIMENTOS

Ejemplo 1, preparación de material sorbente ej. 1

20 Paso 1: Preparación de esferas preformadas.

Se disolvieron estireno (100 ml), divinilbenceno al 80 % de grado técnico (100 ml) y 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo) (3,0 g) en una mezcla de alcohol bencílico (200 ml) y cloroformo (150 ml) y la disolución se agregó a una solución al 0,5 % de alcohol polivinílico (Celvol 523) en agua desionizada (1150 ml). La mezcla de dos

25

fases se agitó a 300 rpm a 50 °C durante 15 h. Después de enfriar, las esferas de polímero orgánico poroso hidrófobo formadas se recogen por tamizado, se lavan con metanol en un filtro de vidrio y se secan.

Paso 2: Preparación de un sorbente compuesto que comprende una esfera preformada y una porción polimérica más externa.

30

Se preparó una solución de monómero que consistía en 53,1 g de 1-vinilimidazol, 2,8 g de divinilbenceno al 80 % de calidad técnica y 1,3 g de 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo) disueltos en 130 g de tolueno. La solución de monómero se purgó con nitrógeno para eliminar el oxígeno disuelto. Se colocaron 100 g de las esferas preformadas del Paso 1 en un recipiente y se agregaron 177,9 g de la solución de monómero en tres porciones bajo agitación

35

continua. El recipiente se agitó completamente hasta obtener un material de flujo libre y luego se enjuagó con nitrógeno y se colocó en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos. La polimerización se llevó a cabo primero a 50 °C durante 24 h y luego a 70°C durante 12 h. El material se sacó del recipiente y se lavó con metanol, acetato de etilo, ácido fórmico, acetonitrilo y metanol de nuevo, y se secó.

40 Ejemplo 2, preparación de material sorbente ej. 2 (no según la presente invención)

El material se preparó de la misma forma que el material anterior, excepto en que se utilizaron 53,1 g de 4-vinilpiridina en lugar de 1-vinilimidazol en el segundo paso.

45 Ejemplo 3, preparación de material sorbente ej. 3

Se disolvieron 51,3 g de 1-vinilimidazol, 184,8 g de trimetacrilato de trimetilolpropano y 5,6 g de peróxido de benzoilo al 75 % en 284 g de tolueno y la disolución se añadió a una solución al 2 % de alcohol polivinílico (Celvol 523) en agua desionizada (1000 ml). La mezcla de dos fases se agitó a 300 rpm a 80 °C durante 20 h. Después de enfriar,

50

las esferas de polímero formado se recogieron mediante tamizado, se lavaron con metanol, acetato de etilo, ácido fórmico, acetonitrilo y metanol de nuevo, y se secaron.

Ejemplo 4, preparación de material sorbente ej. 4 (no según la presente invención)

55 El material se preparó de la misma manera que en el ejemplo 3, excepto que se utilizaron 57,3 g de 4-vinilpiridina en lugar de 1-vinilimidazol.

Ejemplo 5

60 Evaluación del material sorbente con patulina y comparación con otros materiales

Se empaquetaron 60 mg de cada material del Experimento 1-4 (denominados ej. 1-ej. 4) en cartuchos de SPE. Se

pasaron las siguientes soluciones a través de los cartuchos:

- 1 ml de metanol
- 1 ml de acetonitrilo al 10 % en agua
- 5 1 ml de patulina (típicamente 1000 ng/ml), disuelto en acetato de amonio 10 mM, pH 5 en agua
- 1 ml de acetato de amonio 10 mM, pH 5 en agua

El mismo experimento también se llevó a cabo con cartuchos de SPE empaquetados con 40 mg de tres materiales diferentes utilizados comúnmente para extraer analitos de muestras de agua. Los materiales eran todos del tipo HLB y uno era un material neutro (HLB), uno un intercambiador de cationes fuerte (HLB-SCX) y un intercambiador de aniones fuerte (HLB-SAX). Cada uno de los experimentos se llevó a cabo por duplicado. El contenido de micotoxinas de todas las fracciones se analizó utilizando LC-MS/MS y los resultados se muestran en la tabla 1.

15 **Tabla 1:** Cantidades de patulina eluidas en la etapa de carga (muestra en acetato de amonio 10 mM, pH 5 en agua) y en la etapa de lavado (acetato de amonio 10 mM, pH 5 en agua)

Resina	Carga	Lavado
Ej. 1	0 %	0 %
Ej. 2	0 %	1 %
Ej. 3	0 %	0 %
Ej. 4	0 %	1 %
HLB	8 %	8 %
HLB-SCX	12 %	5 %
HLB-SAX	5 %	3 %

Ej. 1, 2, 3 y 4 significa material absorbente obtenido en los ejemplos 1, 2, 3 y 4.

Los resultados demuestran que las resinas de la invención fueron capaces de extraer patulina completamente de la solución acuosa y retenerla durante una etapa de lavado, mientras que las resinas del tipo HLB no pudieron extraer la patulina completa y liberaron parcialmente la patulina extraída durante la etapa de lavado.

20 Las resinas del tipo HLB se utilizan comúnmente para la extracción de varios analitos de muestras acuosas con excelentes resultados, sin embargo, en el caso de la patulina, su rendimiento es deficiente. La razón de este rendimiento deficiente puede ser que la patulina es mucho más polar que muchos otros analitos comunes, tales como la mayoría de los productos farmacéuticos y los contaminantes ambientales. Las resinas de la invención también pueden ser útiles para la extracción de otros compuestos polares que son difíciles de extraer con materiales convencionales. Algunos ejemplos de resinas del tipo HLB son la familia Oasis (Waters), la familia Supel-Select (Supelco), la familia EVOLUTE® (Biotage) y la familia Strata-X (Phenomenex).

Ejemplo 6

30 **Evaluación del material sorbente con un conjunto de micotoxinas y comparación con otros materiales**

Se empaquetaron 60 mg de cada material en cartuchos de SPE. Se pasaron las siguientes soluciones a través de los cartuchos:

- 35 1 ml de metanol
- 1 ml de acetonitrilo al 10 % en agua.
- 1 ml de micotoxinas (típicamente 50-1000 ng/ml), disuelto en acetonitrilo al 10 % en agua
- 1 ml de acetato de amonio 10 mM, pH 6,7 en agua
- 40 1 ml de alcohol isopropílico al 20 % en un tampón de acetato de amonio 10 mM, pH 6,7

El mismo experimento también se llevó a cabo con cartuchos de SPE empaquetados con 40 mg de tres materiales diferentes utilizados comúnmente para extraer analitos de muestras de agua. Los materiales eran todos del tipo HLB y uno era un material neutro (HLB), uno un intercambiador de cationes fuerte (HLB-SCX) y un intercambiador de aniones fuerte (HLB-SAX).

Cada uno de los experimentos se llevó a cabo por duplicado. El contenido de micotoxinas de todas las fracciones se analizó utilizando LC-MS/MS y los resultados se muestran en las tablas 2-4.

50 **Tabla 2:** Cantidad eluida en la etapa de carga (muestra en MeCN al 10 % en solución acuosa)

Resina	Aflatoxina B1	Aflatoxina G1	Ergocriptina	Ergocornina	Ocratoxina A	Fumonis B1	ZON	CPZA
--------	------------------	------------------	--------------	-------------	-----------------	---------------	-----	------

Ej. 1	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	0 %	1 %
Ej. 2	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Ej. 3	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %
Ej. 4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	0 %	0 %
HLB	0 %	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
HLB-SCX	0 %	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
HLB-SAX	0 %	1 %	45 %	54 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Ergocrip. = Ergocriptina, Ergocor. = Ergocornina, Ocratox. = Ocratoxina, Fumonis = Fumonisina, ZON = zearalenona, CPZA = Ácido ciclopiazónico

Ej. 1, 2, 3 y 4 significa material absorbente obtenido en los ejemplos 1, 2, 3 y 4.

Tabla 3: Cantidad eluida en la primera etapa de lavado (10 mM de tampón de acetato de amonio, pH 6,7 en agua)

Resina	Cantidad eluida en la primera etapa de lavado (10 mM de tampón de acetato de amonio, pH 6,7 en agua)							
	Aflatoxina B1	Aflatoxina G1	Ergocriptina	Ergocornina	Ocratoxina A	Fumonis B1	ZON	CPZA
Ej. 1	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	0 %	1 %
Ej. 2	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	0 %	0 %
Ej. 3	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %	0 %	1 %
Ej. 4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	2 %	0 %	1 %
HLB	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
HLB-SCX	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
HLB-SAX	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Ergocrip. = Ergocriptina, Ergocor. = Ergocornina, Ocratox. = Ocratoxina, Fumonis = Fumonisina, ZON = zearalenona, CPZA = Ácido ciclopiazónico

Ej. 1, 2, 3 y 4 significa material absorbente obtenido en los ejemplos 1, 2, 3 y 4.

Tabla 4: Cantidad eluida en el segundo paso de lavado (20 % de alcohol isopropílico en tampón)

Resina	Cantidad eluida en el segundo paso de lavado (20 % de alcohol isopropílico en agua)							
	Aflatoxina B1	Aflatoxina G1	Ergocriptina	Ergocornina	Ocratoxina A	Fumonis B1	ZON	CPZA
Ej. 1	0 %	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	1 %
Ej. 2	0 %	1 %	0 %	0 %	0 %	23 %	0 %	0 %
Ej. 3	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	17 %	0 %	0 %
Ej. 4	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	43 %	0 %	1 %
HLB	28 %	72 %	69 %	23 %	79 %	55 %	11 %	17 %
HLB-SCX	1 %	9 %	0 %	0 %	32 %	117 %	0 %	0 %
HLB-SAX	2 %	11 %	1 %	1 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Ergocrip. = Ergocriptina, Ergocor. = Ergocornina, Ocratox. = Ocratoxina, Fumonis = Fumonisina, ZON = zearalenona, CPZA = Ácido ciclopiazónico

Ej. 1, 2, 3 y 4 significa material absorbente obtenido en los ejemplos 1, 2, 3 y 4.

Todas las resinas excepto HLB-SAX pudieron extraer las micotoxinas completamente de la solución acuosa y 5 retenerlas durante una etapa de lavado, pero solamente las resinas de la invención pudieron retener las micotoxinas aflatoxina, alcaloides de ergot, ocratoxina A y ZON en un 20 % de alcohol isopropílico en agua. Esto permite utilizar soluciones de lavado más fuertes que conducen a extractos más limpios y un análisis más fiable de las micotoxinas.

Ejemplo 7, Extracción de micotoxinas de la harina

10

Configuración de la columna: Absorbente según el ejemplo 1, 60 mg en 3 ml

Procedimiento de extracción

15 Se pesaron 5 g de harina de trigo integral y se mezclaron con 20 ml de una solución de acetonitrilo al 50 % en agua. La suspensión se extrajo durante 30 minutos sobre una mesa de agitación. La muestra extraída se transfirió a un tubo de centrifugado de 50 ml y se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos para eliminar los sólidos. Una fracción del sobrenadante (8 ml) se transfirió a un nuevo tubo de centrifugado y se diluyó con agua (32 ml) para obtener un contenido de acetonitrilo del 10 %. La solución se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 3000 g.

20

Procedimiento de preparación de la muestra

1. Acondicionamiento: se aplicaron 2 ml de acetonitrilo y se dejó fluir a través del lecho de sorbente. Se añadieron 2 ml de agua y se dejó fluir la solución a través del lecho.
- 25 2. Carga: se agregaron 3 ml de muestra (centrifugada y diluida a un contenido de acetonitrilo del 10 %). Se dejó que la muestra fluyera lentamente a través del lecho de sorbente (preferiblemente aplicando solo gravedad).
3. Lavado 1: se añadieron 3 ml de acetato de amonio 10 mM, pH 6,7.
4. Lavado 2: se aplicaron 3 ml de acetonitrilo al 10 % en acetato de amonio 10 mM, pH 6,7. Se extrajo el aire a través de la columna durante 10 a 30 segundos.
- 30 5. Elución 1: se aplicaron 2 ml de ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo.
6. Elución 2: se aplicaron 2 mL de metanol.
7. Evaporación: el disolvente se evaporó a 30 °C durante 40 minutos en un TurboVap a 1,5 bar y se reconstituyó en 1 ml de solución de reconstitución (acetonitrilo al 20 % en carbonato de amonio 5 mM, pH 9)

35 Resultados

Los resultados de la extracción utilizando el método y el material sorbente de la presente invención se analizaron utilizando HPLC y LC-MS.

40 Alta concentración de micotoxinas (200 ng de micotoxina/g de harina)

Las muestras se extrajeron y se prepararon tal y como se ha descrito en las secciones anteriores. La adición de picos de micotoxinas a una concentración de 10 ng/ml de extracto diluido (correspondiente a 200 ng de micotoxinas/g de harina) proporcionó buenas señales para garantizar datos más precisos. Los datos resultantes se 45 presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Recuperaciones después del tratamiento de la muestra, extracto enriquecido a un nivel de 10 ng de micotoxina/ml de extracto diluido (corresponde a un nivel de 200 ng de micotoxina/g de harina) antes de la SPE. Compensado por los efectos de la supresión de iones, es decir, en comparación con los extractos en blanco enriquecidos con las cantidades correspondientes de micotoxinas.

Compuesto	Elución 1	Elución 2	Recuperación total (%)
Aflatoxina B1	101	0	102
Aflatoxina G1	96	0	96
Ergotamina	101	1	101
Ergocriptina	99	1	100
Ergocornina	99	1	100
Ocratoxina A	93	2	95
Fumonisina B1	7	84	91
Zearelenona	95	1	96
Ácido ciclopiazónico	100	0	100

Como se puede ver en los resultados, las recuperaciones estuvieron en el rango de 91 a 102 %. Todos los componentes excepto la fumonisina se eluyen con 2 ml de ácido fórmico al 1 % en acetonitrilo. Se requirió metanol para eluir la fumonisina del sorbente. Los efectos de supresión/mejora de los iones se compensaron al comparar las muestras simuladas con extractos en blanco enriquecidos con micotoxinas.

La supresión/mejora de los iones se controló mediante la adición de extractos de harina en blanco (tratados como se mencionó anteriormente) después del procedimiento SPE, pero antes de la evaporación y comparando el área del pico con la obtenida de las micotoxinas en fase móvil. Los resultados se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Supresión de iones después del tratamiento de la muestra, extracto en blanco enriquecido a un nivel de 10 ng de micotoxina/ml de extracto diluido (corresponde a un nivel de 200 ng de micotoxina/g de harina) después de SPE en comparación con las micotoxinas en fase móvil (sin componentes de matriz)

Compuesto	Elución 1	Elución 2
Aflatoxina B1	-14 %	-12 %
Aflatoxina G1	-23 %	-31 %
Ergotamina	-17 %	-8 %
Ergocriptina	-11 %	-19 %
Ergocornina	-9 %	-10 %
Ocratoxina A	11 %	12 %
Fumonisina B1	-43 %	67 %
Zearelenona	-5 %	-4 %
Ácido ciclopiazónico	-67 %	-54 %

Para todos los componentes excepto la fumonisina y el ácido ciclopiazónico, la supresión de iones está entre el -23 % y el + 11 % (enfocando el debate en las fracciones de elución 1, ya que todos los componentes excepto la fumonisina se eluyeron en la elución 1), un resultado que se puede considerar satisfactorio. Para la fumonisina hubo un aumento significativo de iones en la elución 2 (que fue la fracción en la que se eluyó la fumonisina).

Baja concentración de micotoxinas (20 ng de micotoxinas/g de harina)

Las muestras se extrajeron y se prepararon tal y como se ha descrito en las secciones anteriores. Los extractos fueron enriquecidos con micotoxinas para una concentración de 1 ng/mL de extracto diluido (correspondiente a 20 ng de micotoxinas/g de harina, representando así niveles más realistas de micotoxinas. Los datos resultantes se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Recuperaciones después del tratamiento de la muestra, extracto enriquecido a un nivel de 1 ng de micotoxina/ml de extracto diluido (corresponde a un nivel de 20 ng de micotoxina/g de harina) antes de la SPE. Compensado por los efectos de la supresión de iones, es decir, en comparación con los extractos en blanco enriquecidos con las cantidades correspondientes de micotoxinas.

Compuesto	Elución 1	Elución 2	Recuperación total (%)
Aflatoxina B1	99	2	101

Aflatoxina G1	109	1	110
Ergotamina	106	1	108
Ergocriptina	93	2	95
Ergocornina	95	1	97
Ocratoxina A	80	6	86
Fumonisina B1	1	72	73
Zearelenona	97	0	98
Ácido ciclopiazónico	123	1	124

Como se puede ver en los resultados, las recuperaciones están en el rango del 73 al 124 %. Todos los componentes excepto la fumonisina se eluyeron con 2 ml de ácido fórmico al 1 % en acetonitrilo. Los efectos de supresión/mejora de los iones se compensaron al comparar las muestras simuladas con extractos en blanco enriquecidos con 5 micotoxinas después de la SPE.

La supresión/mejora de los iones se controló mediante la adición de extractos de harina en blanco (tratados como se mencionó anteriormente) después del procedimiento SPE, pero antes de la evaporación y comparando el área del pico con la obtenida de las micotoxinas en fase móvil. Los resultados se muestran en la tabla 8.

10

Tabla 8. Supresión de iones después del tratamiento de la muestra, extracto en blanco enriquecido a un nivel de 1 y 10 ng de micotoxina/ml de extracto diluido (corresponde a un nivel de 20 y 200 ng de micotoxina/g de harina) después de SPE en comparación con las micotoxinas en fase móvil (sin componentes de matriz)

Compuesto	Enriquecido a 1 ng/mL		Enriquecido a 10 ng/mL	
	Elución 1	Elución 2	Elución 1	Elución 2
Aflatoxina B1	-19 %	-21 %	-14 %	-12 %
Aflatoxina G1	-15 %	-27 %	-23 %	-31 %
Ergotamina	-5 %	-27 %	-17 %	-8 %
Ergocriptina	-16 %	39 %	-11 %	-19 %
Ergocornina	-9 %	-18 %	-9 %	-10 %
Ocratoxina A	1 %	-6 %	11 %	12 %
Fumonisina B1	-22 %	-22 %	-43 %	67 %
Zearelenona	2 %	-6 %	-5 %	-4 %
Ácido ciclopiazónico	-21 %	-9 %	-67 %	-54 %

15

Para todos los componentes excepto la fumonisina y el ácido ciclopiazónico, la supresión de iones estuvo entre el -23 % y el +11 % (enfocando el debate en las fracciones de elución 1, ya que todos los componentes excepto la fumonisina se eluyeron en la elución 1), un resultado que se puede considerar satisfactorio. Para la fumonisina hubo una variación significativa en los resultados, la supresión de iones fue del 22 % a nivel bajo y la mejora de iones fue del 67 % a nivel alto. Se observaron efectos similares para el ácido ciclopiazónico.

20

Ejemplo 8: Extracción de micotoxinas de trigo, maíz o cebada

Configuración de la columna: Absorbente según el ejemplo 1, 60 mg en 3 ml

25

Procedimiento de extracción:

Se molió la muestra (trigo, maíz, cebada, 50 g). La muestra molida se almacenó en un recipiente sellado a temperatura ambiente hasta que se requirió. La muestra se extrajo mezclando la muestra de grano entero molido (o harina) (5 g) con acetonitrilo al 50 % (ac.) (20 ml) y se colocó en una mesa de agitación durante 30 minutos. El extracto se transfirió a un tubo de centrifugado de 50 ml y se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos. El sobrenadante (8 ml) se transfirió a un nuevo tubo de centrifugado de 50 ml y se diluyó con agua (32 ml). El extracto diluido se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos más.

30

35 Procedimiento de preparación de la muestra

1. Acondicionamiento: La velocidad de flujo utilizada fue de 1 ml min⁻¹ en todo el procedimiento. La columna se acondicionó con acetonitrilo (2 x 1 ml) y se equilibró con agua (2 ml).

40

2. Carga de muestra: La muestra previamente tratada (3 ml) se cargó en la columna a una velocidad de flujo máxima de 1 ml min⁻¹.

3. Lavado 1: La columna se lavó con agua (3 ml).

4. Lavado 2: La columna se lavó con acetonitrilo al 10 % (3 ml).

5. Secado: La columna se secó durante 30 segundos a vacío máximo, 0,5 bar/7 psi
 6. Elución 1: Eluido con ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (2 ml).
 7. Elución 2: Eluido con metanol (2 ml)
 8. Post elución: El eluyente se secó en una corriente de aire o nitrógeno utilizando un SPE Dry (35 °C, 20 a 40 l min⁻¹) o TurboVap LV (1,5 bar a 35 °C durante 40 min). Se reconstituyó en ácido acético al 0,1 % en acetonitrilo al 20 %: metanol (1 ml, 1:1, v/v). Se filtró con jeringa utilizando una membrana de PTFE de 0,2 µm antes del análisis.

Resultados

- 10 Los resultados de la extracción utilizando el método y el material sorbente de la presente invención se analizaron utilizando LC-MS.

Todos los analitos extraídos utilizando el material absorbente y el método de la presente invención alcanzaron los límites de cantidades y recuperación requeridos por los estándares europeos actuales para el análisis de

- 15 micotoxinas, tal como se muestra en las tablas 9, 10 y 11.

Tabla 9. Recuperación de analitos y límite de datos de cuantificación para un rango de micotoxinas procedentes del grano de trigo

Analito	r ²	LOQ/µg kg ⁻¹		%RSD _r		Recuperación (%)	
		Objetivo	Real	Objetivo	Real	Objetivo	Real
Trigo							
aflatoxina B1	0,9994	2	0,67	40	3,0	50 a 120	96
aflatoxina B2	0,9995	2	0,67	40	5,6	50 a 120	102
aflatoxina G1	0,9990	2	0,67	40	3,7	50 a 120	99
aflatoxina G2	0,9998	2	1,33	40	3,3	70 a 110	110
ocratoxina A	0,9995	3	1,33	40	5,9	70 a 110	88
toxina T-2	0,9996	50	13,3	40	3,8	60 a 130	102
toxina HT-2	0,9987	100	26,7	40	19,0	60 a 130	106
fumonisina B1	0,9997	1000	26,7	30	2,8	60 a 120	100
zearalenona	0,9996	50	26,7	40	1,8	60 a 120	73
ergocornina	0,9997	N/A	13,3	N/A	5,9	N/A	96
ergocriptina	0,9996	N/A	13,3	N/A	4,2	N/A	76

20

Tabla 10. Recuperación de analitos y límite de datos de cuantificación para un rango de micotoxinas procedentes del grano de maíz.

Analito	r ²	LOQ/µg kg ⁻¹		%RSD _r		Recuperación (%)	
		Objetivo	Real	Objetivo	Real	Objetivo	Real
Maíz							
aflatoxina B1	0,9994	2	0,67	40	4,2	50 a 120	94
aflatoxina B2	0,9988	2	0,67	40	2,6	50 a 120	96
aflatoxina G1	0,9995	2	0,67	40	3,3	50 a 120	97
aflatoxina G2	0,9993	2	1,33	40	2,4	70 a 110	95
ocratoxina A	0,9997	3	1,33	40	3,8	70 a 110	72
toxina T-2	0,9992	50	13,3	40	2,4	60 a 130	99
toxina HT-2	0,9989	100	13,3	40	4,5	60 a 130	97
fumonisina B1	0,9993	1000	26,7	30	2,6	60 a 120	100
zearalenona	0,9995	50	26,7	40	2,8	60 a 120	71
ergocornina	0,9995	N/A	13,3	N/A	2,0	N/A	78
ergocriptina	0,9995	N/A	13,3	N/A	1,1	N/A	77

25

Tabla 11. Recuperación de analitos y límite de datos de cuantificación para un rango de micotoxinas procedentes del grano de cebada.

Analito	r ²	LOQ/ $\mu\text{g kg}^{-1}$		%RSD _r		Recuperación (%)	
		Objetivo	Real	Objetivo	Real	Objetivo	Real
Cebada							
aflatoxina B1	0,9996	2	1,33	40	5,0	50 a 120	100
aflatoxina B2	0,9995	2	0,67	40	4,3	50 a 120	99
aflatoxina G1	0,9992	2	1,33	40	2,1	50 a 120	99
aflatoxina G2	0,9989	2	1,33	40	3,4	70 a 110	98
ocratoxina A	0,9990	3	2,00	40	4,5	70 a 110	96
toxina T-2	0,9981	50	13,3	40	8,5	60 a 130	96
toxina HT-2	0,9988	100	20,0	40	8,8	60 a 130	100
fumonisina B1	0,9995	1000	13,3	30	2,0	60 a 120	84
zearalenona	0,9995	50	26,7	40	8,7	60 a 120	96
ergocornina	0,9996	N/A	13,3	N/A	2,2	N/A	82
ergocriptina	0,9997	N/A	13,3	N/A	2,5	N/A	85

5 Ejemplo 9: Extracción de micotoxinas de la nuez de Brasil y el maní (cacahuete)

Configuración de la columna: Sorbente del ejemplo 1, 60 mg en 3 ml.

Procedimiento de extracción:

10

La muestra (cacahuete, nuez de Brasil, 50 g) se trituró y se almacenó en un recipiente sellado a 2 - 8 °C hasta que se requirió. La muestra de nuez entera molida (5 g) se mezcló con acetonitrilo al 80 % (ac) (20 ml) y se colocó en una mesa de agitación durante 30 minutos. El extracto se transfirió a un tubo de centrifugado de 50 ml y se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos. El sobrenadante (4 ml) se transfirió a un nuevo tubo centrifugado de 50 ml y se diluyó con agua (28 ml). El extracto diluido se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos más.

15

Procedimiento de preparación de la muestra

Se utilizaron velocidades de flujo de 1 ml min⁻¹ en todo el procedimiento.

20

1. Acondicionamiento: la columna se acondicionó con acetonitrilo (2 x 1 ml) y se equilibró con acetato de amonio 10 mM (2 ml).

2. Carga: la muestra previamente tratada (3 ml) se cargó en la columna a una velocidad de flujo máxima de 1 ml min⁻¹.

25

3. Lavado 1: la columna se lavó con acetato de amonio 10 mM (3 ml).

4. Lavado 2: la columna se lavó con acetato de amonio 10 mM en acetonitrilo al 10 % (3 ml).

5. Secado: la columna se secó durante 30 segundos a vacío máximo, 0,5 bar/7 psi

6. Elución 1: eluida con ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (2 ml).

7. Elución 2: eluida con ácido fórmico al 0,1 % en metanol (2 ml)

30

8. Postelución: el eluyente se secó en una corriente de aire o nitrógeno utilizando un SPE Dry (35 °C, 20 a 40 l min⁻¹) o TurboVap LV (1,5 bar a 35 °C durante 40 min). Se reconstituyó en ácido acético al 0,1 % en acetonitrilo al 20 %: metanol (1 ml, 1:1, v/v) y se absorbió en un filtro de jeringa con una membrana de PTFE de 0,2 μm antes del análisis.

35 Resultados

Los resultados de la extracción utilizando el método y el material sorbente de la presente invención se analizaron utilizando LC-MS.

Todos los analitos extraídos utilizando el material absorbente y el método según la presente invención alcanzaron

40

los límites de cantidades y recuperación requeridos por los estándares europeos actuales para el análisis de micotoxinas, tal como se muestra en las tablas 12 y 13.

Tabla 12. Recuperación de analitos y límite de datos de cuantificación para un rango de micotoxinas procedentes de la nuez de Brasil

Analito	r ²	LOQ/ $\mu\text{g kg}^{-1}$		%RSD _r		Recuperación (%)	
		Objetivo	Real	Objetivo	Real	Objetivo	Real
nuez de Brasil							
aflatoxina B1	0,9982	2	0,67	40	2,4	50 a 120	106
aflatoxina B2	0,9978	2	0,67	40	4,9	50 a 120	103
aflatoxina G1	0,9978	2	0,67	40	9,4	50 a 120	102
aflatoxina G2	0,9982	2	0,67	40	7,4	70 a 110	114
ocratoxina A	0,9991	3	0,67	40	1,6	70 a 110	93

5 Tabla 13. Recuperación de analitos y límite de datos de cuantificación para un rango de micotoxinas procedentes del cacahuete

Analito	r ²	LOQ/ $\mu\text{g kg}^{-1}$		%RSD _r		Recuperación (%)	
		Objetivo	Real	Objetivo	Real	Objetivo	Real
Cacahuete							
aflatoxina B1	0,9960	2	1,33	40	8,5	50 a 120	102
aflatoxina B2	0,9939	2	1,33	40	8,4	50 a 120	110
aflatoxina G1	0,9973	2	0,67	40	3,4	50 a 120	108
aflatoxina G2	0,9993	2	0,67	40	8,9	70 a 110	114
ocratoxina A	0,9993	3	0,67	40	6,7	70 a 110	93

REIVINDICACIONES

1. Uso de un sorbente en extracción en fase sólida (SPE) para extraer micotoxinas polares, donde el sorbente comprende:
5 una porción de núcleo que incluye una esfera que forma el núcleo, la esfera de núcleo que incluye estireno y divinil benceno (DVB); y una porción más externa, donde la porción central y la porción más externa del sorbente incluyen composiciones diferentes de uno o más
10 polímeros, donde al menos la porción más externa del sorbente comprende un polímero reticulado, el polímero reticulado incluye un monómero que contiene imidazol polimerizado, donde una relación en peso del monómero que contiene imidazol incluido en la porción más externa a la esfera de núcleo es de al menos 0,05.
2. Uso de un sorbente según la reivindicación 1, donde la cantidad de monómero que contiene imidazol
15 en el polímero reticulado es de al menos un 20 % en peso.
3. Uso de un sorbente según la reivindicación 2, donde la cantidad de monómero que contiene imidazol en el polímero reticulado es de al menos un 50 % en peso.
- 20 4. Uso de un sorbente según la reivindicación 3, donde la cantidad de monómero que contiene imidazol en el polímero reticulado es de al menos un 75 % en peso.
5. Uso de un sorbente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la relación en peso es de al menos 0,10, o al menos 0,20, o al menos 0,33, o al menos 0,50.
25
6. Uso de un sorbente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el monómero que contiene imidazol polimerizado incluye 1-vinilimidazol.
7. Uso de un sorbente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las micotoxinas
30 polares se seleccionan del grupo que consiste en aflatoxina; alcaloides del ergot; ocratoxina A; y zearalenona.

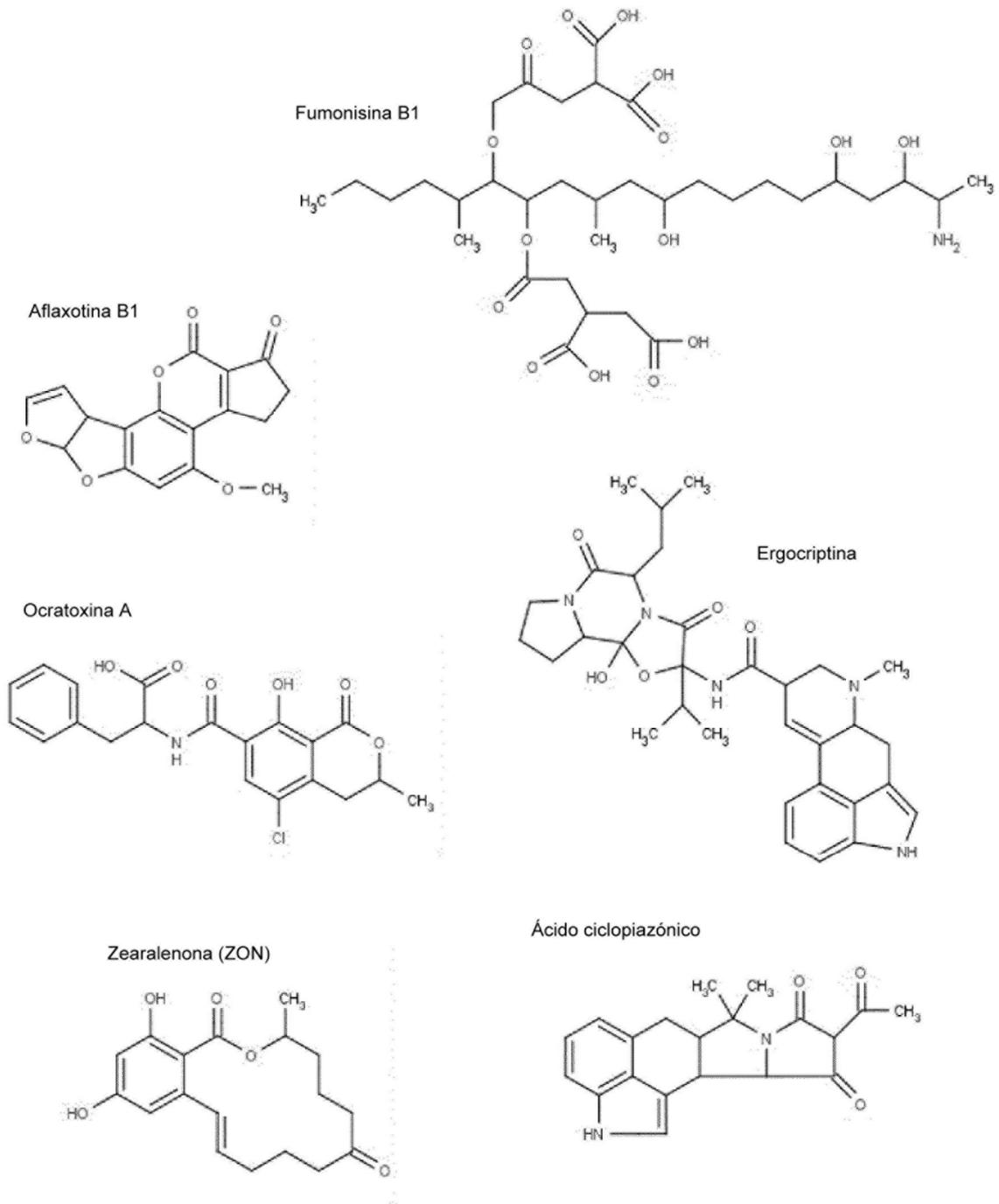


Figura 1.

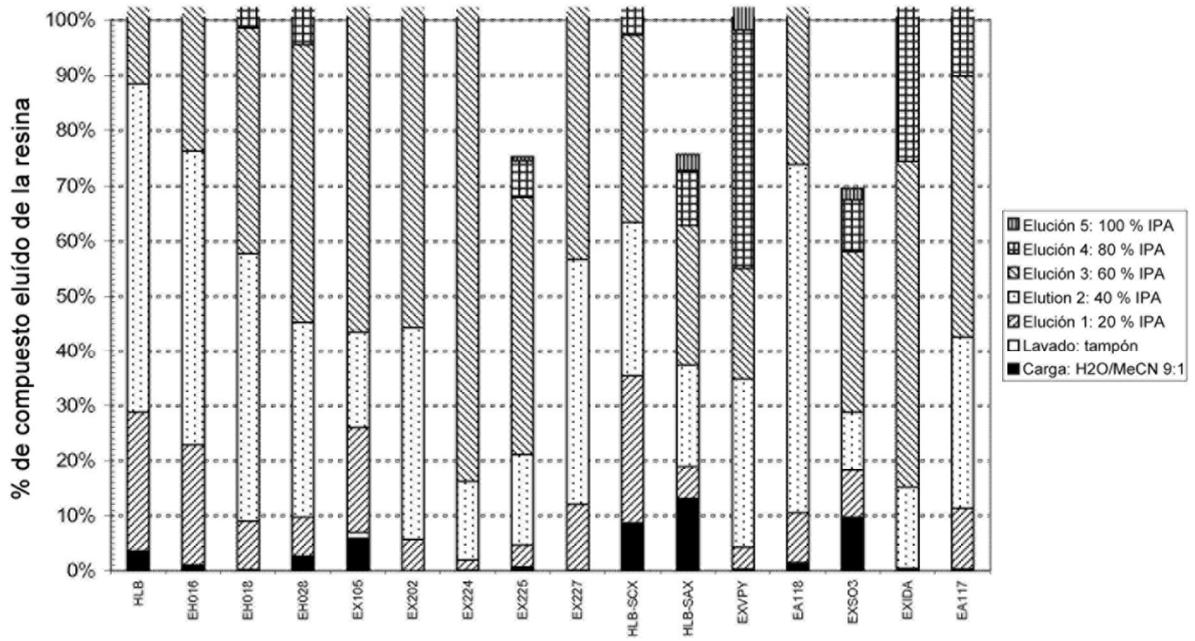


Figura 2.