



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901565139
Data Deposito	16/10/2007
Data Pubblicazione	16/04/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		

Titolo

DISPOSITIVO PER LA GENERAZIONE DI GRADIENTI DI FASE MOBILE A MICRO E NANOFIUSI PER CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA AD ALTE PRESTAZIONI.

DESCRIZIONE

dell'invenzione avente per titolo:

"Dispositivo per la generazione di gradienti di fase mobile a micro- e nanoflussi per cromatografia liquida ad alte prestazioni"

della DANI INSTRUMENTS S.p.A. a Cologno Monzese (Milano)

depositata il 16 ottobre 2007 presso la Camera di Commercio dell'Industria, dell'Artigianato e dell'Agricoltura di Venezia.

La presente invenzione concerne un dispositivo per la generazione di gradienti di fase mobile a micro- e nanoflussi per cromatografia liquida ad alte prestazioni.

Negli ultimi decenni si è assistito ad una progressiva miniaturizzazione di sistemi di cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), in particolare per quanto riguarda i flussi di fase mobile impiegati. Ciò in quanto la riduzione dei flussi consente, innanzitutto, di limitare il consumo di solventi costosi e tossici; inoltre, essa comporta la riduzione dei volumi di iniezione e, quindi, permette di trattare quantità di campione molto piccole. Oltre a ciò, se si utilizzano rivelatori sensibili alla concentrazione, si assiste ad un incremento della sensibilità, grazie alla minore diluizione del soluto in colonna e ad un miglior rapporto segnale-rumore.

Infine le nuove tecniche di accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa LC-MS richiedono di lavorare a flussi inferiori ad 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ per ottenere maggiori sensibilità e limitare i rischi di possibili contaminazioni.

Tuttavia uno dei problemi che si incontrano lavorando a flussi molto ridotti consiste nella mancanza di una strumentazione in grado di generare gradienti affidabili di fase mobile, con un ritardo limitato ed una miscelazione omogenea dei solventi. Certamente la generazione di un gradiente a flussi inferiori a 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ richiede un adeguato sistema di pompaggio, in grado non solo di miscelare accuratamente ed omogeneamente le fasi mobili, ma anche di trasferirle in colonna in modo riproducibile e con minimo ritardo. Tuttavia, in queste condizioni, la strumentazione disponibile sul mercato è costretta ad operare nelle sue condizioni limite e, quindi, l'affidabilità delle prestazioni è spesso discutibile. Inoltre

spesso il profilo effettivo del gradiente presenta un andamento insoddisfacente rispetto a quello impostato.

Uno dei modi più comuni per generare gradienti di fase mobile a micro- e nanoflussi consiste nella tecnica split-flow che impiega un parzializzatore (splitter) inserito tra le pompe HPLC e l'iniettore. Questa soluzione è limitata da uno scarso controllo del gradiente realmente trasferito in colonna e, di conseguenza, da una scarsa riproducibilità. Uno dei primi tentativi di realizzare gradienti a nano-scala consiste nell'immagazzinare in un capillare un gradiente specifico e di trasferirlo poi in colonna con una pompa a siringa. Inconvenienti di tale sistema consistono in una bassa praticità, in una limitata scelta dei gradienti da realizzare ed in uno scarso controllo della forma del gradiente.

Un altro noto sistema, conosciuto come metodo della diluizione esponenziale, prevede di far passare rapidamente il flusso di fase mobile dall'eluente debole, contenuto in una camera di miscelazione, all'eluente forte, con generazione di un gradiente con profilo esponenziale concavo.

Inconveniente di questo sistema consiste nel numero limitato di tipologie di gradienti generabili.

Allo scopo di superare questo inconveniente è già stato proposto di riempire la camera di miscelazione con l'eluente debole e di far fluire l'eluente forte in maniera programmata all'interno di un miscelatore dinamico, in modo da poter controllare l'andamento del gradiente nel tempo.

Inconveniente di questo sistema consiste in una scarsa versatilità di profili di gradienti realizzabili.

Un altro noto sistema prevede di generare un gradiente esponenziale a nanoflussi, introducendo in due camere di miscelazione successive dapprima

l'eluente debole e poi l'eluente forte e trasportandoli poi in colonna usando una pompa alla volta.

Inconveniente di questa nota soluzione consiste in una limitata selezione di gradienti e di profili, oltre che in un consistente ritardo del gradiente.

US 7.135.111 descrive un dispositivo per l'eluizione a gradiente a nanoflussi. Esso comprende una prima pompa per la miscelazione di solventi diversi e per il loro trasporto, una seconda pompa per il trasporto di una soluzione di trasferimento, un iniettore, una colonna ed un sistema di rivelazione. Due loop consentono di immagazzinare temporaneamente diverse miscele di solventi, che vengono trasferite dalla prima pompa a microflussi e successivamente vengono trasportate in colonna a nanoflussi dalla seconda pompa, attraverso una modifica dei collegamenti interni al sistema e, quindi, della direzione del flusso.

Inconveniente di questa nota soluzione consiste nella difficoltà di erogare la fase mobile a flusso costante lavorando a nanolitri/min.

US 7.141.161 descrive un dispositivo di pompa a gradiente in grado di trasferire eluenti ad un cromatografo in maniera continua, secondo intervalli di tempo specifici e ad un flusso costante dell'ordine dei nanolitri/minuti mentre la composizione di due o più eluenti viene modificata. Il dispositivo di pompa a gradiente include una valvola multiposizione a dieci porte, un primo loop collegato ad una pompa isocratica ed un secondo loop, attraverso il quale vengono trasferiti gli eluenti.

Inconveniente di questa nota soluzione consiste in una notevole complessità del sistema di pompe e di valvole che rendono particolarmente difficile l'automatizzazione della strumentazione.

Scopo dell'invenzione è di eliminare gli inconvenienti sopra descritti e di fornire un nuovo dispositivo per generare gradienti accurati e riproducibili a nano - ed a microflussi.

Questo scopo ed altri che risulteranno dalla descrizione che segue, sono raggiunti secondo l'invenzione con un dispositivo per la generazione di gradienti di fase mobile a micro - e nanoflussi per cromatografia liquida ad elevate prestazioni, caratterizzato dal fatto di comprendere:

- un generatore di micro- e nanoflussi di almeno due fasi mobili in differenti composizioni percentuali,
- un distributore di gradiente a n posizioni con una porta di ingresso, una porta di uscita ed $(n-2) / 2$ coppie di porte per altrettanti loop in capillare, ciascuno collegabile selettivamente con un'estremità alla porta di ingresso e con l'altra estremità alla porta di uscita,
- un deviatore di flusso avente l'ingresso collegato con l'uscita del distributore di gradiente a n posizioni, con un'uscita collegata allo scarico e con un'altra uscita collegabile ad un misuratore di micro- e nanoflussi, a sua volta collegato con il circuito analitico,
- un'unità di gestione e controllo provvista di mezzi di comando del generatore di micro- e nanoflussi per creare le differenti composizioni delle miscele di fasi mobili, di mezzi di generazione dei gradienti, agenti sui tempi di attuazione e di permanenza del distributore di gradiente, di mezzi di controllo della portata del generatore di micro- e nanoflussi in funzione delle informazioni ricevute dal misuratore di micro- e nanoflussi e di mezzi di controllo della posizione del deviatore di flusso.

La presente invenzione viene qui di seguito ulteriormente chiarita in due sue preferite forme di pratica realizzazione riportate a scopo puramente

esemplificativo e non limitativo con riferimento alle allegate tavole di disegni, in cui:

la figura 1 mostra in vista schematica il dispositivo secondo l'invenzione in una prima forma di realizzazione, con due convenzionali pompe HPLC unite ad un dispositivo di splittaggio,

la figura 2 mostra cinque replicati della separazione cromatografica di una miscela di quattro componenti ad una prefissata concentrazione,

la figura 3 raffigura il profilo di un gradiente smussato e privo di gradini,

la figura 4 mostra tre differenti profili di un gradiente da 0% a 100% di CH₃CN in H₂O in particolari condizioni cromatografiche,

la figura 5 mostra l'andamento teorico atteso dei tre profili di figura 4,

la figura 6 mostra in vista schematica il dispositivo secondo l'invenzione in una differente forma di realizzazione con due pompa HPLC a siringa per micro- e nanoflussi.

Con riferimento alla figura 1, il dispositivo secondo l'invenzione nella prima forma di realizzazione è previsto per generare micro- e nanogradienti.

Esso comprende due bottiglie 2,4 di due solventi A e B; essi sono collegati, tramite due tradizionali pompe HPLC reciprocanti 6,8, ad un miscelatore 10, a sua volta collegato ad un filtro 12 di acciaio sinterizzato con pori di 0.5 µm. Quest'ultimo è connesso all'ingresso di una valvola multiposizione 16, attraverso un circuito di splittaggio, indicato globalmente con 18.

Questo circuito di splittaggio comprende una valvola 14 e due identici capillari 20,20' di PEEKsil (25 o 50 µm I.D.) collegati alla valvola attraverso un circuito a ridotto volume morto e collegati altresì allo scarico 22. Il circuito di splittaggio 18 consente di ottenere il flusso desiderato a partire dal flusso elevato generato dalle pompe HPLC 6,8 grazie all'impedenza offerta dai due capillari

20,20' e dalla colonna cromatografica 26, alimentata dal dispositivo secondo l'invenzione.

La valvola multiposizione 16 è di tipo tradizionale, ad esempio modello EMTCS6UW della Valco Instruments Co. Inc. Huston TX, ed è dotata di quattordici porte, due delle quali costituiscono l'entrata e l'uscita, mentre le altre dodici rappresentano i punti di connessione per sei loop 24_i realizzati con tubazioni di peek del diametro interno di 250 μm , per l'immagazzinamento della fase mobile.

I primi cinque loop $24_1 - 24_5$ hanno eguale volume pari a 50 μL , mentre il sesto loop ha volume pari a 150 μL . Esso contiene la composizione finale del gradiente ed il suo volume maggiore può essere utile per completare l'analisi cromatografica e per pulire la colonna 26.

La porta di uscita della valvola multiposizione 16 è collegata all'ingresso di una valvola a due posizioni 28, che ha un'uscita collegata allo scarico 30 ed un'altra uscita collegata ad un misuratore di micro- e nanoflussi 32, a sua volta collegato ad un iniettore 34 della colonna cromatografica 26, cui è associato un rivelatore 36.

Le funzioni di ogni componente del dispositivo, ed in particolare la gestione delle due valvole a due posizioni 14 e 28 e della valvola multiposizione 16 è coordinata da un sistema di controllo 38, che assicura il funzionamento automatico ed organizzato del dispositivo stesso.

In funzionamento, la prima operazione prevista consiste nel caricamento dei sei loop 24_i associati alla valvola multiposizione 16. Per effettuare questo caricamento le due valvole a due posizioni 14 e 28 vengono comandate in modo che la valvola 14 by-passi il dispositivo di splittaggio 18 e che la valvola 28 colleghi l'uscita della valvola multiposizione 16 con lo scarico 30.

In questa configurazione le pompe 6 ed 8 possono fornire un flusso elevato, di circa 0.8 - 1.0 mL/min per accelerare la procedura. Il sistema di controllo attiva un programma di gestione delle pompe 6 e 8, correlato ad un programma di tempi di attuazione della valvola multiposizione 16, per distribuire le differenti composizioni di fase mobile a potere eluente crescente nei sei loop 24_i.

Ad esempio, se si vuole generare un gradiente dal 100% del solvente A, contenuto nella bottiglia 2, al 100% del solvente B, contenuto nella bottiglia 4, viene selezionato il primo loop 24₁ e contemporaneamente la sola pompa 6 è programmata per spingere il 100% del solvente A; ad un flusso di 0.8 - 1.0 mL/min, il tempo di riempimento del loop consisterebbe, in teoria, in pochi secondi, ma in pratica è consigliabile attendere un paio di minuti di condizionamento. Quindi, dopo alcuni minuti, il loop 24₁ è completamente caricato con la sua corrispondente composizione di fase mobile ed il sistema di controllo attiva la valvola multiposizione 16 per collegare alla valvola 14 il secondo loop 24₂; al tempo stesso il funzionamento delle pompe 6 e 8 viene modificato in modo che la pompa 6 spinga l'80% del solvente A e la pompa 8 spinga il 20% del solvente B.

Dopo un altro paio di minuti viene selezionato il terzo loop 24₃ e le pompe vengono ulteriormente modificate, in modo da fornire il 60% del solvente A ed il 40% del solvente B.

Il processo viene poi ripetuto fino a quando viene selezionato il sesto loop 24₆ e la sola pompa 8 viene programmata per erogare il 100% del solvente B.

Completato il caricamento dei loop 24_i, si seleziona nuovamente il primo loop 24₁ ed il passaggio del 100% di solvente A; si diminuisce poi il flusso e si commutano le due valvole a due posizioni 14 e 28 in modo da inserire il circuito di splittaggio e da collegare la valvola multiposizione 16 al circuito analitico. Il

sistema elabora le informazioni in arrivo dal misuratore di nanoflussi 32 e regola il flusso della pompa 6 per ottenere nella colonna 26 il flusso desiderato.

In questa configurazione, un micro- o nanoflusso di solvente A, proveniente dal circuito di splittaggio 18, ricarica continuamente il primo loop 24₁ con l'eluente più debole (generalmente acqua) per il condizionamento della colonna 26.

Successivamente all'introduzione del campione e all'inizio dell'analisi cromatografica, la valvola multiposizione 16 viene attivata, in modo da trasferire in colonna 26 il contenuto del loop successivo 24₂, caricato con una composizione di fase mobile a maggior potere eluente. Questo processo si ripete sequenzialmente per tutti i loop. L'andamento del gradiente che si vuole generare viene ottenuto giocando sui tempi di attuazione e di permanenza. Il solvente A, che viene utilizzato invariato per spingere il contenuto di ciascuna loop fino al termine dell'analisi, consente di erogare un flusso di fase mobile costante.

Non è necessaria alcuna modifica nel cromatografo convenzionale per installare il dispositivo secondo l'invenzione. Questo aspetto è particolarmente importante, in quanto consente ad ogni HPLC convenzionale disponibile in commercio di lavorare efficacemente a micro- ed a nanoflussi.

Grazie al basso flusso utilizzato ed al diametro ridotto dei loop 24_i e dei capillari di connessione, non si verifica alcun fenomeno di turbolenza, nè alcun mescolamento: conseguentemente, una volta completamente riempiti, i sei loop 24_i sono in grado di fornire eluente sufficiente per differenti analisi, a seconda del flusso. Il sistema di controllo conserva in memoria le quantità di solvente utilizzato da ciascun loop 24_i durante ogni analisi cromatografica, a seconda del tipo di gradiente e del flusso utilizzati: ciò consente che prima che i loop 24_i siano stati completamente vuotati della corrispondente composizione di fase mobile, e

quindi prima che siano incapaci di generare il corretto gradiente, una nuova procedura di caricamento viene automaticamente avviata.

Allo scopo di valutare le caratteristiche e le prestazioni del dispositivo secondo l'invenzione è stata verificata la ripetibilità intraday effettuando cinque analisi di una miscela di quattro composti monuron, difenoxuron, linuron, azinphos ethyl, ognuno ad una concentrazione di 5 mg/L.

Le separazioni sono state ottenute con una colonna Agilent Zorbax 150 mm x 75 μm , impaccata con particelle da 3.5 μm di fase C 18, utilizzando un gradiente lineare dallo 0% al 100% di CH_3CN in H_2O in 16 min; volume di iniezione 50 nL e rivelazione con UV a $\lambda = 230 \text{ nm}$.

In figura 2 è evidenziata l'elevata ripetibilità dei tempi di ritenzione nelle cinque analisi, in quanto la deviazione standard relativa è risultata inferiore a 0.19%.

Nella seguente tabella 1 sono indicati i tempi di ritenzione relativi ai cromatogrammi di figura 2, per una valutazione più dettagliata della ripetibilità intraday.

TABELLA 1

Composto	Inj 1	Inj 2	Inj 3	Inj 4	Inj 5	\bar{X}	SD	RSD (%)
Monuron	19,497	19,473	19,553	19,457	19,507	19,4974	0,03678	0,188643
Difenoxuron	21,847	21,780	21,833	21,847	21,830	21,8274	0,027628	0,126574
Linuron	22,877	22,780	22,847	22,837	22,843	22,8368	0,035302	0,154582
Azinphos Ethyl	24,657	24,557	24,640	24,630	24,640	24,6248	0,039124	0,158881

Allo scopo di valutare poi la ripetibilità interday, sono state eseguite dieci separazioni cromatografiche al giorno per cinque giorni lavorativi consecutivi. I composti analizzati sono stati: methomyl, monuron, difenoxuron, linuron, ognuno alla concentrazione di 195 mg/L. Il gradiente utilizzato è stato dal 100% di H₂O al 100% di CH₃CN in 16 min. Flusso 360 nL/min; colonna Agilent Zorbax C18 3.5 µm, 150 mm x 75 µm; volume di iniezione 60 nL; rivelazione UV a $\lambda = 230$ nm.

Nella seguente tabella 2 sono riportate le medie dei tempi di ritenzione di ogni composto per ogni giorno lavorativo e le deviazioni standard relative alle medie giornaliere. Per tutti i composti si può osservare un'ottima ripetibilità interday.

TABELLA 2

Composto	\bar{X} Day 1	\bar{X} Day 2	\bar{X} Day 3	\bar{X} Day 4	\bar{X} Day 5	RSD %
Methomyl	10,59	10,55	10,68	10,81	10,44	1,31
Monuron	14,87	14,86	14,71	14,69	14,88	0,63
Difenoxuron	17,21	17,13	16,98	16,94	17,10	0,65
Linuron	19,15	19,04	18,89	18,91	18,99	0,55

In genere è consigliato di utilizzare un gradiente privo di scalini, allo scopo di ottenere una variazione costante della composizione della fase mobile nel tempo. Infatti improvvise variazioni della fase mobile, tipiche dell'andamento a gradini, corrispondono a rapidi cambiamenti di polarità, che possono interferire imprevedibilmente con la separazione cromatografica sia in termini di risoluzione, sia in termini di riproducibilità.

A nanoflussi, le diverse fasi mobili contenute in loop contigui, si alternano miscelandosi reciprocamente all'interno dei volumi della valvola multiposizione 16 e delle connessioni ed evitando brusche variazioni nella composizione dei solventi.

In figura 3 è rappresentato un gradiente smussato e privo di gradini.

In figura 4, dove sono riportati i profili di tre gradienti di 12 minuti, ottenuti ad un flusso di 400 nL/min, utilizzando differenti programmi di attuazione della valvola.

I loop 24_i erano stati riempiti con le seguenti composizioni di solventi: loop 24₁: 100% H₂O - 0% CH₃CN; loop 24₂: 80% H₂O - 20% CH₃CN; loop 24₃: 60% H₂O - 40% CH₃CN; loop 24₄: 40% H₂O - 60% CH₃CN; loop 24₅: 20% H₂O - 80% CH₃CN; loop 24₆: 0% H₂O - 100% CH₃CN.

I programmi di attuazione erano i seguenti: loop 24₂ per 0.30 minuti, loop 24₃ per 1 minuto, loop 24₄ per 1.30 minuti, loop 24₅ per 9.00 minuti per la curva a, che rappresenta il gradiente concavo; loop 24₂ per 3 minuti, loop 24₃ per 3 minuti, loop 24₄ per 3 minuti, loop 24₅ per 3 minuti per la curva b, che rappresenta il gradiente lineare; loop 24₂ per 9.00 minuti, loop 24₃ per 1.30 minuti, loop 24₄ per 1 minuto, loop 24₅ per 0.30 minuti per la curva c, che rappresenta il gradiente convesso.

Gli andamenti teorici attesi sono riportati in figura 5. Le tracce relative all'assorbanza sono molto ben differenziate, come atteso dai tempi di attuazione selezionati. Questo è risultato particolarmente importante, considerando il flusso operativo estremamente ridotto.

L'elevata corrispondenza tra l'andamento atteso e quello reale del gradiente in diverse condizioni consente di impostare la forma del gradiente sia attraverso una tabella dei tempi di attuazione, sia attraverso un approccio grafico

più intuitivo. Infatti, il sistema di controllo fornisce la possibilità di visualizzare sul monitor del computer il profilo del gradiente, in funzione dei tempi di attuazione: ogni cambiamento dei tempi impostati si riflette immediatamente in un corrispondente cambiamento del profilo visualizzato.

Nello stesso modo ogni modifica del profilo del gradiente, ottenuta trascinando la curva grafica con il puntatore del computer, determina una corrispondente modifica nei tempi di attuazione in tabella. Di conseguenza ogni forma del gradiente può essere facilmente programmata, stabilendo i parametri temporali in tabella o il profilo grafico.

Quando si deve eseguire un gradiente lineare è possibile utilizzare il comando "Gradiente Lineare", il quale, in funzione della durata selezionata per il gradiente, calcola automaticamente i tempi di attuazione e mostra il profilo del gradiente.

Nella forma di realizzazione illustrata in figura 6, il dispositivo secondo l'invenzione differisce da quello illustrato in figura 1 per la sostituzione delle pompe reciprocanti 6 e 8 con pompe a siringa per micro- e nanoflussi 40 e 42. Ciò consente di ottenere nanoflussi senza ricorrere al circuito di splittaggio 18.

Per il resto il dispositivo è analogo e gli stessi componenti portano la stessa numerazione.

Da quanto detto risulta chiaramente che il dispositivo secondo l'invenzione si presenta particolarmente vantaggioso, in quanto consente di generare micro- e nano flussi in forma automatica, con elevatissima flessibilità nella scelta dell'andamento del gradiente, conformemente alle esigenze analitiche, e sempre con elevatissima accuratezza e riproducibilità.

La presente invenzione è stata illustrata e descritta in due sue preferite forme di realizzazione, ma si intende che varianti esecutive potranno ad esse in

pratica apportarsi, senza peraltro uscire dall'ambito di protezione del presente brevetto per invenzione industriale.

RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo per la generazione di gradienti di fase mobile a micro- e nanoflussi per cromatografia liquida ad alte prestazioni, caratterizzato dal fatto di comprendere:

- un generatore (2,4,6,8,40,42,10) di micro- e nanoflussi di almeno due fasi mobili in differenti composizioni percentuali,
- un distributore di gradiente (16) a n posizioni con una porta di ingresso, una porta di uscita ed $(n-2)/2$ coppie di porte per altrettanti loop in capillare (24_i), ciascuno collegabile selettivamente con una estremità alla porta di ingresso e con l'altra estremità alla porta di uscita,
- un deviatore di flusso (28) avente l'ingresso collegato con l'uscita del distributore di gradiente a n posizioni (16), con un'uscita collegata allo scarico (30) e con un'altra uscita collegata ad un misuratore di micro- e nanoflussi (32), a sua volta collegato con il circuito analitico (26,36),
- un'unità di gestione e controllo (38) provvista di mezzi di comando del generatore di micro- e nano flussi (2,4,6,8,40,42,10) per creare le differenti composizioni delle miscele di fasi mobili, di mezzi di generazione dei gradienti, agenti sui tempi di attuazione e di permanenza del distributore di gradiente (16), di mezzi di controllo della portata del generatore di nano e micro flussi in funzione delle informazioni ricevute dal misuratore di micro- e nanoflussi (32) e di mezzi di controllo della posizione del deviatore di flusso (28).

2. Dispositivo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che il generatore di micro- e nanoflussi comprende almeno due bottiglie (2,4) contenenti differenti solventi, una pompa reciprocante (6,8), associata a ciascuna bottiglia, un miscelatore (10) dei flussi generati da dette pompe ed un circuito di splittaggio (18).

3. Dispositivo secondo la rivendicazione 2 caratterizzato dal fatto che il circuito di splittaggio (18) comprende una valvola (14) comandata da detta unità di gestione e controllo (38) a commutare tra una posizione di inserimento ed una posizione di by-passaggio di detto circuito di splittaggio (18).
4. Dispositivo secondo la rivendicazione 3 caratterizzato dal fatto che detto circuito di splittaggio comprende almeno un capillare (20,20') collegato a detta valvola (14) ed allo scarico (22).
5. Dispositivo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che il generatore di micro- e nanoflussi comprende almeno due bottiglie (2,4) contenenti differenti solventi, una pompa a siringa (40,42) associata a ciascuna bottiglia ed un miscelatore dei micro- e nanoflussi generati da detta pompa a siringa.
6. Dispositivo secondo le rivendicazioni 2 o 5 caratterizzato dal fatto che tra detto miscelatore (10) e detto distributore di gradiente (16) è interposto un filtro (12).
7. Dispositivo secondo la rivendicazione 6 caratterizzato dal fatto che detto filtro (12) è realizzato in acciaio sinterizzato con pori dell'ordine di $0.5 \mu\text{m}$.
8. Dispositivo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che n-1 loop (24₁-24₅) del distributore di gradiente (16) hanno lo stesso volume mentre l'n-esimo loop (24₆) ha volume maggiore.
9. Dispositivo secondo la rivendicazione 8 caratterizzato dal fatto che n-1 loop (24₁-24₅) del distributore di gradiente (16) hanno volume dell'ordine di $50 \mu\text{L}$ e l'n-esimo loop (24₆) ha volume dell'ordine di $150 \mu\text{L}$.
10. Dispositivo secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che il distributore di gradiente (16) è costituito da una valvola a n posizioni.

11. Dispositivo per la generazione di gradienti di fase mobile a micro- e nanoflussi per cromatografia liquida ad alte prestazioni secondo le rivendicazioni da 1 a 10 e sostanzialmente come illustrato e descritto.

p.i. della DANI INSTRUMENTS S.p.A.

Dr. Ing. Paolo Piovesana

FIG. 1

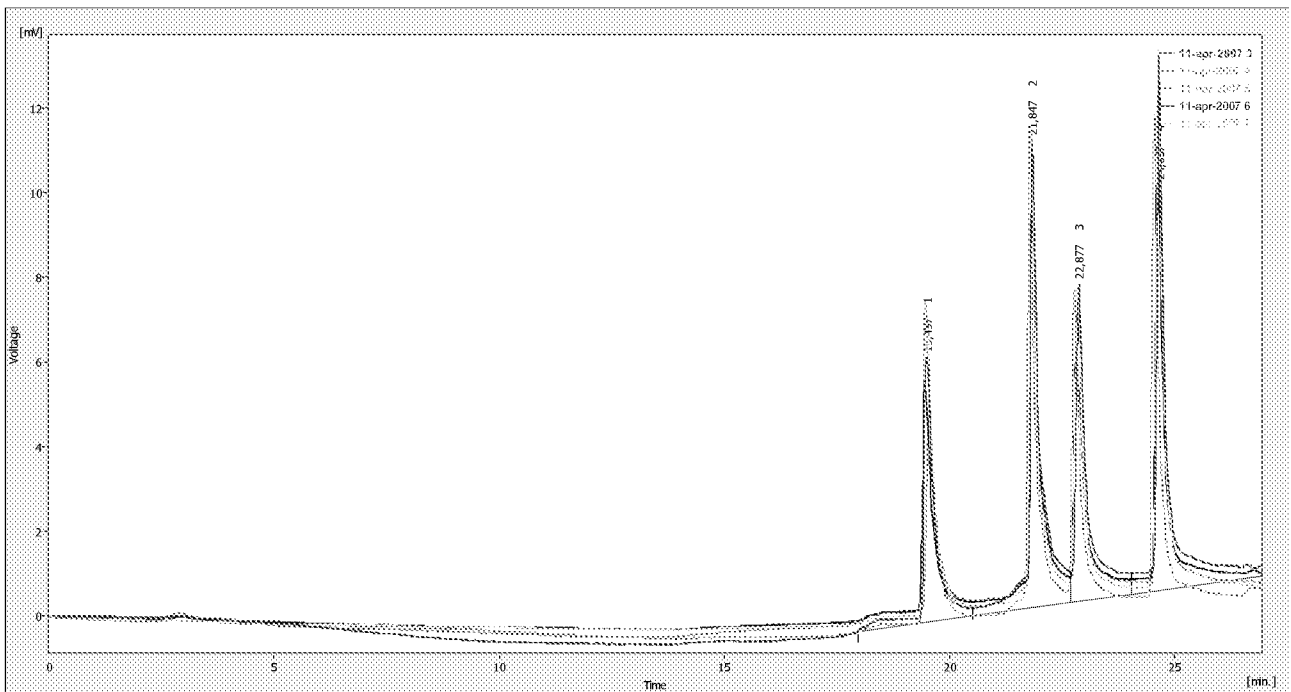
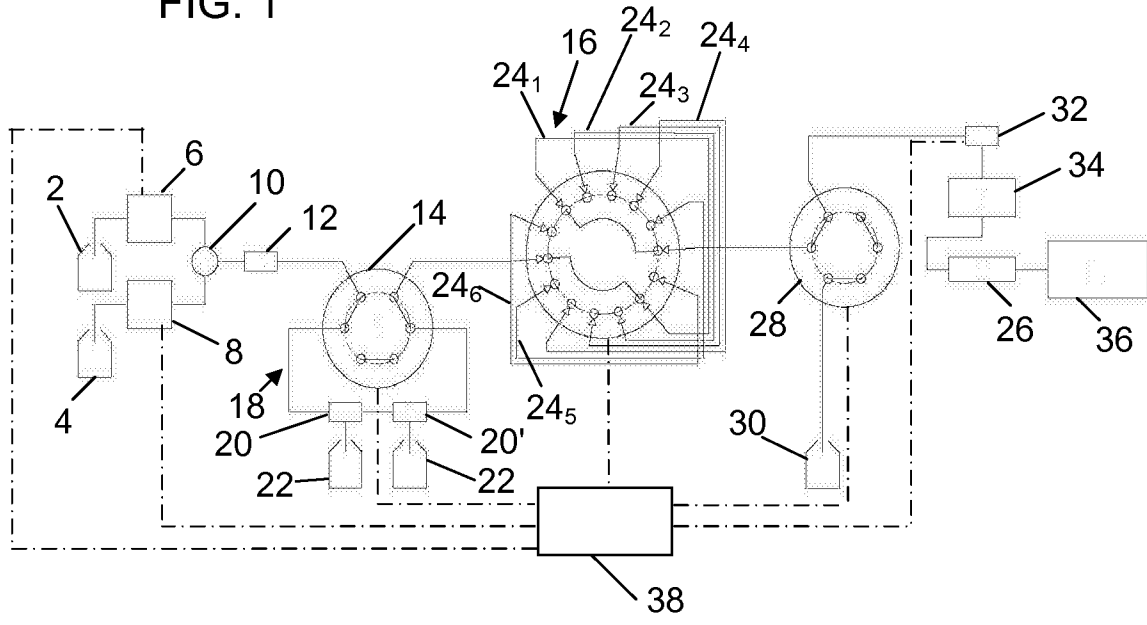


FIG. 2

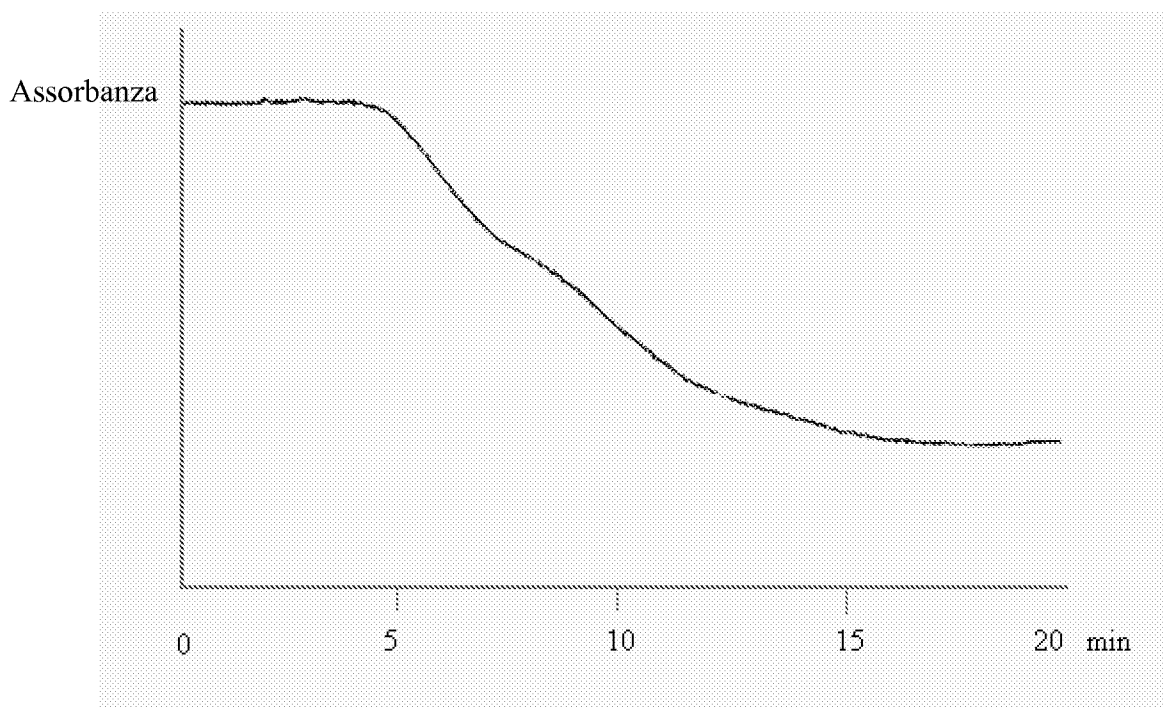


FIG. 3

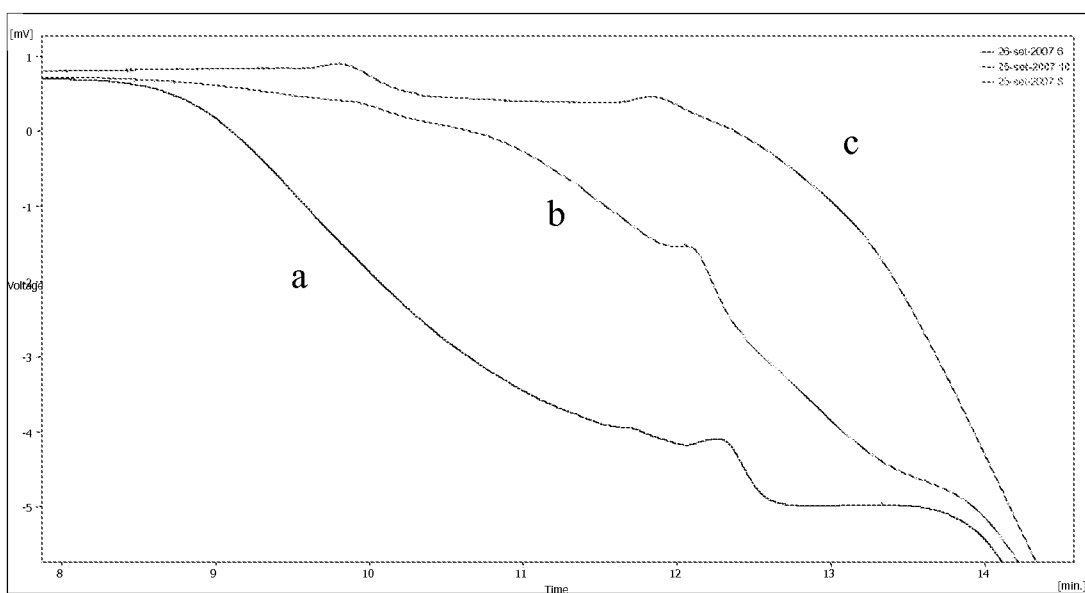


FIG. 4

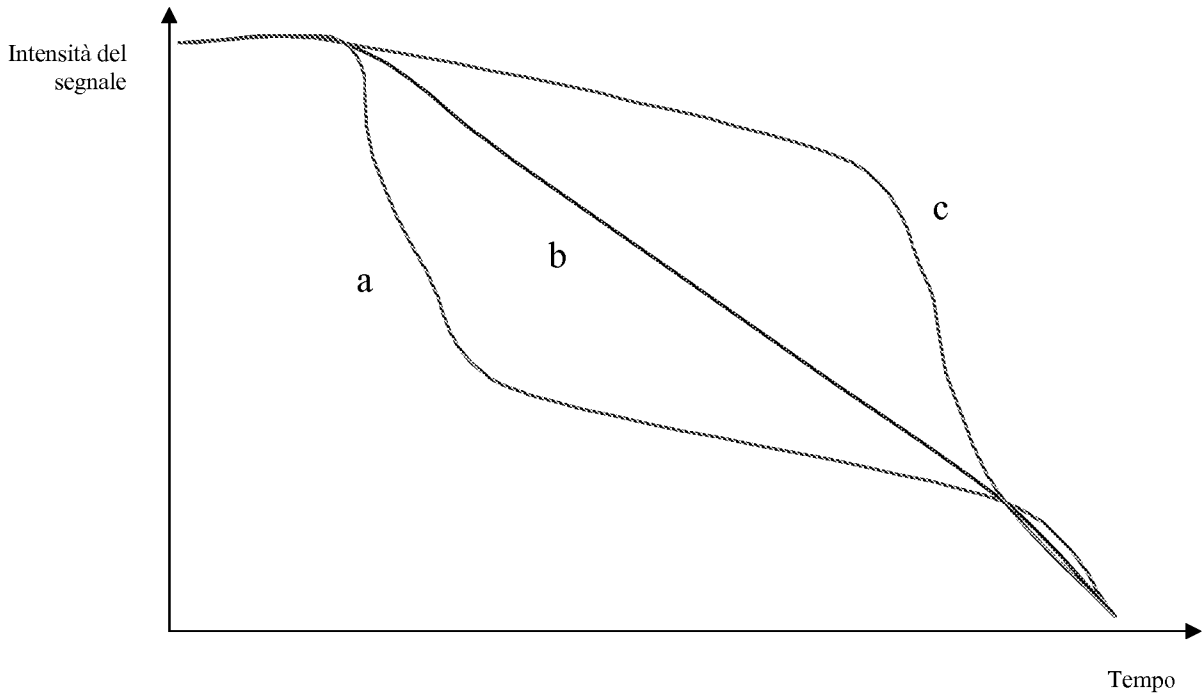


FIG. 5

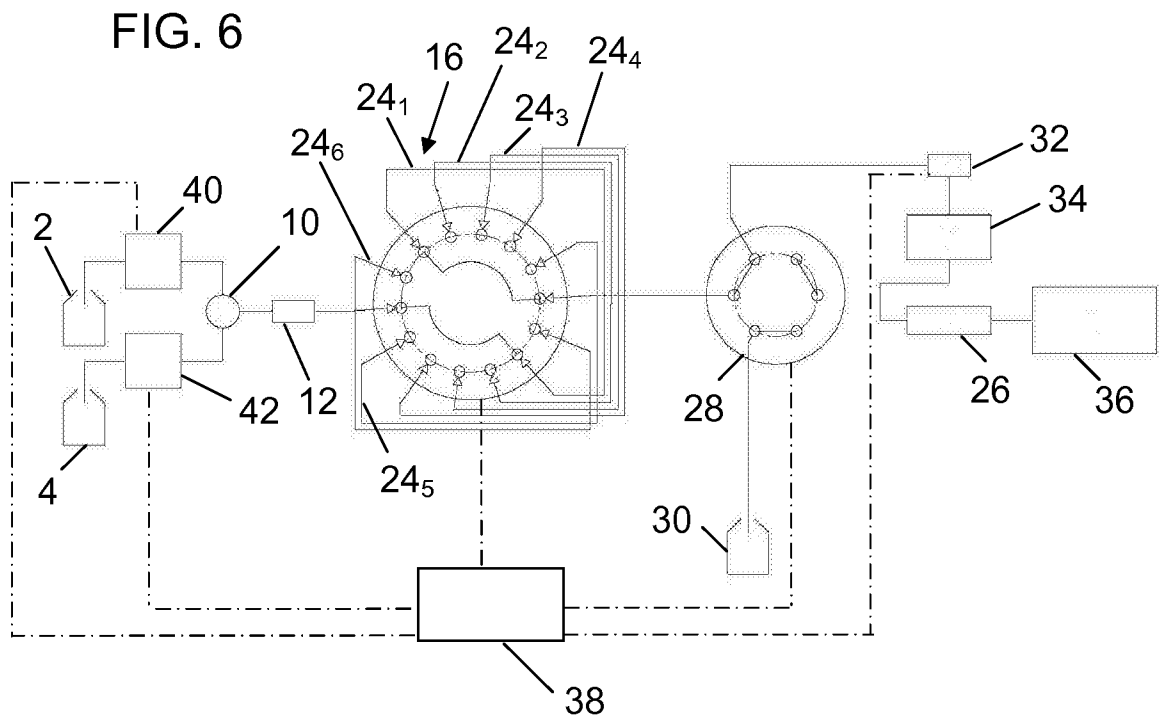


FIG. 6