



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 304 468**

(51) Int. Cl.:
B01D 11/00 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02803003 .9**
(86) Fecha de presentación : **11.11.2002**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1446209**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

(54) Título: **Procedimiento para la extracción de sustancias de contenido de material orgánico.**

(30) Prioridad: **13.11.2001 DE 101 55 517**
29.01.2002 DE 102 03 551

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2008

(73) Titular/es: **Metanomics GmbH**
Tegeler Weg 33
10589 Berlin-Charlottenburg, DE

(72) Inventor/es: **Herold, Michael, Manfred;**
Dostler, Martin;
Looser, Ralf;
Walk, Tilmann, B.;
Fegert, Achim;
Kluttig, Martin;
Lehmann, Britta;
Heidemann, Silke;
Hennig, Annette y
Kopka, Joachim

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la extracción de sustancias de contenido de material orgánico.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la extracción de sustancias de contenido de material orgánico, que comprende el paso extracción con una mezcla monofásica constituida por un 50% en volumen a un 90% en volumen de metanol, y un 50 a un 10% en volumen de agua, y opcionalmente un 0% en volumen a un 40% en volumen de otro disolvente o mezcla de disolventes. En una forma de ejecución, el procedimiento es parte de un procedimiento para el análisis de un perfil metabólico.

10 La compresión de vías de síntesis bioquímicas en el metabolismo de células animales o vegetales, incluyendo microorganismos, como bacterias, hongos, algas, o células de mamíferos, es aún muy rudimentaria a pesar del conocimiento de vías de síntesis principales. La determinación de estados fisiológicos durante crecimiento, desarrollo, o como reacción del estrés medioambiental está limitada hasta la fecha esencialmente a la investigación de moléculas objetivo aisladas, como por ejemplo RNA y proteínas. Modificaciones del nivel de mRNA o proteína, o su actividad, no se pueden correlacionar frecuentemente con modificaciones en el metabolismo, o incluso con funciones fenotípicas.

El análisis directo de sustancias de contenido celulares o metabolitos se efectúa frecuentemente mediante reacciones enzimáticas específicas, ensayos inmunológicos, o sobre la base de procedimientos cromatográficos, que identifican determinadas sustancias por medio de tiempos de retención o coeluciones con sustancias de referencia. Como se describe en Katona, J. Chromatography 1999, 847, 91-102, una gran parte del estado de la técnica trata sólo los análisis de pocos componentes específicos, por ejemplo ácidos o azúcares. La mayor parte de procedimientos conocidos limitan un análisis bioquímico extenso (a) no siendo abiertos, es decir, se pueden obtener sólo informaciones sobre metabolitos ya conocidos, (b) requiriendo trabajo muy intensivo, ya que frecuentemente sirven como base de los mismos ensayos aislados, (c) poseyendo sólo una resolución muy reducida, pudiéndose obtener, por consiguiente, sólo un perfil de complejidad muy reducido y contenido en información reducido, (d) comprendiendo sólo metabolitos o células sólo en un estado, a modo de ejemplo en una fase de crecimiento, o bajo influencia de un factor de estrés, y no pudiéndose seguir, por lo tanto, modificaciones dinámicas en la célula, o (e) registrando sólo algunas de las clases de sustancias presentes en el organismo, por ejemplo sólo azúcares o sólo ácidos grasos, o sólo determinados pesos moleculares, pero no la amplia gama de sustancias polares o apolares. Sólo al comienzo se muestra que los productos metabólicos o metabolitos no sólo representan productos intermedios o finales, sino que actúan también como sensores y reguladores.

La determinación extensa y cuantitativa de metabolitos y sustancias de contenido presentes en una muestra orgánica (independientemente de que esta determinación se limite a diferentes clases de sustancias, etapas de desarrollos o tipos de material, es decir, independientemente de que se trate de una huella dactilar metabólica, perfil metabólico o metabolismo) posibilita la investigación directa de influencias inmediatas de crecimiento, desarrollo o estrés sobre el organismo total o partes del mismo, y por consiguiente ayuda en la determinación de funciones génicas como parte esencial del análisis genómico funcional. Los procedimientos para el análisis de perfiles de metabolitos, en especial si son apropiados para el análisis de números de muestras mayores, permiten investigar la complejidad de interacciones reguladoras sobre todos los planos y en todos los estadios, y valorar no en último término la seguridad y el valor de organismos modificados genéticamente.

En la mayor parte de los casos ha avanzado la determinación de perfiles de metabolitos complejos en el rastreo diagnóstico, pero recientemente se describieron también primeros perfiles de plantas (para una sinopsis véase Trethewey, Curr. Opin. Plant. Biol. 1999, 2, 83-85). De este modo Sauter (ACS Symposium Series 1991, 443 (Synth. Chem. Agrochem. 2), American Chemical Society, Washington, DC, 288-299) muestra la modificación de sustancias de contenido en cebada tras tratamiento con diversos herbicidas. Como procedimiento ventajoso, Sauter describe que se pesaron y se extrajeron con un 100% de etanol muestras de plantas congeladas. Tras filtración, secado y sililado, las muestras se pueden separar a través de columnas capilares. Entre 100 y 200 señales se pudieron detectar, e identificar con ayuda de sustancias de referencia a través de sus coeficientes de retención en cromatografía de gases (GC), o a través de análisis por cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC/MS).

Fiehn, Nature Biotechnology 2000, 18, 1157-1161, describe la cuantificación de 326 sustancias en extractos de hojas de Arabidopsis. Para la comparación de cuatro genotipos diferentes, en un procedimiento costoso se homogeneizaron muestras de plantas congeladas, se extrajeron en 97% de metanol bajo calentamiento breve, y tras adición de cloroformo y agua en varios pasos se obtuvieron una fase polar y una fase apolar, que se analizaron entonces por LC/MS y GC/MS (s.a. Fiehn, Anal. Chem. 2000, 72, 3573-3580; <http://www.mpimp-golm.mpg.de/fiehn/blatt-protokoll-e.html>). Según un procedimiento muy similar, por Roessner, The Plant Journal 2000, 23, 131-142, se extrajeron sustancias de contenido de plantas en metanol, y se compararon entre sí los perfiles de metabolitos polares de plantas de patata cultivadas *in vitro* y en tierra.

Gilmour, Plant Physiology 2000, 124, 1854-1865 extrae azúcar a partir de hojas de Arabidopsis liofilizadas en 80% de etanol tras incubación durante 15 minutos a 80°C, e incubación durante la noche a 4°C. Igualmente a 80°C, durante 30 minutos y en un 80% de etanol con Hepes, pH 7,5, Strand, Plant Physiology 1999, 119, 1387-1397, extrae dos veces azúcares solubles y almidón sucesivamente. A esta temperatura elevada se extrae dos veces aún para mejorar el resultado de extracción, y ciertamente una vez con un 50% de etanol-Hepes, pH 7,5, y una vez con Hepes, pH 7,5.

ES 2 304 468 T3

Los procedimientos descritos en el estado de la técnica permiten sólo un automatizado limitado, que se puede realizar además sólo con un gasto técnico elevado. En especial el registro de grandes números de muestras, la determinación de influencia de factores de estrés múltiples sobre el metabolismo de organismos, o la observación de procesos dinámicos que requiere un análisis continuo de muestras en marcos de tiempo frecuentemente muy reducidos, ocasionan procedimientos

- (a) que son rápidos, es decir, a modo de ejemplo, que la fijación y análisis de muestras se efectúa dentro de un intervalo de tiempo corto tras la obtención de muestras,
- (b) que son altamente reproducibles, es decir, a modo de ejemplo, que un análisis a través de muchas muestras diferentes proporciona resultados dentro de una amplitud de error reducida,
- (c) que son sencillos de manejar, es decir, a modo de ejemplo, el procedimiento es automatizable, y realizable sin gasto técnico o personal elevado,
- (d) que son abiertos, es decir, a modo de ejemplo, que es analizable un gran número de sustancias, y/o
- (e) que son sensitivos, es decir, a modo de ejemplo que el análisis registra también modificaciones reducidas en concentraciones de sustancias, y cantidades de sustancias reducidas.

Muchos procedimientos tienen el inconveniente de ser apropiados sólo para el análisis de números de muestras reducidos. En el caso de un mayor número de muestras, la estabilidad de las muestras, y por consiguiente la reproducibilidad de resultados, no se pueden garantizar. Un extenso análisis continuo de material biológico, por ejemplo muestras animales o muestras de plantas, o por ejemplo la interacción entre sustancia(s) y organismos en sistemas complejos y su desarrollo temporal, por consiguiente, no es posible.

El problema técnico que motiva la presente invención era, por consiguiente, encontrar un procedimiento que permitiera superar los inconvenientes citados anteriormente de procedimientos conocidos en el estado de la técnica, y posibilitar el análisis rápido y sencillo de un mayor número de muestras con una sensibilidad y reproducibilidad elevada.

La solución del problema se pone a disposición mediante las formas de ejecución caracterizadas en las reivindicaciones de la presente invención.

Por consiguiente, la solicitud se refiere a un procedimiento para la extracción de sustancias de contenido de material orgánico, que comprende los pasos

- (a) extracción del material orgánico o de una parte del mismo con una mezcla monofásica constituida por un 50% en volumen a un 90% en volumen de metanol, y un 50% en volumen a un 10% en volumen de agua, y opcionalmente un 0% en volumen a un 40% en volumen de otro disolvente o mezcla de disolventes;
- (b) extracción del material orgánico o de una parte del mismo con un disolvente monofásico apolar o mezcla de disolventes, siendo el índice de polaridad según Kellner del disolvente apolar o mezcla de disolventes menor que el del agente de extracción de la fase polar en el paso (a) en 0,3 o más; y
- (c) reunión de los extractos del paso (a) y del paso (b) para dar una mezcla monofásica. A continuación se indican otros disolventes u otras mezclas de disolventes.

Bajo el concepto “material orgánico” se entiende cualquier material orgánico o biológico, como material de plantas, animales, microorganismos, a modo de ejemplo de protistas, hongos, bacterias, algas, virus, etc., por ejemplo organismos separados de material de cultivo, líquidos corporales, como sangre, linfa, secreciones o nutrientes, piensos, y otros productos animales o vegetales. Del mismo modo se entiende por este material de cultivo en el que viven organismos, es decir, a modo de ejemplo también tras separación de organismos, por ejemplo medios para el cultivo de microorganismos, como protistas, por ejemplo quinetoplastas, plasmodias o bacterias, por ejemplo bacterias gram positivas o gram negativas, o algas, hongos, por ejemplo levaduras, o células animales o vegetales.

Bajo el concepto “extracción”, según la invención se entiende que a partir de una muestra sólida o líquida con disolventes apolares a polares, o mezclas de disolventes, las sustancias contenidas en la misma, por ejemplo sustancias de contenido de material orgánico, se pueden trasladar al respectivo disolvente o mezcla de disolventes. En un disolvente polar, o como por ejemplo agua, se disuelven las sustancias de contenido hidrófilas, por ejemplo también metabolitos, en un disolvente lipófilo se disuelven las sustancias de contenido hidrófobas, por ejemplo también metabolitos, del material.

A continuación se entiende por “disolventes polares o mezclas de disolventes” disolventes o mezclas de disolventes con un índice de polaridad de 4 a 10,2, preferentemente de 5 a 7, más preferentemente de 5,5 a 6,5 según Kellner, Analytical Chemistry, Weinheim, 1998, página 195. Los disolventes polares son, por ejemplo, agua, incluyendo diso-

luciones acuosas, o disolventes orgánicos polares apróticos o próticos, a modo de ejemplo alcoholes de alquilo con un resto alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo metanol, etanol, 1-propano, 2-propanol, butano, pentanol, hexanol, o por ejemplo acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, dimetilsulfóxido o N,N-dimetilformamida, u otros disolventes con una polaridad mayor o igual a 0,50, como se indica, por ejemplo, en Küster/Thiel, *Rechentafeln für die Chemische Analytik*, Wlatter de Gruyter, Berlin/New York 1993, página 359, o son mezclas de los mismos. Una mezcla de disolventes empleadas según la invención, constituida por un 80% de metanol / un 20% de agua, tiene, por ejemplo, el índice de polaridad de 6,1 según Kellner, 1998.

A continuación se entiende por “disolventes apolares o mezclas de disolventes” disolventes o mezclas de disolventes que tienen un índice de polaridad según Kellner, *Analytical Chemistry*, Weinheim, 1998, página 195, que es más reducido que el del agente de extracción de la fase polar en 0,3 o más. El índice de polaridad según Kellner, 1998 es más reducido que el del agente de extracción de la fase polar en 0,5, de modo aún más preferente en 1, en la mayor parte de los casos preferentemente en más de 2. Una mezcla de disolventes empleadas según la invención constituida por un 40% de metanol/60% de diclorometano, tiene, por ejemplo, un índice de polaridad de 3,9 según Kellner, 1998. “Disolventes apolares” son, por ejemplo, disolventes orgánicos, a modo de ejemplo disolventes halogenados, como cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, o disolventes alifáticos como hexano, ciclohexano, pentano, heptano, etc., o disolventes aromáticos, como por ejemplo tolueno o benceno, o éteres, como por ejemplo terc-butilmetiléter, dietiléter o tetrahidrofurano, u otros disolventes con una polaridad menor que 0,50, como se indica, por ejemplo, en Küster/Thiel 1993, o mezclas de los mismos.

Se entiende por una “fase polar” o un “extracto polar” una fase o un extracto que se obtiene a partir de una extracción con un disolvente o mezcla de disolventes con un índice de polaridad de 4 a 10,2, preferentemente de 5 a 7, de modo más preferente de 5,5 a 6,5 según Kellner, *Analytical Chemistry*, Weinheim, 1998, página 195, o que se obtienen a partir de una extracción con un disolvente polar, o mezcla de disolventes, como se cita anteriormente.

Se entiende por una “fase apolar” o un “extracto apolar” una fase o un extracto que presenta una polaridad más reducida o un índice de polaridad más reducido respecto a la fase polar o al extracto polar, y con el que se pueden extraer mejor sustancias de polaridad media a apolares, como por ejemplo en una extracción con disolventes apolares o mezclas de disolventes, como se citan anteriormente. Según la invención se obtiene una “fase apolar” o un “extracto apolar” mediante extracción con un disolvente o mezcla de disolventes con un índice de polaridad según Kellner, *Analytical Chemistry*, Weinheim, 1998, página 195, que es menor que el del disolvente o mezcla de disolventes de la fase polar o del extracto polar en 0,3 o más. De modo más preferente, el índice de polaridad es más reducido que el del disolvente o mezcla de disolventes de la fase polar en 0,5, de modo aún más preferente 1,0, en la mayor parte de los casos preferentemente en más de 2, según Kellner, 1998.

Bajo el concepto “sustancias de contenido” se entiende compuestos polares y apolares, por ejemplo “metabolitos”, que se producen en reacciones de degradación y formación (reacciones catabólicas o anabólicas) del metabolismo, o se absorben por organismos de su ambiente. Esto se refiere a compuestos que se presentan en forma celular, o en organismos más complejos también en forma extracelular, por ejemplo en líquidos corporales. En el cultivo de microorganismos u otros organismos están incluidas también las sustancias de contenido de estos cultivos, por ejemplo del medio de crecimiento. Se influye sobre la concentración de una sustancia de contenido mediante condiciones externas (condiciones ambientales, condiciones de nutrientes, situaciones de estrés) o mediante condiciones internas (desarrollo, regulaciones, modificaciones ocasionadas genéticamente), a las que están sujetos los organismos. El concepto comprende tanto los denominados metabolitos primarios, como también metabolitos secundarios. Por regla general se entiende por “metabolitos primarios” aquellos metabolitos que son productos de vías de degradación y formación, que son de significado fundamental para las células, y con ello son más o menos iguales para todas las células. Por regla general se entiende por “metabolitos secundarios” compuestos que se forman casi siempre por vías secundarias, por ejemplo en situaciones de estrés, como condiciones de hambre o escasez, o una vez concluida la fase de crecimiento activa de las células, y para las que no es conocida una función identificable para las células en muchos casos (s.a. *Römpp Lexikon Biotechnologie*, New York, 1992). Por lo tanto, se entiende por sustancias de contenido, por ejemplo, sustancias polares o apolares, como hidratos de carbono, aminas (en especial aminoácidos), tetrapirroles, lípidos, esteroides, nucleótidos, nucleósidos, cofactores, coenzimas, vitaminas, antibióticos, hormonas, péptidos, terpenos, alcaloide, carotenoides, xantofilos, flavoides, etc., y las sustancias de las respectivas vías metabólicas, sin tener que considerar limitante de ningún modo la enumeración anterior o siguiente.

Los hidratos de carbono, comprenden, por ejemplo, los hidratos de carbono de metabolismo de hidratos de carbono, por ejemplo de glicólisis, gluconeogénesis, por ejemplo triosas, tetrosas, pentosas, por ejemplo furanosas o hexosas, por ejemplo piranosas o heptosas del metabolismo de polisacáridos, del metabolismo de piruvato, del metabolismo de acetil-coenzima A, di- u oligosacáridos, glicósidos, derivados de hexosa, desoxi-hexosas, hidratos de carbono del metabolismo de pentosa, del metabolismo de aminoazúcares, del ciclo de citrato, del metabolismo de glicosilato, etc., u otras sustancias de las respectivas vías metabólicas.

Los aminoácidos comprenden, por ejemplo, los aminoácidos del metabolismo de aminoácidos, como por ejemplo en el metabolismo de amoniaco, o del metabolismo de azufre, del ciclo de urea, u otros derivados, por ejemplo aminoácidos aromáticos o no aromáticos, aminoácidos polares, no cargados, no polares, alifáticos, aromáticos, cargados positivamente, cargados negativamente, aminoácidos de cadena ramificada o de cadena no ramificada, esenciales o no esenciales, u otras sustancias de las respectivas vías metabólicas.

Los tetrapirroles comprenden, por ejemplo, sustancias del metabolismo de protoporfirina, del metabolismo de hemoglobina, del metabolismo de mioglobina, de diferentes metabolismos de citocromo, del metabolismo de fotosíntesis, etc., u otras sustancias de las respectivas vías metabólicas.

- 5 Los lípidos comprenden, por ejemplo, ácidos grasos saturados o insaturados, esenciales o no esenciales, compuestos de acil-CoA, triacilglicéridos, lípidos de lipogénesis o de lipólisis, fosfolípidos, por ejemplo glicerofosfolípidos, eterlípidos, esfingofosfolípidos, glicolípidos, o las sustancias de las respectivas vías metabólicas.

- 10 Las hormonas comprenden hormonas esteroides o no esteroides, por ejemplo hormonas peptídicas, o por ejemplo eicosanoides u octadecanoides.

- 15 Los esteroides comprenden, por ejemplo, las sustancias del metabolismo de colesterol, hopanoides, esteroides vegetales, como fito- y micoesterinas, hormonas de insectos, isoprenoides, hormonas esteroides, gestágenos, andrógenos, estrógenos, corticosteroides, o las sustancias de las respectivas vías metabólicas.

- Los nucleótidos y nucleósidos comprenden, por ejemplo, desoxi- y ribonucleótidos/nucleósidos, cuyos derivados de 5'-fosfato, purinas, pirimidinas u otros derivados, por ejemplo derivados de nucleósidos o nucleótidos ciclados, metilados y/o acetilados, etc., u otras sustancias de las respectivas vías metabólicas.

- 20 Del mismo modo están incluidas sustancias que juegan un papel en esta vías metabólicas. Se entiende por "otras sustancias de las respectivas vías metabólicas" los respectivos productos intermedios en la biosíntesis, en la conversión, transporte o degradación de las citadas sustancias. Se puede encontrar una sinopsis sobre muchos metabolitos, por ejemplo, en Michal, *Biochemical Pathways*, Berlin, 1999 o en KEGG. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, Institute of Chemical Research at Kyoto University, Japan (por ejemplo <http://www.genome.ad.jp/dbget/ligand.html>),
25 que se recogen expresamente en este caso.

- Bajo el concepto "agua" se entiende cualquier tipo de una disolución acuosa, también, por ejemplo, agua desionizada, desmineralizada, destilada o bidestilada. También pueden estar disueltas en el agua, o mezcladas con la misma, una o varias sustancias que mejoran preferentemente la extracción, estabilidad o solubilidad de sustancias de contenido
30 de material orgánico, o conducen a propiedades preferentes, por ejemplo valor de pH, conductividad, concentración de sales, etc., como por ejemplo en disoluciones salinas o tampón.

- Por regla general, las sustancias polares se extraen en el estado de la técnica en alcoholes de alquilo puros, o mezclados con agua o disoluciones tampón, como etanol (Sauter, 1991, Strand, 1999, Gilmour, 2000) o metanol
35 (Fiehn, *Anal. Chem.* 2000 y *Nature Biotechnology* 2000, Roessner, 2000) o en agua o disoluciones tampón.

- El agua tienen propiedades de extracción muy buenas para sustancias polares. No obstante, es desfavorable que en disoluciones acuosas se activen de nuevo procesos celulares, que se detuvieron generalmente con anterioridad mediante congelación o liofilizado. Esto puede ocasionar, por ejemplo, una degradación o conversión enzimática de
40 diversos metabolitos, y conduce a una modificación, y con ello a un falseamiento de concentraciones o condiciones dentro de estos extractos. Por regla general se intenta suprimir estas reacciones secundarias indeseables mediante trabajo sobre hielo. No obstante, esto tiene inconvenientes considerables, tanto para la eficiencia de extracción, como también para la elaboración de grandes números de muestras. Son inevitables pérdida de sensibilidad y desviación del estado celular verdadero en el momento de la cosecha.

- 45 Se emplean etanol o metanol, ya que por una parte tienen propiedades polares, y con ello se extraen suficientemente sustancias de contenido hidrófilas, por otra parte, ya que tras adición a un extracto celular, los extractos celulares se inhiben en su actividad debido al efecto tóxico, desnaturizante. Por consiguiente no se puede efectuar otra reacción de metabolitos, y las células se "congelan" en su estadio metabólico momentáneo. No obstante, es desfavorable que
50 algunas clases de metabolitos polares sean solubles metanol o etanol sólo con dificultad. Esto conduce a una pérdida de sensibilidad, y puede influir sobre la reproducibilidad de resultados.

- Para superar los inconvenientes de extracción en alcohol puro o agua pura, por ejemplo Strand, 1999 y Gilmour, 2000 emplean para la extracción de azúcares mezclas de etanol/agua, e incuban el material de partida durante 15
55 minutos, o bien 30 minutos a 80°C en esta mezcla. Para mejorar la eficiencia de extracción insuficiente, siguen respectivamente otros pasos de extracción costosos: Strand, 1999 establece una cadena de extracción, y por consiguiente un total de cuatro pasos de temperatura elevada: en primer lugar dos veces con un 80% de etanol/20% de Hepes, después 50% de etanol/50% de Hepes, y finalmente 100% de Hepes, respectivamente 30 min. a 80°C, Gilmour, 2000, incubado durante la noche a 4°C tras el paso de alta temperatura. No obstante, una extracción en cuatro pasos, o adicionalmente
60 al paso de temperatura elevada aún durante la noche, requiere mucho tiempo y trabajo. El intento de alcanzar peores propiedades de extracción de etanol, en comparación con agua, mediante temperatura elevadas y tiempos de extracción largos, puede conducir además a descomposiciones de sustancias de contenido, y reduce, por consiguiente, el número de sustancias a detectar y la sensibilidad del sistema.

- 65 Ahora se descubrió que una mezcla monofásica constituida por un 50% en volumen hasta un 90% en volumen de metanol, y un 10% en volumen a un 50% en volumen de agua, conduce a un rendimiento de extracción muy bueno. El procedimiento según la invención conduce a un rendimiento más elevado que en una extracción en metanol o etanol puro. Además, la estabilidad del extracto es elevada frente a una extracción pura en agua, y por consiguiente la repro-

ducibilidad del procedimiento mejora considerablemente. En contrapartida a la extracción con mezclas de etanol/agua, el rendimiento es tan elevado que es suficiente un único paso de extracción para aislar un gran número de sustancias de contenido. En procedimientos motivados por el paso de extracción según la invención para el aislamiento de sustancias polares a partir de células vegetales, se limitó el número de sustancias analizadas sólo por el procedimiento de análisis. Se pudo conseguir una reproducibilidad muy elevada.

La mezcla empleada en el paso (a) tiene preferentemente una fracción de al menos un 70% en volumen de metanol, es más preferente al menos un 75% en volumen, del mismo modo es preferente un 90% en volumen, es más preferente un 85% en volumen, en la mayor parte de los casos es preferente un 80% en volumen de metanol.

Del mismo modo es preferente un 10% en volumen a un 50% en volumen de agua, es más preferente un 15% en volumen a un 40% en volumen de agua, aún es más preferente un 30% en volumen de agua, en la mayor parte de los casos es preferente un 20% en volumen de agua. Por consiguiente, en la mayor parte de los casos, el procedimiento según la invención se lleva a cabo con una mezcla constituida por un 80% en volumen de metanol y un 20% en volumen de agua. En caso dado, la mezcla puede contener también cantidades reducidas de otro disolvente o mezcla de disolventes, por ejemplo diclorometano, pero es preferente menos de un 10% en volumen, es más preferente menos de un 5% en volumen, en la mayor parte de los casos no se encuentra ningún otro disolvente en la mezcla.

Según este primer paso de extracción para sustancias polares puede seguir uno o varios pasos de extracción (a') con una disolución con fracción de agua elevada, o sólo con agua, o con otro alcohol, por ejemplo un alcohol alquílico, con un reto alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, butanol, pentanol, hexanol, o por ejemplo acetona o acetonitrilo, en caso dado mezclado con agua, o como mezcla de diversos componentes. En la mayor parte de los casos es preferente metanol o una mezcla de metanol/agua. En caso dado, el paso dado (a) o (a') se puede repetir una o varias veces. En una forma de ejecución especialmente preferente se lleva a cabo sólo una extracción única tras el paso (a).

Además, el procedimiento según la invención comprende un paso (b) de extracción con un disolvente apolar monofásico, o mezcla de disolventes.

El disolvente o mezcla de disolventes en el paso (b) es más apolar que el disolvente o la mezcla de disolventes en el paso (a). Según la invención, el índice de polaridad (según Kellner, 1998) del disolvente o de la mezcla de disolventes en el paso (b) es menor que el del agente de extracción de la fase polar en el paso (a) en 0,3 o más. De modo más preferente, el índice de polaridad según Kellner, 1998 es menor que el del agente de extracción de la fase polar en 0,5, de modo aún más preferente 1, en la mayor parte de los casos preferente en más de 2. Una mezcla de disolventes empleadas según la invención constituida por un 40% de metanol/60% de diclorometano, tiene de este modo, por ejemplo, un índice de polaridad de 3,9 según Kellner, 1998.

Los disolventes apolares o mezclas de disolventes se describieron anteriormente, por ejemplo disolventes polares orgánicos, o una mezcla de dos o más disolventes polares, como por ejemplo alcoholes alquílicos con un resto alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, butanol, pentanol, hexanol, o por ejemplo acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, dimetilsulfóxido, o N,N-dimetilformamida, u otros disolvente polares con una polaridad mayor o igual que 0,5, como se indican, por ejemplo, en Küster/Thiel 1993, y uno o varios disolventes orgánicos descritos anteriormente, a modo de ejemplo disolventes halogenados, como cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, o disolventes alifáticos, como hexano, ciclohexano, pentano, heptano, etc., o disolventes aromáticos, como por ejemplo tolueno o benceno, o éteres, como por ejemplo terc-butilmetiléter, dietiléter o tetrahidrofurano, u otros disolventes con una polaridad menor que 0,5, como se indica, por ejemplo, en Küster/Thiel 1993.

En el paso (b) se emplea preferentemente un componente disolvente, que no se mezcla con agua, para poder ocasionar a continuación la separación de fases en una fase apolar y una fase polar en una reunión de fases subsiguiente. No obstante, preferentemente se mezcla el componente con metanol. Además es ventajoso un punto de ebullición reducido, a modo de ejemplo de 100°C o menor, más preferentemente 80°C, de modo aún más preferente 60°C, y en la mayor parte de los casos preferentemente 40°C, o menor, a presión normal, ya que la eliminación del disolvente o de la mezcla de disolventes se puede llevar a cabo más rápidamente y a menores temperaturas, de manera más cuidadosa para las sustancias de contenido.

Los disolventes halogenados son preferentes como disolventes en el paso (b). Es especialmente preferente una mezcla de metanol y etanol y cloroformo, pentano, hexano, heptano, ciclohexano, tetracloruro de carbono o diclorometano. Es más preferente una mezcla de metanol o etanol con cloroformo o diclorometano. La mezcla en el paso (b) está constituida preferentemente por un 30% en volumen a un 60% en volumen de metanol o etanol, es preferente una mezcla con un 40 a un 50% en volumen de metanol o etanol. En la mayor parte de los casos es preferente el empleo de metanol. La fracción de diclorometano o cloroformo asciende preferentemente a un 40 hasta un 70% en volumen, es preferente el empleo de diclorometano. El restante 0% en volumen a 30% en volumen puede estar constituido opcionalmente por "otro disolvente u otra mezcla de disolventes", que forman una fase con la mezcla citada anteriormente, por ejemplo etanol o cloroformo. Es preferente que no esté contenido "otro disolvente u otra mezcla de disolventes".

En caso dado, la mezcla en el paso (b) puede contener también cantidades reducidas, preferentemente un 0% en volumen a un 20% en volumen, es más preferente un 10% en volumen, es aún más preferente un 5% en volumen o menos, en la mayor parte de los casos no hay agua preferentemente en la mezcla.

5 Por consiguiente, en una forma de ejecución preferente, el procedimiento según la invención comprende el siguiente paso (b): extracción con una mezcla constituida por un 30% en volumen a un 60% en volumen de alcohol alquílico con 1 a 6 átomos de carbono, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, dimetilsulfóxido o N,N-dimetilformamida, y un 40% en volumen a un 70% en volumen de cloroformo, diclorometano, pentano, hexano, heptano, ciclohexano o tetracloruro de carbono.

10 Sorprendentemente se descubrió que es posible una extracción especialmente buena con una determinada proporción de metanol y diclorometano. Por lo tanto, en la mayor parte de los casos, el procedimiento según la invención en el paso (b) se lleva a cabo preferentemente con una mezcla constituida con un 30 a un 40% en volumen de metanol, y un 60 a un 70% en volumen de diclorometano. En la mayor parte de los casos son preferentes un 40% en volumen de metanol y un 60% en volumen de diclorometano.

En caso dado, el paso (b) se puede repetir una o varias veces, y/o pueden seguir uno o varios pasos opcionales adicionales (b') con una fracción más elevada de disolvente aprótico o disolvente aprótico puro.

20 En una forma de ejecución especialmente preferente, el paso (b) se lleva a cabo sólo una vez.

Los pasos del procedimiento según la invención, en especial los pasos (a) y (b) se pueden llevar a cabo paralelamente, por ejemplo en primer lugar se divide la muestra, y después se obtienen por separado ambos extractos, o sucesivamente, por ejemplo si la misma muestras tras separación del 1 agente de extracción se trata con un 2 agente de extracción, siendo el orden (a)(b) tan posible como el orden (b)(a), y siendo posibles también pasos intermedios. Del mismo modo es posible combinar los pasos con otros pasos. En la mayor parte de los casos es preferente el orden (a)(b).

30 De este modo, con el procedimiento según la invención, que contiene los pasos (a) y (b), opcionalmente también los pasos (a') y (b'), se puede preparar un gran número de muestras sobre metabolitos polares y apolares de manera automatizada, rápida y convenientemente reproducible para la investigación.

En otro paso, en el procedimiento según la invención se reúnen los extractos del paso (a) y del paso (b) para dar una mezcla monofásica tras la extracción.

35 Es ventajoso que la mezcla reunida de (a) y (b) se mezcle con uno o varios estándar de análisis, por ejemplo estándar internos y/o estándar de cromatografía. Tales estándar pueden ser, por ejemplo, compuestos no presentes en las muestras naturales, pero similares a las sustancias analizadas, incluyendo sustancias con marcaje isotópico, radioactivas o con marcaje fluorescente, como para azúcares, por ejemplo ribitol o alfa-metilglucopiranosido, para aminoácidos, por ejemplo, L-glicina-2,2-d₂ p L-alanina-2,3,3,3-d₄, para ácidos grasos o sus derivados, en especial ácidos grasos de número impar, o sus ésteres metílicos, por ejemplo un decanoato, tridecanoato o nonacosanoato de metilo. Los estándar se pueden añadir también por separado al respectivo extracto del paso (a) o (b).

45 En una forma de ejecución, en el procedimiento según la invención se emplean para la extracción disolventes o mezclas de disolventes que contienen adicionalmente hasta un 5% en peso, de modo más preferente hasta un 3% en peso, de modo aún más preferente hasta un 1% en peso de sales tampón, ácidos y/o bases. Son preferentes sistemas tampón volátiles. De este modo, por ejemplo se pueden emplear según la invención disolución de formiato amónico, carbonato amónico, cloruro amónico, acetato amónico o hidrogenocarbonato amónico y/o un ácido, por ejemplo ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoracético, ácido pentafluorpropanoico, ácido heptafluorbutanoico, ácido nonafluor-pentanoico, ácido undecafluorhexanoico, ácido tridecafluorheptanoico o ácido pentadecafluoroctanoico y/o una base, por ejemplo trietilamina, piridina o amoniaco.

55 Es especialmente ventajoso que los extractos reunidos para la extracción en el procedimiento según la invención formen una fase a la que se pueden añadir preferentemente estándar. La ventaja del entremezclado monofásico reiterado de ambos extractos antes de la separación de fases consiste en que restos de sustancias polares de la extracción apolar pasan a la fase polar, y viceversa, restos de compuestos apolares de la fase polar pasan a la correspondiente fase apolar.

60 Tal mezcla monofásica se consigue, por ejemplo, si en el paso (a) se extrae con un 80% en volumen de metanol y un 20% en volumen de agua, y en el paso (b) se extrae con un 40% en volumen de metanol y un 60% en volumen de diclorometano, y después se combinan ambos extractos. Por consiguiente, todas las sustancias de contenido, y opcionalmente, por ejemplo, también los estándar, se encuentran en una fase.

65 Ambas fases se pueden separar según procedimientos conocidos por el especialista, véase, por ejemplo, Bligh y Dyer, Can. J. Biochem. Physiol. 1959, 37, 911-917, a modo de ejemplo mediante la adición de un disolvente apolar, en especial orgánico (por ejemplo diclorometano) o de un disolvente polar o mezcla de disolventes, en especial una disolución acuosa, por ejemplo de un tampón, o mediante adición tanto de un disolvente apolar, como también de un disolvente polar, o mezcla de disolventes, como se describió anteriormente. En este caso se produce una fase que

contiene las sustancias de contenido polares (“fase polar”/“extracto polar”), y una fase que contiene las sustancias de contenido de polaridad media a apolares (“fase apolar”/“extracto apolar”). La separación de fases se consigue preferentemente mediante la adición de disolventes empleados para la extracción, en especial mediante la adición de metanol, diclorometano y/o agua. Tras la reunión se separan de nuevo las fases, y estas se pueden derivatizar y/o analizar según empleo subsiguiente.

En lugar de una separación de fases, o tras la misma, en el procedimiento según la invención se puede llevar a cabo un fraccionado en dos o más fracciones, también por medio de una extracción en fase sólida. Un fraccionado en varias fracciones tiene la ventaja de poder adaptar mejor a los respectivos grupos de sustancias los procedimientos de derivatizado y análisis. De este modo se transesterifican en especial fracciones, que contienen principalmente triglicéridos, por ejemplo, para dar ésteres metílicos antes del análisis. La extracción en fase sólida es apropiada especialmente para el automatizado.

En otra forma de ejecución, el procedimiento según la invención comprende, por consiguiente, uno o varios pasos para derivatizar, cromatografiar y/o analizar las sustancias de contenido, por ejemplo a partir de los extractos o las fases obtenidas. Preferentemente, los extractos o las fases se derivatizan, cromatografían y analizan en los siguientes pasos del procedimiento según la invención. Para analizar los extractos, se deben derivatizar determinadas sustancias de contenido según método de separación y análisis empleado. De este modo, para una separación por cromatografía de gases (GC) se derivatiza preferentemente, mientras que para una separación por cromatografía de líquidos (LC) no es necesario generalmente un derivatizado. En caso dado, también es posible un procedimiento de análisis sin separación cromatográfica, por ejemplo espectrometría de masas (MS), espectrometría de absorción atómica (AAS) o espectrometría de resonancia nuclear (NMR).

En otra forma de ejecución preferente, el procedimiento para la extracción según la invención contienen aún al menos uno de los siguientes pasos adicionales:

- i) congelación de material, preferentemente congelación rápida de material obtenido, por ejemplo cosechado;
- ii) liofilizado de material;
- iii) homogeneizado y dispersión de material;
- iv) concentración por evaporación de un extracto o de una fase para dar la fase seca, en especial polar o apolar, en especial tras separación de fases y/o transesterificado/esterificado en la fase;
- v) puesta en práctica de un esterificado/transesterificado en la fase apolar;
- vi) puesta en práctica de una formación de oxima en la fase apolar;
- vii) puesta en práctica de una formación de oxima en la fase polar;
- viii) puesta en práctica de un trialquilsililado en la fase apolar; y/o
- ix) puesta en práctica de un trialquilsililado en la fase polar.

El procedimiento según la invención contiene los citados pasos ventajosamente por separado, de modo más preferente varios, o en la mayor parte de los casos preferentemente todos, de modo especialmente preferente aproximadamente en el orden citado anteriormente o a continuación.

Se debe evitar que hasta la extracción se desarrollen procesos enzimáticos en las muestras, que modifican el espectro de sustancias de contenido.

Por lo tanto, el material se enfría ventajosamente de inmediato tras la cosecha, mejor se congela, para suprimir de este modo cualquier actividad enzimática en la muestra o en el material, y por lo tanto para evitar una modificación en la distribución de sustancias de contenido. La congelación de material se lleva a cabo preferentemente en menos de 60 segundos, de modo más preferente en menos de 30 segundos, en la mayor parte de los casos preferentemente en menos de 15 segundos tras la obtención o cosecha. Si el material es vegetal, la extracción de muestras puede tener lugar directamente en la cámara Phytotron. Ventajosamente, el material se pesa rápidamente tras la obtención, y después se congela rápidamente y en profundidad, por ejemplo en nitrógeno líquido, y se almacena, por ejemplo, a -80°C o en nitrógeno líquido.

Del mismo modo es ventajoso liofilizar el material. Mediante el liofilizado se extrae el agua del material, de modo que se inhiben procesos enzimáticos. El empleo de liofilizado es especialmente ventajoso, ya que las muestras elaboradas de este modo se pueden almacenar y elaborar adicionalmente a temperatura ambiente.

En una forma de ejecución de la invención, la extracción, por ejemplo la extracción de muestras liofilizadas o congeladas, se apoya mediante otros pasos, por ejemplo mediante técnicas de homogeneizado y dispersión (Fiehn, Anal. Chem. 2000 und Nature Biotechnology 2000, Sauter, 1991, Roessner, 2000, Bligh und Dyer, 1959, Strand, 1999 etc.).

De este modo se puede descomponer el material, por ejemplo mediante calor, molinos vibratorios u otros procedimientos de molidura, presión, o modificaciones de presión rápidas sucesivas, pasos de extracción por ultrasonidos, ondas de choque, microondas y/o Ultraturax, y las sustancias de contenido se pueden extraer mejor. Es ventajoso un método de extracción que permita el automatizado del procedimiento. De este modo es especialmente ventajoso llevar a cabo una ASE (Accelerated Solvent Extraction), PSE (Pressurised Solvent Extraction), PFE (Pressurised Fluid Extraction) o PLE (Pressurised Liquid Extraction), en la que el disolvente o mezcla de disolventes se comprime a través del material bajo presión, y en caso dado a temperatura elevada (véase Björklund, Trends in Analytical Chemistry 2000, 19 (7), 434-445, Richter, American Laboratory 1995, 27, 24-28, Ezzell, LC-GC 1995, 13 (5), 390-398). La extracción se lleva a cabo preferentemente de modo que la temperatura y la presión se adaptan de modo que no se descompongan las sustancias de contenido, y la eficiencia de extracción sea conveniente, por ejemplo a una temperatura de 0°C a 200°C, son ventajosos 20°C, o son más ventajosos 40°C a 150°C, son más preferentes 120°C o menos. El procedimiento se lleva a cabo preferentemente a 40 bar hasta 200 bar, de modo más preferente a 70 bar, de modo aún más preferente a 100 bar hasta 170 bar. Por consiguiente, condiciones especialmente preferente son una temperatura de 60 a 80°C, en especial 70°C, y 110 bar a 150 bar, en especial 140 bar. El tiempo de extracción se puede situar entre 3 segundos y 20 minutos, son preferentes 10 minutos, más preferentes 5 minutos, o menos. Es especialmente preferente el empleo de una temperatura de 60°C a 80°C, y una presión de 110 a 150 bar con un tiempo de extracción de menos de 5 minutos. Por consiguiente, las condiciones de extracción son más cuidadosas que las que se describen en el estado de la técnica, y conducen a rendimientos más elevados y a estabilidad más elevadas de las sustancias de contenido aisladas.

La elaboración de extractos se puede interrumpir en cualquier momento del procedimiento aquí descrito entre los citados pasos, en tanto los extractos se almacenen o se conserven de manera estable, por ejemplo congelándose y/o liofilizándose los extractos. No obstante, es preferente evitar una interrupción de la elaboración antes del análisis. Tras la extracción, las fases se pueden dividir en diferentes alícuotas, y evaporar en caso dado, por ejemplo para eliminar ácidos volátiles y agua y/o para preparar las muestras para los siguientes pasos del procedimiento, por ejemplo con un agitador IR (dispositivo vibratorio calentado con radiación infrarroja bajo presión reducida, un centrifugado en vacío o mediante liofilizado). La concentración por evaporación se efectuará cuidadosamente, de modo preferente a 10°C hasta 80°C, de modo más preferente a 20°C hasta 40°C, preferentemente bajo presión reducida, según disolvente o mezcla disolventes, a modo de ejemplo, a 100 mbar hasta 10 mbar, preferentemente a 10 mbar. En el caso de empleo de mezclas de diclorometano/metanol y/o metanol/agua es especialmente preferente la reducción de la presión en etapas hasta 10 mbar.

Una forma de ejecución preferente comprende también pasos para la separación y el análisis, pudiéndose separar las fases respectivamente a través de LC, GC y/o CE (electroforesis capilar). Tras GC se puede efectuar una detección de sustancias de contenido, por ejemplo por medio de EI-MS (ionización por choque de electrones y análisis por medio de espectrómetro de masas) o CI-MS (ionización química y análisis por medio de espectrómetro de masas), espectrometría de masas de campo de sector, cuadrupol, tiempo de evaporación, trampa iónica o transformada de Fourier-resonancia de ión-ciclotrón, FID (detector de ionización de llama) o espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, tras LC, por ejemplo, por medio de espectrometría de masas de campo de sector, cuadrupol, tiempo de evaporación, trampa iónica o transformada de Fourier-resonancia de ión-ciclotrón, detección por absorción UV/Vis, detección por fluorescencia, NMR o espectroscopia infrarroja. El procedimiento según la invención comprende preferentemente una MS (espectrometría de masas), un análisis por LC/MS (cromatografía de líquidos acoplada a una detección por espectrometría de masas arbitraria), GC/MS (cromatografía de gases acoplada a una detección por espectrometría de masas arbitraria) y/o LC/MS/MS (cromatografía de líquidos acoplada a una detección por espectrometría de masas tandem arbitraria) en la mayor parte de los casos preferentemente un análisis por LC/ME, GC/MS y/o LC/MS/MS.

Tras la evaporación citada anteriormente, los extractos obtenidos según la invención se pueden absorber en disolventes o mezclas de disolventes para HPLC, y después se pueden analizar en la LC. Como agentes eluyentes entran en consideración mezclas, por ejemplo de metanol, acetonitrilo o etanol y/o terc-butilmetiléter, tetrahidrofurano, isopropanol o acetona y/o agua y/o una sal, como por ejemplo disolución de formiato amónico, carbonato amónico, cloruro amónico, acetato amónico o hidrogenocarbonato amónico y/o un ácido, por ejemplo ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido pentafluorpropanoico, ácido heptafluorbutanoico, ácido nonafluorpentanoico, ácido undecafluorhexanoico, ácido tridecafluorheptanoico o ácido pentadecafluoroctanoico y/o una base, como por ejemplo trietilamina, piridina o amoniaco, según se deban separar extractos polares o apolares del paso (a), o bien (b). Por regla general se lleva a cabo una elución de gradiente, preferentemente sigue una detección por espectrometría de masas, por ejemplo una detección por MS- o MS/MS (detección por espectrometría de masas simple, o bien espectrometría de masas tandem).

Para la puesta en práctica del análisis por GC, con la fase apolar y/o la fase polar se puede llevar a cabo un transesterificado/esterificado, en especial con metanol o etanol, y después una formación de oxima, preferentemente un metoximizado, como se describe anteriormente. Preferentemente se pueden añadir sustancias estándar, por ejemplo estándar de cromatografía y/o internos, a cualquier muestra o al respectivo extracto, por ejemplo una disolución de

ES 2 304 468 T3

ácidos grasos de números impar, de cadena lineal, o hidrocarburos. A continuación tiene lugar un trialquilsililado de extractos, siendo opcional el oximizado y/o el trialquilsililado de la fase apolar.

Estos pasos se pueden llevar a cabo como se describe anteriormente, pero también se pueden combinar por separado con otros pasos, por ejemplo otros métodos de separación y análisis, como se describen anteriormente, y adaptar correspondientemente.

En una forma de ejecución, en el procedimiento según la invención se lleva a cabo consecuentemente un esterificado/transesterificado en la fase polar y/o apolar de la extracción. El esterificado/transesterificado se lleva a cabo preferentemente sólo en la fase apolar. Preferentemente, el esterificado/transesterificado de sustancias de contenido, o de una parte de sustancias de contenido que se extrajeron según la invención, se lleva a cabo preferentemente con un alcohol alquílico insaturado o saturado, de cadena lineal, de cadena ramificada o cíclico, con 1 a 8 átomos de carbono, por ejemplo metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, butanol, pentanol, hexanol, etc. Es preferente metanol o etanol, en la mayor parte de los casos es preferente metanol. La temperatura de reacción se sitúa preferentemente entre 70 y 150°C, de modo más preferente entre 90 y 120°C, en la mayor parte de los casos son preferentes 100°C. El tiempo de reacción se sitúa preferentemente entre 0,5 horas y 4 horas, más preferentemente entre 1 hora y 3 horas. Pueden estar presentes otros disolventes que son inertes en la reacción, por ejemplo tolueno, diclorometano, benceno y/o cloroformo. También se pueden emplear mezclas de alcoholes y/o disolventes inertes. La disolución puede contener también un 20% en volumen o una cantidad menor de agua, preferentemente un 10% en volumen, más preferentemente un 5% en volumen o menos.

La fracción de otros disolventes, a parte del citado alcohol, es preferentemente un 20% en volumen a un 0% en volumen, y es lo más reducida posible.

En una forma de ejecución preferente el esterificado/transesterificado en la fase polar y/o apolar se lleva a cabo con un ácido volátil como catalizador, preferentemente con HF, HI, HCl, BF₃, BCl₃, HBr, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoracético o ácido tricloroacético, es más preferente BF₃, BCl₃ o HCl, en la mayor parte de los casos es preferente HCl.

Se entiende por “ácido volátil” un ácido que se puede eliminar sensiblemente de modo preferente por completo mediante concentración por evaporación.

El empleo de un ácido volátil, como por ejemplo HCl, es ventajoso. De modo especialmente preferente, el ácido tiene una presión de vapor más reducida que el disolvente empleado, o los componentes de la mezcla de disolventes, o un posible azeótropo de todos o uno de los componentes, incluyendo el propio ácido. En contrapartida al procedimiento descrito en el estado de la técnica, el empleo de ácidos volátiles posibilita que los restos ácidos se puedan eliminar de manera rápida y automatizable mediante concentración por evaporación, mientras que, en el estado de la técnica, los restos ácidos se deben eliminar mediante pasos de lavado con secado subsiguiente, por ejemplo con un agente desecante, como sulfato sódico y filtración. Por consiguiente, el procedimiento es sensiblemente mejor para un análisis de rendimiento elevado. Como disolvente se puede emplear para el esterificado/transesterificado un alcohol alquílico con un resto alquilo con 1 a 8 átomos de carbono, como se describe anteriormente, de modo opcional con una fracción de un disolvente inerte, o una mezcla de disolventes, por ejemplo cloroformo, diclorometano, benceno y/o tolueno. Es especialmente preferente una mezcla de cloroformo, metanol, tolueno y ácido clorhídrico.

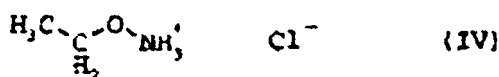
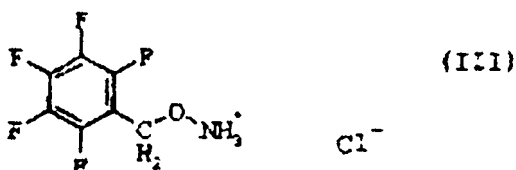
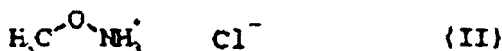
Tras el esterificado/transesterificado, la disolución se puede concentrar por evaporación para la eliminación de ácido, preferentemente hasta secado, por ejemplo para eliminar ácidos volátiles y agua, y preparar las muestras para los siguientes pasos de procedimiento, por ejemplo con agitador IR, centrífuga de vacío o mediante liofilizado. La concentración por evaporación se efectuará cuidadosamente, de modo preferente por debajo de 80°C, más preferentemente por debajo de 40°C, preferentemente bajo presión reducida, según disolvente o mezcla de disolventes, a modo de ejemplo 10 mbar. Es especialmente preferente la reducción de la presión en pasos, a modo de ejemplo a 10 mbar, en el caso de empleo de diclorometano/metanol y/o mezclas de metanol/agua. Los disolventes empleados o las mezclas de disolventes pueden apoyar el paso de secado, siendo especialmente volátiles, o favoreciendo la evaporación de agua como agentes de arrastre, como por ejemplo tolueno.

En otra forma de ejecución preferente, en el procedimiento según la invención se lleva a cabo una formación de oxima en la fase apolar y/o polar. Según la invención se entiende por oxima un compuesto de la estructura (I)



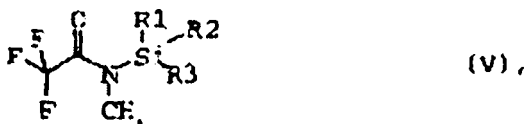
pudiendo ser R H o un resto alquilo, preferentemente un resto alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, en especial un resto metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o hexilo, o un resto arilalquilo sustituido o no sustituido, preferentemente con 5 a 7 átomos de carbono en el resto arilalquilo, y con 0 a 2 heteroátomos en el anillo o en la cadena del resto arilalquilo, por ejemplo un resto bencilo sustituido o no sustituido, en especial un resto bencilo halogenado con 1 a 7 restos halógeno, preferentemente un resto pentafluorobencilo, y pudiendo ser R' cualquier resto bienlazante. Según la invención se pueden emplear como reactivos para la formación de oxima compuestos de la estructura (Ib) R-ONH₂, definiéndose R como anteriormente, preferentemente hidroxiamina o hidroxilaminas O-sustituidas, o respectivamen-

te su sal con un ácido volátil, por ejemplo hidroccloruros, como hidroccloruro de O-alquilhidroxilamina o hidroccloruro de O-pentafluorbencilhidroxilamina, según procedimientos conocidos por el especialista (s.a. Fiehn, Anal. Chem. 2000), por ejemplo disuelta en una mezcla de disolventes, o en un disolvente, como por ejemplo piridina. Es preferente un procedimiento según la invención, empleándose para la formación de oxima hidroccloruro de O-metilhidroxilamina (II), hidroxiclururo de O-pentafluorbencilhidroxilamina (III) o hidroccloruro de O-etilhidroxilamina (IV), en la mayor parte de los casos es preferente hidroccloruro de O-metilhidroxilamina (II).



La reacción se puede llevar a cabo durante 30 minutos a 6 horas, preferentemente durante 1 hora a 2 horas, preferentemente al menos a 20°C hasta 80°C, de modo más preferente de 50°C hasta 60°C. Es especialmente preferente la puesta en práctica durante 1 hora a 2 horas a 50°C hasta 60°C.

En otra forma de ejecución según la invención se lleva a cabo un trialquilsililado en la fase polar y/o apolar. El trialquilsililado se puede llevar a cabo según la invención con un compuesto de la fórmula $\text{Si}(\text{R}^{1-4})_4$, siendo R^4 preferentemente una N-alquilo con 1 a 4 átomos de carbono-2,2,2-trifluoracetamida, de modo especialmente preferente una N-metil-2,2,2-trifluoracetamida, como en la fórmula (V). Por consiguiente, es especialmente preferente el trialquilsililado con un compuesto de la fórmula (V)



pudiendo ser R^1 , R^2 y/o R^3 , independientemente entre sí, restos alquilo respectivamente con 1 a 6 átomos de carbono, en especial CH_3 , C_2H_5 , C_3H_7 o C_4H_9 con las siguientes fórmulas estructurales para C_3H_7 o C_4H_9 :





son preferentemente R^1 o R^2 restos metilo, de modo especialmente preferente, R^1 y R^2 son restos metilo. R^3 es preferentemente un resto alquilo de cadena lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de carbono, como se describe anteriormente, es especialmente preferente un resto metilo o un resto terc-butilo, de modo más preferente, R^3 es un resto metilo. Preferentemente se lleva a cabo un trimetilsililado con MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoracetamida. La reacción se puede efectuar durante 10 minutos a 120 minutos, preferentemente durante 20 minutos a 60 minutos a 20°C hasta 90°C, preferentemente entre 40°C y 70°C.

Antes del trialquilsililado se pueden añadir preferentemente uno o varios estándar internos y/o estándar de cromatografía.

En una forma de ejecución especialmente preferente, el material está constituido por material vegetal. La parte esencial del estado de la técnica describe sólo el análisis de líquidos, no constituidos por material sólido. La elaboración de células vegetales se diferencia de la de células animales o tejidos en que las células animales poseen sólo una membrana celular, pero las células vegetales están rodeadas por una pared celular. A modo de ejemplo se pueden extraer poblaciones o especies vegetales, por ejemplo plantas modificadas genéticamente o estresadas. Del mismo modo se pueden obtener productos homogéneos a partir de un gran número de organismos. Para la verificación de sensibilidad, exactitud, precisión, variabilidad y reproducibilidad se pueden someter a ensayo disoluciones estándar o material mezclado con disoluciones estándar en el procedimiento. A tal efecto se puede almacenar el material orgánico, por ejemplo, con cantidades definidas desde sustancias estándar.

En una forma de ejecución igualmente preferente, el procedimiento según la invención está optimizado a rendimiento elevado, variabilidad reducida, y alta reproducibilidad, y es parte de un análisis de rendimiento elevado.

Un procedimiento optimizado para análisis de rendimiento elevado contienen preferentemente uno o varios de los siguientes pasos:

- i) cosecha/obtención de material orgánico;
- ii) liofilizado de material;
- iii) empleo de mezclas de extracción en el paso (a) y (b), que forman una fase tras reunión, preferentemente en el paso (a) con un 80% en volumen de metanol y un 20% en volumen de agua, y en el paso (b) con un 40% en volumen de metanol y un 60% en volumen de diclorometano;
- iv) concentración por evaporación de extractos tras separación de fases y transesterificado/esterificado;
- v) puesta en práctica de un esterificado/transesterificado en la fase apolar con un ácido volátiles, preferentemente HCl; o
- vi) análisis de extractos por análisis MS, LC/MS, LC/MS/MS y/o GC/MS.

Estos pasos de procedimiento están optimizados para el rendimiento elevado y el empleo de robótica, y de este modo la fracción de trabajo manual se reduce al menos en un 10%, preferentemente un 20%, de modo más preferente en más de un 30%, en la mayor parte de los casos preferentemente en al menos un 50%, frente al estado de la técnica.

Ventajosamente, mediante el procedimiento según la invención, y la posibilidad de automatizado y robótica ocasionada por el mismo, la velocidad de conversión de muestras se reduce en más de un 10%, de modo más preferente en más de un 20%, de modo aún más preferente en más de un 30%, en la mayor parte de los casos preferentemente en más de un 50%. Del mismo modo, mediante los pasos de procedimiento según la invención se alcanza una reproducibilidad sensiblemente elevada antes de un análisis de rendimiento elevado. La elevada reproducibilidad del

procedimiento según la invención está caracterizada por la variabilidad analítica más reducida al menos en un 10%, preferentemente un 20%, de modo más preferente al menos un 30%, y en la mayor parte de los casos preferentemente al menos un 50%.

5 Los procedimientos descritos en el estado de la técnica no son apropiados, o lo son sólo de manera limitada, para una extracción de rendimiento elevado de metabolitos de material orgánico. Las extracciones diagnósticas conocidas se refieren en primer término a investigaciones de líquidos, por ejemplo orina, de modo que estos procedimientos no son apropiados para la elaboración de muestras sólidas, en especial de muestras de células vegetales.

10 Por consiguiente es especialmente preferente un procedimiento según la invención que contiene el paso (iii), es más preferente un procedimiento que contienen los pasos (ii) y (iii), aún más preferentemente (ii), (iii) y (iv), de modo aún más preferente (ii), (iii), (iv) y (v). En la mayor parte de los casos es preferente un procedimiento que contiene todos los pasos (i) a (vi). Es especialmente preferente un procedimiento en el que se extrae el material orgánico mediante ASE. En caso dado, los extractos se pueden fraccionar adicionalmente a través de una extracción en fase sólida.

15 En otra forma de ejecución, el procedimiento es parte de un procedimiento para el análisis de un perfil metabólico, ventajosamente como procedimiento de rendimiento elevado, y comprende los pasos de procedimiento citados anteriormente, y el siguiente paso adicional: análisis de datos de resultado por medio de reconocimiento de picos automático e integración de picos.

20 De este modo, el procedimiento según la invención se puede emplear, a modo de ejemplo, para la preparación de muestras para investigar

- a) efectos de diferencias genéticas sobre el perfil metabólico,
- 25 b) la influencia, por ejemplo, de condiciones ambientales, estrés, sustancias químicas, etc.,
- c) la interacción entre a) y b) o
- 30 d) el desarrollo temporal de a), b) o c),

como por ejemplo en investigaciones de la influencia de una o varias sustancias (por ejemplo también bibliotecas de sustancias) sobre el perfil metabólico, por ejemplo, de organismos lo más idénticos posible desde el punto de vista genético modificados genéticamente a lo más diferente posible desde el punto de vista genético.

35 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, sin que esto se considere limitante de ningún modo.

Ejemplo 1

40 *Toma de muestras y almacenaje de muestras*

La toma de muestras tiene lugar directamente en la cámara Phytotron. Las plantas se cortaron con unas tijeras de laboratorio reducidas, se pesaron rápidamente en una balanza de laboratorio, se trasladaron a una envoltura de extracción refrigerada previamente, y se colocaron en un armazón de aluminio que estaba refrigerado con nitrógeno líquido. Si es necesario, las envolturas de extracción se pueden almacenar a -80°C en congelador. El tiempo de corte de la planta hasta la congelación en nitrógeno líquido no sobrepasa 10-20.

Ejemplo 2

50 *Liofilizado*

Se procuró que las plantas permanecieran en estado congelado hasta el primer contacto con disolventes durante el ensayo (temperaturas <-40°C), o bien se liberaron las mismas de agua mediante liofilizado.

55 El armazón de aluminio con las muestras de plantas en las envolturas de extracción se colocó en la instalación de liofilizado refrigerada previamente (-40°C). La temperatura inicial durante el secado principal ascendía a -35°C, la presión ascendía a 0,120 mbar. Durante el secado se modificaron los parámetros correspondientemente a un programa de presión y temperatura. La temperatura final después de 12 horas ascendía a +30°C, y la presión final se situaba en 60 0,001 a 0,004 mbar. Tras la desconexión de la bomba de vacío y de la máquina refrigerante se ventiló el sistema con aire (desechado a través de un tubo secador) o argón.

Ejemplo 3

65 *Extracción*

Las envolturas de extracción con el material vegetal liofilizado se trasladaron a cartuchos de extracción de 5 mL de ASE inmediatamente después de la ventilación del aparato de liofilizado.

ES 2 304 468 T3

Las 24 posiciones de muestras de un aparato ASE (Accelerated Solvent Extractor ASE 200 con Solvent Controller y AutoASE-Software (firma DIONEX)) se cargaron con muestras de plantas.

5 Las sustancias polares se extrajeron con aproximadamente 10 mL de metanol/agua (80/20, v/v) a $T = 70^{\circ}\text{C}$ y $p = 140$ bar, 5 min de fase de calefacción, 1 minuto de extracción estática. Las sustancias más lipófilas se extrajeron con aproximadamente 10 mL de metanol/diclorometano (40/60, v/v) a $T = 70^{\circ}\text{C}$ y $p = 140$ bar, 5 min de fase de calefacción, 1 minuto de extracción estática. Ambas mezclas de disolventes se extraen en los mismos viales para muestras (viales de centrifugado, 50 mL con tapa a rosca, y septum perforable para ASE (DIONEX)).

10 La disolución se mezcló con estándar internos: ribitol, L-glicina-2,2- d_2 , L-alanin-2,3,3,3- d_4 y α -metilglucopiranosido y nonadecanoato de metilo, undecanoato de metilo, tridecanoato de metilo, nonacoanoato de metilo.

15 El extracto total se mezcló con 7 mL de agua. El residuo sólido de las muestras de plantas y la envoltura de extracción se desecharon.

20 Se agitó el extracto, y después se centrifugó con al menos 1400 g durante 5 a 10 minutos para acelerar la separación de fases. Se extrajo 1 mL de la fase de metanol/agua excedente ("fase polar", incolora) para el análisis por GC adicional, se extrajo 1 mL para el análisis por LC. El resto de la fase de metanol/agua se desechó. La fase orgánica se lavó de nuevo con el mismo volumen de agua (7 mL) y se centrifugó. Se extrajeron 0,5 mL de fase orgánica ("fase lipídica", verde oscuro) para el análisis por GC subsiguiente, se extrajeron 0,5 mL para el análisis por LC. Todas las alícuotas extraídas se concentraron por evaporación con el evaporador en vacío infrarrojo agitador IR (Hettich) hasta sequedad. La temperatura máxima durante el proceso de concentración por evaporación no sobrepasa 40°C en este caso. La presión en el aparato no asciende a menos de 10 mbar.

25 Ejemplo 4

Elaboración subsiguiente de la fase lipídica para el análisis por LC/MS o LC/MS/MS

30 El extracto lipídico concentrado por evaporación a sequedad se absorbió en agente eluyente. El desarrollo por HPLC se llevó a cabo con elución por gradiente.

35 Ejemplo 5

Elaboración subsiguiente de la fase polar para el análisis por LC/MS o LC/MS/MS

40 El extracto polar concentrado por evaporación a sequedad se absorbió en agente eluyente. El desarrollo por HPLC se llevó a cabo con elución por gradiente.

Ejemplo 6

Derivatizado de fase lipídica para el análisis por GC/MS

45 Para la transmetanolisis se añadió al extracto concentrado por evaporación una mezcla de 140 μL de cloroformo, 37 μL de ácido clorhídrico (37% en peso de HCl en agua), 320 μL de metanol y 20 μL de tolueno. El recipiente se cerró herméticamente, y se calentó bajo agitación 2 h a 100°C . A continuación se concentró por evaporación la disolución a sequedad. El residuo se secó completamente.

50 El metoximizado de grupos carbonilo se efectuó mediante reacción con hidrocloreuro de metoxiamina (5 mg/mL en piridina, 100 μL) durante 1,5 a 60°C en el recipiente cerrado herméticamente. Se añadieron 20 μL de una disolución de ácidos grasos de número impar, de cadena lineal, como estándar temporales. Finalmente se derivatizó con 100 μL de N-metil-N-(trimetilsilil)-2,2,2-trifluoracetamida (MSTFA) durante 30 minutos a 60°C en el recipiente, de nuevo cerrado herméticamente. El volumen final antes de la inyección por GC era 200 μL .

Ejemplo 7

60 *Derivatizado de fases polares para el análisis por GC/MS*

El metoximizado y el trimetilsililado con MSTFA se efectuó como se describe para la fase lipídica.

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la extracción de sustancias de contenido de material orgánico, que comprende los pasos

- (a) extracción del material orgánico o de una parte del mismo con una mezcla monofásica constituida por un 50% en volumen a un 90% en volumen de metanol, y un 50% en volumen a un 10% en volumen de agua, y opcionalmente un 0% en volumen a un 40% en volumen de otro disolvente o mezcla de disolventes;
- (b) extracción del material orgánico o de una parte del mismo con un disolvente monofásico apolar o mezcla de disolventes, siendo el índice de polaridad según Kellner del disolvente apolar o mezcla de disolventes menor que el del agente de extracción de la fase polar en el paso (a) en 0,3 o más; y
- (c) reunión de los extractos del paso (a) y del paso (b) para dar una mezcla monofásica.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, llevándose a cabo el paso (a) con una mezcla de un 80% en volumen de metanol y un 20% en volumen de agua.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, llevándose a cabo el paso (b) con una mezcla con un 30% en volumen a un 60% en volumen de alcohol de alquilo con 1 a 6 átomos de carbono, acetona, acetonitrilo, acetato de etilo, dimetilsulfóxido o N,N-dimetilformamida, y un 40% en volumen a un 70% en volumen de cloroformo, diclorometano, pentano, hexano, heptano, ciclohexano o tetracloruro de carbono.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, llevándose a cabo el paso (b) con una mezcla de un 30% en volumen a un 70% en volumen de metanol y un 40% en volumen a un 60% en volumen de diclorometano.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, derivatizándose, cromatografiándose y/o analizándose las sustancias de contenido en uno o en varios pasos adicionales.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, conteniendo el procedimiento uno de los siguientes pasos adicionales:

- i) congelación del material;
- ii) liofilizado del material;
- iii) homogeneizado y/o dispersión del material;
- iv) concentración por evaporación de un extracto o una fase a sequedad;
- v) puesta en práctica de un esterificado/transesterificado en la fase apolar;
- vi) puesta en práctica de una formación de oxima en la fase apolar;
- vii) puesta en práctica de una formación de oxima en la fase polar;
- viii) puesta en práctica de un trialquilsililado, conteniendo cada resto alquilo 1 a 6 átomos de carbono, en la fase apolar; o
- ix) puesta en práctica de un trialquilsililado, conteniendo cada resto alquilo 1 a 6 átomos de carbono, en la fase polar.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, llevándose a cabo la extracción a una temperatura de 0°C a 200°C y a una presión de 40 bar a 200 bar.

8. Procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, llevándose a cabo un esterificado/transesterificado bajo catálisis de un ácido volátil.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, conteniendo los disolventes empleados para la extracción, o las mezclas de disolvente, adicionalmente hasta un 5% en peso de sales tampón, ácidos y/o bases.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, analizándose las fases respectivamente a través de un análisis por LC, GC, MS, LC/MS, GC/MS y/o LC/MS/MS.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, estando constituido el material por material vegetal.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, siendo el procedimiento parte de un procedimiento para el análisis de un perfil metabólico, y conteniendo el mismo el siguiente paso adicional:

Análisis de los datos de resultado por medio de identificación de picos e integración de picos automática.