



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 334 742**

② Número de solicitud: 200801922

⑤ Int. Cl.:

G01N 30/88 (2006.01)

G01N 30/89 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **17.06.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2010**

Fecha de la concesión: **28.01.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **09.02.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
09.02.2011

⑰ Titular/es: **Sanidad y Residencias 21, S.A.**
c/ Cronista Rey Díaz, nº 2
14006 Córdoba, ES

⑱ Inventor/es: **Luque de Castro, María Dolores;**
Quesada Gómez, José Manuel y
Mata Granados, José María

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Procedimiento automatizado para la determinación simultánea de vitaminas liposolubles.**

㉒ Resumen:

Procedimiento automatizado para la determinación simultánea de vitaminas liposolubles.

La presente invención se refiere a un método para la determinación simultánea automatizada de las vitaminas, liposolubles y metabolitos de las vitaminas D3 y D2 en suero, caracterizado porque se requiere un volumen adecuado de suero, que se trata en línea mediante un sistema automático de extracción en fase sólida para eliminar las especies interferentes y concentrar las vitaminas, una separación de las vitaminas en un cromatógrafo de líquidos y una medida de cada una de las especies separadas mediante un espectrofotómetro. Los datos que proporciona este detector se interpolan en las rectas de calibrado de las vitaminas previamente obtenidas e introducidas en el programa de cuantificación. Los análisis se pueden solapar (desarrollo de la etapa de extracción en fase sólida de una muestra mientras la anterior se cromatografía), consiguiéndose así una alta frecuencia de muestreo.

ES 2 334 742 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento automatizado para la determinación simultánea de vitaminas liposolubles.

5 La presente invención se encuadra en el campo técnico de los métodos analíticos para la determinación de vitaminas liposolubles y metabolitos de las vitaminas D₃ y D₂ en suero.

Más concretamente la presente invención consiste en un nuevo método automático para la determinación de las vitaminas liposolubles basado en el acoplamiento de un sistema de extracción en fase sólida con un cromatógrafo de líquidos.

Estado de la técnica anterior a la invención

15 Existen pocos métodos para la determinación simultánea de vitaminas liposolubles en fluidos biológicos, la mayoría de los cuales consisten en una etapa de extracción líquido-líquido previa a una separación cromatográfica con detección mediante absorción molecular en la zona UV, o mediante espectrometría de masas (MS). Todos ellos son métodos relativamente complejos, largos y caros, especialmente los dedicados a vitamina D por su inestabilidad frente a la temperatura y la luz. Por tanto, resulta de gran interés, tanto en el campo clínico como en metabolómica, el desarrollo de un método que permita determinar en una única muestra y con un tratamiento simple y automático el contenido de vitaminas liposolubles.

Existen tres patentes que reflejan el estado de la técnica anterior a este método y que se comentan brevemente.

25 La patente española con número ES 2133133B1 se refiere a un método para la determinación de vitamina D₃ y sus metabolitos y se basa en las siguientes etapas: una extracción líquido-líquido manual, etapa de limpieza y preconcentración del extracto de suero humano mediante extracción sólido-líquido, separación del extracto mediante HPLC y detección mediante espectrofotometría UV-visible.

La patente que aquí se presenta tiene las siguientes características diferenciales:

30 En primer lugar sólo se determinan hidroximetabolitos de la vitamina D₃, mientras que en el documento que se analiza se determinan en general vitaminas liposolubles y metabolitos de la D₂ y D₃ y en dicha patente se requiere una etapa de extracción líquido-líquido manual, que no se realiza en el método que se pretende patentar. El procedimiento propuesto se puede usar para cualquier tipo de suero, mientras que en esta patente sólo se hace referencia a suero humano. Además en dicha patente se utilizan 2 mL de suero humano y en el procedimiento expuesto se utilizan entre 0.3 y 1 mL de suero de cualquier especie animal.

40 La patente KR20030073428 se refiere a un método para la determinación de vitamina E en suero, que se lleva a cabo utilizando HPLC y espectrofotometría UV. No existe etapa de extracción líquido-sólido y, además, sólo determina vitamina E.

45 La patente americana US 005532166A se refiere a un método rápido de determinación de retinol (vitamina A) en suero mediante electroforesis capilar. Por tanto, la técnica de separación es diferente a la propuesta en la patente que se solicita y, además, sólo se lleva a cabo la determinación de una vitamina.

Quedan, por tanto, de manifiesto aspectos diferenciales que justifican la solicitud de patente para el método propuesto de determinación de vitaminas liposolubles y metabolitos de las vitaminas D₂ y D₃.

Descripción detallada de la invención

50 El procedimiento se refiere a un método para la determinación simultánea de las vitaminas liposolubles D₃, D₂, A, alfa- y delta-tocoferol, 25-OH-D₃ y 25-OH-D₂ en suero basado en el acoplamiento de un sistema de extracción en fase sólida y un cromatógrafo de líquidos con un detector ultravioleta.

55 *Preparación de la muestra*

La sangre y otros fluidos biológicos se recogen en un tubo apropiado, y se realiza el proceso normal de extracción con la muestra.

60 *Desarrollo del método*

65 En un vial de muestra se mezcla un volumen de suero adecuado con un volumen igual de acetonitrilo-agua en relación 6:4 que tiene una concentración 150 milimolar en dodecil sulfato sódico (en adelante SDS). El vial se coloca en un vórtex agitando hasta conseguir una buena mezcla y a continuación en la bandeja del automuestreador para su análisis automático.

Se realiza la inyección automática del contenido del vial en el sistema de extracción líquido-sólido, que sigue la secuencia de operaciones que se describe a continuación. Básicamente, el análisis comienza con la preparación del

ES 2 334 742 B1

5 cartucho de extracción en fase sólida mediante activación de la fase sólida que contiene metanol. acondicionamiento y equilibración con acetonitrilo-agua en relación 3:7 que tiene una concentración 15 milimolar en SDS. A continuación, con esta misma mezcla se arrastra la muestra del bucle de inyección y en estas condiciones los analitos quedan retenidos en la fase sólida. Posteriormente, se introduce una mezcla acetonitrilo-agua en relación 3:7 como disolución de limpieza. En este momento comienza la etapa cromatográfica mediante la elución de los analitos retenidos en la fase sólida por la fase móvil. El cartucho de extracción en fase sólida es un cartucho empaquetado con el sorbente C8 de fase reversa.

10 La fase móvil inicial es acetonitrilo:metanol en relación 8.5:1.5 a un caudal de 1 mL/min. En el minuto 5 comienza un gradiente lineal hasta el minuto 9 para aumentar el caudal el 50% del caudal inicial. La columna cromatográfica se mantiene a temperatura ambiente. La etapa de extracción se produce simultáneamente con la etapa cromatográfica de la muestra anterior, lo cual reduce considerablemente el tiempo de análisis que hasta ahora se manejaba para este tipo de determinaciones. La columna analítica está rellena con el sorbente C18.

15 Para la detección se utiliza un detector (UV) en el que se selecciona una longitud de onda para cada clase de compuestos.

Modo de realización de la invención

20 En un vial de 1.8 mililitros se mezclan 0.5 mL de suero con la misma cantidad de acetonitrilo-agua en relación 6:4 que tiene una concentración 150 milimolar en SDS. El vial se coloca en un vórtex durante 1 minuto para conseguir una buena mezcla y a continuación en la bandeja del automuestreador para su análisis automático.

25 Se realiza la inyección automática del contenido del vial en el sistema de extracción líquido-sólido. El análisis comienza con la preparación del cartucho de extracción en fase sólida mediante activación de la fase sólida que contiene con 3 mL de metanol, acondicionamiento (3 mL) y equilibración (1 mL) con acetonitrilo-agua en relación 3:7 que tiene una concentración 15 milimolar en SDS. A continuación, con esta misma mezcla se arrastra la muestra del bucle de inyección y bajo estas condiciones los analitos son retenidos en el cartucho de C8. Posteriormente, se introducen 2 mL de una mezcla acetonitrilo-agua en relación 3:7 como disolución de limpieza. En este momento comienza la etapa cromatográfica mediante la elución de los analitos retenidos en la fase sólida por la fase móvil inicial que se produce con el giro de una válvula de seis vías.

30 La fase móvil inicial es acetonitrilo:metanol en relación 8.5:1.5 a un caudal de 1 mL/min. En el minuto 5 comienza un gradiente lineal hasta el minuto 9 para aumentar el caudal hasta 1.5 mL/min. La columna cromatográfica se mantiene a temperatura ambiente. Con este gradiente se produce la separación en función de su polaridad relativa llegando al detector donde se monitorizan cada uno a su longitud de onda de máxima absorción. También se puede ver el resultado en forma de cromatograma (absorbancia frente a tiempo).

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento automatizado para la determinación simultánea de vitaminas liposolubles y metabolitos de las mismas en suero, **caracterizado** por comprender las siguientes etapas:
- a) introducción de un volumen de suero comprendido entre 0.3 y 1.0 mL en un sistema automático de extracción en fase sólida para la eliminación de las especies interferentes y la concentración de las vitaminas.
 - 10 b) introducción del concentrado obtenido en la etapa anterior en un cromatógrafo líquido de de alta resolución para conseguir la separación de las vitaminas.
 - 15 c) introducción de cada una de las especies vitamínicas separadas en la etapa anterior en un espectrofotómetro que permita la determinación de las cantidades de cada vitamina mediante interpolación en rectas de calibrado.
- 20 2. Procedimiento automatizado para la determinación de vitaminas liposolubles en suero, según reivindicación 1, **caracterizado** por comprender la mezcla en un vial de un volumen de suero con un volumen igual de acetonitrilo-agua 6:4 que contiene dodecil sulfato sódico 150 milimolar.
- 25 3. Procedimiento automatizado para la determinación de vitaminas liposolubles en suero, según reivindicación 2, **caracterizado** por comprender una preconcentración y limpieza de la muestra de forma automática mediante una extracción en fase sólida.
- 30 4. Procedimiento automatizado para la determinación de vitaminas liposolubles en suero, según reivindicación 3, **caracterizado** porque dicha extracción se hace arrastrando la muestra con una mezcla acetonitrilo:agua en relación 3:7 que contiene 15 milimolar de SDS.
- 35 5. Procedimiento automatizado para la determinación de vitaminas liposolubles en suero, según reivindicación 3, **caracterizado** por comprender una etapa de limpieza con acetonitrilo:agua 3:7.
- 40 6. Procedimiento automatizado para la determinación de vitaminas liposolubles en suero, según reivindicación 3, **caracterizado** por comprender el uso de un cartucho de extracción en fase reversa de fase C8.
- 45 7. Procedimiento automatizado para la determinación de vitaminas liposolubles en suero, según reivindicación 1, **caracterizado** por comprender el uso de una válvula de seis vías para la elución automática del concentrado de vitaminas hacia la columna cromatográfica.
- 50 8. Procedimiento automatizado para la determinación de vitaminas liposolubles en suero, según reivindicación 8, **caracterizado** por comprender el uso de una columna de cromatográfica de fase reversa C18 para separar las vitaminas liposolubles y sus metabolitos.
- 55 9. Procedimiento automatizado para la determinación de vitaminas liposolubles suero, según reivindicación 1, **caracterizado** por comprender el uso de un espectrofotómetro que permita la determinación de las cantidades de cada vitamina mediante interpolación en rectas de calibrado.
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 742

②1 N° de solicitud: 200801922

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2008

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤1 Int. Cl.: **G01N 30/88** (2006.01)
G01N 30/89 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MATA-GRANADOS, J.M. et al.: "Fully Automated Method for the Determination of 24,25(OH) ₂ and 25(OH) D ₃ Hydroxyvitamins, and Vitamins A and E in Human Serum by HPLC", J. Pharm. Biomed. Anal. (2004), vol. 35, pp.: 575-582, todo el documento.	1-9
A	ES 2133133 A1 (QUESADA GÓMEZ, J.M.) 16.08.1999, todo el documento.	1-9
A	DELGADO-ZAMARREÑO, M.M. et al.: "Automatic Determination of Liposoluble Vitamins in Butter and Margarine Using Triton X-100 Aqueous Micellar Solution by Liquid Chromatography with Electrochemical Detection", Anal. Chim. Acta (1995), vol. 315, pp.: 201-208, todo el documento.	1-9
A	DELGADO-ZAMARREÑO, M.M. et al.: "Directly Coupled Sample Treatment-High-Performance Liquid Chromatography for On-Line Automatic Determination of Liposoluble Vitamins in Milk", J. Chromatography A (1995), vol. 694, pp.: 399-406, todo el documento.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.02.2010

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MATA-GRANADOS, J.M. et al., J. Pharm. Biomed. Anal. , vol. 35, pp.: 575-582	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un procedimiento automatizado para la determinación simultánea de vitaminas liposolubles y metabolitos de las mismas en suero. Este procedimiento comprende una extracción de la muestra en fase sólida para eliminar impurezas y concentrar las vitaminas, separación de las distintas vitaminas mediante un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) y detección de las vitaminas y/o metabolitos mediante un espectrofotómetro.

D01 describe un método totalmente automático para determinar vitaminas A y E así como metabolitos de la vitamina D3, mediante HPLC. Incluye un sistema de separación en fase sólida y un espectrofotómetro para la detección de las vitaminas liposolubles y/o los metabolitos de la vitamina D3. Se considera D01 como el estado de la técnica más cercano a la solicitud. El problema planteado tanto en uno como en la otra es el mismo: determinar vitaminas liposolubles, así como alguno de sus metabolitos, en suero, mediante un método automático. La solicitud y D01 lo resuelven de igual forma: utilizando un sistema que incluye una separación en fase sólida, una separación por HPLC y una etapa de detección en la que se utiliza un espectrofotómetro. Así, aunque los procedimientos en ambos casos no son idénticos, sí que existe un paso obvio desde el planteamiento descrito en D01 al de la solicitud.

Por todo lo dicho anteriormente, se considera que la solicitud cumple con el requisito de novedad, pero no con el de actividad inventiva.