



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 273 601**

② Número de solicitud: 200502590

⑤ Int. Cl.:

G01N 30/72 (2006.01)

G01N 31/12 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **11.10.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2007**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.05.2007

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Oviedo**
OTRI-Edificio Científico Técnico
Campus El Cristo
33003 Oviedo, Asturias, ES

⑦ Inventor/es: **Ruiz Encinar, Jorge y**
García Alonso, José Ignacio

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Método absoluto de cuantificación de compuestos orgánicos.**

⑤ Resumen:

Método absoluto de cuantificación de compuestos orgánicos que eluyen de un sistema cromatográfico sin la utilización de patrones. Consiste en la conversión en continuo del carbono de estos compuestos en dióxido de carbono (CO₂) mediante una reacción química y su mezcla, previa a la separación o posterior, con un flujo conocido y constante de un compuesto de carbono, preferentemente CO₂, enriquecido en el isótopo carbono-13 (13C). La mezcla se introduce en un Espectrómetro de Masas donde se mide en continuo la relación isotópica 12C/13C ya sea en el carbono o en algún ión característico proveniente de éste. Dicha relación isotópica se convierte en una medida de flujo másico de carbono utilizando la dilución isotópica en línea. La integración de cada pico cromatográfico proporciona de forma absoluta la masa de carbono en dicho pico. De aplicación en sectores como el medioambiental o en el control de procesos industriales.

ES 2 273 601 A1

DESCRIPCIÓN

Método absoluto de cuantificación de compuestos orgánicos.

5 La presente invención se refiere a un método de cuantificación de compuestos orgánicos que permite determinar de forma absoluta la masa de los distintos compuestos orgánicos que eluyen de un sistema cromatográfico sin necesidad de la realización de un calibrado de la respuesta instrumental del equipo específico para cada compuesto.

10 La presente invención se encuadra dentro del campo de la Química Analítica Instrumental y más concretamente dentro de los métodos de determinación de compuestos orgánicos utilizando sistemas cromatográficos de separación y su campo de aplicación cubriría sectores como el medioambiental o el de control de procesos industriales.

Estado de la técnica anterior

15 Cuando se desea determinar el contenido de uno o varios compuestos orgánicos en una muestra cualquiera llegada a un laboratorio de análisis se siguen, en general, los siguientes pasos:

20 a) Si la muestra es sólida se procede a su disolución o lixiviación de los compuestos orgánicos a determinar con un disolvente adecuado. En el caso de muestras líquidas, únicamente se requiere la extracción de los compuestos orgánicos a un disolvente adecuado. En este momento, o mas tarde, se podrían añadir a la muestra algún tipo de patrón interno para corregir errores posteriores de la metodología. Estos patrones internos pueden ser i) un compuesto distinto de los que se han de determinar que no está presente en la muestra (método del patrón interno), ii) uno o varios de los compuestos a determinar donde se ha alterado la abundancia isotópica de alguno de los elementos presentes en el compuesto (método de dilución isotópica) o iii) uno o varios de los compuestos a determinar pero sin modificar las abundancias isotópicas naturales (método de adiciones estándar). Cuando la muestra es líquida se puede añadir el patrón interno directamente sobre la muestra.

30 b) Una vez extraídos los compuestos del sólido o cuando la muestra es líquida puede ser necesario un proceso de preconcentración o de separación de otros compuestos interferentes por técnicas de separación no cromatográficas cuyo rendimiento hay que determinar.

35 c) Finalmente, la muestra ya preparada se inyecta en un sistema cromatográfico para la separación de los distintos compuestos orgánicos presentes y su detección con un dispositivo instrumental adecuado.

40 d) La señal, en área o altura de pico, se compara con una línea de calibrado preparada a partir de patrones puros para cada compuesto a determinar ya que la señal instrumental es diferente para cada compuesto. Esta calibración permite determinar el contenido del compuesto orgánico en la muestra inyectada. Cabe resaltar que esta etapa del análisis es, sin duda alguna, la de mayor coste del proceso ya que los patrones certificados son caros y cada compuesto presente en la muestra requiere su calibración independiente, lo que requiere tiempo y dinero.

45 e) En el caso de que se haya utilizado algún tipo de los patrones internos descritos más arriba las metodologías de cuantificación difieren ligeramente.

50 La presente invención pretende eliminar o simplificar algunos de los pasos descritos más arriba mediante la utilización de la dilución isotópica en línea (ver referencias 1 a 5). La dilución isotópica es una técnica clásica de determinación elemental descrita hace ya más de 50 años. Se basa en la alteración intencionada de la abundancia isotópica de un elemento en la muestra por la adición de una cantidad conocida del mismo elemento con una abundancia isotópica alterada (trazador) y la medida de la abundancia isotópica final en la mezcla mediante Espectrometría de Masas. Este principio fundamental se ilustra en la Figura 1 para un elemento que posee dos isótopos: a y b. Como se puede observar, el isótopo a es el más abundante en la muestra mientras que el trazador está enriquecido en el isótopo b. La abundancia isotópica en la mezcla será una combinación lineal de las abundancias en la muestra y trazador que dependerá de la cantidad de elemento presente en la muestra y de la cantidad de trazador adicionada. La medida de la relación isotópica R_m en la mezcla (isótopo a/isótopo b) permite determinar la cantidad del elemento en la muestra original.

60 Este principio puede aplicarse a la determinación de la cantidad de un elemento que eluye de un sistema cromatográfico utilizando la dilución isotópica en línea cuyo principio fundamental se ilustra en la Figura 2 para un sistema de cromatografía líquida y que ya ha sido descrito en diversas publicaciones (ver referencias 1 a 5).

65 Como se puede observar en la Figura 2 la muestra y el trazador se mezclan en continuo (en flujo) tras la separación cromatográfica y la medida de la relación isotópica en la mezcla R_m se realiza en función del tiempo mediante Espectrometría de Masas. Si el aporte de trazador a la mezcla se mantiene constante en el tiempo, la relación isotópica medida en la mezcla (R_m) dependerá únicamente del aporte del elemento a analizar proveniente de la muestra, que puede ser constante o variable. En nuestro caso, el aporte del elemento a la mezcla procedente de la muestra varía con el tiempo debido a la separación cromatográfica y por tanto, las ecuaciones de la dilución isotópica se modifican introduciendo el flujo másico del elemento como variable desconocida (ver referencias 1 a 5). La representación del

flujo másico en función del tiempo será el denominado cromatograma de flujo másico. La integración de cada pico cromatográfico nos proporciona de forma absoluta la masa del elemento en dicho pico. La concentración en la muestra original se calcula conociendo la masa (o el volumen) de muestra inyectada en el sistema cromatográfico (ver referencias 1 a 5). Como se puede observar, este procedimiento elimina directamente el paso d) descrito anteriormente ya que la cuantificación se realiza directamente durante la separación cromatográfica (paso c).

Cuando se pretende utilizar la dilución isotópica en línea para análisis elemental tras una separación cromatográfica es imprescindible que exista un equilibrio isotópico entre los compuestos eluidos de la columna cromatográfica y el compuesto químico utilizado como trazador que contiene el elemento enriquecido isotópicamente. La consecución de este equilibrio isotópico se ha descrito en la literatura únicamente utilizando el plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización ya que es capaz de romper todos los enlaces químicos tanto en los compuestos provenientes de la columna cromatográfica como del compuesto químico que contiene al trazador (ver referencias 1 a 5). Por tanto, la eficacia del proceso de ionización será independiente de la naturaleza del compuesto químico que contiene al analito o al trazador enriquecido. Para la determinación de compuestos orgánicos por dilución isotópica en línea existe sólo una publicación en la literatura utilizando el plasma de acoplamiento inductivo como fuente de ionización y ácido benzoico marcado con ^{13}C como trazador (ver referencia 6). Sin embargo, esta fuente de ionización no es la más adecuada para la determinación de carbono debido al bajo rendimiento del proceso de ionización para este elemento y a la posible contaminación por carbono atmosférico.

20 Referencias bibliográficas.

- (1) "Isotope dilution analysis for trace element speciation. A tutorial review". **Rodríguez** González, P; **Marchante** Gayón, JM; **García** Alonso, JI; **Sanz** Medel, A. *SPECTROCHIMICA ACTA PART B-ATOMIC SPECTROSCOPY*, 2005, 60 (2): 151-207.
- (2) "Isotope-dilution mass spectrometry". **Heumann** KG. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY AND ION PROCESSES*, 1992, 118:575-592.
- (3) "Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double focusing ICP-MS" **Muñiz** CS, **Marchante** Gayón, JM; **García** Alonso, JI; **Sanz** Medel, A. *JOURNAL OF ANALYTICAL ATOMIC SPECTROSCOPY*, 2001, 16 (6): 587-592.
- (4) "Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS". **Reyes** LH, **Marchante**-Gayón JM, **García** Alonso, JI; **Sanz** Medel, A. *JOURNAL OF ANALYTICAL ATOMIC SPECTROSCOPY*, 2003, 18 (10): 1210-1216.
- (5) "Determination of cadmium in biological and environmental materials by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry: effect of flow sample introduction methods" **Mota** JPV, de la **Campa** MRF, **García** Alonso, JI; **Sanz** Medel, A. *JOURNAL OF ANALYTICAL ATOMIC SPECTROSCOPY*, 1999, 14 (2): 113-120.
- (6) "Development of an ICP-IDMS method for dissolved organic carbon determinations and its application to chromatographic fractions of heavy metal complexes with humic substances". **Vogl**, J; **Heumann**, KG. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 1998, 70 (10): 2038-2043.

Descripción detallada de la invención

La presente invención aplica la dilución isotópica en línea a la determinación absoluta de compuestos orgánicos con alta sensibilidad y precisión mediante la medida continua de la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ a la salida de un sistema cromatográfico utilizando fuentes de ionización alternativas al plasma de acoplamiento inductivo. Estas otras fuentes de ionización, que podrían trabajar a alto vacío, proporcionarían una mayor sensibilidad y menores contaminaciones de carbono, lo que se traduciría en mejores límites de detección para compuestos orgánicos. Para ello, se ha desarrollado un procedimiento que permite alcanzar el equilibrio isotópico entre los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica y el trazador enriquecido isotópicamente como paso previo a su introducción en la fuente de ionización. La consecución de este equilibrio isotópico previo nos permitiría elegir la fuente de ionización más adecuada para el análisis de compuestos orgánicos sin tener que recurrir necesariamente, como hasta ahora, al plasma de acoplamiento inductivo.

La presente invención utiliza una reacción química capaz de transformar cuantitativamente el carbono presente en cada compuesto orgánico que eluye de la columna cromatográfica en dióxido de carbono (CO_2) como medio para alcanzar el equilibrio isotópico. Este dióxido de carbono proveniente de los compuestos orgánicos de la muestra se mezcla con un compuesto volátil de carbono marcado con ^{13}C enriquecido antes de su introducción en la fuente de ionización del Espectrómetro de Masas para su análisis por dilución isotópica en línea.

Para introducir el carbono marcado isotópicamente con ^{13}C , trazador, y realizar la dilución isotópica en línea, la presente invención comprende dos formas alternativas igualmente válidas:

ES 2 273 601 A1

- a) Introducir el trazador directamente como dióxido de carbono enriquecido en ^{13}C (realización preferente).
- b) Introducir el trazador como otro compuesto volátil de carbono (por ejemplo metano) enriquecido ^{13}C .

5 En el primero de los casos (utilización de CO_2) el trazador puede introducirse en cualquier momento en el sistema cromatográfico (en la fase móvil, después de la columna o después de la reacción química) mientras que para el segundo caso (metano) la introducción se hará siempre antes de la reacción química para convertir el compuesto utilizado como trazador también en CO_2 .

10 La mezcla así obtenida se introduce en un Espectrómetro de Masas para la medida de la relación isotópica del carbono de forma continua obteniendo así el cromatograma de flujo másico. La medida de la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ se puede realizar, en función de la fuente de ionización utilizada, tanto en los propios iones monopositivos de carbono a masas 12 y 13 como en otros iones derivados de éstos como, por ejemplo, en el CO_2^+ a masas 44 y 45, respectivamente.

15 El método absoluto de cuantificación de compuestos orgánicos objeto de la invención presenta, respecto a las metodologías actuales de cuantificación de compuestos orgánicos, las siguientes ventajas:

- a) Es un método universal que serviría para cualquier compuesto orgánico independientemente de su forma química ya que el carbono presente en todo compuesto orgánico es susceptible de ser transformado cuantitativamente en CO_2 mediante una reacción química.
- b) Es un método absoluto que no requiere la utilización de patrones de calibrado para cada compuesto a determinar, lo que disminuye ostensiblemente el coste y el tiempo de los análisis en los laboratorios de rutina. De hecho, permitiría la cuantificación absoluta de todo compuesto que contenga carbono presente en la muestra, y que eluya del sistema cromatográfico, en una sola inyección sin necesidad de patrón alguno.
- c) Utiliza la dilución isotópica por cuanto puede considerarse un método primario de análisis directamente trazable al Sistema Internacional de unidades.
- d) Requiere una mínima modificación de los sistemas cromatográficos actuales para introducir la reacción química y el flujo de carbono 13 enriquecido.
- e) Utiliza Espectrómetros de Masas de bajo coste ya que no se requieren altas precisiones en las relaciones isotópicas medidas.
- f) Permite la utilización de patrones internos para corregir errores metodológicos durante la preparación de la muestra, variaciones en el volumen inyectado o variaciones de volumen debidas a la evaporación del disolvente, dado que esta metodología permite determinar también de forma absoluta la cantidad de patrón interno inyectada.

40 La presente invención puede ser empleada tanto en separaciones por cromatografía líquida como en separaciones por cromatografía de gases y podrá encontrar aplicación en laboratorios de ensayo medioambientales y en laboratorios de control de procesos industriales donde se realicen determinaciones rutinarias de compuestos orgánicos, de estructura química conocida, por técnicas cromatográficas. En concreto, la determinación de hidrocarburos alifáticos en diversos tipos de muestras, de hidrocarburos aromáticos, pesticidas, compuestos organoclorados, etc. sería factible con esta invención. Por tanto, uno de los campos de aplicación más inmediatos es al análisis medioambiental de contaminantes orgánicos en laboratorios de ensayo. Un segundo campo de aplicación importante sería en el control de calidad de productos industriales y farmacéuticos y en el control de procesos químicos, realizados normalmente en los laboratorios de las propias plantas de producción.

50 Otros campos de aplicación, dentro de la Química Analítica, podrían ser la optimización y estudio de procesos de separación no cromatográficos (extracción líquido-líquido, extracción sólido-líquido, microextracción en fase sólida, etc.) dado que la cuantificación absoluta que se realiza por este método puede servir para estudiar y optimizar estos procesos con elevada fiabilidad. Un caso particular es la selección y utilización de patrones internos para corregir errores en los procesos de separación no cromatográficos.

60 Desde el punto de vista instrumental, la presente invención se podrá incorporar en equipos cromatográficos que emplean la Espectrometría de Masas como sistema de detección (equipos sencillos de GC-MS o HLC-MS) y por tanto, consiste en una modificación instrumental susceptible de comercialización por las empresas de instrumentación analítica. Estos equipos modificados permitirían la realización de análisis de rutina de compuestos orgánicos con una elevada precisión y exactitud, a bajo coste para los laboratorios y en un tiempo considerablemente más corto que los métodos tradicionales de calibrado externo y adiciones estándar.

Breve descripción de las figuras

65 Figura 1: Ilustración del principio básico del análisis por dilución isotópica.

Figura 2: Ilustración del principio de la dilución isotópica en línea para un sistema de cromatografía líquida.

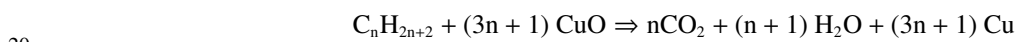
Figura 3: Esquema de una realización preferente.

Explicación de una forma de realización preferente

5 Para una mejor comprensión del proceso objeto de la presente invención se explicará el procedimiento a seguir para la determinación de compuestos orgánicos por Cromatografía de Gases utilizando un Espectrómetro de Masas de cuadrupolo con una fuente de ionización de impacto electrónico, que se podría considerar como “realización preferente” de la invención. Esto no significa que la invención no pueda aplicarse a otras técnicas cromatográficas o con las otras alternativas descritas previamente.

10 El dióxido de carbono enriquecido en ^{13}C se prepara disuelto en Helio presurizado. El recipiente que contiene el trazador tendría un orificio de salida y el flujo de gas iría controlado mediante un controlador de flujo másico que regularía exactamente el flujo de trazador añadido a la mezcla.

15 Por otro lado, a la salida de la columna cromatográfica se instala una interfase de combustión consistente en un tubo de sílice fundida donde se introducen hilos de cobre, oxidados previamente en una corriente de aire a CuO , y que se puede mantener a una temperatura adecuada ($> 850^\circ\text{C}$) para que ocurra la reacción genérica:



de forma cuantitativa y donde $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ es un hidrocarburo alifático cualquiera. Cualquier compuesto orgánico produciría la reacción anterior de forma cuantitativa convirtiéndose en dióxido de carbono, agua y, en caso de presencia de heteroátomos, otros productos de reacción (NO_2 , SO_2 , etc). El flujo de dióxido de carbono marcado con ^{13}C se añadiría a la salida de la interfase de combustión y la mezcla así generada se introduciría, a través de un tubo de sílice fundida, en la fuente de ionización de un Espectrómetro de Masas. Utilizando una fuente de ionización de impacto electrónico se podrían medir las relaciones isotópicas del carbono en el ión molecular CO_2^+ a masas 44 (para el carbono 12) y 45 (para el carbono 13). La relación isotópica medida se convertiría en relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ teniendo en cuenta las abundancias isotópicas naturales del oxígeno si fuera necesario. Esa relación isotópica se introduciría en la ecuación de la dilución isotópica en línea (ver referencia 1) para obtener el cromatograma de flujo másico y así poder determinar directamente la masa de carbono en cada pico cromatográfico tras su correspondiente integración. Un esquema general de esta realización preferida se ilustra en la Figura 3.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método absoluto de cuantificación de compuestos orgánicos **caracterizado** por la utilización de la dilución isotópica en línea acoplada a un sistema de separación cromatográfico para la determinación de la cantidad (masa) de carbono que eluye en cada pico cromatográfico.

10 2. Método absoluto de cuantificación de compuestos orgánicos, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los compuestos orgánicos eluidos del sistema cromatográfico se transforman cuantitativamente en dióxido de carbono mediante una reacción química y se mezclan, antes o después de la reacción química, con un compuesto volátil enriquecido en carbono-13 (trazador).

15 3. Método absoluto de cuantificación de compuestos orgánicos, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por el uso de la medida en continuo de la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en la mezcla generada mediante un Espectrómetro de Masas, directamente o derivada de una relación isotópica medida en un ión molecular, para construir así un cromatograma de flujo másico de carbono en base a la ecuación de la dilución isotópica en línea.

20 4. Método absoluto de cuantificación de compuestos orgánicos, según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por la utilización del cromatograma de flujo másico para determinar de forma absoluta la masa de carbono presente en cada pico cromatográfico tras la integración matemática de dichos picos respecto al tiempo.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

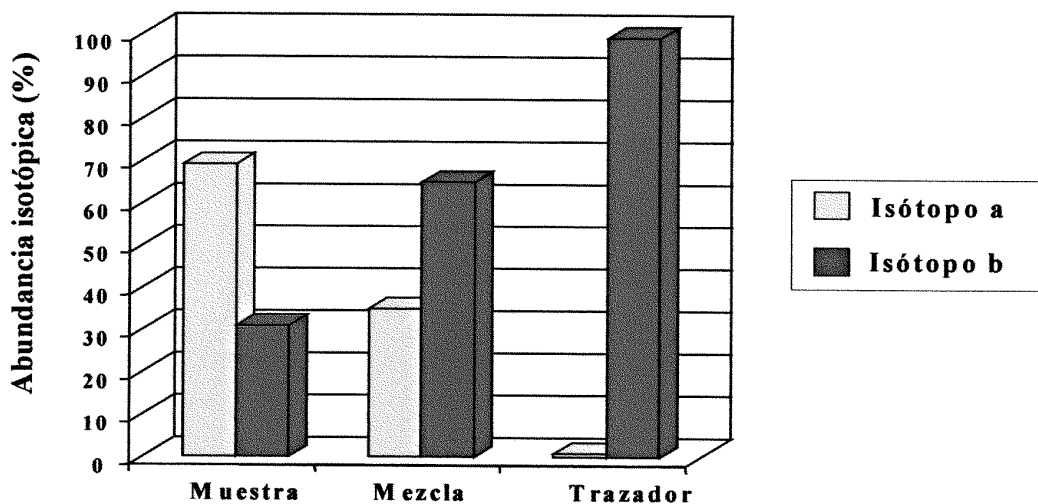


FIGURA 2

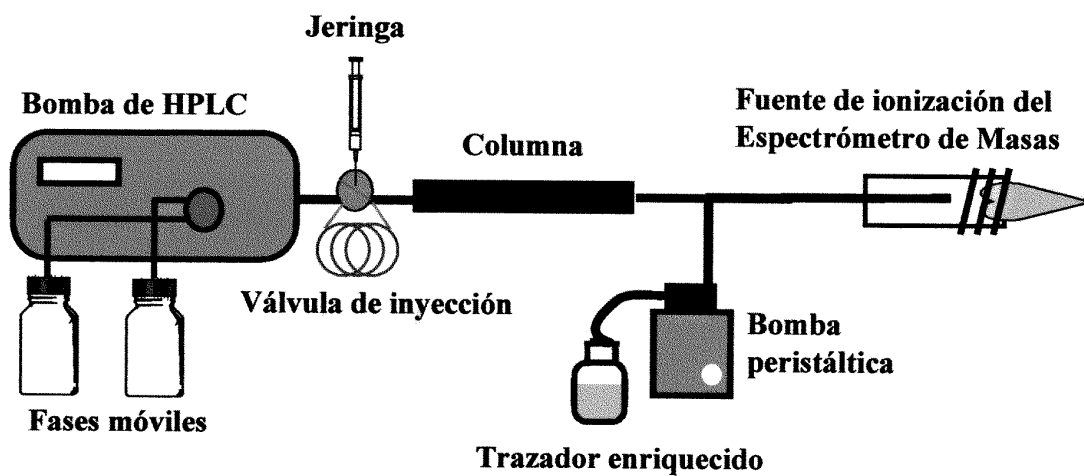
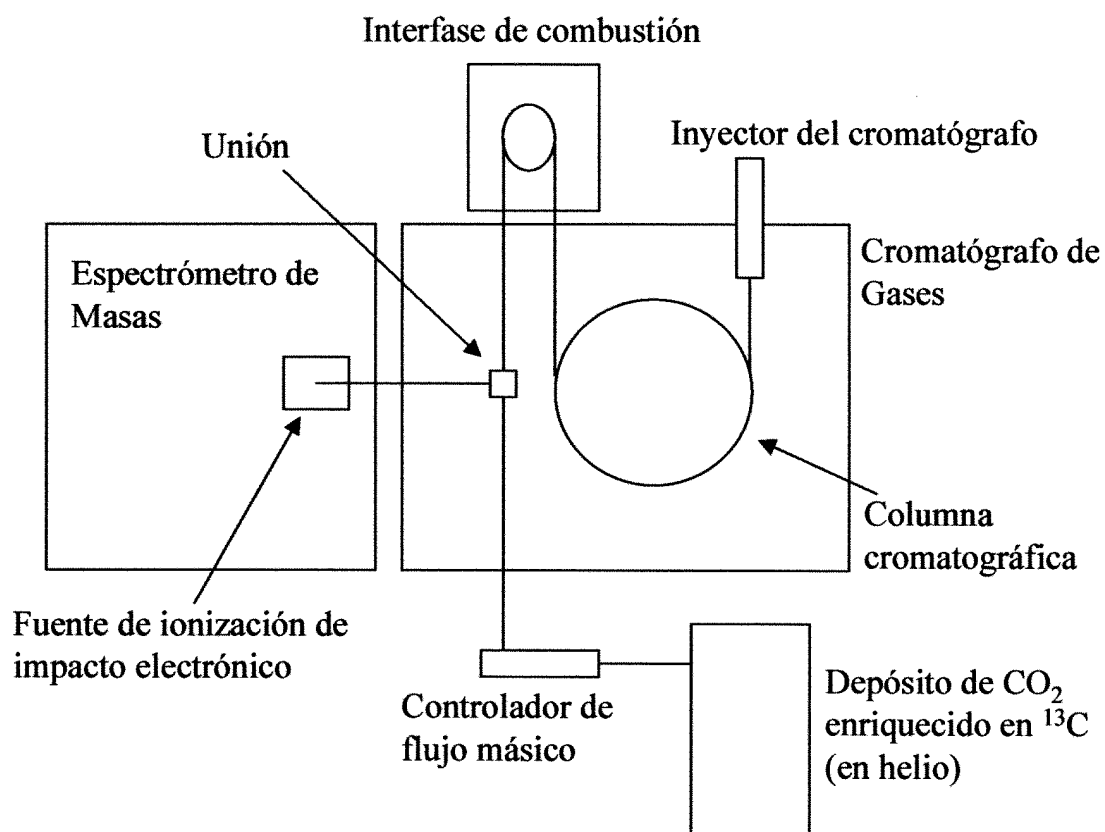


FIGURA 3





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 273 601

② Nº de solicitud: 200502590

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.10.2005

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 30/72** (2006.01)
G01N 31/12 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DUBE, G. "13C/12C Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie für Stoffmengenmessungen in der Organischen Chemie". PTB-Bericht ThEx-Physikalisch-Technische Bundesanstalt, 1997, PTB-ThEx-3, páginas 11-12. Todo el documento.	1-4
X	DUBE, G. et al. "A combination of gas chromatography, combustion, and 13C/12C isotope dilution mass spectrometry (GC/C/IDMS)". Metrologia, 1997, Volumen 34, páginas 83-86. Todo el documento.	1-4
X	FR 2673291 A1 (INBIOMED INTERNATIONAL & TEXINFINE) 28.08.1992, todo el documento.	1-4
A	US 6355416 B1 (ABRAMSON, F.P.) 12.03.2002, reivindicación 1.	1-4
A	FR 2845479 A1 (L'AIR LIQUIDE SOCIÉTÉ ANONYME POUR L'ÉTUDE ET L'EXPLOITATION DES PROCÉDÉS GEORGES CLAUDE) 09.04.2004, todo el documento.	1-4

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
09.03.2007

Examinador
G. Esteban García

Página
1/1