

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 211 290**

② Número de solicitud: 200201377

⑤ Int. Cl.7: **G01N 21/64**
G01N 21/77

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **14.06.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2004**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.07.2004

⑰ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano 117
28006 Madrid, ES
Universidad del País Vasco y
Université de Metz**

⑱ Inventor/es: **Cebolla Burillo, Vicente Luis;
Membrado Giner, Luis;
Domingo, María Pilar;
Gálvez, Eva María;
Cossío, Fernando Pedro;
Arrieta, Ana;
Matt, Muriel y
Gruber, Rene**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Detector universal y cuantitativo de moléculas orgánicas por fluorescencia.**

㉑ Resumen:

Detector universal y cuantitativo de moléculas orgánicas por fluorescencia.

No todas las moléculas orgánicas son fluorescentes, ni se pueden convertir en fluorescentes usando un único procedimiento

Esta invención permite la detección cuantitativa por fluorescencia de cualquier molécula orgánica, sea o no fluorescente, y de sus mezclas. Este carácter universal de la detección confiere a la invención su principal novedad.

El procedimiento está caracterizado por la medida de la variación de la intensidad de la fluorescencia que provoca la interacción ión-dipolo inducido al adicionar la molécula orgánica que se quiera detectar a cualquier catión orgánico, fluorescente y con carga igual o superior a la unidad, y, posteriormente, irradiar el conjunto con luz en el rango ultravioleta o visible. Este procedimiento puede ser llevado a cabo en disolución, en dispositivos tipo sensor, preferentemente de fibra óptica, e incorporado a sistemas cromatográficos, electroforéticos y electrocromatográficos.

ES 2 211 290 A1

DESCRIPCIÓN

Detector universal y cuantitativo de moléculas orgánicas por fluorescencia.

Sector de la técnica

El sector en el que se encuadra la invención es el de la Tecnología Química. Esta invención tiene interés para todos los campos en que se detectan y cuantifican moléculas orgánicas (bioquímica, medioambiente, cromatografía, química orgánica y analítica, etc...).

Estado de la técnica

La fluorescencia es una de las técnicas más sensibles de detección de moléculas, que se aplica en modo espectroscópico, como detector cromatográfico, o en dispositivos de tipo sensor.

No todas las moléculas orgánicas presentan fluorescencia. Existen muchas que carecen de las características estructurales precisas para ser detectables mediante tal propiedad. Así, sólo son detectadas las que poseen fluorescencia intrínseca o bien aquéllas moléculas que se pueden convertir en fluorescentes mediante reacción o interacción química con otros compuestos químicos (en adelante, derivatizantes). Éstas reacciones o interacciones involucran derivatizantes que suelen ser eficaces sólo para una molécula o un conjunto particular de moléculas orgánicas. Así, pues, *no se ha descrito hasta ahora ningún procedimiento, derivatizante o sistema de detección general que sirva para detectar por fluorescencia a todas las moléculas orgánicas existentes.*

Un ejemplo de derivatizante utilizado únicamente desde hace tiempo como detector exclusivo de hidrocarburos saturados es el cloruro de berberina, cuando una placa de sílica gel impregnada con una disolución de esta sal, y sobre la que se depositaba el correspondiente hidrocarburo saturado, se irradiaba con luz ultravioleta a 254 nm y con luz visible a 365 nm en un sistema de cromatografía en capa fina (Mamlok, L. Technical Note: Berberine Hydrochloride for Detection (as a Detector) in Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1981**, 19, 53.). También se utilizó el cloruro de berberina para detectar a simple vista (usando luz natural) los hidrocarburos saturados eluidos a través de una columna abierta rellena con sílica gel (Brockmann, H.; Volpers, F. Zur Kenntnis der chromatographischen Adsorption, II. Mitteil: Ein neues Verfahren zur Trennung farbloser Stoffe. *Ber.* **1947**, 80, 77). En ambos casos, la detección era visual, es decir, la fluorescencia emitida no era recogida mediante ningún dispositivo.

Utilizando el mismo procedimiento en cromatografía en capa fina aunque recogiendo la fluorescencia emitida mediante el uso de filtros en un densitómetro, Marsh y Hiekane también detectaron hidrocarburos saturados en un bitumen en 1991 (Marsh, C. M.; Hiekane, C. J. Quantitative Analysis of Bitumen by Conventional High Performance Thin Layer Chromatography. *J. Planar Chromatogr.-Mod TLC* **1991**, 4, 293-298).

Las bases de este fenómeno no fueron sistemáticamente estudiadas hasta 1999 por Cebolla et al. (Cebolla, V. L.; Membrado, L.; Domingo, M. P.; Henrion, P.; Garriga, R.; González, P.; Cossio, F. P.; Arrieta, A.; Vela, J. Quantitative Applications of Fluorescence and Ultraviolet Scanning Densitometry for Compositional Analysis of Petroleum Products in Thin-Layer Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **1999**, 37,

219-226, y Cebolla, V.L., Matt, M., Gálvez, E.M., Membrado, L., Domingo, M.P., Vela, J., Beregovtsova, N., Sharypov, V., Kuznetsov, B.N., Marin, N., Weber, J.V. Application of Thin-layer Chromatography with Fluorescence Scanning Densitometry for Analysing Saturates in Heavy Liquids Derived from Copyrolysis of Biomass and Plastics. *Chromatographia* **2002**, 55, 87-93), y Cossío et al. (Fernando P. Cossío, Ana Arrieta, Vicente L. Cebolla, Luis Membrado, María P. Domingo, Patrick Henrion, Jesús Vela. Enhancement of Fluorescence in Thin-Layer Chromatography Induced by the Interaction between n-Alkanes and an Organic Cation. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 1759-1766, y Fernando P. Cossío, Ana Arrieta, Vicente L. Cebolla, Luis Membrado, Jesús Vela, Rosa Garriga, and María P. Domingo. Berberine Cation: A Fluorescent Chemosensor for Alkanes and Other Low-Polarity Compounds. An Explanation of This Phenomenon. *Organic Letters* **2000**, 2, 2311-2313), quienes asimismo realizaron contribuciones a su aplicación en cromatografía en capa fina para el análisis de hidrocarburos saturados en productos de petróleo y biomasa. Estos autores demostraron que la emisión fluorescente es debida a una interacción ión-dipolo inducido entre el catión berberina y el correspondiente hidrocarburo saturado.

El descubrimiento que nos lleva a proponer esta patente es que la emisión fluorescente caracterizada por interacciones ión-dipolo inducido no permite solamente la detección de hidrocarburos saturados u otras moléculas puntuales sino que es un *procedimiento general que permite la detección de todas y cada una de las moléculas orgánicas.* Cualquiera de los cationes orgánicos existentes, con tal que sean fluorescentes y con carga igual o superior a la unidad se comportan como derivatizantes universales de moléculas orgánicas, en virtud de las ecuaciones matemáticas que rigen este tipo de fluorescencia (Fernando P. Cossío, Ana Arrieta, Vicente L. Cebolla, Luis Membrado, Jesús Vela, Rosa Garriga, and Mana P. Domingo. Berberine Cation: A Fluorescent Chemosensor for Alkanes and Other Low-Polarity Compounds. An Explanation of This Phenomenon. *Organic Letters* **2000**, 2, 2311-2313). El catión berberina es un caso particular de este fenómeno. El sistema de detección inventado aquí se basa en este tipo de interacción. La parte fundamental del descubrimiento consiste en la generalización del fenómeno a otros cationes y otras técnicas de separación distintas de la cromatografía en capa fina (TLC), sobre la que se ha estudiado hasta el momento la detección de algunos compuestos particulares con berberina, por lo que se excluye en consecuencia su aplicación a la TLC en las reivindicaciones de esta invención, aunque tampoco en el caso de la TLC se ha descrito como detector universal.

Esta invención es aplicable a una variedad de dispositivos analíticos que tienen interés para la detección de múltiplos analitos.

Descripción de la invención

Explicación de la invención

No se ha descrito hasta ahora ningún procedimiento que permita detectar por fluorescencia todas y cada una de las moléculas orgánicas existentes en diversos sistemas analíticos de interés. Nuestra invención permite la detección de todas y cada una de las moléculas orgánicas (carácter universal) de modo cuantitativo, lo cual presenta interés en su aplicación a distintos cam-

pos de la Química por ser la fluorescencia un modo de detección muy sensible. Asimismo, es posible incorporarla a los diferentes tipos de sistemas comerciales con ligeras modificaciones.

Nuestra invención se basa en recoger cuantitativamente la fluorescencia emitida cuando se irradia el correspondiente compuesto orgánico que se quiere determinar, con luz ultravioleta o visible, en una disolución de cualquier catión orgánico fluorescente de carga igual o superior a la unidad. Así, en las condiciones mencionadas, estos cationes se comportan como detectores o sensores de cualquier compuesto orgánico. La principal novedad de la invención es que todas las moléculas orgánicas son detectadas en estas condiciones. Este tipo de fluorescencia se caracteriza por una interacción ión-dipolo inducido entre el correspondiente compuesto orgánico y el catión utilizado.

Otra novedad de nuestra invención es que puede ser llevada a cabo en diferentes sistemas comerciales, con ligeras modificaciones, que se detallan en el apartado siguiente. Todos estos sistemas ya incorporan dispositivos para realizar la irradiación de la muestra con luz ultravioleta o visible.

La explotación industrial de esta invención puede venir por el desarrollo comercial de estos sistemas de detección para su aplicación a la detección de analitos de interés en los campos de la química orgánica, cromatografía, bioquímica, medioambiente.

Descripción detallada de la invención

Es posible detectar cualquier compuesto orgánico mediante el aumento o la disminución de la intensidad de la fluorescencia emitida a una longitud de onda, que se produce cuando se irradia con luz en el rango ultravioleta o visible una disolución conjunta del compuesto orgánico a detectar y cualquier sal de cualquier catión orgánico que sea fluorescente y con carga igual o superior a la unidad, respecto de la fluorescencia de la misma disolución sin adición del compuesto orgánico.

La fluorescencia emitida está caracterizada por una interacción ión-dipolo inducido. Como consecuencia de dicha interacción, el catión polariza a la molécula orgánica creando una cierta separación de cargas en ella y produciendo una emisión fluorescente.

El aumento o disminución de fluorescencia ocurre, en las condiciones mencionadas, para todos los compuestos orgánicos y su valor absoluto depende de la masa del compuesto orgánico añadido y de las condiciones de adición del catión fluorescente, además de depender de las longitudes de onda de excitación y emisión. El signo de la fluorescencia depende del disolvente utilizado. La única restricción es que tanto el catión como el compuesto orgánico a detectar sean solubles en dicho disolvente.

Las longitudes de onda de excitación y de emisión dependerán de cada catión particular y compuesto a detectar. De entre los posibles cationes a utilizar, el catión berberina es un caso particular. En este caso, la longitud de onda de excitación se encuentra preferentemente entre 250 y 400 nm, y la de emisión, preferentemente en el rango 350-550 nm. Los valores de longitud de onda mencionados son orientativos. Los valores óptimos suelen darse para el catión berberina alrededor de 365 nm en lo referente a excitación y 450-550 nm en cuanto a emisión.

Esta invención permite la detección universal y

cuantitativa de cualquier compuesto orgánico, tanto puro como en mezclas. En ella se reivindica el uso, en las condiciones mencionadas, de cualquier catión orgánico fluorescente, en virtud de las expresiones que rigen este tipo de fluorescencia.

Esta invención se puede llevar a cabo en diferentes sistemas. En primer lugar, y tal como se ha descrito anteriormente, puede ser aplicada a la detección directa de analitos orgánicos en disolución, utilizando sistemas tales como equipos de espectroscopia. En este caso, la detección puede ser llevada a cabo en la misma cubeta en la que se realiza la medida espectroscópica. También puede aplicarse en cualquier dispositivo tipo sensor, por ejemplo, asociado a fibra óptica.

Asimismo, la invención puede llevarse a cabo, mediante separación de los compuestos que eventualmente compongan la muestra problema, en equipos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), o en equipos de cromatografía supercrítica. También en sistemas de cromatografía en capa fina, así como en sistemas de electroforesis y electrocromatografía. Se detallan algunas particularidades de la detección de compuestos orgánicos en dichos sistemas.

La descripción de la invención para el caso de sistemas electroforéticos o electrocromatográficos requiere la impregnación de la capa de gel mediante una disolución del catión, pudiéndose regular la concentración de la disolución del catión y el tiempo de impregnación a voluntad del analista en función de las necesidades de detección.

En el caso de la cromatografía HPLC, la muestra se inyecta en un equipo convencional de cromatografía equipado con columna o columnas de cualquier tipo de fase estacionaria y detector de fluorescencia. En el caso de nuestra patente, se debe utilizar una bomba adicional que impulse un caudal de una disolución de cualquier sal de berberina. Este caudal se deberá mezclar con el de fase móvil tras la salida de la columna y antes de la entrada al detector de fluorescencia. La berberina puede ser añadida en cualquier disolvente adecuado, en concentraciones típicas entre 1 y 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y a un flujo típico entre 0.1 y 10 mL / min . De este modo, los compuestos separados junto con la fase móvil interaccionan con la berberina y es posible detectarlos de forma cuantitativa por fluorescencia en las condiciones descritas anteriormente. El nivel de fluorescencia de línea base corresponde al de la fluorescencia original de la fase móvil. La cantidad de berberina añadida y el flujo utilizado condicionan la intensidad de la fluorescencia emitida y sus características (positiva o negativa).

Explicación detallada del contenido de las figuras

La figura 1 presenta un esquema general de la fluorescencia presentada en esta patente y que está caracterizada por interacción ión-dipolo inducido. La irradiación, con luz ultravioleta o visible de cualquier molécula orgánica disuelta en una disolución de cualquier sal de cualquier catión orgánico (que sea fluorescente) conduce a una interacción ión-dipolo inducido en la que el catión polariza a la molécula orgánica. Esta interacción produce una emisión fluorescente.

La figura 2 pretende ilustrar la detección de moléculas orgánicas de distinta naturaleza mediante el empleo del catión berberina como sensor o detector, utilizando un equipo de HPLC con detector de fluo-

rescencia. A notar que las moléculas reseñadas en la presente figura no poseen fluorescencia intrínseca. La figura 2 representa la respuesta fluorescente de diversos alcoholes (propanol, butanol, octanol, pentanol, decanol y metanol) mediante fluorescencia caracterizada por interacción ión-dipolo inducido, utilizando un sistema de HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). Las condiciones utilizadas eran las que se citan a continuación. Fase móvil: Diclorometano con flujo de 0'3 ml/min. Concentración de berberina: 200 microgramos/ml en diclorometano (disuelta en 3 ml de metanol por 100 de la disolución total). Flujo de la disolución de berberina 0'8 ml/min. La respuesta de cada compuesto depende de las condiciones anteriores. Longitud de onda de excitación: 350 nm. Longitud de onda de detección: 520 nm.

La figura 3 corresponde a un ejemplo de detección espectroscópica por fluorescencia de *n*-hexano en disolución mediante el uso de sulfato de berberina y excitación con luz ultravioleta a 350 nm. En el eje de ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias); en el eje de abscisas se representa la longitud de onda de la emisión fluorescente. El espectro A es el de fluorescencia de la disolución de sulfato de berberina en acetona. El espectro B es el de fluorescencia de la disolución anterior a la que se había añadido *n*-hexano.

Ejemplos de realización de la invención

El primer ejemplo se corresponde con la figura 2, que representa la detección de diferentes alcoholes mediante fluorescencia ión-dipolo inducido, utilizando un sistema de HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia).

Se realizaron inyecciones sucesivas de 20 microlitros de propanol (2 inyecciones), butanol (2 inyecciones), octanol (2 inyecciones), pentanol (2 inyecciones), decanol (2 inyecciones) y metanol (3 inyeccio-

nes). La fase móvil utilizada fue diclorometano con un flujo de 0.3 ml/min. Se adicionó sulfato de berberina a la salida de la columna en una concentración de 200 microgramos/ml tras haber sido disuelta en diclorometano/metanol (3% de metanol en volumen) con un flujo de 0.8 ml/min. Ambos caudales, el de fase móvil y el de berberina fueron mezclados a la salida de la columna antes de su paso por el detector de fluorescencia. La longitud de onda de excitación fue de 350 nm y la de detección de 520 nm.

La respuesta de cada alcohol depende, como para el resto de productos, de los flujos de fase móvil y berberina empleados. Si bien en este caso apenas se detecta respuesta en el caso del pentanol, otras condiciones permiten detectar también con claridad dicho compuesto.

El segundo ejemplo se corresponde con la figura 3, que representa el aumento de fluorescencia producido por un hidrocarburo (*n*-hexano). Dicho aumento de fluorescencia permite detectar la presencia de este compuesto. Hay que hacer notar que éste compuesto no es fluorescente como tampoco lo eran los alcoholes del ejemplo anterior. El modo de proceder es el siguiente: se toman 2 ml de una disolución de berberina en acetona en una concentración de 125 microgramos por mililitro y se añaden 23 ml de acetona. Se realiza el espectro de fluorescencia con longitud de onda 350 nm. Es el espectro denominado A en la figura. Posteriormente, se toman 2 ml de la mencionada disolución de berberina en acetona, se añaden 22 ml de acetona y 1 ml de *n*-hexano. Se realiza el espectro de fluorescencia en las mismas condiciones que en el caso anterior. Es el espectro denominado B en la figura. Se observa, por comparación de ambos espectros, que la adición de *n*-hexano ha producido un incremento de la fluorescencia emitida en el rango 400-570 nm.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección universal y cuantitativa de cualquier molécula orgánica y mezclas compuestas de ellas **caracterizado** por la medida de la variación de la intensidad de la fluorescencia que provoca la interacción ión-dipolo inducido al adicionar la molécula orgánica que se quiera detectar a cualquier catión orgánico, fluorescente y con carga igual o superior a la unidad, y, posteriormente, irradiar el conjunto con luz en el rango ultravioleta o visible.

2. Procedimiento para la detección de cualquier molécula orgánica y mezclas compuestas de ellas según reivindicación 1, **caracterizado** por ser llevado a cabo en disolución, mediante adición del compuesto orgánico que se quiera detectar a una disolución de cualquier sal de cualquiera de los cationes definidos en 1.

3. Procedimiento para la detección de cualquier molécula orgánica y mezclas compuestas de ellas según reivindicación 1, **caracterizado** por su incorporación a cualquier tipo de sistema de cromatografía

líquida de alta eficacia (HPLC), por adición post-columna de una disolución de cualquier sal de cualquiera de los cationes descritos en 1.

4. Procedimiento para la detección de cualquier molécula orgánica y mezclas compuestas de ellas según reivindicación 1, **caracterizado** por su incorporación a cualquier tipo de sistema de cromatografía supercrítica, por adición post-columna de una disolución de cualquier sal de cualquiera de los cationes descritos en 1.

5. Procedimiento para la detección de cualquier molécula orgánica y mezclas compuestas de ellas según reivindicación 1, **caracterizado** por su incorporación a todo tipo de sistema de electroforesis, mediante pre o post impregnación con una disolución de cualquier sal de cualquiera de los cationes descritos en 1.

6. Procedimiento para la detección de cualquier molécula orgánica y mezclas compuestas de ellas según reivindicación 1, **caracterizado** por su incorporación a todo tipo de sistema de electrocromatografía, por adición post-columna de una disolución de cualquier sal de cualquiera de los cationes descritos en 1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

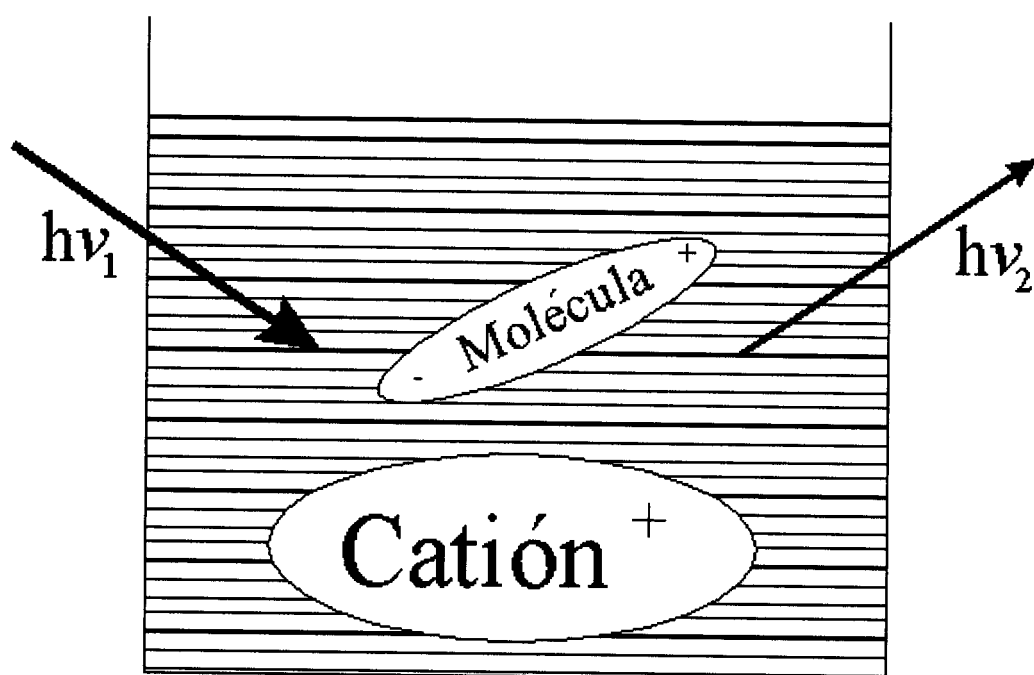


Figura 1

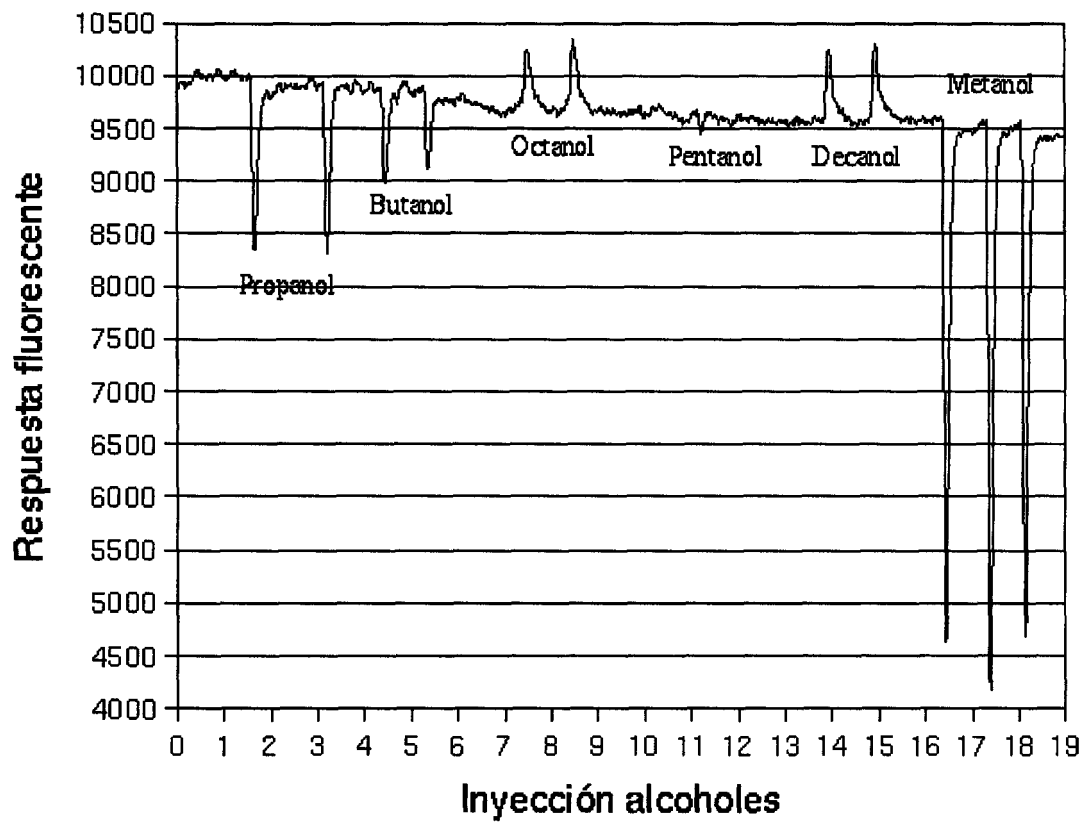


Figura 2

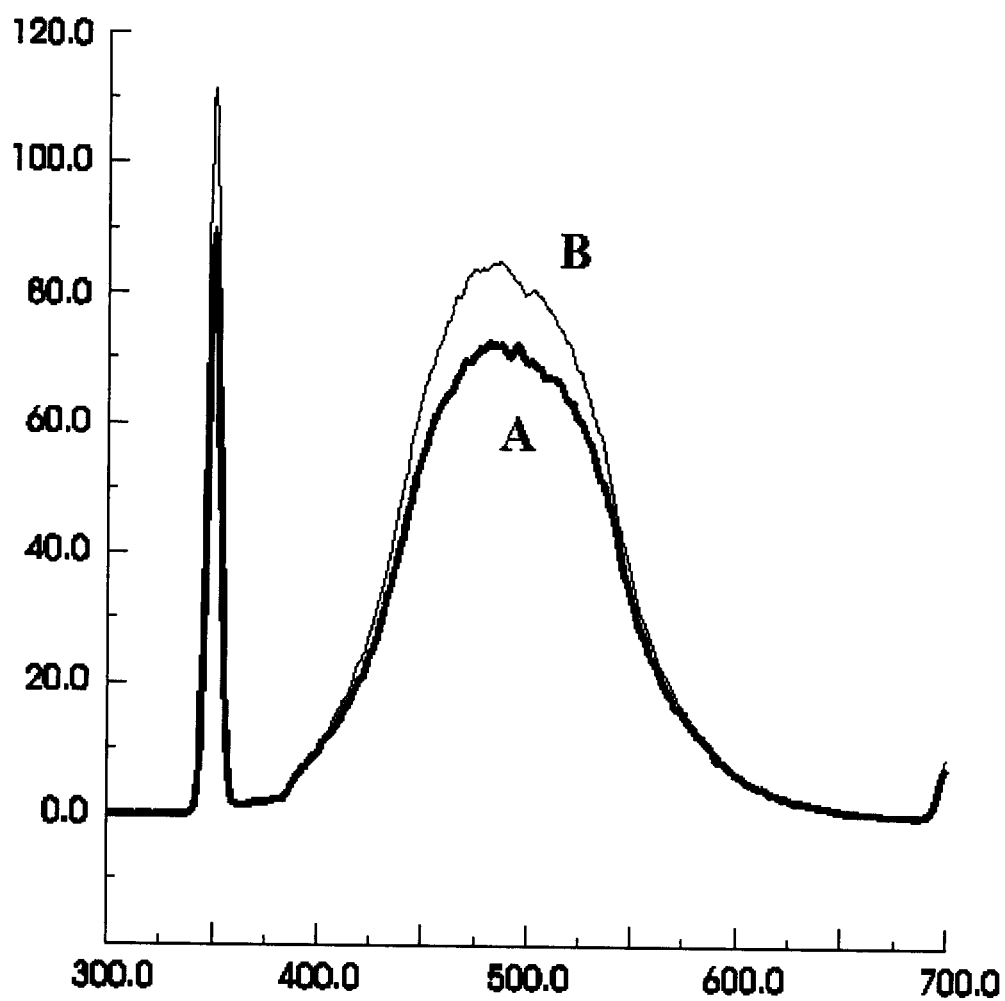


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 211 290

② Nº de solicitud: 200201377

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.06.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: G01N 21/64, 21/77

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CEBOLLA, V.L. et al. "Quantitative Applications of Fluorescence and Ultraviolet Scanning Densitometry for Compositional Analysis of Petroleum Products in Thin-Layer Cromatography". Journal of Cromatographic Science, Junio 1999, Vol. 37, páginas 219-226.	1,2,6
X	CEBOLLA, V.L. et al. "Enhancement of Fluorescence in Thin-Layer Cromatography Induced by the Interaction between n-Alkanes and Organic Cation". Anal. Chem., Abril 2000, Vol. 72, Nº 8, páginas 1759-1766.	1,2,6
X	CEBOLLA, V.L. et al. "Application of Thin-Layer Cromatography with Fluorescence Scanning Densitometry for Analysing Saturates in Heavy Liquids Derived from Co-pyrolisis of Biomass and Plastics". Cromatographia 2002, Enero 2002, Vol. 55, Nº 1/2, páginas 87-93.	1,2,6
X	LEONARD, K.M. "Development of a fiber-optic chemical sensor for multicontaminant monitoring of environmental systems". SENSORS AND ACTUATORS B, Abril 1995, Vol. 24-25, páginas 458-461.	1-3,6
X	MIKIHITO SAITO et al. "2-(5-Hydrazinocarbonyl-2-oxazolyl)-5,6-dimethoxybenzothiazole as a precolumn fluorescence derivatization reagent for carboxylic acids in high-performance liquid cromatography and its application to the assay of fatty acids in human serum". JOURNAL OF CROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL APPLICATIONS. Diciembre 1995, Vol. 674, páginas 167-175.	1,2,4,6
X	US 5759374 A (TAKAHASI et al.) 02.06.1998, columna 2, líneas 10-51; ejemplos 2,5,8.	1,2,5,6

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

03.05.2004

Examinador

V. Balmaseda Valencia

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 211 290

② Nº de solicitud: 200201377

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.06.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: G01N 21/64, 21/77

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5879528 A (YEUNG et al.) 09.03.1999, todo el documento.	1,5,6

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

03.05.2004

Examinador

V. Balmaseda Valencia

Página

2/2