



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 320 718**

② Número de solicitud: 200703122

⑤ Int. Cl.:

G01N 27/26 (2006.01)

G01J 3/00 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23J 3/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **26.11.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2009**

Fecha de la concesión: **15.02.2010**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **03.03.2010**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
03.03.2010

⑦ Titular/es: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑧ Inventor/es: **Sánchez Hernández, Laura;
Castro Puyana, María;
García Ruiz, Carmen;
Crego Navazo, Antonio Luis y
Marina Alegre, María Luisa**

⑨ Agente: **No consta**

④ Título: **Procedimiento para la identificación y cuantificación de los enantiómeros del aminoácido no proteico carnitina en alimentos por Electroforesis Capilar acoplada a Espectrometría de Masas.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la identificación y cuantificación de los enantiómeros del aminoácido no proteico carnitina en alimentos por Electroforesis Capilar acoplada a Espectrometría de Masas.

El objetivo de la invención es el desarrollo de un procedimiento analítico quiral por Electroforesis Capilar (CE) acoplada a Espectrometría de Masas (MS) que permita determinar de forma fidedigna cada uno de los enantiómeros del aminoácido no proteico carnitina (L- y D-carnitina) en alimentos.

La invención consiste en una separación electroforética utilizando la ciclodextrina Succinil- γ -ciclodextrina (Succ- γ -CD, grado de sustitución 4) en tampón formiato a pH 2.5 seguida de una detección al final del capilar por MS2 (384 · 179 m/z) empleando un líquido envolvente compuesto por isopropanol: agua (50/50 v/v) con 0.1 % (p/v) ácido fórmico a 3.3 μ L/min; un potencial de electronebulización de 4.5 kV; una presión de nebulización y un flujo del gas de secado de 2 psi y de 5 L/min, respectivamente; una temperatura de 300°C; un voltaje de fragmentación de 86.7 V y una amplitud de fragmentación de 1.20 V.

ES 2 320 718 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la identificación y cuantificación de los enantiómeros del aminoácido no proteico carnitina en alimentos por Electroforesis Capilar acoplada a Espectrometría de Masas.

El procedimiento analítico propuesto permite la identificación inequívoca y la cuantificación de los enantiómeros del aminoácido no proteico carnitina en alimentos. La técnica empleada ha sido la Electroforesis Capilar (CE) acoplada a la detección por Espectrometría de Masas (MS), utilizando una pequeña concentración de ciclodextrina como selector quiral. Teniendo en cuenta que la D-carnitina presenta un efecto tóxico en la salud, debido a que en procesos bioquímicos causa la inhibición de la enzima carnitina aciltransferasa, este procedimiento supone un gran avance por la posibilidad de determinar cada uno de los enantiómeros de carnitina por separado y así poder establecer la pureza óptica de L-carnitina en alimentos con el fin de evaluar la seguridad y calidad de los mismos. Asimismo, el procedimiento propuesto podrá ser utilizado para evitar fraudes económicos, ya que el empleo de L-carnitina aumenta el coste de producción respecto a la utilización de la mezcla racémica del compuesto que es más económica.

Estado de la técnica

La carnitina es un aminoácido no proteico presente en los seres humanos por vías endógenas y exógenas, puesto que se genera *in vivo* por rutas biosintéticas a partir de lisina o metionina, o se ingiere en la dieta, siendo los productos cárnicos la mejor fuente de carnitina, mientras los lácteos, el marisco y el pescado tienen un bajo contenido, y los vegetales son los que presentan el menor contenido [1]. La adición de carnitina en alimentos ha de ser controlada debido a que es un compuesto quiral cuyas dos formas enantioméricas presentan una actividad biológica muy diferenciada. La L-carnitina, es imprescindible para la producción de energía a partir del metabolismo de ácidos grasos [2]; sin embargo, la D-carnitina inhibe la enzima carnitina aciltransferasa reduciendo los niveles de L-carnitina.

Los métodos desarrollados hasta el momento para la separación enantiomérica de carnitina únicamente se han aplicado en la industria farmacéutica, ya que en el campo de los alimentos sólo se han desarrollado métodos no quirales. En principio, el control de la pureza óptica de la L-carnitina en formulaciones farmacéuticas se llevaba a cabo fundamentalmente por aplicación de métodos de RMN [3] o con reacciones enzimáticas específicas [4], pero estas técnicas no permitían la detección de niveles de D-carnitina por debajo de un 1%. En los últimos años, se han desarrollado métodos donde se aplican técnicas de separación como la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) y CE.

En relación al empleo de HPLC, la separación de los enantiómeros de carnitina se ha llevado a cabo en base a dos estrategias, empleando columnas capilares con [5-7] y sin derivatización [8], o bien empleando un agente derivatizante quiral ((+)-[1-(9-fluorenil)etil]-clorofornato, FLEC) y una columna no quiral [9-11]. Estos métodos han sido aplicados sólo a muestras sencillas como patrones o formulaciones farmacéuticas llegando a detectar el enantiómero D a niveles entre 0.1 y 1% en tiempos inferiores a 30 min.

La CE utilizando ciclodextrinas como selectores quirales es, en la actualidad, una técnica con un gran potencial para la separación de los enantiómeros de un compuesto quiral. En este campo, hay trabajos descritos en la bibliografía en los que también se utiliza el reactivo (+)-FLEC para la separación de los enantiómeros de la carnitina mediante electroforesis capilar en zona (CZE) [9]. Sin embargo, el elevado coste de este agente derivatizante (50 mg ~ 350 €) llevó a buscar otras opciones. Así, Vogt y col., describieron la separación de los enantiómeros de la carnitina empleando el 9-fluorenilmetilclorofornato (FMOC) como agente derivatizante y añadiendo al tampón de separación un selector quiral (γ -CD), alcanzando una resolución enantiomérica de 1.3 con un tiempo de análisis de ~ 40 min [10]. Posteriormente, Vogt y Kiessing, demostraron que el orden de migración de los enantiómeros de la carnitina podía ser invertido cambiando el tipo de CD, de γ -CD a dimetil- β -CD (DM- β -CD), y empleando capilares neutros. El método desarrollado fue aplicado en formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas (plasma), obteniendo separaciones en tiempos de análisis mayores de 30 min y con valores de resolución menores de 1.5 [12]. La DM- β -CD fue también seleccionada como selector quiral por Mardones y col., para diseñar un sistema de inyección en flujo que permitiera integrar automáticamente "*en línea*" la derivatización de la carnitina con el FMOC al sistema de CE. En este caso la aplicación del método se llevó a cabo con muestras sintéticas, pero los tiempos de análisis seguían siendo elevados (> 40 min) y las resoluciones a línea base ($R_s \sim 1.5$) [13]. Finalmente, se ha descrito recientemente en la bibliografía el empleo de un sistema dual de selectores quirales, un nuevo éter corona y sulfatada- β -CD (grado de sustitución, 3-4), para la separación de los enantiómeros de una muestra patrón de carnitina derivatizada con bromuro de 4-bromofenacilo. Con este sistema dual de éter y CD se consigue la separación de la carnitina a línea base en ~10 min [14].

Finalmente, hay que destacar que en los métodos de análisis quiral de carnitina descritos hasta el momento se ha empleado un sistema de detección por absorción UV, el cual al no ser específico no permite confirmar de forma inequívoca la identificación de la carnitina en las muestras analizadas.

Teniendo en cuenta las limitaciones descritas en la bibliografía para la determinación enantiomérica de la carnitina, y que en ningún caso se describe su cuantificación en alimentos, donde hay un gran número de muestras que contienen dicho aminoácido, tales como suplementos para deportistas, productos dietéticos para quemar grasas o muestras de leche infantiles, nuestra invención supone un nuevo procedimiento de análisis quiral de carnitina en alimentos funcionales.

Descripción de la invención

El procedimiento para la identificación enantioselectiva del aminoácido no proteico carnitina por CE-MS utilizando una CD como selector quiral se caracteriza por las condiciones experimentales tabuladas en la Tabla 1.

TABLA 1

Resumen de las condiciones experimentales del procedimiento de separación enantiomérica de Carnitina por CE-MS

CE	
Agente Derivatizante	9-Fluorenilmetilcloroformato (FMOC)
Tampón de separación	Formiato amónico 0.5 M a pH 2.5
Selector Quiral	0.2 % (p/v) succinil- γ -ciclodextrina (Succ- γ -CD, grado de sustitución de 4)
Capilar	Sílice fundida: 50 μ m de diámetro interno, 375 μ m de diámetro externo y 1 m de longitud total
Acondicionamiento	Acido fosfórico 0.1 M (1 bar, 2 min) Agua (1 bar, 2 min) Tampón de separación (1 bar, 2 min) Tampón de separación conteniendo Succ- γ -CD 0.2 % (p/v) (1 bar, 2 min)
Inyección de muestra	50 mbar - 12 s (patrones/muestras derivatizadas previamente)
Temperatura	25 °C
Voltaje	25 kV
MS ² (384 \rightarrow 179 m/z)	
Líquido envolvente	Isopropanol:agua (50:50 v/v) con 0.1 % (p/v) ácido fórmico a un flujo de 3.3 μ L/min
Potencial de electronebulización	4.5 kV
Presión de nebulización	2 psi
Flujo del gas de secado	5 L/min
Temperatura	300 °C
Número máximo de iones acumulados	50000
Tiempo máximo de acumulación de iones	300
Voltaje de fragmentación	86.7 V
Conductor de la trampa	38.0
Anchura de aislamiento	4 m/z
Amplitud de fragmentación	1.20 V
Límite de fragmentación	106 m/z

ES 2 320 718 B1

Ventajas principales del procedimiento

Las ventajas principales del procedimiento inventado son las siguientes:

- 5 - El procedimiento objeto de la invención es sencillo porque se alcanza la separación electroforética empleando una concentración muy pequeña de ciclodextrina como selector quiral, lo que ha permitido su introducción en el MS sin una pérdida apreciable de sensibilidad de detección.
- 10 - El procedimiento desarrollado permite identificar de forma inequívoca los enantiómeros de carnitina, siendo un método específico para dicha especie.
- 15 - El procedimiento inventado permite determinar el contenido de los enantiómeros de carnitina en alimentos, como por ejemplo leches infantiles, bebidas, galletas, barritas, etc., siendo una valiosa herramienta para los laboratorios de control de calidad porque posibilita determinar la presencia del enantiómero tóxico de carnitina (forma D).
- 20 - El procedimiento desarrollado no tiene interferencias de matriz lo que hace que sea un método suficientemente selectivo para permitir determinar los dos enantiómeros de carnitina en alimentos de mayor o menor complejidad empleando el método de calibrado del patrón externo.
- El procedimiento desarrollado permite separar los dos enantiómeros de carnitina en unos 30 min y con una resolución mayor de 3, que supera los valores obtenidos hasta ahora en otros trabajos bibliográficos.

25 En la Figura 1 se muestran los electroforegramas correspondientes a una disolución de una muestra de bebida de 20 $\mu\text{g/ml}$ que contiene carnitina y a la misma disolución de muestra enriquecida con el patrón racémico de 20 $\mu\text{g/ml}$. Se observa que sólo aparecen los picos correspondientes a los dos enantiómeros de carnitina (perfectamente separados, $R_s \sim 3$), por lo que el método es específico y no hay interferencias a la hora de identificar y cuantificar el analito de interés. Esta especificidad se observa para todas las muestras estudiadas. Para la identificación de los enantiómeros de carnitina se comparan los espectros de las muestras con los de las disoluciones patrón empleadas, teniendo en cuenta que D y L carnitina son enantiómeros, deben presentar el mismo espectro. La Figura 2 muestra la capacidad 30 identificativa del método, pudiéndose observar espectros idénticos para ambos compuestos.

Descripción de las figuras

35 Figura 1. Electroforegramas correspondientes a: (A) la separación de los enantiómeros de carnitina obtenida al inyectar una muestra de bebida de 20 $\mu\text{g/mL}$ comparada con (B) la separación de los enantiómeros de carnitina obtenida al inyectar la misma muestra que en A enriquecida en 20 $\mu\text{g/mL}$. Medio de separación: formiato amónico 0.5 M a pH 2.5 conteniendo 0.2% (p/v) de Succ- γ -CD. Condiciones electroforéticas: capilar de sílice fundida, 1 m \times 50 μm de diámetro interno; temperatura de separación, 25°C, voltaje aplicado, 25 kV; inyección, 50 mbar \times 12 s. 40 Condiciones MS: líquido envolvente, isopropanol:agua (50:50 v/v) con 0.1% (p/v) ácido fórmico; flujo de la bomba de jeringa, 3.3 $\mu\text{L/min}$. Potencial de electronebulización, 4.5 kV. Presión de nebulización y flujo del gas de secado, 2 psi y 5 L/min, respectivamente. Temperatura, 300°C; número máximo de iones acumulados, 50000; máximo tiempo de acumulación de iones 300 ms; fragmentador, 86.7 V y conductor de la trampa, 38.0. Modo MS² indicando como compuesto padre 384 m/z; anchura de aislamiento, 4 unidades de m/z; amplitud de fragmentación, 1.20 V y un límite de fragmentación de 106 m/z. 45

Figura 2. Identificación inequívoca del enantiómero D-carnitina por comparativa de su espectro con el de L-carnitina. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Figura 1.

Modo de realización

50 El procedimiento para la identificación enantioselectiva del aminoácido no proteico carnitina por CE-MS utilizando una CD como selector quiral se ha llevado a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE (equipado con un detector ultravioleta-visible (UV-Vis) de diodos en serie (DAD)) acoplado mediante una interfase ortogonal de electrospray a un espectrómetro de masas con trampa de iones. 55

Preparación de patrones y muestras

60 La preparación de las disoluciones patrón se realiza a partir de una disolución inicial de 1 mg/mL de D,L-carnitina que se diluye hasta la concentración requerida.

Se han empleado distintos tratamientos de muestra dependiendo de la complejidad de los alimentos analizados: (i) las bebidas o ampollas se homogeneizan y diluyen, si es necesario, previamente a tomar la alícuota para su derivatización; (ii) las galletas o barritas se trituran, se toma la cantidad necesaria para obtener una concentración de 0.4 mg/mL en agua, se centrifuga (5000 g a 15 min y 25°C) y se toma del sobrenadante 1 mL que se diluye 10 veces con agua Milli-Q previamente a tomar la alícuota para su derivatización; y (iii) para las muestras de leche infantiles, se toman 1.6 g y se añade agua Milli-Q hasta 10 g totales, esta suspensión se agita y sonica durante 5 min y se somete a una ultrafiltración (Filtros Amicon Ultra, 5 KDa, Millipore Corporation, Billerica, EEUU), centrifugando a 5000 g durante

ES 2 320 718 B1

una hora y 30 min a 25°C para recoger el líquido filtrado que se lleva a un volumen final de 10 mL previamente a tomar la alícuota para su derivatización.

Proceso de derivatización

El proceso de derivatización de la carnitina con el FMOC se realiza en base al protocolo establecido por Vogt y col. [10, 12] poniendo en contacto 50 μ L de una disolución de carnitina con 50 μ L de carbonato (50 mM, pH 10.4) y 130 μ L de la disolución del agente derivatizante (FMOC, 30 mM en acetona), preparada diariamente para evitar una preconcentración del FMOC por evaporación del disolvente. La disolución se mantiene en un baño de agua a 45°C durante una hora. Transcurrido ese tiempo, se añaden 150 μ L de acetato (50 mM, pH 4.2) para parar la reacción de derivatización, y tras agitar la muestra, se lleva a cabo su inyección en el sistema de CE-MS.

Características analíticas del procedimiento

Las características analíticas del procedimiento objeto de la invención se expresan en función de la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad instrumental, repetibilidad metodológica y exactitud para cada uno de los dos enantiómeros de carnitina. Los resultados obtenidos con el procedimiento inventado para el análisis quiral de carnitina por CE-MS se han tabulado en la Tabla 2.

TABLA 2

Características analíticas del procedimiento de separación enantiomérica de Carnitina por CE-MS

	Racémico: 0-120 mg/L	
Intervalo lineal de trabajo		Enantiómeros: 0-60 mg/L
Límites de detección (LOD)^a		$\sim 2 \times 10^{-8}$ M
Límites de cuantificación (LOQ)^a		$\sim 6 \times 10^{-8}$ M
Precisión	L-carnitina	D-carnitina
<i>Repetibilidad instrumental (n = 6)^b</i>		
80 mg/L racémico	A _c , RSD (%)	2.1
	t, RSD (%)	2.5
	2.3	2.3
<i>Repetibilidad metodológica (n = 18)^c</i>		
80 mg/L racémico	A _c , RSD (%)	8.0
	t, RSD (%)	10.0
	2.3	2.3
Exactitud^d	L-carnitina	D-carnitina
Recuperación (%)	97 \pm 6	91 \pm 7

^a Valores calculados a partir del electroforegrama (tratado con smooth = 1) obtenido para una muestra patrón diluida (65 ng/mL y S/R = 60) considerando una relación S/R = 3.29 para el LOD y S/R = 10 para el LOQ.

^b Expresada como RSD %, de las áreas corregidas ($A_c = A_i/t_i$ donde A_i corresponde al área y t_i al tiempo de migración del pico del enantiómero considerado) y los tiempos de migración (t) obtenidos al inyectar seis veces consecutivas una disolución patrón de concentración conocida en un mismo día.

^c Expresada como RSD %, de las áreas corregidas (A_c) y los tiempos de migración (t) obtenidos de seis disoluciones patrón preparadas de forma independiente e inyectadas por triplicado el mismo día.

^d Estimada como porcentaje de recuperación obtenido al comparar la cantidad determinada por el procedimiento de CE-MS² desarrollado con respecto a una cantidad añadida de carnitina patrón (20, 30 y 40 μ g/mL) en cinco muestras distintas (tres bebidas y dos galletas).

Características cuantitativas del procedimiento

El procedimiento de separación y determinación enantioselectiva inventado es aplicable a la cuantificación de los enantiómeros de carnitina en muestras de alimentos, habiendo sido ensayado principalmente para alimentos funcionales. La cuantificación se lleva a cabo utilizando el método de calibración del patrón externo con disoluciones diluidas obtenidas a partir de una disolución del compuesto racémico puro comercial (1 mg/mL), inyectando cada uno de los distintos niveles de calibrado por triplicado. Este método de calibración es aplicable porque se ha comprobado (mediante la comparación de las pendientes obtenidas para los métodos de calibrado del patrón externo y de las adiciones patrón) la ausencia de interferencias de matriz en distintas muestras de alimentos de diferente complejidad (bebidas, galletas y leches infantiles).

ES 2 320 718 B1

Para obtener la recta de calibrado se representan las áreas corregidas (A_c de cada uno de los picos de los enantiómeros de carnitina en función de la concentración inyectada de cada uno de ellos (c , 50% de la concentración total de carnitina en cada disolución). Para la determinación cuantitativa de los enantiómeros de carnitina en muestras de alimentos se inyectan las muestras el mismo día que se realiza la calibración metodológica.

5

Aplicación industrial

Tanto a los fabricantes como a la administración les interesa que existan procedimientos analíticos quirales que permitan el control de calidad y seguridad de las materias primas de L-carnitina y de los productos alimenticios que contienen o a los que se añade L-carnitina.

10

Bibliografía

[1] Demarquoy, J., Georges, B., Rigault, C., Royer, M. C., Clairet, A., Soty, M., Lekounougou, S., Le Borgne, F., *Food Chemistry*, 2004, 86, 137-142

15

[2] Bremen, J., *Physiol. Rev.*, 1983, 63, 1420

[3] Bounoure, J., Souppe, L., *The analyst*, 1991, 113, 1143

20

[4] Marzo, A., Cardace, G., Martelli, E., Arrifoni, E., *Chirality*, 1992, 4, 247

[5] Qi, M.L., Wang, P., Yang, J.J., *Chromatographia*, 2004, 59, 247-250

25

[6] Takahashi, M., Terashima, K., Nishijima, M., Kamata, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, 1579-1584

[7] Hirota, T., Minato, K., Ishii, K., Nishimura, N., Sato, T., *J. Chromatogr. A*, 1994, 673, 37-43

30

[8] D'Acquarica, I., Gasparrini, F., Misiti, D., Villani, C., Carotti, A., Cellamare, S., Muck, S., *J. Chromatogr. A*, 1999, 857, 145-155

[9] Dewitt, P., Deias, R., Muck, S., Galletti, B., Meloni, D., Celletti, P., Marzo, A., *J. Chromatogr. B*, 1994, 657, 67-73

35

[10] Vogt, C., Georgi, A., Werner, G., *Chromatographia*, 1995, 40, 287-295

[11] Freimuller, S., Altorfer, H., *J. Phar. Biomed. Anal.*, 2002, 30, 209-218

40

[12] Vogt, C., Kiessig, S., *J. Chromatogr. A*, 1996, 745, 53-60

[13] Mardones, C., Ríos, A., Valcárcel, M., Ciccirelli, R., *J. Chromatogr. A*, 1999, 849, 609-616

[14] Wang, C.Y., Wang, D.H., Long, T.H., Yu, Q.S., *J. Heterocyclic chemistry*, 2005, 42, 1043-1045

45

50

55

60

65

ES 2 320 718 B1

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de análisis quiral de carnitina **caracterizado** porque permite la separación, identificación y cuantificación de los enantiómeros de este aminoácido no proteico en alimentos por Electroforesis Capilar (CE) con acoplamiento a la detección por Espectrometría de Masas (MS) empleando una ciclodextrina como selector quiral.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque requiere diferente tratamiento de muestra, previamente a la derivatización de carnitina con FMOC según el protocolo establecido por Vogt y col., dependiendo de la complejidad del alimento funcional analizado:

(i) las bebidas o ampollas se homogeneizan y diluyen en los casos en que es necesario,

(ii) las galletas o barras se trituran, se toma la cantidad necesaria para obtener una concentración de 0.4 mg/mL en agua, se centrifuga (15 min a 5000 g y 25°C) y se toma del sobrenadante 1 mL que se diluye 10 veces con agua Milli-Q y

(iii) para las muestras de leche infantiles, se toman 1.6 g y se añade agua Milli-Q hasta 10 g totales, esta suspensión se agita y sonica durante 5 min y se somete a una ultrafiltración (Filtros Amicon Ultra, 5 KDa, Millipore Corporation, Billerica, EEUU) centrifugando a 5000 g durante una hora y 30 min a 25°C para recoger el líquido filtrado que se lleva a un volumen final de 10 mL añadiendo agua Milli-Q.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, que consiste en un medio de separación quiral para CE con fórmico 0.5 M ajustado a pH 2.5 con hidróxido amónico al 25% y conteniendo como selector quiral, una pequeña concentración (0.2% (p/v) o 1.25 mM) de succinil- γ -ciclodextrina (Succ- γ -CD, grado de sustitución 4).

4. Procedimiento, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque se realiza en un capilar de sílice fundida no recubierto de 50 μ m de diámetro interno y 375 μ m de diámetro externo con una longitud total de 1 m que debe acondicionarse con ácido fosfórico 0.1 M, agua, tampón (fórmico 0.5 M a pH 2.5) y tampón conteniendo Succ- γ -CD 0.2% (p/v), cada uno de ellos durante 2 min a un bar, previamente a la inyección de los patrones y muestras (50 mbar durante 12 s) y a la separación electroforética sumergiendo los extremos del capilar en tampón fórmico 0.5 M a pH 2.5.

5. Procedimiento, según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la separación electroforética de los enantiómeros de carnitina se realiza empleando una temperatura de 25°C y un voltaje de separación de 25 kV.

6. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se realiza una detección al final del capilar de separación. Las condiciones para la detección por espectrometría de masas (MS) consisten en el empleo de un líquido envolvente compuesto por isopropanol:agua (50:50 v/v) con 0.1% (p/v) de ácido fórmico a un flujo de 3.3 μ L/min; un potencial de electronebulización de 4.5 kV; una presión de nebulización y un flujo del gas de secado de 2 psi y de 5 L/min, respectivamente; una temperatura de 300°C; un número máximo de iones acumulados de 50000 y un tiempo máximo de acumulación de iones de 300 ms, un voltaje de fragmentación de 86.7 V y conductor de la trampa 38.0.

7. Procedimiento, según la reivindicación 6, **caracterizado** por el empleo de un modo de MS² para mejorar la sensibilidad y selectividad de detección seleccionando un ión precursor con una relación masa/carga (m/z) de 384 m/z (correspondiente al ión molecular del derivado de carnitina con FMOC) y un ión producto de 179 m/z, utilizando como parámetros importantes para la fragmentación un valor de anchura de aislamiento de 4 unidades de m/z, una amplitud de fragmentación de 1.20 V y un límite de fragmentación de 106 m/z.

8. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la identificación inequívoca de los enantiómeros D y L carnitina, que presentan espectros MS² idénticos, en alimentos.

9. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque permite la determinación cuantitativa de los enantiómeros D y L carnitina en alimentos.

Figura 1

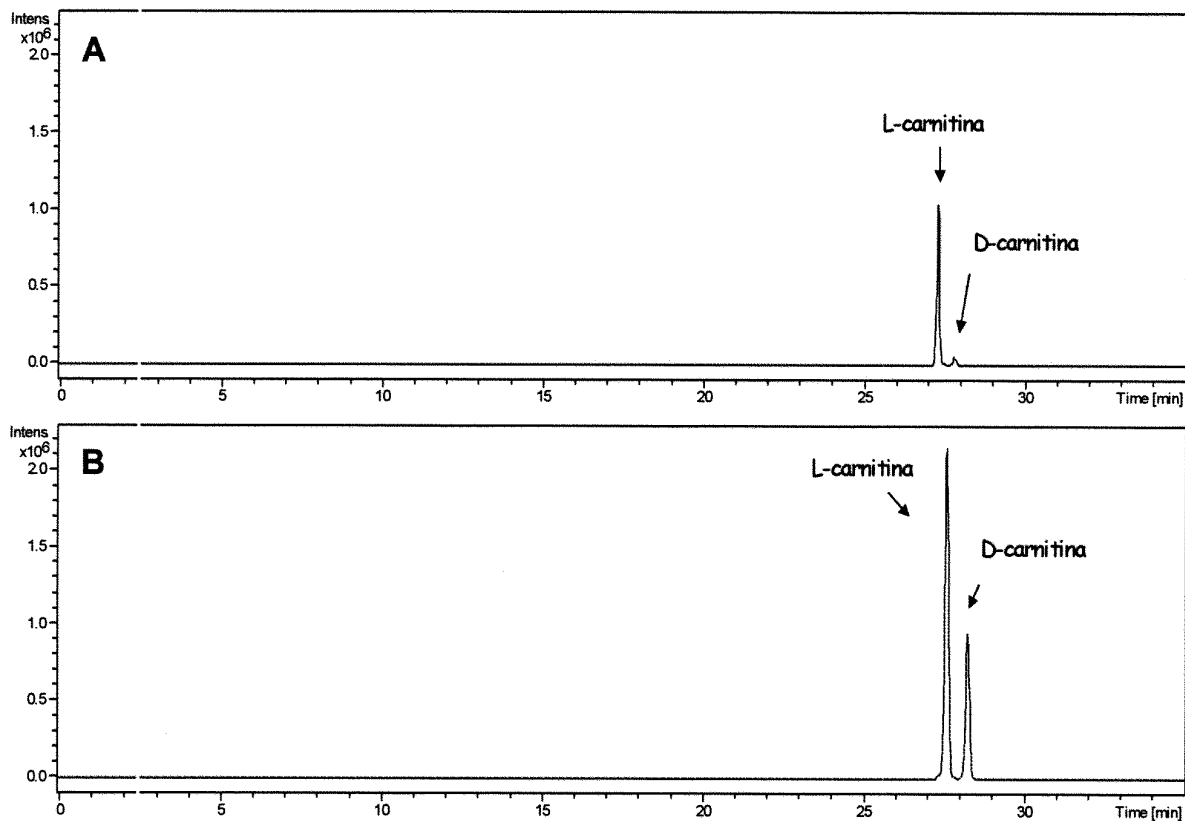
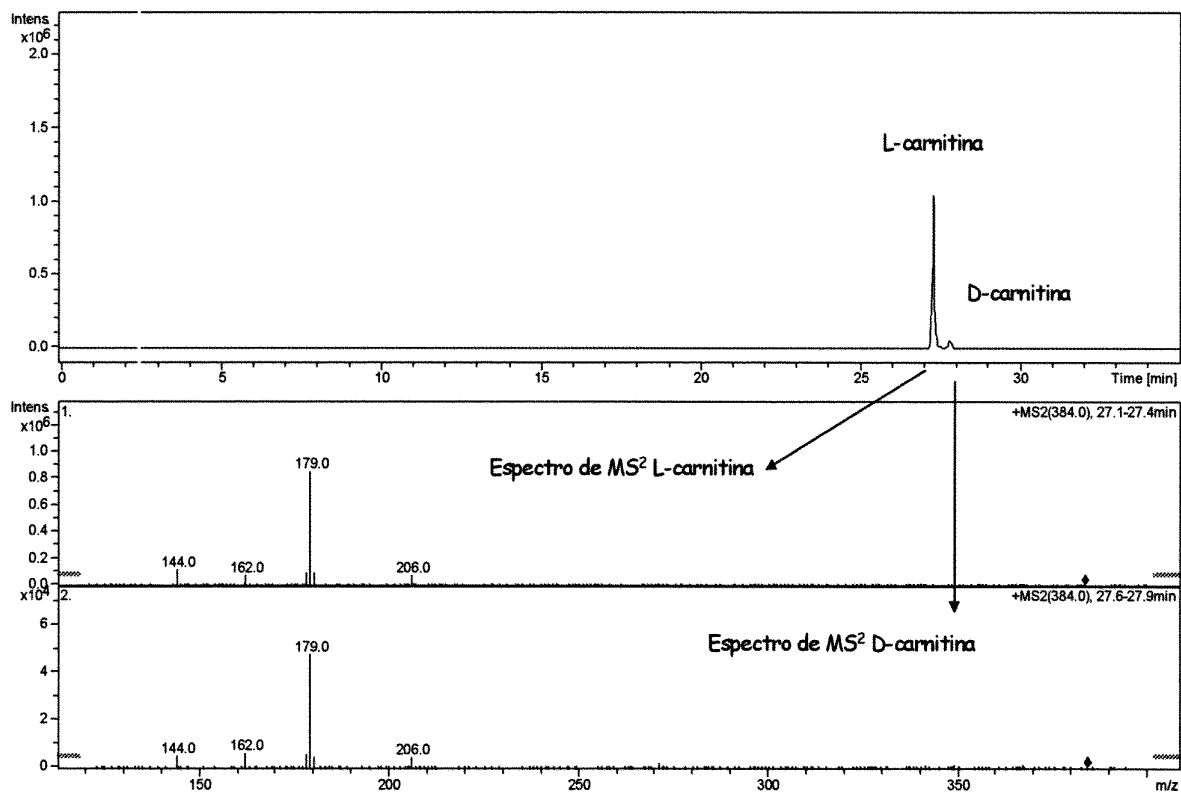


Figura 2





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 320 718

② Nº de solicitud: 200703122

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	C. VOGT, S. KIESSIG. Separation of D/L-Carnitine enantiomers by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography, 1996, Vol 745, páginas 53-60.	1-9
A	C. MARDONES, A. RIOS, M. VALCARCEL, R. CICCARELLI. Enantiomeric separation of D- and L- carnitine by integrating on-line derivatization with capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A. 1999, Vol 849, páginas 609-616.	1-9
A	C. VOGT, A. GEORGI, G. WERNER. Enantiomeric separation of D/L-carnitine using HPLC and CZE after derivatization. Chromatographia 1995, Vol 40, páginas 287-295.	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

25.03.2009

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 27/26 (2006.01)

G01J 3/00 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23J 3/00 (2006.01)

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

G01N, G01J, A23L, A23J

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, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.03.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SÍ
	Reivindicaciones	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	Journal of Chromatography	1996
D02	Journal of Chromatography	1999
D03	Chromatographia	1995

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 invención se refiere a un procedimiento de análisis quiral de carnitina que permite la separación, identificación y cuantificación de los enantiómeros en alimentos por electroforesis capilar con acoplamiento a la detección por espectrometría de masas, empleando ciclodextrina como selector quiral y FMOC (9-fluorenilmetilcloroformato) como agente derivatizante.

El documento D01 hace referencia a un método de electroforesis capilar para la determinación simultánea de D- y L- enantiómeros de carnitina. La separación mediante electroforesis capilar se llevo a cabo utilizando como agente de derivatización de carnitina el FMOC, como selector quiral distintos tipos de ciclodextrinas alfa, beta y gamma ciclodextrinas y tampones ácidos.

El documento D02 se refiere a un método de electroforesis capilar de zona para la separación y cuantificación de enantiómeros de D-, L- carnitina utilizando como agente derivatizante el FMOC en un sistema de flujo que permite integrar automáticamente en línea la derivación de la carnitina con FMOC al sistema de electroforesis capilar. Y como selector quiral alfa, beta y gamma ciclodextrinas.

El documento D03 hace referencia a un método de separación de D-/L- carnitina utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) y electroforesis capilar de zona. Utiliza como agente derivatizante el FMOC y como selector quiral gamma ciclodextrina.

Ninguno de los documentos D01-D03, solos o en combinación revelan un procedimiento de análisis quiral de carnitina que permita la separación de sus D-, L- enantiómeros en alimentos por electroforesis capilar con acoplamiento a la detección por espectrometría de masas. Por lo tanto el objeto de las reivindicaciones 1-9 cumple los requisitos de novedad, actividad inventiva y aplicación industrial de acuerdo con los Arts. 6, 8 y 9 de LP.