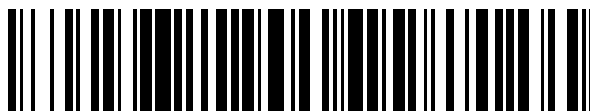


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 590**

21 Número de solicitud: 201030369

51 Int. Cl.:

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **12.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.07.2012

71 Solicitante/s:

**UNIVERSIDAD DE MURCIA
AVDA. TENIENTE FLORESTA S/N
30003 MURCIA, ES y
HERO ESPAÑA, S.A.**

72 Inventor/es:

**VIÑAS LÓPEZ-PELEGRÍN, PILAR;
CAMPILLO SEVA, NATALIA;
FÉREZ MELGAREJO, GEMA;
LÓPEZ GARCÍA, IGNACIO;
HERNÁNDEZ CÓRDOBA, MANUEL y
VASALLO MORILLAS, MARÍA ISABEL**

74 Agente/Representante:

de Elzaburu Márquez, Alberto

54 Título: **MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NUCLEÓTIDOS EN ALIMENTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE PARES IÓNICOS CON DETECCIÓN POR FOTODIODOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

57 Resumen:

Método de determinación de nucleótidos en alimentos mediante cromatografía líquida de pares iónicos con detección por fotodiodos acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización dual operando en modo negativo (HPLC/ESI-APCI-TOF-MS). El método permite la determinación rápida de los cinco nucleótidos monofosfato autorizados en alimentos infantiles (citidina 5-monofosfato, uridina 5-monofosfato, adenosina 5-monofosfato, inosina 5-monofosfato y guanósina 5-monofosfato), y comprende la precipitación previa de las proteínas de los alimentos y el análisis directo de los nucleótidos en el extracto resultante por HPLC de pares iónicos usando elución isocrática. La recuperación obtenida para muestras fortificadas fue satisfactoria para todos los analitos. El procedimiento propuesto permite la determinación de los únicos nucleótidos autorizados y se ha aplicado con éxito al análisis de diferentes muestras de alimentos infantiles y funcionales, tales como purés, cereales y potitos.

ES 2 385 590 A1

DESCRIPCIÓN

**MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE NUCLEÓTICOS EN ALIMENTOS
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE PARES IÓNICOS CON
DETECCIÓN POR FOTODIODOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE
MASAS**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la determinación de nucleótidos en alimentos, particularmente en alimentos infantiles, mediante la precipitación de las proteínas de la muestra y la determinación de los nucleótidos en el extracto
10 resultante mediante cromatografía líquida (HPLC) de pares iónicos con detección por fotodiodos (DAD) acoplada a espectrometría de masas (MS).

INTRODUCCIÓN

Los nucleótidos son monómeros constituidos por un grupo fosfato, un azúcar
15 de cinco átomos de carbono (ribosa o deoxiribosa) y uno o dos anillos de una base que contiene nitrógeno. Son parte esencial de los ácidos nucleicos, quizás los constituyentes fundamentales y más importantes de las células [1]. Se han reconocido como elementos importantes en la nutrición de los mamíferos especialmente durante períodos de crecimiento rápido o estrés
20 fisiológico, y además juegan un papel crucial en la función eficiente del sistema inmunológico. Muchos tejidos no son capaces de sintetizar los nucleótidos y los hombres deben incorporarlos a través de la dieta [2]. En muchos procesos bioquímicos, los nucleótidos primarios monofosfato se usan para producir metabolitos intermedios a través de una serie de reacciones enzimáticas. La
25 adición de nucleótidos primarios a la dieta proporciona una fuente real en la síntesis de intermediarios.

Los nucleótidos se encuentran abundantemente en la leche humana y cuando la lactancia materna no es posible, se recomienda una fórmula enriquecida.
30 Para gente joven sana, su ingesta a través de la dieta es suficiente; sin embargo, en la mayoría de los alimentos, las cantidades de nucleótidos útiles son muy bajas comparadas con sus necesidades. Todos los ingredientes de origen animal y vegetal que contienen material celular son fuentes potenciales, usualmente en forma de nucleoproteínas. El contenido es particularmente elevado en

- ingredientes tales como proteínas solubles de origen animal, legumbres y extractos de levadura. El contenido, proporción y disponibilidad difiere entre ellos. El músculo es una fuente pobre de nucleótidos, al igual que las semillas, soja, cereales, frutas, verduras y productos procesados de la leche [3]. Entre
- 5 las fuentes de origen marino, las anchoas y sardinas, por ejemplo, tienen niveles muy altos de guanina. La disponibilidad también es un factor muy importante. Las proteínas solubles de pescado y origen animal son altamente digestivas y afectan la disponibilidad total [4].
- 10 Hay un gran interés sobre la importancia de los nucleótidos de la dieta en la nutrición infantil. Los alimentos infantiles combinan una gran variedad de matrices [5]: alimentos no grasos basados en frutas y verduras (contenido de
- 15 grasas inferior al 2%), alimentos grasos basados en carne/huevos/queso y alimentos basados en cereales con diferentes contenidos de grasa. Ya que los alimentos derivados de las plantas y de la leche tienen escasos contenidos de
- 20 nucleótidos, la suplementación con la dieta puede ser de particular interés para los niños que no sólo se alimentan de leche. Los nucleótidos permitidos en las fórmulas infantiles son cinco compuestos, citidina 5'-monofosfato (CMP), uridina 5'-monofosfato (UMP), adenosina 5'-monofosfato (AMP), guanosina 5'-
- monofosfato (GMP) e inosina 5'-monofosfato (IMP) [6]. Sin embargo, no existe información sobre los niveles de nucleótidos en algunos alimentos infantiles tales como cereales y purés y tampoco hay niveles establecidos para el
- suplemento de los alimentos infantiles.
- 25 Los nucleótidos son compuestos inestables y relativamente no volátiles y el método utilizado generalmente para su análisis en alimentos ha sido HPLC. Sin embargo, su separación se lleva a cabo generalmente mediante intercambio
- 30 aniónico o fase reversa con pares de iones, debido a que tienen una elevada polaridad y naturaleza aniónica. Así, se han propuesto diferentes métodos mediante HPLC para la separación y determinación de los nucleótidos en fórmulas infantiles o matrices biológicas [7-36] usando distintos sistemas de detección, fundamentalmente DAD y MS. No obstante, en los alimentos no suplementados (tales como ciertos alimentos infantiles), los niveles de nucleótidos son muy bajos y, al ser la matriz muy compleja, los métodos

existentes presentan un problema de falta de sensibilidad y de seguridad en la identificación de los nucleótidos con total certeza.

5 En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de un método de determinación de los cinco nucleótidos autorizados en alimentos infantiles, a saber 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-AMP, 5'-GMP y 5'-IMP, que tenga una elevada sensibilidad para dichos nucleótidos además de una elevada seguridad en la identificación de los mismos.

10 Este problema ha sido resuelto en el método de la invención a través de una primera etapa de precipitación de las proteínas de la muestra seguida por el análisis del extracto mediante acoplamiento de HPLC de pares iónicos con detección por fotodiodos (DAD) acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS) con dual electrospray e ionización química a presión
15 atmosférica (HPLC/ESI-APCI-TOF-MS). En particular, el uso del reactivo volátil formador de pares de iones N,N-dimetilhexilamina (DMHA) ha permitido mejorar la compatibilidad de HPLC de pares iónicos con ESI-APCI-TOF-MS. Hasta el conocimiento de los inventores, este es el primer estudio en el que se han determinado rápidamente los cinco nucleótidos autorizados en una gran
20 variedad de alimentos infantiles y/o funcionales tales como cereales y purés, sin y con suplementación.

En consecuencia, un primer aspecto de la invención se dirige a un método de determinación en un alimento de al menos un nucleótido seleccionado del
25 grupo que consiste en: monofosfato citidina 5'-monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, inosina 5'-monofosfato y guanosina 5'-monofosfato, sólo o en cualquier combinación entre ellos, caracterizado porque comprende las etapas de:

- 30 a) precipitar las proteínas del alimento con ácido acético o ácido tricloroacético y a continuación separar el precipitado, obteniendo un extracto;
- b) someter el extracto obtenido a cromatografía líquida (HPLC) de pares iónicos con detección por fotodiodos acoplada a

espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización dual ESI-APCI operando en modo negativo, caracterizado porque la fase móvil del sistema HPLC comprende N,N-dimetilhexilamina (DMHA) a una concentración entre 5 y 25 mM como reactivo formador de pares de iones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1. Cromatogramas obtenidos para una mezcla de nucleótidos estándar de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ usando HPLC de pares iónicos. A: Cromatograma mediante HPLC/DAD a 260 nm; B-F: Cromatogramas de los iones extraídos mediante HPLC/ESI-APCI-TOF-MS mostrando los espectros de los compuestos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION.

15 1. Instrumentación utilizada

El sistema HPLC es Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) compuesto por una bomba binaria (G1312A) operando con una velocidad de flujo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent G1379A). La columna se mantuvo en un compartimento termostataado a temperatura ambiente (Agilent G1316A). El detector de diodos es Agilent G1315D operando a tres longitudes de onda: 252, 260 y 271 nm. La separación se llevó a cabo en una columna Gemini®-NX $5 \mu\text{m C18}$ (150 x 4.6 mm), que proporcionó elevada eficiencia y resistencia mecánica en un intervalo de pH muy amplio de 1-12. La inyección ($40 \mu\text{L}$) se llevó a cabo con un automuestreador (Agilent G1329A). El sistema HPLC se acopló a un espectrómetro de masas TOF/Q-TOF (Agilent 6220) equipado con una interfase dual ESI-APCI. Las disoluciones se almacenaron en viales de vidrio de color ámbar de 2 o 10 mL. Para la extracción de las muestras se utilizó una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) y un baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona, Spain).

2. Reactivos

Se utilizó acetonitrilo y metanol grado reactivo de Lab-Scan (Dublin, Ireland). El agua desionizada se obtuvo con un sistema de purificación Milli-Q (Millipore,

Bedford, MA, USA). Los nucleótidos comerciales 5'-monofosfato, 5'-CMP, 5'-AMP, 5'-GMP, 5'-IMP y 5'-UMP, se obtuvieron como sales sódicas de Sigma (St. Louis, MO, USA). Las disoluciones concentradas ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) se prepararon disolviendo los productos comerciales, sin purificación previa, en agua. Todos se mantuvieron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en botellas oscuras cerradas con tapones de PTFE/silicona. Las disoluciones estándar de trabajo se prepararon diariamente diluyendo con agua. Otros reactivos utilizados fueron formiato sódico, DMHA y ácido tricloroacético (Sigma).

10 3. *Muestras*

Las muestras de diferentes tipos de alimentos infantiles y/o funcionales fueron suministradas por la empresa Hero España, S.A. en forma de purés o potitos (desde 4 meses de edad) que contenían verduras, carne, pescado y frutas, alimentos preparados (desde 12 meses de edad) de carne con verduras, lentejas, potaje de garbanzos y spaguetti y cereales infantiles (multicereales con miel y con cacao). Por otra parte, se llevó a cabo un estudio sobre la estabilidad de los nucleótidos en muestras con yogur pasteurizado y fórmulas de seguimiento durante un período de 6 meses en dos condiciones experimentales diferentes: a temperatura ambiente y a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Los estudios de recuperación se llevaron a cabo usando muestras fortificadas con una mezcla estándar de los nucleótidos. Las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante al menos media hora antes de realizar el procedimiento de extracción.

25 4. *Procedimiento analítico*

Las muestras se prepararon pesando 1 g del alimento infantil en tubos de centrífuga de 10-mL y diluyendo con 2 mL de agua. Entonces se añadió 1 mL de ácido tricloroacético al 3% m/v y la muestra se llevó a 5 mL, lo que suponía una concentración final de 0,6% m/v, y entonces se dejó reposar durante 15 min para conseguir precipitar las proteínas. A continuación se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se recogió y se diluyó a 5 mL con agua en un matraz aforado. Se filtraron alícuotas a través de filtros de jeringa de $0,45 \mu\text{m}$ de difluoruro de polivinilideno (PVDF) con carcasa de polipropileno y se inyectaron $40 \mu\text{L}$ en el cromatógrafo usando los viales

ámbar del automuestreador. La fase móvil en condiciones isocráticas fue una mezcla de disolución reguladora de formiato 0,1 M (pH 5,5) al 95 % (v/v) que contenía DMHA 0,01 M y metanol al 5 % (v/v). La velocidad de flujo fue 0,7 mL min⁻¹. La detección UV-vis se llevó a cabo en el intervalo 190–450 nm y el detector de diodos se utilizó a las longitudes de onda de 252 nm para 5'-GMP y 5'-IMP, 260 nm para 5'-AMP y 5'-UMP y 271 nm para 5'-CMP. Los análisis se realizaron por triplicado.

5. *Detección ESI-APCI-TOF-MS*

El sistema HPLC (0,7 mL min⁻¹) se acopló a un equipo TOF-MS con una interfase dual ESI-APCI operando en modo negativo y usando un voltaje capilar de +1 kV. Los demás parámetros óptimos del ESI-TOF fueron: temperatura del gas de secado, 350 °C; flujo del gas de secado, 11 L min⁻¹ y presión del gas nebulizador, 58 psi. La detección se llevó a cabo considerando un intervalo de masas de 50–600 *m/z*. Los datos de masa exacta de los iones moleculares fueron procesados utilizando el software Mass Hunter considerando el nivel de exactitud ampliamente aceptado para confirmación de la composición elemental a 5 ppm. Durante del desarrollo del método HPLC, se realizó calibración externa del instrumento. La disolución de calibración se inyectó al principio de cada tanda y todos los espectros fueron calibrados antes de la identificación del compuesto.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

25 1. *Separación HPLC*

Los nucleótidos tienen un carácter ácido fuerte como consecuencia de la disociación de los grupos fosfato en disolución acuosa. Generalmente, tienen carga negativa ya que sus valores de pK son inferiores a 7. Los nucleótidos ionizados tienen una polaridad más elevada que las especies neutras y son retenidos en menor extensión, lo que puede atribuirse a su débil interacción con la fase estacionaria hidrofóbica y a su mayor afinidad por la fase móvil acuosa. Las especies ionizadas también tienen interacciones iónicas con los grupos silanol activados, lo que perjudica la forma del pico y la reproducibilidad. Se ensayó en primer lugar la cromatografía de fase reversa usando columnas

C₁₈ como Zorbax Eclipse XDB y Discovery HS. Las fases móviles fueron mezclas de diferentes disoluciones reguladoras como formiato (10 mM, pH 3-5), fosfato (50 mM, pH 7) o Bis-Tris (10 mM, pH 7) en ausencia y en presencia de metanol hasta el 60 % v/v. Sin embargo, debido a su naturaleza polar, los nucleótidos no se retuvieron en las columnas en ninguna condición experimental. La acidificación de la fase móvil para neutralizar los grupos silanol es una práctica común para reducir interacciones secundarias y disminuir la ionización de los analitos, favoreciendo la interacción con la fase estacionaria. Así, se ensayó una fase móvil de pH 2 que contenía ácido acético (2 % v/v) y metanol (0-40 % v/v), pero los resultados no fueron satisfactorios y la técnica de fase reversa fue desechada.

Para aumentar la retención de los nucleótidos, se seleccionó la cromatografía de pares iónicos (IPC). La naturaleza iónica de los ésteres fosfato facilitó las interacciones fuertes con reactivos de pares de iones catiónicos a valores de pH apropiados, aumentando así la retención y la resolución. Con el empleo de la técnica HPLC/MS, la resolución de la columna con disoluciones reguladoras volátiles es crítica. Se ha seleccionado una columna Gemini®-NX 5 µm C₁₈, que es capaz de tolerar cambios en el pH de la fase móvil de 1-12, suministrando una alta eficiencia y resistencia mecánica sin degradación de la columna. Como los nucleótidos están cargados negativamente, la superficie del empaquetamiento C₁₈ se recubrió de moléculas adsorbidas de un reactivo de pares de iones positivo y la carga del reactivo se enlazó a la fase estacionaria. Se ensayaron diferentes reactivos. El par de bandas crítico para esta separación fue 5'-GMP y 5'-IMP. Cuando se utilizaron los reactivos hidróxido de tetrapropilamonio e hidróxido de tetrabutylamonio se obtuvo muy mala resolución para dicha banda. Por otra parte, estos reactivos no volátiles no son compatibles con la detección por MS. En consecuencia, se ensayó un reactivo volátil N,N-dimetilhexilamina para originar mínima interferencia con MS y separación adecuada. Es muy frecuente que la influencia de la concentración del reactivo formador de pares de iones tenga efectos opuestos sobre las técnicas HPLC y MS; así, se modificó la retención de los nucleótidos variando la concentración del reactivo en la fase móvil entre 5 y 25 mM. La retención alcanzó un máximo a una concentración 20 mM. Por otra parte, el

acoplamiento HPLC/MS sólo puede tener éxito si la fase móvil permite que se genere suficiente analito ionizado en fase gaseosa. Sin embargo, a esta concentración tan alta de reactivo, la detección por MS es difícil ya que la señal de fondo es muy alta y no reproducible. Por tanto, se seleccionó una
5 concentración 10 mM que mejora el balance de buena separación y sensibilidad de MS.

Se estudió el efecto del pH de la fase móvil en el intervalo 2-8 sobre los tiempos de retención y la forma de los picos. A pH 2-4, los nucleótidos, que
10 están predominantemente como especies ionizadas, disminuyen su retención. A pH 5-6 están en forma neutra y exhiben más retención, mientras que permanecen sin carga hasta pH 8. Por tanto, se seleccionó un valor de pH 5,5 que da la mejor resolución y formas apropiadas de los picos. La influencia de la concentración de la disolución reguladora de formiato se estudió entre 20 y 100
15 mM y un aumento de la concentración se traduce en la disminución de la retención. Se seleccionó una concentración 100 mM.

Los modificadores orgánicos tales como metanol o acetonitrilo añadidos a la reguladora pueden mejorar la resolución. Se ensayaron cambios en el
20 porcentaje de metanol entre 0 y 15 % v/v con objeto de modificar la retención y el espaciado de las bandas. Un aumento del porcentaje de metanol reduce la retención de todos los compuestos y la resolución entre las dos bandas de 5'-GMP y 5'-IMP, ya que disminuye la adsorción del reactivo formador de pares de iones en la fase estacionaria y esto provoca la reducción en la retención de
25 los nucleótidos iónicos. La mejor separación se obtuvo con una fase móvil que contenía metanol 5 % v/v.

2. *Detección mediante ESI-APCI-TOF-MS*

ESI es un método de ionización más débil que APCI, y normalmente se utiliza
30 para diferentes compuestos polares. Por tanto, se ha seleccionado el modo de ionización dual ESI-APCI que es aplicable a una gran variedad de compuestos. La supresión de ionización es un fenómeno complejo asociado con detección MS que puede ser atribuido a desprotonación, presencia de componentes no volátiles y, en muestras complejas, cantidades grandes de especies

compitiendo con los iones disponibles. Así, la supresión de la ionización se evaluó aplicando los dos modos de operación, positivo y negativo. En modo positivo, los espectros producidos son más complejos, con gran interferencia de fondo del ión DMHA protonado; mientras que en modo negativo, las intensidades de los iones moleculares negativos fueron generalmente más fuertes y con menor señal de fondo. Por tanto, no se consideró la operación en modo positivo ya que el propio DMHA produjo una señal muy fuerte que suprimió otros iones positivos, siendo seleccionado el modo de ionización negativo que dio sensibilidad más alta. La Figura 1 muestra el cromatograma UV obtenido a 260 nm para una mezcla de los cinco estándares de los nucleótidos y los cromatogramas de los iones extraídos mediante HPLC/ESI-APCI-TOF-MS.

La Tabla 1 resume los tiempos de retención, las bandas UV y los datos TOF-MS incluyendo los valores m/z experimentales y calculados para las fórmulas moleculares proporcionadas, error, la fórmula molecular y los compuestos identificados. Todos los nucleótidos se identificaron interpretando los espectros de masas obtenidos por ESI-APCI-TOF-MS considerando la fórmula molecular proporcionada y su masa exacta y los espectros de absorción en la región UV. Los espectros representativos TOF-MS de los compuestos se muestran también en la Fig. 1.

Tabla 1. Datos TOF-MS y bandas UV para los nucleótidos

Pico	t_R (min)	λ_{max} (nm)	m/z Experimental	m/z Calculado	Error (ppm)	Fórmula molecular	Compuesto
1	3.75	271	322.0437	322.0446	2.56	$C_9H_{14}N_3O_8P$	5'-CMP
2	4.77	260	323.0293	323.0286	-2.04	$C_9H_{13}N_2O_9P$	5'-UMP
3	6.81	252	362.0510	362.0507	-0.80	$C_{10}H_{14}N_5O_8P$	5'-GMP
4	7.04	252	347.0390	347.0398	2.30	$C_{10}H_{13}N_5O_7P$	5'-IMP
5	14.36	260	346.0543	346.0558	4.46	$C_{10}H_{14}N_5O_7P$	5'-AMP

3. Datos analíticos y validación

Se validó la linealidad, límite de detección, selectividad, exactitud y precisión del método. Las curvas de calibrado se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal representando área de pico frente a concentración de analito

usando seis niveles de concentración. La cuantificación se llevó a cabo por el método de estándar externo. Los parámetros de validación, coeficientes de correlación y el intervalo de linealidad para los nucleótidos se muestran en la Tabla 2. Los valores de r^2 fueron buenos ($r^2 > 0,99$) y se obtuvo excelente linealidad en todo el intervalo estudiado. Los límites de detección se calcularon en base a tres veces la desviación estándar de la ordenada en el origen de las gráficas de calibrado y los límites de cuantificación usando diez veces la desviación estándar de la ordenada en el origen. La Tabla 2 también muestra estos valores. Para comprobar la repetitividad del método, se llevaron a cabo diez análisis idénticos de una muestra de leche fermentada; los valores de R.S.D. se encontraron entre 2,1 y 6,8 %. Estos valores indicaron que la precisión del método es satisfactoria para análisis de control.

Se consiguió una gran selectividad del método debido a la alta resolución y las medidas de masa exacta de LC/TOF-MS. La identificación se llevó a cabo usando el nivel de exactitud ampliamente aceptado para confirmación de composición elemental como una tolerancia de 5 ppm. No aparecieron picos de impurezas a los tiempos de retención correspondientes a los nucleótidos.

Tabla 2. Datos analíticos para los nucleótidos usando HPLC de pares iónicos

Analito	Pendiente (mL μg^{-1})	Coefficiente correlación	Linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Límite de detección (ng mL $^{-1}$)	Límite de cuantificación (ng mL $^{-1}$)
HPLC-DAD					
5'-CMP	31	0.9972	0.02-5	6.3	21
5'-UMP	30	0.9964	0.02-5	5.5	18
5'-GMP	33	0.9992	0.02-5	4.5	15
5'-IMP	29	0.9991	0.02-5	7.6	25
5'-AMP	40	0.9995	0.02-5	4.5	15
HPLC-MS					
5'-CMP	14752	0.9987	0.1-5	11	35
5'-UMP	11019	0.9991	0.1-5	13	42
5'-GMP	3917	0.9985	0.1-5	19	62
5'-IMP	4107	0.9982	0.1-5	17	58
5'-AMP	3526	0.9992	0.1-5	16	55

Los efectos de matriz se estudiaron en los diferentes tipos de muestras analizadas para evaluar la supresión de señal producida por co-elución de compuestos de la matriz que puedan afectar a la ionización del analito. El efecto matriz para los nucleótidos en los alimentos infantiles se evaluó comparando las pendientes de las gráficas de calibrado de los estándares acuosos y de adiciones estándar para las diferentes matrices, obtenidas representando concentración (a cinco niveles) frente a área de pico y llevando a cabo análisis de regresión lineal. La Tabla 3 muestra los datos obtenidos. Como puede comprobarse, las pendientes de adiciones estándar a las gráficas de calibrado para las muestras fueron diferentes a las de disoluciones acuosas para los cinco nucleótidos, confirmando que es necesario llevar a cabo la calibración mediante el método de adiciones estándar para compensar el efecto matriz.

Para comprobar la exactitud del método propuesto se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando tres muestras (yogur con leche de seguimiento, cereales infantiles y potito de verduras) a dos niveles de concentración correspondientes a aproximadamente dos y cuatro veces los límites de cuantificación. Las recuperaciones de los nucleótidos de las muestras fortificadas variaron del 85 al 96 %, con una recuperación media \pm S.D. (n=30) de 92 ± 3 .

Tabla 3. Pendientes de calibración para diferentes alimentos infantiles, mL μg^{-1}

Muestra	5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-AMP
Estándares acuosos	14752	11019	3917	4107	3526
Alimentos infantiles de 4-6 meses de edad					
Cordero con verduras	3729	3495	3345	3743	954
Pavo con verduras	2733	4821	1345	2588	1368
Jamón con guisantes	2031	4501	3563	4182	1455
Ternera con verduras	1051	3654	1801	1251	757
Jamón/Ternera con verduras	1228	4168	2220	1872	1314

Alimentos infantiles de 12 meses de edad					
Potaje de garbanzos	1133	3302	3388	581	1011
Pollo con arroz y verduras	695	4411	2067	1077	1466
Lentejas	6638	3570	2300	782	750
Spaguettis con carne	5021	5266	2929	2706	762
Cereales infantiles					
Multicereales con miel	3654	1614	452	562	559
Cereales con cacao	2029	1447	480	590	490
Alimentos infantiles lácteos					
Yogur pasteurizado y fórmula de seguimiento	7697	9412	2472	2267	2031

4. *Extracción de la muestra*

Ya que las muestras de alimentos infantiles son matrices biológicas muy complejas, fue necesario llevar a cabo un método de preparación de la muestra para simplificar la matriz y facilitar la interpretación con certeza de la señal. Además hay que tener en cuenta algunas precauciones adicionales para asegurar la integridad de la muestra a través del proceso analítico. Esto es particularmente crítico en el análisis de la leche, ya que los nucleótidos son susceptibles de sufrir conversiones enzimáticas por una variedad de enzimas endógenas como nucleotidasas y fosfatasas, que pueden degradar rápidamente los analitos. Por tanto, la muestra se trató con ácidos para inhibir la conversión de los analitos por inactivación de estas enzimas. Para eliminar las proteínas, la extracción se llevó a cabo con ácido acético y ácido tricloroacético (TCA) y, después de centrifugar, el precipitado se lavó con agua y se combinaron los extractos. Los mejores resultados relativos a la separación eficiente de las proteínas de la leche se consiguieron usando TCA. La precipitación de las proteínas con ácidos, sin neutralización, presenta la ventaja de que la preparación de la muestra es simple y rápida. Sin embargo, se pueden producir pérdidas de nucleótidos durante el almacenamiento de éstos con ácido durante un tiempo largo. Se ensayaron diferentes concentraciones de TCA en el intervalo 0,1 - 1% m/v y los extractos se centrifugaron y filtraron

para su análisis cromatográfico inmediato. Se obtuvo buena recuperación consiguiendo la precipitación de las proteínas usando TCA al 0,6 % m/v. También se ensayó la extracción con disolventes orgánicos; sin embargo, se obtuvieron eficiencias de extracción bajas usando metanol y acetonitrilo, por lo que se descartó su uso.

Antes de la inyección en HPLC las muestras fueron filtradas. Los alimentos infantiles que contienen aceite de oliva presentaron algunos problemas para la filtración con filtros de nylon. Sin embargo, se consiguió una buena filtración usando filtros de jeringa de difluoruro de polivinilideno (PVDF) con carcassas de polipropileno. El PVDF tiene carácter hidrofílico y es una membrana que se puede usar para proteínas y péptidos.

5. *Análisis de alimentos infantiles*

Se analizaron diferentes muestras correspondientes a diez alimentos infantiles (de 4-6 meses de edad) que contenían verduras, carne, pescado y frutas, alimentos infantiles (de 12 meses de edad) que contenían carne con verduras, potaje de garbanzos, lentejas y spaguettis y cereales infantiles (multicereales con miel y con cacao). Todas las muestras se analizaron por triplicado. La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos. Como puede comprobarse, los niveles más altos de nucleótidos se encuentran en los alimentos con base de pescado. Los niveles más bajos se encontraron en las muestras de cereales infantiles. En consecuencia, los niveles encontrados en las muestras de alimentos infantiles pueden ser cuantificados de manera adecuada y sin problemas de sensibilidad utilizando este procedimiento de HPLC-MS. Los dos nucleótidos de interés comercial como potenciadores de sabor, 5'-IMP y 5'-GMP, pueden encontrarse en la naturaleza y se han detectado en los alimentos infantiles. Otros nucleótidos, tales como 5'-AMP, también están presentes naturalmente. 5'-IMP está primariamente asociado con fuentes animales, mientras que 5'-GMP es más predominante en alimentos basados en verduras. La mayoría de los animales marinos son buenas fuentes de 5'-IMP, especialmente cuando es un producto seco [37].

Tabla 4. Contenido de nucleótidos^a en alimentos infantiles ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Muestra	5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	5'-AMP
Alimentos infantiles de 4-6 meses de edad					
Cordero con verduras	0.27±0.02	2.0±0.16	0.29±0.02	3.1±0.2	2.7±0.2
Pavo con verduras	0.11±0.01	1.1±0.08	0.24±0.02	0.13±0.01	2.1±0.1
Jamón con guisantes	0.14±0.01	0.91±0.1	0.12±0.01	0.10±0.01	0.56±0.03
Ternera con verduras	0.53±0.03	2.2±0.18	0.51±0.04	2.6±0.1	2.9±0.2
Jamón/Ternera con verduras	0.15±0.01	0.36±0.03	0.07±0.01	0.06±0.01	1.2±0.1
Merluza con arroz	1.7±0.1	2.2±0.3	1.0±0.09	2.2±0.2	3.2±0.2
Verduras	2.5±0.13	3.5±0.3	1.8±0.1	0.36±0.02	4.2±0.2
Melocotón y plátano	1.0±0.09	2.3±0.2	0.59±0.03	0.21±0.01	1.0±0.08
Alimentos infantiles de 12 meses de edad					
Potaje de garbanzos	0.25±0.02	1.7±0.15	0.52±0.04	2.2±0.1	2.1±0.1
Pollo con arroz y verduras	0.94±0.1	1.8±0.2	0.65±0.04	1.4±0.06	1.7±0.05
Lentejas	0.34±0.02	1.5±0.1	0.73±0.05	0.82±0.07	0.83±0.05
Spaguettis con carne	0.85±0.06	1.5±0.1	0.07±0.01	0.57±0.03	0.27±0.02
Cereales infantiles					
Multicereales con miel	0.32±0.02	0.12±0.07	0.13±0.01	ND	ND
Cereales con cacao	0.11±0.01	0.18±0.1	0.27±0.02	ND	ND
^a Media±desviación estándar (n=3)					

Los perfiles cromatográficos demostraron la ausencia de picos interferentes. Los picos se identificaron comparando los datos de retención obtenidos para los estándares, las muestras y las diferentes muestras fortificadas con los estándares bajo condiciones idénticas. Los picos se identificaron también

usando el detector DAD para medir continuamente el espectro mientras el soluto pasa a través de la célula de flujo, confirmando así la identidad y la pureza de los picos. Se obtuvo una excelente concordancia entre los espectros UV de los diferentes picos obtenidos para los estándares, las muestras y las muestras fortificadas. Finalmente, se confirmó la identificación usando el umbral ampliamente aceptado para composición elemental de 5 ppm de tolerancia.

6. *Estabilidad de los nucleótidos en alimentos infantiles acidificados con yogur pasteurizado y leche de seguimiento.*

En la producción de alimentos fermentados se usan microorganismos o enzimas para producir los cambios bioquímicos deseados y la modificación del sabor y el contenido de nutrientes de los alimentos. Los alimentos beneficiosos para la salud, es decir los así llamados “alimentos funcionales” de productos derivados de la leche, están basados en las características de las bacterias del ácido láctico [38]. Se llevó a cabo un estudio sobre la estabilidad de los nucleótidos en alimentos infantiles lácteos acidificados. Las muestras se analizaron recién preparadas y después de dos meses durante el tiempo de vida total de seis meses. Los experimentos se llevaron a cabo en dos condiciones experimentales, a temperatura ambiente (TA) y después de mantener las muestras a 30 °C. Como muestra la Tabla 5, 5'-GMP y 5'-UMP no fueron estables en las muestras, mientras que 5'-CMP y 5'-AMP fueron prácticamente estables, especialmente en el caso de las muestras almacenadas a temperatura ambiente.

25

Tabla 5. Evolución del contenido de nucleótidos en alimentos infantiles lácteos acidificados, con yogur pasteurizado y fórmula de seguimiento (mg/100 g)

Nucleótido	Declarado	Recién preparado	Tras 2 meses (TA)	Tras 2 meses (30 °C)	Tras 4 meses (TA)	Tras 4 meses (30 °C)	Tras 6 meses (TA)	Tras 6 meses (30 °C)
5'-CMP	0.8	0.79	0.83	0.85	0.89	0.78	0.79	0.87
5'-UMP	1.4	1.2	0.94	0.90	0.92	0.90	0.84	0.94
5'-GMP	1.0	0.35	0.31	0.20	0.25	0.17	0.12	0.09
5'-IMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5'-AMP	0.3	0.37	0.34	0.30	0.35	0.16	0.29	0.11

CONCLUSIÓN

De acuerdo con la presente invención, se propone un método analítico basado en HPLC de pares iónicos con detección por DAD acoplada a ESI-APCI-TOF-MS para la determinación rápida de cinco nucleótidos monofosfato: 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-AMP, 5'-GMP y 5'-IMP en alimentos infantiles. El procedimiento propuesto permitió determinar estos cinco nucleótidos autorizados y se aplicó con éxito a una gran variedad de alimentos infantiles y/o funcionales y cereales infantiles, incluyendo un estudio de la estabilidad de los nucleótidos en alimentos lácteos acidificados. La sensibilidad y la masa exacta de ESI-APCI-TOF-MS permitieron la identificación correcta de los compuestos.

REFERENCIAS

- [1] B. Hinwood. A textbook of science for the health professions. 2nd Ed. Chapman & Hall. United Kingdom (1993).
- [2] R. Uauy, J. Nutr. 124 (1994) 157S.
- [3] L.A. Barness, J. Nutr. 124 (1994) 128S.
- [4] B. Devresse, Feed Mix 8 (2000) 20.
- [5] U.S. Food and Drug Administration. In *Pesticide Analytical Manual Vol. I, Multiresidue Methods*, third ed.; U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC, 1994.
- [6] Scientific Committee for Food, Minutes of the 100th Plenary Session, March 7-8, 1996. In *Brussels. Directive 96/4/EC. European Commission of the European Communities*, Luxembourg, 1996, 7.
- [7] H. Yokoi, T. Watanabe, H. Onishi, Agric. Biol. Chem. 51 (1987) 3147.
- [8] W. Hu, T. Takeuchi, H. Haraguchi, Anal. Sci. 7 (1991) 135.
- [9] W.W. Fish, J. Agric. Food Chem. 39 (1991) 1098.
- [10] L. Thorell, L.B. Sjoberg, O. Hernell, Pediatr. Res. 40 (1996) 845.
- [11] K.F. Childs, X.H. Ning, S.F. Bolling, J. Chromatogr. B 678 (1996) 181.
- [12] E. Witters, W. Van Dongen, E.L. Esmans, H.A. Van Onckelen, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 694 (1997) 55.
- [13] S. Auriola, J. Frith, M.J. Rogers, A. Koivuniemi, J. Monkkonen, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 704 (1997) 187.
- [14] A. Apffel, J.A. Chakel, S. Fischer, K. Lichtenwalter, W.S. Hancock, J. Chromatogr. A 777 (1997) 3.

- [15] H.J. Gaus, S.R. Owens, M. Winniman, S. Cooper, L.L. Cummins, *Anal. Chem.* 69 (1997) 313.
- [16] C. Oliveira, I.M. Ferreira, E. Mendes, M.A. Ferreira, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 571.
- 5 [17] E. Schlimme, D. Martin, H. Meisel, *J. Nutrit.* 84 (2000) 559.
- [18] C. Perrin, L. Meyer, C. Mujahid, C.J. Blake, *Food Chem.* 74 (2001) 245.
- [19] N. Tomiya, E. Ailor, S.M. Lawrence, M.J. Betenbaugh, Y.C. Lee, *Anal. Biochem.* 293 (2001) 129.
- [20] D.H. Kang, J.W. Lee, K.H. Row, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24
10 (2001) 855.
- [21] I.M. Ferreira, E. Mendes, A.M.P. Gomes, M.A. Faria, M.A. Ferreira, *Food Chem.* 74 (2001) 239.
- [22] J. Aussenac, D. Chassagne, C. Claparols, M. Charpentier, B. Duteurtre, M. Feuillat, C. Charpentier, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 155.
- 15 [23] A. Buchholz, R. Takors, C. Wandrey, *Anal. Biochem.* 295 (2001) 129.
- [24] E.N. Fung, Z. Cai, T.C. Burnette, A.K. Sinhababu, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 754 (2001) 285.
- [25] Z. Cai, F. Song, M.S. Yang, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 135.
- [26] R. Tuytten, F. Lemièrre, W. Van Dongen, E.L. Esmans, H. Slegers, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1205.
- 20 [27] C.D. Mateo, D.N. Peters, H.H. Stein, *J. Animal Sci.* 82 (2004) 1339.
- [28] T. Qian, Z. Cai, M.S. Yang, *Anal. Biochem.* 325 (2004) 77.
- [29] C. Charpentier, J. Aussenac, M. Charpentier, J.C. Prome, B. Duteurtre, M. Feuillat, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3000.
- 25 [30] S.U. Bajad, W. Lu, E.H. Kimball, J. Yuan, C. Peterson, J.D. Rabinowitz, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 76.
- [31] B.D. Gill, H.E. Indyk, *Int. Dairy J.* 17 (2007) 596.
- [32] J. Klawitter, V. Schmitz, J. Klawitter, D. Leibfritz, U. Christians, *Anal. Biochem.* 365 (2007) 230.
- 30 [33] B. Luo, K. Groenke, R. Takors, C. Wandrey, M. Oldiges, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 153.
- [34] K. Inoue, R. Obara, T. Akiba, T. Hino, H. Oka, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6863.

- [35] R.L. Cordell, S.J. Hill, C.A. Ortori, D.A. Barrett, *J. Chromatogr. B* 871 (2008) 115.
- [36] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, S. Martínez-López, I. Vasallo, M. Hernández-Córdoba, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 7245.
- 5 [37] J.A. Maga, A.T. Tu, *Food Additive Toxicology*, Marcel Dekker, New York (1995).
- [38] C.E. Steinhart, M.E. Doyle, *Food Safety 1995*, Marcel Dekker, New York 1995.

REIVINDICACIONES

- 1) Método de determinación en un alimento de al menos un nucleótido seleccionado del grupo que consiste en: monofosfato citidina 5'-
5 monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, inosina 5'-monofosfato y guanosina 5'-monofosfato, sólo o en cualquier combinación entre ellos, caracterizado porque comprende las etapas de:
- a) precipitar las proteínas del alimento con ácido acético o ácido tricloroacético y a continuación separar el precipitado, obteniendo
10 un extracto;
- b) someter el extracto obtenido a cromatografía líquida (HPLC) de pares iónicos con detección por fotodiodos acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización dual
ESI-APCI-TOF-MS operando en modo negativo,
15 caracterizado porque la fase móvil del sistema HPLC comprende N,N-dimetilhexilamina (DMHA) a una concentración entre 5 y 25 mM como reactivo formador de pares de iones.
- 2) Método según la reivindicación 1, en el que la fase móvil del sistema
20 HPLC comprende N,N-dimetilhexilamina (DMHA) a una concentración de aproximadamente 20 mM.
- 3) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 precedentes, en el que la fase móvil del sistema HPLC comprende además 5% (v/v)
25 metanol y 95% (v/v) disolución reguladora de formiato 0,1 M a un pH entre 5 y 6, y la elución es isocrática.
- 4) Método según la reivindicación 3, en el que el pH es de
30 aproximadamente 5,5.
- 5) Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 anteriores, en el que, en la etapa a), las proteínas del alimento son precipitadas con ácido tricloroacético a una concentración entre 0,1 y 1% m/v.

- 6) Método según la reivindicación 5, en el que, en la etapa a), las proteínas del alimento son precipitadas con ácido tricloroacético a una concentración de alrededor de 0,6% m/v.
- 5 7) Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que, previamente a la etapa b), el extracto obtenido de la etapa a) es filtrado.
- 10 8) Método según la reivindicación 7, en el que el filtrado del extracto se realiza mediante filtro de difluoruro de polivinilideno (PVDF).
- 9) Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase móvil es eluida a una velocidad de flujo de 0,7 mL min⁻¹.
- 15 10) Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de HPLC se lleva a cabo con un voltaje capilar de +1 kV.
- 11) Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el alimento es un alimento infantil o un alimento funcional.
- 20 12) Método según la reivindicación 11, en el que el alimento es un potito o puré infantil.

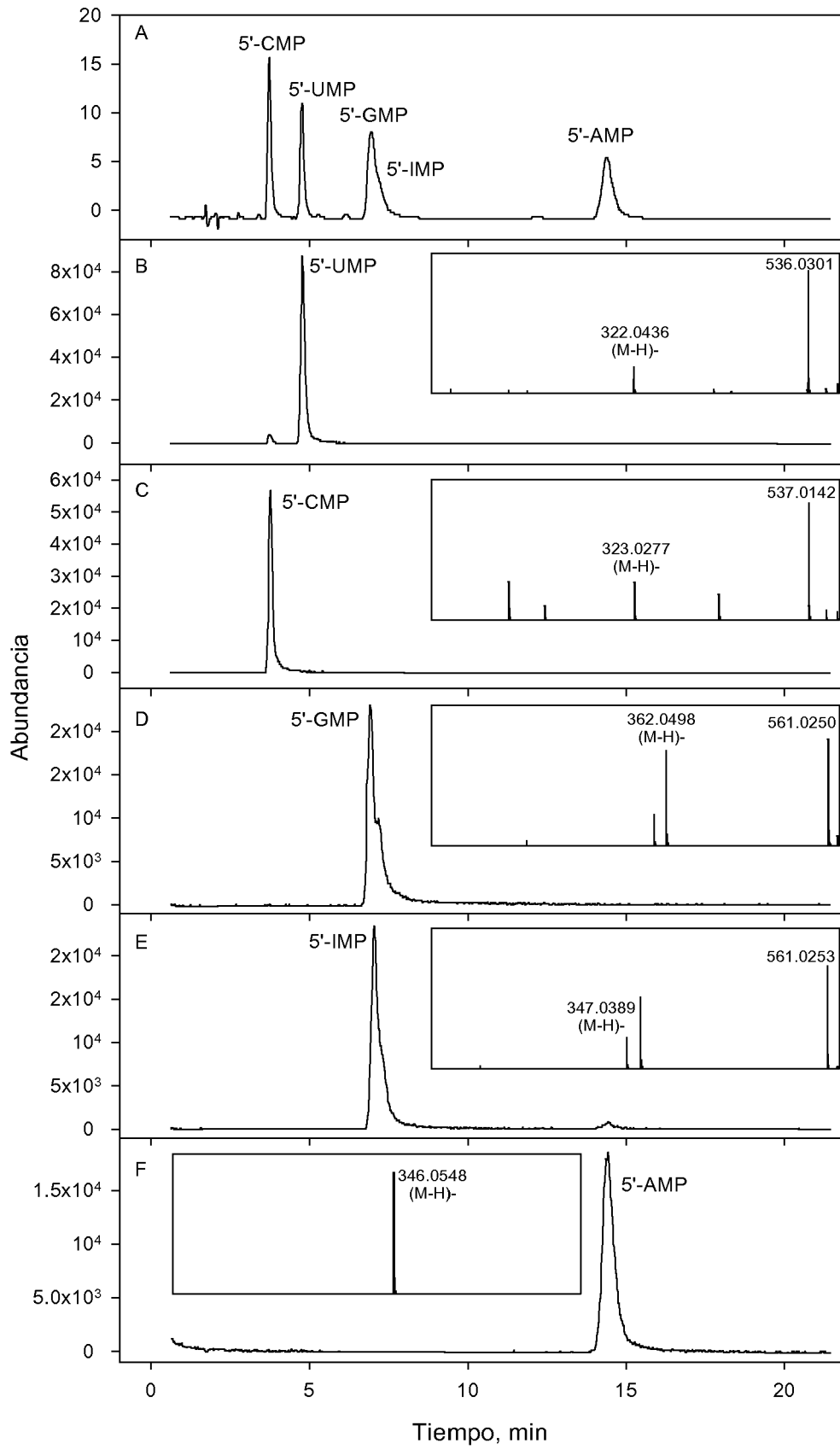


FIG. 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201030369

22 Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **G01N30/02** (2006.01)
G01N33/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	TUYTTEN, R., LEMIÈRE, F., DONGEN, W.V. et al. Short capillary ion-pair high-performance liquid chromatography coupled to electrospray (tandem) mass spectrometry for the simultaneous analysis of nucleoside mono-, di- and triphosphates. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2002. Vol 16, Nº 12. Páginas 1205-1215. ISSN 0951-4198. Páginas 1205 y 1206.	1-12
Y	WO 2006107775 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.) 12.10.2006, páginas 5-9; reivindicaciones.	1-12
A	AURIOLA, S., FRITH, J., ROGERS, M. J. et al. Identification of adenine nucleotide-containing metabolites of bisphosphonate drugs using ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Journal of chromatography B: biomedical sciences & applications. 19.12.1997. Vol 704, Nº 1-2. Páginas 187-195. ISSN 1570-0232. Páginas 187 y 188.	1-12
A	COULIER, I., BAS, R., JESPERSEN, S. et al. Simultaneous Quantitative Analysis of Metabolites Using Ion-Pair Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Analytical Chemistry. 01.01.2006. Vol 78, Nº 18. Páginas 6573-6582. ISSN 0003-2700. Páginas 6574 y 6575.	1-12
A	VIÑAS, P., CAMPILLO, N., LOPEZ-GARCIA, I. et al. Anion Exchange Liquid Chromatography for the Determination of Nucleotides in Baby and/or Functional Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 26.08.2009. Vol 57, Nº 16, páginas 7245-7249. ISSN 0021-8561. Páginas 7245 y 7246. ISSN 0003-2700.	1-12
A	PERRIN, C., MEYER, L., MUJAHID, C. et al. The analysis of 5'-mononucleotides in infant formulae by HPLC. Food chemistry. 01.08.2001. Vol 74, Nº 2. Páginas 245-253. ISSN 0308-8146.	1-12

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
13.07.2012

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/5

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,XTA,XTTC,XTTGB,XTTU,XTTWO,BIOSIS,EMBASE,BIOSIS,NPL,XPESP,INSPEC,
PUBCHEM,MEDLINE, COMPDX

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.07.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	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 se publica.

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	TUYTTEN, R., LEMIÈRE, F., DONGEN, W.V. et al. Short capillary ion-pair high-performance liquid chromatography coupled to electrospray (tandem) mass spectrometry for the simultaneous analysis of nucleoside mono-, di- and triphosphates. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2002. Vol 16, Nº 12. Páginas 1205-1215. ISSN 0951-4198. Páginas 1205 y 1206.	2002
D02	WO 2006107775 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS, INC.)	12.10.2006
D03	AURIOLA, S., FRITH, J., ROGERS, M. J. et al. Identification of adenine nucleotide-containing metabolites of bisphosphonate drugs using ion-pair liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Journal of chromatography B: biomedical sciences & applications. 19.12.1997. Vol 704, Nº 1-2. Páginas 187-195. ISSN 1570-0232. Páginas 187 y 188.	19.12.1997
D04	COULIER, I., BAS, R., JESPERSEN, S. et al. Simultaneous Quantitative Analysis of Metabolites Using Ion-Pair Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Analytical Chemistry. 01.01.2006. Vol 78, Nº 18. Páginas 6573-6582. ISSN 0003-2700. Páginas 6574 y 6575.	01.01.2006
D05	VIÑAS, P., CAMPILLO, N., LOPEZ-GARCIA, I. et al. Anion Exchange Liquid Chromatography for the Determination of Nucleotides in Baby and/or Functional Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 26.08.2009. Vol 57, Nº 16, páginas 7245-7249. ISSN 0021-8561. Páginas 7245 y 7246. ISSN 0003-2700.	26.08.2009
D06	PERRIN, C., MEYER, L., MUJAHID, C. et al. The analysis of 5'-mononucleotides in infant formulae by HPLC. Food chemistry. 1.08.2001. Vol 74, Nº 2. Páginas 245-253. ISSN 0308-8146.	01.08.2001

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 presente solicitud tiene por objeto un método de determinación en un alimento de determinados nucleótidos, que comprende precipitar las proteínas del alimento con ácido acético o tricloroacético (TCA) y someter el extracto obtenido a una cromatografía líquida (HPLC) de pares iónicos con detección por fotodiodos acoplada a espectrometría de masas con tiempo de vuelo con ionización dual ESI-APCI-TOF-MS operando en modo negativo, donde el reactivo formador de pares de iones es N,N-Dimetilhexilamina (DMHA) entre 5 y 25 mM (Reivindicaciones 1-12).

El documento D01 divulga un método de determinación de nucleótidos mediante cromatografía líquida de pares iónicos acoplada a espectrometría de masas.

El documento D02 divulga un método de detección y cuantificación de oligonucleótidos mediante una cromatografía líquida de pares iónicos acoplada a dos métodos de detección, un detector de UV y un espectrómetro de masas.

El documento D03 divulga un método de identificación de nucleótidos de adenina resultantes del metabolismo de bifosfonatos. La identificación se lleva a cabo mediante una cromatografía líquida de pares iónicos acoplada a espectrometría de masas. Como formador de pares de iones se utiliza DMHA en concentraciones 10 y 20 mM (ver páginas 187-188).

El documento D04 divulga un método de detección de metabolitos polares, entre los que se encuentran diferentes nucleótidos. La determinación se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de pares iónicos acoplada a espectrometría de masas. Como formador de pares de iones se utiliza hexilamina (páginas 6574-6575).

El documento D05 divulga un método de determinación de nucleótidos en alimentos infantiles mediante cromatografía líquida de pares iónicos acoplada a detección por fotodiodos. Para llevar a cabo el proceso, previamente a la separación cromatográfica, se procede a la precipitación de proteínas con TCA (página 7245).

El documento D06 divulga un método de detección de nucleótidos de fórmulas infantiles. Comprende un primer paso de precipitación de las proteínas de la muestra y un análisis posterior en cromatografía líquida de pares iónicos acoplada a detección por fotodiodos.

NOVEDAD (Art. 6.1, Ley 11/86)

El objeto de las reivindicaciones 1-12 es nuevo en el sentido del artículo 6.1 de la Ley de patentes 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1, Ley 11/86)

D01 se considera el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la presente solicitud.

El documento D01 divulga un método de determinación de nucleótidos (AMP, GMP, UMP y CMP entre otros) mediante cromatografía líquida de pares iónicos acoplada a espectrometría de masas ESI-TOF-MS operando en modo negativo. Como formador de pares de iones se utiliza N,N-Dimetilhexilamina en concentraciones entre las que se encuentran las de 5mM y 20 mM. (ver páginas 1205 y 1206)

La diferencia entre el objeto de la presente solicitud y D01 es que se utilizan dos métodos de detección acoplados, fotodiodos (detector de UV) y espectrometría de masas.

El utilizar tras la separación con cromatografía líquida de pares iónicos dos métodos de detección acoplados, concretamente un fotodiodo o detector de UV y un espectrómetro de masas, es una opción conocida en el estado de la técnica, tal y como se refleja por ejemplo en D02.

El documento D02 divulga un método de detección de oligonucleótidos mediante cromatografía líquida de pares iónicos acoplada a un detector de UV que a su vez está acoplado a un espectrómetro de masas. Se indican diferentes posibilidades como formadores de pares de iones entre los que se encuentra el DMHA (Páginas 5-9 y reivindicaciones)

A la luz de la combinación de las enseñanzas técnicas de D01 y D02, y teniendo en cuenta que la precipitación de proteínas de la muestra previo al análisis cromatográfico resulta obvia para un experto en la materia, siendo rutinario el uso de TCA en este contexto (ver D03) y que además los equipos de espectrometría de masas pueden operar en un modo dual ESI-APCI que permite detectar mayor variabilidad de compuestos, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1,2,7,8,11,12 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/86.

En relación a las reivindicaciones dependientes 3-6, 9 y 10 referentes a condiciones particulares del proceso, se considera que el establecimiento de dichas condiciones es resultado de un proceso de optimización del método, rutinario en el ejercicio de un experto en la materia.

En conclusión, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-12 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia en el sentido del artículo 8.1 de la Ley de patentes 11/86.