

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 767**

51 Int. Cl.:

B01D 15/08 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2008 E 08769735 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2164589**

54 Título: **Columnas de cromatografía con emisores de electronebulización integrados**

30 Prioridad:

01.06.2007 US 932734 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2015

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215-5450, US**

72 Inventor/es:

MARTO, JARROD A.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 767 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Columnas de cromatografía con emisores de electronebulización integrados

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a cromatografía, y más particularmente a columnas de cromatografía con frita porosa y emisores de electronebulización individuales micrométricos y submicrométricos, así como métodos para prepararlas.

10

Antecedentes

15 La cromatografía líquida (LC) es una técnica analítica bien establecida para separar componentes de una mezcla fluida para análisis y/o identificación posterior, en la que una columna se rellena con un material de fase estacionaria que por lo general es un sólido o gel finamente dividido tal como partículas pequeñas con diámetros de unos pocos micrómetros. Se puede usar una diversidad de diferentes detectores para detectar los analitos separados en una columna de LC. Además, los componentes separados se pueden pasar desde la columna de cromatografía líquida a otros tipos de instrumentos analíticos para análisis posterior, por ejemplo, la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) separa compuestos cromatográficamente antes de que se introduzcan en una fuente de iones de un espectrómetro de masas.

20

25 La espectrometría de masas ("MS") es una técnica analítica usada para medir la relación de masa a carga de iones en fase gaseosa. Esto se consigue ionizando una muestra y separando iones diferentes masas y registrando su abundancia relativa mediante la medida de intensidades de flujo de iones. La ionización por electronebulización (ESI) es una técnica de ionización aplicada normalmente cuando se trata con biomoléculas tales como péptidos y proteínas. El proceso de electronebulización crea gotitas altamente cargadas que, bajo evaporación, crean iones representativos de las especies contenidas en una solución de muestra.

30

35 La proteómica basada en espectrometría de masas, en particular espectrometría de masas con ionización por electronebulización acoplada a cromatografía líquida (LC-ESI-MS), se ha convertido recientemente en la técnica de elección para la identificación y caracterización rápida de proteínas en sistemas biológicos. Además, en la actualidad existen múltiples enfoques para realizar estos experimentos de una forma semicuantitativa para controlar cambios en la expresión de proteínas y sucesos específicos después de la traducción como una función de la alteración biológica. A pesar de estas ventajas analizadas anteriormente, la espectrometría de masas experimenta intervalo dinámico limitado (por ejemplo, la incapacidad para detectar péptidos que abarcan una relación de abundancia superior a 5000:1 en una sola exploración/espectro) y tasa de adquisición finita (por ejemplo, la incapacidad de adquirir datos de MS/MS a una tasa suficiente para proporcionar información de secuencias en todos los péptidos en una mezcla compleja durante una sola realización de LC-MS/MS, independientemente de su abundancia relativa). Estas limitaciones, combinadas con las tendencias actuales hacia el análisis de mezclas cada vez más complejas (biomarcadores, rutas de señalización, etc) continúa impulsando los límites de las columnas de capilares de sílice fundida con un D.I. de 75 μm y 100 μm (es decir, diámetro interno) usado en todas partes con resinas para HPLC en fase inversa de 5 y 10 μm de diámetro usadas ampliamente.

40

45 La Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0014143 desvela aparatos y métodos para detección de biomoléculas dentro de una muestra. El aparato presenta una columna de separación y un emisor de electronebulización integrados que no incluye una polimerización *in situ* formada por una frita o tapón de cerámica de una composición líquida de silicato.

50

La Patente EP N° 0231684 desvela columnas de cromatografía con tapones de cerámica fundida que proporcionan soportes para lechos cromatográficos en dispositivos de cromatografía líquida y limitadores en dispositivos de cromatografía de fluido supercrítico.

55

La Patente de Estados Unidos N° 6.190.559 desvela métodos para rellenar columnas de cromatografía que incluyen extraer una suspensión de material de relleno en un disolvente volátil en un extremo de una columna de cromatografía, retirar el disolvente a través del mismo extremo para dejar el material de relleno atrás, y sinterizar el material de relleno depositado.

60

Sumario

65 La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que se puede conseguir un rendimiento de LC-MS excepcional usando columnas de cromatografía tal como se definen las reivindicaciones adjuntas. Estas columnas se pueden usar a caudales muy bajos, por ejemplo, tan bajos como 3-5 nanolitros/minuto e incluso 1 nanolitro/minuto.

60

La divulgación también presenta métodos para preparar tales columnas.

65

Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes características. El método puede incluir rellenar el tubo con una suspensión de perlas que tienen un diámetro de aproximadamente 1,8 µm a 5 µm, por ejemplo, después de formar el material cerámico. La composición líquida de silicato puede incluir silicato de litio y silicato de tetrametilamonio. El material cerámico se puede formar calentando la composición. El material cerámico se puede formar calentando la composición a 300 °C o superior. El emisor ahusado se puede formar usando un extractor de pipeta basado de láser. El emisor ahusado puede tener un orificio con diámetro de 1,5 micrómetros o inferior. El emisor ahusado se puede configurar para su uso como un emisor de electronebulización.

Las realizaciones también pueden incluir una o más de las siguientes características. El silicato de la columna de cromatografía puede incluir silicato de litio. El orificio puede tener un diámetro de 1,5 micrómetros o inferior. El orificio puede tener un diámetro de 0,75 micrómetros o inferior. La columna puede ser capaz de resistir una presión de 34,47 MPa (6000 psi) o superior. La columna puede ser capaz de resistir una presión de 54,71 MPa (7500 psi) o superior, por ejemplo, 62,05 MPa (9000 psi) o superior. El orificio se puede dimensionar y configurar para su uso como un emisor de electronebulización en espectrometría de masas. El orificio se puede dimensionar y configurar para que funcione a un caudal de, por ejemplo, aproximadamente 10 nl/min o inferior. El caudal puede ser de 5 nl/min o inferior, por ejemplo, 1 nl/min o inferior.

Como se usa en el presente documento, la expresión "micrómetro simple" se refiere a una dimensión superior a 1 micrómetro e inferior a 10 micrómetros. El término "submicrómetro" se refiere a una dimensión inferior a 1 micrómetro.

Los aspectos y realizaciones que se describen en el presente documento pueden incluir una o más de las siguientes ventajas. Esta divulgación presenta la fabricación de columnas de HPLC capilares a base de sílice fundida con puntas emisoras de electronebulización integradas, que se pueden usar en experimentos de espectrometría de masas y cromatografía líquida basadas en proteómica. La construcción de columnas de HPLC a base de sílice fundida con puntas emisoras de electronebulización integradas disminuye el volumen muerto entre el lecho de la columna de HPLC y la punta emisora y por lo tanto aumenta el rendimiento cromatográfico. La formación *in situ* de fritas de retención de lecho de columna en capilares de sílice fundida de cualquier tamaño, especialmente de D.I. pequeño, facilita la construcción de capilares de HPLC de diámetro interno más pequeño con puntas emisoras de electronebulización arbitrariamente pequeñas. Además, los métodos que se desvelan en el presente documento se pueden usar en conjunto con la denominada LC de presión ultra elevada, que ofrece mejoras adicionales en el rendimiento cromatográfico. Por ejemplo, las nuevas columnas con emisores de electronebulización integrados preparados con los métodos que se desvelan en el presente documento pueden resistir presiones ultra elevadas, por ejemplo, 34,47 MPa (5000 psi) o superior, 51,71 MPa (7500 psi) o superior, 62,05 MPa (9000 psi) o superior, e incluso 68,95 MPa (10.000 psi) o superior.

La presente divulgación también presenta columnas preparadas con los métodos que se desvelan, que tienen diámetros internos arbitrariamente pequeños y tienen fritas de retención porosas que son mecánicamente estables, pero que aún permiten un flujo volumétrico suficiente para facilitar el relleno de lechos de LC de partículas y tienen estabilidad mecánica suficiente para resistir LC de presión ultra elevada y facilitar la colocación de puntas emisoras integradas cerca de la frita y con diámetros de orificio arbitrariamente pequeños. En particular, se han fabricado dispositivos con columnas capilares de diámetro interno de 25 micrómetros, rellenas con resina de HPLC de 3 micrómetros de diámetro, que terminan con una punta emisora de electronebulización con un diámetro inferior a 1 micrómetro, a caudales inferiores a 1 nanolitro por minuto y funcionan de forma satisfactoria aplicando los métodos que se desvelan en el presente documento. En comparación, por ejemplo, los dispositivos más pequeños ofrecidos en el mercado en la actualidad, por ejemplo, los ofrecidos por New Objective, Inc., tienen diámetros internos de 50 micrómetros, están rellenos con perlas de resina de 5 micrómetros de diámetro, terminan con una punta emisora de 10 micrómetros, y pretenden funcionar a caudales de 50-100 nl/min.

Sin quedar ligado a la teoría, hasta la fecha parece que nadie ha demostrado de forma satisfactoria un método para fabricar columnas que permitan la exploración experimental de regímenes de LC-MS a escala ultra pequeña, debido a las dificultades que se analizan a continuación. Generalmente, las columnas de LC con superficie de contacto para ionización por electronebulización se benefician de forma significativa si tienen un emisor de ESI integrado en la columna, de forma preferente inmediatamente adyacente a la frita de la columna. La eficacia de la ionización por electronebulización aumenta a medida que disminuye el caudal efluente. Sin embargo, la electronebulización estable a caudales muy bajos (por ejemplo, 10 nl/min o inferior) requiere orificios de diámetro extremadamente pequeños (por ejemplo, inferiores a 10 µm). Además, la ecuación de Van Deemter predice que a caudales por debajo de mínimos de representación de Van Deemter, se espera difusión longitudinal para conducir a un ensanchamiento de la banda. Además, la introducción de volumen muerto entre la frita y la punta emisora contribuya adicionalmente al ensanchamiento de la banda. Como resultado, se puede esperar que el ensanchamiento de la banda cromatográfica contrarreste cualquier ganancia realizada por aumento de la eficacia de la ionización. Sin embargo, de forma sorprendente, el uso de las nuevas columnas con emisores de electronebulización integrados simples o sub-micrométricos que se describen en la presente divulgación ha conducido a un aumento significativo del rendimiento de LC-MS.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado tal como normalmente lo entiende un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

La FIG. 1 es una vista en sección transversal aumentada de una parte de una columna de cromatografía.

Las FIGS. 2a-2e son representaciones esquemáticas en sección transversal de columnas intermedias durante diversas etapas de un método a modo de ejemplo para preparar columnas de cromatografía con emisores de electronebulización integrados.

Las FIGS. 3a-3e son representaciones de columnas intermedias durante etapas separadas para formación *in situ* de una fritada en un tubo de sílice fundida. La FIG. 3d es una micrografía electrónica de un emisor de electronebulización integrado formado en el tubo de sílice fundida, y la FIG 3e es una micrografía electrónica de una sección transversal de la columna de las FIGs. 3a-3d que muestra la fritada porosa formada en el tubo.

La FIG. 4 es un gráfico de intensidad máxima de espectro de masas representada como una función del tamaño de la columna y caudal de la columna para 400 péptidos comunes detectados usando las columnas que se describen en el presente documento.

La FIG 5 es un gráfico de ancho de pico cromatográfico representada como una función de caudal de columnas generado usando las columnas que se describen en el presente documento.

La FIG. 6 es un histograma de número de péptidos identificados mediante MS/MS representado como una función del tamaño de columna y caudal de columna.

La FIG 7 es una serie de diagramas de Venn que muestran la reproducibilidad de identificaciones de péptidos observada para análisis de LC-MS/MS.

Descripción detallada

La presente divulgación presenta una estrategia sencilla para construir columnas capilares robustas a base de sílice fundida con fritas a base de silicato poroso, integrado y puntas emisoras simples o submicrométricas para análisis de LC-MS/MS de sensibilidad elevada. Este enfoque puede usar materiales de partida económicos, disponibles en el mercado, junto con un procedimiento sencillo y rápido, que permite una construcción rápida de columnas, por ejemplo, en menos de 30 minutos. Estas columnas se pueden usar fácilmente con sistemas binarios de HPLC convencionales y de alta presión (por ejemplo, 34,47 MPa (5000 psi o superior)). De forma rutinaria se pueden observar anchos de pico de LC (por ejemplo, ancho total a máximo medio, "FWHM") de menos de 30 segundos a caudales de separación de aproximadamente 3-5 nanolitros por minuto ("nl/min") ca partir de estos montajes de columna de HPLC. Cuando se almacenan de forma apropiada, se pueden usar columnas de LD de 25 μm . con emisores integrados de ESI de 1,5 μm o diámetro inferior durante varias semanas sin fallo. Además, el análisis de péptidos tripticos derivados de lisado de células enteras demuestra claramente el aumento del rendimiento de MS (por ejemplo, índice de aumento de 10 o superior de la relación de señal a ruido) realizado a través de la combinación de montajes en miniatura de columna y caudales de LC ultra bajos.

Columnas de Cromatografía con Fritas Porosas y Emisores Integrados de Electronebulización

Las nuevas columnas son el resultado de un equilibrio cuidadoso de una diversidad de parámetros para conseguir aumentos de rendimientos significativos. Las columnas tienen un diámetro interno pequeño que varía de 5 a 75 micrómetros, por ejemplo, de 10 a 25 micrómetros. Las columnas se rellenan con partículas o perlas pequeñas de resina de 1,8, 2, 3, 4 o 5 micrómetros. Las columnas incluyen un emisor integral que tiene un orificio de menos de 3 micrómetros, por ejemplo, 2, 1,5, 1,0, o incluso más pequeño. Estas combinaciones de dimensiones y el uso de una fritada porosa a base de silicatos, robusta permite que las nuevas columnas se usen a caudales extremadamente bajos, por ejemplo, inferiores a 10 nanolitros/minuto, por ejemplo, inferiores a 7,5, 5,0, 4,0, 3,0, 2,0, 1-0, e incluso inferiores a 1,0 nanolitro/minuto. Además, las nuevas columnas son sorprendentemente robustas, funcionan bien a presiones elevadas, tales como presiones que o superiores a 34,47, 48,26, 62,05, 62,50, e incluso de 68,95 MPa (5000, 7000, 9000, 9500, 10,000 psi, respectivamente).

Tal como se muestra en la FIG. 1, un tubo capilar 10 usado en LC-ESI-MS incluye un cuerpo tubular 12 de diámetro interno uniforme ("D.I.") y un extremo ahusado 14, que tiene un orificio de un diámetro "d". El tubo 10 puede tener capacidad para un lecho absorbente o fase sólida 18 que se define mediante la pared del cuerpo 12. Una fritada de retención porosa 16 formada, por ejemplo, de silicato, separa el lecho absorbente 18 y el extremo ahusado 14.

El tubo capilar 10 puede tener un D.I. en el intervalo de 5 micrómetros a 2 mm, por ejemplo, de 5 a 75 micrómetros, de 10 a 50 micrómetros, o de 15 a 25 micrómetros. El diámetro d del orificio del extremo ahusado 14 puede variar de

unos pocos cientos de nanómetros a aproximadamente unos pocos micrómetros, por ejemplo, de 0,5 a 3 micrómetros o de 0,5 a 1,5 micrómetros. La frita 16 si adhiere a la superficie de la pared interna lisa del tubo 10 y se coloca por detrás del orificio a alguna distancia "L" que varía de 2 mm a 5 mm. La frita 16 también tiene una longitud "l" que varía de 0,5 mm a 2 mm. El lecho absorbente 18 normalmente se inyecta a alta presión en el tubo 10 en forma de una suspensión después de la formación de la frita 16. Dado que la frita es porosa, una suspensión de absorbente 18 se puede inyectar fácilmente en el tubo 10.

Los tubos capilares vacíos usados para columnas de HPLC son los conocidos en la técnica, y, por ejemplo, se pueden preparar con materiales cerámicos, tales como vidrio de borosilicato, sílice fundida, sílice fundida revestida con poliimida y sílice fundida revestida con aluminio; metales, tales como acero inoxidable, acero inoxidable revestido con vidrio o acero inoxidable revestido de sílice; o se pueden preparar de materiales poliméricos o materiales poliméricos revestidos con sílice fundida. El material polimérico que se puede usar incluye fluoropolímeros, tales como etileno y tetrafluoroetileno (ETFE), etileno y propileno fluorado (FEP) y politetrafluoroetileno (PTFE); poliolefinas, tales como polietileno lineal de densidad elevada (HDPE), polietileno lineal de baja densidad (LDPE) y polipropileno; policetonas, tales como polieterecetonona (PEEK) y PEEK revestido con sílice; materiales acrílicos, tales como polimetilmetacrilato (PMMA), poliamidas, tales como nailon 6, nailon 11 y nailon 12; y poliimida. Los tubos capilares útiles para uso como columnas capilares de acuerdo con la presente divulgación son los de acero inoxidable, PEEK y HDPE, y sílice fundida revestida con poliimida.

Las formas interna o externa de las columnas capilares pueden tener una diversidad de formas geométricas regulares, tales como redonda, ovalada, cuadrada, rectangular, poligonal, tal como pentagonal hexagonal, y similares; o pueden tener formas irregulares. La expresión "forma interna" de las columnas capilares, como se usa en el presente documento, tiene el mismo significado que el "calibre" de una columna capilar. Los tubos usados normalmente para estas columnas tienen una forma o calibre interno redondo.

Metodología General para Preparar las Columnas de Cromatografía

Las FIGS 2a-2e ilustran un método a modo de ejemplo para preparar las nuevas columnas capilares de sílice fundida con fritas a base de silicato y puntas emisoras integradas. A medida que se forman, las columnas con emisores integrados se pueden usar en experimentos de LC-ESI-MS.

Formación de Fritas Porosas en Tubos de Sílice

Tal como se muestra en la FIG. 2a, se expone una sección pequeña 22 (por ejemplo, 1,5 cm) de sílice fundida retirando un revestimiento de poliimida (se muestra en color gris claro), por ejemplo, a través de calentamiento con antorcha cerca de un extremo del tubo capilar de sílice fundida revestido con poliimida 20. A continuación, haciendo referencia a las FIGs. 2b y 2c, un precursor que forma frita 24 tal como una solución de silicato de potasio y litio (mostrada con color gris oscuro con unos pocos círculos y puntos) se acerca a la ventana de sílice fundida 22 por acción capilar. Un soldador (no se muestra) a aproximadamente 300 °C se lleva cerca de la sección 22 y el calor enfocado induce polimerización local del precursor 24 para formar una frita porosa 26 aproximadamente en el borde director de la solución de silicato con una longitud limitada "l" normalmente en el intervalo de 1 a 2 mm. A continuación, cualquier solución de silicato sin polimerizar se expulsa del capilar mediante un aclarado presurizado con una solución acuosa.

En realizaciones en particular, se añade silicato de tetrametilamonio a la solución de silicato de potasio y litio en un esfuerzo para controlar mejor el tamaño del poro de la frita. Sin desear quedar ligado por la teoría, se cree que el tamaño del poro se determina, en parte, por el tamaño del catión en la solución de silicato. El tetrametilamonio es un catión más grande en comparación con los cationes potasio y litio, por lo tanto tamaño medio del poro se puede aumentar mediante el aumento de la abundancia del silicato de tetrametilamonio en la solución de silicato. La relación de volumen de la solución de silicato de tetrametilamonio a la solución de silicato de potasio y litio es preferentemente de aproximadamente 2:1 al 1:3, por ejemplo, aproximadamente 1:2. Por ejemplo, una solución precursora que forma frita se puede preparar mezclando 50 µl de una solución acuosa de silicato de tetrametilamonio (15-20 % en peso), 100 µl de una solución de silicato de Klebofon™1524 (por ejemplo, de aproximadamente un 77,0 % en peso de agua, un 2,5 % en peso de Li₂O, y un 20,5 % en peso de SiO₂), y 10 µl de formamida. De forma inesperada, además del beneficio del control del tamaño del poro, la mezcla de la solución de silicato de tetrametilamonio y de silicato de litio también permite la creación de fritas notablemente robustas. Como resultado, es menos probable que la frita robusta aloje partículas finas que pueden atascar los poros y/o el orificio de la frita cuando se aplica alta presión a la columna de LC. Como un ejemplo, la solidez de las fritas preparadas tal como se describe en el presente documento se pone en evidencia con varias semanas de uso repetido de la columna de LC con puntas de emisor integradas de un diámetro inferior a 1,5 µm, a caudales de columna de, por ejemplo, 3-5 nl/min.

La solidez de las fritas se pone en evidencia adicionalmente mediante el hecho de que las nuevas columnas con emisores de electronebulización integradas preparadas con los métodos que se desvelan en el presente documento se han sometido al ensayo para resistir presiones ultra elevadas, por ejemplo, superiores a 48,26, 51,71, 62,05, y 65,50 MPa (5000, 7500, 9000, y 9500 psi, respectivamente).

Llenado de la Columna de Cromatografía

Después de haber formado la frita 26, una suspensión formada por el absorbente 28 o partículas de diámetro especificado (por ejemplo, partículas de C18 de tamaño de poro de 120 Å, de 3 µm de diámetro de Monitor) y una fase móvil (por ejemplo, un disolvente orgánico) se inyecta a presión desde el extremo de la columna opuesto a aquél por el que el silicato entró en la columna, tal como se ilustra en la FIG. 2d. En algunas realizaciones, también se puede usar presión al rellenar la resina de LC 28 para expulsar de forma simultánea el silicato sin polimerizar. En Yang, Patente de Estados Unidos N° 4.483.773 se describe con más detalle el llenado de columnas de cromatografía.

Formación de Emisores de Electronebulización de Micrómetro Simple

Después de rellenar la columna 20 con el lecho de absorbente 28, la columna se puede secar con gas presurizado, tal como helio, durante unos minutos y se puede formar una punta de emisor integrada de diámetro sub- o micrométrico simple, por ejemplo, 0,5 - 1,5 µm usando un extractor de pipeta basado en láser, tal como en P-2000 de Salter Instruments Company, CA. Haciendo referencia ahora a la FIG. 2e, el capilar 20 relleno se coloca en un extractor de pipeta basado en láser y a continuación una punta emisora de orificio con diámetro pequeño se empuja a 2-5 mm desde la frita 26. Los diámetros del orificio de estos emisores pueden variar de menos de 3 micrómetros a menos de 2,5, 2,0, 1,5, 1,0, o incluso menos de 1 micrómetro.

Almacenamiento de las Columnas Rellenas con Emisores Integrados

Para una manipulación y almacenamiento convenientes, la columna se puede enfundar en un tubo de TEFLON® (por ejemplo, 1575 µm (0,062 pulgadas) de D.O. x 292 µm (0,0115 pulgadas) de D.I.) se contracalibra (965 µm (0,038 pulgadas) de D.I.) en un extremo usando un taladro de tornillo resurrección para proporcionar una cubierta protectora para la punta cuando no se usa. Para almacenamiento prolongado, la columna se puede colocar en un tubo de tipo cónico (manguito de TEFLON® orientado hacia abajo) que contiene 5 ml de ácido acético diluido. Sin desear quedar ligado por la teoría, se cree que este procedimiento mantiene la punta emisora bañada en líquido de modo que cantidades traza de sales no volátiles que pueden estar presentes en los disolventes de HPLC no precipitan en la punta. Como alternativa, la columna se puede secar expulsando todos los líquidos con helio presurizado.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitantes.

Materiales de Partida para Preparar Montajes de Columna de Cromatografía

El tubo de sílice fundida está disponible, por ejemplo, en Polymicro Technologies (Phoenix, AZ). Diversas nueces, férulas, y otros accesorios de polieterecetona ("PEEK") están disponibles, por ejemplo, en Valco Instrument Co. (Houston, TX) y en Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA). El tubo de TEFLON® se adquirió en Zeus Industrial Products (Orangeburg, SC). Las resinas a granel para cromatografía en fase inversa (partículas de C18 de tamaño de poro de 120 Å, de 5 µm de diámetro de Monitor; partículas de C18 de tamaño de poro de 120 Å, de 3 µm de diámetro de Monitor) se pueden obtener, por ejemplo, en Column Engineering (Ontario, CA). Se pueden usar otras resinas indistintamente dependiendo del uso específico de las columnas de cromatografía tal como se conoce en este campo.

En el mercado se pueden obtener compuestos o precursores que forman frita tales como soluciones de silicato de potasio y litio, por ejemplo, de PQ Corporation (Valley Forge, PA). Por ejemplo, en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) están disponibles formamida, silicato de tetrametilamonio, ácido acético glacial. El acetonitrilo de calidad para HPLC se puede adquirir en Fisher Scientific Intl. (Hampton, NJ).

Ejemplo 1. Formación de Fritas a Base de Silicato en Columnas Analíticas

Se construyeron columnas analíticas ("CA") a partir de 360 µm de D.O. x 50 µm de D.I. y 360 µm de D.O. x 25 µm de D.I. de tubo capilar de sílice fundida. Una sección de 2,5 cm de poliimida se retiró a aproximadamente 3 cm de un extremo del tubo de sílice fundida. Las fritas a base de silicato se fundieron *in situ* siguiendo el protocolo general que se ha descrito anteriormente. Se añadieron 50 µl de silicato de tetrametilamonio (Sigma-Aldrich, N° de parte 438669) a un tubo de microcentrífuga, seguido de la adición de 100 µl de silicato de litio (Klebofon™1524 de PQ Corporation, Valley Forge, PA.). Esta solución se agitó brevemente, con posterior adición de 10 µl de formamida (Sigma-Aldrich, N° de parte F5786) seguido de otra breve agitación a temperatura ambiente. Se permitió que esta solución migrara aproximadamente 1 cm en un extremo del tubo de sílice fundida por acción capilar.

A continuación, un soldador a temperatura variable se ajustó a 375 °C y se usó para inducir la polimerización de la solución de silicato comenzando en el extremo opuesto del tapón de silicato. Girando lentamente el capilar de sílice fundida y colocando el soldado inmediatamente adyacente al extremo distal del tapón de silicato, la polimerización

gradual se visualizó fácilmente y las fritas de 2 - 5 mm de longitud se fundieron fácilmente en 5 - 20 segundos. Inmediatamente después de la formación de la frita, el silicato sin polimerizar se expulsó del capilar mediante un aclarado presurizado con una solución acuosa de ácido acético al 0,1 %. El exceso de tubo de sílice fundida se recortó usando punzón para corte de azulejo de modo que la frita se colocó en el mismo extremo del capilar de sílice fundida. Las Figuras 3a-3c son imágenes ópticas que muestran etapas separadas en este proceso para la construcción de columnas analíticas de 50 μm de D.I.. En primer lugar, se permitió que la solución de silicato migrara a cuatro quintos la longitud de la ventana expuesta (FIG. 3a). Después, se indujo la polimerización usando el soldador tal como se ha descrito anteriormente, teniendo cuidado para formar fritas de 1 - 2 mm de longitud (FIG. 3b). Después de expulsar el exceso de solución de silicato, las fritas se volvieron a calentar con el soldador a 400 °C durante varios segundos (FIG. 3c). El recalentamiento puede proporcionar estabilidad mecánica extra a las fritas a base de silicato. La FIG. 3e es una micrografía electrónica de barrido que muestra una sección transversal del tubo capilar (25 μm de D.I.) relleno con la frita mesoporosa a medida que se forma.

Ejemplo 2. Relleno de las Columnas Analíticas

Para rellenar las columnas que se describen en el Ejemplo 1, se preparó una suspensión densa de resina en fase inversa en 1 ml de acetonitrilo y se relleno por detrás de la frita a presiones de aproximadamente 3,45 - 10,35 MPa (500 - 1500 psi). Se consiguió una longitud del lecho de 6 - 8 cm en menos de 10 minutos (perlas de 5 μm de diámetro usadas para la CA de 50 μm de D.I. y perlas de 3 μm de diámetro usadas en la CA de 25 μm de D.I.).

Ejemplo 3. Formación de Emisores de Electronebulización Simples y Sub-micrométricos en Columnas Analíticas

Las CA rellenas en el Ejemplo 3 se secaron con helio presurizado durante 5 minutos antes de que se formara una punta emisora integrada de 0,75 - 1,5 μm de diámetro 2 - 4 mm por detrás de la frita usando un extractor de pipeta basado en láser (P-2000, Sutter Instruments Company, CA, ajustes del programa: Calor = 500, Fil = 0, Vel = 5, Del = 130, Pull = 25). Se usó un microscopio I.C.-66 de Nikon (Micro Optics, Fresh Meadows, NY) con un aumento de 1000x o 1500x para confirmación visual del diámetro de la punta. La Figura 3d muestra una imagen de micrografía electrónica de alta resolución de una punta emisora integrada sub-micrométrica a medida que se forma en este procedimiento.

Ejemplo 4. Uso de CA en Análisis de Espectrometría de Masas Cromatografía y Líquida

Se usaron Waters[®] NanoAcquity (Waters Corp., Milford, MA) y una bomba binaria de la serie 1100 de Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) para generar gradiente es de disolvente para experimentos de LC-MS en línea. Las muestras se cargaron a presión manualmente en una precolumna (un tubo capilar de sílice fundida con frita de 360 μm de D.O. \times 100 μm de D.I. o 360 μm de D.O. \times 50 μm de D.I., relleno o perlas de 5 μm de diámetro), que a continuación se insertaron en una rama de salida de un conector de tipo Y de PEEK. La entrada y la segunda salida del Y de PEEK se conectaron al efluente de HPLC y líneas de residuo, respectivamente. El caudal base de HPLC se ajustó a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. y se insertó un limitador ajustable en la línea de residuos para proporcionar contrapresión variable (y por lo tanto flujo) a través de la CA preparada en el Ejemplo 3.

Por lo general, una contrapresión de 60 - 80 bar (6 - 8 MPa) medida en la bomba binaria proporcionaba caudales de 2 - 10 nl/min a través de la PC y la CA. El caudal final para cada experimento se calculó a partir de la medida del volumen desplazado que incluye la PC y la AC, y el tiempo de retardo observado para el avance del gradiente orgánico (dando como resultado un fuerte aumento de la medida inicial total del cromatograma de iones) durante el análisis de LC-MS. Una microunión de Upchurch con un volumen de arrastre interno de 9 nl con se usó para conectar las columnas pre- y analíticas. La posición de la punta emisora con respecto a la entrada del espectrómetro de masas se controló con una Fuente NanoESI sourc (Proxeon Biosystems A/S, Odense, Dinamarca). El disolvente A para HPLC era ácido acético 0,2 M y el disolvente B era acetonitrilo al 70 %/ácido acético 0,2 M. El gradiente de disolvente se elevó de un 0 % - a un 100 % de B en 50 min. La adquisición de datos de espectrometría de masas se realizó en modo dependiente de los datos en un instrumento Orbitrap híbrido con trampa iónica lineal (ThermoFinnigan, San Jose, CA) en las siguientes condiciones: barrido de MS, $350 \leq m/z \leq 1500$; los 8 barridos principales de MS/MS más abundantes con lista de exclusión y ventana de aislamiento de 3 Da de ancho; tensión de ESI de 1,5 kV; temperatura del capilar de 200 °C.

Se usó Mascot Daemon para extraer y formatear datos de MS/MS para búsqueda posterior frente a base de datos de proteína IPI humana (versión 2.0.00 de Mascot, Matrix Science, Inc., Londres, Reino Unido). Los parámetros de búsqueda permitieron 2 escisiones pérdidas para tripsina y una modificación fija de + 57 que corresponde a la carboxiamidación de cisteína. Una tolerancia de masa fue de 1,2 Da para precursores y se especificó una 0,35 Da para fragmentos iónicos. Solamente se exportaron las identificaciones de secuencias de péptidos comunes entre análisis realizados con los montajes de columna grande y pequeña, y con una puntuación ≥ 20 de Mascot para análisis posterior. Se generaron cromatogramas iónicos seleccionados para 100 de estos precursores y a continuación se compararon en términos de intensidad máxima del precursor y ancho del pico de cromatografía, medido de base a base. Por último, se realizó comparación manual de los espectros de MS/MS correspondientes para confirmar la comparación de precursores idénticos.

Las columnas de cromatografía con emisores de electronebulización integrados simples y submicrométricos y métodos para preparar tales columnas permiten el aumento de la eficacia de la ionización y por lo tanto mejores rendimientos de LC-MS. Las puntas emisoras en este régimen de tamaño submicrométrico soportan fácilmente caudales inferiores a 10 nl/min, y ofrecen el potencial de mejorar los límites de detección como resultado del aumento. A continuación se demuestran más ventajas.

Haciendo referencia en particular a la FIG. 4, se muestra una representación de la intensidad del pico del espectro de masas como una función del tamaño de columna (rojo: 360 μm de DO x 50 μm de DI; azul: 360 μm de DO x 25 μm de DI) y caudal de columna (enumerada por encima de cada tamaño de columna, nl/min) para 400 péptidos comunes detectados a través de estas condiciones. La línea de color amarillo muestra la intensidad media del péptido observada a través de esta columna y condiciones del caudal. Claramente, la intensidad del péptido observada muestra una correlación fuerte e inversa para la combinación de tamaño de columna y caudal. Por ejemplo, la intensidad media del péptido usando columna de DI de 25 micrómetros sometida a ensayo a un caudal de 0,75 nl/min es de al menos 10 veces más elevada que la que usa una columna de DI de 50 micrómetros a un caudal de 200 nl/min. En este ejemplo, ambas columnas tienen emisores con diámetro de orificio de 0,75 - 1 μm .

Haciendo referencia ahora a la FIG. 5, se representa el ancho del pico de cromatografía (segundos) como una función del caudal de la columna (nl/min). Los puntos individuales son los péptidos detectados con montajes de columna grande (360 x 50) y pequeña (360 x 25). Los anchos medios de los picos de cromatografía se indican con el color rojo (360 x 50) y el color azul (360 x 25). El montaje de columna más pequeño proporciona un rendimiento cromatográfico superior para todos los caudales usados en este estudio. Además, para caudales inferiores aproximadamente 3 nl/min, los anchos de pico de cromatografía comienzan a ensancharse para montajes de columna tanto grande como pequeña. A pesar de este ensanchamiento del pico, las nuevas columnas todavía proporcionan un aumento significativo del rendimiento.

Haciendo referencia a la FIG. 6, el número de péptidos identificados por MS/MS, con puntuación de Mascot ≥ 40 , se representa como una función del tamaño de columna (rojo: 360 μm de DO x 50 μm de DI; azul: 360 μm de DO x 25 μm de DI) y de caudal columna (enumerada por encima de cada sitio de columna, nl/min). Claramente, el número de péptidos identificados mediante análisis de LC-MS muestra una correlación fuerte e inversa para la combinación del tamaño de columna y caudal. De forma interesante, para el montaje de la columna grande, el ensanchamiento de la banda longitudinal reduce el número de péptidos identificados en el caudal más bajo. En las columnas pequeñas, el flujo volumétrico equivalente proporciona una velocidad lineal cuatro veces más elevada, anulando de ese modo los efectos perjudiciales de la difusión longitudinal. Como resultado, el número total de péptidos identificados usando la columna pequeña continúa aumentando a medida que disminuye el flujo volumétrico.

La FIG. 7 ilustra la reproducibilidad de identificaciones de péptidos observada para análisis de LC-MS/MS a través de los tres caudales más bajos usados para los montajes de columna pequeña (izquierda) y grande (derecha). Aquí, el montaje de la columna pequeña tiene un D.I. de 25 μm y un diámetro del orificio de aproximadamente 0,75 - 1 μm mientras que el montaje de la columna grande tiene un D.I. de 50 μm y un diámetro del orificio de aproximadamente 0,75 - 1 μm . Tomando el diagrama de Venn de la izquierda (que usa una columna de D.I. de 25 μm y un diámetro del orificio de aproximadamente 0,75 - 1 μm) por ejemplo, el círculo más grande indica que las 2206 especies (por ejemplo, péptidos) se detectaron a un caudal de 0,7 nl/min, y el círculo intermedio indica que las 1367 especies se detectaron a un caudal de 3 nl/min. El solapamiento de los dos círculos indica el número de especies comunes que se detectaron ambas a dos caudales diferentes, que en este caso son 1045 péptidos comunes. De forma análoga, el solapamiento de los tres círculos indica el número de especies comunes que se detectaron a tres caudales diferentes. Por lo general, cuanto mayor es el número de especies comunes, más reproducible es la identificación del péptido. Los diagramas de Venn muestran claramente un índice de aumento superior a dos (670 frente a 325) en el número de péptidos comunes observados, por lo tanto demuestra claramente que el montaje de columna más pequeña tiene una reproducibilidad más elevada de identificaciones de péptido.

REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar una columna de cromatografía, columna de cromatografía que comprende:

- 5 un tubo de sílice (10) que comprende
un extremo ahusado (14) que forma un orificio que tiene un diámetro inferior a 3 micrómetros;
una cavidad tubular interior que tiene un diámetro de 75 micrómetros o inferior, y
una frita porosa (16) que comprende silicato;
10 en el que la frita porosa (16) se coloca adyacente al extremo ahusado (14) de 1 a 5 mm desde el orificio y tiene una longitud de aproximadamente 1 a 3 mm;

método que comprende:

- 15 (a) obtener un tubo de sílice (10) que comprende dos extremos abiertos y una cavidad tubular interior con un diámetro de 75 micrómetros o inferior que se extiende entre los dos extremos abiertos;
(b) depositar una composición líquida de silicato en la cavidad tubular interior del tubo en un primer extremo abierto del tubo;
(c) formar un material cerámico poroso a partir de la composición en la cavidad tubular interior del tubo en una posición cercana al primer extremo abierto de modo que se forma un espacio entre el material cerámico y el extremo abierto que está básicamente libre del material cerámico; y
20 (d) formar un emisor ahusado que tiene un diámetro de orificio inferior a 3 micrómetros en el primer extremo abierto.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el material cerámico se forma por calentamiento de la composición.

25 3. El método de la reivindicación 1, en el que el emisor ahusado se forma usando un extractor de pipeta basada en láser.

30 4. El método de la reivindicación 1, en el que el emisor ahusado tiene un diámetro de orificio de 1,5 micrómetros o inferior.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el emisor ahusado se configura para su uso como un emisor de electronebulización.

35 6. El método de la reivindicación 1, en el que la composición líquida de silicato comprende silicato de litio y silicato de tetrametilamonio.

7. El método de la reivindicación 2, en el que el material cerámico se forma por calentamiento de la composición a 300 °C o superior.

40 8. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente rellenar el tubo con una suspensión de perlas que tienen un diámetro de aproximadamente 1,8 µm a 5 µm después de la formación del material cerámico.

9. Una columna de cromatografía que comprende:

- 45 un tubo de sílice (10) que comprende
un extremo ahusado (14) que forma un orificio que tiene un diámetro inferior a 3 micrómetros;
una cavidad tubular interior que tiene un diámetro de 75 micrómetros o inferior, y
una frita porosa (16) que comprende silicato;
50 en la que la frita porosa se coloca adyacente al extremo ahusado de 1 a 5 mm desde el orificio y tiene una longitud de aproximadamente 1 a 3 mm.

10. La columna de cromatografía de la reivindicación 9, en la que el silicato comprende silicato de litio.

55 11. La columna de cromatografía de la reivindicación 9, en la que el orificio tiene un diámetro de 1,5 micrómetros o inferior.

12. La columna de cromatografía de la reivindicación 9, en la que el orificio tiene un diámetro de 0,75 micrómetros o inferior.

60 13. La columna de cromatografía de la reivindicación 10, en la que el silicato comprende adicionalmente silicato de tetrametilamonio.

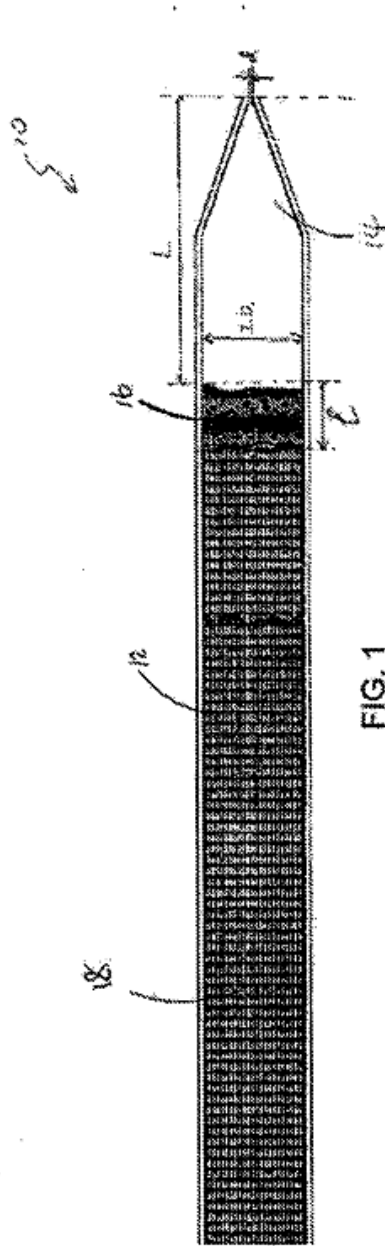
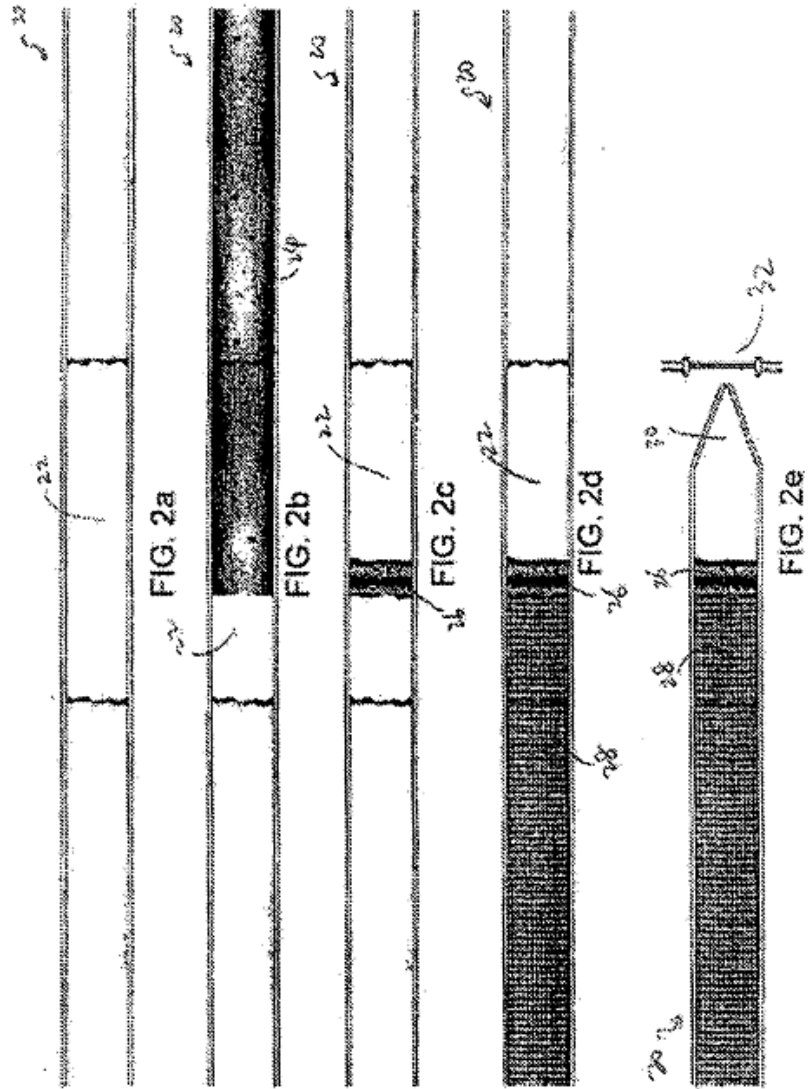


FIG. 1



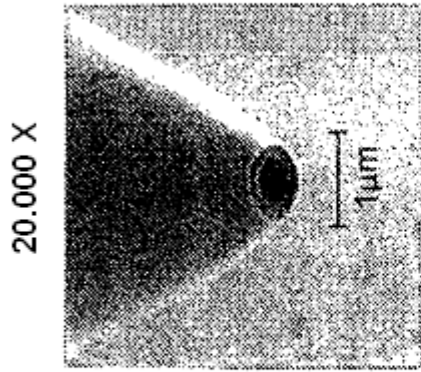
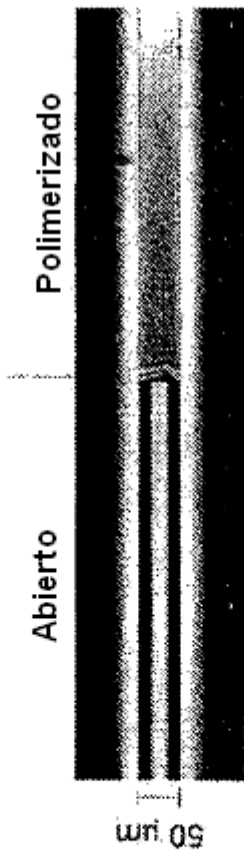
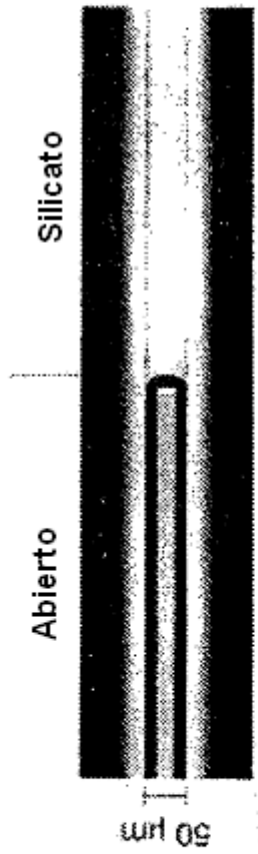


FIG. 3d



FIG. 3e



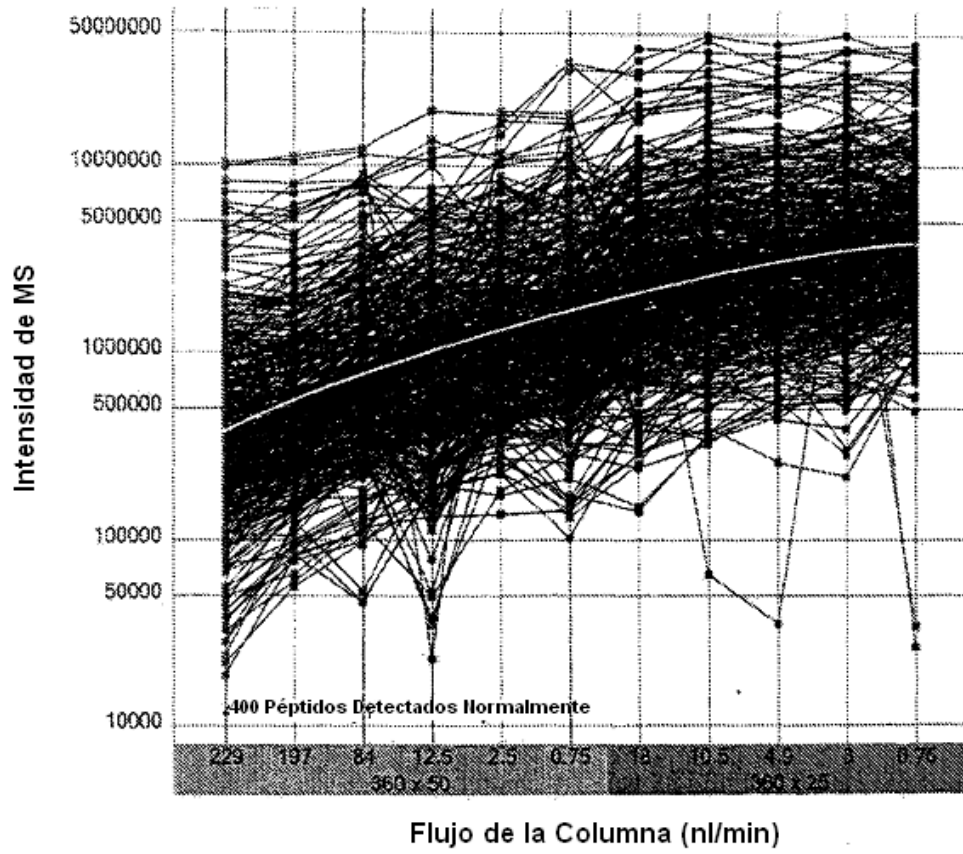


FIG. 4

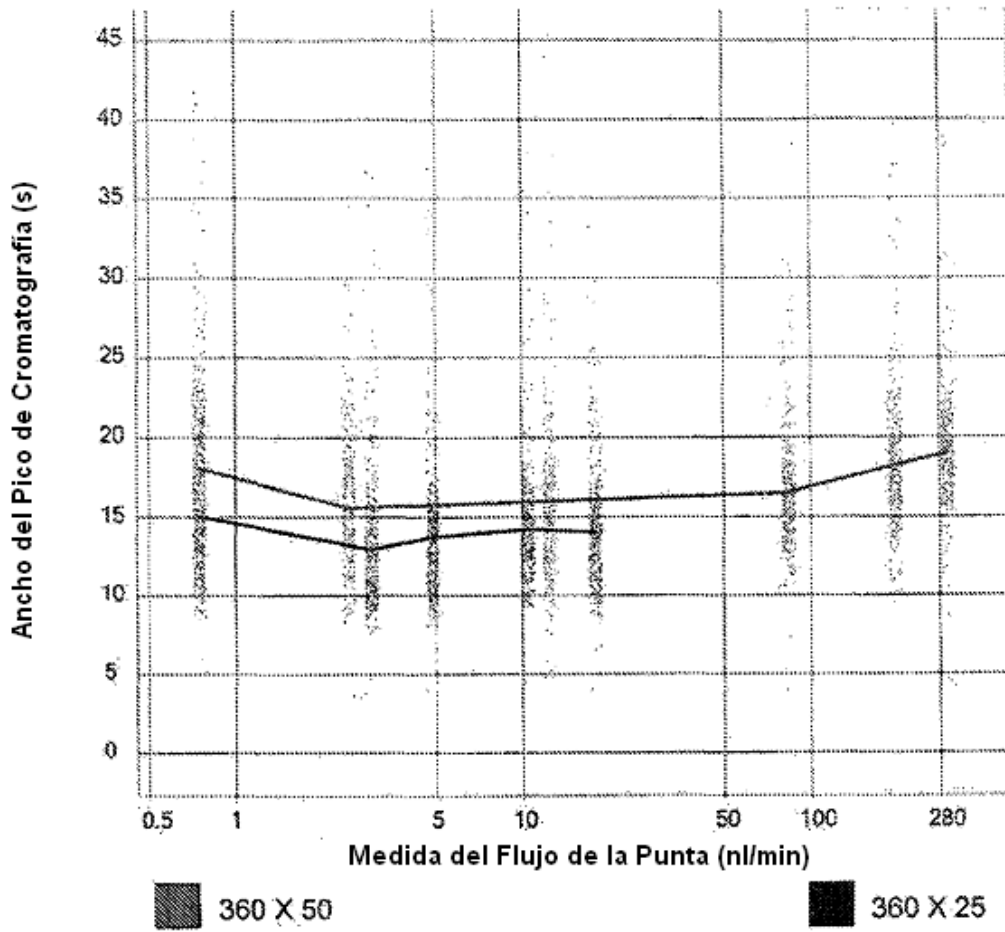
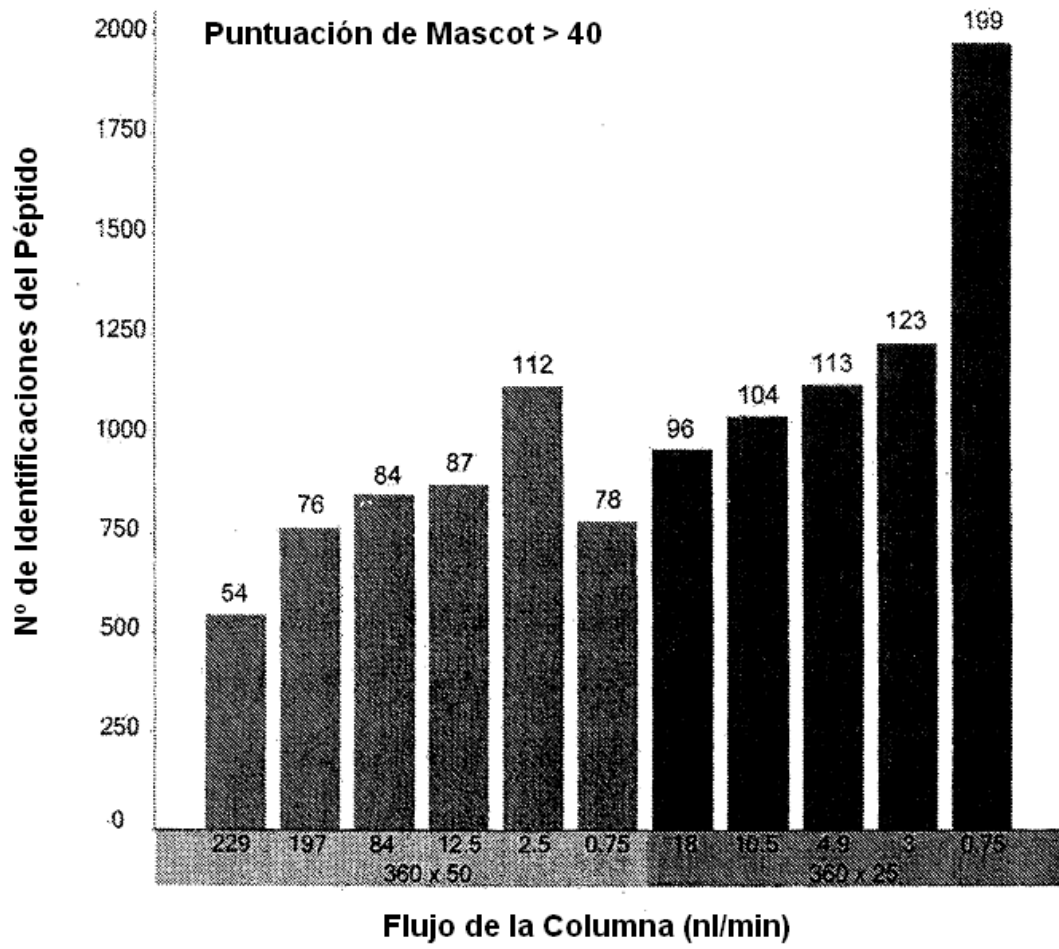


FIG. 5

FIG. 6



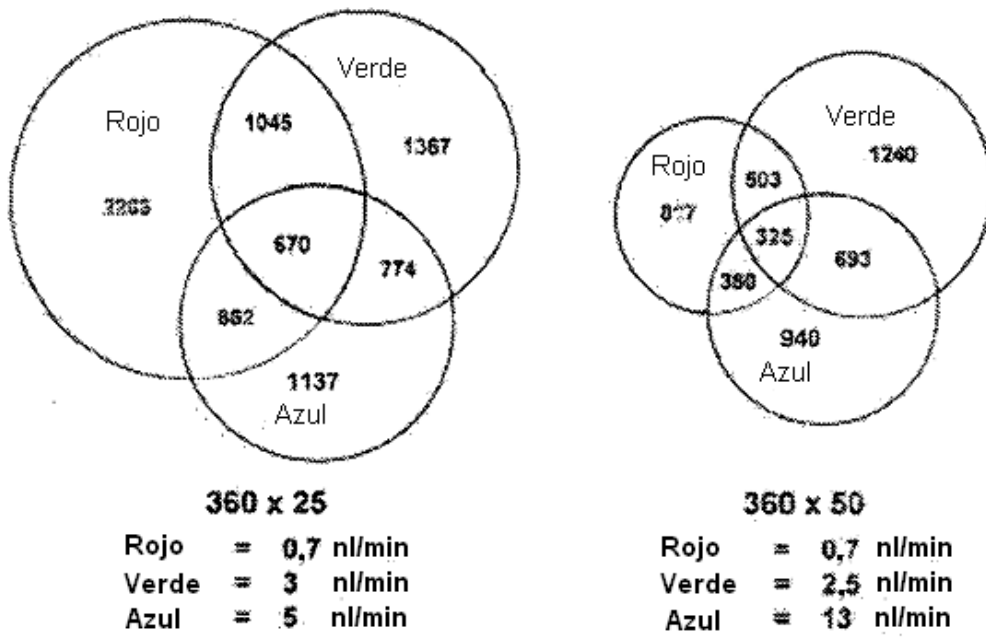


FIG. 7