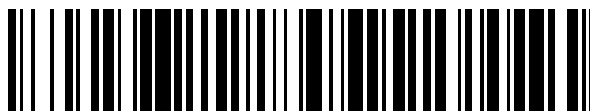


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 830**

51 Int. Cl.:

**H01J 49/02** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2015 PCT/EP2015/072165**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16046396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2015 E 15767557 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 3198628**

54 Título: **Procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas sin limitación de masa**

30 Prioridad:

**26.09.2014 EP 14306498**

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

**17.04.2019**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)  
3 rue Michel-Ange  
75794 Paris Cedex 16, FR y  
UNIVERSITÉ AIX MARSEILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHAMPENOIS, CAROLINE ANTOINETTE  
MADELEINE;  
HILICO, LAURENT;  
JOUVET, CHRISTOPHE MICHEL RENÉ;  
PEDREGOSA GUTIERREZ, JOFRE;  
KNOOP, MARTINA y  
DEDONDER-LARDEUX, CLAUDE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 709 830 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

Procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas sin limitación de masa

**Campo**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas y, más particularmente, a un procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas sin limitación de masa. El presente procedimiento de detección no tiene un límite superior ni inferior en el rango de masas. El presente procedimiento de detección permite, en particular, la detección de partículas cargadas que tienen una masa mayor de  $10^6$  Da. Dichas partículas pueden ser, por ejemplo, átomos, moléculas, agrupaciones, nanopartículas, biomoléculas, virus, ADN, etc. Más generalmente, dichas partículas pueden ser cualquier tipo de partícula biológica.

**10 Antecedentes**

En la actualidad, se usan dos técnicas principales para detectar partículas cargadas, o iones. En la presente memoria, la expresión "detectar partículas cargadas" significa "determinar la presencia de al menos una partícula cargada, o la ausencia de cualquier partícula cargada".

15 La primera se basa en la espectrometría de masas FTICR ("Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, "resonancia ión-ciclotrón con transformada de Fourier"). Los iones son atrapados por un campo magnético estático homogéneo de una trampa Penning, y son excitados a sus frecuencias de ciclotrón resonante por un campo eléctrico estático espacialmente inhomogéneo de dicha trampa Penning. Los iones de la misma masa y la misma relación M/Z masa-a-carga se hacen girar a continuación a su frecuencia de ciclotrón, como un "paquete" de iones, y generan una señal eléctrica medible. La transformada de Fourier de esta señal eléctrica da acceso a un espectro de masas. La espectrometría de masas FTICR es una técnica de alta resolución, pero está limitada a la detección de partículas que tienen una masa menor o igual a  $10^6$  Da, debido a la amplitud requerida del campo magnético necesario para atrapar las partículas.

20 La segunda técnica se basa en la espectrometría de masas TOF ("Time-Of-Flight", "Tiempo de vuelo"), en la que la relación M/Z masa-a-carga de un ion se determina mediante una medición de tiempo. Los iones son acelerados por un campo eléctrico de intensidad conocida. Después de esta aceleración, todos los iones de la misma carga tienen la misma energía cinética. La velocidad de los iones depende de su relación M/Z masa-a-carga. Se mide el tiempo requerido para que los iones lleguen a un detector a una distancia conocida. Las relaciones M/Z masa-a-carga de los iones se obtienen a partir de este momento y de los parámetros experimentales conocidos. Sin embargo, los iones se destruyen cuando se detectan: de hecho, la detección de iones implica bombardear el ión contra una superficie semiconductor, causando la extracción de los electrones de dicha superficie. La señal asociada a los electrones extraídos es amplificada, por ejemplo, con un multiplicador de electrones y, de esta manera, se genera una señal observable para cada ion que bombardea la superficie. La extracción de los electrones desde la superficie semiconductores implica también un impulso mínimo para los iones; dicho impulso mínimo puede proporcionarse a iones que tienen una masa inferior a  $10^6$  Da.

25 En la patente US 2008/0230692 A1 se describen un procedimiento y un sistema de espectrometría de masas de alta resolución para el análisis de proteínas completas y otras moléculas de gran tamaño. Este documento se refiere, en particular, a la provisión de un procedimiento de inyección de iones dentro de una trampa de iones, con el fin de extender el intervalo de masas de trabajo de un espectrómetro de masas de trampa de iones y permitir, de esta manera, un análisis en tiempo real de moléculas de gran tamaño que tienen una masa de más de 20 kDa. El procedimiento de inyección propuesto se basa en una técnica MALDI ("Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization", "ionización/desorción mediante láser asistida por matriz"). A continuación, el documento US 2008/0230692 A1 usa espectrometría de masas TOF: los iones son fragmentados por colisión con una superficie a alta temperatura, a continuación, los fragmentos son ionizados mediante ionización de impacto de electrones y los fragmentos ionizados son detectados finalmente con un multiplicador de electrones clásico. De esta manera, el procedimiento propuesto es destructivo para los iones detectados. La ionización por impacto de electrones depende en gran medida además de la naturaleza de los fragmentos, induciendo a que la eficiencia de la detección no sea constante según los iones a detectar. Por lo tanto, el procedimiento propuesto es inapropiado para mediciones cuantitativas y comparativas de dos tipos diferentes de iones.

35 El documento US 5 770 857 A (Fuerstenau et al; 23/06/1998) describe un procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas que comprende las etapas de:

- medir un valor de referencia (línea de base) de un parámetro físico (voltaje) de un detector de carga que comprende un tubo de recogida de carga;
- 50 – realizar una inyección de una muestra en el detector de carga, en el que la muestra atraviesa el detector de carga y sale del detector de carga sin quedar atrapada dentro del detector de carga;
- medir un primer valor experimental (voltaje) de al menos un parámetro físico del detector de carga;

- comparar el primer valor experimental con el valor de referencia para determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

En este contexto, existe una necesidad de un procedimiento que permita la detección de iones sin limitación de masa. Existe también una necesidad de un procedimiento que permita una detección no destructiva de iones sin limitación de masa. Existe también una necesidad de un procedimiento que permita una detección no destructiva de un solo ion sin limitación de masa. Existe también una necesidad de un procedimiento que permita una detección no destructiva de un solo ion sin limitación de masa e independientemente de la naturaleza del ion.

### Sumario

La presente invención aborda los problemas técnicos identificados anteriormente. Un objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas que comprende las etapas de:

- medir un valor de referencia de al menos un parámetro físico de una nube de iones confinada en una trampa de iones;
- realizar una inyección de una muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, en el que la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;
- medir un primer valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones;
- comparar el primer valor experimental con el valor de referencia para determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

En la presente memoria, la expresión "detectar partículas cargadas" significa "determinar la presencia de al menos una partícula cargada, o la ausencia de cualquier partícula cargada". En la presente memoria, una partícula cargada, denominada también "ión", es una partícula que tiene al menos una carga. Una partícula cargada puede tener más de una carga, pero no es necesario.

Gracias a un aspecto de la invención, una muestra a ensayar es inyectada a una nube de iones, en el que la nube de iones está confinada en una trampa de iones. Dicha nube de iones está compuesta de iones atómicos. La muestra a ensayar es introducida en la nube de iones, atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones. La muestra a ensayar no queda atrapada dentro de la trampa de iones. La nube de iones permanece confinada en la trampa de iones. En el caso en el que la muestra comprenda al menos una partícula cargada, dicha inyección de la muestra en la nube de iones induce una perturbación de al menos un parámetro físico de la nube de iones. En el caso en el que la muestra no comprenda ninguna partícula cargada, dicho al menos un parámetro físico de la nube de iones permanece sustancialmente inalterado por la inyección de la muestra en la nube de iones. Se miden un valor de referencia y un valor experimental de dicho al menos un parámetro físico de la nube de iones. A continuación, una comparación del valor experimental con el valor de referencia permite determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra. Una partícula cargada, a la que se hace referencia también como una partícula cargada externa, es una partícula que ha sido inyectada en la nube de iones con el propósito de detectar la misma. Una partícula cargada externa puede ser de cualquier tipo. Por ejemplo, una partícula cargada externa puede ser un átomo o un virus. Una partícula cargada externa no está atrapada en la nube de iones. Por el contrario, los iones atómicos de la nube de iones están atrapados. Los iones atómicos de la nube de iones son típicamente átomos simples ionizados individualmente, que pueden ser fácilmente excitados por un láser.

El procedimiento de detección de partículas cargadas según un aspecto de la invención es beneficiosamente no destructivo. De hecho, la presencia de al menos una partícula cargada o la ausencia de cualquier partícula cargada se determina de manera indirecta, usando las propiedades de la nube de iones. Por lo tanto, la muestra a ensayar no se destruye y puede ser reutilizada. En el caso en el que la muestra comprenda al menos una partícula cargada, dicha al menos una partícula cargada puede ser detectada usando el procedimiento según un aspecto de la invención sin destruir dicha al menos una partícula cargada, que puede ser reutilizada por lo tanto para otros experimentos.

De manera beneficiosa, el procedimiento de detección de partículas cargadas según un aspecto de la invención no tiene limitación de masa para las partículas cargadas a ser detectadas. En otras palabras, el procedimiento según un aspecto de la invención no tiene un límite superior ni inferior en el intervalo de masas para las partículas cargadas a ser detectadas. De hecho, el procedimiento según un aspecto de la invención no requiere que la muestra sea atrapada ni fragmentada. El procedimiento según un aspecto de la invención está particularmente adaptado para la detección de partículas cargadas ultra-masivas, que tienen típicamente una masa mayor que  $10^6$  Da. De hecho, cuanto más masiva es una partícula cargada, más lentamente puede moverse y puede perturbar en mayor medida la nube de iones. Sin embargo, cada partícula cargada que atraviesa la nube de iones induce una perturbación medible de la nube de iones y, de esta manera, puede ser detectada, independientemente de la masa de dicha partícula cargada. De esta manera, el procedimiento según un aspecto de la invención permite de manera beneficiosa la detección de una única partícula

cargada.

Aparte de las características indicadas anteriormente en el párrafo anterior, el procedimiento de detección de luz según un aspecto de la invención puede tener una o varias características complementarias de entre las siguientes características consideradas individualmente o en cualquier combinación técnicamente posible:

- 5
- El al menos un parámetro físico de la nube de iones es beneficiosamente la fluorescencia de la nube de iones. De hecho, un objetivo es medir con precisión una variación de temperatura de la nube de iones, sin interferir con dicha variación. Una medición de la fluorescencia de la nube de iones no modifica la temperatura de la nube de iones.
- 10
- La etapa de medir un primer valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones se realiza de manera beneficiosa después de que la muestra ha atravesado la nube de iones y ha salido de la nube de iones. De hecho, en el caso en el que el paso de la muestra a través de la nube de iones induce una modificación de al menos un parámetro físico de la nube de iones, dicha modificación es beneficiosamente persistente. En otras palabras, la nube de iones mantendrá el valor modificado de su al menos un parámetro físico al menos durante una duración significativa y no volverá automática e inmediatamente al valor inicial de su al menos un parámetro físico. La expresión "durante una duración significativa" significa que la nube de iones mantiene el valor modificado de su al menos un parámetro físico durante una duración que es suficiente para que dicho al menos un parámetro físico sea medido.
- 15
- La etapa de medir un primer valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada durante el paso de la muestra a través de la nube de iones y después de que la muestra sale de la nube de iones.
- 20
- La etapa de medir un valor de referencia de al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada antes de la inyección de la muestra en la nube de iones. De esta manera, la etapa de medir un valor de referencia de al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada antes de que pueda ocurrir cualquier perturbación de dicho al menos un parámetro físico de la nube de iones.
- 25
- El procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas comprende además la etapa de analizar el primer valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones con el fin de:
    - o determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra, y
    - o en el caso en el que se ha detectado la presencia de al menos una partícula cargada, determinar el número de carga de dicha al menos una partícula cargada.
- 30
- El procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas comprende además las etapas de:
    - o guiar de nuevo la muestra que ha salido de la nube de iones hacia la nube de iones;
    - o realizar una segunda inyección de la muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, en el que la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;
    - o medir un segundo valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones;
    - o comparar los valores experimentales primero y segundo con el valor de referencia con el fin de determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.
- 35
- La nube de iones tiene:
    - o una primera temperatura antes de que la muestra sea inyectada en la nube de iones, y
    - o una segunda temperatura después de que la muestra ha atravesado la nube de iones y ha salido de la nube de iones;
- 40
- en el que la segunda temperatura es sustancialmente igual a la primera temperatura cuando la muestra no comprende partículas cargadas, y la segunda temperatura es mayor que la primera temperatura cuando la muestra comprende al menos una partícula cargada.
- 45
- Antes de la etapa de realizar una inyección de una muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, la nube de iones tiene una temperatura menor de  $-173,15^{\circ}\text{C}$  (100 K).

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes tras un examen de las especificaciones detalladas a continuación y los dibujos adjuntos.

### Breve descripción de las figuras

- 5
- La Figura 1 ilustra esquemáticamente un procedimiento de detección de partículas cargadas según una primera realización de la invención.
  - La Figura 2 ilustra esquemáticamente un diagrama de la modificación de la señal de fluorescencia de una nube de iones confinada en una trampa de iones, inducida por una muestra inyectada en la nube de iones, según la primera realización de la invención.
- 10
- La Figura 3 ilustra esquemáticamente un procedimiento de detección de partículas cargadas según una segunda realización de la invención.
  - La Figura 4 ilustra esquemáticamente un procedimiento de detección de partículas cargadas según una tercera realización de la invención.

### Descripción detallada de la realización preferida

15 Algunas realizaciones de aparatos y procedimientos según las realizaciones de la presente invención se describen a continuación, solo a modo de ejemplo, y con referencia a los dibujos adjuntos. La descripción debe considerarse como de naturaleza ilustrativa y no como limitada.

La Figura 1 ilustra esquemáticamente un procedimiento 1 de detección de partículas cargadas según una primera realización de la invención.

El procedimiento 1 según la primera realización de la invención comprende:

- 20
- una etapa st00 de medición de un valor de referencia de al menos un parámetro físico de una nube de iones confinada en una trampa de iones;
  - una etapa st10 de realización de una inyección de una muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, en el que la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;
- 25
- una etapa st20 para medición de un valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones;
  - una etapa st30 de comparación del valor experimental con el valor de referencia para determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

30 Se hace referencia a los iones de la nube de iones como "iones" o "iones de detección". Típicamente, los iones de detección son iones atómicos cargados individualmente o de carga única. Los iones de detección son excitados por la luz láser que cumple una condición de resonancia, es decir, luz láser a una longitud de onda que coincide con una transición atómica de los iones de detección. Los iones de detección pueden ser típicamente iones de magnesio o iones de calcio.

Por ejemplo:

- los iones de magnesio cargados individualmente de masa  $M = 28$  Da y carga  $Z = + 1$  e tienen una relación carga-a-masa  $M/Z = 28$  Da/e, y
- los iones de calcio cargados individualmente de masa  $M = 40$  Da y carga  $Z = + 1$  e tienen una relación carga-a-masa  $M/Z = 40$  Da/e,

con  $1 \text{ Da} \approx 1,660 \times 10^{-27} \text{ kg}$  y  $e \approx 1,602 \times 10^{-19} \text{ C}$ .

40 La nube de iones puede comprender típicamente entre 500 y 1.000 iones de detección. Las dimensiones de la nube de iones son típicamente del orden de un milímetro. La dinámica de la nube de iones está controlada por el potencial de confinamiento, la repulsión de Coulomb entre los iones de la nube y el enfriamiento por láser. El potencial de confinamiento es típicamente del orden de unos pocos cientos de voltios. Típicamente, la nube de iones es enfriada con láser a una primera temperatura que es menor de  $-173,15^\circ\text{C}$  (100 K). La nube de iones puede ser enfriada con láser a una primera temperatura que es menor de  $-272,15^\circ\text{C}$  (1 K). Típicamente, se usa solo un dispositivo láser tanto para excitar los iones de detección como para enfriar la nube de iones. La excitación de los iones de detección puede ser realizada de manera permanente, de una manera continua, pero no es necesario. En tal caso, con la excitación permanente de los iones de detección y con un solo dispositivo láser, se eligen los parámetros experimentales de dicho dispositivo láser, tales como la potencia y el desplazamiento de frecuencia, con el fin de mantener los iones de detección fríos. Dichos

45

5 parámetros experimentales del dispositivo láser se eligen también de manera que el enfriamiento de los iones de detección no sea demasiado fuerte y una perturbación de la nube de iones inducida por una muestra sea detectada fácilmente. Los parámetros de captura de la trampa de iones se eligen según los iones de detección a ser atrapados. De hecho, los parámetros de captura dependen de la relación carga-a-masa  $M/Z$  de los iones de detección. En otras palabras, la trampa de iones es selectiva en la relación carga-a-masa  $M/Z$  y la elección de los parámetros de captura experimentales pueden ser optimizados de manera que una primera especie de iones de detección sea atrapada mientras que una segunda especie de partículas cargadas externas no sea atrapada.

10 Un confinamiento estable en una trampa de iones viene determinado por la frecuencia  $\Omega/2\pi$  y la amplitud  $V_{rf}$  de la tensión alterna de captura de radiofrecuencia que se aplica, y por la amplitud de la tensión  $U_{dc}$  de captura estática (en el caso en el que se aplica una tensión de captura estática). Un confinamiento estable en una trampa de iones viene determinado también por las dimensiones espaciales de la trampa de iones y por la relación carga-a-masa  $M/Z$  de los iones a atrapar. En el caso en el que tanto los iones de detección como la partícula cargada externa a detectar tienen la misma relación carga-a-masa  $M/Z$ , la energía cinética de la partícula cargada a detectar se elige entonces de manera que sea mayor que la profundidad del pozo de potencial de confinamiento. De esta manera, la primera especie de iones de detección puede permanecer atrapada mientras que la segunda especie de partículas cargadas externas permanece no atrapada.

15 Antes de la etapa st00 de medición de un valor de referencia de al menos un parámetro físico de la nube de iones, dicha nube de iones es enfriada con láser a una primera temperatura, y está en un primer estado denominado "primer estado de equilibrio". Según un ejemplo particular, la primera temperatura de la nube de iones es del orden de  $-273,14^{\circ}\text{C}$  (10 mK).

20 La etapa st00 de medición de un valor de referencia de al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada antes de la etapa st10 de realización de una inyección de una muestra en la nube de iones. De esta manera, el valor de referencia es característico del primer estado de equilibrio.

25 La etapa st10 de realización de una inyección de una muestra en la nube de iones puede inducir una perturbación del primer estado de equilibrio, resultando en que la nube de iones pasa a un segundo estado de equilibrio. Para realizar una inyección de una muestra en la nube de iones, pueden usarse varios procedimientos de inyección conocidos. Por ejemplo, es posible inyectar una muestra en la nube de iones usando una lente de inyección. También es posible inyectar una muestra en la nube de iones usando deflectores y un tubo de vuelo corto. También es posible inyectar una muestra en la nube de iones usando una lente de tubo de enfoque y una guía de iones de octopolar. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos. Después de la etapa st10, es decir, después de que la muestra es inyectada en la nube de iones, atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones, la nube de iones tiene una segunda temperatura.

30 En el caso en el que la muestra no comprende ninguna partícula cargada, el primer estado de equilibrio no es perturbado sustancialmente por la inyección de la muestra y la nube de iones permanece en el primer estado de equilibrio. Como consecuencia, la segunda temperatura es sustancialmente igual a la primera temperatura.

35 En el caso en el que la muestra comprende al menos una partícula cargada, el primer estado de equilibrio es perturbado por la inyección de la muestra y la nube de iones pasa al segundo estado de equilibrio. Como consecuencia, la segunda temperatura es sustancialmente mayor que la primera temperatura: típicamente hay un factor 10 entre la primera temperatura y la segunda temperatura. En el caso en el que la primera temperatura de la nube de iones es del orden de  $-273,14^{\circ}\text{C}$  (10 mK), la segunda temperatura de la nube de iones es, de esta manera, del orden de al menos  $-273,05^{\circ}\text{C}$  (100 mK).

40 Un objetivo es medir con precisión la perturbación, es decir, la variación de temperatura, sin interferir con dicha perturbación. En otras palabras, la medición de la perturbación no modifica la perturbación. La medición de la variación de temperatura de la nube de iones permite de esta manera determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

45 La perturbación, es decir, la variación de temperatura, causa una modificación de la señal de fluorescencia de la nube de iones. Cabe señalar que dicha variación de temperatura de la nube de iones es persistente y, de esta manera, que dicha modificación de la señal de fluorescencia de la nube de iones es persistente. En otras palabras, la nube de iones mantendrá la segunda temperatura al menos durante una duración significativa y no volverá automáticamente e inmediatamente a la primera temperatura. En la presente memoria, la expresión "durante una duración significativa" significa que la nube de iones mantiene la segunda temperatura durante una duración que es suficiente para que la señal de fluorescencia asociada a dicha temperatura sea medida. De esta manera, una duración significativa puede ser del orden de 1 milisegundo. Una medición de la fluorescencia de la nube de iones no modifica la temperatura de la nube de iones.

50 El al menos un parámetro físico de la nube de iones del cual se miden un valor de referencia y un valor experimental es, por lo tanto, y de manera beneficiosa, la intensidad de fluorescencia, denominada también "señal de fluorescencia", de la nube de iones. Por lo tanto, el procedimiento 1 de detección de partículas cargadas según la primera realización de la

invención comprende beneficiosamente una etapa st20 de medición de un valor experimental de la intensidad de fluorescencia de la nube de iones. El valor experimental de la intensidad de fluorescencia de la nube de iones es medido típicamente usando un detector de fluorescencia, tal como un contador de fotones. De manera alternativa, el al menos un parámetro físico de la nube de iones del cual se miden un valor de referencia y un valor experimental puede ser la frecuencia de excitación de los electrones de la nube de iones.

En condiciones experimentales típicas, un solo ion de detección puede emitir una señal de fluorescencia que comprende aproximadamente  $10^7$  fotones por segundo, es decir,  $10^4$  fotones por milisegundo. Considerando una nube de iones que comprende 1.000 iones de detección, dicha nube de iones puede emitir, de esta manera, una señal de fluorescencia que comprende aproximadamente  $10^7$  fotones por milisegundo. El detector de fluorescencia puede tener una eficiencia de aproximadamente  $10^{-3}$ , teniendo en cuenta, por ejemplo, el ángulo sólido, la ganancia, la transmisión y la absorción de la óptica de dicho detector de fluorescencia. De esta manera, es posible detectar una señal que comprende aproximadamente  $10^4$  fotones por milisegundo, a partir de la señal emitida por la nube de iones y que comprende aproximadamente  $10^7$  fotones por milisegundo. Para una buena fiabilidad de detección, la perturbación del al menos un parámetro físico de la nube de iones debida al paso de una muestra que comprende al menos una partícula cargada es superior a las fluctuaciones estadísticas de la señal de referencia, que se mide antes de la inyección de la muestra en la nube de iones, y de la señal experimental, que se mide después de que la muestra ha atravesado la nube de iones y ha salido de la nube de iones. En otras palabras, la relación señal-a-ruido entre la señal de referencia y la señal experimental es mayor que las fluctuaciones estadísticas de la señal de referencia y de la señal experimental. Las fluctuaciones estadísticas de una señal dependen de la amplitud de dicha señal: en el ejemplo de una señal que comprende N fotones, las fluctuaciones estadísticas o el "ruido" de dicha señal es la raíz cuadrada de N:  $\sqrt{N}$ .

En el caso en el que la muestra no comprende ninguna partícula cargada, la señal experimental o el valor experimental es típicamente sustancialmente igual a la señal de referencia o al valor de referencia. Es decir, la señal experimental es igual a la señal de referencia, con un error comprendido dentro de las fluctuaciones estadísticas de la señal de referencia. En el caso en el que la muestra comprende al menos una partícula cargada, la señal experimental o el valor experimental es sustancialmente diferente de la señal de referencia o el valor de referencia. En el caso preferido en el que el al menos un parámetro físico de la nube de iones es la fluorescencia de la nube de iones, el valor experimental es sustancialmente menor que el valor de referencia. Típicamente, el valor experimental es menor o igual al 50% del valor de referencia. Más precisamente, el valor experimental es típicamente menor o igual al 25% del valor de referencia.

La Figura 2 ilustra esquemáticamente un diagrama de la modificación de la señal de fluorescencia de la nube de iones, inducida por una muestra inyectada en la nube de iones, en el que a continuación la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones. La señal de fluorescencia es medida en cuentas por segundo cps. Los parámetros experimentales del ejemplo particular de la Figura 2 son los siguientes:

- la nube de iones comprende N = 500 iones;
- la muestra comprende una sola partícula cargada, en la que la partícula cargada tiene una masa M =  $10^6$  Da;
- la amplitud de la tensión alterna de captura de radiofrecuencia es:  $V_{rf} = 400$  V;
- la frecuencia de la tensión alterna de captura de radiofrecuencia es:  $\Omega/2\pi = 5,25$  MHz;
- la amplitud de la tensión de captura estática es:  $U_{dc} = 10$  V;
- la muestra tiene una energía incidente  $E_c = 25$  eV;
- el detector de fluorescencia tiene una eficiencia de  $10^{-3}$ .

La energía incidente de la muestra es determinada y controlada durante un procedimiento de creación de dicha muestra y, a continuación, durante un procedimiento de guiado de dicha muestra. Típicamente, el procedimiento de guiado de la muestra permite ralentizar o acelerar la muestra. El procedimiento de creación de la muestra puede usar, por ejemplo, una técnica de ionización por electropulverización ESI, tal como se describe más adelante. El procedimiento de guiado de la muestra puede usar, por ejemplo, campos eléctricos de intensidad conocida.

La Figura 2 muestra que la modificación de la señal de fluorescencia de la nube de iones puede ser observada en una escala temporal del orden de 1 milisegundo. En el ejemplo particular de la Figura 2, la señal de fluorescencia tomada 5 milisegundos después del comienzo de la grabación es de aproximadamente 10.000 cps, y la señal de fluorescencia tomada 6 milisegundos después del comienzo de la grabación es de aproximadamente 2.000 cps. Por lo tanto, la Figura 2 muestra una disminución de aproximadamente 10.000 cps a aproximadamente 2.000 cps, es decir, una disminución del 80%, en una escala temporal del orden de 1 milisegundo.

La etapa st00 de medición de un valor de referencia de al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada

antes de la inyección de la muestra en la nube de iones, es decir, antes de que pueda ocurrir cualquier perturbación de la nube de iones.

5 La etapa st20 de medición de un valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada después de que la muestra haya atravesado la nube de iones y haya salido de la nube de iones, es decir, después de que se haya producido cualquier perturbación de la nube de iones. Un valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones puede ser medido solo después de que la muestra haya salido de la nube de iones, y no durante el tiempo en que la muestra es inyectada en la nube de iones, atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones, debido a la persistencia de la segunda temperatura de la nube de iones, descrita anteriormente.

10 De manera alternativa, la etapa st20 de medición de un valor experimental de al menos un parámetro físico es realizada durante el paso de la muestra a través de la nube de iones y después de que la muestra haya salido de la nube de iones.

15 La etapa st00 de medición de un valor de referencia y la etapa st20 de medición de un valor experimental pueden ser realizadas en una sola acción, es decir, por ejemplo, realizando una sola grabación continua de al menos un parámetro físico de la nube de iones, entre un primer tiempo que ocurre antes de la inyección de la muestra en la nube de iones y un segundo tiempo que ocurre después de que la muestra haya salido de la nube de iones. De manera alternativa, la etapa st00 de medición de un valor de referencia y la etapa st20 de medición de un valor experimental pueden ser realizadas en al menos dos acciones distintas, es decir, por ejemplo, realizando:

- una primera medición del al menos un parámetro físico de la nube de iones en un primer momento que ocurre antes de la inyección de la muestra en la nube de iones, y
- una segunda medición del al menos un parámetro físico de la nube de iones en un segundo tiempo que ocurre:
  - 20     o después de que la muestra haya salido de la nube de iones,
  - o o, de manera alternativa, durante el paso de la muestra a través de la nube de iones y después de que la muestra haya salido de la nube de iones.

25 La primera medición puede ser una primera grabación que ocurre durante una primera duración que comprende el primer momento definido anteriormente. La segunda medición puede ser una segunda grabación que ocurre durante una segunda duración que comprende el segundo momento definido anteriormente. En el caso en el que la primera medición es una primera grabación y la segunda medición es una segunda grabación, de manera beneficiosa, la primera grabación y la segunda grabación no están superpuestas.

En el ejemplo particular descrito con relación a la Figura 2, la señal de fluorescencia de la nube de iones puede ser grabada, de manera beneficiosa, durante todo el experimento, es decir:

- 30     – antes de la inyección de la muestra en la nube de iones, por ejemplo, durante una duración del orden de 1 milisegundo,
- durante el tiempo durante el cual la muestra es inyectada en la nube de iones, atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones, y
- 35     – después de que la muestra haya salido de la nube de iones, típicamente, durante una duración del orden de 1 milisegundo, es decir, más generalmente durante una duración que permite que el detector de fluorescencia mida una señal de fluorescencia que es suficiente para determinar, de una manera fiable, la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

La Figura 3 ilustra esquemáticamente un procedimiento 2 de detección de partículas cargadas según una segunda realización de la invención.

40 El procedimiento 2 según la segunda realización de la invención comprende:

- la etapa st00, descrita anteriormente, de medición de un valor de referencia de al menos un parámetro físico de la nube de iones;
- una etapa st01 de ionización de una muestra;
- 45     – la etapa st10, descrita anteriormente, de realización de una inyección de la muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, en el que la muestra pasa a través de la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;
- la etapa st20, descrita anteriormente, de medición de un valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones;



- la etapa st30, descrita anteriormente, de comparación del valor experimental con el valor de referencia con el fin de determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

5 Antes de la etapa st01 de ionización de la muestra, la muestra puede comprender al menos una partícula no cargada. Después de la etapa st01 de ionización de la muestra, la muestra no comprende ninguna partícula no cargada. En otras palabras:

- en un primer caso, la muestra comprende inicialmente al menos una partícula, cargada o no cargada. En dicho primer caso, después de la etapa st01 de ionización de la muestra, todas las partículas de la muestra están cargadas;
- 10 – en un segundo caso, la muestra está vacía y no comprende ninguna partícula. En dicho segundo caso, la etapa st01 de ionización de la muestra no tiene efecto.

15 La etapa st01 de ionización de la muestra puede ser realizada usando una técnica de ionización por electropulverización ESI. La técnica de ionización por electropulverización ESI crea partículas cargadas en un estado altamente cargado, lo cual no es necesario para el procedimiento según una realización de la invención. De hecho, el procedimiento de detección de partículas cargadas según una realización de la invención permite la detección de partículas cargadas en un estado de baja carga, es decir, de partículas cargadas que tienen al menos una carga.

De manera alternativa, la etapa st01 de ionizar la muestra puede ser realizada, de manera beneficiosa, usando una técnica MALDI ("Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization", "ionización/desorción mediante láser asistida por matriz"). De hecho, la técnica MALDI produce iones que tienen muchas menos cargas múltiples que la técnica ESI.

20 Durante el procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas según cualquiera de las realizaciones de la invención, no se destruyen ni la muestra ni la nube de iones.

- Después de salir de la trampa de iones, típicamente, la muestra continúa su trayectoria. Típicamente, la muestra puede ser ralentizada por su paso a través de la nube de iones. La muestra puede ser reutilizada para otros experimentos y, en particular, para el procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas según una realización de la invención.
- 25 – Tal como se ha descrito anteriormente, antes de ser atravesada por la muestra, la nube de iones es enfriada con láser a una primera temperatura. Después de ser atravesada por la muestra, la nube de iones tiene una segunda temperatura que puede ser típicamente mayor que la primera temperatura. De hecho, el paso de una muestra que comprende al menos una partícula cargada a través de la nube de iones induce un calentamiento de la nube de iones. En ese caso, la temperatura de la nube de iones puede ser devuelta a su valor inicial, es decir, a la primera temperatura, modificando los parámetros del láser de enfriamiento. La nube de iones puede ser reutilizada para otros experimentos y, en particular, para el procedimiento no destructivo de detección de partículas cargadas según una realización de la invención.
- 30

35 El procedimiento de detección de partículas cargadas según una realización de la invención puede comprender además una etapa de caracterización y/o de identificación de partículas cargadas. La etapa de caracterización y/o de identificación de partículas cargadas puede usar, por ejemplo, una técnica TOF ("Time-Of-Flight") de tiempo-de-vuelo. Si dicha etapa de caracterización y/o de identificación de partículas cargadas no es destructiva, puede ser realizada antes o después de las etapas de detección de partículas cargadas según una realización de la invención. Si dicha etapa de caracterización y/o de identificación de partículas cargadas es destructiva, es realizada después de las etapas de detección de partículas cargadas según una realización de la invención.

40

La Figura 4 ilustra esquemáticamente un procedimiento 3 de detección de partículas cargadas según una tercera realización de la invención.

- El procedimiento 3 según la tercera realización de la invención comprende: la etapa st00 de medición de un valor de referencia de al menos un parámetro físico de una nube de iones confinada en una trampa de iones;
- 45 – la etapa st10 de realización de una inyección de una muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, en la que la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;
- la etapa st20 de medición de un primer valor experimental del al menos un parámetro físico de la nube de iones;
- una etapa st40 de guiado de la muestra que ha salido de la nube de iones de nuevo hacia la nube de iones;
- 50 – una etapa st11 de realización de una segunda inyección de la muestra en la nube de iones confinada en la

trampa de iones, en la que la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;

- una etapa st21 de medición de un segundo valor experimental del al menos un parámetro físico de la nube de iones;
- 5      – una etapa st32 de comparación de los valores experimentales primero y segundo con el valor de referencia para determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

10      Gracias al procedimiento 3 según la tercera realización de la invención, la muestra es inyectada dos veces en la nube de iones y se miden dos valores experimentales del al menos un parámetro físico de la nube de iones. La determinación de la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o de la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra, puede usar de esta manera la comparación de dos valores experimentales, en lugar de uno, con el valor de referencia. El primer valor experimental y el segundo valor experimental pueden ser promediados, por ejemplo, y el valor promedio de los valores experimentales primero y segundo puede ser comparado con el valor de referencia. De esta manera, puede mejorarse la fiabilidad de la determinación. Después de la etapa st21 de medición del segundo valor experimental del al menos un parámetro físico de la nube de iones, por supuesto, es posible:

- guiar de nuevo la muestra que ha salido de la nube de iones hacia la nube de iones;
- realizar una tercera inyección de la muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, en la que la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;
- medir un tercer valor experimental del al menos un parámetro físico de la nube de iones;
- 20      – comparar los valores experimentales primero, segundo y tercero con el valor de referencia para determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

25      Según una variación, el procedimiento 3 puede comprender además una etapa st01 de ionización de una muestra. De esta manera, dicha variación combina el procedimiento 2 según la segunda realización de la invención, descrito anteriormente, con el procedimiento 3 según la tercera realización de la invención. Por ejemplo, la etapa st01 de ionización de una muestra es realizada después de la etapa st00 de medición de un valor de referencia y antes de la etapa st10 de realización de una inyección de la muestra en la nube de iones.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento (1, 2, 3) no destructivo de detección de partículas cargadas que comprende las etapas de:

- medir (st00) un valor de referencia de al menos un parámetro físico de una nube de iones confinada en una trampa de iones;
- 5     – realizar (st10) una inyección de una muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, en la que la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;
- medir (st20) un primer valor experimental del al menos un parámetro físico de la nube de iones;
- 10    – comparar (st30) el primer valor experimental con el valor de referencia para determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

2. Procedimiento (1, 2, 3) no destructivo de detección de partículas cargadas según la reivindicación anterior, en el que el al menos un parámetro físico de la nube de iones es la fluorescencia de la nube de iones.

3. Procedimiento (1, 2, 3) no destructivo de detección de partículas cargadas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de medición (st20) de un primer valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada después de que la muestra haya atravesado la nube de iones y haya salido de la nube de iones.

4. Procedimiento (1, 2, 3) no destructivo de detección de partículas cargadas según la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de medición (st20) de un primer valor experimental de al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada durante el paso de la muestra a través de la nube de iones y después de que la muestra haya salido de la nube de iones.

5. Procedimiento (1, 2, 3) no destructivo de detección de partículas cargadas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa de medición (st00) de un valor de referencia del al menos un parámetro físico de la nube de iones es realizada antes de la inyección de la muestra en la nube de iones.

6. Procedimiento (1, 2, 3) no destructivo de detección de partículas cargadas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de analizar el primer valor experimental del al menos un parámetro físico de la nube de iones para:

- determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra, y
- en el caso en el que se haya detectado la presencia de al menos una partícula cargada, determinar el número de cargas de dicha al menos una partícula cargada.

7. Procedimiento (3) no destructivo de detección de partículas cargadas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además las etapas de:

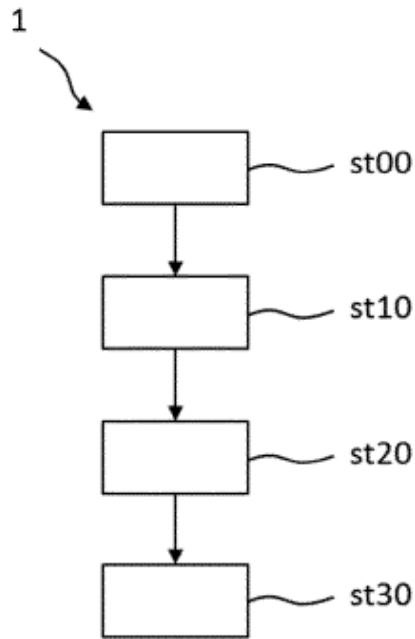
- guiar (st40) de nuevo la muestra que ha salido de la nube de iones hacia la nube de iones;
- 35    – realizar (st11) una segunda inyección de la muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, en la que la muestra atraviesa la nube de iones y sale de la nube de iones sin quedar atrapada dentro de la trampa de iones;
- medir (st21) un segundo valor experimental del al menos un parámetro físico de la nube de iones;
- comparar (st32) los valores experimentales primero y segundo con el valor de referencia para determinar la presencia de al menos una partícula cargada en la muestra, o la ausencia de cualquier partícula cargada en la muestra.

8. Procedimiento (1, 2, 3) no destructivo de detección de partículas cargadas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la nube de iones tiene:

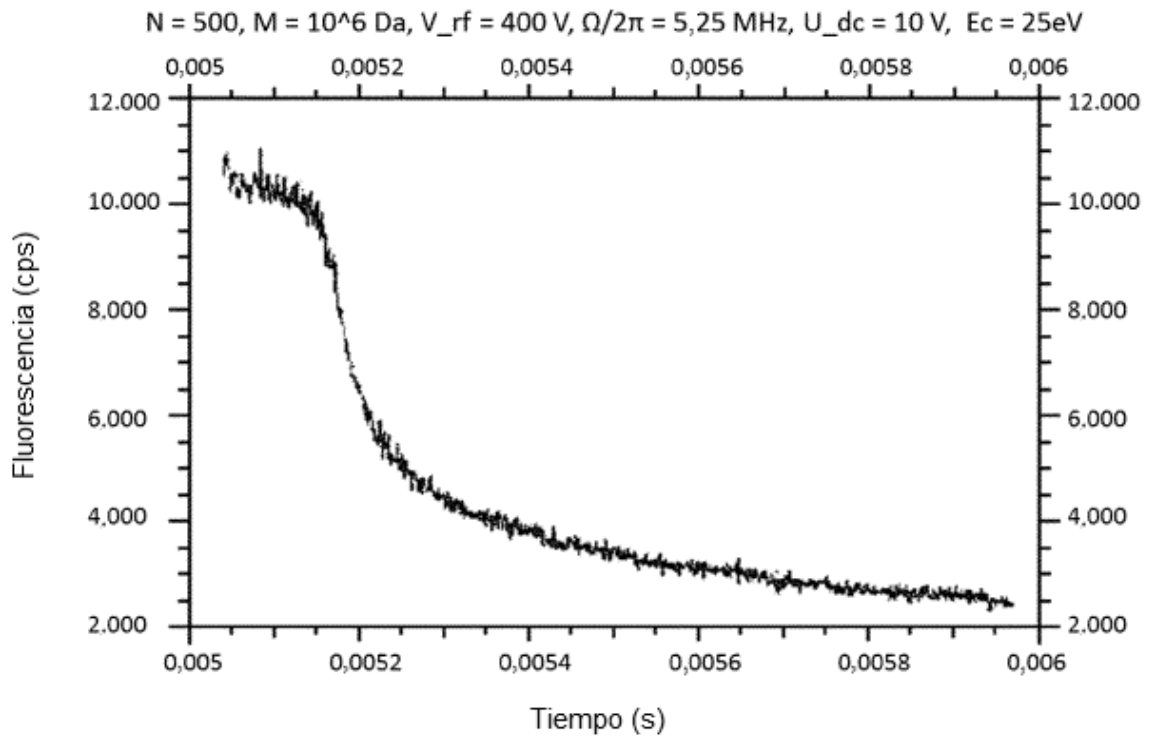
- una primera temperatura antes de que la muestra sea inyectada en la nube de iones, y
- 45    – una segunda temperatura después de que la muestra ha atravesado la nube de iones y ha salido de la nube de iones;

en el que la segunda temperatura es sustancialmente igual a la primera temperatura cuando la muestra no comprende partículas cargadas, y la segunda temperatura es mayor que la primera temperatura cuando la muestra comprende al menos una partícula cargada.

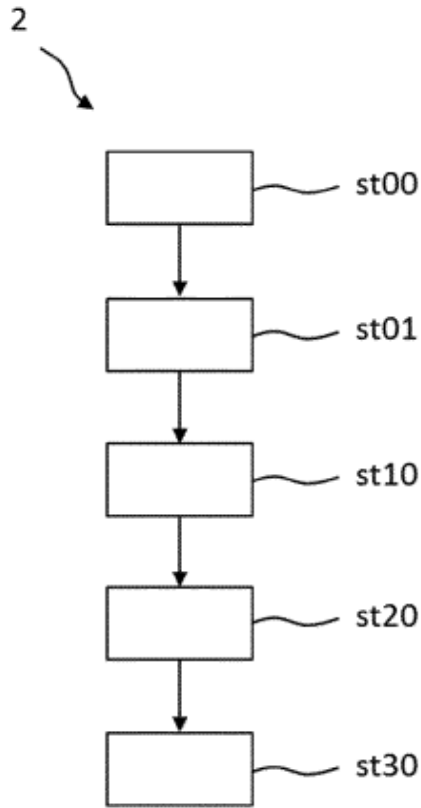
- 5 9. Procedimiento (1, 2, 3) no destructivo de detección de partículas cargadas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, antes de la etapa de realización (st10) de una inyección de una muestra en la nube de iones confinada en la trampa de iones, la nube de iones tiene una temperatura menor de  $-173,15^{\circ}\text{C}$  (100 K).



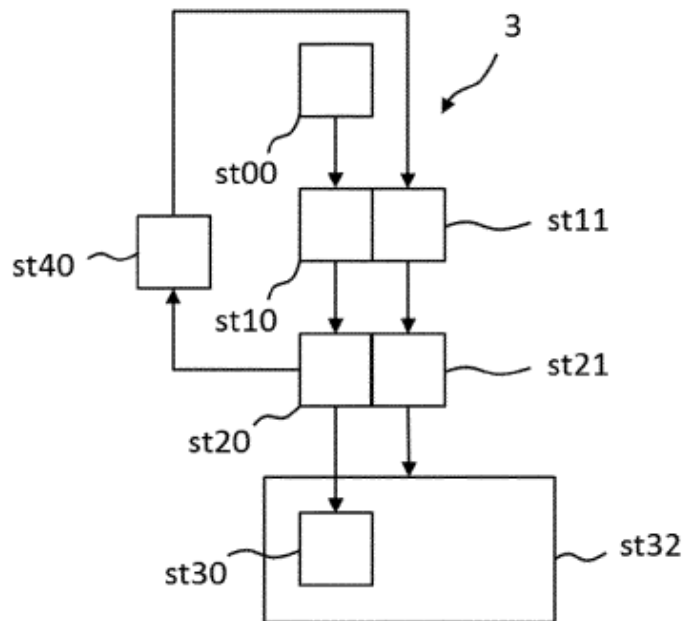
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**