

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 925**

51 Int. Cl.:

B01J 20/26 (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01)
B01J 20/287 (2006.01)
B01J 20/30 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)
B01D 15/32 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2018 PCT/US2018/047950**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2019 WO19040868**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2018 E 18765334 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023 EP 3672723**

54 Título: **Método para preparar copolímeros HLB mejorados**

30 Prioridad:

24.08.2017 US 201762549771 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2024

73 Titular/es:

**SIGMA-ALDRICH CO. LLC (100.0%)
3050 Spruce Street
St. Louis, MO 63103, US**

72 Inventor/es:

**BETZ, WILLIAM;
FRANTZ, CURTIS;
KEELER, MICHAEL;
YE, MICHAEL;
ESPENSCHIED, KEN;
SMITH, SARA y
SMITH, BRITTANY A.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 967 925 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

Método para preparar copolímeros HLB mejorados

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la Solicitud de patente provisional de EE. UU. No. 62/549,771, presentada el 24 de agosto de 2017.

10 Antecedentes

15 Un deseo omnipresente dentro de la química analítica es el desarrollo de un enfoque "universal" para la preparación de muestras que sea útil para una amplia variedad de matrices, desde muestras ambientales y agroquímicas, a muestras biológicas, a muestras farmacéuticas, a alimentos y bebidas. Estas muestras suelen incluir tanto analitos de interés como analitos no deseados o interferentes. La extracción de fase sólida (SPE) se ha utilizado durante mucho tiempo como una técnica de preparación de muestras, capaz de simplificar la matriz mediante la eliminación de analitos no deseados, así como el enriquecimiento de trazas para analitos de interés.

20 Para aplicaciones SPE, los adsorbentes típicos consisten en sílice, carbono u otros adsorbentes que se utilizan típicamente como cromatografía líquida (LC) y empaque de HPLC. Estos adsorbentes están limitados primero en los analitos no deseados que se pueden eliminar de una muestra, ya que cada uno puede funcionar bien para algunas clases de analitos, pero no tan bien para otros. Además, estos materiales deben ser activados o pretratados antes de su uso para permitir un rendimiento óptimo, añadiendo pasos adicionales y tiempo necesario para un análisis. Además, el rendimiento se puede perder si se permite que el material se seque durante el uso, un problema conocido como el efecto de secado excesivo.

30 Aunque el número y variedad de analitos en una muestra dada ha planteado un gran desafío, el descubrimiento de polímeros de equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) para la extracción de fase sólida (SPE) ha aumentado la viabilidad de la idea de un sorbente SPE genérico. La tecnología HLB es el material SPE más utilizado debido a la versatilidad y la amplia gama de analitos que abarca. Las resinas HLB son copolímeros compuestos por un monómero hidrófilo y un monómero lipófilo. Aunque todavía se considera un sorbente de fase inversa, la presencia del monómero hidrófilo aumenta la retención de analitos polares, permitiendo que una sola extracción sea efectiva para una amplia gama de analitos (por ejemplo, ácidos, neutros, bases, polares y no polares).

35 Actualmente, hay varios productos HLB SPE en el mercado. El sorbente HLB más común es un copolímero que contiene *N*-vinilpirrolidona (VP) como componente hidrófilo y divinilbenceno (DVB) como monómero lipófilo.

40 Aunque ampliamente utilizado para aplicaciones SPE HLB, la naturaleza de los copolímeros de vinilpirrolidona-divinilbenceno, sin embargo, limita su utilidad. Estos copolímeros de vinilpirrolidona y divinilbenceno no son repetibles y dan lugar a la retención y a la variabilidad máxima de la forma en los procesos de separación cromatográfica. La solubilidad en agua de la vinilpirrolidona da como resultado la polimerización de la vinilpirrolidona en la interfase de gotas de comonómero/agua durante el proceso de polimerización de la suspensión. El uso de vinilpirrolidona, que también se utiliza ampliamente como tensoactivo de superficie en procesos de polimerización en suspensión, conduce a la irreproducibilidad en la secuencia de copolímeros. Por lo tanto, un aumento en la superficie de divinilbenceno (hidrófobo) en los poros más profundos del polímero esférico y poroso conduce a una selectividad sesgada dentro del copolímero poroso. Esta selectividad sesgada ha limitado el desarrollo de adsorbentes HLB capaces de adsorber analitos de manera efectiva en una amplia gama de tamaños y químicos. Existe una necesidad de adsorbentes HLB mejorados que puedan eliminar de manera efectiva y simultánea analitos que varían mucho tanto en tamaño como en propiedades.

50 Además, los productos SPE convencionales suelen seguir un flujo de trabajo SPE tradicional que tiene 5 pasos: acondicionamiento, equilibrio, carga, lavado y elución. La capacidad de un sorbente HLB para extraer con éxito una variedad de analitos puede reducir el número total de extracciones que se requieren, sin embargo, el proceso todavía puede consumir bastante tiempo. Mientras que algunos adsorbentes HLB se han adaptado para trabajar en un proceso simplificado, todavía existe la necesidad de adsorbentes HLB mejorados capaces de extraer analitos sin la necesidad de pasos de acondicionamiento y equilibrio.

60 En consecuencia, sería útil desarrollar nuevos adsorbentes poliméricos útiles para SPE y otras técnicas de separación. Idealmente, los nuevos polímeros serían útiles para la extracción eficiente y simultánea de analitos de diversas propiedades, incluyendo ácidos, bases, analitos neutros, fuertemente polares, moderadamente polares y no polares, y de diferente tamaño, incluyendo moléculas pequeñas y moléculas grandes, en una variedad de disolventes y en un amplio rango de pH. Estos nuevos adsorbentes poliméricos deberían ser idealmente resistentes a los efectos de secado excesivo observados con muchos adsorbentes convencionales, permitiendo así su uso en un flujo de trabajo simplificado.

65 EP 2664366 A2 divulga el sistema cromatográfico para materiales macro porosos monolíticos.

Breve descripción de la invención

5 En la presente se proporcionan métodos para preparar adsorbentes poliméricos de equilibrio hidrófilo-lipófilo mejorados para la extracción de fase sólida (SPE), incluido un copolímero de divinilbenceno-acrilonitrilo capaz de adsorber simultáneamente una pluralidad de analitos. Tales analitos pueden incluir ácidos, bases, neutros, analitos fuertemente polares, moderadamente polares y no polares, y pueden incluir moléculas pequeñas, moléculas grandes, o una combinación de ambos.

10 En la presente se proporciona un método para preparar un adsorbente HLB para la extracción de fase sólida de conformidad con la reivindicación 1.

15 También se describen en la presente los métodos para eliminar uno o más solutos de una disolución mediante el contacto con la disolución con el adsorbente polimérico suministrado. Los métodos descritos son útiles tanto para disolventes no polares como polares y son útiles en una amplia gama de valores de pH. Los métodos descritos pueden eliminar una pluralidad de diferentes solutos que tienen propiedades variables.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1 es una superposición de poros que ilustra la estructura de poros del adsorbente HLB descrito en la presente (HLB-67) y dos productos HLB convencionales.

La Figura 2 es un gráfico que ilustra la reproducibilidad sintética por lotes de los copolímeros HLB descritos en la presente.

25 La Figura 3A muestra un gráfico de la teoría funcional de la densidad (DFT) para el adsorbente HLB-65 experimental sobre partículas de sílice antes y después del lavado con acetonitrilo. La Figura 3B muestra una trama de poros de la teoría funcional de la densidad (DFT) que ilustra la disminución uniforme de los poros utilizando el proceso de recubrimiento de sílice descrito en la presente.

30 La Figura 4 muestra un gráfico de superposición de DFT para tres adsorbentes HLB experimentales, HLB-44, HLB-48 y HLB-49, con relaciones de copolímeros variables.

La Figura 5 es una micrografía electrónica de barrido de un polímero HLB unido a una fibra SPME.

35 La Figura 6 compara las recuperaciones de componentes de una mezcla de seis analitos usando seis adsorbentes HLB experimentales y dos adsorbentes HLB convencionales. Se utilizó un protocolo tradicional de 5 pasos que incorporaba un paso seco después del acondicionamiento y el equilibrio.

40 La Figura 7 compara las recuperaciones de componentes de una mezcla de seis analitos usando cuatro adsorbentes HLB experimentales y dos adsorbentes HLB convencionales. Se utilizó un protocolo de 3 pasos; no se realizó acondicionamiento ni equilibrio.

La Figura 8 muestra las recuperaciones absolutas de 20 analitos extraídos de suero adicionado en condiciones ácidas utilizando resinas experimentales HLB-01, HLB-22 y HLB-26.

45 La Figura 9A muestra los datos de eliminación de suero de ternera no extraído usando resinas experimentales HLB-01, HLB-22, HLB-26, y HLB A convencional; la Figura 9B muestra lo mismo con un eje Y expandido.

La Figura 10 muestra una comparación de las recuperaciones absolutas de analito de muestras de matriz adicionadas extraídas usando un protocolo estándar de 5 pasos con HLB-67 experimental y HLB B convencional.

50 La Figura 11 muestra una comparación de las recuperaciones absolutas de analito de muestras de matriz adicionadas extraídas usando un protocolo simplificado de 3 pasos con HLB-67 experimental y HLB B convencional.

La Figura 12 es una comparación de las recuperaciones absolutas de muestras de matriz adicionadas extraídas usando un protocolo de 3 pasos con HLB-67 experimental y HLB A convencional.

55 La Figura 13 muestra la recuperación absoluta de seis analitos utilizando HLB-01 experimental para extraer de una disolución amortiguadora.

60 La Figura 14 muestra una comparación de la recuperación absoluta de un copolímero HLB que contiene acrilonitrilo descrito en la presente, HLB-01, con HLB A convencional, un material HLB que contiene vinilpirrolidona.

La Figura 15 muestra la recuperación absoluta de una variedad de analitos utilizando sílice recubierta con adsorbente experimental HLB-65.

65 La Figura 16 muestra una comparación de un copolímero HLB HLB-79 recubierto de un sustrato de sílice frente a un adsorbente HLB convencional utilizando un protocolo SPE de 3 pasos.

Descripción detallada

5 Los copolímeros HLB descritos en la presente, también conocidos como adsorbentes, ofrecen una mejor separación y eliminación de una amplia variedad de analitos de propiedades variables, incluyendo ácidos, bases, analitos neutros, fuertemente polares, moderadamente polares y no polares, y de diverso tamaño, incluyendo moléculas pequeñas y moléculas grandes, en una variedad de disolventes. Además, son adecuados para su uso sin la necesidad de pasos de acondicionamiento y equilibrio dentro del flujo de trabajo SPE. Además de ser útiles para las técnicas de extracción de fase sólida (SPE), también son adecuados para la microextracción de fase sólida (SPME) y también se pueden adaptar para columnas HPLC o UHPLC.

15 Los adsorbentes HLB para la extracción de fase sólida (SPE) se forman copolimerizando al menos un monómero hidrófobo y al menos un monómero hidrófilo. El monómero hidrófobo incluye el divinilbenceno y el monómero hidrófilo incluye el acrilonitrilo. Otros monómeros hidrófobos que podrían usarse además del divinilbenceno incluyen monovinilo y monómeros de polivinilo, tales como estireno, trivinilbenceno, diviniltolueno, divinilnaftaleno, divinilpiridina, vinilpiridina, etilvinilbenceno y divinilxileno. Se incluyen monómeros no aromáticos, tales como 1,5-hexadieno, 2,5-dimetil-hexadieno, 1,7-octadieno, trivinilciclohexano, cloruro de polivinilidina, cloruro de polivinilo y combinaciones de los mismos. Otros monómeros hidrófilos que se pueden utilizar además del acrilonitrilo incluyen metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, diacrilato de etilenglicol, dietilenglicol divinil éter, metacrilato de 2-cianoetilo, éster dimetacrílico, vinilquinolinas y combinaciones de los mismos. En una realización particularmente preferida, el adsorbente del copolímero incluye solamente divinilbenceno y acrilonitrilo.

25 Aunque no se utiliza tradicionalmente en los copolímeros HLB, el acrilonitrilo es el monómero hidrófilo en los copolímeros HLB descritos en la presente, ya que se ha encontrado que ofrece muchas ventajas sobre el monómero hidrófilo tradicional utilizado en los adsorbentes HLB, N-vinilpirrolidona. Con un log P de 0,25, es más hidrófilo que N-vinilpirrolidona (log P de 0,37). El acrilonitrilo también se incorpora más eficazmente dentro del polímero a través de una gama más amplia de relaciones de monómeros, lo que permite una capacidad de extraer analitos increíblemente hidrófilos (log P < 0) y analitos muy lipófilos (log P > 6), simultáneamente, como se muestra en la Figura 8, que se discute a continuación.

30 El acrilonitrilo es también un material higroscópico, un hecho que llevó a que fuera utilizado en el desarrollo del polímero "súper sluper" por la F.D.A. de los EE. UU. en la década de 1960, un polímero que era capaz de soportar 400 veces su peso. Los inventores han encontrado que la utilización de un monómero higroscópico permite mejorar el rendimiento de este material para SPE y SPME. Esto permite que el material funcione bien sin la necesidad de un paso de pre-tratamiento, comúnmente conocido como acondicionamiento y equilibrio. Por lo tanto, el procedimiento SPE puede simplificarse desde 35 pasos totales (acondicionamiento, equilibrio, carga de muestras, lavado y elución) hasta 3 pasos (carga de muestras, lavado y elución) o 1 paso (carga de muestras/elución).

40 Se añade un porógeno al proceso de síntesis para controlar la distribución del tamaño de poro del copolímero HLB. Los porógenos, anteriormente conocidos como extensores de fase, son disolventes que se añaden a la polimerización para afectar las propiedades del polímero que se está formando. Los porógenos pueden afectar muchas propiedades de un polímero, incluyendo, pero sin limitarse a, el área superficial, volumen de poros, tamaño de poros, porosidad y propiedades hidrófobas-hidrófilas. Se añaden porógenos particulares, o combinaciones de porógenos preferiblemente para ajustar las propiedades del polímero resultante.

45 Una combinación de porógenos no polares y polares se utilizan en los métodos de acuerdo con la invención. Los porógenos no polares preferidos utilizados en la preparación de los copolímeros HLB descritos en la presente incluyen tolueno, xilenos, benceno, hexano, ciclohexano, pentano, heptano, octano, nonano, decano, dodecano, isooctano, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, y combinaciones de los mismos. Los porógenos polares preferidos utilizados en la preparación de los copolímeros HLB descritos en la presente incluyen alcohol bencílico, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, 4-metil-2-pentanol, alcohol isoamílico, dodecanol, acetato de etilo, 2-etilhexanol, ciclohexanol, y combinaciones de los mismos. Un experto en la técnica también sería capaz de elegir porógenos no polares y polares adecuados adicionales para ajustar las propiedades de los polímeros resultantes. En una realización especialmente preferida, se utiliza una combinación de o-xileno y 4-metil-2-pentanol para los porógenos.

55 De acuerdo con los métodos descritos en la presente, la relación de monómeros de divinilbenceno y acrilonitrilo utilizados en la formación del adsorbente polimérico puede variar mucho, mientras que todavía se logran las propiedades de separación adecuadas necesarias para un polímero HLB.

60 En algunas realizaciones, la relación de monómero hidrófobo a monómero hidrófilo está en el rango de 10:90 (% en peso) a 90:10 (% en peso). En otras realizaciones, la relación de monómero hidrófobo a monómero hidrófilo está en el rango de 30:70 (% en peso) a 70:30 (% en peso). En otras realizaciones, la relación de monómero hidrófobo a monómero hidrófilo está en el rango de 15:85 (% en peso) a 85:15 (% en peso); de 20:80 (% en peso) a 80:20 (% en peso); de 25:75 (% en peso) a 75:25 (% en peso); de 30:70 (% en peso) a 70:30 (% en peso), de 35:65 (% en peso) a 65:35 (% en peso); de 40:60 (% en peso) a 60:40 (% en peso); de 55:45 (% en peso) a 45:55 (% en peso); o aproximadamente 50:50 (% en peso). En una realización preferida, la relación de monómero hidrófilo a monómero hidrófobo es de aproximadamente 63:37 (% peso).

- 5 En una realización preferida, el adsorbente polimérico es poli(divinilbenceno-co-acrilonitrilo). En algunas realizaciones, la relación de divinilbenceno a acrilonitrilo está en el rango de 90:10 (% en peso) a 10:90 (% en peso). En otras realizaciones, la relación de divinilbenceno a acrilonitrilo está en el rango de 15:85 (% en peso) a 85:15 (% en peso); de 20:80 (% en peso) a 80:20 (% en peso); de 25:75 (% en peso) a 75:25 (% en peso); de 30:70 (% en peso) a 70:30 (% en peso), de 35:65 (% en peso) a 65:35 (% en peso); de 40:60 (% en peso) a 60:40 (% en peso). En una realización preferida, la relación de divinilbenceno a acrilonitrilo es de aproximadamente 75:25 (% en peso). En otras realizaciones preferidas, la relación de divinilbenceno a acrilonitrilo es de aproximadamente 63:37 (% en peso).
- 10 En ciertas realizaciones preferidas, el adsorbente polimérico que se divulga en la presente se adapta para adsorber simultáneamente una pluralidad de analitos incluyendo ácidos, bases, neutros, analitos fuertemente polares, moderadamente polares y apolares. Los analitos ejemplares pueden incluir moléculas pequeñas, moléculas grandes, proteínas, fosfolípidos y moléculas farmacéuticamente relevantes.
- 15 Algunos analitos típicos de interés pueden incluir, pero no se limitan a, los compuestos que encajan en estas amplias clases: aceites esenciales, conservantes alimentarios, vitaminas, plastificantes, pesticidas, esteroides, hidrocarburos, contaminantes, aminas, alcoholes, colorantes, fenoles, alcaloides, micotoxinas, aminoácidos, flavonoides, compuestos heterocíclicos, lípidos, esteroides, ácidos orgánicos, terpenos, tensioactivos, hidratos de carbono, catecolaminas, antibióticos, aminoácidos, ácidos nucleicos, bases de ácidos nucleicos, proteínas y péptidos.
- 20 Algunos ejemplos no limitativos de analitos farmacéuticos de interés incluyen: acetaminofén, amilorida, amitriptilina, atrazina, benzoilecgonina, buspirona, claritromicina, 2,7-dihidroxi-naftaleno, doxepina, haloperidol, hidroquinidina, imidacloprid, imipramina, imiquimod, loratadina, losartán, mesoridazina, metafrileno, mianserina, mirtazapina, nefazodona, nevirapina, nizatidina, procainamida, propranolol, y p-toluamida.
- 25 El adsorbente polimérico puede ser una partícula esférica porosa. Cuando se desean partículas esféricas, el tamaño de partícula no es particularmente limitado. Las partículas se pueden formar con distribuciones de tamaño de partícula favorables y reproducibles en una amplia gama, lo que permite el uso de estos copolímeros HLB en una variedad de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse a, SPE, SPME y HPLC.
- 30 Los adsorbentes HLB pueden ser partículas esféricas porosas que tienen un diámetro en el rango de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 1 mm. En algunas divulgaciones, las partículas esféricas porosas tienen diámetros en el rango de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 125 μm . En ciertas divulgaciones, la partícula esférica porosa tiene un diámetro en el rango de aproximadamente 30 μm a aproximadamente 85 μm . Para su uso en SPE, las partículas esféricas tienen un diámetro en el rango de aproximadamente 40 a aproximadamente 75 μm . En una divulgación preferida para SPE, las partículas esféricas tienen un diámetro de aproximadamente 50 μm . En algunas divulgaciones, la partícula esférica porosa tiene un diámetro en el rango de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 10 μm . Para SPME, las partículas esféricas tienen preferiblemente un diámetro en el rango de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 4 μm ; y más preferiblemente, un diámetro en el rango de aproximadamente 0,8 μm a aproximadamente 2 μm . El uso de tamaños de partículas monodispersas es deseable para mejorar los procesos de preparación de muestras.
- 35 En algunas divulgaciones, las partículas esféricas porosas tienen una superficie en el rango de aproximadamente 10 m^2/g a 1000 m^2/g . En algunas divulgaciones, las partículas esféricas porosas tienen una superficie en el rango de aproximadamente 350 m^2/g a aproximadamente 675 m^2/g . En algunas divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 350 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 375 m^2/g , en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 400 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 425 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 450 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 475 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 500 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 525 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 550 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 575 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 600 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 625 m^2/g ; en otras divulgaciones, el área superficial es de aproximadamente 650 m^2/g ; en otras divulgaciones más, el área superficial es de aproximadamente 675 m^2/g ; y en otras divulgaciones más, el área superficial es de aproximadamente 700 m^2/g .
- 40 En algunas divulgaciones, las partículas esféricas porosas tienen un diámetro de poro promedio en el rango de aproximadamente 50 Å a aproximadamente 105 Å. Además, el diámetro promedio de poros para los adsorbentes HLB descritos en la presente puede ser de aproximadamente 50 Å, aproximadamente 55 Å, aproximadamente 60 Å, aproximadamente 65 Å, aproximadamente 70 Å, aproximadamente 75 Å, aproximadamente 80 Å, aproximadamente 85 Å, aproximadamente 90 Å, aproximadamente 95 Å, aproximadamente 100 Å, aproximadamente 105 Å, o aproximadamente 110 Å.
- 45 En ciertas divulgaciones, el adsorbente polimérico se recubre en un sustrato. Los sustratos adecuados pueden incluir carbono, sílice y metal, entre otras cosas. En algunas divulgaciones, puede ser particulado, mientras que en otras divulgaciones, el sustrato puede ser una fibra.
- 50
- 55
- 60
- 65

5 Cuando el sustrato es una fibra, el adsorbente polimérico puede usarse para recubrir directamente la fibra. En algunas divulgaciones, se utiliza un adhesivo o un aglutinante para adherir el adsorbente polimérico a la fibra. Los aglutinantes adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Algunos ejemplos no limitativos de adhesivos que se pueden utilizar de acuerdo con los adsorbentes de HLB descritos en la presente incluyen, polidimetilsiloxano (PDMS), resinas epoxi, polisilazano, resinas acrílicas, resinas de fenol formaldehído, acetato de polivinilo (PVA, pegamento blanco), pegamento de carpintero amarillo (resina alifática), polivinilpirrolidona (a base de PVP o PVA), resina de poliéster, resina de resorcinol, pegamento de urea-resina (resina plástica) o combinaciones de los mismos. Un adhesivo especialmente preferido es el polidimetilsiloxano (PDMS). El uso de PDMS como un aglutinante para adherir adsorbentes a una estructura se divulga en las Patentes de EE. UU. No. 5,559,445 y 7,815,864, por ejemplo. En otras divulgaciones, se puede utilizar un aglutinante, es decir, que no exhiba características de reticulación. Tales aglutinantes pueden incluir, pero no se limitan a, poliacrilonitrilo (PAN), TEFLÓN (PTFE y polímeros/plásticos fluorados similares), gelatina, celulosa, derivados de celulosa, polivinilpirrolidona, almidón, sacarosa y polietilenglicol.

15 Notablemente, a diferencia de las fibras recubiertas de HLB convencionales, las fibras de HLB proporcionadas en la presente pueden usarse sin un paso de acondicionamiento. Como se explicó anteriormente, esta simplificación del proceso de extracción es muy deseable desde el punto de vista del tiempo, lo que permite el análisis de muchas más muestras en un período de tiempo más corto.

20 También se describen en la presente los métodos para eliminar uno o más solutos de una disolución mediante el contacto con la disolución con un adsorbente polimérico, como se describe en la presente, en el que el soluto se adsorbe en el adsorbente polimérico. En algunas divulgaciones, el soluto puede entonces ser eluido del adsorbente polimérico.

25 En algunas divulgaciones de este método, la disolución tiene un disolvente polar. En una divulgación preferida, el disolvente polar es un disolvente acuoso. En otra divulgación preferida, el disolvente polar es un disolvente orgánico.

30 De acuerdo con los métodos descritos en la presente, los adsorbentes HLB son útiles para eliminar al menos 6 solutos, analitos interferentes o analitos de interés de una disolución. En algunas divulgaciones, los adsorbentes HLB son útiles para eliminar al menos 8 solutos de una disolución. En otras divulgaciones, los adsorbentes HLB son útiles para eliminar al menos 10 solutos de una disolución. En otras divulgaciones, los adsorbentes HLB son útiles para eliminar al menos 15 solutos de una disolución. En una divulgación preferida, los adsorbentes HLB son útiles para eliminar al menos 20 solutos de una disolución. De acuerdo con los métodos descritos en la presente, los adsorbentes HLB son útiles para eliminar varios tipos diferentes de solutos, analitos interferentes o analitos de interés de una disolución. Los solutos, analitos interferentes o analitos pueden incluir una o más proteínas, uno o más analitos farmacéuticamente relevantes y uno o más fosfolípidos.

35 En una divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 75 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 50 %. En otra divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 80 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 50 %. En otra divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 85 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 50 %. En otra divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 90 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 50 %. En otra divulgación preferida más, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 95 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 50 %.

40 En todavía otra divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 75 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 70 %. En otra divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 80 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 70 %. En otra divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 85 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 70 %. En otra divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 90 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 70 %. En otra divulgación preferida, los adsorbentes HLB eliminan al menos aproximadamente 95 % de los solutos que se eliminan de la disolución con una recuperación de al menos 70 %.

45 También se describe en la presente un método para la eliminación selectiva de los solutos interferentes de una disolución que comprende el paso de poner en contacto la disolución con un adsorbente polimérico HLB como se describe en la presente, en donde los solutos se adsorben en el polímero, o se lava el polímero en el paso de lavado del método, y en donde los solutos se seleccionan del grupo que consiste en proteínas, fosfolípidos, sales inorgánicas, combinaciones de los mismos, y en donde se eliminan al menos aproximadamente 90 % de los solutos interferentes.

60 También se describen en la presente los cartuchos que contienen los adsorbentes HLB descritos en la presente. En algunas divulgaciones, los cartuchos incluyen partículas esféricas de adsorbente HLB. En otras divulgaciones, los cartuchos incluyen partículas esféricas de sílice recubiertas con el adsorbente HLB.

65 Los materiales HLB descritos en la presente pueden denominarse "polímeros", "copolímeros", "resinas" y "adsorbentes" indistintamente. Cualquiera de estos términos puede ser sustituido por otro y el uso de un término sobre otro no connota una diferencia en la composición o la función del material HLB.

Los adsorbentes HLB descritos en la presente son útiles para la adsorción de analitos, ya sea para la función de eliminación para purificación o eliminación para concentración. Se entiende que “eliminar” o “adsorber” puede utilizarse indistintamente o sustituirse por otros términos, tal como “extraer” sin cambiar el significado. Se entiende además que los términos “analitos”, “analitos de interés”, “solutos” y “solutos interferentes” pueden utilizarse indistintamente como las sustancias que son adsorbidas o eliminadas por los copolímeros HLB descritos en la presente.

Los procedimientos, experimentos y ejemplos proporcionados en la presente tienen la intención de ser ilustrativos de los copolímeros HLB mejorados proporcionados en la presente y no están destinados a limitar la invención.

Lo siguiente ilustra la síntesis, el uso y las propiedades de los copolímeros HLB descritos en la presente. Para ilustrar las propiedades mejoradas de estos polímeros, los nuevos copolímeros HLB descritos en la presente fueron probados contra varios adsorbentes HLB convencionales actualmente disponibles, identificados como HLB A convencional, HLB B convencional, HLB C convencional, y así sucesivamente, y esas etiquetas se utilizan de manera consistente con los mismos materiales en todas partes.

Como se describió anteriormente, los copolímeros HLB descritos en la presente son copolímeros de divinilbenceno (DVB) y acrilonitrilo (AN) hechos usando un proceso de polimerización de suspensión o dispersión.

La Figura 1 muestra una superposición de poros que ilustra la estructura de poros de uno de los adsorbentes de copolímero HLB descritos en la presente, materiales HLB A convencional y HLB B convencional. El copolímero DVB/AN se preparó utilizando extensores de fase hidrófobos e hidrófilos, para lograr la microporosidad y mesoporosidad necesarias, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Superficie de copolímeros y porosidad de productos convencionales y varios copolímeros HLB descritos en la presente

ID de resina	Diámetro (µm)	Área superficial (m ² /g)	Volumen de poro total de un solo punto (mL/g)	Diámetro de poro promedio (Å)
HLB A convencional		438	1,04	95
HLB B convencional		716	1,29	72
HLB C convencional		201	0,958	190
HLB-96	38-75	423	1,02	97
HLB-99	38-75	448	1,17	105
HLB-100	38-75	667	1,21	73
HLB-01	38-75	346	0,74	85
HLB-03	38-75	401	0,67	66
HLB-05	38-75	658	0,82	50

Ejemplo: Síntesis de un copolímero HLB ejemplar. Se preparó una fase orgánica combinando una mezcla de divinilbenceno de grado técnico (100 g), acrilonitrilo de grado técnico (43 g), peróxido de benzoilo (6,9 g), o-xileno (54 g) y 4-metil-2-pentanol (54 g). Se preparó una fase acuosa combinando: dodecil sulfato de sodio(1,2 g), culminal (1,2 g, metil celulosa de alto peso molecular), ácido bórico (32 g) y agua a granel (794 g). La fase orgánica se cargó a la fase acuosa en un reactor. Se aplicó agitación para dispersar la fase orgánica en gotas finas, y el reactor se calentó a 80 °C durante aproximadamente 16 horas para iniciar y completar la polimerización. El resultado fue un polvo blanco esférico con un rendimiento de aproximadamente 140 g.

Se encontró que los copolímeros HLB hechos por el proceso descrito en la presente tienen buena reproducibilidad sintética por lotes, como se muestra en la Figura 2. Como se ilustra en la Figura 2, se mostró que la estructura de poros era reproducible a través de los rangos microporosos y mesoporosos de un lote al siguiente.

Copolímero HLB recubierto de sílice. El proceso de recubrimiento de la sílice es el siguiente. Primero, la sílice de grado HPLC (3,0 µm, 300 Å), se seca al vacío durante la noche a 140 °C. La sílice seca se carga a un matraz de evaporador rotatorio. El divinilbenceno (4,5 g), acrilonitrilo (1,5 g), peróxido de benzoilo (0,18 g) y diclorometano (90 g, disolvente a granel) se pre-mezclan, luego se carga la disolución pre-mezclada al matraz. El matraz se gira a 50 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente para permitir el equilibrio. El matraz se calienta paso a paso para evaporar lentamente el diclorometano, de la siguiente manera: (1) mantener dos horas en condiciones ambientales; (2) elevar la temperatura de ambiente a 60 °C y mantener durante una hora; (3) mantener durante una hora a 60-65 °C; luego (4) aumentar la temperatura de 65 a 80 °C y mantener 16 horas. La sílice también puede estar encapsulada, por ejemplo, con trimetilclorosilano o ácido oleico, antes del recubrimiento con polímeros.

Para SPME, la sílice recubierta de copolímero posee un rango de tamaño de partícula típico de 2 a 4 μm , y posee una estructura de poros y características químicas de superficie similares al molde duro de sílice. Sin embargo, se observa que el copolímero recubierto de sílice puede estar en el rango de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 5 μm , dependiendo de la aplicación de interés.

5

Para investigar la idoneidad del recubrimiento de los copolímeros HLB descritos en la presente sobre sílice, se eligió el ejemplo HLB-65. Las sílices elegidas para este material poseían diámetros de poro de: 100 Å, 200 Å y 300 Å. Para asegurar la copolimerización de los monómeros DVB y ACN en la superficie de la sílice, se eligieron procedimientos de lavado para determinar la pérdida de copolímero. No se detectó ninguna pérdida, como se muestra en la Figura 3A. La Figura 3B ilustra la disminución uniforme de los poros utilizando el proceso de recubrimiento de sílice mencionado anteriormente. La Figura 4 ilustra los recubrimientos utilizando diferentes relaciones de copolímeros.

10

El efecto del lavado en la recuperación de analito fue investigado utilizando el copolímero HLB experimental HLB-65. En las pruebas se utilizaron los procedimientos de análisis de veinte analitos descritos a continuación. Los resultados se resumen en la Tabla 2, Tabla 3 y Tabla 4.

15

Tabla 2 Efecto del lavado sobre recuperaciones absolutas obtenidas utilizando HLB-65 experimental

Número de analitos (Recuperaciones absolutas)								
Recuperación (%)	HLB-65 W (Neutro) Secado	Sin	HLB-65 sox (Neutro) Secado	Sin	HLB-65 W (Ácido) Secado	Sin	HLB-65 sox (Ácido) Secado	Sin
>70%	8		12		8		17	
50-70%	11		8		6		3	
<50%	6		5		11		5	

Tabla 3 Efecto del lavado sobre recuperaciones de ajuste matricial obtenidas utilizando HLB-65 experimental

Número de analitos (Recuperaciones de ajuste matricial)								
Recuperación (%)	HLB-65 W (Neutro) Secado	Sin	HLB-65 sox (Neutro) Secado	Sin	HLB-65 W (Ácido) Secado	Sin	HLB-65 sox (Ácido) Secado	Sin
>70%	18		17		12		20	
50-70%	2		4		5		1	
<50%	5		4		8		4	

20

Tabla 4 Efecto del lavado sobre recuperaciones relativas obtenidas utilizando HLB-65 experimental

Número de analitos (Recuperaciones relativas)								
Recuperación (%)	HLB-65 W (Neutro) Secado	Sin	HLB-65 sox (Neutro) Secado	Sin	HLB-65 W (Ácido) Secado	Sin	HLB-65 sox (Ácido) Secado	Sin
>120%	3		3		3		1	
80-120%	11		6		7		12	
<80%	1		6		5		3	

25

Para ilustración, la Figura 5 es una micrografía electrónica de barrido de una fibra SPME recubierta de sílice típica. El adhesivo utilizado para la unión de la sílice recubierta de polímero de 3,0 μm es el polidimetilsiloxano (PDMS) descrito en la presente.

La evaluación adicional de los copolímeros HLB descritos en la presente se realizó de la siguiente manera:

30

Evaluaciones de recuperación de analitos: Cribado preliminar de seis analitos. Se preparó una disolución madre de 1 mg/mL disolviendo 50 mg de los siguientes analitos en 50 mL de metanol: acetaminofén, procainamida, p-toluamida, 2,7-dihidroxi-naftaleno, propranolol y doxepina. Se preparó una disolución madre analítica de 10 $\mu\text{g/mL}$ transfiriendo 500 μL de disolución madre 1 mg/mL a 49,5 mL de disolución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM. Los reactivos se prepararon utilizando frascos volumétricos rellenos de acuerdo con el procedimiento estándar.

35

Para resinas experimentales o comparaciones convencionales, se utilizaron formatos de cartucho SPE de 3 mL con pesos de lecho de 60 mg. Las muestras se procesaron utilizando el protocolo descrito en la Tabla 5.

ES 2 967 925 T3

Tabla 5 Protocolo de SPE de 3 pasos utilizado para el cribado básico.

Protocolo SPE
Cargar: Muestra de 1 mL en disolución amortiguadora de fosfato 20 mM
Lavar: 1 mL metanol ac. al 5 %
Eluir: 1 mL 90:10 ACN: Metanol
Evaporar: 40 °C, corriente de nitrógeno de 68,9 kPa (10 psi)
Reconstituir: 1 mL de disolución amortiguadora de fosfato 20 mM

5 Las tasas de caída se mantuvieron a una caída por segundo o menos. Las existencias de analito se disolvieron inicialmente en metanol a concentraciones de 1 mg/mL y luego se diluyeron a 10 µg/ mL en una disolución amortiguadora de fosfato potásico de 20 mm (pH 7) para producir el material de carga. Después de la evaporación, todas las muestras se sometieron a vórtice 30 segundos en una disolución amortiguadora de fosfato potásico de 20 mm (pH 7) para reconstituirse para el análisis. Se analizaron tres alícuotas de 10 µg/mL de disolución de carga y se utilizó el promedio de recuento de área para cada compuesto como una referencia para calcular la recuperación de los respectivos compuestos.

10 Parámetros HPLC. El análisis se realizó utilizando una HPLC Agilent 1190 acoplada con un detector UV. Los parámetros del método se pueden encontrar en la Tabla 6.

Parámetros de instrumentos HPLC			
Columna	Discovery® C18, 5 cm x 4,6 mm x5 µm (Sigma-Aldrich)		
Fase móvil A	Fosfato de potasio 20 mM		
Fase móvil B	MeOH		
Volumen de inyección	25 µL		
Gradiente	Tiempo (min)	A %	B %
	0,0	95	5
	2,00	95	5
	3,00	65	35
	7,00	65	35
	8,00	30	70
	12,00	30	70
	12,10	95	5
	20,00	95	5
Longitud de onda	230 nm		
Flujo	1,0 mL/min		

Tabla 6 Parámetros HPLC-UV para el análisis del cribado preliminar de 6 analitos

15 Protocolo I: este protocolo utilizó una mezcla de 20 analitos que consiste en los siguientes: amitriptilina, atrazina, benzoilecgonina, buspirona, claritromicina, haloperidol, hidroquinidina, imidacloprid, imipramina, imiquimod, loratadina, mesoridazina, metaprileno, mianserina, mirtazapina, nefazodona, nevirapina, nizatidina y losartán. Para las extracciones de matriz ácida, el suero de tercera recién nacida se adicionó con analito a una concentración de 200 ng/mL. El suero con puntas se diluyó 1:1 con una disolución de ácido fórmico al 0,4 %. Estas disoluciones también se combinaron con una mezcla estándar interna, lo que permitió concentraciones finales de 100 ng/mL de analito y 50 ng/mL de normas internas.

20 El procedimiento SPE se describe en la Tabla 7.

Se observa que todos los cartuchos que contenían materiales experimentales se empaquetaron con fritas de polietileno lavadas con Soxhlet para eliminar interferencias lipofílicas que de otro modo serían co-extraídas con los analitos.

25 Tabla 7 Procedimiento SPE utilizado para el Protocolo I.

Procedimiento SPE
Cargar 1 mL de muestra en un lecho seco (60 mg de peso en lecho).
Cartucho de lavado con 1 mL de MeOH al 5 % (ac.)
Eluir con 1 mL de disolvente de elución.
Evaporar las muestras hasta la sequedad a 40 °C con una corriente de nitrógeno de 34,5 kPa (5 psi).

Procedimiento SPE

Reconstituir en 1 mL de fase móvil de inicio.

5 Protocolo O: El suero de ternera recién nacido se diluyó 1:1 con ácido fosfórico al 4 % (concentración de analito final: 100 ng/mL; concentración estándar interna final: 50 ng/mL). El procedimiento descrito anteriormente fue seguido usando MeOH al 100 % como disolvente de elución. Los eluatos de la muestra se secaron y reconstituyeron en la fase móvil inicial. Las muestras también se prepararon siguiendo un "protocolo de 5 pasos", esto simplemente implicó la adición de un paso de acondicionamiento (1 mL de MeOH) y equilibrio (1 mL de agua) antes de la carga de la muestra. Para esta evaluación se utilizó la mezcla de 20 analitos.

10 Se observa que todos los cartuchos que contenían materiales experimentales se empaquetaron con fritas de polietileno lavadas con Soxhlet para eliminar interferencias lipofílicas que de otro modo serían co-extraídas con los analitos.

15 Protocolo P: El suero de ternera recién nacido se diluyó 1:1 con ácido fosfórico al 4 % (concentración de analito final: 100 ng/mL; concentración estándar interna final: 50 ng/mL). El procedimiento descrito en la Tabla 5 fue seguido usando MeOH al 100 % como disolvente de elución. Los eluatos de la muestra se analizaron directamente a través de LC-MS/MS. Una mezcla de ocho analitos que contiene azidotimidina, fenacetina, betametasona, alprazolam, naproxeno, propranolol, protriptilina y amitriptilina fueron utilizados para esta evaluación.

20 Se observa que todos los cartuchos que contenían materiales experimentales se empaquetaron con fritas de polietileno lavadas con Soxhlet para eliminar interferencias lipofílicas que de otro modo serían co-extraídas con los analitos.

25 Análisis LC-MS/MS: Análisis de las muestras de protocolo HLB del Protocolo I y Protocolo O. Las muestras se analizaron utilizando una UHPLC Agilent 1290 Infinity junto con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460. La Tabla 8 y la Tabla 9 muestran los parámetros fuente específicos de UHPLC y MS. La Tabla 10 y la Tabla 11 muestran los parámetros de MS específicos de compuestos para el análisis de analitos en modo positivo y negativo, respectivamente.

Parámetros de instrumentos UHPLC			
Columna	Ascentis® Express RP-Amida; 10 cm x 2,1 mm; 2,7 µm (Sigma-Aldrich)		
Temperatura de la columna (°C)	40		
Fase Móvil A	ácido acético al 0,1 %, acetato de amonio 5 mM		
Fase móvil B	Acetato de amonio 5 mM en acetonitrilo		
Tasa de flujo (mL/min)	0,4		
Volumen de inyección (µL)	2,00		
Gradiente	Tiempo (min)	A %	B %
	0,00	95,0	5,0
	1,00	95,0	5,0
	7,00	57,0	43,0
	8,00	57,0	43,0
	10,00	38,5	61,5
	11,00	95,0	5,0
	14,00	95,0	5,0

Tabla 8 Parámetros de instrumentos UHPLC utilizados para el análisis de muestras de protocolo interno y protocolo convencional de 5 pasos.

30 Tabla 9 Parámetros fuente de MS utilizados para el análisis de muestras de protocolo interno y protocolo convencional de 5 pasos.

Parámetros fuente de MS	
Tensión capilar (V)	3500
Temp. de gas (°C)	350
Flujo de gas (L/min)	8

Parámetros fuente de MS	
Nebulizador (kPa (psi))	310,3 (45)
Calentador de gas de impulsión	350
Flujo de gas de impulsión	12
Acelerador de celdas (V)	7
Polaridad	Positiva y negativa (2 análisis separados)
Δ EMV	200

Tabla 10 Parámetros de compuestos para el análisis de modo positivo de muestras de protocolo interno y protocolo convencional de 5 pasos.

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	t, (min)	Ventana de retención (min)
5-(N,N-dimetil)amilorida	259	199,9	100	15	5,32	1,5
Abacavir	287	191	135	20	4,04	1,5
Amilorida	230,1	170,9	100	17	3,15	1,5
Amitriptilina	278,19	91	110	25	7,15	1,5
Amitriptilina- d_3	281,44	91	100	25	7,15	1,5
Atrazina	216,1	173,9	115	17	7,79	1,5
Atrazina- d_5	222	179,7	115	20	7,74	1,5
Benzoilecgonina	290,14	168	115	17	3,87	1,5
Benzoilecgonina- d_3	293,31	171	120	16	3,86	1,5
Buspirona	386,21	122	165	33	5,58	1,5
Buspirona- d_8	394,21	121,9	185	36	5,56	1,5
Claritromicina	748,51	158	165	29	7,50	3
Haloperidol	376,15	122,9	130	45	6,96	1,5
Haloperidol- d_4	380,9	126,9	120	45	6,94	1,5
Hidroquinidina	327,21	55,1	150	45	5,59	1,5
Imidacloprid	256,06	209	95	9	4,83	1,5
Imidacloprid- d_4	260,7	131,4	100	33	5,32	1,5
Imipramina	281,2	86,1	105	13	6,93	1,5
Imipramina- d_3	284,2	193	100	40	6,93	1,5
Imiquimod	241,1	168,1	150	40	6,40	1,5
Loratadina	383,11	337	150	21	10,92	1,5
Loratadina- d_5	388	337	150	25	10,95	1,5
MCPPP- d_8	206	159	135	20	4,47	1,5
Mesoridazina	387,2	98,1	150	40	6,16	1,5
Metapirileno	262,1	97	150	40	5,30	1,5
Metapirileno-dimetil- d_6	268	97	150	20	5,28	1,5
Mianserina	265,2	58,2	128	24	6,33	1,5
Mianserina- d_3	268,4	61,2	130	25	6,31	1,5
Mirtazapina	266,2	72,2	128	16	4,98	1,5
N-desmetil-mirtazapina	252,34	195	115	21	4,90	1,5
Nefazodona	470,2	246,1	150	20	7,91	1,5

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	t, (min)	Ventana de retención (min)
Nevirapina	267,1	80	150	40	5,57	1,5
Nizatidina	332,1	58,1	150	40	1,50	1,5
Quinina	325,42	79	145	45	5,28	1,5

Tabla 11 Parámetros de compuestos para el análisis de modo negativo de muestras de protocolo interno y protocolo convencional de 5 pasos.

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	Tiempo de retención (min)
Losartán	421	127	150	40	7,89

- 5 Análisis de muestras de protocolo de 3 pasos. Las muestras se analizaron utilizando una UHPLC Agilent 1290 Infinity junto con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460. La Tabla 12 y la Tabla 13 muestran los parámetros fuente específicos de UHPLC y MS. La Tabla 14 muestra los parámetros de MS específicos del compuesto.

Parámetros fuente de UHPLC			
Columna	Titan™ C18; 5 cm x 2,1 mm; 1,9 µm (Sigma-Aldrich)		
Temperatura de la columna (°C)	40		
Fase Móvil A	Ácido fórmico al 0,1 %		
Fase móvil B	Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo		
Tasa de flujo (mL/min)	0,5		
Volumen de inyección (µL)	2,00		
Gradiente	Tiempo (min)	% A	% B
	0,30	70,0	30,0
	1,00	70,0	30,0
	4,00	70,0	30,0
	6,00	50,0	50,0
	6,10	50,0	50,0
	6,50	70,0	30,0
8,50	70,0	30,0	

- 10 Tabla 12 Parámetros de instrumentos UHPLC utilizados para el análisis de muestras de protocolo interno y protocolo convencional de 3 pasos.

Tabla 13 Parámetros fuente de MS utilizados para el análisis de protocolo interno y muestras de protocolo del Protocolo P.

Parámetros fuente de MS	
Tensión capilar (V)	3500
Temp. de gas (C)	300
Flujo de gas (L/min)	10
Nebulizador (kPa (psi))	137,9 (20)
Calentador de gas de impulsión	400
Flujo de gas de impulsión	12
Acelerador de celdas (V)	7
Polaridad	Positivo
ΔEMV	200
Permanencia	30

Tabla 14 Parámetros de compuestos para el análisis de modo positivo de muestras de protocolo interno y protocolo convencional de 3 pasos.

Analito	Precursor (<i>m/z</i>)	Producto (<i>m/z</i>)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)
Betametasona	393,01	373,1	100	1
Prednisolona	361,01	147	95	25
Alprazolam- <i>d</i> ₅	314,01	286	170	25
Alprazolam	309,01	281	160	25
Oxazepam	288,01	241,9	115	17
Abacavir	287,01	191	110	17
Amitriptilina- <i>d</i> ₃	281,01	105	110	21
Amitriptilina	278,2	58,2	113	24
Azodotimidina	268,01	126,9	110	9
Protriptilina- <i>d</i> ₃	267,01	155	123	24
Propranolol- <i>d</i> ₇	267,01	56,2	120	28
Protriptilina	264,2	155,1	123	24
Propranolol	260,2	116	125	16
Ketoprofeno	255,29	104,9	115	24
Naproxeno	231,31	185	80	8
Fenacetina	180,1	65	125	44

- 5 Monitoreo de fosfolípidos. Las muestras se analizaron utilizando una UHPLC Agilent 1290 Infinity junto con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460. La Tabla 15 y la Tabla 16 muestran los parámetros fuente específicos de UHPLC y MS. La Tabla 17 muestra los parámetros de MS específicos del compuesto.

Tabla 15 Parámetros de instrumentos UHPLC utilizados para el monitoreo de fosfolípidos.

Parámetros de instrumentos UHPLC	
Columna	Ascentis® Express C18; 5 cm x 2,1 mm; 2,7 μm (Sigma-Aldrich)
Temperatura de la columna (°C)	40
Fase móvil	Formiato de amonio 5 mM en 90:10 (MeOH/agua)
Tasa de flujo (mL/min)	0,5
Volumen de inyección (μL)	2,00

- 10 Tabla 16 Parámetros fuente de MS utilizados para el monitoreo de fosfolípidos.

Parámetros fuente de MS	
Tensión capilar (V)	5000
Temp. de gas (°C)	350
Flujo de gas (L/min)	8
Nebulizador (kPa (psi))	310,3 (45)
Calentador de gas de impulsión	350
Flujo de gas de impulsión	12
Acelerador de celdas (V)	7
Polaridad	Positivo

Tabla 17 Parámetros de compuestos para el monitoreo de fosfolípidos.

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)
Fosfolípido 1	184	104	160	80
Fosfolípido 2	496	184	160	80
Fosfolípido 3	524	184	160	80
Fosfolípido 4	704	184	160	80
Fosfolípido 5	758	184	160	80
Fosfolípido 6	786	184	160	80
Fosfolípido 7	806	184	160	80

Estudios preliminares. El enfoque de los estudios preliminares fue examinar una serie de resinas de copolímero para la recuperación de una mezcla de seis analitos fuera de la disolución amortiguadora. Los analitos de interés fueron seleccionados por su variedad de carácter hidrófobo (Tabla 18). A pesar de ser un cribado simple, los resultados fueron útiles para identificar posibles resinas para evaluar más a fondo.

Tabla 18 Analitos de interés utilizados para el cribado preliminar.

Analito	Log P
Acetaminofén	0,5
Procainamida	0,9
p-toluamida	1,2
2,7-dihidroxi-naftaleno	2,3
Propranolol	3,0
Doxepina	4,3

Un total de ocho resinas de copolímero fueron preparadas para el cribado preliminar. Estas resinas fueron diseñadas para estudiar el papel de las relaciones de copolímeros y la estructura de poros en la recuperación de analitos. De estas resinas, HLB-01, HLB-03, HLB-05 y HLB-10 son de acuerdo con la invención. La Tabla 19 describe la composición de copolímeros de cada resina experimental. La relación o-xileno:MIBC (p:p) fue variada en diversas resinas para variar la estructura de los poros.

Tabla 19 Composición de copolímeros de resinas experimentales cribadas preliminarmente. DVB: divinilbenceno; AcrilN: acrilnitrilo; VP: N-vinilpirrolidona; MIBC: metil isobutil carbinol.

ID de resina	DVB (%)	AcrilN (%)	VP (%)	o-xileno: MIBC (p:p)
HLB-96	91,5	8,5	0	
HLB-98	90,9	9,1	0	
HLB-99	90,9	0	9,1	
HLB-100	63	0	37	150:150
HLB-01	63	37	0	150:150
HLB-03	63	37	0	225:75
HLB-05	63	0	37	225:75
HLB-10	25	75	0	150:150

Varias resinas experimentales fueron analizadas más a fondo para entender mejor sus químicas. Estas resinas fueron evaluadas con respecto a la composición CHN (Tabla 20), así como área superficial y porosidad (Tabla 21). Los materiales de HLB A convencional, HLB B convencional y HLB C convencional también fueron evaluados para su comparación.

Tabla 20 Composición CHN de productos convencionales y varias resinas experimentales.

ID de resina	N (%)	C (%)	H (%)	Total (%)
HLB A convencional	0,70	35,47	3,72	39,89
HLB B convencional	2,35	86,14	8,27	96,76

ID de resina	N (%)	C (%)	H (%)	Total (%)
HLB C convencional	2,42	85,61	8,10	96,13
HLB-96	2,00	87,56	7,84	97,40
HLB-98	1,88	89,37	7,89	99,14
HLB-99	≤ 0,02	90,01	8,02	98,03
HLB-100	1,05	88,10	8,13	97,28
HLB-01	9,22	82,75	7,35	99,32
HLB-03	8,82	82,75	7,37	98,94
HLB-05	0,97	87,49	7,92	96,38
Muestra comparativa	≤ 0,02	90,84	7,92	98,76

En cuanto a la composición de CHN, se hizo evidente que los materiales de HLB B convencional y HLB C convencional son muy similares. Sin embargo, el material de HLB A convencional difiere mucho, con solo 35,47 % de carbono.

5 Tabla 21 Superficie de copolímero y porosidad de productos HLB convencionales y varias resinas HLB experimentales.

ID de resina	Diámetro (µm)	Área superficial (m ² /g)	Volumen de poro total de un solo punto (mL/g)	Diámetro de poro promedio (Å)
HLB A convencional		438	1,04	95
HLB B convencional		716	1,29	72
HLB C convencional		201	0,958	190
HLB-96	38-75	423	1,02	97
HLB-99	38-75	448	1,17	105
HLB-100	38-75	667	1,21	73
HLB-01	38-75	346	0,74	85
HLB-03	38-75	401	0,67	66
HLB-05	38-75	658	0,82	50

En términos de superficie y porosidad, el HLB A convencional y el HLB B convencional también difieren. El HLB B convencional tiene una mayor superficie y un diámetro de poro más pequeño que el material de HLB A convencional.

- 10 Cada resina experimental fue evaluada por la capacidad de recuperar los seis analitos de interés siguiendo dos protocolos. El primer protocolo se modeló siguiendo un método HLB convencional, sin embargo el lecho se secó después del acondicionamiento y el equilibrio. Los resultados de este experimento se pueden encontrar en la Figura 6. Como era de esperar, el producto HLB convencional dio como resultado altas recuperaciones para los 6 analitos, con la menor recuperación del 79 % para el analito más lipófilo, la doxepina. El cribado de las resinas experimentales reveló grandes diferencias. Se determinó que la resina de mayor rendimiento en esta etapa era HLB-01. Las recuperaciones fueron superiores al 80 % para los seis analitos.

- 20 El segundo protocolo utilizó un proceso de 3 pasos: carga, lavado y elución. En el momento de estos experimentos, el protocolo de 3 pasos era desconocido, por lo que las extracciones se realizaron a pH neutro. Los resultados de este experimento se pueden encontrar en la Figura 7. Sorprendentemente, sólo 3 de los 6 analitos se recuperaron utilizando el producto HLB A convencional. Estos resultados pueden revelar una debilidad con el producto, o pueden ser simplemente debido a que estas extracciones iniciales se realizan a pH neutro. Se comprobó de nuevo que la resina experimental con mejor rendimiento era HLB-01, con recuperaciones superiores al 80 % y RSD típicamente ≤ 5 % para los 6 analitos.

- 25 El cribado preliminar reveló que el siguiente nivel de experimentación debería centrarse en la resina HLB-01. Esta resina se preparó comenzando con una relación monómero de 63:37 (DVB/AN) y una relación de extensión de fase de 150:150 (o-xileno/MIBC). Esta resina tuvo un desempeño mejor que HLB-03, que sólo difirió por la relación de extensión de fase, lo que resultó en menor macroporosidad; y HLB-100, que difirió en el monómero hidrófilo (sustituyendo N-vinilpirrolidona por acrilonitrilo).

- 30 Cribado prolongado. Se eligieron 20 analitos adicionales con el fin de realizar un cribado prolongado para optimizar aún más la resina HLB experimental. La Tabla 22 muestra los 20 analitos y sus valores de log P. Esta mezcla representa un rango más amplio de carácter hidrófobo. Esta variedad debería ayudar a encontrar una resina HLB aún más ideal.

Tabla 22 Mezcla de 20 analitos utilizada para el cribado prolongado de resinas experimentales

Analito	Loq P
Amilorida	-0,30
Imidacloprid	0,57
Nizatidina	1,10
Benzoilecgonina	1,71
Nevirapina	2,50
Atrazina	2,61
Buspirona	2,63
Imiquimod	2,70
Metapirileno	2,87
Mirtazapina	2,90
Claritromicina	3,16
Mianserina	3,52
Hidroquinidina	3,77
Mesoridazina	3,90
Haloperidol	4,30
Nefazodona	4,70
Imipramina	4,80
Amitriptilina	5,10
Loratadina	5,20
Losartán	6,10

5 Durante el cribado preliminar, se realizaron grandes cambios en la química de los polímeros para identificar las condiciones de interés. Con el fin de optimizar aún más la resina HLB, se realizaron pequeños cambios en la química durante el cribado prolongado. Esto permitirá un "ajuste de precisión" de la química del polímero. La Tabla 23 contiene las composiciones de copolímeros y las características de porosidad de las resinas adicionales: HLB-22 y HLB-26, en comparación con HLB-01.

10 Tabla 23 Composiciones de copolímeros y características de porosidad de resinas experimentales adicionales.

ID de resina	DVB (%)	AcrilN (%)	o-xileno: MIBC (p:p)	% de microporos superficial) (m ² /g)	área % de microporos (volumen) (cc/g)
HLB-01	63	37	150:150	16,8	13,5
HLB-22	75	25	150:150	28,7	17,6
HLB-26	75	25	50:150	33,6	26,4

15 La Figura 8 y la Tabla 24 comparan las recuperaciones de 20 analitos extraídos de suero adicionado en condiciones ácidas para las tres resinas co-poliméricas experimentales. En este análisis, se encontró que la resina HLB-22 mejoró el rendimiento sobre las resinas HLB-01 y HLB-26. Esta resina tiene una relación de monómero inicial de 75:25 (divinilbenceno/acrilonitrilo).

Tabla 24 Número de analitos dentro de cada categoría de recuperación absoluta para tres resinas experimentales.

Número de analitos			
Recuperación (%)	HLB-01	HLB-22	HLB-26
>70%	12	16	12
50-70%	7	2	6
<50%	1	2	2

5 Cada resina experimental también se evaluó con respecto a la capacidad de eliminar fosfolípidos de muestras de matriz. La Figura 9 muestra una superposición de trazas de MRM de suero de ternera no extraído con muestras que habían sido extraídas con varias resinas experimentales y HLB A convencional. Todas las resinas experimentales fueron capaces de eliminar >95 % de los fosfolípidos presentes. Se encontró que HLB-22 daba como resultado una eliminación del 98,7 % cuando se utilizaron condiciones de extracción ácida.

10 A continuación, también se investigó una sílice recubierta de polímero. Se preparó un material que tuvo éxito en la eliminación de fosfolípidos >99 %. Después de identificar las condiciones óptimas del polímero, la siguiente etapa fue comparar el rendimiento de este polímero experimental con dos productos convencionales: HLB A convencional y HLB B convencional.

15 La primera comparación se realizó utilizando el protocolo de 5 pasos con la mezcla de 20 analitos detallada en la Tabla 22. La Figura 10 compara las recuperaciones absolutas de analito en los 20 analitos usando polímero experimental HLB-67 y HLB B convencional. Al usar las mismas metodologías de extracción, el copolímero experimental HLB-67 fue capaz de extraer los 20 analitos con recuperaciones >70 %. Para HLB B convencional, 18/20 analitos tuvieron altas recuperaciones absolutas. Este resultado confirma que los materiales descritos en la presente tienen el potencial de ser utilizados como un reemplazo directo para los métodos convencionales de 5 pasos existentes.

20 A continuación, se evaluó el potencial de la resina experimental HLB-67 para superar al HLB convencional. Esto implicó una vez más la extracción de la mezcla de 20 analitos de suero adicionado en condiciones ácidas, sin embargo, durante esta evaluación se utilizó un protocolo simplificado de 3 pasos. No se incluyeron pasos de acondicionamiento o de equilibrio. Los resultados de esta evaluación se pueden ver en la Figura 11. Sólo 14/20 analitos tuvieron recuperaciones absolutas >70 % cuando se utilizó HLB convencional con un método de 3 pasos. Para nuestra resina experimental HLB-67, 17/20 analitos tuvieron una recuperación >70 % cuando una muestra fue cargada en un lecho seco. Esto sugiere que la resina experimental tiene una ventaja sobre el producto convencional. Dado que los pasos de condición y equilibrio no son necesarios, un usuario puede ahorrar tiempo y pasos usando el método de 3 pasos, en lugar de 5 pasos.

30 La resina experimental HLB-67 fue probada contra HLB A convencional. Para esto, se eligió una mezcla de ocho analitos. La Tabla 25 enumera los ocho analitos y sus valores log P.

Tabla 25 Analitos utilizados para las evaluaciones de protocolo de 3 pasos.

Analito	Log P
Azidotimidina (AZT)	0,05
Fenacetina	1,58
Betametasona	1,94
Alprazolam	2,12
Naproxeno	3,18
Propranolol	3,48
Protriptilina	4,70
Amitriptilina	4,92

35 Se encontró que la resina copolimérica HLB-67 experimental funcionaba casi idénticamente a HLB A convencional (Figura 12). Estos resultados también demuestran que el material HLB descrito en la presente es adecuado para los métodos SPE de 3 pasos.

40 La siguiente comparación que se hizo con los productos HLB convencionales fue la eliminación de matriz. Esto se logró mediante el monitoreo de siete transiciones de MRM diferentes que representan diferentes clases de fosfolípidos. Se compararon las áreas pico totales entre las muestras extraídas y el suero no extraído para determinar el porcentaje promedio de eliminación de fosfolípidos. En la Tabla 26 se compara la eliminación de matriz entre una resina experimental, HLB A convencional y HLB B convencional. Se demostró que el material experimental eliminaba una cantidad comparable de fosfolípidos de la muestra como los materiales convencionales.

45 Tabla 26 Comparación de la eliminación de fosfolípidos realizada con una resina experimental y dos resinas convencionales.

Resina utilizada	% promedio de eliminación de fosfolípidos
HLB experimental	98,8
HLB A convencional	98,9

ES 2 967 925 T3

Resina utilizada	% promedio de eliminación de fosfolípidos
HLB B convencional	98,7

5 Después de establecer que las resinas copoliméricas experimentales descritas en la presente son adecuadas como reemplazo directo y mejora sobre varios productos convencionales, la etapa final de evaluación se centró en determinar la reproducibilidad de la preparación del material. Se prepararon un total de cinco lotes a pequeña escala: 3 lotes a escala de investigación (HLB-22, HLB-67 y HLB-79) y 2 lotes de fabricación. Cada material fue evaluado usando el protocolo de 20 analitos descrito anteriormente: un método de 3 pasos usando 50:50 (ACN/MeOH) como disolvente de elución. La Tabla 27, Tabla 28 y Tabla 29 muestran las recuperaciones absolutas, de ajuste matricial y relativas de cada material, respectivamente.

10 Tabla 27 Comparación de las recuperaciones absolutas de suero adicionado en diferentes lotes de resina experimental.

Número de analitos (Recuperaciones absolutas)						
Recuperación (%)	Lote 1 R&D HLB-22	Lote 2 R&D HLB-67	Lote 3 R&D HLB-79	Lote de fab. 1	Lote de fab. 2	HLBA convencional (referencia)
>70%	17	18	18	17	19	17
50-70%	3	2	2	3	1	3
<50%	0	0	0	0	0	0

Tabla 28 Comparación de las recuperaciones de ajuste matricial de suero adicionado en diferentes lotes de resina experimental.

Número de analitos (Recuperaciones de ajuste matricial)						
Recuperación (%)	Lote 1 R&D HLB-22	Lote 2 R&D HLB-67	Lote 3 R&D HLB-79	Lote de fab. 1	Lote de fab. 2	HLBA convencional (referencia)
>70%	18	18	19	20	20	18
50-70%	2	2	1	0	0	2
<50%	0	0	0	0	0	0

15 Tabla 29 Comparación de las recuperaciones relativas de suero adicionado en diferentes lotes de resina experimental.

Número de analitos (Recuperaciones relativas)					
Recuperación (%)	Lote 1 R&D HLB-22	Lote 2 R&D HLB-67	Lote 3 R&D HLB-79	Lote de fab. 1	Lote de fab. 2
>120%	1	0	0	0	0
80-120%	13	15	15	15	15
<80%	2	1	1	1	1

Experimentos adicionales:

20 El copolímero experimental HLB-01 se evaluó para determinar posibles efectos de secado excesivo mediante la medición absoluta de una mezcla de seis analitos utilizando el siguiente procedimiento. Se preparó una disolución madre de 1 mg/mL disolviendo 50 mg de los siguientes analitos en 50 mL de metanol: acetaminofén, procainamida, p-toluamida, 2,7-dihidroxinaftaleno, propranolol y doxepina. Se preparó una disolución madre analítica de 10 µg/mL transfiriendo 500 µL de disolución madre 1 mg/mL a 49,5 mL de disolución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM. Los reactivos se prepararon utilizando frascos volumétricos rellenos de acuerdo con el procedimiento estándar. Se utilizaron tres formatos de cartucho SPE de mL con pesos de lecho de 60 mg. Las muestras se procesaron utilizando el protocolo descrito en la

25 Tabla 30.

Tabla 30 Protocolo de SPE de 5 pasos con paso seco (utilizado para los datos de la Figura 13).

Protocolo de 5 pasos:
Acondicionamiento: 1 mL de MeOH
Equilibrio: 1 mL de disolución amortiguadora de fosfato 20 mM
Secar: aplicando 10" Hg de vacío durante 10 min

Cargar: Muestra de 1 mL en disolución amortiguadora de fosfato 20 mM
Lavar: 1 mL de MeOH al 5 %
Eluir: 1 mL de MeOH
Evaporar: 40 °C, corriente de nitrógeno de 68,9 kPa (10 psi)
Reconstituir: 1 mL de disolución amortiguadora de fosfato 20 mM

5 Las tasas de caída se mantuvieron a una caída por segundo o menos. Las existencias de analito se disolvieron inicialmente en metanol a concentraciones de 1 mg/mL y luego se diluyeron a 10 µg/mL en una disolución amortiguadora de fosfato potásico de 20 mM (pH 7) para producir el material de carga. Después de la evaporación, todas las muestras se sometieron a vórtice 30 segundos en una disolución amortiguadora de fosfato potásico de 20 mM (pH 7) para reconstituirse para el análisis. Se analizaron tres alícuotas de 10 µg/mL de disolución de carga y se utilizó el promedio de recuento de área para cada compuesto como una referencia para calcular la recuperación de los respectivos compuestos.

10 Parámetros de HPLC: El análisis se realizó utilizando una HPLC Agilent 1190 acoplada con un detector UV. Los parámetros del método se pueden encontrar en la Tabla 31.

Parámetros de instrumentos HPLC-UV			
Columna	Discovery C18, 5 cm x 4,6 mm x 5 µm		
Fase móvil A	Fosfato de potasio 20 mM		
Fase móvil B	MeOH		
Volumen de inyección	25 µL		
Gradiente	Tiempo (min)	A %	B %
	0,0	95	5
	2,00	95	5
	3,00	65	35
	7,00	65	35
	8,00	30	70
	12,00	30	70
	12,10	95	5
20,00	95	5	
Longitud de onda	230 nm		
Flujo	1,0 mL/min		

Tabla 31 Parámetros HPLC-UV para el análisis de cribado de 6 analitos

15 La Figura 13 muestra la recuperación absoluta de seis analitos utilizando un copolímero HLB que contiene acrilonitrilo descrito en la presente (HLB-01) para extraer de una disolución amortiguadora. El material se secó después del pretratamiento, demostrando que el efecto de secado excesivo no es un problema al trabajar con el nuevo material HLB. Estos analitos representan un rango log P de 0,5-4,3.

20 El copolímero HLB-01 se evaluó entonces contra un HLB convencional que contenía vinilpirrolidona, HLB A convencional, midiendo la recuperación de los mismos seis analitos, pero utilizando el proceso de 3 pasos. Se siguió la misma preparación de disolución y análisis de HPLC que se describieron anteriormente. El procedimiento SPE se modificó ligeramente como se muestra en la Tabla 32.

Tabla 32 Protocolo de SPE de 3 pasos para los datos de la Figura 14.

Protocolo de 3 pasos:
Cargar: Muestra de 1 mL en disolución amortiguadora de fosfato 20 mM
Lavar: 1 mL de MeOH al 5 %
Eluir: 1 mL 90:10 (ACN/MeOH)
Evaporar: 40 °C, corriente de nitrógeno de 68,9 kPa (10 psi)
Reconstituir: 1 mL de disolución amortiguadora de fosfato 20 mM

La Figura 14 muestra una comparación de la recuperación absoluta del material de HLB que contiene acrilonitrilo (HLB-01) y un material de HLB convencional que contiene vinilpirrolidona (HLB A convencional) cuando se utiliza un protocolo simplificado de 3 pasos (sin acondicionamiento ni equilibrio antes de la carga de la muestra) para extraer de suero adicionado. Este conjunto de compuestos en la Figura 14 representa un rango log P de 0,5-4,3.

5

El copolímero experimental HLB HLB-65 fue recubierto con partículas de sílice como se describió anteriormente. Las partículas de sílice recubiertas de HLB se utilizaron de la siguiente manera. Se utilizó una mezcla de 20 analitos que incluía los siguientes: amitriptilina, atrazina, benzoilecgonina, buspirona, claritromicina, haloperidol, hidroquinidina, imidacloprid, imipramina, imiquimod, loratadina, mesoridazina, metaprileno, mianserina, mirtazapina, nefazodona, nevirapina, nizatidina y losartán. Una disolución amortiguadora de acetato de amonio de 20 mM, pH 7,4, se adicionó con analito a una concentración de 200 ng/mL. La muestra adicionada se diluyó 1:1 con acetato de amonio 20 mM. Estas disoluciones también se combinaron con una mezcla estándar interna, lo que permitió concentraciones finales de 100 ng/mL de analito y 50 ng/mL de normas internas. El procedimiento SPE se describe en la Tabla 33.

10

15 Tabla 33 Procedimiento SPE utilizado para la evaluación de sílice recubierta de polímero (utilizado para los datos de la Figura 15).

Procedimiento SPE	
Cargar 1 mL de muestra (diluida 1:1 con acetato de amonio 20 mM) en un lecho seco (60 mg de peso en lecho).	
Cartucho de lavado con 1 mL de MeOH al 5 % (ac.)	
Eluir con 1 mL de 50:50 (ACN/MeOH).	
Evaporar las muestras hasta la sequedad a 40 °C con una corriente de nitrógeno de 68,9 kPa (10 psi).	
Reconstituir en 1 mL de fase móvil de inicio.	

Análisis LC-MS/MS: Las muestras se analizaron utilizando una UHPLC Agilent 1290 Infinity junto con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460. La Tabla 34 y la Tabla 35 muestran los parámetros fuente específicos de UHPLC y MS. La Tabla 36 y la Tabla 37 muestran los parámetros de MS específicos de compuestos para el análisis de analitos en modo positivo y negativo, respectivamente.

20

Parámetros de instrumentos UHPLC			
Columna	Ascentis Express RP-Amida; 10 cm x 2,1 mm; 2,7 µm		
Temperatura de la columna (°C)	40		
Fase Móvil A	ácido acético al 0,1 %, acetato de amonio 5 mM		
Fase móvil B	Acetato de amonio 5 mM en acetonitrilo		
Tasa de flujo (mL/min)	0,4		
Volumen de inyección (µL)	2,00		
Gradiente	Tiempo (min)	A %	B %
	0,00	95,0	5,0
	1,00	95,0	5,0
	7,00	57,0	43,0
	8,00	57,0	43,0
	10,00	38,5	61,5
	11,00	95,0	5,0
	14,00	95,0	5,0

Tabla 34 Parámetros de instrumentos UHPLC utilizados para el análisis de la mezcla de 20 analitos (utilizados para los datos de las Figuras 15 y 16).

25

Tabla 35 Parámetros fuente de MS utilizados para el análisis de la mezcla de 20 analitos (utilizados para los datos de la Figura 15 y 16).

Parámetros fuente de MS	
Tensión capilar (V)	3500
Temp. de gas (°C)	350
Flujo de gas (L/min)	8

Parámetros fuente de MS	
Nebulizador (kPa (psi))	310,3 (45)
Calentador de gas de impulsión	350
Flujo de gas de impulsión	12
Acelerador de celdas (V)	7
Polaridad	Positiva y negativa (2 análisis separados)
Δ EMV	200

Tabla 36 Parámetros de compuestos para el análisis de modo positivo de la mezcla de 20 analitos (utilizado para los datos de la Figura 15 y 16).

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	t_r (min)	Ventana de retención (min)
5-(N,N-dimetil)amilorida	259	199,9	100	15	5,32	1,5
Abacavir	287	191	135	20	4,04	1,5
Amilorida	230,1	170,9	100	17	3,15	1,5
Amitriptilina	278,19	91	110	25	7,15	1,5
Amitriptilina- d_3	281,44	91	100	25	7,15	1,5
Atrazina	216,1	173,9	115	17	7,79	1,5
Atrazina- d_5	222	179,7	115	20	7,74	1,5
Benzoilecgonina	290,14	168	115	17	3,87	1,5
Benzoilecgonina- d_3	293,31	171	120	16	3,86	1,5
Buspirona	386,21	122	165	33	5,58	1,5
Buspirona- d_8	394,21	121,9	185	36	5,56	1,5
Claritromicina	748,51	158	165	29	7,50	3
Haloperidol	376,15	122,9	130	45	6,96	1,5
Haloperidol- d_4	380,9	126,9	120	45	6,94	1,5
Hidroquinidina	327,21	55,1	150	45	5,59	1,5
Imidacloprid	256,06	209	95	9	4,83	1,5
Imidacloprid- d_4	260,7	131,4	100	33	5,32	1,5
Imipramina	281,2	86,1	105	13	6,93	1,5
Imipramina- d_3	284,2	193	100	40	6,93	1,5
Imiquimod	241,1	168,1	150	40	6,40	1,5
Loratadina	383,11	337	150	21	10,92	1,5
Loratadina- d_5	388	337	150	25	10,95	1,5
MCPPP- d_8	206	159	135	20	4,47	1,5
Mesoridazina	387,2	98,1	150	40	6,16	1,5
Metapirileno	262,1	97	150	40	5,30	1,5
Metapirileno-dimetil- d_6	268	97	150	20	5,28	1,5
Mianserina	265,2	58,2	128	24	6,33	1,5
Mianserina- d_3	268,4	61,2	130	25	6,31	1,5
Mirtazapina	266,2	72,2	128	16	4,98	1,5
N-desmetil-mirtazapina	252,34	195	115	21	4,90	1,5
Nefazodona	470,2	246,1	150	20	7,91	1,5

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	de t _r (min)	Ventana de retención (min)
Nevirapina	267,1	80	150	40	5,57	1,5
Nizatidina	332,1	58,1	150	40	1,50	1,5
Quinina	325,42	79	145	45	5,28	1,5

Tabla 37 Parámetros de compuestos para el análisis de modo negativo de la mezcla de 20 analitos (utilizado para los datos de la Figura 15 y 16).

Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	Tiempo de retención (min)
Losartán	421	127	150	40	7,89

5 Las recuperaciones absolutas de los analitos utilizando sílice recubierta con HLB-65 experimental se muestran en la Figura 15. La sílice recubierta con este copolímero HLB extrajo una variedad de analitos de muestras de suero adicionado utilizando un procedimiento SPE tradicional de 5 pasos.

10 Evaluación de HLB B convencional y material HLB experimental HLB-79 (datos mostrados en la Figura 16). La Tabla 38 muestra el procedimiento SPE. Se utilizó el método LC-MS/MS descrito anteriormente.

Tabla 38 Procedimiento SPE utilizado para la evaluación de sílice recubierta de polímero (utilizado para los datos de la Figura 16).

Procedimiento SPE
Cargar 1 mL de muestra (diluida 1:1 con ácido fosfórico al 2 % para HLB convencional; ácido fórmico al 0,4 % para HLB-79 experimental) en un lecho seco (60 mg de peso en lecho).
Cartucho de lavado con 1 mL de MeOH al 5 % (ac.)
Eluir con 1 mL de MeOH (para HLB convencional); 50:50 MeOH:ACN (para HLB-79)
Evaporar las muestras hasta la sequedad a 40 °C con una corriente de nitrógeno de 68,9 kPa (10 psi).
Reconstituir en 1 mL de fase móvil de inicio.

15 Como se muestra en la Figura 16, el HLB-79 experimental mostró una recuperación más consistente para la mezcla de 20 analitos que el HLB convencional que contiene vinilpirrolidona cuando se utilizó un protocolo simplificado de 3 pasos para extraer analitos de suero adicionado. Este conjunto de compuestos de 20 analitos representa un rango log P de -0,3-6,1. Debido al aumento de la polaridad del acrilonitrilo y a la capacidad de incorporarse dentro del benceno de divinilo, se obtuvieron mejores recuperaciones, particularmente para los analitos con valores log P más bajos.

20 Los copolímeros HLB proporcionados en la presente han demostrado ser útiles en una variedad de aplicaciones SPE. Utilizando los métodos descritos en la presente, los adsorbentes HLB mejorados son capaces de extraer consistentemente al menos 18/20 analitos con recuperaciones >70 % cuando se utilizan métodos de 5 o 3 pasos. Ventajosamente, los adsorbentes HLB mejorados proporcionados en la presente son adecuados para un protocolo de 3 pasos, en donde no se requerían pasos de acondicionamiento y equilibrio. También se encontró que el material HLB mejorado eliminaba >98 % de los fosfolípidos presentes en una muestra sérica, en promedio.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar un adsorbente HLB para la extracción de fase sólida, en donde el método comprende copolimerizar al menos un monómero hidrófobo y al menos un monómero hidrófilo en presencia de un porógeno no polar y un porógeno polar, en donde el monómero hidrófobo comprende divinilbenceno y el monómero hidrófilo comprende acrilonitrilo.
- 10 2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el porógeno no polar se selecciona del grupo que consiste en tolueno, xilenos, benceno, hexano, ciclohexano, pentano, heptano, octano, nonano, decano, dodecano, isooctano, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, y combinaciones de los mismos.
- 15 3. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el porógeno polar se selecciona del grupo que consiste en alcohol bencílico, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, 4-metil-2-pentanol, alcohol isoamílico, dodecanol, acetato de etilo, 2-etilhexanol, ciclohexanol, y combinaciones de los mismos.
- 20 4. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el porógeno no polar comprende o-xileno y el porógeno polar comprende 4-metil-2-pentanol.
- 25 5. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde:
(A) la relación de monómero hidrófobo a monómero hidrófilo está en el rango de 10:90 (% en peso) a 90:10 (% en peso);
(B) la relación de monómero hidrófobo a monómero hidrófilo está en el rango de 30:70 (% en peso) a 70:30 (% en peso);
o
(C) la relación de monómero hidrófobo a monómero hidrófilo es de 63:37 (% en peso).
- 30 6. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde el adsorbente HLB es poli(divinilbenceno-co-acrilonitrilo).
7. El método de conformidad con la reivindicación 6, en donde:
(A) la relación de divinilbenceno a acrilonitrilo está en el rango de 90:10 (% en peso) a 10:90 (% en peso);
(B) la relación de divinilbenceno a acrilonitrilo está en el rango de 25:75 (% en peso) a 75:25 (% en peso); o
(C) la relación de divinilbenceno a acrilonitrilo es de 63:37 (% en peso).

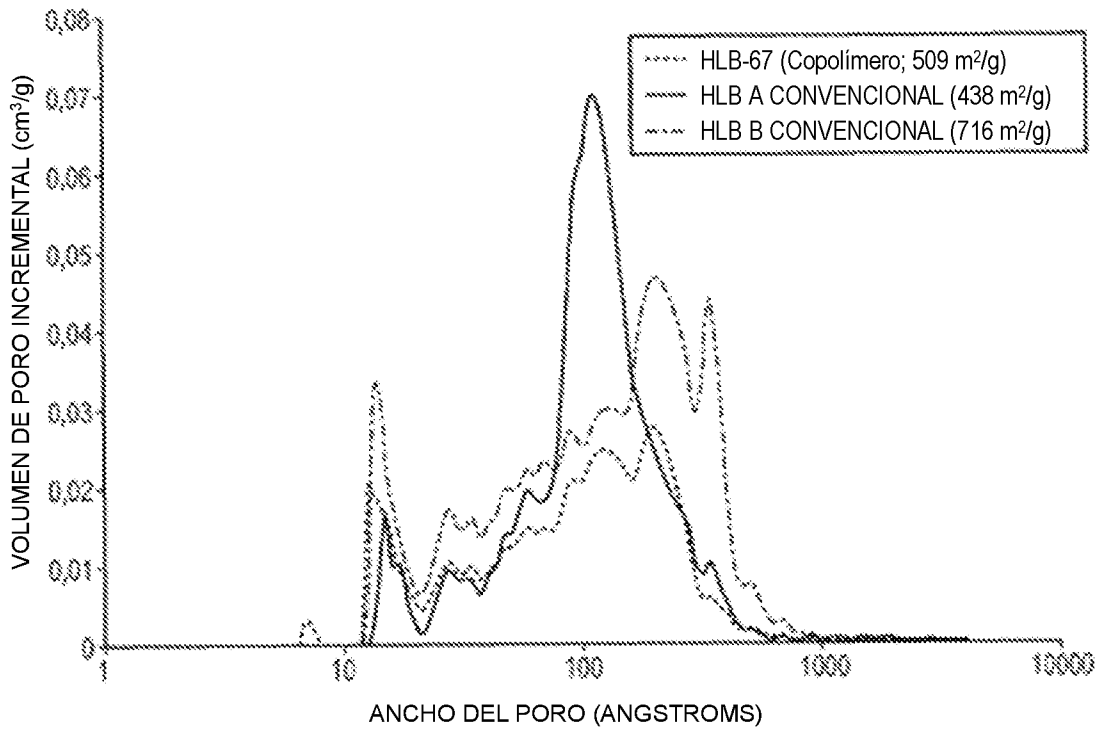


FIG. 1

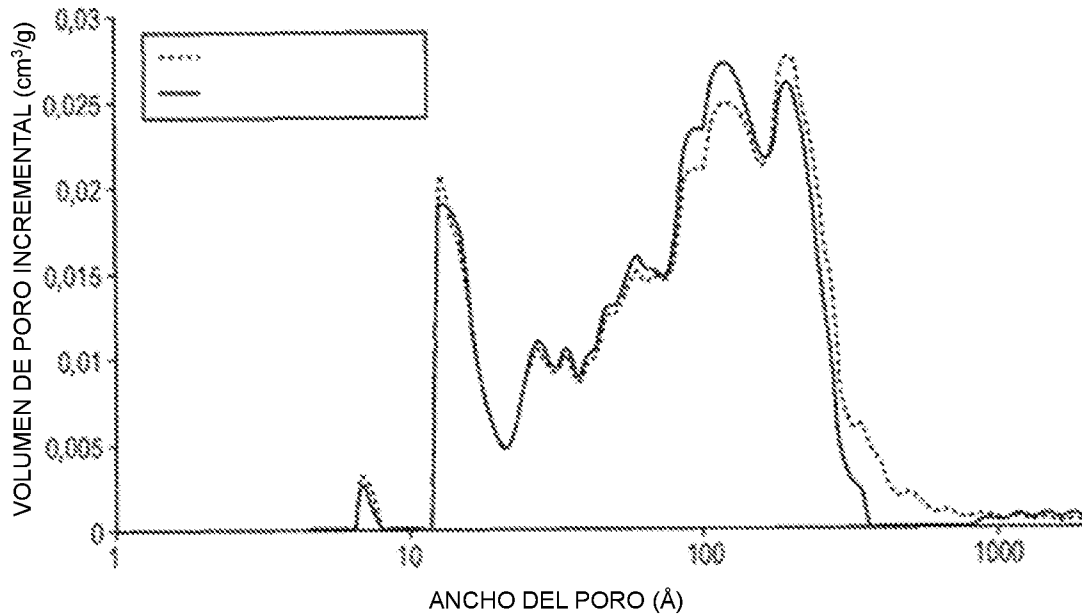


FIG. 2

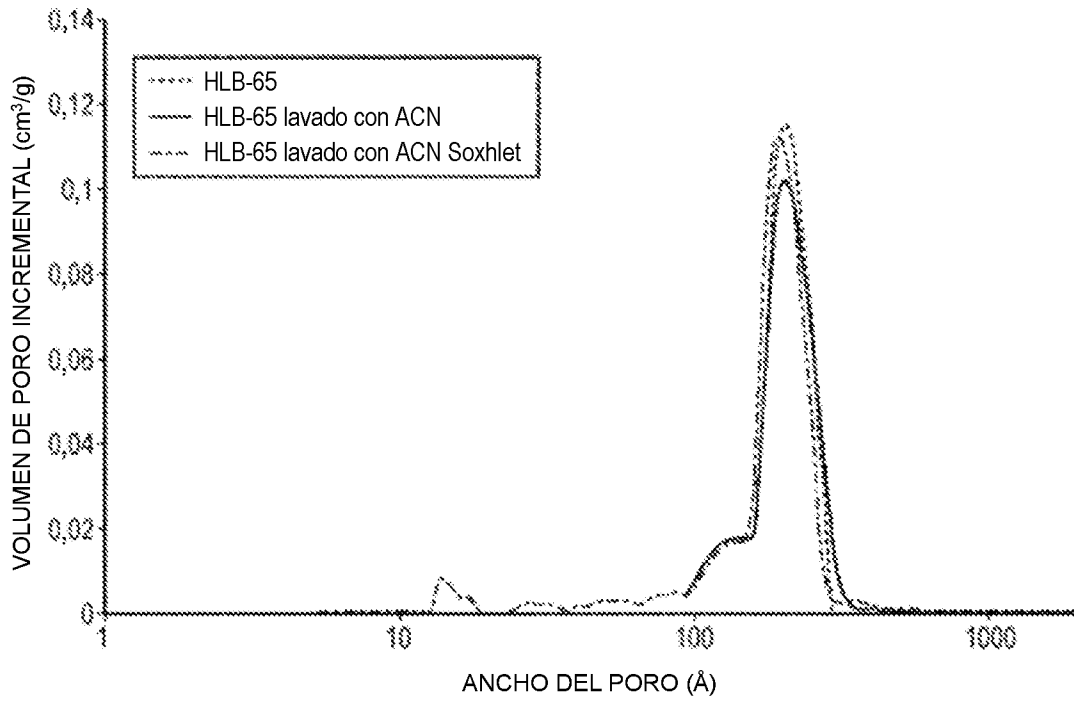


FIG. 3A

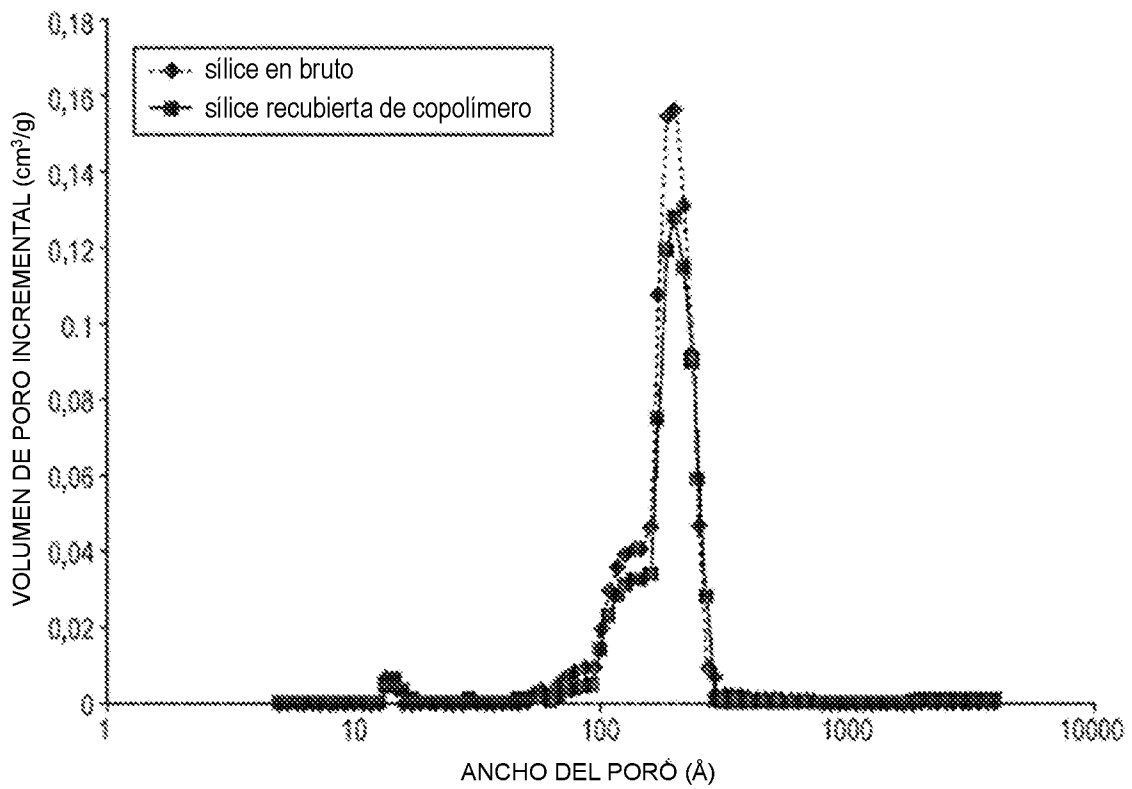


FIG. 3B

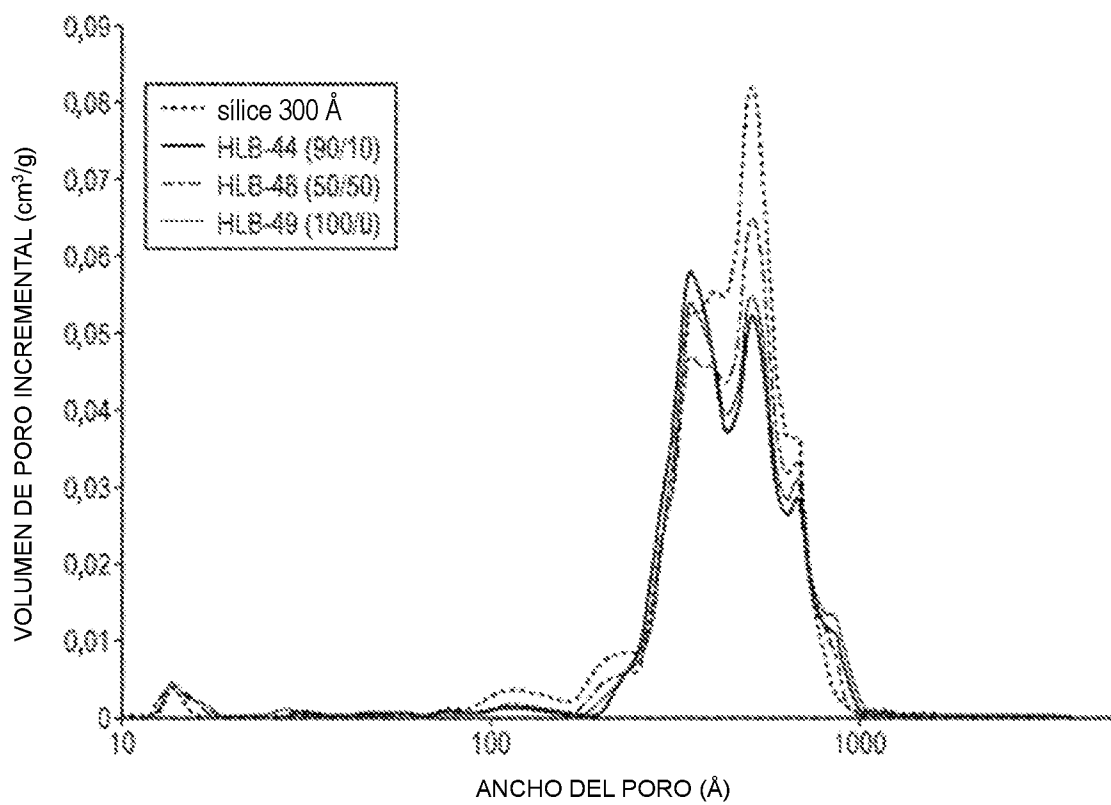


FIG. 4

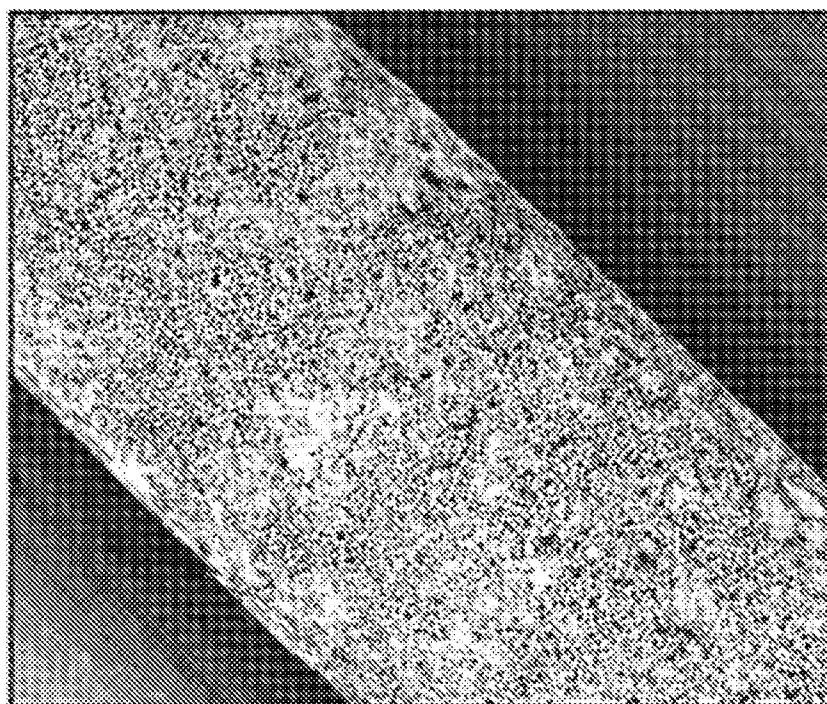
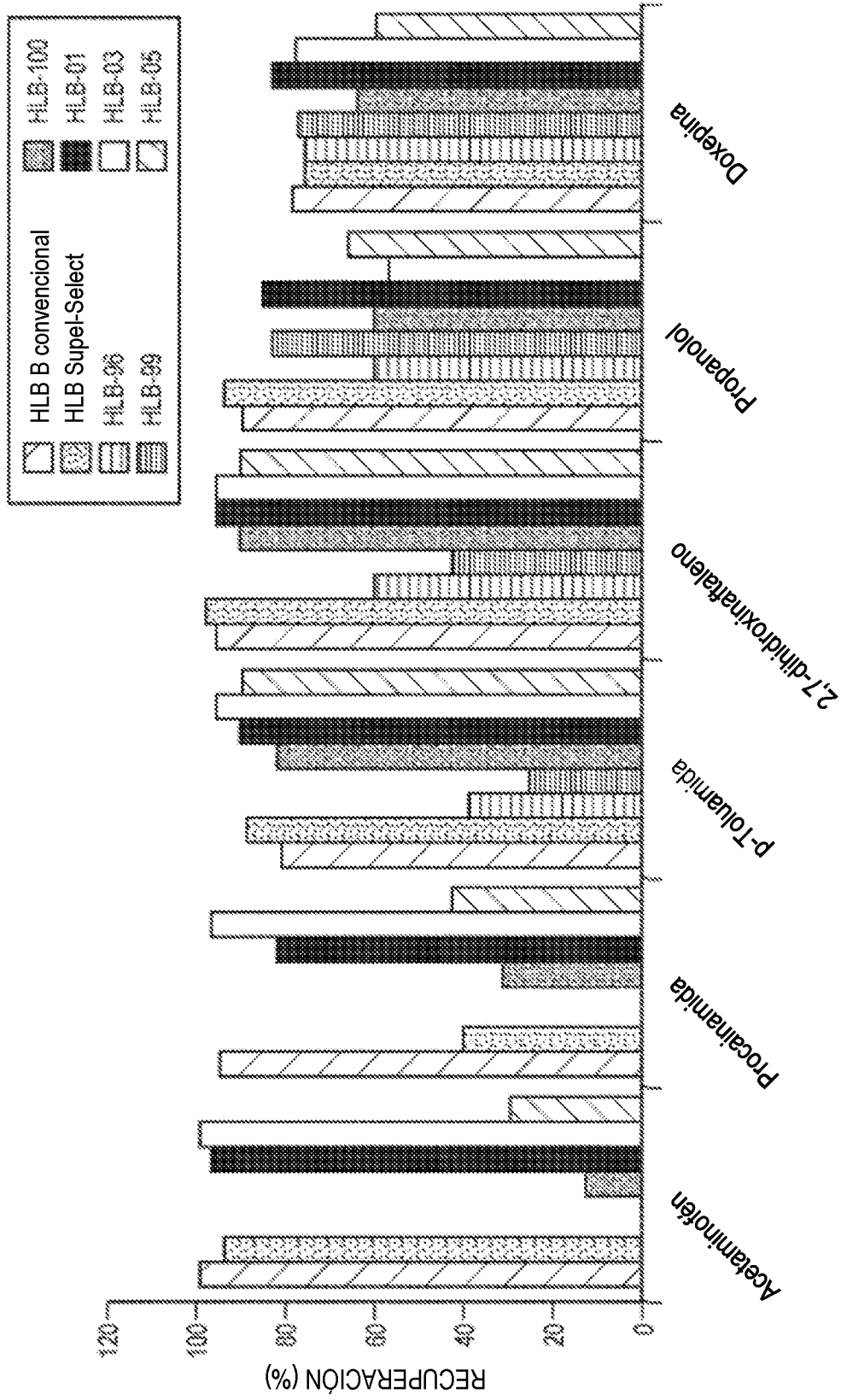
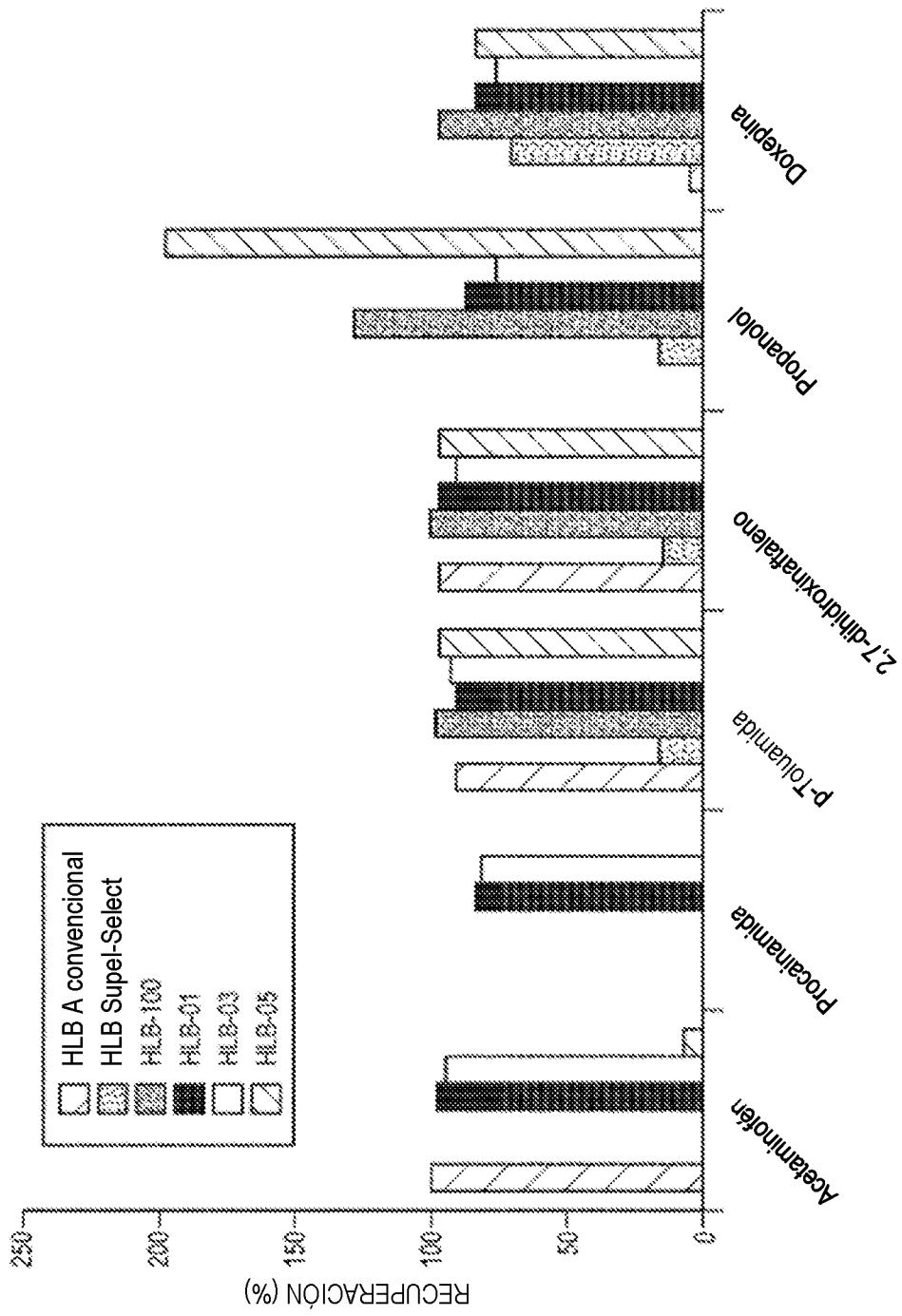


FIG. 5



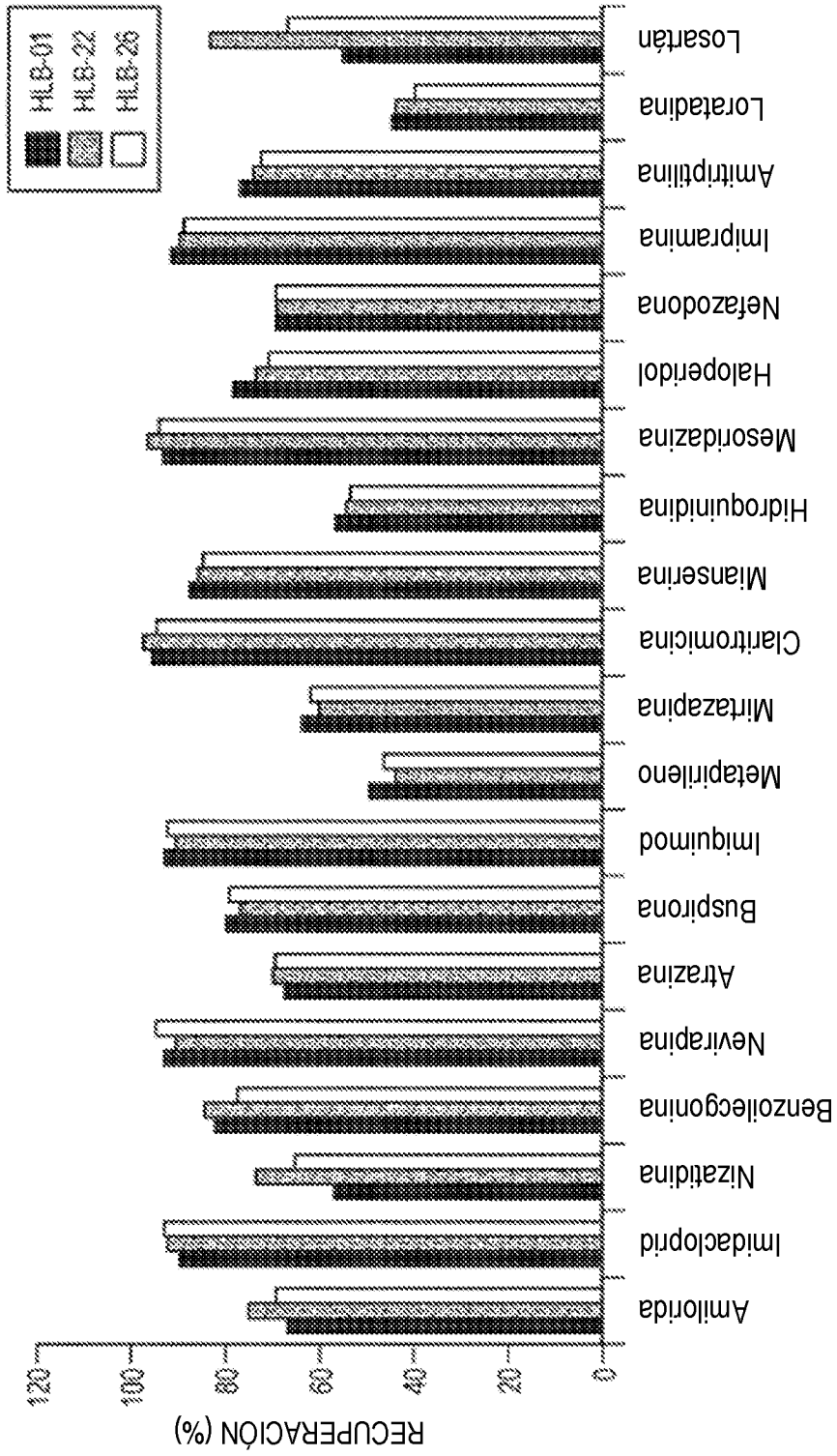
ANÁLITO (log P en aumento)

FIG. 6



ANÁLITO (log P en aumento)

FIG. 7



ANALITO (log P en aumento)

FIG. 8

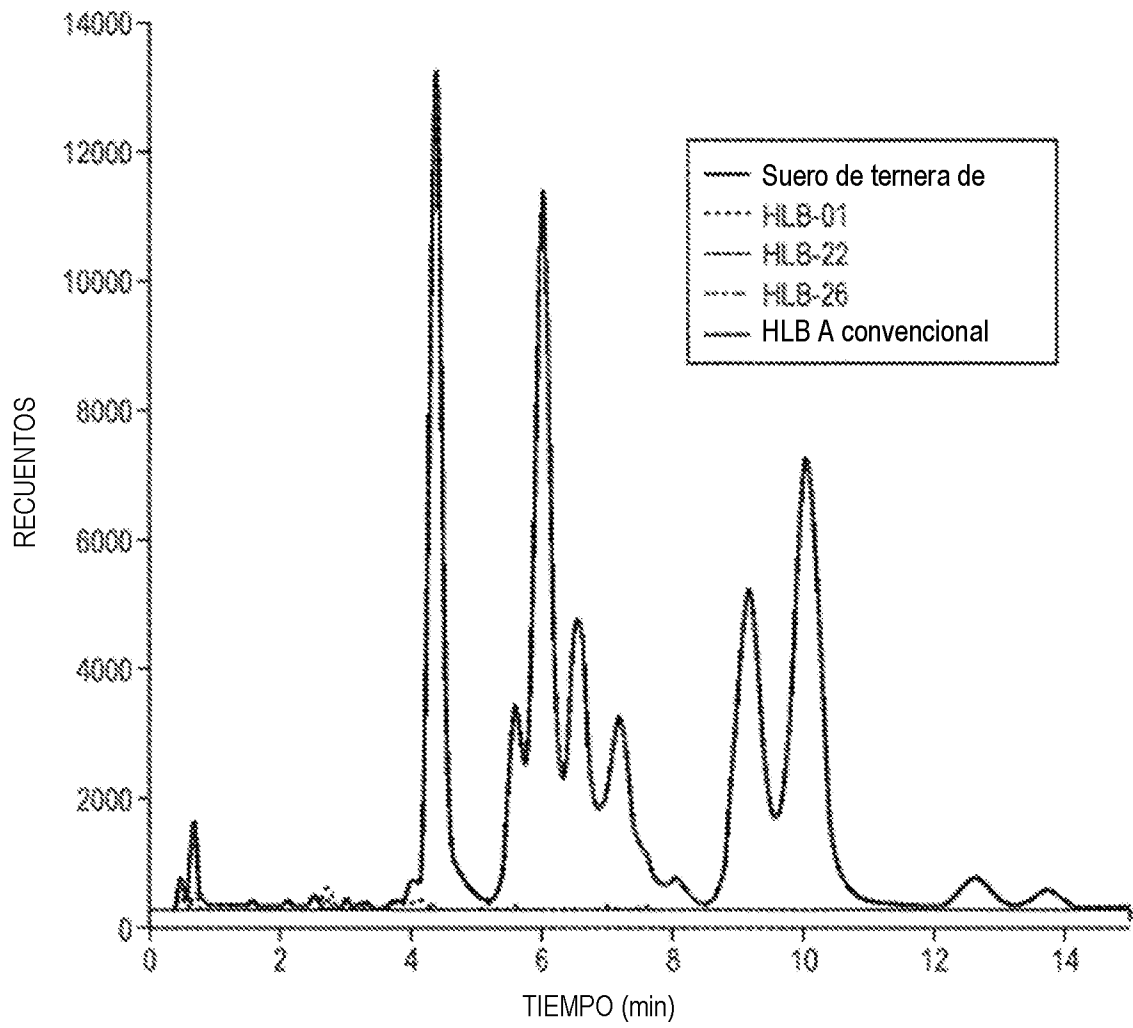


FIG. 9A

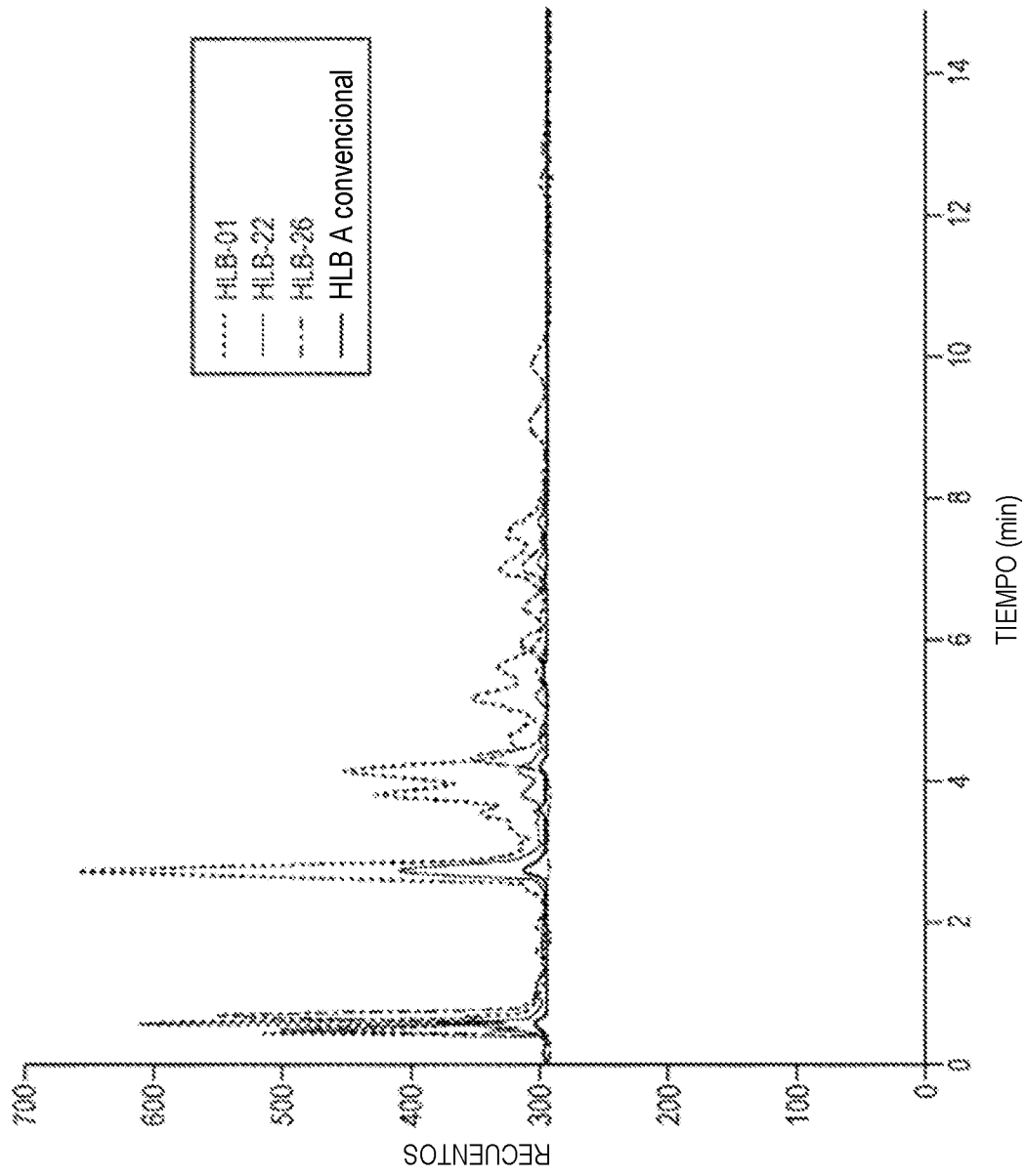
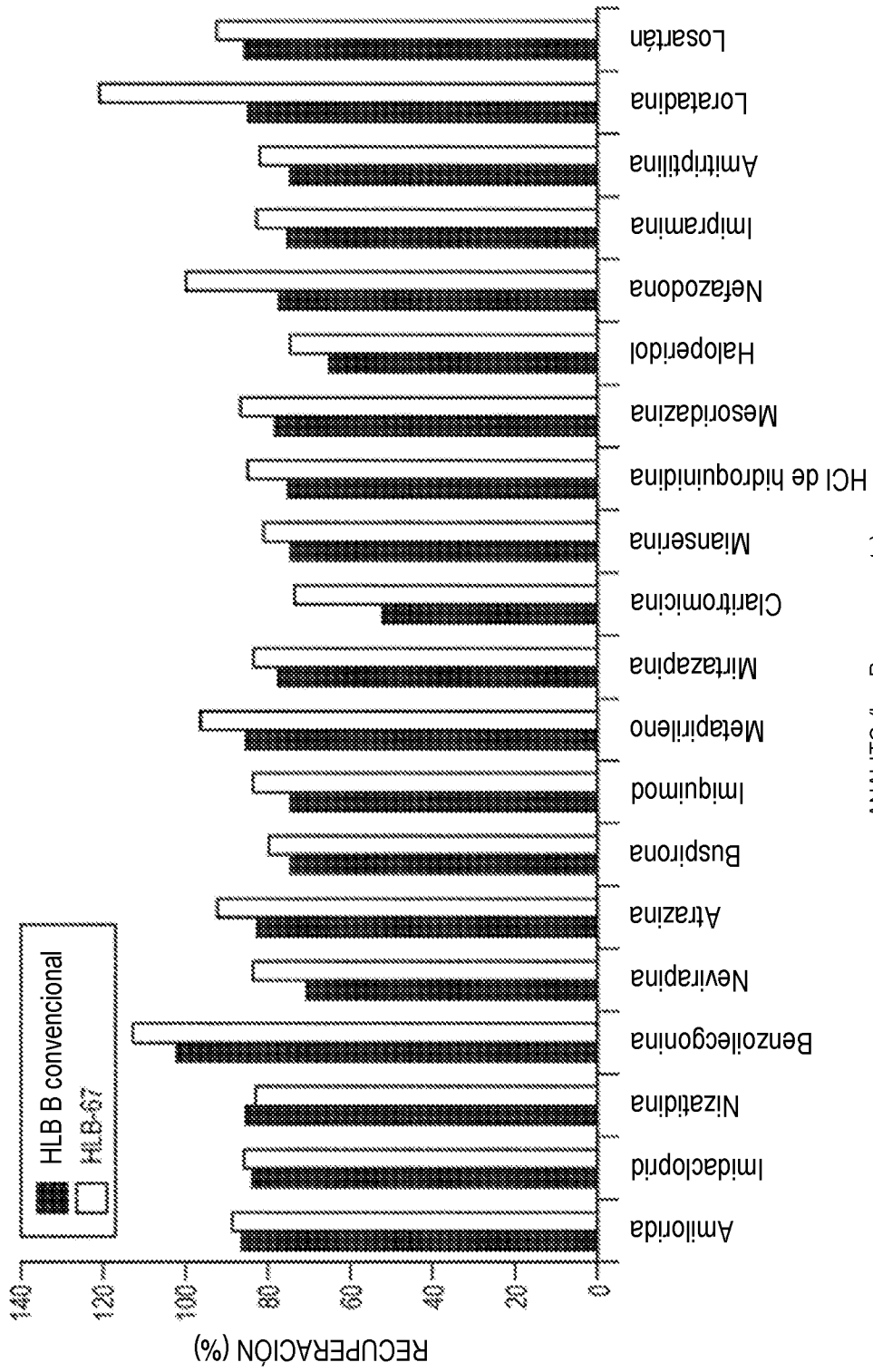
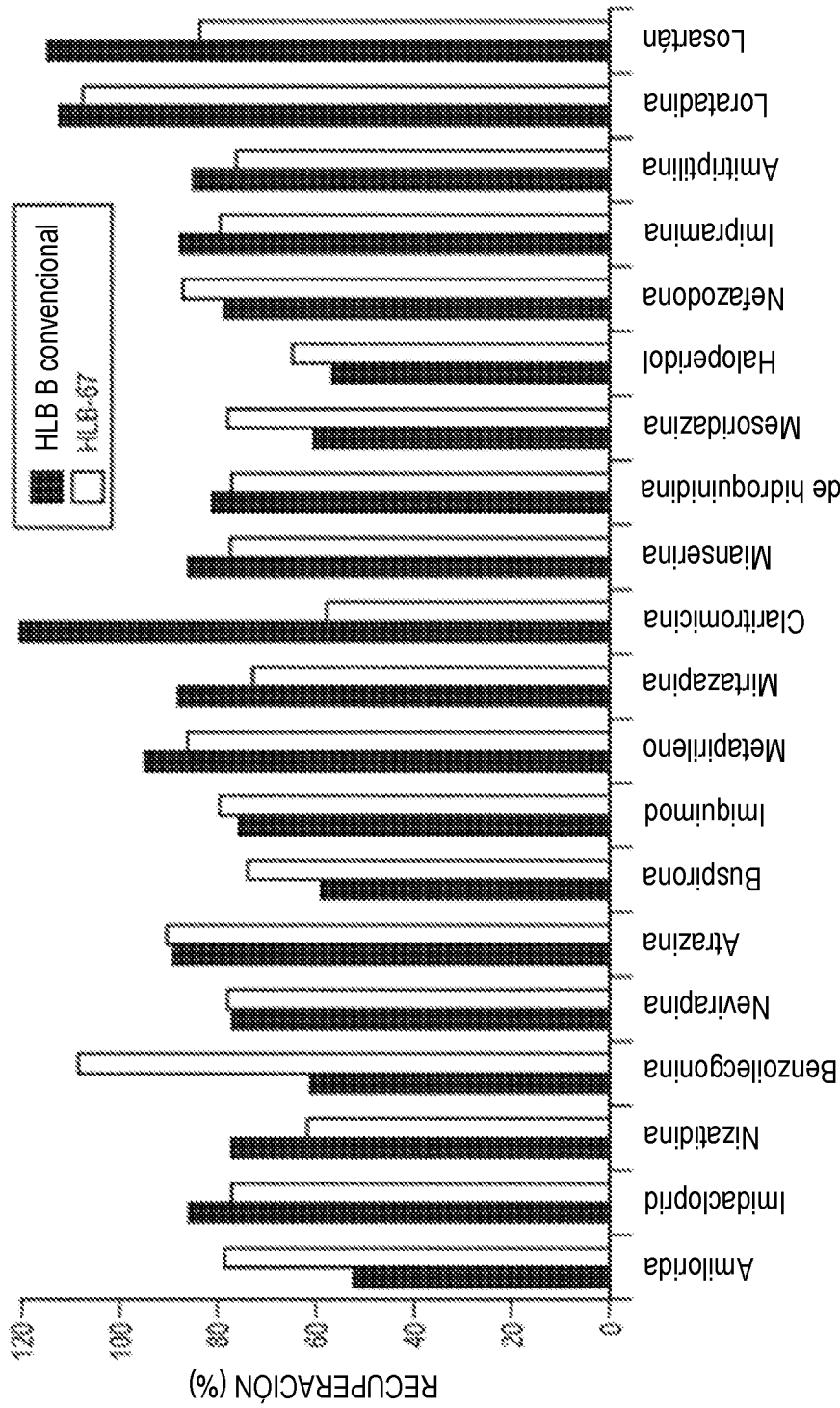


FIG. 9B



ANÁLITO (log P en aumento)

FIG. 10



ANÁLITO (log P en aumento)

FIG. 11

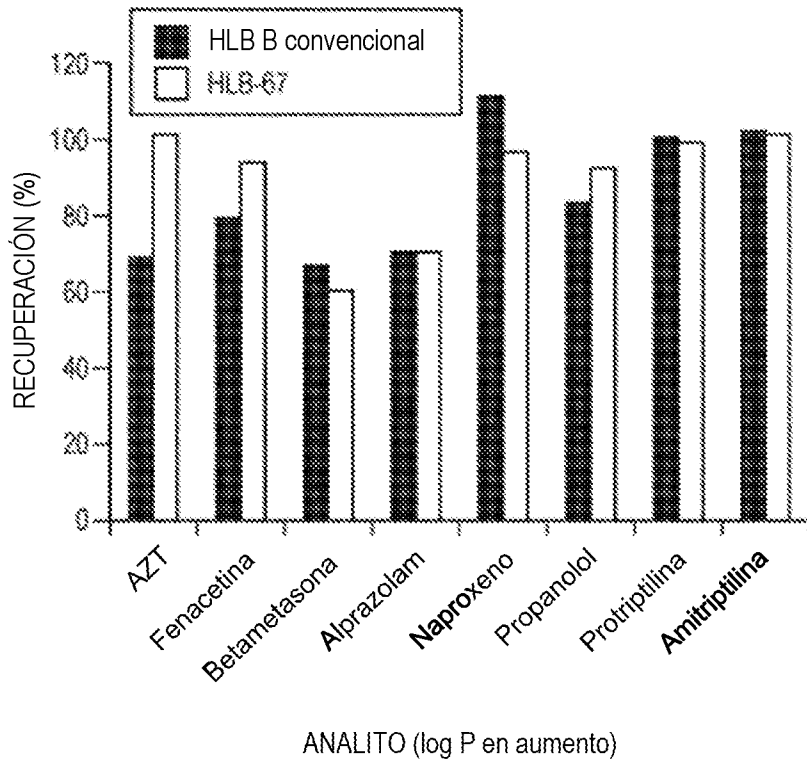


FIG. 12

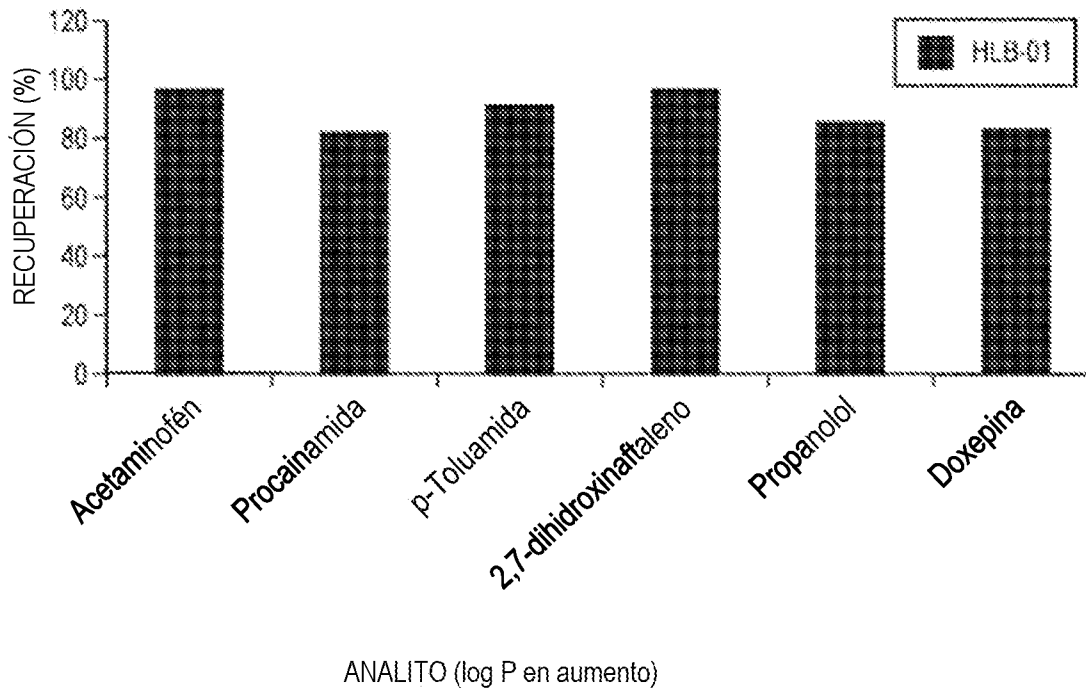
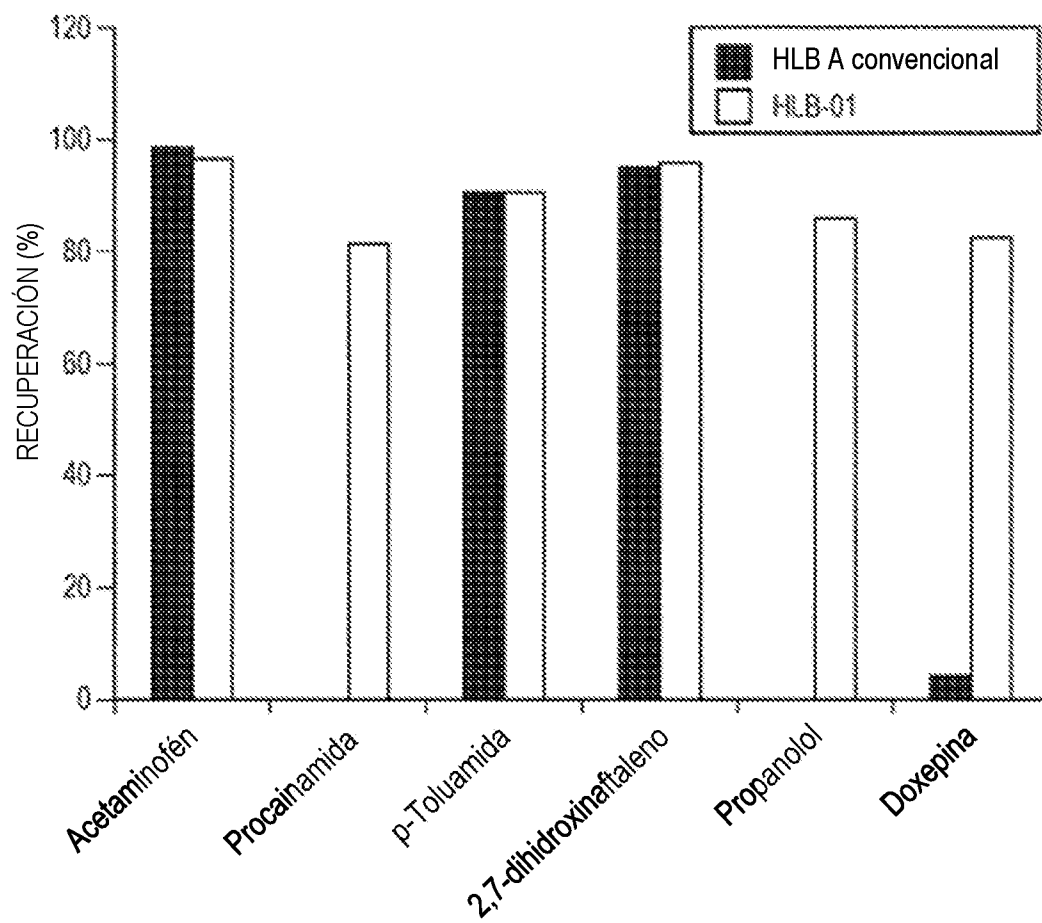
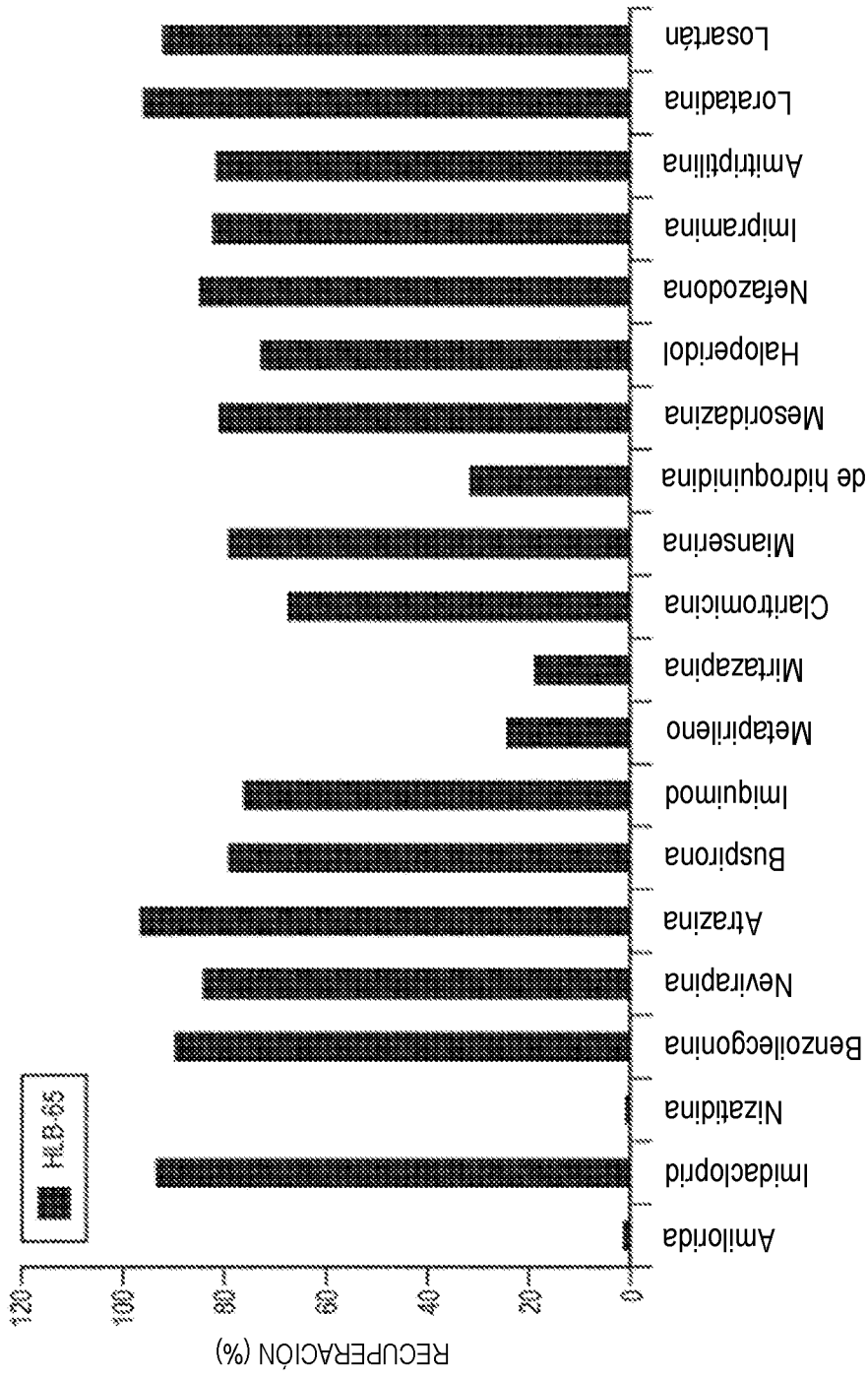


FIG. 13



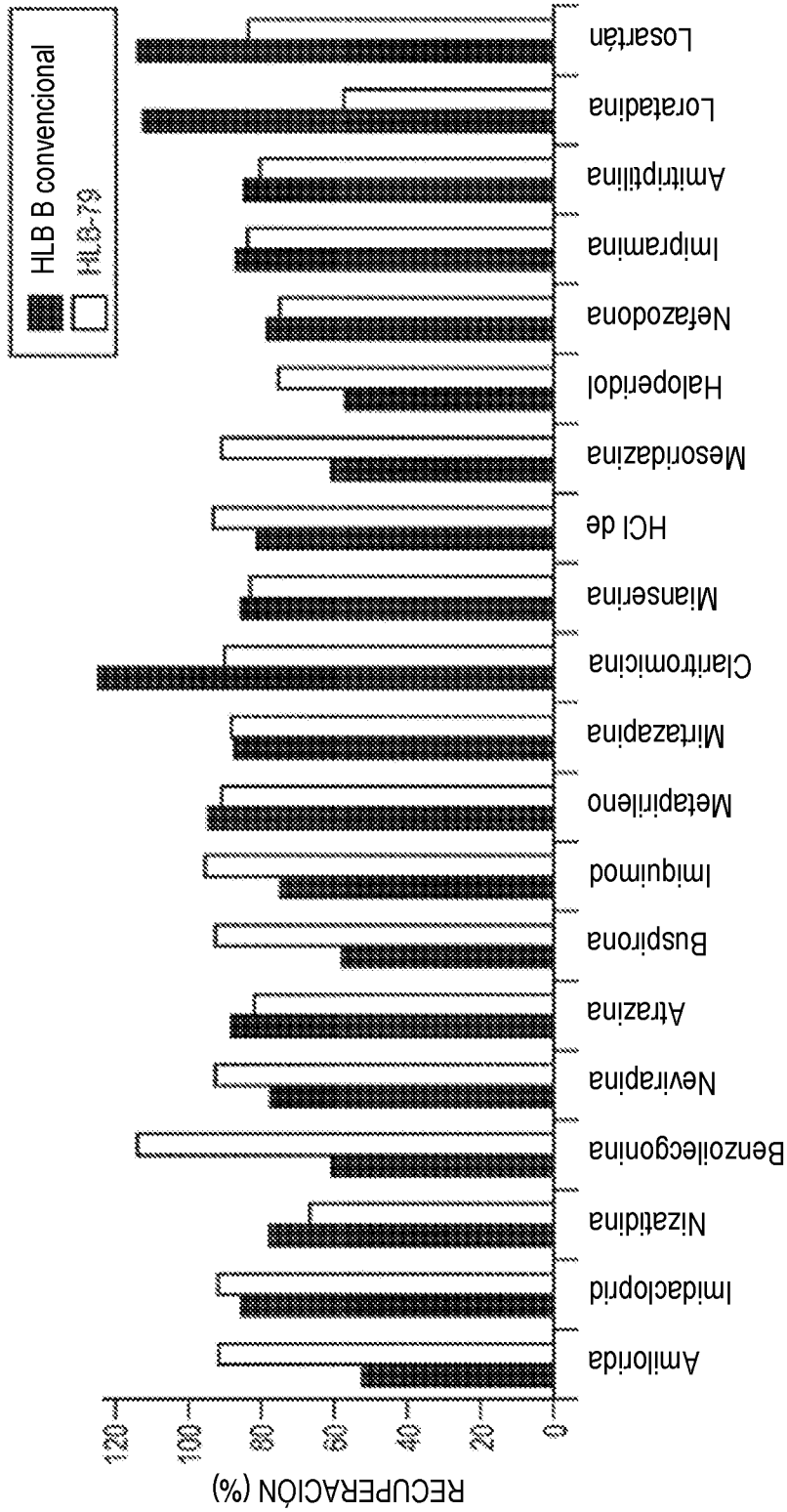
ANALITO (log P en aumento)

FIG. 14



ANALITO (log P en aumento)

FIG. 15



ANALITO (log P en aumento)

FIG. 16