(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 015 159**

(51) Int. Cl.:

G01N 30/72 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2020 E 20204420 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3992627**

(54) Título: **Cromatografía de líquidos: equivalencia de corriente por calibración de corriente individual**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2025

(73) Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es:

QUINT, STEFAN;
SCHWEINBERGER, FLORIAN y
TIEMANN, BENJAMIN

(74) Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

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

Cromatografía de líquidos: equivalencia de corriente por calibración de corriente individual

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a un aparato de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) que incluye un sistema de cromatografía de líquidos (CL) y una fuente de ionización, donde múltiples corrientes fluídicas se pueden conectar de forma alterna a la fuente de ionización. La presente divulgación también se refiere a un procedimiento para análisis químico en un aparato CL-EM.

Antecedentes

Existe un interés creciente por la implementación de espectrometría de masas y más específicamente de cromatografía de líquidos (CL) acoplada a espectrometría de masas en el laboratorio clínico así como en otros entornos de laboratorio. En estos entornos, con frecuencia se requiere procesar una variedad de diferentes ensayos de una manera en gran medida automatizada y, si es posible, usando un modo de acceso aleatorio (es decir, el analizador puede realizar cualquiera de los múltiples ensayos en cualquier momento, en comparación con sistemas donde se procesa un gran número de muestras que requieren un ensayo particular como un lote, o sistemas donde solo se procesan uno o dos ensayos durante períodos de tiempo más largos). Por lo tanto, los aparatos de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) basados en múltiples corrientes fluídicas en lugar de los dispositivos CL-EM comúnmente usados que comprenden solo una corriente individual han atraído recientemente mucha atención en el contexto de minimizar el tiempo de ciclo de inyección a inyección entre muestras posteriores y proporcionar un alto rendimiento del aparato.

Sin embargo, las corrientes de un sistema CL-EM de múltiples corrientes pueden estar sujetas a variaciones. Por ejemplo, columnas CL, dimensiones de capilares, válvulas, etc. pueden diferir entre corrientes, lo que en última instancia puede afectar, por ejemplo, a los volúmenes totales y muertos. Otras razones pueden incluir obstrucciones en diferentes elementos a lo largo de una vía de flujo de una corriente fluídica, tolerancias del fabricante en las dimensiones de capilares u otros elementos constitutivos del aparato, así como muchas otras razones. Debido a dichas inexactitudes, algunos de los sistemas CL-EM de técnica anterior que incluyen múltiples corrientes fluídicas son propensos a tener condiciones de flujo desiguales en diferentes corrientes fluídicas. La desigualdad entre diferentes corrientes fluídicas da como resultado desplazamientos en el tiempo de retención y ensanchamiento de picos en los cromatogramas medidos por EM incluso si los mismos analitos y disolventes con un perfil de gradiente de CL predeterminado individual se inyectan en cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas.

Dichos desplazamientos de retención y su ensanchamiento dan lugar, a su vez, a una reducción del tamaño del margen de detección de EM y a un deterioro en la calidad del análisis. Para detectar un error, en algunos sistemas de tecnología de la técnica anterior es necesario revisar los de instrumento pertinentes, lo que requiere una comprensión técnica profunda del sistema CL-EM en cuestión. En muchos casos, solo personal de servicio especialmente capacitado puede encontrar y resolver el problema, pero incluso para ellos puede ser una tarea bastante complicada y que requiere mucho tiempo. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas técnicas eficaces que puedan resolver los problemas mencionados anteriormente.

El documento US 8 851 528 B2 se refiere a una conexión de compresión fluídica que incluye un primer dispositivo de sellado que tiene una entrada de fluido en una abertura de entrada y una primera superficie de acoplamiento en un extremo de abertura de salida. El documento US 8 851 528 B2 incluye además un segundo dispositivo de sellado que tiene un inserto consumible Plug-and-Play intercambiable, una segunda superficie de acoplamiento en el extremo de abertura de entrada y una tercera superficie de acoplamiento en el extremo de abertura de salida. El documento US 8 851 528 B2 incluye además un tercer dispositivo de sellado que tiene una salida de fluido en la abertura de salida y una cuarta superficie de acoplamiento en el extremo de abertura de entrada. El documento US 8 851 528 B2 incluye además un soporte mecánico y un mecanismo de fuerza de accionamiento, en el que la primera superficie de acoplamiento se opone a la segunda superficie de acoplamiento y la tercera superficie de acoplamiento se opone a la cuarta superficie de acoplamiento, y en el que el mecanismo de fuerza de accionamiento se configura para aplicar una fuerza de accionamiento sustancialmente axial opuesta por el soporte mecánico, para comprimir el primer, segundo y tercer dispositivos de sellado y crear un sello resistente a fugas en la conexión entre los dispositivos de sellado.

Sumario

En un aspecto general, la presente divulgación se refiere a un aparato de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas. El aparato CL-EM incluye una fuente de ionización acoplada a un espectrómetro de masas y un sistema cromatográfico de líquidos (CL) acoplado a la fuente de ionización. El sistema CL comprende múltiples corrientes fluídicas que se pueden conectar de forma alterna a la fuente de ionización, asignando de este modo un margen de tiempo de detección a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas cuando se conectan a la fuente de

ionización. El sistema CL del primer aspecto se configura para proporcionar una conexión alternativa a la fuente de ionización conmutando entre las múltiples corrientes fluídicas a un ritmo constante, asignando de este modo un margen de tiempo de detección de una duración fija a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas cuando se conectan a la fuente de ionización, o de modo que el margen de tiempo de detección asignado para al menos una corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas difiere del margen de tiempo de detección asignado a otras corrientes fluídicas de las múltiples corrientes fluídicas. El aparato CL-EM comprende además un controlador que se configura para llevar a cabo etapas para monitorizar de una corriente de ionización de la fuente de ionización para las múltiples corrientes fluídicas e identificar diferencias en condiciones de flujo entre las múltiples corrientes fluídicas en base a la corriente de ionización monitorizada. El controlador se configura además para llevar a cabo el ajuste de las condiciones de detección de una o más de las múltiples corrientes fluídicas en respuesta a las diferencias identificadas, permitiendo de este modo que los eluidos de interés de cada corriente fluídica se detecten por el espectrómetro de masas en el respectivo margen de tiempo de detección.

En un segundo aspecto general, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para análisis químico en el aparato CL-EM del primer aspecto general.

La técnica del primer y segundo aspectos generales puede tener efectos técnicos ventajosos.

En primer lugar, la técnica de la presente divulgación puede usar la corriente de ionización como un mecanismo de lectura adicional para obtener información sobre posibles desviaciones en las condiciones de flujo entre las múltiples corrientes fluídicas del aparato CL-EM. Aunque medir la corriente de ionización en sí es conocida para algunos sistemas en la técnica, la técnica del primer y segundo aspectos puede explotar el conocimiento sobre los perfiles de la corriente de ionización para múltiples corrientes fluídicas (por ejemplo, posiciones de pico y sus alturas, cambios de perfil o desplazamientos al pasar de un perfil medido a otro, etc.) para identificar errores específicos en el aparato CL-EM tales como, por ejemplo, volúmenes muertos de columna pre y post-CL, defectos de válvulas, tolerancias de fabricación en diversos elementos y muchos otros. Además, se puede llevar a cabo identificar errores específicos en las técnicas actuales para cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas sin afectar al tiempo de medición o a los resultados de medición.

En segundo lugar, usando este conocimiento, la técnica de la presente divulgación también puede ayudar a resolver el problema de la desigualdad de las corrientes fluídicas. Las corrientes fluídicas se pueden recalibrar individualmente y se puede restablecer por tanto su equivalencia en algunos ejemplos. De esta manera, la presente técnica puede permitir que los eluidos de interés de cada corriente fluídica se detecten por el EM en el respectivo margen de tiempo de detección.

En tercer lugar, usando una corriente de nebulización de ionización tiene la ventaja adicional de que no se necesita ningún equipo adicional para su medición y se puede ejecutar después de cada acción de mantenimiento requiriendo solo un pequeño esfuerzo por parte del operario. Esto podría dar lugar a tiempos de servicio más cortos del sistema CL-EM y podría reducir el nivel de capacitación requerido por el operario o técnico que es responsable de la posible resolución de problemas.

El término "cromatografía de líquidos o CL" como se usa en el presente documento se puede referir a cualquier tipo de procedimiento analítico que somete muestras inyectadas por un inyector de muestras a una separación cromatográfica a través de una columna CL, por ejemplo, para separar analitos de interés entre sí y, por lo tanto, permitir su detección individual, por ejemplo, por medio de una detección por espectrometría de masas. En otros ejemplos, dicho procedimiento analítico también tiene como objetivo separar analitos de interés de componentes de matriz, por ejemplo, componentes de matriz restantes después de la preparación de muestra que todavía pueden interferir con una detección posterior. En algunos ejemplos, dichas formas de cromatografía de líquidos se usan como cromatografía de líquidos realizada bajo presión, por ejemplo, "cromatografía de líquidos de alto rendimiento" o HPLC, "cromatografía de líquidos de ultraalto rendimiento" o UHPLC, "microcromatografía de líquidos" o µLC y "cromatografía de líquidos de pequeño calibre" o CL de pequeño calibre.

El término un "sistema cromatográfico de líquidos o sistema CL" es un aparato o módulo analítico o una unidad en un aparato analítico para llevar a cabo la cromatografía de líquidos. El sistema CL se puede realizar como un sistema de un solo canal o como multicanal que puede comprender una o una pluralidad de columnas CL dispuestas en paralelo y/o en serie. El sistema CL también puede comprender elementos tales como un inyector de muestra, válvulas, fuentes de líquido, conexiones fluídicas y partes, por ejemplo, para mezclar líquidos, desgasificar líquidos, atemperar líquidos y similares, uno o más sensores, tales como sensores de presión, sensores de temperatura y similares, y especialmente al menos una bomba CL. La lista no es exhaustiva.

El término "muestra" se refiere a un material biológico sospechoso de contener uno o más analitos de interés y donde su detección, cualitativa y/o cuantitativa, se puede asociar a una afección particular (por ejemplo, una afección clínica). La muestra se puede derivar de cualquier fuente biológica, tal como un líquido fisiológico, incluyendo sangre, saliva, líquido del cristalino ocular, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, leche, líquido ascítico, mucosa, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, tejido, células o similares. La muestra se puede pretratar antes de su uso, tal como preparar plasma a partir de sangre, diluir líquidos viscosos, lisis o similares; los

procedimientos de tratamiento pueden implicar filtración, centrifugación, destilación, concentración, inactivación de componentes interferentes y la adición de reactivos. Una muestra se puede usar directamente como se obtiene de la fuente en algunos casos o tras un flujo de trabajo de pretratamiento y/o preparación de muestra para modificar el carácter de la muestra, por ejemplo, después de añadir un estándar interno, después de diluirse con otra solución o después de haberse mezclado con reactivos, por ejemplo, para permitir llevar a cabo una o más pruebas de diagnóstico *in vitro*, o para enriquecer (extraer/separar/concentrar) analitos de interés y/o para retirar componentes de matriz que interfieren potencialmente con la detección del/de los analito(s) de interés. Los ejemplos de analitos de interés son vitamina D, drogas, fármacos, hormonas y metabolitos en general. Sin embargo, la lista no es exhaustiva.

De acuerdo con algunos ejemplos, el detector es un espectrómetro de masas (EM) conectado a la fuente de ionización. La fuente de ionización a su vez se puede conectar con el sistema CL. En algunos ejemplos, un espectrómetro de masas se puede conectar a un conducto de válvula a detector por medio de la fuente de ionización. En algunos ejemplos, la fuente de ionización se puede conectar con el sistema CL por medio del conducto de válvula a detector. En algunos ejemplos, el sistema CL se puede configurar como un módulo analítico diseñado para preparar una muestra para espectrometría de masas y/o para transferir una muestra preparada a un espectrómetro de masas, en particular para separar analitos de interés antes de la detección por un espectrómetro de masas. En particular, típicamente, durante una tanda de CL, el espectrómetro de masas se puede configurar para barrer un intervalo de masas específico. Los datos de CL/EM se pueden representar sumando la corriente iónica en los barridos de masas individuales y representando gráficamente esa corriente iónica "totalizada" como un punto de intensidad frente al tiempo.

El término "espectrómetro de masas (EM)" se puede referir a un módulo analítico que comprende un analizador de masas diseñado para separar y/o detectar además analitos en base a su proporción de masa con respecto a carga. En algunos ejemplos, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de barrido rápido. Sin embargo, en otros ejemplos, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas en tándem que puede seleccionar iones moleculares originales, generar fragmentos por fragmentación inducida por colisión y separar los fragmentos o iones derivados de acuerdo con su proporción de masa a carga (m/z). Todavía en otros ejemplos, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, como es conocido en la técnica. Además de los cuadrupolos, también se pueden usar otros tipos de analizadores de masas, incluyendo tiempo de vuelo, captura de iones o combinaciones de los mismos.

El término "eluido de CL" que sale de una corriente fluídica de CL se usa en el presente documento para indicar una fracción del eluido que comprende al menos un analito de interés.

El término "fuente de ionización" como se usa en el presente documento se refiere a una interfaz que acopla CL a EM, configurada para generar moléculas de analito cargadas (iones moleculares) y transferir las moléculas de analito cargadas de un líquido a una fase gaseosa. De acuerdo con determinados modos de realización, la fuente de ionización es una fuente de ionización por electronebulización (ESI). En otros modos de realización, la fuente de ionización puede ser cualquier fuente de ionización en la que los procedimientos de ionización se activan eléctricamente. La interfaz CL/EM también puede comprender una fuente de ionización doble. Las partes típicas de una fuente de ionización, por ejemplo, de una fuente de ionización por electronebulización (ESI), pueden ser un nebulizador y un capilar de muestreo, típicamente dispuestos de forma ortogonal o coaxial entre sí. Un eluido de CL que sale de una corriente fluídica de CL se guía a través de una sonda que incluye una aguja o capilar nebulizador. De esta manera, el eluido de CL se nebuliza en un volumen corriente abajo del capilar nebulizador donde tiene lugar la ionización y las moléculas de analito cargadas obtenidas de este modo se llevan a una fase gaseosa. Se proporciona un dispositivo de muestreo (por ejemplo, un capilar u orificio de muestreo) para recoger los iones en la fase gaseosa y guiarlos hacia el espectrómetro de masas. La fuente de ionización puede incluir además un conjunto para proporcionar un gas de gas, también conocido como gas de contrarresto (por ejemplo, N_2) que reduce la entrada de iones de fondo (por ejemplo, grupos de disolvente) en EM. El conjunto puede tener una placa de contrarresto y un conjunto de orificio para proporcionar el gas de cortina. En algunos ejemplos, la fuente de ionización comprende un capilar nebulizador que forma parte del conducto de la válvula a detector. Por tanto, el líquido de las corrientes fluídicas, incluyendo eluidos de CL, puede fluir de forma alterna a través del capilar nebulizador conectado fluídicamente a la válvula de selección de corriente.

La fuente de ionización puede incluir además un conjunto para proporcionar un gas auxiliar, también conocido como gas calentador. Para optimizar las condiciones de ionización, también puede ser posible ajustar la composición del disolvente añadiendo un flujo auxiliar directamente antes de la fuente de ionización para ajustar el pH, las sales, los tampones o el contenido orgánico. Dichas fuentes de ionización son conocidas en la técnica y no se aclaran más aquí.

El término "corriente fluídica" se puede referir a una trayectoria fluídica a través de la que pueden fluir líquidos y en particular a través de la que una muestra de un punto de inyección de muestra puede sufrir un procedimiento cromatográfico y finalmente transferirse a un detector, por ejemplo, a un espectrómetro de masas. En algunos ejemplos, la conexión fluídica a través de diferentes partes de la corriente fluídica puede ser discontinua. Esto se debe a que la corriente fluídica puede comprender elementos tales como válvulas de conmutación que pueden

establecer conexiones alternativas y regular el flujo fluídico entre diferentes partes de la corriente fluídica en diferentes momentos. La corriente fluídica puede comprender al menos un tubo capilar y/o una columna CL que comprende una fase estacionaria seleccionada de acuerdo con el tipo de muestra(s) y analitos de interés y a través de la que se bombea una fase móvil para capturar y/o separar y eluir y/o transferir analitos de interés en condiciones seleccionadas, por ejemplo, de acuerdo con su polaridad o valor logarítmico de p, tamaño o afinidad, como es conocido en general para un experto en la técnica. La al menos una columna CL puede ser intercambiable. En particular, el sistema CL puede comprender más columnas CL que corrientes fluídicas, donde una pluralidad de columnas CL pueden ser seleccionables, por ejemplo, acoplarse de manera intercambiable a la misma corriente fluídica. También se puede usar un tubo capilar para derivar las columnas CL o puede permitir el ajuste de volúmenes muertos para afinar los márgenes de tiempo de elución. Una corriente fluídica puede comprender una pluralidad de subcorrientes. En particular, el sistema CL en algunos ejemplos puede comprender una pluralidad de corrientes fluídicas conectadas a una válvula de selección de corriente para dirigir el flujo desde una corriente fluídica a la vez a un espectrómetro de masas.

Una "columna CL" se puede referir a cualquiera de una columna, un cartucho, un capilar y similares para realizar separaciones de naturaleza cromatográfica. Típicamente, las columnas se rellenan o se cargan con una fase estacionaria, a través de la que se bombea una fase móvil para atrapar y/o separar y eluir y/o transferir analitos de interés en condiciones seleccionadas, por ejemplo, de acuerdo con su polaridad o valor de log P, tamaño o afinidad, como es conocido en general. Esta fase estacionaria puede ser particulada o en forma de perlas o un monolito poroso. Sin embargo, el término "columna CL" también se puede referir a capilares o canales que no se rellenan ni se cargan con una fase estacionaria, sino que dependen del área superficial de la pared de capilar interna o estructuras geométricas para efectuar las separaciones. Un ejemplo se proporciona por la cromatografía de disposición de soportes ("*pillar array chromatography*"), en la que los lechos de separación se forman eliminando volúmenes intersticiales de una oblea de silicio sólida, dejando una disposición de soportes. Los canales resultantes se pueden plegar en un espacio reducido concatenando segmentos de lecho con distribuidores de flujo optimizados que limitan la dispersión de picos. Esto crea una estructura de soporte de fase estacionaria que se organiza en un patrón ordenado reproducible. Una columna CL puede tener diferentes longitudes (por ejemplo, 5 mm o más grande, 20 mm o más grande, 50 mm o más grande) y diámetros internos (por ejemplo, 0,1 mm o más grande, 1 mm o más grande, 5 mm o más grande).

Una "bomba de cromatografía de líquidos o bomba CL" es una bomba de alta presión que puede variar en capacidad de presión pero que puede producir un caudal volumétrico consecuente y reproducible a través de un canal CL. La presión en HPLC típicamente puede alcanzar hasta 60 MPa o aproximadamente de 600 atmósferas, mientras que los sistemas UHPLC y µ-CL se han desarrollado para trabajar a presiones incluso mayores, por ejemplo, de hasta 140 MPa o aproximadamente de 1400 atmósferas y por lo tanto pueden usar tamaños de partícula más pequeños en las columnas CL (<2 µm). En otros modos de realización, las partículas usadas en las columnas CL pueden tener un tamaño diferente (deseado), por ejemplo, igual o más grande que 2 µm, o igual o más grande que 50 µm. Las bombas CL se pueden configurar como bombas binarias o incluso bombas cuaternarias, por ejemplo, en caso de condiciones que requieren el uso de gradientes de elución variando gradualmente la proporción entre hasta cuatro disolventes de elución.

De acuerdo con un modo de realización, la bomba CL puede proporcionar una presión de 60 MPa a 140 MPa, típicamente de 75 MPa a 100 MPa, y más típicamente 80 MPa. De acuerdo con un modo de realización, la bomba CL se puede configurar para operar con un caudal de entre 1 µl/min y 500 µl/min o más, típicamente hasta 1500 µl/min, y más típicamente opera a caudales de entre 100 µ/min a 300 µl/min y una exactitud de, por ejemplo, aproximadamente ± 5 % o menos.

La bomba CL puede comprender más de un cabezal de bomba. Por ejemplo, las bombas binarias comprenden dos cabezales de bomba y cada cabezal de bomba típicamente comprende un cabezal de bomba principal y un cabezal de bomba secundaria que cooperan entre sí para bombear líquido mientras mantienen la presión del líquido dentro del cabezal de bomba aproximadamente constante. En particular, cada uno del cabezal de bomba principal y del cabezal de bomba secundaria es típicamente una bomba similar a una jeringa que comprende un cuerpo de cilindro similar a una jeringa que tiene una superficie de pared interna y un émbolo trasladable a través del cuerpo de cilindro dejando un espacio intermedio entre la superficie de pared interna y el émbolo cuando el émbolo se traslada a través del cuerpo de cilindro.

Una composición de la fase móvil, es decir, concentraciones de disolventes o mezclas de disolventes que constituyen la fase móvil y que tienen como objetivo llevar una muestra a través de la fase estacionaria de la columna CL, puede ser una función que cambia con el tiempo. Dicho procedimiento de separación cromatográfica se puede denominar elución en gradiente. La dependencia temporal deseada de la composición que entra en la columna CL durante la elución en gradiente se puede programar de antemano en algunos ejemplos.

El término "líquido" en relación con una corriente fluídica se refiere a líquidos usados en cromatografía de líquidos, por ejemplo, como disolventes o mezclas de disolventes usados, por ejemplo, como fases móviles o eluyentes (disolventes de elución), y como es conocido en la técnica.

El término "volumen muerto" se define aquí como el volumen de un sistema CL entre el punto de inyección y la entrada a la fuente de ionización, donde se excluye un volumen de la columna CL. Por tanto, el "volumen muerto" puede incluir diversos capilares y/o tubos de conexión previos y posteriores a la columna, el volumen de válvulas, accesorios finales, etc.

El término "volumen total de una corriente fluídica" se refiere en el presente documento al volumen de todos los capilares, accesorios, ranuras de válvulas y el volumen de columna CL de una corriente fluídica. El volumen total de una corriente fluídica también puede incluir un volumen de permanencia y/o un volumen de retardo de gradiente asociado con los sistemas de bombeo.

Descripción de los dibujos

La **FIG. 1A** muestra esquemáticamente un aparato de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) cuando una corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas se conecta a una fuente de ionización por electronebulización.

La **FIG. 1B** es el aparato CL-EM ilustrado en la **FIG. 1A** cuando otra corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas se conecta a la fuente ESI.

La **FIG. 1C** es el aparato CL-EM ilustrado en la **FIG. 1A** cuando una tercera corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas se conecta a la fuente ESI.

La **FIG. 2** es un diagrama de flujo que ilustra el procedimiento para el análisis químico en el aparato CL-EM de la presente divulgación.

La **FIG. 3** es un ejemplo experimental que muestra un gradiente de CL frente al tiempo, así como la correspondiente respuesta medida de la corriente ESI frente al tiempo *t*.

Descripción detallada

En primer lugar, se dará una visión general de las técnicas de la presente divulgación en relación con las **FIGS. 1A-1C.** Los aspectos de las técnicas CL-EM de la presente divulgación se resumirán posteriormente en un diagrama de flujo mostrado en la **FIG. 2**. Por último, se demostrarán algunos resultados de medición típicos en el contexto de las técnicas CL-EM divulgadas en el presente documento en relación con la **FIG. 3**.

Las **FIGS. 1A-1C** incluyen un ejemplo esquemático de un aparato CL-EM 100 de acuerdo con la presente divulgación. El aparato CL-EM comprende una fuente de ionización 51 acoplada a un espectrómetro de masas (EM) 50 y un sistema cromatográfico de líquidos (CL) 10 acoplado a la fuente de ionización 51. En el presente ejemplo, se toma una fuente de ionización por electronebulización (ESI) (51) como fuente de ionización. El sistema CL a su vez comprende múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 (por ejemplo, dos o más o tres o más corrientes fluídicas) que se pueden conectar de forma alterna a la fuente de ionización 51, asignando de este modo un margen de tiempo de detección a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas cuando se conectan a la fuente de ionización 51. En algunos ejemplos, conectar de forma alterna de múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 desde el sistema CL 10 a la fuente de ionización se puede llevar a cabo de manera aleatoria, es decir, el orden en el que las múltiples corrientes fluídicas se conectan a la fuente de ionización 51 no se mantiene durante el funcionamiento del aparato CL-EM 100. Por ejemplo, este escenario puede tener lugar si el aparato CL-EM (por ejemplo, un analizador) funciona en un modo de acceso aleatorio. En otros ejemplos, conectar de forma alterna múltiples corrientes fluídicas se puede realizar en un orden predeterminado. En algunos ejemplos, el orden predeterminado se puede establecer para todo el lapso de tiempo de funcionamiento del aparato CL-EM. En otros ejemplos, el orden predeterminado se puede restablecer a un orden predeterminado diferente después de un determinado período de tiempo.

En algunos ejemplos mostrados en las **FIGS. 1A-1C**, el aparato CL-EM puede comprender además una válvula de selección de corriente 20 (por ejemplo, una válvula rotatoria) y un conducto de válvula a detector 30 configurado para conectar de forma alterna las múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 por medio de una válvula de selección de corriente 20 para permitir que los eluidos de CL fluyan a través de un conducto de válvula a detector 30 a la fuente ESI 51. El aparato CL-EM también puede incluir diferentes disposiciones para conectar las múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 a la fuente ESI 51. Por ejemplo, el aparato CL-EM puede incluir otros elementos de selección de corriente distintos de una válvula (rotatoria). Además o de forma alternativa, el aparato CL-EM puede incluir múltiples elementos de selección de corriente (por ejemplo, válvulas de selección de corriente). Además, el CL-EM puede incluir múltiples grupos de corrientes fluídicas incluyendo cada uno dos o más corrientes fluídicas conectables a la fuente ESI.

En el presente ejemplo, una fuente de ionización por electronebulización (ESI) 51 comprende una aguja o capilar nebulizador 52, que en algunos ejemplos puede formar parte del conducto de válvula a detector 30, de modo que la EM se conecta al conducto de válvula a detector 30 por medio de la fuente ESI 51. En otros ejemplos, el capilar

nebulizador puede no ser necesariamente parte del conducto de válvula a detector 30 y se conecta a él de una manera conocida en la técnica.

En el ejemplo representado en las **FIGS. 1A-1C**, la válvula de selección de corriente 20 comprende una pluralidad de puertos de corriente fluídica 21, 22, 23 configurados para conectar de forma alternativa una respectiva corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 del sistema CL con el conducto de válvula a detector 30 para proporcionar eluidos de CL 15 que fluyen desde la respectiva corriente fluídica para introducirse en la fuente ESI. En algunos ejemplos, como se muestra en estas figuras, la válvula de selección de corriente 20 se puede equipar adicionalmente con un puerto de conducto de válvula a detector 25, conectado al conducto de válvula a detector 30. En el ejemplo, la válvula de selección de corriente 20 puede comprender además una pluralidad de puertos de residuos 21', 22', 23' para cada corriente fluídica 11, 12, 13 de las múltiples corrientes fluídicas que dan lugar a un residuo 40. En otros ejemplos, el aparato CL-EM puede comprender, por ejemplo, una bomba de lavado adicional configurada para conectarse con el conducto de válvula a detector 30 en momentos apropiados, como entre la conmutación de dos corrientes fluídicas consecutivas 11,12; 12,13; 13,11 para lavar rastros finales de muestras de una corriente fluídica previa fuera del conducto de válvula a detector 30 antes de que el líquido de una corriente fluídica posterior entre en el conducto de válvula a detector 30. Se entiende que los modos de realización presentados en las **FIGS. 1A-1C** son solo un ejemplo y el número de puertos y conexiones se puede adaptar de muchas maneras diferentes y en particular de acuerdo con el número de corrientes fluídicas.

El aparato CL-EM 100 puede comprender además un controlador 60 que en algunos modos de realización se puede configurar para controlar un tiempo de conexión de corriente fluídica (es decir, el tiempo de conexión entre cada corriente fluídica 11, 12, 13 y el conducto de válvula a detector 30) controlando la conmutación de la válvula de selección de corriente 20. De esta manera, el aparato CL-EM 100 puede asignar en última instancia un margen de tiempo de detección a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas cuando se conectan a la fuente de ionización. El controlador también puede asignar un margen de tiempo de detección cuando se emplean otros elementos de selección de corriente distintos de la válvula de selección de corriente 20, controlando los respectivos elementos de selección de corriente en consecuencia.

Después de salir de una corriente fluídica 11, 12, 13, un eluido de CL se guía hacia la fuente ESI. En algunos ejemplos, el eluido de CL se puede pasar a través del conducto de válvula a detector 30 hacia la fuente ESI para que se nebulice en un volumen corriente abajo de la aguja o capilar nebulizador 52 donde se produce la ionización, lo que da como resultado la producción de una fase gaseosa de moléculas de analito cargadas (véanse las **FIGS. 1A-1C**, esquina inferior derecha). El controlador 60 se configura para monitorizar una corriente de ionización de la fuente (por ejemplo, una corriente de ionización por electronebulización de la fuente ESI) para las múltiples corrientes fluídicas. En un ejemplo, la corriente de ionización de la fuente de ionización se puede monitorizar midiendo la corriente de ionización para la correspondiente corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas conectadas a la fuente de ionización dentro del respectivo margen de tiempo de detección. En otros ejemplos, la corriente de ionización para la correspondiente corriente fluídica se puede monitorizar durante un intervalo de tiempo que es diferente del respectivo margen de tiempo de detección, por ejemplo, tomando el intervalo de tiempo que es más pequeño que el respectivo margen de tiempo de detección. La corriente de ionización se puede medir usando un dispositivo de medición de corriente incluido en o conectado a la fuente de ionización. En algunos ejemplos, se puede suministrar una fuente de alto voltaje a la aguja o capilar nebulizador 52 de la fuente de ionización. La corriente de ionización resultante de las partículas nebulizadas y posteriormente ionizadas en un volumen corriente abajo de la aguja o capilar nebulizador 52 que fluye hacia una entrada del espectrómetro de masas 50 se puede medir, por ejemplo, entre la aguja o capilar nebulizador y una contraplaca del espectrómetro de masas. En algunos ejemplos, esta corriente de ionización se puede medir conectando apropiadamente un circuito eléctrico conocido en la técnica a la aguja o capilar nebulizador y a la contraplaca.

En las técnicas actuales, el controlador 60 se configura para identificar diferencias en las condiciones de flujo del espectrómetro de masas entre las múltiples corrientes fluídicas en base a la corriente de ionización monitorizada. En algunos ejemplos, las múltiples corrientes fluídicas se pueden configurar para que sean equivalentes, es decir, que presenten las mismas condiciones de flujo (es decir, dentro de una exactitud predeterminada). Es posible que esta desigualdad no se dé inicialmente o durante el funcionamiento del aparato CL-EM (es decir, las respectivas corrientes fluídicas no son equivalentes, es decir, son desiguales). Por ejemplo, los componentes (columnas CL, capilares, canales y/o válvulas) usados en las diferentes corrientes fluídicas pueden tener propiedades que se desvían de una propiedad nominal. Esta diferencia podría estar provocada por variaciones de producción (por ejemplo, dos componentes nominalmente idénticos tienen propiedades diferentes). En otros ejemplos, una corriente fluídica se puede configurar erróneamente o equiparse con un componente incorrecto (es decir, no de acuerdo con la memoria descriptiva), lo que puede dar lugar diferencias en las condiciones de flujo. En otros ejemplos (o adicionalmente en algunos ejemplos), una diferencia en las condiciones de flujo puede estar provocada por cambios en las condiciones de flujo desarrolladas durante el funcionamiento del aparato CL-EM (por ejemplo, debido al desgaste de componentes). La desigualdad descrita anteriormente de las múltiples corrientes puede dar lugar a variaciones en las trayectorias de flujo presentadas por los eluidos de CL que fluyen en las diferentes corrientes fluídicas. Dichas diferencias se pueden reflejar, por ejemplo, en la conformación medida de la corriente de ionización monitorizada y/o en una posición en el tiempo de uno o más rasgos característicos de un perfil de la corriente de ionización monitorizada. Estas diferencias se pueden identificar por el controlador 60.

Además, el controlador 60 se configura para ajustar las condiciones de detección de una o más de las múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 en respuesta a las diferencias identificadas. De esta manera, el controlador 60 permite que los eluidos de CL de interés que fluyen desde cada corriente fluídica se detecten por el espectrómetro de masas en el respectivo margen de tiempo de detección. Esta etapa de ajuste puede dar como resultado una reducción de los desplazamientos en el tiempo de retención y el ensanchamiento de picos en los cromatogramas obtenidos por el aparato CL-EM, siempre que se use un perfil de gradiente de CL predeterminado individual para cada corriente de las múltiples corrientes fluídicas.

Además, se divulga y propone un procedimiento para análisis químico en un aparato de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM) mostrado esquemáticamente en la **FIG. 2** con referencia continua a las **FIGS. 1A-1C**, comprendiendo el procedimiento conectar de forma alterna 71 múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 desde un sistema de cromatografía de líquidos (CL) 10 a una fuente de ionización 51 acoplada al sistema CL, asignando de este modo un margen de tiempo de detección a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas cuando se conectan a la fuente de ionización. Las técnicas de la presente divulgación comprenden además monitorizar una corriente de ionización 72 de la fuente de ionización para las múltiples corrientes fluídicas e identificar diferencias en condiciones de flujo 73 del espectrómetro de masas entre las múltiples corrientes fluídicas en base a la corriente de ionización monitorizada. La siguiente etapa del procedimiento incluye ajustar las condiciones de detección 74 de una o más de las múltiples corrientes fluídicas en respuesta a las diferencias identificadas, permitiendo de este modo que los eluidos de interés de cada corriente fluídica se detecten por un espectrómetro de masas (EM) 50 acoplado a la fuente de ionización en el respectivo margen de tiempo de detección.

En particular, la **FIG. 1A** muestra una situación en la que solo una de las múltiples corrientes fluídicas (por ejemplo, la primera corriente fluídica) 11 del sistema CL se conecta a la fuente ESI 51. En este ejemplo, la válvula de selección de corriente 20 se rota de modo que la primera corriente fluídica 11 se conecta al conducto de válvula a detector 30 por medio de un puerto de corriente fluídica 23 y un puerto de conducto de válvula a detector 25 para proporcionar la conexión deseada de la primera corriente fluídica 11 con la fuente ESI 51. En el presente modo de realización, las otras corrientes fluídicas 12, 13 se pueden conectar a los puertos de residuos 22', 23' durante dicho margen de tiempo de detección de la primera corriente fluídica 11, como se muestra en la **FIG. 1A**. De esta manera, el margen de tiempo de detección se puede asignar solo a la primera corriente fluídica 11, caso en el que un eluido de CL que sale de la primera corriente fluídica 11 se guiará hacia la fuente ESI, se ionizará en ella y finalmente se detectará por el EM 50. La etapa de monitorizar posterior de la corriente ESI con respecto a la primera corriente fluídica 11 se puede realizar de acuerdo con los análisis anteriores. En algunos ejemplos, las mismas etapas de procedimiento se pueden repetir con respecto a las otras corrientes fluídicas de las múltiples corrientes fluídicas, por ejemplo, con respecto a las dos corrientes fluídicas restantes 12, 13, como se muestra en las **FIGS. 1B** y **1C**. A continuación, en base a las corrientes de ionización monitorizadas, se pueden identificar las diferencias en las condiciones de flujo 73 del espectrómetro de masas entre las múltiples corrientes fluídicas y se puede realizar la etapa de ajuste de acuerdo con los análisis anteriores.

En un ejemplo, un margen de tiempo de detección asignado para las múltiples corrientes fluídicas (o un subconjunto de las mismas) puede ser de una longitud idéntica y/o una longitud fija (durante un período de tiempo predeterminado). El sistema CL 10 de la presente invención se configura para conectarse de forma alterna a la fuente de ionización 51 conmutando entre las múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 a un ritmo constante, asignando de este modo un margen de tiempo de detección de una duración fija a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas cuando se conectan a la fuente de ionización. De forma alternativa, el margen de tiempo de detección asignado para al menos una corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas difiere del margen de tiempo de detección asignado a otras corrientes fluídicas de las múltiples corrientes fluídicas.

En algunos ejemplos, identificar diferencias en las condiciones de flujo de las técnicas en la presente divulgación puede implicar comparar un perfil de inyección de muestra (por ejemplo, una serie de tiempo del perfil de inyección de muestra) en la una o más de las múltiples corrientes fluídicas con un perfil de la corriente de ionización monitorizada 90 para la respectiva corriente (por ejemplo, con una serie de tiempo de la corriente de ionización monitorizada 90). Por ejemplo, el procedimiento de inyección puede incluir inyectar una muestra en una columna CL de la una de las múltiples corrientes fluídicas de CL 11, 12, 13. El procedimiento de inyección se puede proporcionar por una o más bombas CL conectadas al conjunto de inyección (no mostrado en las **FIGS. 1A-1C**), por ejemplo, una bomba de elución del aparato CL-EM para inyectar la muestra en una columna de la corriente fluídica de CL. En un ejemplo, una presión de sistema proporcionada por la una o más bombas CL puede variar en el tiempo dando como resultado un perfil de inyección de muestra dependiente del tiempo bien controlado en la entrada de la columna CL. En un ejemplo, el perfil de inyección de muestra se puede representar por una serie de tiempo de la concentración de muestra inyectada en la columna CL. En otros ejemplos, el perfil de inyección de muestra se puede dar por una serie de tiempo del caudal volumétrico de muestra inyectado en la columna CL.

En un ejemplo, el perfil de inyección de muestra usado en la etapa de comparar puede incluir un perfil de gradiente de CL que determina el contenido orgánico o aditivos inorgánicos (ambos pueden ser, por ejemplo, constituyentes de una fase móvil) en cada punto en el tiempo. En algunos ejemplos, el perfil de gradiente de CL se puede medir en

la entrada de la columna de CL en cada punto en el tiempo. En otros ejemplos, el gradiente de CL se puede medir en otras partes del aparato CL-EM en cada punto en el tiempo. En un ejemplo, un perfil de gradiente de CL puede ser un gradiente de CL lineal simple. En otros ejemplos, el perfil de gradiente de CL se puede describir por un conjunto de funciones lineales con diferentes pendientes. Todavía en otros ejemplos, el perfil de gradiente de CL puede ser una función no lineal o una función escalonada en el tiempo. A modo de ejemplo, la **FIG. 3** divulga un perfil típico para el gradiente de CL 80 obtenido usando la técnica de esta divulgación.

En otros ejemplos, el perfil de gradiente de CL 80 para cada corriente fluídica se puede seleccionar de modo que pueda diferir del perfil de gradiente de CL usado para cualquier otra corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13. En un ejemplo, esto se puede lograr cambiando un contenido orgánico o inorgánico de un disolvente con el tiempo en un punto de inyección de muestra a la columna CL. En otros ejemplos, el gradiente de CL se puede modificar variando los caudales volumétricos proporcionados por una bomba de CL. Todavía en otros ejemplos, se puede usar primero un perfil de gradiente de CL predeterminado individual para las múltiples corrientes fluídicas para la etapa de comparar.

En algunos ejemplos, la etapa de comparar puede incluir hacer fluir el eluido de CL (es decir, el líquido que emerge de la columna CL que puede comprender al menos un analito de interés y un disolvente o una mezcla de disolventes) a la fuente de ionización para ionización adicional y posterior detección en el EM. En este caso, el eluido de CL se puede nebulizar y posteriormente ionizar en un volumen corriente abajo de la aguja o capilar nebulizador de la fuente de ionización. La corriente de ionización resultante de las partículas ionizadas se puede medir para obtener dicho perfil de la corriente de ionización monitorizada 90 para la respectiva corriente.

En un ejemplo, la etapa de comparar puede involucrar la serie de tiempo de la corriente de ionización monitorizada 90, que abarca al menos una parte de un procedimiento de inyección de la muestra en una columna de la corriente de CL (por ejemplo, más de un 20 % o más de un 50 % de una duración de un procedimiento de inyección, o un margen de hasta un 20 % o hasta un 50 % de la duración de un procedimiento de inyección). En otros ejemplos, la serie de tiempo puede abarcar un procedimiento de inyección completo de una muestra en una columna de la corriente de CL. Todavía en otros ejemplos, la corriente de ionización se puede monitorizar midiendo la corriente de ionización después de un determinado período de tiempo estimado. Esto puede tener en cuenta el tiempo que tarda la muestra inyectada en la columna CL en experimentar la separación cromatográfica y los eluyentes resultantes que salen de la columna CL en llegar a la fuente de ionización.

En algunos ejemplos, la etapa descrita previamente de comparar el perfil de inyección de muestra 80 en la una o más de las múltiples corrientes fluídicas con el perfil de la corriente de ionización monitorizada 90 para la respectiva corriente puede incluir además evaluar las posiciones relativas de uno o más puntos o rasgos característicos en el perfil de inyección de muestra (por ejemplo, en una serie de tiempo del perfil de inyección de muestra) y el perfil de la corriente de ionización monitorizada (por ejemplo, una serie de tiempo de la corriente de ionización monitorizada 90). La técnica de la presente divulgación también puede incluir evaluar similitudes entre los perfiles de inyección de muestra y el perfil de la corriente de ionización monitorizada.

Volviendo a la **FIG. 3**, el perfil de gradiente de CL 80 frente al tiempo *t* se muestra junto con la correspondiente serie de tiempo de la corriente ESI monitorizada 90, donde esta última se puede interpretar como una respuesta en forma de la corriente medida del eluido nebulizado y posteriormente ionizado al perfil de gradiente de CL aplicado de esta conformación específica 80.

La técnica de la presente divulgación puede tener como objetivo detectar un volumen muerto de cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas al menos parcialmente en base a un retardo entre un punto de inicio de la inyección de muestra 81 y un correspondiente rasgo característico, opcionalmente un pico 91, en la serie de tiempo de la corriente ESI monitorizada. En el ejemplo mostrado en la **FIG. 3**, debido a una inyección de muestra con contenido orgánico creciente en un disolvente, el pico de respuesta 91 en la serie de tiempo de la corriente ESI (que aparece alrededor de los 8 s) se puede remontar al tiempo requerido para que la muestra inyectada pase, por ejemplo, desde el punto de inyección (o bucle) de la respectiva corriente fluídica hasta una punta ESI (por ejemplo, una aguja o capilar nebulizador). Por tanto, el retardo de tiempo resultante se puede asociar con el volumen muerto para la corriente fluídica en consideración.

En algunos otros ejemplos, se puede detectar un volumen total de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas al menos parcialmente en base a un retardo entre un punto en el perfil de inyección de muestra en el que el contenido orgánico o los aditivos inorgánicos de la muestra inyectada cambia 82 y un respectivo rasgo característico en la serie de tiempo de la corriente ESI monitorizada 92. En el ejemplo presentado en la **FIG. 3**, el contenido orgánico de alto valor dentro del gradiente de CL cae abruptamente 82 (en un momento del tiempo alrededor de *110 s*) de nuevo a valores iniciales con el valor más bajo del contenido orgánico (el llamado modo *flash-back*). De esta figura se observa que la meseta de la correspondiente corriente ESI permanece prácticamente inalterada durante un cierto período de tiempo, que en este ejemplo es de aproximadamente *12 s*, y solo después de este período la corriente ESI responde a este acontecimiento de caída del contenido orgánico y su valor comienza a disminuir con el tiempo. En este ejemplo, el retardo de tiempo resultante se puede atribuir al volumen total de la corriente fluídica en consideración.

Se entiende que el perfil de retardo de gradiente de CL y la corriente ESI de respuesta mostrados en la **FIG. 3** ejemplifican solo un protocolo posible, ya que cualquier número de diferentes perfiles para el retardo de gradiente de CL y disolventes orgánicos o inorgánicos también se puede contemplar por la presente divulgación.

Además o de forma alternativa, identificar diferencias en las condiciones de flujo de las presentes técnicas puede incluir comparar un perfil de la corriente de ionización monitorizada (por ejemplo, una serie de tiempo del perfil de la corriente de ionización monitorizada) de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas con un perfil de referencia de una corriente de ionización (por ejemplo, con una serie de tiempo del perfil de referencia de la corriente de ionización). La serie de tiempo de referencia de la corriente de ionización se puede medir, por ejemplo, en un punto particular (por ejemplo, después de la configuración o el mantenimiento del sistema CL 10). En otros ejemplos, la serie de tiempo de referencia de la corriente de ionización se puede estimar y/o calcular para un aparato CL-EM específico en uso (por ejemplo, en base a información sobre la configuración del aparato CL-EM y/o datos medidos en el aparato CL-EM). La serie de tiempo de referencia de la corriente de ionización se puede almacenar en una base de datos y recuperar de la base de datos por el controlador 60. Por ejemplo, la serie de tiempo de la corriente ESI monitorizada medida para la una o más de las múltiples corrientes fluídicas puede tener un perfil 90 mostrado en la **FIG. 3**. Este perfil se puede comparar con una serie de tiempo de referencia de la corriente ESI.

En algunos otros ejemplos, identificar diferencias en las condiciones de flujo puede implicar evaluar un desplazamiento de perfil o un cambio de perfil de la corriente de ionización monitorizada. En un ejemplo, la etapa de evaluar puede incluir comparar un desplazamiento de perfil o un cambio de perfil de la corriente de ionización monitorizada de una de las múltiples corrientes fluídicas con respecto a una serie de tiempo de la corriente de ionización monitorizada de la misma corriente medida durante una conexión previa de esta corriente a la fuente de ionización. En algunos otros ejemplos, la etapa de evaluar puede incluir comparar un desplazamiento de perfil o un cambio de perfil de la corriente de ionización monitorizada de una de las múltiples corrientes fluídicas con respecto a la corriente de ionización de la otra corriente o corrientes. En algunos ejemplos, un perfil de gradiente de CL predeterminado individual 80 tal como el mostrada en la **FIG. 3** se puede usar para las múltiples corrientes fluídicas al realizar la etapa de evaluar: solo en el caso de equivalencia entre las múltiples corrientes fluídicas, las conformaciones resultantes de las corrientes de ionización monitorizadas medidas para cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas coincidirán entre sí.

Las técnicas de la presente divulgación pueden incluir identificar las diferencias en condiciones de flujo entre las múltiples corrientes fluídicas en base a la corriente de ionización monitorizada, que se relacionan con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas. Como se analiza anteriormente, estas diferencias pueden tener múltiples causas. En un ejemplo, una de las corrientes fluídicas puede tener un volumen muerto más grande o más pequeño que una o más de otras corrientes fluídicas. Además o de forma alternativa, una de las corrientes fluídicas puede tener un volumen total más grande o más pequeño que una o más de otras corrientes fluídicas. En un ejemplo, el volumen muerto y/o volumen total se pueden detectar para cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas 11, 12, 13 de una manera similar como se divulgada anteriormente en relación con la **FIG. 3**. Cualquier diferencia en el volumen muerto o total entre las múltiples corrientes fluídicas puede dar lugar, respectivamente, a un desplazamiento de tiempo en la posición esperada del correspondiente pico o un desplazamiento de perfil en la serie de tiempo de la corriente de ionización monitorizada. En un ejemplo, estos desplazamientos se pueden usar para identificar las diferencias en condiciones de flujo entre las múltiples corrientes fluídicas. En otros ejemplos, el aparato CL-EM puede realizar mediciones diferentes de las representadas en la **FIG. 3** para identificar dichas diferencias.

En algunos otros ejemplos, las técnicas actuales pueden incluir identificar las diferencias en las condiciones de flujo relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por una condición de válvula, por ejemplo, un desgaste de válvula o un defecto de válvula. Todavía en otros ejemplos, se pueden identificar las diferencias en las condiciones de flujo, que se relacionan con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por una condición de columna CL, por ejemplo, un envejecimiento de columna CL o un defecto de columna CL. En otros ejemplos de las presentes técnicas, identificar las diferencias en condiciones de flujo en base a la corriente de ionización monitorizada puede comprender identificar las diferencias relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por una obstrucción, por ejemplo, por una obstrucción de columna CL o por una obstrucción de válvula. Todavía en otros ejemplos, identificar las diferencias en las condiciones de flujo puede implicar identificar las diferencias relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por una fuga (por ejemplo, una fuga provocada por una columna CL o capilar conectado de forma floja, una fuga en una columna CL o capilares y/o en una válvula u otros elementos de conexión). En otros ejemplos, las diferencias identificadas en las condiciones de flujo en base a la corriente de ionización monitorizada pueden comprender identificar las diferencias relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por el ajuste

incorrecto de una o más columnas CL. Todavía en otros ejemplos, las diferencias identificadas en las condiciones de flujo en base a la corriente de ionización monitorizada pueden comprender identificar las diferencias en las condiciones de flujo relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas resultantes de tolerancias de fabricación en uno o más componentes del sistema CL. En algunos ejemplos, cada una de las diferencias identificadas mencionadas anteriormente se puede identificar correspondientemente en una serie de tiempo de la corriente de ionización monitorizada: Por ejemplo, en referencia de nuevo a la **FIG. 3**, nuevos picos, desplazamientos de perfil o modificaciones de perfil, ensanchamiento del pico existente, etc. pueden aparecer adicionalmente en forma de serie de tiempo de la corriente ESI monitorizada en comparación con el ejemplo presentado en esta figura.

En otra etapa, las técnicas de la presente divulgación pueden incluir ajustar las condiciones de detección de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en respuesta a las diferencias identificadas. Esto puede implicar una modificación de la una o más corrientes fluídicas para garantizar que los eluidos de interés de las respectivas corrientes lleguen en el respectivo margen de tiempo de detección (por ejemplo, un margen de tiempo de detección de una duración fija si las corrientes se conmutan a un ritmo constante). En otras palabras, cualquier desajuste entre un tiempo de llegada esperado y un tiempo de llegada real (por ejemplo, provocado por las causas analizadas anteriormente) se puede reducir o incluso eliminar.

En un ejemplo, ajustar las condiciones de detección puede implicar cambiar el tiempo de inyección de muestra de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas. Además o de forma alternativa, ajustar las condiciones de detección puede implicar hacer coincidir los tiempos de inyección de muestra de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas. Por ejemplo, dichas diferencias se pueden identificar con respecto a la primera corriente fluídica 11 de la **FIG. 1A**, que se conecta a la fuente ESI 51 dentro del respectivo margen de tiempo de detección durante el funcionamiento del aparato CL-EM. En un ejemplo, las condiciones de detección para esta corriente fluídica 11 se pueden ajustar en respuesta a las diferencias identificadas haciendo coincidir un tiempo de inyección de muestra en una conexión posterior de la primera corriente fluídica 11 a la fuente ESI. De forma similar, la etapa de ajustar de las presentes técnicas también se puede llevar a cabo para las otras corrientes fluídicas 12, 13 mostradas en las **FIGS. 1B** y **1C** durante el funcionamiento del aparato CL-EM.

En algunos otros ejemplos, ajustar las condiciones de detección de cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas (por ejemplo, para tres corrientes fluídicas 11, 12, 13 divulgadas en relación con las **FIGS. 1A-1C**) puede incluir una inyección de muestra retardada o acelerada con respecto a un tiempo de inyección de muestra predefinido. Todavía en otros ejemplos, los tiempos de inyección de muestra se pueden actualizar para la una o más corrientes fluídicas para ajustar las condiciones de flujo.

Todavía en otros ejemplos, la etapa de ajustar de la presente técnica puede comprender cambiar un perfil de elución cambiando un parámetro de bomba de una bomba CL. Esto puede implicar una o más de elución retardada o acelerada por una acción de bomba CL retardada o acelerada en comparación con una acción de bomba CL predefinida: Además o de forma alternativa, cambiar un parámetro de bomba de una bomba CL puede incluir uno o más de cambiar una presión o velocidad de bomba CL. En otros ejemplos, la etapa de ajustar puede implicar ajustar las condiciones de elución por un cambio en un disolvente o un perfil de gradiente de CL. Estas medidas también se pueden combinar.

En la presente divulgación, el ajuste de las condiciones de detección de cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas se puede llevar a cabo individualmente para cada una de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas. Las técnicas de la presente divulgación pueden incluir el controlador configurado para ajustar automáticamente las condiciones de detección de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en base a las diferencias identificadas. Por tanto, la etapa de ajuste de la presente divulgación en relación con los ejemplos enumerados anteriormente puede restablecer la equivalencia de las múltiples corrientes fluídicas.

Implementación por ordenador

El controlador de la presente divulgación se puede realizar en cualquier forma adecuada (por ejemplo, usando cualquier programa informático o equipo físico adecuado). En algunos ejemplos, el controlador puede ser un dispositivo informático independiente. En otros ejemplos, el controlador se puede integrar en un dispositivo o sistema informático que también sirve para otro propósito además de llevar a cabo las etapas de las técnicas de la presente divulgación. El controlador se puede disponer localmente o conectarse de forma remota (a través de una red adecuada) a un sitio donde se localiza el sistema CL-EM.

Se divulga y propone además un programa informático que incluye instrucciones ejecutables por ordenador para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente divulgación en uno o más de los modos de realización incluidos en el presente documento cuando el programa se ejecuta en un ordenador o red informática. Específicamente, el programa informático se puede almacenar en un soporte de datos legible por ordenador. Por tanto, específicamente, una, más de una o incluso todas las etapas de procedimiento, como se divulga en el presente documento, se pueden realizar usando un ordenador o red informática, preferentemente usando un

programa informático.

Se divulga y propone además un producto de programa informático que tiene un código de programa para realizar el procedimiento de acuerdo con la presente divulgación en uno o más de los modos de realización incluidos en el presente documento cuando el programa se ejecuta en un ordenador o red informática. Específicamente, el código de programa se puede almacenar en un soporte de datos legible por ordenador.

Se divulga y propone además un soporte de datos que tiene una estructura de datos almacenada en el mismo, que, después de cargarse en un ordenador o red informática, tal como en una memoria de trabajo o memoria principal del ordenador o red informática, puede ejecutar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento.

Se divulga y propone además un producto de programa informático con código de programa almacenado en un soporte legible por máquina para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento, cuando el programa se ejecuta en un ordenador o red informática. Como se usa en el presente documento, un producto de programa informático se refiere al programa como un producto comercializable. El producto puede existir en general en un formato arbitrario, tal como en un formato impreso, o en un soporte de datos legible por ordenador. Específicamente, el producto de programa informático se puede distribuir a través de una red de datos.

Se divulga y propone además una señal de datos modulada que contiene instrucciones legibles por un sistema informático o red informática para realizar el procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento.

En referencia a los aspectos implementados por ordenador de la presente divulgación, una o más de las etapas de procedimiento o incluso todas las etapas de procedimiento del procedimiento de acuerdo con uno o más de los modos de realización divulgados en el presente documento se pueden realizar usando un ordenador o red informática. Por tanto, en general, se puede realizar cualquiera de las etapas de procedimiento, incluyendo la provisión y/o manipulación de datos usando un ordenador o red informática. En general, estas etapas de procedimiento pueden incluir cualquiera de las etapas de procedimiento, típicamente excepto por las etapas de procedimiento que requieren un trabajo manual, tales como proporcionar las muestras y/o determinados aspectos de realización de mediciones.

Se divulga y propone además un ordenador, o red informática, que comprende al menos un procesador, en el que el procesador se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción.

Se divulga y propone además una estructura de datos cargable en ordenador que se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción mientras la estructura de datos se ejecuta en un ordenador.

Se divulga y propone además un medio de almacenamiento, en el que una estructura de datos se almacena en el medio de almacenamiento y en el que la estructura de datos se adapta para realizar el procedimiento de acuerdo con uno de los modos de realización descritos en esta descripción después de haberse cargado en un almacenamiento principal y/o de trabajo de un ordenador o de una red informática.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, CL-EM, (100) que comprende:

una fuente de ionización (51) acoplada a un espectrómetro de masas (50);

un sistema cromatográfico de líquidos, CL, (10) acoplado a la fuente de ionización (51), en el que el sistema CL comprende múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) que se pueden conectar de forma alterna a la fuente de ionización, asignando de este modo un margen de tiempo de detección a cada corriente fluídica (11, 12, 13) de las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) cuando se conectan a la fuente de ionización (51),

en el que el sistema CL (10) se configura para proporcionar una conexión alterna a la fuente de ionización (51) conmutando entre las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) a un ritmo constante, asignando de este modo un margen de tiempo de detección de una duración fija a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) cuando se conectan a la fuente de ionización (51), o

de modo que el margen de tiempo de detección asignado para al menos una corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas difiere del margen de tiempo de detección asignado a otras corrientes fluídicas de las múltiples corrientes fluídicas,

en el que el aparato (100) comprende además un controlador (60) que se configura para llevar a cabo las etapas de:

monitorizar una corriente de ionización (72) de la fuente de ionización (51) para las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13);

identificar diferencias en las condiciones de flujo entre las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) en base a la corriente de ionización monitorizada;

ajustar las condiciones de detección de una o más de las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) en respuesta a las diferencias identificadas, permitiendo de este modo que los eluidos de interés de cada corriente fluídica (11, 12, 13) se detecten por el espectrómetro de masas (50) en el respectivo margen de tiempo de detección.

2. El aparato (100) de la reivindicación 1, en el que identificar diferencias en las condiciones de flujo incluye comparar un perfil de inyección de muestra en la una o más de las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) con un perfil de la corriente de ionización monitorizada (90) para la respectiva corriente.

3. El aparato de la reivindicación 1, en el que identificar diferencias en las condiciones de flujo incluye comparar un perfil de la corriente de ionización monitorizada de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) con un perfil de referencia de una corriente de ionización.

4. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que identificar diferencias en las condiciones de flujo incluye evaluar un desplazamiento de perfil o un cambio de perfil de la corriente de ionización monitorizada.

5. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que identificar las diferencias en las condiciones de flujo en base a la corriente de ionización monitorizada comprende identificar las diferencias relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por un volumen muerto más grande o más pequeño o por un volumen total más grande o más pequeño.

6. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que identificar las diferencias en las condiciones de flujo en base a la corriente de ionización monitorizada comprende identificar las diferencias relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por una condición de válvula, por ejemplo, un desgaste de válvula o un defecto de válvula.

7. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que identificar las diferencias en las condiciones de flujo en base a la corriente de ionización monitorizada comprende identificar las diferencias relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por una condición de columna CL, por ejemplo, un envejecimiento de columna CL o un defecto de columna CL o una obstrucción de columna CL o por un ajuste incorrecto de una o más columnas CL.

8. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que identificar las diferencias en las condiciones de flujo en base a la corriente de ionización monitorizada comprende identificar las diferencias relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas

en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas provocadas por una fuga.

9. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que identificar las diferencias en las condiciones de flujo en base a la corriente de ionización monitorizada comprende identificar las diferencias en las condiciones de flujo relacionadas con retardos de flujo sistemáticos en cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en comparación con la otra corriente o corrientes fluídicas resultantes de tolerancias de fabricación en uno o más componentes del sistema CL.

10. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que ajustar las condiciones de detección comprende hacer coincidir un tiempo de inyección de muestra de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas, o

ajustar las condiciones de elución por un cambio en un disolvente o un perfil de gradiente de CL.

11. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que ajustar las condiciones de detección de cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas comprende una inyección de muestra retardada o acelerada con respecto a un tiempo de inyección de muestra predefinido.

12. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que ajustar las condiciones de detección de cualquiera de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas se lleva a cabo individualmente para cada una de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas.

13. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el controlador se configura para ajustar automáticamente las condiciones de detección de la una o más de las múltiples corrientes fluídicas en base a las diferencias identificadas.

14. El aparato de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la fuente de ionización es una fuente de ionización por electronebulización, ESI, (51).

15. Un procedimiento para análisis químico en un aparato de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, CL-EM, (70), comprendiendo el procedimiento:

conectar de forma alterna (71) múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) desde un sistema de cromatografía de líquidos, CL, (10) a una fuente de ionización (51) acoplada al sistema CL, asignando de este modo un margen de tiempo de detección a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas cuando se conectan a la fuente de ionización,

en el que el sistema CL (10) se configura para proporcionar una conexión alterna a la fuente de ionización (51) conmutando entre las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) a un ritmo constante, asignando de este modo un margen de tiempo de detección de una duración fija a cada corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas (11, 12, 13) cuando se conectan a la fuente de ionización (51), o

de modo que el margen de tiempo de detección asignado para al menos una corriente fluídica de las múltiples corrientes fluídicas difiere del margen de tiempo de detección asignado a otras corrientes fluídicas de las múltiples corrientes fluídicas;

monitorizar una corriente de ionización (72) de la fuente de ionización para las múltiples corrientes fluídicas;

identificar diferencias en las condiciones de flujo (73) entre las múltiples corrientes fluídicas en base a la corriente de ionización monitorizada;

ajustar las condiciones de detección (74) de una o más de las múltiples corrientes fluídicas en respuesta a las diferencias identificadas, permitiendo de este modo que los eluidos de interés de cada corriente fluídica se detecten por un espectrómetro de masas (50) acoplado a la fuente de ionización en el respectivo margen de tiempo de detección.

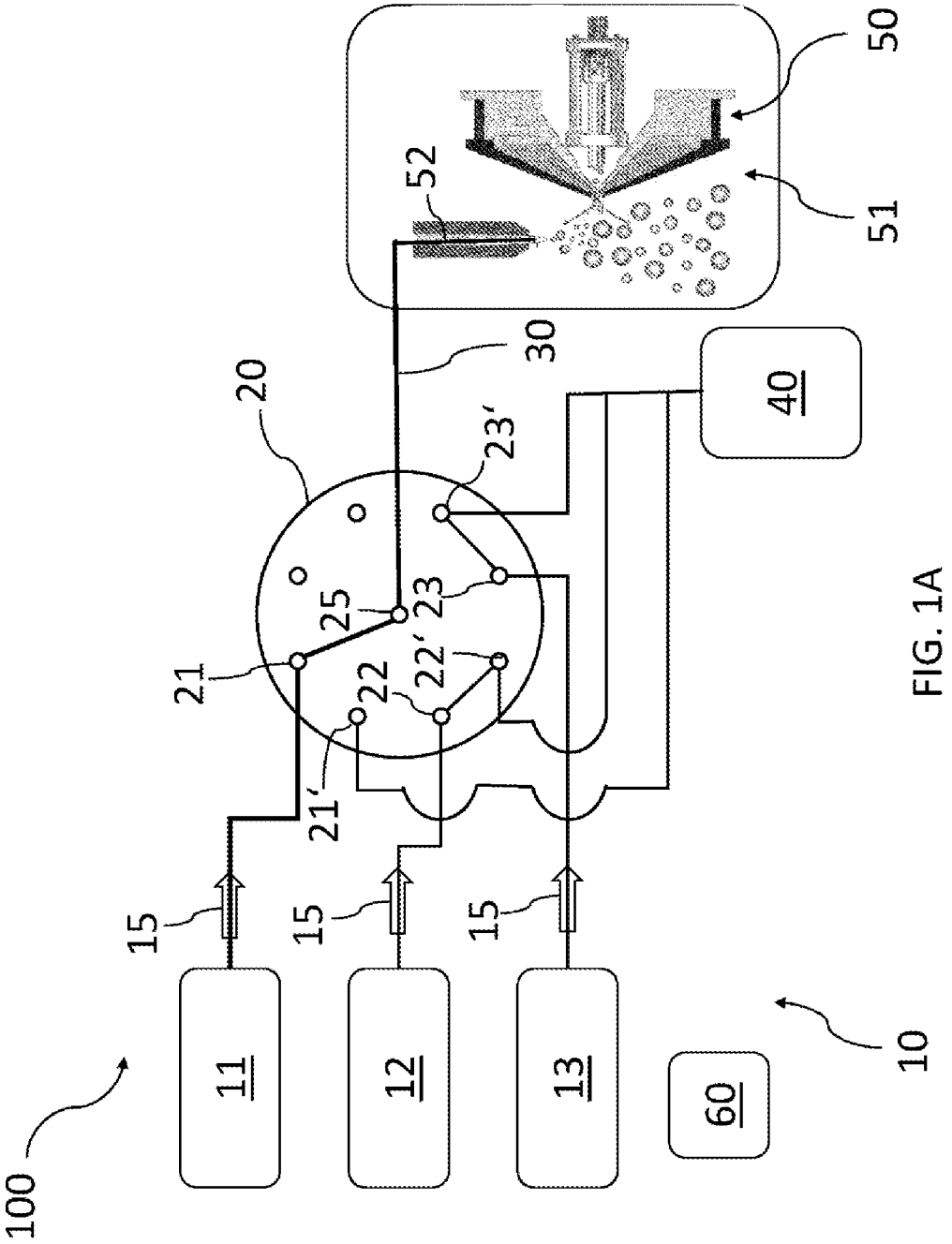


FIG. 1A

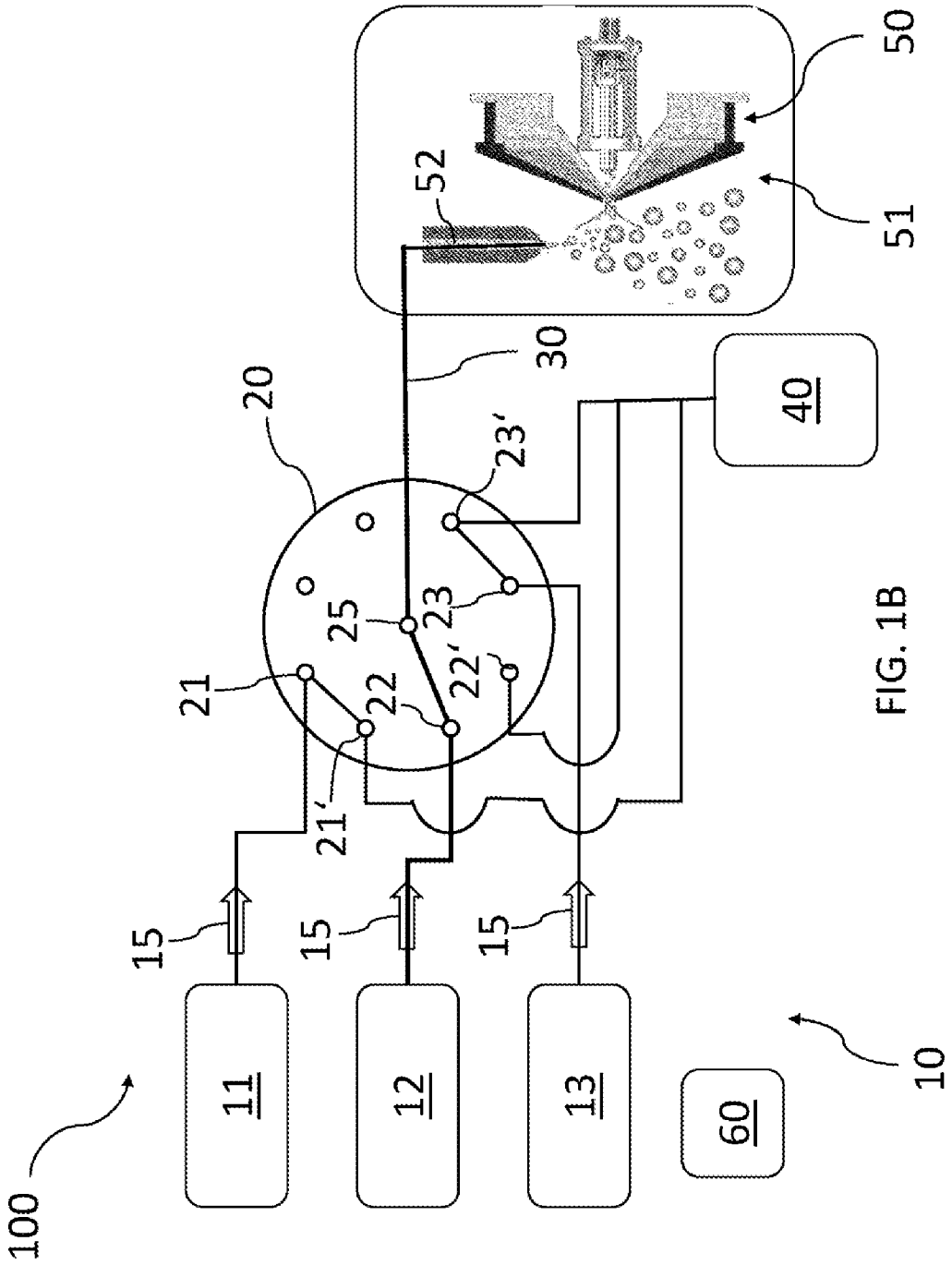


FIG. 1B

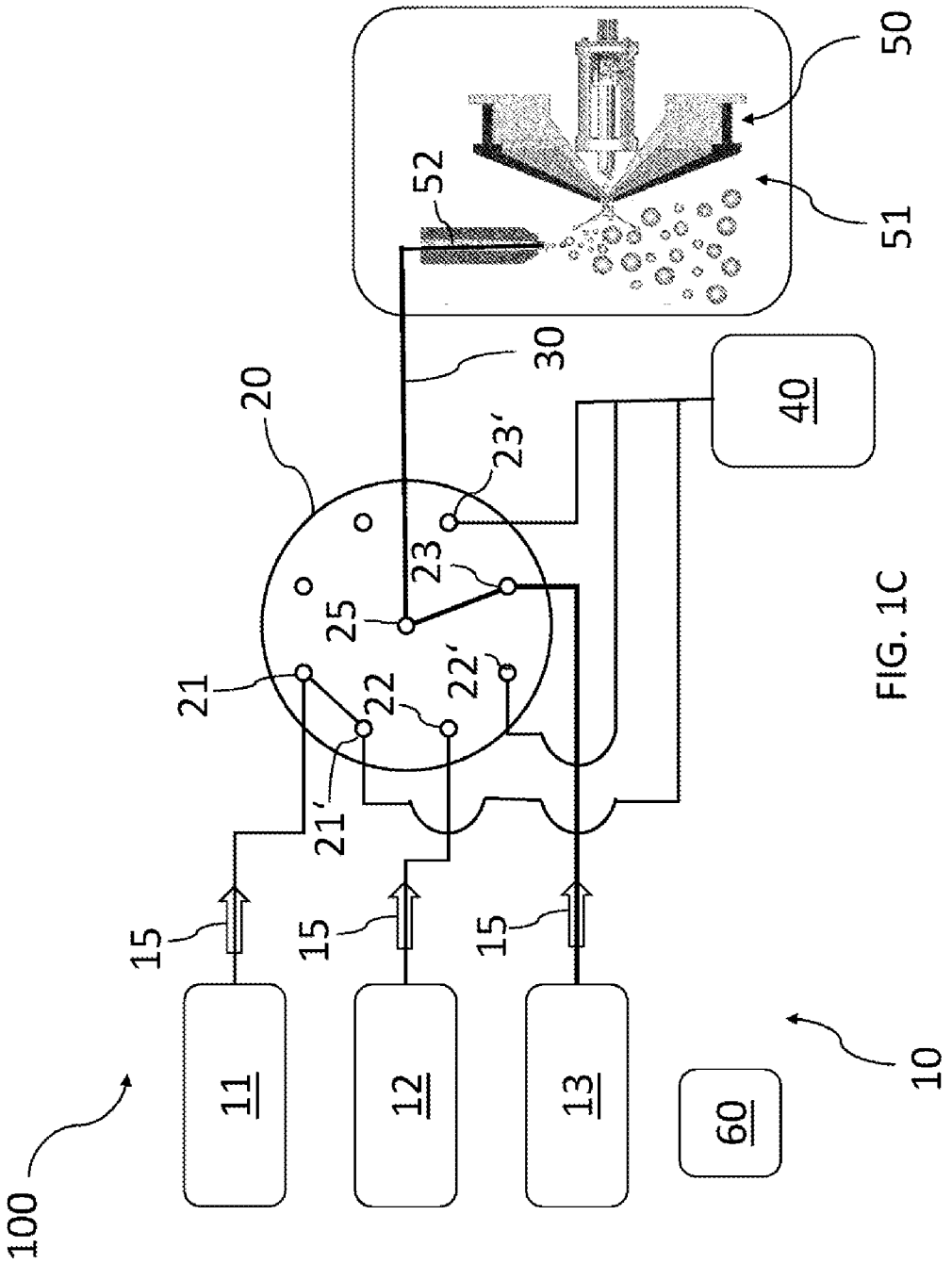


FIG. 1C

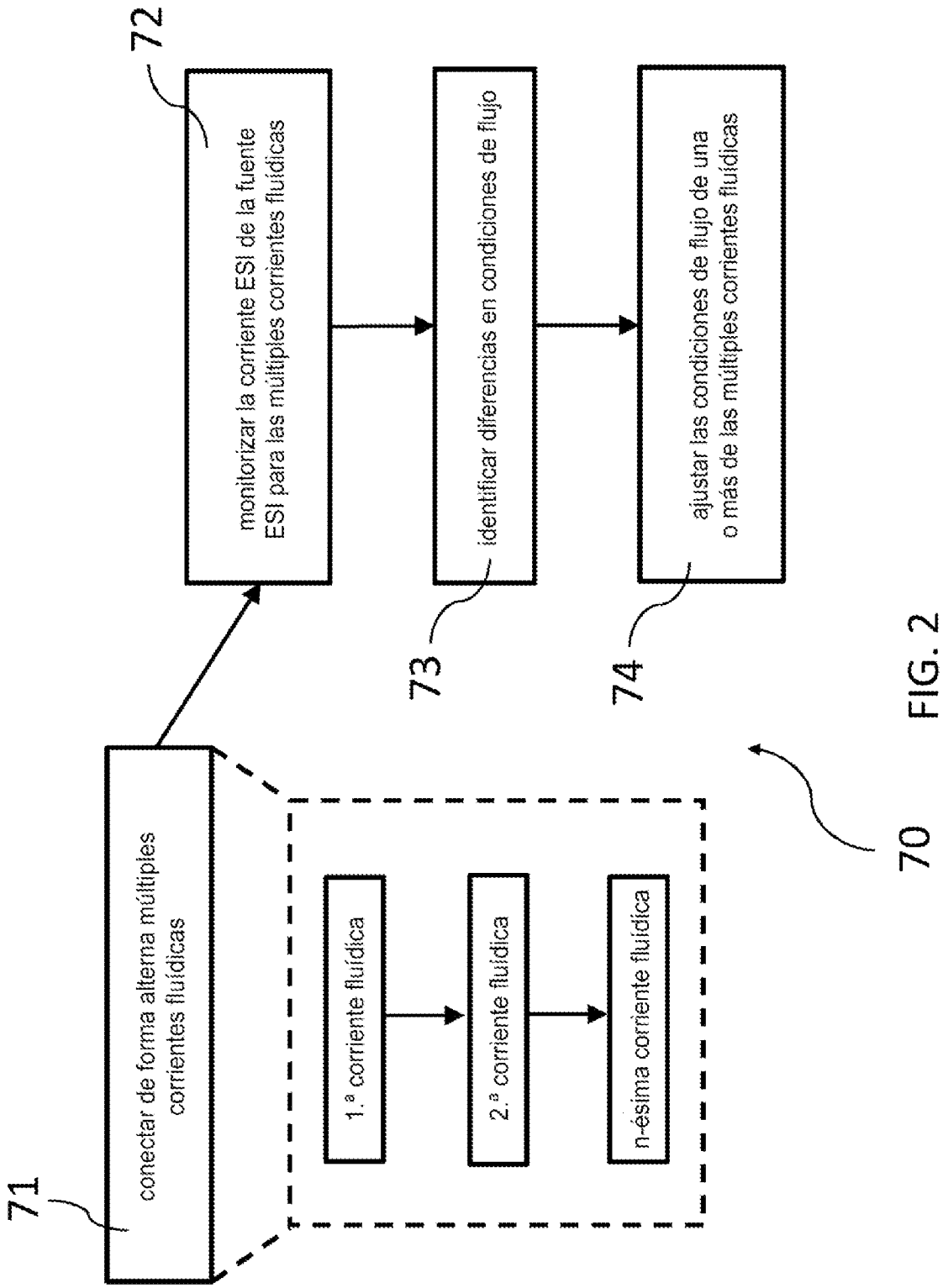

72
monitorizar la corriente ESI de la fuente ESI para las múltiples corrientes fluídicas
identificar diferencias en condiciones de flujo
ajustar las condiciones de flujo de una o más de las múltiples corrientes fluídicas
73
74
71
conectar de forma alterna múltiples corrientes fluídicas
1.ª corriente fluídica
2.ª corriente fluídica
n-ésima corriente fluídica
70

FIG. 2

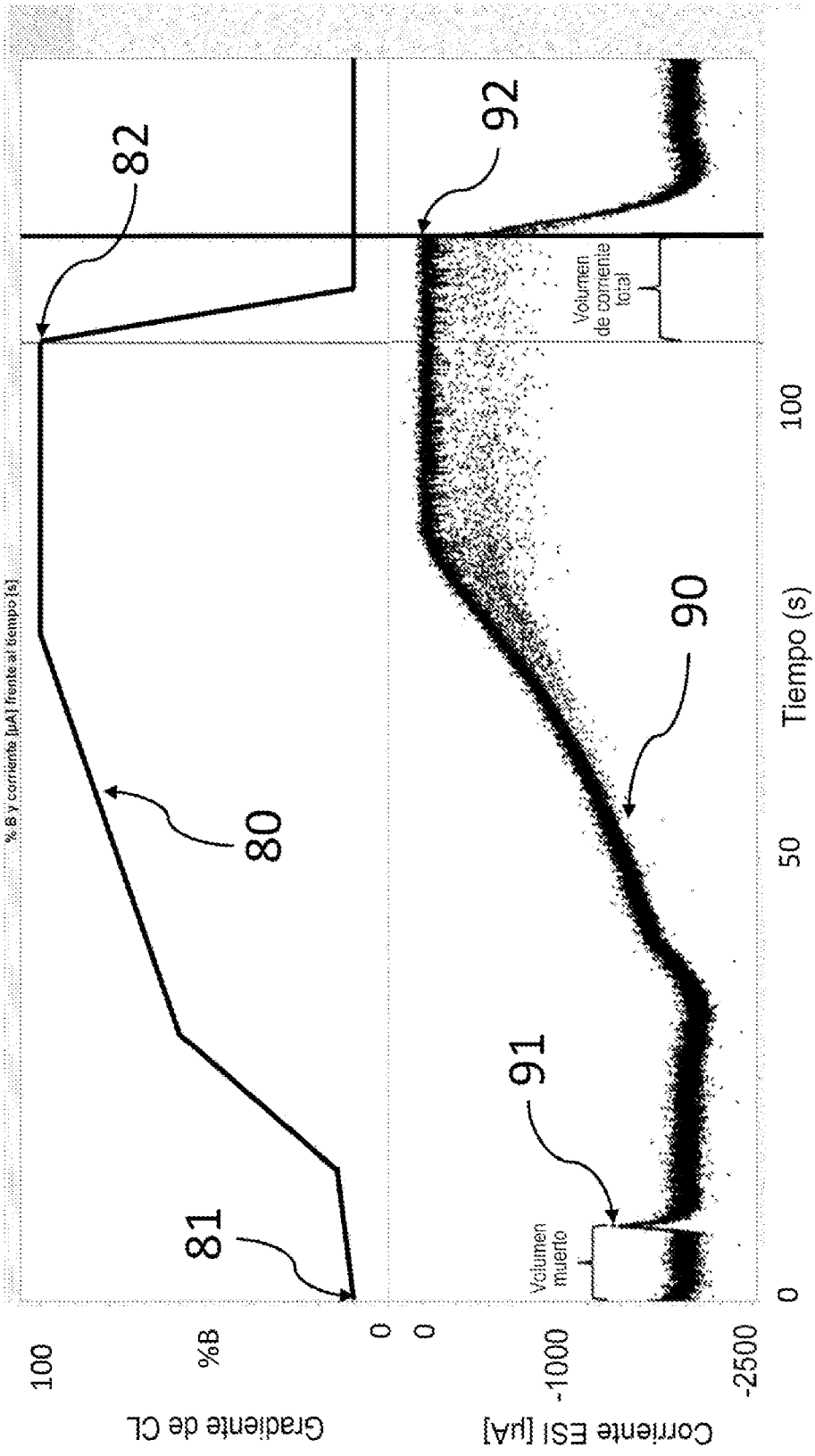

% B y corriente [µA] frente al tiempo [s]
Gradiente de CL
%B
100
0
Corriente ESI [µA]
0
-1000
-2500
Tiempo (s)
0
50
100
80
81
82
90
91
92
Volumen muerto
Volumen de corriente total

FIG. 3