



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 156 476**

②① Número de solicitud: 009800306

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: G01N 27/447

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **16.02.1998**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2001**

Fecha de concesión: **20.12.2001**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2002**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.02.2002**

⑦③ Titular/es: **Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

⑦② Inventor/es: **Díez Masa, José Carlos y  
Cienfuentes Gallego, Alejandro**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Tratamientos de columnas capilares de sílice fundida para la obtención de capilares funcionalizados con grupos vinilo.**

⑤⑦ Resumen:

Tratamientos de columnas capilares de sílice fundida para la obtención de capilares funcionalizados con grupos vinilo.

Los capilares empleados para EC y CLCA consisten normalmente en tubos de sílice fundida debido a sus buenas propiedades en términos de resistencia mecánica y transparencia a la radiación ultravioleta-visible. En el caso de EC, la buena conductividad térmica de la sílice fundida ha sido además una propiedad determinante para su empleo generalizado. Estos capilares una vez funcionalizados son recubiertos de un polímero de modo que gracias a esta interacción covalente pared-polímero se asegura la durabilidad y resistencia tanto mecánica como química del recubrimiento.

ES 2 156 476 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Tratamientos de columnas capilares de sílice fundida para la obtención de capilares funcionalizados con grupos vinilo.

**Sector de la técnica**

Materiales. Cromatografía de líquidos.

**Estado de la técnica**

En Cromatografía de Líquidos en Columnas Abiertas (CLCA) se utilizan normalmente tubos de sílice fundida de muy pequeño diámetro (5-50 µm), realizándose en su interior la separación de las sustancias gracias al diferente reparto de las mismas entre una fase líquida que fluye por el interior del tubo y una fase estacionaria anclada a la pared interna del capilar. En esta técnica, la deposición de la fase estacionaria sobre dicha pared es un requisito previo indispensable para llevar a cabo cualquier separación. La deposición de la fase estacionaria requiere toda una serie de pre-tratamientos de la pared interna del capilar que aseguren la reproducibilidad de la misma de una preparación a otra.

En Electroforesis Capilar (EC) la preparación de columnas capilares recubiertas internamente de capas poliméricas ha permitido su aplicación en toda una serie de métodos que requieren bien la eliminación o disminución del flujo electroosmótico (p.ej. separación por pesos moleculares e isoelectroenfoque), bien en la separación de toda una serie de sustancias que por sus características tienden a adsorberse sobre la pared de sílice fundida del capilar. El desarrollo de esta tecnología de columnas capilares ha permitido que el empleo de esta técnica se ha cada vez más generalizado en los laboratorios de análisis.

En esta patente se propone un método altamente reproducible para la funcionalización de la pared del capilar. Tras la preparación que aquí se describe el capilar queda internamente funcionalizado con grupos vinilo, de forma que puede ser empleado para su posterior recubrimiento con cualquier monómero de tipo acrílico o vinílico que reaccione con dichos grupos (e.g. poliacrilamida lineal, poliacrilamida entrecruzada, poliacrilato de etilo, polimetacrilato de etilo, etc.). El procedimiento consiste en una serie de tratamientos consecutivos de preparación de la pared interna de sílice mediante lixiviación, ataque ácido, deshidratación y finalmente funcionalización del capilar con un vinilo derivado.

El recubrimiento interno de la pared del capilar es un requisito imprescindible en CLCA ya que dicho recubrimiento actúa como fase estacionaria. En el caso de EC el recubrimiento del capilar elimina por un lado el flujo electroosmótico y por otro el efecto negativo de la adsorción de algunas sustancias sobre la pared del capilar. Sobre estos temas se han publicado toda una serie de trabajos de investigación, los cuales pueden encontrarse resumidos en los siguientes artículos: *Analytical Chemistry* 62 (1990) 403R414R, *Analytical Chemistry* 64 (1992) 3898-4078, *Analytical Chemistry* 66 (1994) 2808-3148, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 5698-5868, *Journal of Chromatography* 778 (1997) 3-21. En estos artículos de revisión se mencionan la práctica totalidad de los trabajos que han aparecido relacionados con los diferentes

tipos de recubrimientos desarrollados para EC o CLCA, si bien en nuestro conocimiento no se ha llevado a cabo un estudio tan exhaustivo de los pasos previos al recubrimiento como el aquí descrito.

En la Patente U.S. N° 4 680 201, Hjerten presentó un método para el recubrimiento de la pared interna de un capilar con una delgada capa de poliacrilamida utilizando un silano bifuncional (gamma-metacriloxipropil trimetoxisilano) menos estable químicamente que el reivindicado en esta patente. Novotny y col. (Patente U.S. N° 5 074 982) presentaron un procedimiento para recubrir la pared interna de un capilar de sílice fundida con poliacrilamida utilizando como reactivo bifuncional un compuesto de Grignard, que conduce a una buena estabilidad hidrolítica del recubrimiento. Karger y col. (EP 0 541 238 A1) reivindicaron un método para preparación de recubrimientos neutros hidrófilos utilizando 3-glicidoxipropil trimetoxisilano como agente bifuncional; la capa polimérica esta formada por dos subcapas unidas químicamente: la primera contiene poliacrilamida lineal sobre la que se une una segunda capa de dextrano. Shieh (patente WO 95/20157) describió una patente para la preparación de capilares de sílice fundida con recubrimientos neutros hidrófilos basados en una doble capa: un primer recubrimiento polimérico hidrófobo covalentemente unido a la superficie del capilar (obtenido a partir de polibutadienil trietoxisilano) sobre el que se une covalentemente una segunda capa de poliacrilamida lineal o entrecruzada. Finalmente, Kerr y Jung (Patente WO 92/05433) patentaron diferentes procedimientos para unir varios reactivos bifuncionales que involucran funcionalidades químicas con carga eléctrica positiva en la mayoría de las condiciones utilizadas en electroforesis capilar.

Asimismo, una serie de empresas de ámbito internacional han desarrollado diferentes tipos de columnas recubiertas para Electroforesis Capilar, este es el caso de:

- Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, USA): los capilares están recubiertos de un polímero lineal hidrófilo.
- Supelco, Inc. (Bellefonte, Pennsylvania, USA) cuyos capilares presentan toda una serie de diferentes recubrimientos: recubrimientos hidrófilos, débilmente hidrófobos, moderadamente hidrófobos y de elevada hidrofobicidad.
- Scientific Resources Inc. (Eatontown, New Jersey, USA): los capilares presentan un flujo de tipo anodal como resultado del recubrimiento con sustancias de elevada carga positiva.
- Beckman Inc. (Fullerton, California, USA) dispone de diferentes kits para diferentes aplicaciones, presentando la gran mayoría capilares con un recubrimiento de tipo neutro e hidrófilo.
- Hewlett-Packard (Arizona, Phoenix, USA) dispone de dos tipos de capilares recubiertos, unos de alcohol polivinílico y otros de

un polímero entrecruzado; ambos eliminan los fenómenos de adsorción y el flujo electrosmótico dentro del capilar.

### Descripción de la invención

Los capilares empleados para EC y CLCA consisten normalmente en tubos de sílice fundida debido a sus buenas propiedades en términos de resistencia mecánica y transparencia a la radiación ultravioleta-visible. En el caso de EC, la buena conductividad térmica de la sílice fundida ha sido además una propiedad determinante para su empleo generalizado. Estos capilares una vez funcionalizados son recubiertos de un polímero de modo que gracias a esta interacción covalente pared-polímero se asegura la durabilidad y resistencia tanto mecánica como química del recubrimiento.

Antes del recubrimiento polimérico, la reproducibilidad de los tratamientos previos es un factor determinante para conducir a resultados analíticos similares, tanto dentro de un mismo lote de fabricación como de lotes diferentes.

La consecución de los objetivos marcados supone la obtención de una elevada reproducibilidad en las fases siguientes del procedimiento de elaboración: 1) lixiviado con sosa, 2) ataque ácido, 3) deshidratación y 4) funcionalización de la superficie interna del tubo capilar con un derivado vinílico.

*Activación del tubo capilar.* Consiste en los pasos 1, 2 y 3 y su objetivo es el proporcionar de forma reproducible una densidad de grupos silanol libres en la superficie del capilar, suficiente para favorecer la subsiguiente funcionalización.

*Funcionalización de la superficie interna activada del tubo capilar.* Consiste en llevar a cabo una reacción química entre los grupos silanol superficiales y un organosilano que ejerza una función de agente de acoplamiento entre la pared de sílice fundida y el polímero. El organosilano empleado presenta un grupo vinílico en el extremo de cadena.

### Ejemplo de realización

La columna queda definida con respecto a sus dimensiones, tomando un trozo de tubo capilar de sílice fundida de dimensiones previamente establecidas tanto en longitud como en diámetro

interno.

El primer paso en el tratamiento de los capilares consiste en un lixiviado de la pared interna del capilar. El tratamiento con hidróxido sódico 1 mol/l durante 30 minutos en flujo continuo a una presión de 5 bares asegura la reproducibilidad de este tratamiento tanto para capilares de un mismo fabricante y diferente lote, como para capilares de diferentes fabricantes. Una vez lixiviados los capilares son lavados con un flujo de agua durante 1 hora.

El *ataque ácido* consiste en un tratamiento de los capilares mediante flujo en continuo con ácido clorhídrico 0.1 mol/l durante 2 horas a 70°C. Este ataque elimina las impurezas que presenta en su superficie interna el capilar de sílice fundida y es seguido por un lavado con agua hasta neutralización.

Este proceso continúa con la *deshidratación térmica* de los capilares, para ello se les introduce en un homo durante toda una noche a una temperatura de 160°C, simultáneamente se les pasa una corriente de nitrógeno seco (2 bars de presión) para que arrastre el agua desorbida. La optimización de esta fase de deshidratación mejora el rendimiento de la siguiente etapa en el tratamiento de los capilares, es decir, la silanización.

El mejor rendimiento en la etapa de *silanización* y su mejor reproducibilidad se obtienen empleando el silano 7-octa-1-eniltrimetoxisilano puro. El silano es introducido en el interior del capilar, los extremos del mismo se cierran y se deja que se produzca la reacción entre el organosilano y la pared del capilar a temperatura ambiente durante una noche. Una vez pasado este tiempo el capilar es lavado con metanol en flujo continuo a 4 bares de presión durante una hora. El capilar funcionalizado con el silano y lavado queda entonces listo para su recubrimiento con cualquiera de los polímeros que se han mencionado.

La reproducibilidad de los diferentes tratamientos ha sido determinando mediante la medida por triplicado del valor de flujo electrosmótico de las diferentes columnas a cinco valores de pH distintos (4, 5, 6, 8 y 10), habiéndose comprobado para este estudio un total de más de 250 capilares.

**REIVINDICACIONES**

1. Tratamientos de columnas capilares de sílice fundida para la funcionalización de su pared interna con grupos vinilo **caracterizado** porque las columnas funcionalizadas, pueden ser directamente recubiertas con un monómero acrílico o vinílico y empleadas en Electroforesis Capilar o Cromatografía de Líquidos en Columnas Abiertas y Las columnas son tubos de sílice fundida que por sus características de composición química, inercia, resistencia y flexibilidad son adecuados para su empleo en estas técnicas analíticas.

2. Tratamiento de columnas capilares internamente funcionalizadas según la reivindicación 1,

**caracterizado** por la aplicación de un proceso fisicoquímico de activación de la superficie interna, con disoluciones básicas y ácidas, seguido de deshidratación térmica, para provocar una densidad de grupos silanol libres reproducible y adecuada para una correcta silanización.

3. Tratamiento de columnas capilares internamente funcionalizadas según la reivindicación 1, **caracterizado** por la aplicación de un proceso químico de silanización de la superficie, mediante un compuesto de tipo organosilano, para reducir la presencia de grupos silanol residuales en la superficie del capilar y para favorecer el anclaje covalente del polímero de recubrimiento.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: G01N 27/447

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9520157 A (BECKMAN INSTRUMENTS, INC.) 27.07.1995, reivindicaciones 1-2,4-5,8-15; ejemplos 1-2.	1,3
X	EP 0541238 A (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 12.05.1993, ejemplo.	1,3
X	US 4680201 A (STELLAN HJERTEN) 14.07.1987, columna 2, líneas 20-49; columna 3, líneas 16-20; reivindicaciones 1-3.	1,3
Y	US 5181999 A (JOHN E. WIKTOROWICZ) 26.01.1993, columna 14, líneas 14-17.	1-3
Y	WO 9205433 A (KERR, ROBER et al.) 02.04.1992, página 6, líneas 29-39; página 7, líneas 1-10,19-29; reivindicaciones 1-17.	1-3
E	ES 2151354 A (SUGELABOR S.A.) 16.12.2000, todo el documento.	1-3

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

18.05.2001

Examinador

A. Amaro Roldán

Página

1/1



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: 2 156 476 B1

② Número de solicitud: 009800306

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: G01N 27/447

## CORRECCION DE ERRATAS DE FOLLETO DE PATENTE

Pág./INID	Errata	Corrección
1, ⑦	Cienfuentes	Cifuentes