

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**Trabajo de Tesis Doctoral**

**Cromatografía líquida bi-dimensional. Aplicación a la  
separación de mezclas complejas**

**Lic. Marcelo R. Filgueira**

Directores:

Prof. Dra. Cecilia B. Castells (UNLP)

Prof. Dr. Peter W. Carr (U. Minnesota)

**Año 2012**

## **Reconocimientos**

Este trabajo pudo ser realizado gracias a la visión y experiencia de mis directores de tesis, Dra. Cecilia Castells y Dr. Peter W. Carr. Su continuo apoyo y guía han marcado en mi formación profesional, la importancia en las decisiones que se toman a diario y cómo pueden afectar el futuro de cada persona.

Quiero también agradecer a otros profesionales que han dedicado tiempo y esfuerzo en mi formación durante este trabajo de tesis: Dr. Yuan Huang, Dr. Dwight Stoll, Dr. John Thompson, Dr. Changyub Paek, Doug Fryer, Dr. Philippe Buhlman, Dr. Daniel Jorajuría, Dr. Paul Boswell, Robert Allen y Dra. Sarah Rutan.

## **Dedicatoria**

A mi futura esposa, Sharon, quien ha estado a mi lado apoyándome durante la mayor parte de este difícil y desafiante proceso.

A mis padres, Lidia y Roberto, por todo el amor y ayuda que siempre me brindaron; porque tengo el privilegio de que sean un ejemplo de vida tanto en lo personal como en lo profesional.

A toda mi familia y amigos, porque parte de todo este tiempo dedicado a la tesis, se lo tomé prestado a ellos. Siempre han sido una parte muy importante y presente a pesar de la distancia.

## Contenidos publicados

Varios de los contenidos de esta tesis han sido publicados en la bibliografía científica o presentados en charlas o conferencias.

### Capítulo II:

- Huang Y, Gu H, **Filgueira, Marcelo R.**, and Peter W. Carr. “An Experimental Study of Sampling Time Effects on the Resolving Power of On-line Two-dimensional High Performance Liquid Chromatography.” *Journal of Chromatography A* 1218, no. 20 (May 20, 2011): 2984–2994.
- **Marcelo R. Filgueira**, Yuan Huang, Klaus Witt, Cecilia Castells, and Peter W. Carr. “Improving Peak Capacity in Fast Online Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography with Post-First-Dimension Flow Splitting.” *Analytical Chemistry* 83, no. 24 (December 15, 2011): 9531–9539.

### Capítulo III:

- **Marcelo R. Filgueira**, Peter W. Carr and Klaus Witt. “INSTRUMENT OPTIMIZATION IN COMPREHENSIVE ON-LINE 2D-LC”. Minnesota Chromatography Forum Conference (May 13, 2011).

### Capítulo IV:

- Gu H, Huang Y, **Filgueira Marcelo R.**, and Peter W. Carr. “Effect of First Dimension Phase Selectivity in Online Comprehensive Two Dimensional Liquid Chromatography (LC × LC).” *Journal of Chromatography A* 1218, no. 38 (September 23, 2011): 6675–6687.
- Paek C, Huang Y, **Filgueira Marcelo R.**, Alon V. McCormick, and Peter W. Carr. “Development of a Carbon Clad Core-shell Silica for High Speed Two-dimensional Liquid Chromatography.” *Journal of Chromatography A* 1229, no. 0 (March 16, 2012): 129–139.

Capítulo V:

- **Marcelo R. Filgueira**, Cecilia Castells and Peter W. Carr. “A Simple Robust Orthogonal Background Correction Method for Two-Dimensional Liquid Chromatography”. En preparación.

## INDICE

<b>CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BI-DIMENSIONAL .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Optimizando el poder de resolución.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Columnas monolíticas .....	1
1.1.2 Partículas completamente porosas menores a 2 µm (UHPLC) .....	2
1.1.3 Partículas parcialmente porosas de núcleo sólido (“core-shell”).....	3
1.1.4 Uso de alta temperatura (HTLC).....	4
<b>1.2 Cromatografía líquida bi-dimensional (2D-LC) .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Cromatografía bi-dimensional completa fuera de línea (“off-line”).....	8
1.2.2 Cromatografía bi-dimensional completa en línea (“on-line”) .....	9
1.2.3 Elución en modo isocrático y en gradiente.....	10
1.2.4 Limitaciones en la adopción de la técnica .....	10
<b>1.3 Referencias .....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO II ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Introducción .....</b>	<b>14</b>
2.1.1 Comparación entre cromatografía líquida convencional y bi-dimensional .....	15
2.1.2 Experimental .....	20
2.1.3 Instrumentación.....	22
2.1.4 Cálculo de la capacidad de picos.....	28
2.1.5 Recuento de picos en la muestra de maíz .....	30
2.1.6 Resultados y Discusión .....	32
2.1.7 Conclusiones del estudio.....	42
<b>2.2 Incrementando la capacidad de picos en LCxLC rápida utilizando división de caudal después de la primera dimensión.....</b>	<b>44</b>
2.2.1 Introducción .....	44
2.2.2 Parte experimental.....	48
2.2.3 Resultados y discusión .....	60
2.2.4 Conclusiones .....	68
<b>2.3 Referencias .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO III INSTRUMENTACIÓN EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BI-DIMENSIONAL .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 Introducción.....</b>	<b>75</b>
<b>3.2 Dispositivo de muestreo ó modulador .....</b>	<b>79</b>
3.2.1 Evolución .....	79
3.2.2 Características del modulador .....	82
3.2.3 Configuración del modulador.....	82
<b>3.3 Sistema de bombeo .....</b>	<b>87</b>

<b>3.4 Sistemas de termostatación de la columna y alta temperatura.....</b>	<b>93</b>
<b>3.5 Características del detector .....</b>	<b>96</b>
<b>3.6 División de caudal activa.....</b>	<b>99</b>
<b>3.7 Conclusiones.....</b>	<b>100</b>
<b>3.8 Referencias .....</b>	<b>104</b>
<b>CAPÍTULO IV DESARROLLO DE FASES ESTACIONARIAS.....</b>	<b>106</b>
<b>4 Introducción.....</b>	<b>106</b>
<b>4.1 Estudio de la selectividad de la columna utilizada en la primera dimensión en cromatografía líquida bi-dimensional en línea.....</b>	<b>108</b>
4.1.1 Comparación de fases estacionarias .....	108
4.1.2 Parte experimental.....	110
4.1.3 Resultados y discusión .....	113
4.1.4 Muestras de orina y jugo .....	122
4.1.5 Conclusiones .....	122
<b>4.2 Fases estacionarias para la segunda dimensión: deposición de carbono sobre partículas superficialmente porosas de núcleo sólido de 2.7 µm de diámetro .....</b>	<b>123</b>
4.2.1 Experimental .....	125
4.2.2 Resultados y discusión .....	129
4.2.3 Conclusiones .....	153
<b>4.3 Referencias .....</b>	<b>155</b>
<b>CAPÍTULO V PROCESAMIENTO Y REPRESENTACIÓN DE LOS DATOS .....</b>	<b>159</b>
<b>5.1 Introducción.....</b>	<b>159</b>
<b>5.2 Razones para diseñar un software en este trabajo.....</b>	<b>160</b>
<b>5.3 Método para corrección de fondo para cromatografía líquida bi-dimensional acoplada con DAD....</b>	<b>166</b>
5.3.1 Parte experimental.....	167
5.3.2 Resultados y discusión .....	170
5.3.3 Conclusiones .....	180
<b>5.4 Referencias .....</b>	<b>181</b>
<b>CAPÍTULO VI CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECTOS A FUTURO.....</b>	<b>183</b>
<b>6.1 Resultados generales.....</b>	<b>183</b>
<b>6.2 Proyectos a futuro.....</b>	<b>185</b>
6.2.1 Detección con espectrómetro de masas y comparación con DAD .....	185
6.2.2 Utilización de métodos quimiométricos .....	185
6.2.3 Mecanismos de retención alternativos para la primera dimensión .....	186





# Capítulo I

## Introducción a la cromatografía líquida bi-dimensional

### 1.1 Optimizando el poder de resolución

La metodología cromatográfica en la que la fase móvil es un líquido o una disolución líquida es hoy una metodología madura. La terminología que la identifica como “cromatografía líquida” proviene de su traducción del inglés y es la que se usará en este trabajo por simplificación.

En los últimos años se han producido un importante número de desarrollos tecnológicos en el área de la cromatografía líquida, que permiten realizar separaciones más rápidas y eficientes. Por ejemplo, el uso de columnas monolíticas, de columnas rellenas de partículas muy pequeñas (menores a 2  $\mu\text{m}$ ) que requieren “ultra-alta” presión, de partículas parcialmente porosas de núcleo sólido y también el uso de temperaturas muy elevadas (*1*). Vamos a describir brevemente estas tecnologías ya que todas persiguen el mismo fin: lograr el mayor poder de separación en el menor tiempo posible.

#### 1.1.1 Columnas monolíticas

Estas columnas consisten en una única pieza (de ahí su nombre) de material poroso con características únicas en cuanto a permeabilidad y eficiencia. Se han desarrollado dos tipos principales de columnas monolíticas, las basadas en polímeros orgánicos y las basadas en monolitos de sílice. Las de tipo orgánico son, en general, más utilizadas para separaciones de macromoléculas como proteínas o anticuerpos utilizando fases móviles mayoritariamente acuosas; estos polímeros suelen contraerse y expandirse al variar mucho la concentración del

modificador orgánico. Las basadas en sílice tienen una estructura bimodal caracterizada por macro-poros de unos 2  $\mu\text{m}$  y meso-poros de aproximadamente 13 nm. Sus propiedades son similares a las rellenas de partículas del orden de los 3.5  $\mu\text{m}$  en cuanto a eficiencia, pero de permeabilidad comparable a las que contienen partículas de 11  $\mu\text{m}$ . Las características físicas de estas columnas radican en que poseen mayor velocidad de transferencia de masa y pueden ser utilizadas a caudales entre 3 y 10 veces más elevados que las columnas particuladas, permitiendo reducir significativamente el tiempo de análisis (2). Otro enfoque que se emplea con estas columnas consiste en utilizar suficiente longitud de columna (hasta el límite de presión provisto por el sistema) con el fin de lograr un gran número de platos teóricos. Entre las limitaciones generales de estos monolitos se encuentra el límite de presión que soportan: no mayor a 200 bar, rangos reducidos de pH de fase móvil posibles (entre 2 y 8), incompatibilidad con algunos solventes ya que se encuentran construidas en PEEK (acrónimo de “polyether etherketone”), poca variedad de fases estacionarias y muy pocos fabricantes por fuertes restricciones en las patentes de su fabricación.

### **1.1.2 Partículas completamente porosas menores a 2 $\mu\text{m}$ (UHPLC)**

En cromatografía está bien establecido el concepto de que reducir el tamaño de las partículas mejora la eficiencia máxima, la velocidad óptima, y la velocidad de transferencia de masa simultáneamente. Desde el año 2004 ya se ofrecen en mercado partículas de 1.8  $\mu\text{m}$  de diámetro y para poder hacer uso de sus beneficios se han debido optimizar considerablemente los instrumentos cromatográficos. Ya que la caída de presión de una columna es inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de las partículas del relleno (ley de Darcy), la presión requerida para mantener una dada velocidad lineal se cuadruplica al reducir a la mitad el diámetro de las partículas del relleno. Si, además, se aumenta el caudal del eluyente al reducir el tamaño promedio de las partículas con el fin de mantener la

velocidad reducida en el mismo valor, la caída de presión aumentará a la potencia tres. Es interesante que todas las campañas de marketing resalten la ultra-alta presión, cuando la alta presión es la consecuencia y no el fin.

Sin dudas esta estrategia es la que ofrece mayor variedad de fases estacionarias, proveedores y facilidad al momento de transferir una técnica. Esto es de mucha importancia al momento de tener en cuenta procedimientos de validación en ambientes regulados por organismos gubernamentales. Por supuesto, esto implica adquirir un instrumento nuevo para ultra-alta presión.

### **1.1.3 Partículas parcialmente porosas de núcleo sólido (“core-shell”)**

Si bien esta tecnología fue desarrollada en los años 1990 por Kirkland (3), no fue hasta el 2007 que se logró tamaños de partículas relativamente pequeños y se comenzaron a ofrecer en el mercado bajo el nombre comercial Halo de AMT (Advanced Materials Technology). Hoy en día hay varias marcas comerciales ofreciendo este tipo de partículas y en general se presentan en tamaños de 2.7  $\mu\text{m}$  de diámetro y con un núcleo sólido de 1.7  $\mu\text{m}$ . Fueron diseñadas originalmente con el objetivo de reducir el camino difusivo que los analitos recorren dentro de partículas totalmente porosas. El hecho de presentar un recorrido menor para que los analitos difundan, reduce la resistencia a la transferencia de masa y por lo tanto la dispersión axial, reduciendo el ensanchamiento de banda, especialmente a elevadas velocidades lineales. Otra característica particular de estos materiales, es que se suelen preparar con una distribución mucho menor en el tamaño de partículas. El hecho de tener una distribución más homogénea permite construir columnas con lechos más eficientes y reducir el efecto de dispersión Eddy. Es común lograr eficiencias similares a las obtenidas con partículas menores a 2  $\mu\text{m}$  para iguales tamaños de columna, pero con permeabilidad

correspondiente a partículas de 2.7  $\mu\text{m}$ , permitiendo el uso de equipos convencionales, o columnas más largas (4).

#### **1.1.4 Uso de alta temperatura (HTLC)**

Se considera alta temperatura cuando la columna se calienta por encima de los 60 °C (5). Una temperatura superior podría estar limitada por el equipamiento, el que generalmente no permite temperaturas superiores a los 150 - 200 °C.

La elevada temperatura afecta en forma directa las propiedades físicas del eluyente (5, 6):

1) se reduce considerablemente la viscosidad de la fase móvil, lo cual reduce en el mismo factor la caída de presión del sistema;

2) provoca un aumento en los coeficientes de difusión de los analitos; esto, a su vez, tiene dos consecuencias: se reduce la resistencia a la transferencia de masa en ambas fases (disminuyendo la pendiente positiva de la curva de van Deemter) y se desplaza la velocidad óptima hacia mayores velocidades lineales.

3) Disminuye la constante dieléctrica y la tensión superficial del agua, por lo que aumenta el poder de elución del solvente en fase reversa y, en consecuencia, la cantidad de solvente orgánico de la fase móvil se puede reducir.

Hay varios aspectos negativos en esta estrategia que reducen mucho su aceptación en el uso habitual. En primer lugar, la variedad de fases estacionarias que son estables a elevadas temperaturas es muy reducida. La estabilidad térmica de algunos analitos también puede ser un factor limitante dependiendo el caso. Desde el punto de vista instrumental, son solo unos pocos los proveedores de hornos de alta temperatura que hay disponibles, se debe pre-

calentar la fase móvil ingresante y, con muchos detectores, es necesario utilizar un restrictor de presión a la salida del detector (o columna) para evitar la ebullición de la fase móvil. Además, algunos detectores ópticos no soportan temperaturas mayores a 50 °C. En cambio, puede ser beneficioso para acoplar con detectores no convencionales como un FID (7) o un espectrómetro de masas.

## **1.2 Cromatografía líquida bi-dimensional (2D-LC)**

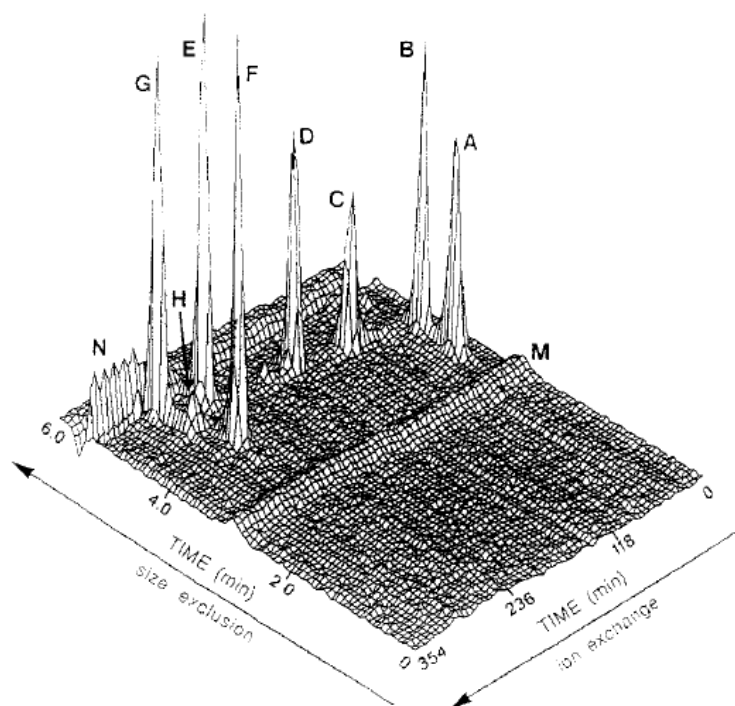
La cromatografía líquida bi-dimensional es motivo de interés y experimentación desde hace ya varios años (8). La ventaja principal de la cromatografía líquida bi-dimensional respecto a la cromatografía líquida de alta resolución radica en la gran capacidad de picos que se puede lograr utilizando diferentes mecanismos separativos, lo que es prácticamente indispensable en muestras complejas por la cantidad y variedad de analitos presentes. Históricamente, la cromatografía líquida bi-dimensional ha sido utilizada casi exclusivamente para resolver mezclas con cientos de constituyentes.

El experimento consiste básicamente en transferir una o varias fracciones del eluyente de una columna cromatográfica a una segunda columna para realizar otra etapa de separación adicional. Esta estrategia puede tener varios objetivos: a) poder resolver componentes de una mezcla compleja que no puede ser separada en una única columna, b) para separar la matriz de una muestra respecto de los componentes de interés, c) para concentrar y purificar algún compuesto particular o d) hacer uso más eficiente del tiempo de separación. Hay muchas formas de practicar la cromatografía bi-dimensional. El ejemplo más simple podría ser realizar una cromatografía en capa fina con un solvente en una dirección y luego utilizar un solvente diferente para realizar una segunda cromatografía a 90 grados respecto a la primera. Sin embargo, muchos otros ejemplos se pueden obtener combinando diferentes formas de cromatografía líquida (fase normal, reversa, exclusión, intercambio iónico) en ambas

dimensiones. El análisis del eluyente de la primera columna se podría realizar de varias formas. Si, por ejemplo, uno está interesado solamente en una fracción de la primera dimensión (corte), ésta única fracción es transferida a la segunda columna y analizada. Esta es la forma más común de cromatografía bi-dimensional y se la conoce por varios términos diferentes, como ser “cambio de columnas”, “cromatografía en serie”, “análisis secuencial” ó incluso “columnas acopladas”. La principal ventaja radica en que los requerimientos instrumentales son menores y, en principio, solo se precisaría una válvula para transferir el corte de la primera a la segunda columna.

Cuando es necesario realizar una caracterización completa de la muestra, Calvin Giddings utilizó por primera vez el concepto de “cromatografía multidimensional completa” (traducido del inglés: *comprehensive multidimensional chromatography*) (9). Este concepto aplicado a cromatografía bi-dimensional significa que cada fracción de la primera columna (el eluyente de la primera columna completo) debe ser analizada en la segunda dimensión. Esto normalmente se implementa juntando fracciones en intervalos de tiempo determinados que luego son analizados en sucesivas corridas en la segunda dimensión. Cuando uno realiza cromatografía líquida (LC) bi-dimensional (2D-LC), pero en modo completo, se lo suele abreviar como LCxLC, dónde el símbolo de multiplicar implica en modo “completo” (traducido del inglés: *comprehensive*) implicando el concepto del producto del poder de separación de ambas dimensiones. Este concepto se discutirá en detalle en los siguientes capítulos.

La figura 1.2.1 muestra un cromatograma bi-dimensional de una muestra de proteínas obtenido en uno de los trabajos pioneros en LCxLC.



**Figure 3.** 2-D chromatogram of protein sample: peak A, glucose oxidase; B, ovalbumin; C,  $\beta$ -lactoglobulin A; D, trypsinogen; E,  $\alpha$ -chymotrypsinogen A; F, conalbumin; G, ribonuclease A; H, hemoglobin; M, exclusion volume "pressure" ridge; N, inclusion volume "salt" ridge. Ovalbumin and  $\alpha$ -chymotrypsinogen A at 0.2%, other proteins at 0.3% (w/v). C1 conditions: 5  $\mu$ L/min, 0% to 100% buffer B from 20 to 260 min; buffer A, 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5; buffer B, 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /0.25 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 5. Valve actuated every 6 min; detection at 215 nm, data collection rate 0.5 point/s; plot shows every other point collected for injection 1 through 60. Each line perpendicular to the IEC time axis represents one injection on the SEC column.

Figura 3. Cromatograma 2-D de muestra de proteínas: pico A, glucosa oxidasa; B, ovoalbúmina; C,  $\beta$ -lactoglobulina A; D, tripsinógeno; E,  $\alpha$ -simotripsinógeno A; F, conalbúmina; G, ribonucleasa A; H, hemoglobina; M, defecto de "presión" del volumen de exclusión; N, defecto de "sal" del volumen de inclusión. Ovoalbúmina y  $\alpha$ -simotripsinógeno A a 0.2 %, las otras proteínas a 0.3 % (p/v). Condiciones C1: 5  $\mu$ L/min, 0 % a 100 % de buffer B desde 20 hasta 260 min; buffer A, 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5; buffer B, 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /0.25 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 5. Válvula accionada cada 6 min; detección a 215 nm, datos colectados a 0.5 puntos/s; el gráfico muestra cada punto colectado para la inyección 1 hasta la 60. Cada línea perpendicular al eje de tiempo IEC representa una inyección en la columna SEC.

Figura 1.2.1 Uno de los trabajos pioneros en LCxLC en línea realizado Bushey y Jorgenson en 1990 (10).

La cromatografía gaseosa (GC) bi-dimensional completa (GCxGC) es una técnica madura que se viene utilizando desde hace muchos años y, en el mercado actual, se pueden adquirir equipos comerciales. Tiene un poder de separación muy importante y los análisis típicos no son mucho más largos que los convencionales de GC capilar. En el caso de LCxLC, la técnica aún está en sus comienzos.

El objetivo que se persigue con la modalidad LCxLC es el mismo que se plantea desde los comienzos de la cromatografía: lograr el máximo poder de separación en el menor tiempo posible. En las técnicas multidimensionales y cuando se trabaja en elución en gradiente para resolver muestras complejas, el poder de resolución se lo suele caracterizar en términos de la “capacidad de picos”. Por ahora definiremos a la capacidad de picos como la cantidad de picos que se pueden “acomodar” en un tiempo determinado. En un caso ideal (¡y como todo lo ideal, no existe!), la capacidad de picos para una técnica bi-dimensional completa estaría determinada por el producto de la capacidad de picos de cada una de las dimensiones. El valor así obtenido de la capacidad de picos es sin dudas el límite superior y, lamentablemente se encuentran en la literatura muchos casos de abuso de este concepto, informándose valores de capacidades de picos irrisorios como resultado de un experimento. La realidad es que hay varios requisitos que se deben cumplir para lograr acercarse lo más posible a la ideal “regla del producto”. Por ejemplo; los mecanismos de separación que se implementan en las dos columnas deben ser de muy diferente selectividad. Sin embargo, en el caso de muestras complejas, hay una gran variedad de analitos con muchas más propiedades que los mecanismos que se podrían utilizar en la práctica para su separación.

### **1.2.1 Cromatografía bi-dimensional completa fuera de línea (“off-line”)**

Este modo es de los primeros realizados y consiste en recolectar todas las fracciones eluidas de la primera dimensión, para poder ser luego analizadas por la segunda dimensión. Hoy en



día hay equipos comerciales que realizan esto de forma completamente automatizada. Dionex es uno de los proveedores de tal instrumento. En este modo, uno puede tomar tantas fracciones como “desea” de la primera dimensión con un colector de fracciones y luego inyectarlas individualmente sin restricciones en cuanto a la capacidad de picos y el tiempo de análisis de la segunda dimensión. Este modo es sin dudas el que permite alcanzar los valores más altos en la capacidad de picos. Incluso se pueden considerar tratamientos intermedios de las fracciones colectadas antes de ser inyectadas en la segunda dimensión. Sin dudas el tiempo es el factor a tener en cuenta al realizar esta modalidad. El grupo de Guiochon ha reportado valores de capacidad de picos de 7000 en un tiempo de análisis de 28 hs para el análisis de una muestra proteómica utilizando este modo (11). Además del elevado tiempo necesario para este modo, también se puede considerar una desventaja la complejidad necesaria para transferir las muestras y el riesgo de degradación o contaminación.

### **1.2.2 Cromatografía bi-dimensional completa en línea (“on-line”)**

Para el modo en línea, las fracciones que eluyen de la primera dimensión se van juntando generalmente en una válvula con dos lazos. A medida que en un lazo se colecta la muestra, el otro lazo es inyectado y analizado en la segunda dimensión. Esto implica que para cuando la siguiente muestra se terminó de colectar en un lazo, el análisis de la segunda dimensión tiene que haberse completado y debe estar listo para el siguiente ciclo. Esto impone una fuerte restricción en la optimización de la técnica, como se discute más adelante. Estas restricciones hacen que el modo en línea no pueda alcanzar generalmente tan elevada capacidad de picos como el modo fuera de línea, pero para tiempos de análisis relativamente más cortos (menores a una hora en general), se pueden lograr capacidades de picos grandes y por lo tanto una muy elevada cantidad de capacidad de picos por unidad de tiempo.

### **1.2.3 Elución en modo isocrático y en gradiente**

El modo de elución en gradiente permite la separación de muestras con un rango muy amplio en factores de retención en una única corrida. Es bien sabido que el máximo número de picos que pueden ser separados en una ventana de tiempo particular (capacidad de picos) es considerablemente mayor en elución en gradiente que en modo isocrático, ya que los picos son más angostos y prácticamente todos de un mismo ancho (12). También, la utilización en el espacio de separación es normalmente más regular en modo gradiente que en isocrático. Del mismo modo que sucede en cromatografía de una dimensión, en cromatografía bi-dimensional, el incremento en la capacidad de picos es muy significativo utilizando elución en gradiente en ambas dimensiones.

### **1.2.4 Limitaciones en la adopción de la técnica**

Probablemente la principal razón de la lenta adopción de esta técnica, es por la falta de interés de los fabricantes de equipos cromatográficos por comercializarlos. No obstante, la necesidad de reducir el tiempo de análisis y aumentar la resolución hace que los componentes que se encuentran en el mercado prácticamente no necesiten modificaciones para poder ensamblar un equipo LCxLC en línea.

La falta de herramientas de software robustas, simples de utilizar y comercialmente disponibles es sin duda uno de los principales factores que demoran la rápida adopción de esta técnica (13). Esto está cambiando de a poco y ya se encuentran al menos dos productos comerciales, y uno de ellos (GCImage, Lincoln, Nebraska (14)) va mostrando un rápido y constante desarrollo. Si bien estos productos fueron desarrollados para GCxGC, se pueden utilizar en muchos casos para LCxLC. Por supuesto, hay particularidades de la técnica que estos productos no pueden aún resolver, como la fuerte distorsión en la línea de base

generada en condiciones de gradiente muy rápidos utilizando detectores ópticos. Esto se discutirá en detalle en el capítulo V.

Otro aspecto importante es la falta de mano de obra calificada para el desarrollo de los métodos. Siendo una técnica utilizada principalmente en laboratorios de investigación, la capacitación de personal idóneo es mucho más lenta que en cualquier otra técnica cromatográfica.

La complejidad inherente por la combinación de diferentes columnas y fases móviles, que sumado a las restricciones de velocidad de la segunda dimensión, hacen que el desarrollo de métodos rápidos y eficientes sea lento.

### 1.3 Referencias

- (1) Guillarme, D.; Ruta, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *397*, 1069–1082.
- (2) Cabrera, K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science* **2004**, *27*, 843–852.
- (3) Kirkland, J. J. Superficially porous silica microspheres for the fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1239–1245.
- (4) David V., M. Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1193*, 85–91.
- (5) Teutenberg, T. *High-Temperature Liquid Chromatography: A User's Guide for Method Development*; Royal Society of Chemistry, 2010.
- (6) D. Antia, F.; Horváth, C. High-performance liquid chromatography at elevated temperatures: examination of conditions for the rapid separation of large molecules. *Journal of Chromatography A* **1988**, *435*, 1–15.
- (7) Bruckner, C. A.; Ecker, S. T.; Synovec, R. E. Simultaneous flame ionization and absorbance detection of volatile and nonvolatile compounds by reversed-phase liquid chromatography with a water mobile phase. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3465–3470.
- (8) Cortes, H. J. *Multidimensional chromatography: techniques and applications*; CRC, 1990; Vol. 50.
- (9) Giddings, J. C. Two-dimensional separations: concept and promise. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1258A–1270A.

- (10) Bushey, M. M.; Jorgenson, J. W. Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 161–167.
- (11) Marchetti, Nicola, Jacob N. Fairchild, and Georges Guiochon. “Comprehensive Off-Line, Two-Dimensional Liquid Chromatography. Application to the Separation of Peptide Digests.” *Anal. Chem.* **80**, **2008**, 2756–2767.
- (12) Jandera, P.; Hájek, T.; Česla, P. Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 1995–2006.
- (13) Stoll, D. R. Recent progress in online, comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for non-proteomic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *397*, 979–986.
- (14) GCImage. <http://www.gcimage.com/index.html> (accessed March 2, 2012).

## Capítulo II

# Estrategias de optimización

### 2.1 Introducción

Cuando en cromatografía hablamos de optimizar una separación analítica, hay que establecer qué se quiere optimizar. Siendo que el poder de resolución es proporcional a la raíz cuadrada del número de platos teóricos de la columna cromatográfica, la mayoría de las veces se asume que la optimización implica utilizar la velocidad lineal óptima que se obtiene en el mínimo de la curva de van Deemter. Esto, desde el punto de vista teórico, implica utilizar partículas muy grandes y columnas extremadamente largas resultando en tiempos de análisis impracticables. Lo contrario ocurre si se pretende optimizar el cociente entre número de platos y tiempo de análisis. Además, si uno debe optimizar el sistema para un tiempo de análisis determinado, se deben tener en cuenta factores como el re-equilibrado de la columna y del instrumento si se utiliza un gradiente de elución. En este trabajo, el concepto de optimización, se aplica a la maximización de la capacidad de picos en un tiempo de análisis determinado. La optimización se realizó empleando herramientas informáticas basadas en la teoría de fuerza de solvente lineal (LSST, “Linear Solvent Strength Theory”) propuesta por Snyder (1), e implementado en un modelo que maximiza la capacidad de picos para cromatografía de elución en gradiente en fase reversa desarrollado por Wang *et al.* (2). Esto es, fijando la longitud de la columna, la velocidad lineal de la fase móvil y la composición del gradiente para un diámetro interno, tamaño de partícula y temperatura determinada, se logra una precisa predicción del ancho de los picos cromatográficos y de los tiempos de retención de los solutos de interés utilizando la máxima presión disponible en el sistema. En contraste con

la cromatografía líquida de una dimensión, la optimización en cromatografía líquida bi-dimensional en línea es mucho más compleja ya que se deben considerar limitaciones adicionales en los parámetros de optimización, como el caudal de la primera dimensión y el tiempo de muestreo. Es importante tener en cuenta la limitación adicional que se impone en la separación de la primera dimensión por el volumen de fase móvil que se transfiere a la segunda dimensión. En caso de transferir volúmenes muy grandes, se pueden producir severos ensanchamientos de banda en la separación de la segunda dimensión, por lo que se suelen utilizar caudales muy bajos y velocidades lineales generalmente muy por debajo del óptimo para reducir el volumen de muestra transferido a la segunda dimensión.

### **2.1.1 Comparación entre cromatografía líquida convencional y bi-dimensional**

Cuando en cromatografía de una dimensión evaluamos la capacidad de picos ( ${}^1n_c$ ), ésta se la puede definir por la ecuación 2.1.1:

$${}^1n_c = \frac{(t_{R,ult} - t_{R,prim})}{w_{prom}}$$

donde  $t_{R,ult}$  y  $t_{R,prim}$  corresponden al tiempo de retención del último y primer pico observados en la separación y  $w_{prom}$  es el ancho de pico promedio en la base ( $4\sigma$ ) (3).

En el caso de separaciones multidimensionales, la definición de capacidad de picos de Giddings es la medida más importante para el poder de separación (4). Asimismo ha sido demostrado, al menos para separaciones de una dimensión, que la capacidad de picos es proporcional a la resolución media (2). Idealmente, la capacidad de picos bi-dimensional ( $n_{c,2D}$ ) queda definida por el producto de la capacidad de picos de la primera y segunda dimensión. Esta relación es también conocida como la regla del producto, y se muestra en la ecuación 2.1.2:

$$n_{c,2D} = {}^1n_c \times {}^2n_c$$

donde  ${}^1n_c$  y  ${}^2n_c$  corresponden a la capacidad de picos de la primera y segunda dimensión, respectivamente. Es bien sabido que, desde el punto de vista práctico, esta ecuación sobreestima la capacidad de picos y deben aplicarse factores de corrección para corregir por los efectos de sub-muestreo de la primera dimensión (5–7) y la falta de independencia entre los mecanismos de separación de ambas dimensiones (8) (denominada comúnmente como falta de “ortogonalidad”). El sub-muestreo consiste en analizar el eluyente de la primera dimensión en fracciones relativamente grandes. Esto produce una pérdida en el poder de separación, pues, analitos que fueron separados en la primera dimensión, vuelven a ser juntados durante el proceso de muestreo. Por esto es primordial que la segunda dimensión sea muy rápida respecto a la primera. La “regla del producto” puede ser entonces corregida por sub-muestreo utilizando el factor de Davis-Stoll-Carr, ecuación 2.1.3 (7):

$$\langle \beta \rangle = \sqrt{1 + 3.35 \left( \frac{{}^2t_c}{{}^1w} \right)^2} = \sqrt{1 + 3.35 \left( \frac{{}^2t_c {}^1n_c}{{}^1t_g} \right)^2}$$

donde  $\beta$  es el factor de corrección por sub-muestreo,  ${}^1w$  y  ${}^1t_g$  son el ancho de pico en la base y el tiempo de gradiente para la primera dimensión respectivamente y  ${}^2t_c$  es el tiempo de ciclo de la segunda dimensión. Aplicando el factor de corrección a la ecuación 2.1.2, se obtiene la capacidad de picos bi-dimensional corregida ( $n'_{c,2D}$ ), ecuación 2.1.4:

$$n'_{c,2D} = \frac{{}^1n_c \times {}^2n_c}{\langle \beta \rangle} \approx \frac{{}^1t_g \times {}^2n_c}{{}^1w \sqrt{1 + 3.35 \left( \frac{{}^2t_c}{{}^1w} \right)^2}}$$

Esta ecuación provee una medida más exacta de la capacidad de picos práctica de un sistema y es de gran utilidad cuando se quieren comparar sistemas con condiciones similares en ambas dimensiones. Para corregir también por el efecto de la falta de independencia entre los



mecanismos de separación y tomar en cuenta el grado de aprovechamiento de una separación bi-dimensional, Stoll *et al.* definieron la capacidad de picos efectiva ( $n_{c,2D}^*$ ) a través de la ecuación 2.1.5:

$$n_{c,2D}^* = n_c \times n_c \times f_{cober} \times \frac{1}{\langle \beta \rangle}$$

Esta ecuación incorpora el factor de cobertura  $f_{cober}$  que toma en cuenta el hecho de que el espacio de separación bi-dimensional nunca puede ser cubierto en su totalidad (4). El método de estimación de  $f_{cober}$  consiste en una modificación al método desarrollado inicialmente por Gilar, que se explica más adelante. En la comunicad científica relacionada a esta especialidad, lamentablemente no hay aún consenso en cuanto a la corrección por sub-muestreo y la necesidad de tomar en cuenta el aprovechamiento del espacio bi-dimensional (ortogonalidad). Esto redundando en que los factores de corrección utilizados que se informan en la literatura pueden variar considerablemente, y lamentablemente aún se ven algunas publicaciones recientes en las que los autores simplemente utilizan la “regla del producto” para representar la capacidad de picos, cuando en el mejor de los casos sólo la cuarta parte del valor representa la capacidad de picos real una vez aplicadas las correcciones. Es fundamental observar las correcciones aplicadas a cada resultado reportado en esta técnica. Igualmente, al momento de optimizar, se deben analizar adecuadamente cuáles son los factores que tendrán mayor influencia para el método particular.

En los últimos años han aparecido varias publicaciones acerca de la optimización en LCxLC en modo “on-line”. Schoenmakers *et al.* (9) sugirieron un protocolo basado en el concepto de las gráficas de Poppe (10), que consisten en optimizar la relación (tiempo/número de platos). Sin embargo, en vez de optimizar el tiempo de muestro, este protocolo simplemente lo determina según el valor de una desviación estándar del ancho de los picos de la primera dimensión. Esto es sabido que es demasiado rápido. Sobre esa base, los autores no realizan

ninguna corrección para el efecto de sub-muestreo antes mencionado y simplemente lo consideran despreciable. Ya que el tiempo de muestreo es un parámetro de mayor importancia en la optimización de LCxLC en línea, es evidente que los resultados derivados de este protocolo no son los óptimos. Posteriormente, Horie *et al.* (5) publicaron un minucioso estudio sobre el efecto de sub-muestreo y su optimización, basándose en el modelo de Seeley (11). Más recientemente, el grupo de Schoenmakers publicó un trabajo exhaustivo sobre la optimización de cromatografía LCxLC, donde toman en cuenta el efecto de sub-muestro y el ensanchamiento de banda en la segunda dimensión en función del volumen de muestra inyectado en ésta segunda dimensión. En este último trabajo, se optimizaron simultáneamente el tiempo de muestreo, el tamaño de partícula, diámetro interno y longitud de columnas y la velocidad lineal de la fase móvil en ambas dimensiones (12). También se compararon las diferentes combinaciones de modos isocrático y en gradiente en ambas dimensiones mostrando claramente que en el modo en gradiente se logran mucho mayores valores de capacidad de picos. Basándose en la mayor capacidad de picos del modo gradiente, se comparó el uso de baja y alta presión en ambas dimensiones. El método utilizado en la optimización de múltiples objetivos simultáneamente es conocido como optimización-Pareto, y ha sido utilizado en problemas financieros por muchos años, pero nunca había sido utilizado en cromatografía. El estudio utilizó como criterios maximizar la capacidad de picos corregida, minimizar el tiempo de análisis y minimizar el factor de dilución de la muestra.

En este trabajo, la optimización realizada se basa en la selección clave de las fases estacionarias de la primera y segunda dimensión. La fase estacionaria para la segunda dimensión es carbono sobre óxido de zirconio y fue elegida por su excelente estabilidad química y mecánica a elevadas temperaturas y caudales (13, 14). Además, y de mayor importancia, es su selectividad extremadamente diferente a la mayoría de las fases

estacionarias para fase reversa (15). Las fases de carbono son particularmente retentivas, y resultan muy apropiadas en especial si se lo combina con fases como las de pentafluoro-fenil ó C3 (de particular bajo poder de retención, como se discute más adelante) en la primera dimensión. La gran retentividad de la fase de carbono es esencial para enfocar el eluyente de la primera dimensión en la entrada de la columna de la segunda dimensión, y aún utilizar columnas de tamaño muy reducido. Esto permite prácticamente eliminar el ensanchamiento de banda causado por grandes volúmenes de inyección (de hasta 100 µL) provenientes de los lazos en la válvula de 10 puertos. También se utilizó elución en gradiente para la segunda dimensión por varias razones. Primero, se consigue aumentar considerablemente la capacidad de picos, lo cual es crítico en este modo de cromatografía. Segundo, nos ayuda a enfocar la muestra inyectada proveniente de la primera dimensión, ya que la columna de la segunda dimensión se encuentra con solvente de débil fuerza eluyente por el comienzo del gradiente de cada ciclo. También el hecho de tener que eluir una gran variedad de analitos con distintos factores de retención, impulsa a utilizar un gradiente para poder eluir todos los analitos inyectados en cada ciclo, antes de comentar el siguiente ciclo, y así evitar el acarreo de muestra entre ciclos y la aparición de picos fantasma.

Considerando lo antes mencionado, la estrategia de optimización utilizada se concentra en buscar el tiempo de muestreo óptimo, que combinado con tiempos de gradiente en ambas dimensiones, maximice la capacidad de picos bi-dimensional corregida y efectiva.

Cuando calculamos la capacidad de picos, si el primer pico eluye al comienzo del gradiente y el último pico al final del mismo, podemos aproximar el numerador en la ecuación 2.1.1 como  $t_g$ . Luego, en el límite de la capacidad de picos en condiciones de sub-muestreo severas, Li *et al.* (16) encontraron que la capacidad de picos corregida puede ser aproximada por la ecuación 2.1.6:

$$n'_{c,2D} \approx \frac{{}^1t_g \times {}^2n_c}{1.83 \times {}^2t_c}$$

De forma general, para llegar a esta aproximación, se consideró que  ${}^2t_c$  es mucho mayor respecto a  ${}^1w$  en la ecuación 2.1.4 (lado derecho). De esta forma, el segundo sumando de la raíz en el denominador es mucho mayor que la unidad y puede ser simplificado para llegar a la forma de la ecuación 2.1.6, la cual es una simple y muy útil guía para la optimización de LC×LC en línea. Esta ecuación muestra que la capacidad de picos por unidad de tiempo de la segunda dimensión ( ${}^2n_c/{}^2t_c$ ) es clave. Asimismo muestra que la capacidad de picos de la primera dimensión no tiene importancia, pero sí es importante el tiempo de gradiente de la misma (tenemos en cuenta que estamos en condiciones de sub-muestreo severo).

## 2.1.2 Experimental

Productos químicos. Los patrones utilizados para determinar la capacidad de picos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y fueron de grado reactivo o mejor. El acetonitrilo fue obtenido de Burdick y Jackson (Muskegon, MI). El fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) fue obtenido de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ), y el fosfato di sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) fue Fisher Scientific (Fairlawn, NJ). El agua de grado HPLC fue adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todos los reactivos fueron utilizados como fueron recibidos, sin ningún tratamiento posterior. Las fases móviles acuosas se prepararon gravimétricamente ( $\pm 0.01$  g) y se filtraron a través de membrana de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$  previo a ser utilizadas, con un aparato de Lida Manufacturing Inc (Kenosha, WI).

Preparación de la muestra. La solución patrón para determinar la precisión en la predicción de la capacidad de picos contenía nitrato de sodio, tirosina, 5-hidroxy-L-triptofano, triptofano, indol-3-ácido acético, indol-3-ácido propiónico e indol-3-acetonitrilo. Estos

compuestos fueron disueltos en buffer de fosfato de sodio 20 mM a pH 5.7 en concentraciones de 20 µg/mL. Las semillas de maíz utilizadas para HPLC y LC×LC en línea fueron Silver Queen (Burpee, Warminster, PA) y fueron tratadas de la siguiente forma: 40 g de la muestra de semillas fueron molidas hasta formar un polvo fino con un molino convencional para granos de café. El polvo fue dividido en 8 alícuotas en tubos de vidrio de 20 mL, seguido de la adición de 3.5 mL de metanol y 1.5 mL del buffer de fosfato 20 mM pH 5.7. Los tubos fueron sonicados en un equipo L&R PC3 (Kearny, NJ) a temperatura ambiente durante dos horas y luego centrifugados a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante de cada frasco fue transferido a un tubo de vidrio de 32 mL, pudiéndose recuperar aproximadamente 8 mL en total. Luego se agregaron 20 mL del buffer de fosfato 20 mM a pH 5.7 mientras se agitaba suavemente para precipitar los componentes más hidrofóbicos presentes en la muestra. La mezcla fue centrifugada durante otros 20 min a 3000 rpm para decantar los insolubles. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de 0.45 µm, obteniéndose unos 18 mL. Esta solución, que llamamos solución A, fue concentrada con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) por el siguiente procedimiento: un cartucho de C18 (500 mg, Agilent Technologies, Wilmington, DE) fue acondicionado con 3 mL de metanol y luego 3 mL de solución agua-metanol (90:10). Luego del acondicionado, se transfirieron los 18 mL de la solución A en el cartucho. El filtrado, que llamaremos solución B, fue colectado. Una vez que toda la solución A pasó a través del cartucho, se agregó 1 mL de solución acetonitrilo-buffer fosfato 20 mM pH 5.7 (50:50) para recuperar compuestos retenidos en el cartucho. La solución recuperada es la solución C. Un cartucho de carbono de 500 mg, SimpleQ de Agilent fue acondicionado con el mismo procedimiento que al cartucho de C18. Luego la solución B fue cargada en este cartucho y se pasaron 3 mL de tetrahidrofurano. Esta solución fue recolectada en un tubo de vidrio de 20 mL y luego evaporada hasta sequedad con nitrógeno, resultando un precipitado amarillento en el fondo del tubo. Finalmente la

solución C fue transferida a este mismo tubo y luego sonicada por unos 10 min hasta que todo el precipitado amarillo se disolviera. La solución final resultante, de aproximadamente 1 mL, fue almacenada en el freezer hasta ser analizada.

### **2.1.3 Instrumentación**

Primera Dimensión. Las separaciones de una dimensión convencionales fueron realizadas en un equipo Agilent 1100 controlado por el software Chemstation versión B.01.03 (Agilent Technologies; Wilmington, DE). Este instrumento estaba equipado con una bomba binaria capilar modelo G1376A, un auto inyector modelo G1329A, un compartimiento de columna modelo G1316B y un detector UV modelo G1314A equipado con una micro-celda de 1.0  $\mu$ L. El detector fue configurado para adquirir la señal a una longitud de onda de 220 nm. Las separaciones en fase reversa fueron realizadas empleando columnas Discovery HS-F5 (Supelco, Bellefonte, PA, 2.1 mm de diámetro interno, con partículas de 5  $\mu$ m) utilizando elución en gradiente. La fase móvil en el canal A fue buffer de fosfato 20 mM de pH 5.7. La fase móvil en el canal B fue acetonitrilo. Los parámetros utilizados, incluyendo longitud de columna, caudal y composición final de la fase móvil, fueron optimizados simultáneamente utilizando la función Solver de Microsoft Excel con las siguientes restricciones: la presión máxima del sistema fue limitada a 400 bar. La composición inicial de la fase móvil fue fijada en 100% A. La longitud máxima de la columna se limitó a 50 cm y el diámetro interno fue fijo y de 2.1 mm. El caudal estuvo limitado a un rango de 0.1 a 5 mL/min. La composición final del modificador orgánico podía variar entre el 10 y 100 % v/v. Los parámetros “óptimos” fueron los que maximizaron la capacidad de picos para un tiempo de gradiente determinado. Los parámetros así obtenidos y la capacidad de picos reportada por este procedimiento de optimización, como así también los valores obtenidos experimentalmente, se muestran en la tabla 2.1.1.

Tabla 2.1.1 Parámetros experimentales y capacidades de picos para la cromatografía de una dimensión completamente optimizada

$t_g$ (min) <sup>a</sup>	5	12	24	52
L (cm) <sup>b</sup>	20	30	40	50
F (mL/min) <sup>c</sup>	1.1	0.65	0.45	0.35
$\phi_i$ <sup>d</sup>	0	0	0	0
$\phi_f$ <sup>e</sup>	0.7	0.6	0.5	0.38
$n_{c, \text{ medida}}$ <sup>f</sup>	100	135	150	163
$n_{c, \text{ pred}}$ <sup>g</sup>	111	137	151	162

<sup>a</sup> Tiempo de gradiente

<sup>b</sup> Longitud de columna

<sup>c</sup> Caudal

<sup>d</sup> Composición inicial del gradiente

<sup>e</sup> Composición final del gradiente

<sup>f</sup> Capacidad de picos experimental, medida utilizando el ancho de pico promedio de la mezcla patrón en las condiciones descritas en esta tabla y obtenida según la ecuación 2.1.1

<sup>g</sup> Capacidad de picos obtenida por el procedimiento de optimización. La temperatura fue 40 °C. Presión máxima de 400 bar. Solvente A: buffer de fosfato 20 mM a pH = 5.7. Solvente B: acetonitrilo.

El volumen de demora del gradiente fue medido de acuerdo al procedimiento descrito por Snyder y Dolan (17) y resultó ser de 1.0 mL. Se programó una inyección demorada para asegurar que ningún pico eluyera antes del comienzo del gradiente.

Equipo bi-dimensional – Primera Dimensión. La configuración básica del sistema de LC×LC en línea utilizado en este trabajo se muestra en la figura 2.1.1.

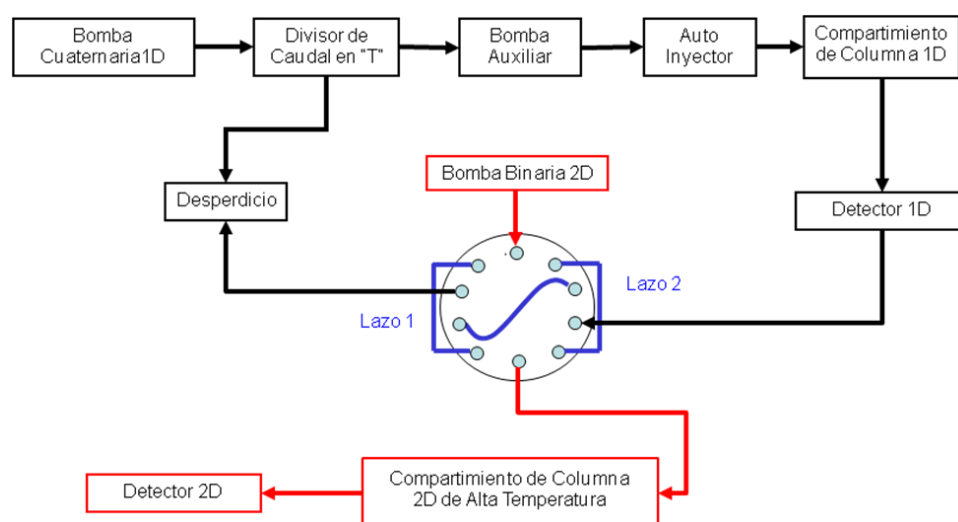


Figura 2.1.1 Diagrama de bloques del equipo bi-dimensional. El trazo en negro corresponde al flujo del caudal de la primera dimensión. El trazo en rojo corresponde al flujo del caudal de la segunda dimensión.

La primera dimensión utilizó una bomba cuaternaria de Agilent series 1100 modelo G1311A, siendo el resto de los componentes los mismos descritos anteriormente para la separación HPLC convencional, incluyendo las fases móviles, columnas y componentes instrumentales. La principal diferencia radica en el caudal de la primera dimensión en el equipo LC×LC en línea, que fue fijado a 0.1 mL/min. Esto fue logrado usando un divisor de caudal en “T” de acero inoxidable, ajustando la longitud y diámetro interno de los tubos capilares de salida para lograr una relación 10:1 (10 de entrada: 1 hacia la columna). La salida del detector de la



primera dimensión fue conectada a la válvula de 10 puertos (VICI CHEMINERT 09v-0233H, Valco Instruments, Houston, TX, USA) como se muestra en la figura 2.1.1. Esta válvula fue accionada de forma neumática utilizando helio a 50 psi. Los lazos que se utilizaron para coleccionar la muestra en todos los experimentos (lazo 1 and lazo 2 en la figura 2.1.1) fueron armados con 35 cm de tubo PEEK de 0.02 pulgadas de diámetro interno; el volumen de cada uno correspondiente a 70  $\mu$ L. La configuración de la válvula mostrada en la figura 2.1.1 corresponde al modo FILO (del inglés “*first in-last out*” ó “primero en entrar-último en salir”). La primera dimensión fue optimizada ajustando la longitud de la columna y la composición final del modificador orgánico mientras el caudal fue fijado en 100  $\mu$ L/min en acuerdo con experimentos previos publicados por el grupo de Carr (18, 19). En este estudio todos los experimentos fueron realizados utilizando una configuración en la válvula de 10 puertos tipo FILO, excepto cuando se especifique haber cambiado a configuración al tipo FIFO (del inglés “*first in-first out*” ó “primero en entrar-primero en salir”). Los parámetros experimentales y capacidad de picos medidos para la primera dimensión de la separación LCxLC en línea se muestran en la tabla 2.1.2.

Tabla 2.1.2 Parámetros experimentales utilizados en las separaciones LC×LC en línea y capacidades de picos experimentales de la primera dimensión

	Primera dimensión					Segunda dimensión			
${}^1t_g^a$ (min)	5	12	24	49	${}^2t_g^g$ (s)	3	9	18	37
L (cm) <sup>b</sup>	5	10	10	20	L (cm) <sup>h</sup>	3.3	3.3	3.3	3.3
F (mL/min)	0.1	0.1	0.1	0.1	F (mL/min)	3.0	3.0	3.0	3.0
$\phi_i^c$	0	0	0	0	$\phi_i^i$	0	0	0	0
$\phi_f^d$	0.65	0.6	0.5	0.45	$\phi_f^j$	1.0	1.0	1.0	0.7
${}^1w$ (min) <sup>e</sup>	0.183	0.207	0.310	0.524					
${}^1n_c^f$	27	58	78	94					

<sup>a</sup> Tiempo de gradiente de la primera dimensión.

<sup>b</sup> Longitud de columna de la primera dimensión.

<sup>c</sup> Composición inicial del gradiente en la primera dimensión.

<sup>d</sup> Composición final del gradiente en la primera dimensión.

<sup>e</sup> Promedio del ancho de picos de la primera dimensión basados en las medidas experimentales de los patrones utilizados en las condiciones indicadas en esta tabla.

<sup>f</sup> Capacidad de picos de la primera dimensión calculada según la ecuación 2.1.2.

<sup>g</sup> Tiempo de gradiente de la segunda dimensión.

<sup>h</sup> Longitud de columna de la segunda dimensión.

<sup>i</sup> Composición inicial del gradiente en la segunda dimensión.

<sup>j</sup> Composición final del gradiente en la segunda dimensión.

Para la primera dimensión, el solvente A fue buffer de fosfato 20 mM a pH = 5.7. El solvente B fue acetonitrilo. Temperatura 40 °C. Columna Discovery HS-F5 2.1 mm de diámetro interno y partículas de 5 µm. Para la segunda dimensión, el solvente A fue ácido fosfórico 10 mM. El solvente B fue acetonitrilo. Temperatura de 110 °C. Columna ZirChrom-CARB (8 % p/p de carbono), 2.1 mm de diámetro interno y partículas de 3 µm.

Equipo bi-dimensional – Segunda Dimensión. Para la segunda dimensión se utilizó una bomba binaria Agilent 1100 modelo G1312A modificada como se describe en la sección 3.3. Los parámetros experimentales se muestran en la tabla 2.1.2. La fase móvil en el canal A fue ácido fosfórico 10 mM en agua, mientras que en el canal B se utilizó acetonitrilo. Ambos solventes de grado cromatográfico.

Se realizaron diferentes experimentos, utilizando distintos tiempos de gradiente de 3, 9, 18 y 37 s, con un tiempo de re-equilibrio de 3 s en todos los casos. El detector fue de arreglo de diodos (DAD) modelo G1315C SL también de Agilent, utilizando una frecuencia de muestreo de 80 Hz. Todos los datos reportados en este trabajo corresponden a la señal adquirida a 220 nm. Los distintos componentes del sistema LCxLC en línea, incluyendo la primera dimensión, la válvula de 10 puertos, la bomba y el detector de la segunda dimensión, fueron coordinados y controlados con el software LabVIEW 7.0 a través de una placa controladora PCI 6024E (National Instruments Inc., Austin, TX), utilizando un programa desarrollado en el laboratorio. La separación en la segunda dimensión fue realizada con columnas de 33 x 2.1 mm rellenas con partículas de 3.0  $\mu\text{m}$  de óxido de zirconio recubiertas con carbono de tipo grafitico. Estas partículas contenían un 8 % p/p de carbono (ZirChrom-CARB, ZirChrom Separations, Inc. Anoka, MN, USA). La temperatura de la columna fue mantenida a  $110\pm 0.1$  °C con un sistema de termostatación para alta temperatura fabricado por Systec Inc. (New Brighton, MN, USA). Utilizando un caudal de 3.0 mL/min, la presión máxima durante el gradiente fue en general algo menor a 350 bar.

La razón de utilizar columnas angostas en la segunda dimensión, fue para minimizar el problema de ensanchamiento de banda causado por el gradiente de temperatura radial generado por auto-calentamiento. Adicionalmente, con estas columnas se logra aumentar la sensibilidad en la detección como también un pequeño volumen de re-equilibrado. La

combinación de un caudal muy elevado y un pequeño volumen de re-equilibrio del sistema, redundan en un tiempo muy corto de re-equilibrio, permitiendo utilizar una mayor fracción del tiempo de ciclo de la segunda dimensión en el gradiente. El gradiente comenzó en 100 % de la fase móvil acuosa en todos los casos. La composición final del modificador orgánico a cada tiempo de gradiente, fue ajustada para poder distribuir los componentes en todo el gradiente. Los parámetros experimentales de ambas dimensiones para todo el experimento se muestran en la tabla 2.1.2, salvo aquellos explícitamente indicados en el texto.

#### **2.1.4 Cálculo de la capacidad de picos**

Para 1DLC y LC×LC en línea. La capacidad de picos de la separación con elución en gradiente de una dimensión fue estimada utilizando la ecuación 2.1.1. Ya que en todos los casos se utilizó inyección demorada y el primer compuesto de la muestra de maíz en eluir se observó a la suma del tiempo muerto y del tiempo de demora,  $t_{R,prim}$  en la ecuación 2.1.1 fue utilizado como la suma del tiempo muerto y el tiempo de demora del gradiente ( $t_m + t_d$ ). Adicionalmente, las condiciones fueron optimizadas de modo que el último pico (indol-3-acetonitrilo) en el estándar de indoles, eluyera cerca del final del gradiente. De este modo,  $t_{R,ult}$  fue utilizado como  $t_m + t_d + t_g$ . El ancho de pico en la ecuación 2.1.1 fue tomado como el promedio del ancho en la base (estimado como  $4\sigma$ ) de los seis compuestos en el estándar.

La capacidad de picos efectiva en LC×LC en línea, para cada combinación específica de gradientes de la primera y segunda dimensión, fueron calculadas utilizando la ecuación 2.1.5. En los experimentos, la capacidad de picos de la primera dimensión en la ecuación 2.1.5 fue medido de la misma forma que en el caso de la separación de una dimensión optimizada. La mezcla estándar fue inyectada en la columna utilizada en la primera dimensión y separada bajo las mismas condiciones relevantes y el ancho de pico promedio fue luego calculado de la misma forma anteriormente explicada. La capacidad de picos de la segunda dimensión fue

calculada en base al promedio del ancho de pico de unos 10-20 picos representativos, bien formados, de la muestra de maíz en la separación LC×LC en línea para los correspondientes tiempos de gradiente de la primera y segunda dimensión. Estos picos en la segunda dimensión fueron cuidadosamente elegidos para evitar picos ensanchados por sobrecarga local de muestra, interacciones específicas entre la columna y el analito y picos no resueltos. El valor de  ${}^2n_c$  fue entonces calculado como el cociente entre el tiempo de gradiente y el promedio del ancho de los picos en la base, de la separación de la segunda dimensión. Una vez obtenidos  ${}^1n_c$  y  ${}^2n_c$ , el valor de la capacidad de picos bi-dimensional efectiva fue obtenida de la ecuación 2.1.5.

El valor de  $f_{\text{cober}}$  fue medido de la fracción del espacio de separación ocupado por los picos de la muestra de maíz para cada condición. El procedimiento consiste en trazar una cuadrícula en el espacio representado por la separación bi-dimensional definiendo un límite divisor entre los cuadrados ocupados por picos de la muestra y cuadrados libres. Finalmente,  $f_{\text{cober}}$  queda establecido por la fracción de cuadrados contenidos dentro del límite divisor respecto al total de cuadrados como se muestra en la figura 2.1.2.

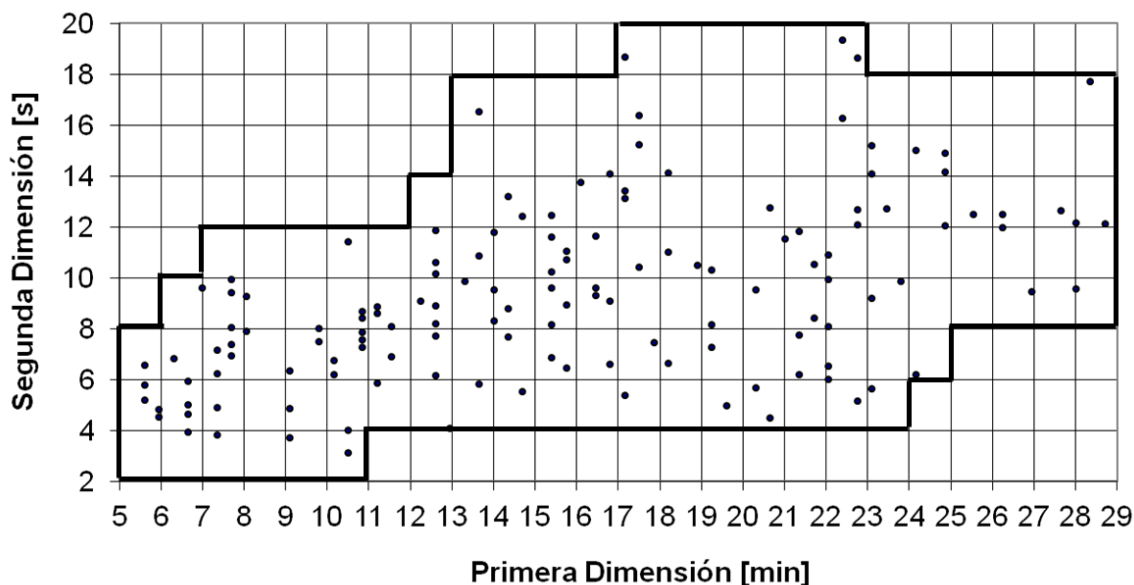


Figura 2.1.2 Fracción del espacio bi-dimensional utilizado durante la separación, necesaria para calcular el factor de cobertura utilizado en la ecuación 2.1.5.

Para los experimentos de LC×LC en línea con tiempos de gradiente en la primera dimensión de 5 min, 12 min y 24 min, el tamaño de la grilla fue tomado como 1 min, mientras que para un gradiente de 49 min se dividió la grilla cada 2 min. Para tiempos de ciclo de 6 s, 12 s, 21 s y 40 s, el tamaño de la grilla de la segunda dimensión fue tomado como 0.5 s, 1 s, 2 s y 4 s respectivamente. Lamentablemente,  $f_{\text{cober}}$  es muy dependiente del tamaño de la grilla utilizada. Información más detallada sobre la estimación de  $f_{\text{cober}}$  puede encontrarse en las referencias (8, 16).

### 2.1.5 Recuento de picos en la muestra de maíz

El número de picos presentes en la muestra de maíz fue determinado por inspección visual de los cromatogramas de la segunda dimensión, utilizando los criterios que se describen a continuación. Primero, el criterio de unimodalidad establece que en una serie de picos, con el mismo tiempo de retención en la segunda dimensión, una vez encontrado un pico de máxima

intensidad, otro pico en un cromatograma subsiguiente de mayor intensidad será parte de un nuevo pico. Segundo, una vez localizado un máximo, éste debe ser el mayor valor de los 8 puntos a su alrededor. Este procedimiento fue realizado con un simple programa hecho en Matlab. Tercero, Cuando la válvula de 10 puertos fue conectada en modo FILO, se observaron variaciones sistemáticas en el tiempo de retención en la segunda dimensión como se muestra en la figura 2.1.3.

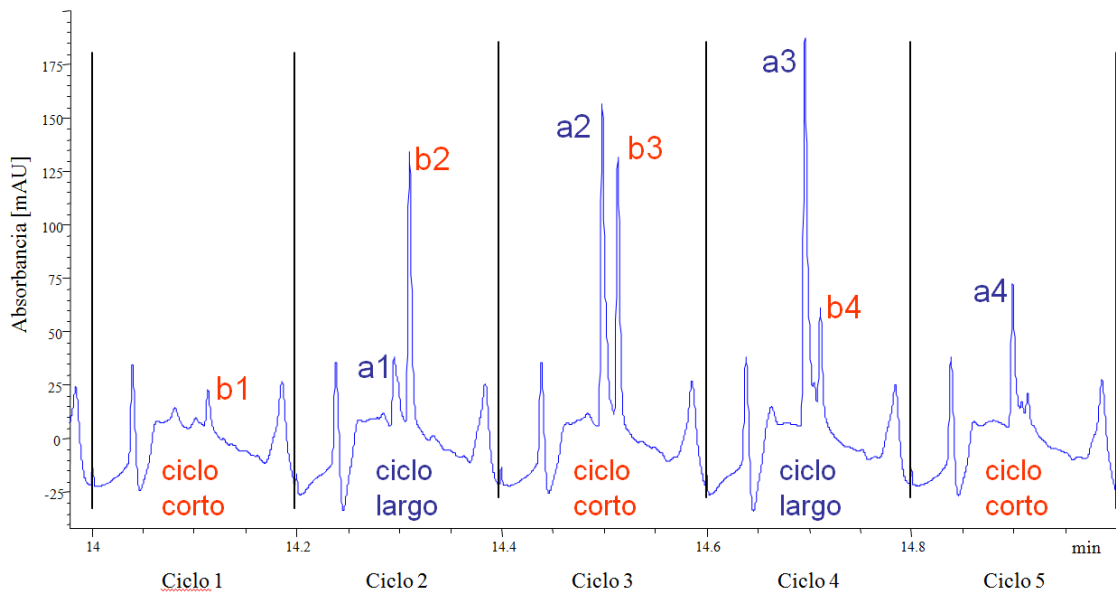


Figura 2.1.3 Ejemplo para interpretación del efecto generado por la configuración de la válvula de 10 puertos en el modo FILO.

Este efecto no fue observado cuando la válvula de 10 puertos fue conectada en modo FIFO. Dado la naturaleza alternante del patrón de variación, fue simple de reconocer los picos sin afectar el recuento. Para confirmar que el hecho de utilizar configuración FILO ó FILO no afectara las conclusiones, se realizaron experimentos utilizando las mismas condiciones y solo variando la configuración de la válvula; el recuento de picos en ambos casos fue aceptablemente similar.

## 2.1.6 Resultados y Discusión

### 2.1.6.1 Efecto del tiempo de muestreo y tiempo de gradiente de la primera dimensión en la capacidad de picos bi-dimensional corregida

Podemos observar la representación de la capacidad de picos bi-dimensional corregida respecto al tiempo de muestreo en la figura 2.1.4.

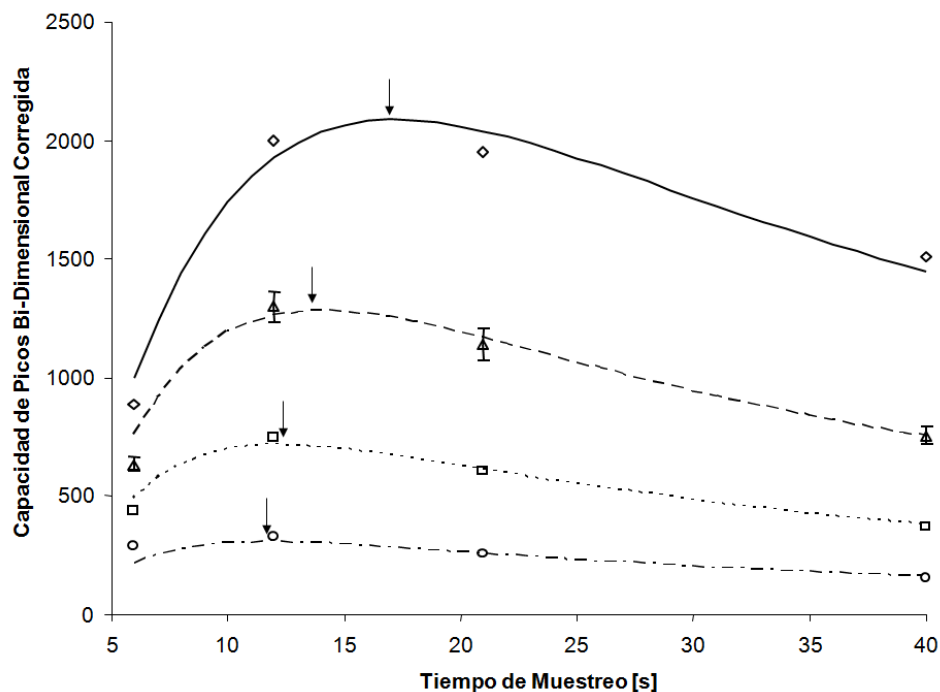


Figura 2.1.4 Representación de la capacidad de picos bi-dimensional corregida vs. el tiempo de ciclo. La curva representada es el ajuste de los puntos obtenidos experimentalmente a la ecuación 2.1.6 utilizando el valor promedio de las capacidades de picos de la segunda dimensión medidos a tiempos de ciclo de 6, 12, 21 y 40 s. Los tiempos de gradiente de la primera dimensión para las distintas curvas desde abajo hacia arriba son 5 min (línea de guiones y puntos); 12 min (línea de puntos), 24 min (línea de guiones), 49 min (línea continua). Las flechas indican el máximo de la capacidad de picos bi-dimensional corregida. Los símbolos representan los valores experimentales obtenidos para la capacidad de picos bi-dimensional corregida para cada tiempo de gradiente de la primera dimensión y corresponden a 5 min (○), 12 min (□), 24 min (△) y 49 min (◇).



Los valores de capacidad de picos fueron corregidos por el efecto de sub-muestreo utilizando la ecuación 2.1.4. Los valores de  $^1n_c$  medidos y los correspondientes anchos de picos utilizados en los cálculos se muestran en la tabla 2.1.3.

Tabla 2.1.3 Comparación de LC×LC en línea con 1DLC optimizada en términos de capacidad de picos y con el número de picos observados en la muestra real de maíz

$^1t_g$ (min) <sup>a</sup>	$t_c$ (s) <sup>b</sup>	$^1n_c$ <sup>c</sup>	$\langle\beta\rangle$ <sup>d</sup>	$^2n_c$ <sup>e</sup>	$f_{cober}$ <sup>f</sup>	$n_{c,2D}^*$ <sup>g</sup>	$P_{1D}$ <sup>h</sup>	$P_{2D}/P_{1D}$ <sup>i</sup>	$n_{c,2D}^*/n_{c,1D}$ <sup>j</sup>
5	6	27	1.404	11	0.30	63	40	0.32	0.63
	12	27	2.210	27	0.45	149	40	0.80	1.5
	21	27	3.590	34	0.45	116	40	0.80	1.2
	40	27	6.643	38	0.51	79	40	0.75	0.79
12	6	58	1.337	10	0.25	108	60	0.41	0.80
	12	58	2.036	26	0.51	384	60	1.1	2.8
	21	58	3.261	34	0.54	325	60	1.2	2.4
	40	58	5.996	38	0.51	187	60	0.92	1.4
24	6	78	1.162	10	0.35	236	88	0.42	1.6
	12	78	1.550	26	0.58	754	88	1.4	5.0
	21	78	2.301	34	0.67	769	88	1.6	5.1
	40	78	4.072	40	0.56	430	88	1.2	2.9
49	6	94	1.060	10	0.31	276	100	0.60	1.7
	12	94	1.221	26	0.53	1054	100	1.7	6.5
	21	94	1.582	33	0.59	1146	100	1.9	7.1
	40	94	2.540	41	0.48	732	100	1.5	4.5

<sup>a</sup> Tiempo de gradiente de la primera dimensión para LC×LC en línea o para 1DLC optimizada.

<sup>b</sup> Tiempo de ciclo

<sup>c</sup> Capacidad de picos de la primera dimensión.

<sup>d</sup> Factor de sub-muestreo de la primera dimensión calculado según la ecuación 2.1.3 utilizando  $t_g$  y el promedio de ancho de pico de la primera dimensión de la tabla 2.1.2.

<sup>e</sup> Capacidad de picos de la segunda dimensión calculado utilizando el ancho de pico promedio de la muestra de maíz en la separación LC×LC en línea.

<sup>f</sup> Factor de cobertura.

<sup>g</sup> Capacidad de picos efectiva calculada según la ecuación 2.1.5.

<sup>h</sup> Número de picos observados en el extracto de maíz de la separación 1DLC optimizada.

<sup>i</sup> Relación del número de picos observados en el extracto de maíz separados por LC×LC en línea a picos observados en la separación 1DLC optimizada.

<sup>j</sup> Relación de capacidad de picos bi-dimensional efectiva a la capacidad de picos medida en separación 1DLC optimizada (de la tabla 2.1.1).

Las capacidades de picos de la segunda dimensión a diferentes tiempos de muestreo fueron calculadas utilizando la ecuación 2.1.7:

$${}^2n_c = {}^2n_{c,\text{lim}} \times (1 - \exp(-\Theta \times {}^2t_g))$$

donde  ${}^2n_{c,\text{lim}}$  es el valor límite de la capacidad de picos para tiempos de gradiente largos utilizando una columna de longitud fija y  $\Theta$  representa qué tan rápido  ${}^2n_c$  se aproxima al valor límite (20). Los valores de  ${}^2n_{c,\text{lim}}$  y de  $\Theta$  utilizados en la ecuación anterior fueron obtenidos ajustando la función al promedio de los valores experimentales de la capacidad de picos de la segunda dimensión, como función del tiempo de muestreo. La función de ajuste utilizada fue elegida basándonos en la experiencia de trabajos anteriores con patrones de alquilfenonas y péptidos, donde se muestra un ajuste razonable a esta función (16, 20). Sin embargo, la forma de esta ecuación es meramente empírica y no posee un fundamento teórico.

La figura 2.1.4 muestra claramente que el máximo de la capacidad de picos bi-dimensional corregida fue siempre obtenido para valores de tiempo de muestreo intermedios.

La existencia de un valor óptimo para el tiempo de muestreo es consistente con las predicciones teóricas previas y puede ser explicado por la ecuación 2.1.5. De acuerdo a esta ecuación, incrementando el tiempo de muestreo aumenta el sub-muestreo, lo que disminuye la capacidad de picos bi-dimensional. Sin embargo, aumentar el tiempo de muestreo implica un aumento en la capacidad de picos de la segunda dimensión, lo cual aumenta la capacidad de picos bi-dimensional. La relación de compromiso entre estos dos efectos resulta en un valor óptimo del tiempo de muestreo que maximiza la capacidad de picos bi-dimensional. Adicionalmente, como se muestra con las flechas en la figura, cuando los tiempos de gradiente de la primera dimensión son más cortos que 12 min, el tiempo de muestreo óptimo es de aproximadamente 12 s. A medida que se incrementa el tiempo de gradiente, el máximo se va desplazando hacia mayores tiempos de muestreo. Esta tendencia es consistente con la

ecuación 2.1.6 y de acuerdo con esto, en condiciones de sub-muestreo severo, la máxima capacidad de picos bi-dimensional corregida se obtendrá al tiempo de muestreo óptimo, que corresponderá al máximo de la capacidad de producción de picos por unidad de tiempo de la segunda dimensión. También podemos observar que en función de la ecuación 2.1.6, la capacidad de picos bi-dimensional corregida debería incrementarse de forma lineal con el tiempo de gradiente de la primera dimensión. Esto se observa claramente en la figura 2.1.5.

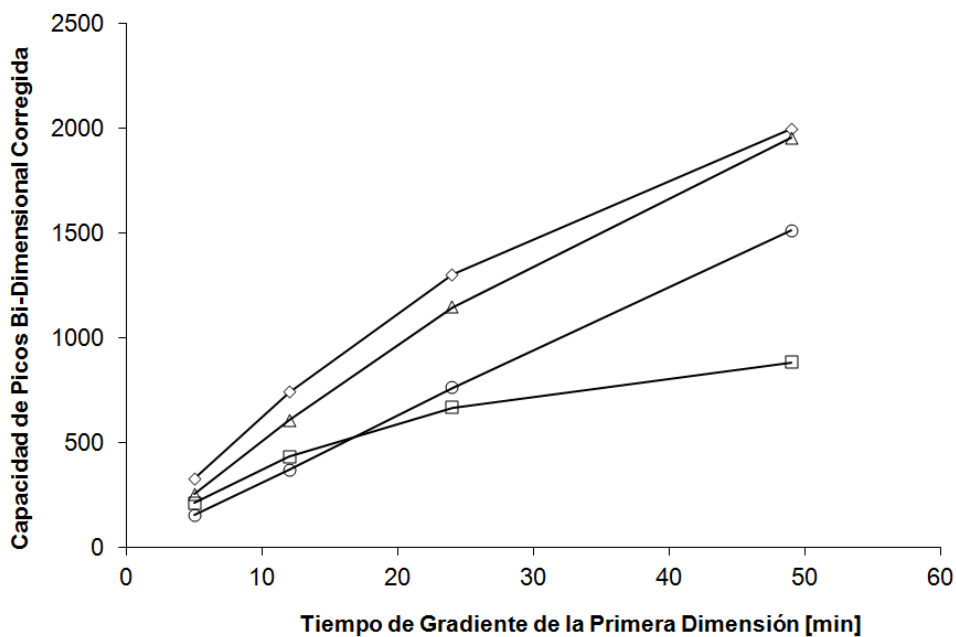


Figura 2.1.5 Representación de la capacidad de picos bi-dimensional corregida vs. el tiempo de gradiente de la primera dimensión. Los símbolos corresponden a tiempos de ciclo de la segunda dimensión de 6 s ( $\square$ ), 12 s ( $\diamond$ ), 21 s ( $\Delta$ ) y 40 s ( $\circ$ ); los tiempos de gradiente de la primera dimensión corresponden a 5 min, 12 min, 24 min y 49 min.

El gráfico también sugiere que la dependencia de la capacidad de picos corregida, respecto al tiempo de gradiente de la primera dimensión, se hace progresivamente más lineal para tiempos de ciclo mayores a 12 s. Esto es porque mientras el incremento en el tiempo de muestreo incrementa el efecto de sub-muestreo, el incremento en la capacidad de picos bi-dimensional corregida se hace lineal con respecto al tiempo de gradiente de la primera dimensión, como se puede observar claramente en la figura 2.1.5 y a través de la ecuación 2.1.6.

### **2.1.6.2 Comparación experimental entre cromatografía de una dimensión y bi-dimensional**

Podemos ver en la figura 2.1.5 que la máxima capacidad de picos bi-dimensional corregida que se puede obtener en un tiempo de análisis de 1 hora es aproximadamente 2000. Sin embargo, tan elevada capacidad de picos asume que el factor  $f_{\text{cober}}$  vale 1 en LC×LC en línea. Esto equivale a decir que el espacio de separación bi-dimensional es completamente utilizado, lo cual es imposible en separaciones bi-dimensionales (4).

Los resultados típicos que se obtienen de  $f_{\text{cober}}$  en separaciones bi-dimensionales de analitos en muestras de maíz, muestran valores de entre 0.5 y 0.7. Es decir, un 50-70 % del valor de la capacidad de picos bi-dimensional efectiva mostrados en la figura 2.1.5. Por lo tanto, para una comparación justa entre cromatografía de una dimensión y bi-dimensional, se debe tener en cuenta cómo es utilizado el espacio de separación en cada caso. La figura 2.1.6 muestra cromatogramas de la muestra de maíz en condiciones completamente optimizadas de cromatografía de una dimensión.

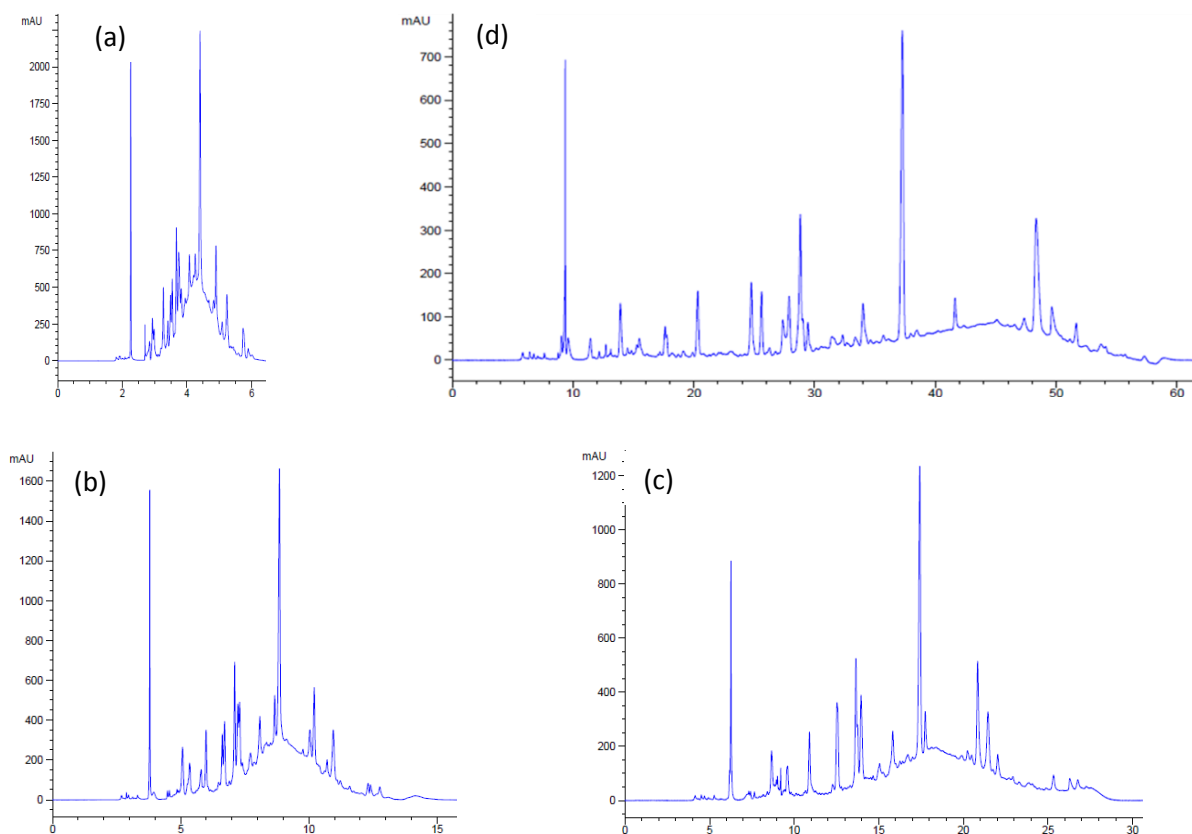


Figura 2.1.6 Cromatogramas de la muestra de maíz para la cromatografía de una dimensión convencional. En todos los casos se puede observar la completa utilización del espacio de separación. Las distintas figuras corresponden a tiempos de gradiente de (a) 5 min, (b) 12 min (c) 24 min y (d) 52 min en condiciones completamente optimizadas. Ver condiciones en la tabla 2.1.1.

Todos estos cromatogramas muestran que los picos están distribuidos sobre toda la ventana del gradiente. De hecho, se pueden observar conglomerados de picos no resueltos que forman una “montaña”. Basados en esta observación podemos decir que en el caso de cromatografía de una dimensión optimizada, prácticamente todo el espacio de separación está siendo utilizado, correspondiendo un valor unitario para  $f_{\text{cober}}$ .

Algunos ejemplos representativos de la separación LC×LC en línea de la muestra de maíz a distintos tiempos de gradiente para la primera dimensión y un tiempo de ciclo de 21 s en la segunda dimensión se muestran en la figura 2.1.7.

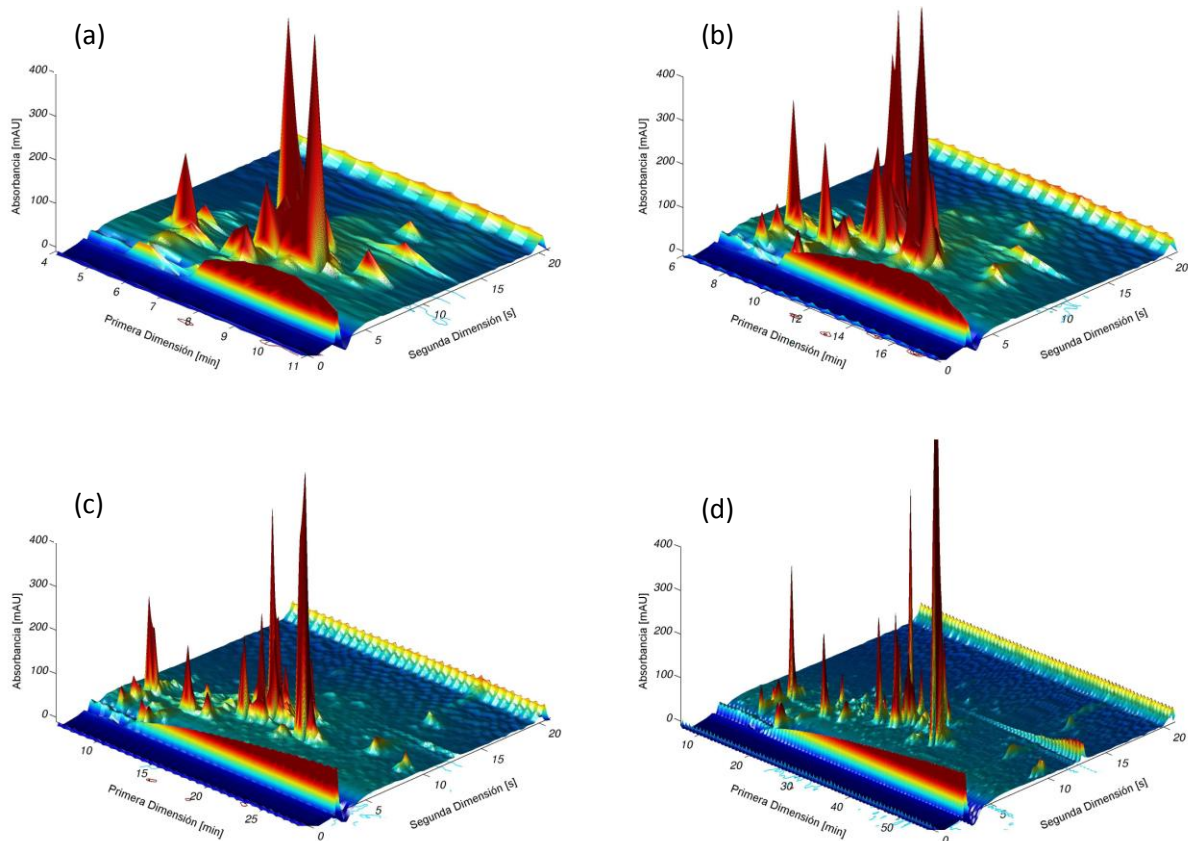


Figura 2.1.7 Representación gráfica en 3D de los cromatogramas bi-dimensionales utilizando un tiempo de ciclo de 21 s para la segunda dimensión y tiempos de gradiente de la primera dimensión de (a) 5 min, (b) 12 min, (c) 24 min y (d) 49 min. Parámetros experimentales indicados en la tabla 2.1.2.

Estas figuras muestran claramente que en LC×LC en línea, el espacio de separación es solo ocupado de forma parcial. Por esta razón, para la comparación se hizo el recuento de picos utilizando el procedimiento anteriormente explicado, y se calculó  $f_{\text{cober}}$  en cada caso. Luego se utilizó ese valor para calcular la capacidad de picos bi-dimensional efectiva. Finalmente la capacidad de picos de la separación de una dimensión optimizada y la capacidad de picos bi-dimensional efectiva fueron graficadas respecto al tiempo de gradiente; éstos resultados se muestran en la figura 2.1.8.

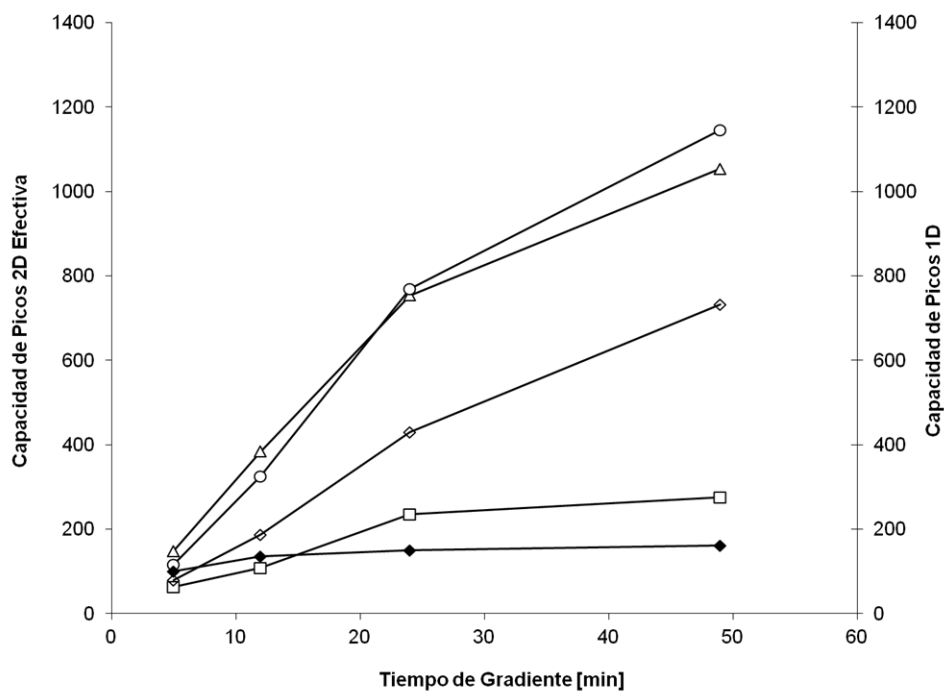


Figura 2.1.8 Comparación de la capacidad de picos bi-dimensional efectiva (eje izquierdo) y capacidad de picos de la cromatografía 1DLC optimizada (eje derecho) vs. el tiempo de gradiente. Los tiempos de gradiente de la primera dimensión utilizados en todos los casos corresponden a 5 min, 12 min, 24 min y 49 min. Los símbolos representan, para el caso de los experimentos bi-dimensionales (eje izquierdo), tiempos de ciclo de la segunda dimensión de 6 s ( $\square$ ), 12 s ( $\circ$ ), 21 s ( $\Delta$ ) y 40 s ( $\diamond$ ). El símbolo ( $\blacklozenge$ ) corresponde a la capacidad de picos de la cromatografía 1DLC optimizada (eje derecho).

Esto nos permite comparar de forma crítica ambas técnicas utilizando el mismo tiempo para la separación. Es importante notar en la figura que la intersección entre la curva correspondiente a la separación de una dimensión y las curvas de la separación bi-dimensional ocurre aproximadamente entre los 5 y 10 min. En el caso de la separación bi-dimensional con un tiempo de gradiente en la primera dimensión de 5 min, el poder de separación es ligeramente superior a la separación de una dimensión, cuando se utilizan tiempos de ciclo de 12 o 21 s. Cuando el tiempo de ciclo se incrementa a 40 s, la intersección se produce alrededor de los 7 min. El mayor tiempo de intersección se produce cuando el tiempo de muestreo es de 6 s y ocurre a aproximadamente a 15 min. Si bien a primera vista parece no intuitivo, ya que una mayor frecuencia de muestreo debe reducir el efecto de sub-muestreo, la capacidad de picos de la segunda dimensión decae muy drásticamente. Finalmente, con el incremento del tiempo de gradiente de la primera dimensión, el poder de separación aumenta más para la separación bi-dimensional que para la separación de una dimensión. De acuerdo a esta figura, incluso utilizando ambos factores de corrección (sub-muestreo y  $f_{\text{cober}}$ ), se pueden lograr incrementos en la capacidad de picos de hasta 7 veces utilizando LC×LC en línea respecto a la separación de una dimensión. Estos resultados son consistentes con otras publicaciones y con cálculos recientes (5, 16, 21).

La cantidad de picos observados en cromatografía de una dimensión y en LC×LC en línea se muestran en la figura 2.1.9.



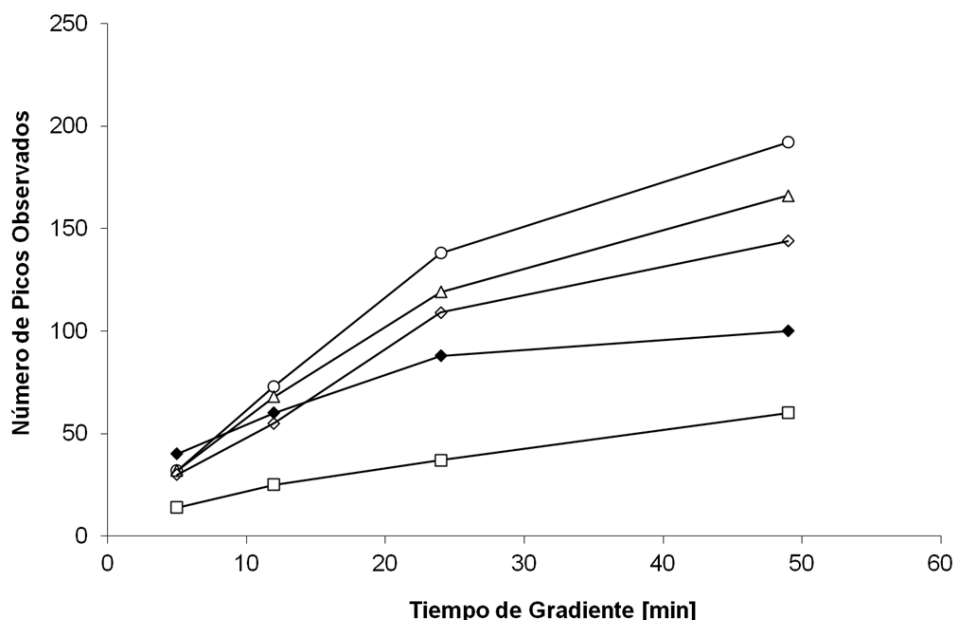


Figura 2.1.9 Representación del número de picos observados en los experimentos bi-dimensionales y en la cromatografía 1DLC optimizada para la muestra de maíz vs. el tiempo de gradiente de la primera dimensión. Los tiempos de gradiente y símbolos utilizados son los mismos que en la figura 2.1.8.

En el eje de abscisas se representa el tiempo de gradiente y en las ordenadas el número de picos encontrados. Una comparación entre estos dos métodos basada en el número de picos observados es problemática, ya que si bien uno espera una relación similar a la dictada por la capacidad de picos, hay que tener en cuenta que utilizar una segunda dimensión implica un proceso de dilución de la muestra como se discute más adelante. También, el hecho de que la línea de base es mucho más irregular en la segunda dimensión, hace que sea más difícil detectar los picos lo cual es un problema importante en la técnica y se discute con más detalle en el capítulo V.

La comparación del poder de resolución de ambas técnicas fue realizada con los instrumentos disponibles en el laboratorio. En el caso de haber utilizado un sistema de alta presión (UHPLC) para la separación de una dimensión, se hubieran obtenido valores mayores para el

poder de resolución. Sin embargo, cálculos de optimización basados en una mezcla estándar sobre doce derivados de índoles, a una temperatura de trabajo de 40 °C, con partículas de 5 µm y tiempo de gradiente fijo en 60 min, optimizando completamente la longitud de la columna, el caudal y la composición final del gradiente, mostraron solo un 28 % de incremento en la capacidad de picos cuando la presión máxima aumentó de 400 a 1200 bar. Por lo tanto, utilizando un sistema UHPLC no hubiera cambiado mayormente nuestras conclusiones. Incluso, si el mismo criterio es aplicado a la segunda dimensión, elevando la presión, también se podría esperar un cierto incremento en la capacidad de picos, pero por limitaciones principalmente en la válvula de 10 puertos utilizada, la presión se tuvo que mantener por debajo de los 400 bar.

### **2.1.7 Conclusiones del estudio**

En esta parte del trabajo se estudió experimentalmente el efecto del tiempo de muestreo en el poder de resolución de LC×LC en línea y se lo comparó con cromatografía líquida de una dimensión en términos de la capacidad de picos efectiva y del número de picos observados en una muestra compleja de maíz concluyendo que:

El tiempo de muestreo tiene un gran impacto en LC×LC en línea, siendo máxima la capacidad de picos bi-dimensional corregida para tiempos de muestreo entre 12 y 21 s. Esto es consistente con estudios teóricos previos.

El tiempo de gradiente para el cual se cruzan las curvas de capacidad de picos efectiva de ambas técnicas, se encuentra aproximadamente entre 5 y 7 min cuando se utilizan tiempos de muestreo en el rango de 12 y 21 s.

El poder de resolución en LC×LC en línea puede ser incrementado radicalmente aumentando el tiempo de gradiente de la primera dimensión. Para el tiempo de gradiente más largo

utilizado en este experimento (49 min), el incremento es de 7 veces en la capacidad de picos efectiva y casi el doble en el número de picos observados respecto a la cromatografía de una dimensión.

El factor de cubrimiento es muy importante para tener en cuenta el poder efectivo de la separación bi-dimensional y decrece para tiempos de muestreo muy cortos.

## **2.2 Incrementando la capacidad de picos en LCxLC rápida utilizando división de caudal después de la primera dimensión**

### **2.2.1 Introducción**

Desde su introducción en 1991, el uso de divisores de caudales como parte del dispositivo modulador entre la primera y la segunda dimensión fue bastante común en cromatografía gaseosa bi-dimensional en línea (22). Recientemente, los distintos beneficios de este enfoque fueron discutidos en una publicación por Tranchida *et al.* (23). Sin embargo, solo hemos visto algunas pocas referencias en utilizar divisor de flujo en cromatografía líquida bi-dimensional en línea después de la primera dimensión (11, 24); en ningún caso fue utilizado para optimizar independientemente la primera dimensión. En las figuras 2.2.1 (a) y (b) se muestran los diagramas de bloques de los equipos sin y con divisor de caudal como se implementaron para este trabajo.

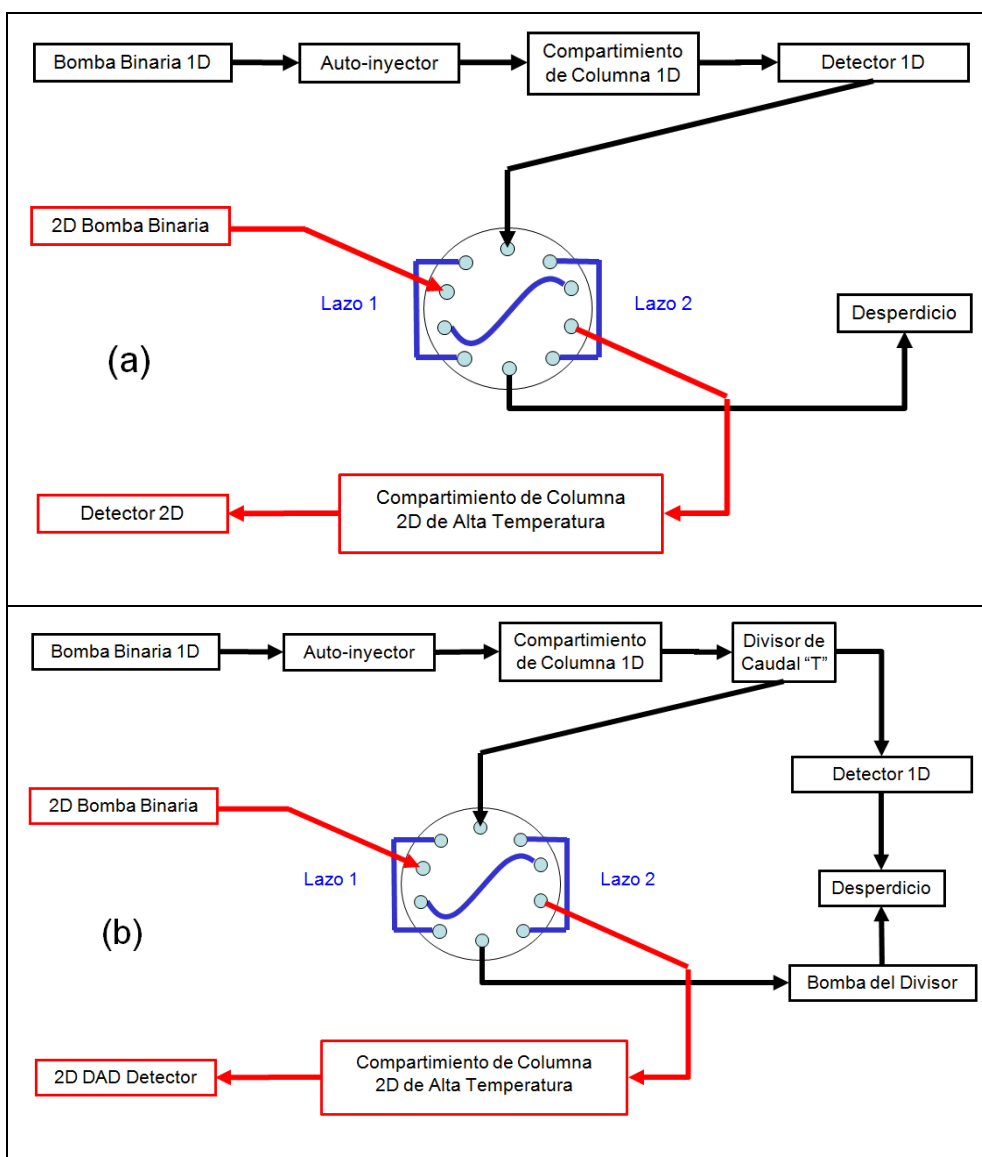


Figura 2.2.1 Diagramas de bloques de los instrumentos utilizados en las separaciones LC×LC en línea (a) sin división de caudal y (b) con división de caudal.

En ambos instrumentos, el cromatograma bi-dimensional obtenido es completo. Cuando se utiliza el divisor de caudal, solo una parte del efluente de la primera dimensión es transferido a la válvula de 10 puertos y luego a la segunda dimensión. Esta fracción es uniforme y completamente representativa del eluyente total de la primera dimensión. Esto es diferente al

tipo de muestreo descrito por Seeley (11), donde el ciclo de muestreo no tomaba continuamente el efluente de la primera dimensión, sino fracciones discretas a intervalos regulares. La principal motivación para implementar un divisor de caudal se basa en nuestros trabajos previos (25, 26). Ya hemos mostrado en la sección anterior que en cromatografía líquida bi-dimensional en línea existe un tiempo de muestreo óptimo. Este tiempo de muestreo es necesariamente igual al tiempo de ciclo de la segunda dimensión. Por lo tanto, el volumen de muestra colectado cuando no se utiliza un divisor de caudal es, según la ecuación 2.2.1:

$$V_s = F \cdot t_c$$

Es evidente que una vez determinado el tiempo de muestreo, cualquier cambio en el caudal de la primera dimensión ( $F$ ) resultará en un cambio en el volumen muestreado para el sistema sin divisor mostrado en la figura 2.2.1 (a). Si se utiliza un divisor de caudal, como se muestran en la figura 2.2.1 (b), la ecuación anterior se puede generalizar como la ecuación 2.2.2:

$$V_s = \rho F \cdot t_c$$

donde  $\rho$  representa el grado de división de caudal utilizado. Obviamente cuanto mayor sea el grado de división de caudal, mayor será la dilución de la muestra. El efecto de dilución en separaciones multidimensionales fue estudiado en detalle por Schure (24) y más recientemente por Horváth *et al.* (27). La gran ventaja de esta implementación de divisor de caudal, es que permite que ambas dimensiones sean operadas de forma independiente. Sin embargo, también hay otros beneficios, incluyendo un incremento significativo en el poder de resolución de la cromatografía bi-dimensional en línea.

A medida que esta técnica de LCxLC va siendo más aceptada para análisis cuantitativos, se hace más importante lograr reproducibilidad en las réplicas y elevada productividad. En este

aspecto, el tiempo de análisis debe ser reducido lo máximo posible. El tiempo de re-equilibrio del sistema ( $t_{re-eq}$ ) juega un papel clave en determinar el tiempo de gradiente ( $t_g$ ) disponible para un cierto tiempo de análisis ( $t_{an}$ ) y debe ser tenido en cuenta en la optimización ya que no ocurre separación durante este período. El concepto de la fracción de tiempo utilizada en la separación ( $\lambda$ ) fue definido por Horváth *et al.* (21) para la segunda dimensión de una separación bi-dimensional. Con el mismo objetivo, definimos su análogo para la primera dimensión de nuestro sistema bi-dimensional en la ecuación 2.2.3:

$${}^1\lambda = \frac{{}^1t_g}{{}^1t_{an}} = \frac{{}^1t_g}{{}^1t_g + {}^1t_{re-eq}}$$

Esta relación es utilizada en este trabajo para representar la fracción del tiempo de análisis dedicada a la separación en la primera dimensión. Obviamente, a medida que el tiempo de re-equilibrio ocupa una fracción menor del tiempo de análisis,  ${}^1\lambda$  tiende a uno.

En este trabajo se compara el rendimiento potencial siguiendo los dos enfoques (con y sin divisor de caudal) en términos de la capacidad de picos bi-dimensional corregida (ecuación 2.1.4) para un tiempo de análisis determinado. También reportamos el número de picos observados en la muestra de extracto de maíz como una medida complementaria del rendimiento del sistema. Ambas medidas son muy importantes ya que la configuración que provea la mayor capacidad de picos bi-dimensional corregida, también debería (para la misma distribución de picos) permitir observar un mayor número de picos. La producción de capacidad de picos bi-dimensional corregida (es decir, la capacidad de picos bi-dimensional corregida por unidad de tiempo de análisis) también es calculada ya que es de especial importancia en alta capacidad de análisis.

### 2.2.2 Parte experimental

Productos químicos. El origen de los patrones de indoles utilizados para determinar la capacidad de picos fue descrito en el punto 2.1.2; sin embargo el 5-carbonitrilo-indol, 4-acetato de indolilo, como también el nitroetano y nitropropano fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) como productos de grado reactivo o mejor. La tiourea de grado reactivo fue provista por Matheson Coleman & Bell (East Rutherford, NJ, USA). Agua y acetonitrilo de grado cromatográfico fueron obtenidos de Fisher Scientific (Pittsburg, PA, USA). El ácido perclórico de grado reactivo fue de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Todos los materiales fueron utilizados como se recibieron. Las fases móviles fueron preparadas gravimétricamente ( $\pm 0.01$  g) y utilizadas sin filtrado previo.

Preparación de Muestras. En este experimento se utilizaron dos muestras. Una mezcla estándar y el extracto de maíz. La mezcla estándar contenía los siguientes compuestos: tiourea (33.9  $\mu\text{g/mL}$ ), 5-hidroxi-L-triptofano (151  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-acetil-L-ácido aspártico (27.1  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-acetil-L-ácido glutámico (265  $\mu\text{g/mL}$ ), triptofano (91.6  $\mu\text{g/mL}$ ), ácido antranílico (33.9  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-acetil-L-glicina (80.8  $\mu\text{g/mL}$ ), 5-hidroxi-triptamina (22.9  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-acetil- $\epsilon$ -L-leucina (33.9  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-acetil- $\beta$ -D-glucosa (54.9  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-acetamida (74.6  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-ácido carboxílico (91.6  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-acetil-L-isoleucina (61.8  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-ácido propiónico (33.9  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-etanol (72.9  $\mu\text{g/mL}$ ), triptamina (40.7  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-ácido butírico (133  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-3-acetonitrilo (102  $\mu\text{g/mL}$ ), indol-5-carbonitrilo (48.5  $\mu\text{g/mL}$ ), 4-acetato de indolilo (18.1  $\mu\text{g/mL}$ ), nitroetano (10.4  $\mu\text{g/mL}$ ) y nitropropano (9.9  $\mu\text{g/mL}$ ). La composición final del solvente de la mezcla estándar fue agua con menos de un 1% v/v de acetonitrilo. La muestra de extracto de maíz se preparó con el mismo procedimiento descrito en la sección 2.1.2. Las muestras se



filtraron a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de PTFE previo a la inyección y los volúmenes de inyección se muestran en la tabla 2.2.1.

Tabla 2.2.1 Parámetros experimentales y capacidades de picos para los distintos tiempos de análisis y modos de división de caudal utilizados

Modo	Tiempo de Análisis [min]					
	15		30		60	
	sin división	con división	sin división	con división	sin división	con división
${}^1t_g$ [min] <sup>a</sup>	6	12.4	19	25	43	52.1
${}^1t_{re-eq}$ [min] <sup>b</sup>	9	2.6	11	5	17	7.9
${}^1\lambda$ <sup>c</sup>	0.40	0.82	0.63	0.83	0.72	0.87
Cociente ${}^1\lambda$ <sup>d</sup>	2.05		1.31		1.20	
${}^1L$ [cm] <sup>e</sup>	5	20	10	30	25	40
${}^1F$ [ $\mu$ L/min] <sup>f</sup>	100	570	100	380	100	290
$V_{inyección}$ [ $\mu$ L] <sup>g</sup>	1.5	8.57	1.5	5.7	1.5	4.35
Iny. Demorada [min]	4.9	0.86	4.9	1.29	4.9	1.69
${}^1\phi_i$ <sup>h</sup>	0	0	0	0	0	0
${}^1\phi_f$ <sup>i</sup>	0.81	0.49	0.62	0.50	0.63	0.47
${}^1W_{prom.}$ [s]	9.7	4.99	12.9	8.28	16.1	13.4
Cociente ${}^1W_{prom.}$ <sup>j</sup>	1.94		1.55		1.20	
${}^1n_{c, pred}$ <sup>k</sup>	46	228	94	275	149	317
Cociente ${}^1n_{c, pred}$ <sup>l</sup>	5.0		2.9		2.1	
${}^1n_{c, medido}$ <sup>m</sup>	37	149	88	181	157	232
Cociente ${}^1n_{c, medido}$ <sup>n</sup>	4.0		2.1		1.5	

La columna es Zorbax SB-C3 de 2.1 mm de diámetro interno y partículas de 3.5  $\mu$ m. La temperatura es 40 °C. <sup>a</sup> Tiempo de gradiente. <sup>b</sup> Tiempo de re-equilibrio. <sup>c</sup> Fracción del tiempo de análisis dedicada a la separación. <sup>d</sup> Relación de valores de  ${}^1\lambda$  para los modos con división y sin división. <sup>e</sup> Longitud de columna. <sup>f</sup> Caudal. <sup>g</sup> Volumen inyectado. <sup>h</sup> Fracción inicial de B en el gradiente. <sup>i</sup> Fracción final de B en el gradiente. <sup>j</sup> Relación de anchos de pico promedio entre los modos sin división y con división. <sup>k</sup> Capacidad de picos obtenida con el procedimiento de optimización. <sup>l</sup> Relación de la capacidad de picos predicha para el modo con división al modo sin división. <sup>m</sup> Capacidad de picos medida calculada utilizando la ecuación 2.1.7 utilizando el ancho de pico promedio. <sup>n</sup> Relación de la capacidad de picos medida para el modo con división al modo sin división.

Es importante notar que el volumen de inyección de la mezcla estándar y del extracto de maíz fueron especialmente elegidos para mantener constante el número de moles de muestra transferidos de la primera a la segunda dimensión. Por ejemplo, para un tiempo de análisis de 15 min, utilizando el modo sin divisor, el volumen de inyección fue de 1.5  $\mu\text{L}$  y toda la muestra fue transferida a la segunda dimensión; el caudal de la primera dimensión fue de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , colectando un volumen de muestra de 20  $\mu\text{L}$  o 34  $\mu\text{L}$  para tiempos de muestreo de 12 s o 21 s respectivamente. En el modo con divisor, el caudal de la primera dimensión fue optimizado en 570  $\mu\text{L}/\text{min}$  pero la bomba del divisor fue configurada a un caudal de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Para compensar este grado de división se inyectaron en la primera dimensión 8.57  $\mu\text{L}$  ( $1.5 \mu\text{L} \times 570/100$ ) de modo que los moles de muestra totales transferidos a la segunda dimensión fueran los mismos en ambos modos. Esto fue especialmente hecho para asegurarnos que el recuento de picos no fuera afectado por un cambio en la sensibilidad. Adicionalmente, la cantidad de muestra inyectada en la primera dimensión fue variada deliberadamente para evaluar problemas de sobrecarga como se muestra en la figura 2.2.2. Estamos confiados que la primera dimensión no fue sobrecargada en ninguno de los modos.

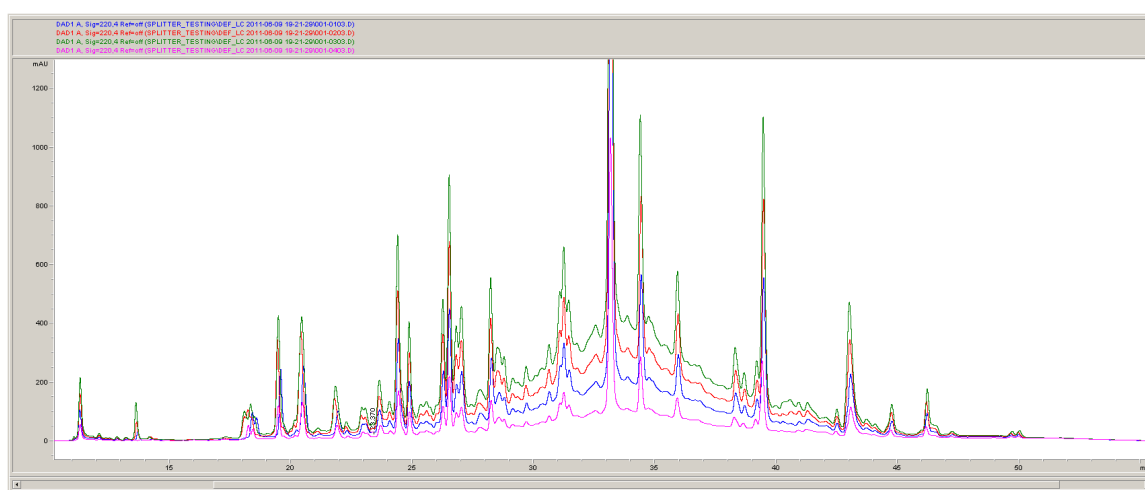


Figura 2.2.2 Verificación de sobrecarga con inyecciones de la muestra de maíz para verificar la consistencia en los tiempos de retención de los principales picos. Los volúmenes inyectados de la muestra de maíz desde abajo hacia arriba fueron de 1.5  $\mu\text{L}$  (trazo rosa); 3.0  $\mu\text{L}$  (trazo azul); 4.5  $\mu\text{L}$  (trazo rojo) y 6.0  $\mu\text{L}$  (trazo verde).

Instrumentación LC×LC en línea – Primera Dimensión. El sistema utilizó los siguientes componentes de Agilent: un degasificador en línea modelo G1379, bomba binaria modelo G1312 donde el mezclador original fue reemplazado por uno de tipo JetWeaver V100 también de Agilent. Esto nos permitió reducir el volumen de “enjuague” a 700  $\mu\text{L}$  y la demora de gradiente a 610  $\mu\text{L}$ . Esto ayudó a reducir el tiempo de estabilización de la bomba que es parte importante del tiempo de re-equilibrio de la primera dimensión. La muestra fue inyectada con un auto inyector 1290 Infinity modelo G4226A equipado con un lazo de 40  $\mu\text{L}$ . La columna fue calentada con un compartimiento de termostatación 1200 SL modelo G1312B. El detector utilizado (que puede ser opcional) fue un Agilent 1100 VWD modelo G1314A equipado con una micro-celda con un volumen de 1.0  $\mu\text{L}$  y camino óptico de 5 mm. Cuando el sistema fue utilizado en modo sin divisor, el caudal de la primera dimensión fue fijado en 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  y todo el efluente fue colectado después del detector como se muestra en la figura 2.2.1 (a); cuando el sistema fue utilizado en modo con divisor, el caudal fue dividido en dos utilizando una conexión “T” de acero inoxidable modelo U-428 de IDEX Corp. (Lake Forest, IL, USA). Una de las salidas fue conectada al detector Agilent 1100 VWD modelo G1314A antes mencionado, mientras que la otra salida fue conectada a la válvula de 10 puertos / 2 posiciones (VICI CHEMINERT 110-0063H, Valco Instruments, Houston, TX, USA), para muestrear la primera dimensión como se muestra en la figura 2.2.1 (b). La tubería después de la válvula de 10 puertos fue conectada a una bomba binaria Agilent 1290 modelo G4220A que controlaba (restringía) el caudal proveniente de la primera dimensión en 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Un tubo de 100 cm de longitud y 0.0025 pulgadas de diámetro interno de PEEK-Sil fue conectado a la salida de la bomba para proveer una contra-presión adecuada para que las válvulas de la bomba funcionaran adecuadamente. La válvula de 10 puertos fue accionada neumáticamente utilizando helio a 80 psi. Los dos lazos (lazo 1 y lazo 2 en las figuras 2.2.1) fueron construidos con tubos de PEEK de 37.5 cm de longitud y 0.01 pulgadas de diámetro

interno para el tiempo de muestreo de 12 s y de 137 cm de longitud y 0.007 pulgadas de diámetro interno para el tiempo de muestreo de 21 s; los volúmenes para cada set de tubos se muestran en la tabla 2.2.2.

Tabla 2.2.2 Parámetros experimentales y capacidades de picos de la segunda dimensión

	Tiempo de Muestreo [s]	
	12	21
${}^2t_g$ [s] <sup>a</sup>	9	18
${}^2t_{re-eq}$ [s] <sup>b</sup>	3	3
${}^2L$ [cm] <sup>c</sup>	3.3	3.3
${}^2F$ [mL/min] <sup>d</sup>	3.0	3.0
$V_{lazo}$ [ $\mu$ L] <sup>e</sup>	20	34
${}^2\phi_i$ <sup>f</sup>	0	0
${}^2\phi_f$ <sup>g</sup>	1.0	1.0
${}^2n_{c, medido}$ <sup>h</sup>	24	32

La columna fue de 33 x 2.1 mm empacada con partículas ZirChrom-CARB de 3  $\mu$ m. La temperatura fue 110 °C. <sup>a</sup> Tiempo de gradiente. <sup>b</sup> Tiempo de re-equilibrio. <sup>c</sup> Longitud de columna. <sup>d</sup> Caudal. <sup>e</sup> Volumen del lazo. <sup>f</sup> Composición inicial del gradiente. <sup>g</sup> Composición final del gradiente. <sup>h</sup> Capacidad de picos de la segunda dimensión calculado como el cociente entre el tiempo del gradiente  ${}^2t_g$  y el ancho de picos promedio medido.

Las columnas utilizadas para la separación de la primera dimensión fueron Agilent Zorbax SB-C3 de 2.1 mm de diámetro interno, rellenas con partículas de 3.5  $\mu\text{m}$  y longitudes de 5, 10, 15 y 25 cm, las que fueron alternativamente usadas para lograr la longitud de columna deseada de acuerdo al protocolo de optimización antes mencionado. Los parámetros experimentales utilizados para la primera dimensión en ambos modos, con y sin divisor, se muestran en la tabla 2.2.1.

Instrumentación LC $\times$ LC – Segunda Dimensión. Se utilizó una bomba binaria Agilent 1290 modelo G4220A configurada con un mezclador JetWeaver V35. El solvente en el canal A fue una solución 10 mM de ácido fosfórico y el solvente en el canal B fue acetonitrilo. El gradiente de la segunda dimensión fue de 9 o 18 s, permitiendo un tiempo de re-equilibrio de 3 s para ambos gradientes. Por lo tanto, los tiempos de ciclo utilizados fueron de 12 y 21 s respectivamente. Un detector DAD modelo G4220A equipado con una micro-celda de 1  $\mu\text{L}$  y camino óptico de 6 mm se utilizó para detectar los analitos en la segunda dimensión. La longitud de onda de lectura fue a 220 nm y la adquisición de datos se realizó a una frecuencia de 80 Hz. El ancho de ranura del detector fue configurado en 4 nm y la longitud de onda de referencia desactivada.

La columna utilizada para la separación en la segunda dimensión fue de 33  $\times$  2.1 mm rellena con partículas de 3.0  $\mu\text{m}$  ZirChrom-CARB (ZirChrom Separations Inc. Anoka, MN, USA). La columna se termostató a 110  $^{\circ}\text{C}$  y el caudal se mantuvo a 3.0 mL/min, resultando el sistema en una presión máxima de aproximadamente 400 bar durante el gradiente. Un sistema con pre-calentamiento de fase móvil y termostatación de columna de Systec Inc. (New Brighton, MN, USA) fue utilizado para mantener la columna a una temperatura de 110  $\pm$  0.1  $^{\circ}\text{C}$ . Como se menciona antes, tanto la reducida dimensión de la columna utilizada en la segunda dimensión como el elevado caudal, ayudan a reducir el tiempo de re-equilibrio del sistema. Las partículas de óxido de zirconio recubiertas con carbono de ZirChrom-CARB

fueron elegidas por su excelente estabilidad química y térmica a las elevadas temperaturas en que se las utilizó. Además, la selectividad de esta fase estacionaria es radicalmente diferente a casi la totalidad de las fases estacionarias comúnmente utilizadas en fase reversa (25). Las condiciones utilizadas en la segunda dimensión se muestran en la tabla 2.2.2.

Adquisición de datos y control del instrumento. Todos los módulos de Agilent fueron configurados y controlados por el software Chemstation B.04.03 (Agilent Technologies Inc., USA). La bomba binaria utilizada en la segunda dimensión y la válvula de 10 puertos fueron coordinadas utilizando un simple programa realizado con el software LabVIEW 9.0 y controlados a través de una placa conversora PCI 6024E (ambos productos de National Instruments Inc. Austin, TX, USA).

Procesamiento de los datos. Los cromatogramas bi-dimensionales fueron adquiridos con el software Chemstation como un único cromatograma con las múltiples corridas sucesivas en serie. Luego este único cromatograma conteniendo todas las corridas individuales de la segunda dimensión fue exportado a un archivo de valores separados por comas (CSV) y luego procesados utilizando programas desarrollados con el software Matlab 7.10 (R2010b, The Mathworks Inc., MA, USA).

Optimización y cálculo de la capacidad de picos. La estrategia de optimización fue la misma ya descrita en la sección 2.1. El método de optimización se aplicó para los dos modos, con y sin divisor. Cuando se utiliza el modo sin divisor, el caudal queda fijo a 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , pudiéndose optimizar únicamente el largo de la columna y la composición final del gradiente. Para la segunda dimensión, se mostró que existe un tiempo de ciclo óptimo en la sección 2.1. En acuerdo con esta experiencia, se utilizaron dos tiempos de ciclo en este trabajo (12 y 21 s), los cuales representan el rango en el cual se encuentra el valor óptimo para estos experimentos.

Se decidió utilizar columnas de 2.1 mm de diámetro interno para la primera dimensión en ambos modos, con y sin divisor. Esto fue porque este diámetro interno de columna funciona bastante bien a caudales de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  necesarios para el modo sin divisor. En el modo con divisor se pudo haber utilizado columnas de mayor diámetro interno (como 4.6 mm). Sin embargo, con el fin de simplificar la comparación entre ambos modos, se decidió mantener el diámetro interno de columna constante. El haber utilizado columnas de diámetro interno de 4.6 mm en el modo con divisor, hubiese ofrecido dos ventajas sobre las columnas de 2.1 mm. Primero, a la misma velocidad lineal, un caudal mayor habría reducido el tiempo de re-equilibrio del sistema permitiendo incrementar aun mas  $^1\lambda$  (ver más adelante). Segundo, las columnas de diámetro interno de 4.6 mm por lo general ofrecen mayor número de platos teóricos que las de 2.1 mm ya que el rellenado de la columna suele ser más eficiente.

Medida de la capacidad de picos. La capacidad de picos de la primera dimensión en condiciones optimizadas fue medida utilizando la mezcla de patrones de derivados de indoles. La capacidad de picos luego fue calculada de acuerdo a la ecuación 2.1.1.

En este trabajo se utilizó inyección demorada para que el primer pico eluyera cerca del volumen muerto de la columna y al comienzo del gradiente. Una consideración muy importante en el uso de inyección demorada, es que permitió combinar el tiempo de demora de gradiente del sistema, con el tiempo necesario para el re-equilibrado de la bomba y columna. Por esto, para una larga serie de inyecciones, no es necesario tomar en cuenta el tiempo de demora de gradiente, en el tiempo de la corrida cromatográfica. Por estas razones, se considera que para una comparación justa entre los modos con y sin divisor, el tiempo de demora de gradiente debe ser excluido ya que solo se debe “esperar” el gradiente en la primera corrida y es “amortizado” rápidamente en corridas sucesivas. Esto se representa de forma gráfica en la figura 2.2.3.



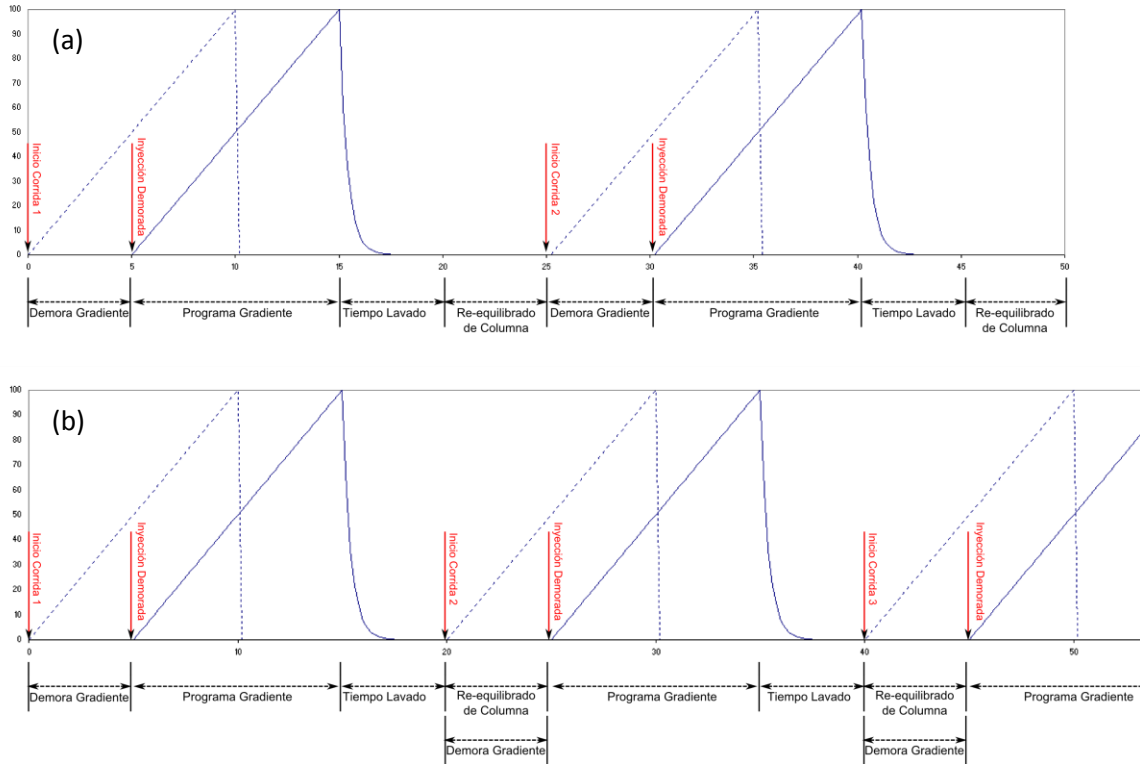


Figura 2.2.3 Representación gráfica de la combinación del tiempo de lavado del sistema con el re-equilibrado de la columna cuando se utiliza inyección demorada. El trazo punteado azul representa el programa del gradiente en la bomba. El trazo continuo azul representa la composición del gradiente en la entrada de la columna. En (a) la segunda corrida comienza una vez finalizado el proceso de re-equilibrado de la columna. Se espera lo que demora el gradiente en llegar a la columna para inyectar. En (b) solo se espera lo que demora el gradiente en la primera corrida. Sin embargo, en las corridas sucesivas se puede combinar el tiempo de re-equilibrado de la columna con la demora del gradiente.

Las condiciones se optimizaron para lograr que el último pico de la mezcla estándar eluyera cerca del final del gradiente. De este modo, la diferencia entre el tiempo de retención del primero y del último pico, se aproximó al tiempo de gradiente utilizado. El ancho del pico promedio en la ecuación 2.1.1, se tomó como el promedio del ancho de los picos en la base de componentes bien resueltos de la mezcla patrón.

La capacidad de picos de la segunda dimensión fue calculada utilizando el mismo método anteriormente descrito en la sección 2.1.4. Las capacidades de picos corregidas para la

combinación de los diferentes tiempos de gradiente de la primera y segunda dimensión se calcularon utilizando la ecuación 2.1.4 y los resultados se reportan en la tabla 2.2.3.

Tabla 2.2.3 Efecto del modo utilizado, tiempo de análisis y tiempo de ciclo de la segunda dimensión en la capacidad de picos bi-dimensional corregida y en la producción de picos

a) 12 s	Tiempo de Análisis [min]					
	15		30		60	
	sin división	con división	sin división	con división	sin división	con división
Modo						
$^1 n_{c, \text{medido}}^a$	37	149	88	181	157	232
$^2 n_{c, \text{medido}}^b$	24	24	24	24	24	24
$\langle \beta \rangle^c$	2.5	4.5	2.0	2.8	1.7	1.9
$n'_{c, 2D}^d$	360	793	1073	1534	2257	2912
$n'_{c, 2D} / t_{an}$ [picos/min] <sup>e</sup>	24	53	36	51	38	49

b) 21 s	Tiempo de Análisis [min]					
	15		30		60	
	sin división	con división	sin división	con división	sin división	con división
Modo						
$^1 n_{c, \text{medido}}^a$	37	149	88	181	157	232
$^2 n_{c, \text{medido}}^b$	32	32	32	32	32	32
$\langle \beta \rangle^c$	4.1	7.8	3.1	4.7	2.5	3.0
$n'_{c, 2D}^d$	291	614	899	1221	1975	2456
$n'_{c, 2D} / t_{an}$ [picos/min] <sup>e</sup>	19	41	30	41	33	41

<sup>a</sup> Capacidad de picos de la primera dimensión calculada utilizando la ecuación 2.1.1 a partir del ancho de pico promedio experimental. <sup>b</sup> Capacidad de picos de la segunda dimensión medida a partir del ancho de pico promedio y utilizando la ecuación 2.1.1. <sup>c</sup> Factor de corrección por sub-muestreo de la primera dimensión calculado con la ecuación 2.1.3. <sup>d</sup> Capacidad de picos bi-dimensional corregida calculada con la ecuación 2.1.4. <sup>e</sup> Producción de picos por minuto calculado como la capacidad de picos bi-dimensional corregida respecto al tiempo de análisis.

Número de picos observados en el extracto de maíz. Para confirmar la tendencia en los resultados obtenidos con la capacidad de picos corregida como una medida del poder de resolución de la separación bi-dimensional, se contaron los picos bi-dimensionales encontrados en la muestra de maíz. Este procedimiento fue manual y se describió en detalle en la sección 2.1.5.

### **2.2.3 Resultados y discusión**

La cromatografía líquida bi-dimensional puede ser utilizada tanto para generar una capacidad de picos muy grande, como para generar una capacidad de picos razonablemente grande pero en tiempos relativamente cortos (28–30). Mientras que la LC×LC fuera de línea es sin dudas el más adecuado para alcanzar las mayores capacidades de picos (31, 32) (pero en tiempos relativamente largos), el modo LC×LC en línea es sin dudas la mejor forma de lograr una elevada capacidad de picos, para corridas del orden de los (15-60 min) (31). En ambos modos, en línea y fuera de línea, hay que tomar en cuenta varias restricciones como ser la compatibilidad entre las fases móviles de ambas dimensiones (33, 34), el límite en el volumen de muestra a inyectar en la segunda dimensión (12) y también la fuerza del solvente inyectado (35, 36).

En LC×LC en línea tenemos que tener en cuenta además otra restricción, ya que el tiempo de análisis de la segunda dimensión debe ser igual al tiempo de ciclo utilizado (a no ser que se utilicen columnas paralelas), ya que el eluyente de la primera dimensión es secuencialmente analizado en tiempo real. Esto impone una fuerte restricción ya que ambas dimensiones se encuentran fuertemente acopladas. Como resultado, la capacidad de picos de ambas dimensiones se ve severamente afectada y reducida. La segunda dimensión debe ser muy rápida para minimizar el efecto de sub-muestreo de la primera dimensión pero a su vez debe mantener un poder de separación aceptable (capacidad de picos). Esto también afecta a la

primera dimensión ya que se deben utilizar caudales muy bajos para evitar inyectar grandes volúmenes de muestra en la segunda dimensión. Para reducir este efecto, algunos investigadores han utilizado columnas capilares de considerable longitud en la primera dimensión, pero aun a caudales por debajo del óptimo (12, 35, 37). Esta estrategia hace que tanto el tiempo de re-equilibrio de la columna como del instrumento se incrementen considerablemente.

Otras estrategias también han sido utilizadas. Por ejemplo, Stoll *et al.* utilizaron un divisor de caudal antes de la columna de la primera dimensión con una relación de división de 10:1 para reducir considerablemente el tiempo de re-equilibrio del sistema (18). La bomba trabajaba a un caudal de 1000  $\mu\text{L}/\text{min}$  mientras que la columna recibía solamente 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , que también estaba por debajo del caudal óptimo. En ciertas ocasiones se utilizó un divisor de caudal luego de la columna de la primera dimensión para reducir el volumen de muestra transferida a la segunda dimensión, pero sin optimizar el caudal que aún estaba por debajo del óptimo (6, 38).

En aquellas publicaciones en donde se utilizó un divisor de caudal luego de la columna de la primera dimensión, la relación de división (caudal) entre ambas salidas fue implementada en todos los casos utilizando una “T” con tubos de diámetro interno y longitud determinadas en cada salida para lograr la caída de presión deseada y así controlar la relación de caudales. Nos vamos a referir a este método como “división de caudal pasiva”. Cuando se utiliza la división de caudal pasiva bajo condiciones de elución en gradiente, la viscosidad del eluyente queda determinada por su composición y temperatura. La forma en que se implementó la división de caudal en este trabajo es mucho menos afectada por fluctuaciones en la viscosidad y temperatura.

De la bibliografía recopilada se puede afirmar que la división de caudal luego de la primera dimensión nunca había sido utilizada para maximizar la capacidad de picos de la primera

dimensión en LC×LC en línea. Lo novedoso de esta propuesta es que utilizando una bomba precisamente controlada para ajustar la división de caudal luego de la primera dimensión, se pudo optimizar completamente las condiciones de la primera dimensión independientemente de la segunda dimensión. Nos vamos a referir a este método como “división de caudal activa”. Este modo de división de caudal no es afectado por el cambio de temperatura o viscosidad del eluyente. También es importante notar que aplicando este método, la separación de la primera dimensión no es afectada por un cambio en la relación de caudales, como sucede si se implementa antes de la columna de la primera dimensión. El hecho de utilizar una bomba para controlar de forma precisa el caudal de la rama que se conecta a la válvula de 10 puertos, nos permite controlar de forma precisa la cantidad de muestra transferida de la primera a la segunda dimensión, y nos da la flexibilidad de poder cambiar fácilmente la relación de división según sea necesario.

Ya ha sido demostrado que el poder de resolución de la primera dimensión tiene menor importancia en la capacidad de picos de la cromatografía bi-dimensional, que la capacidad de picos de la segunda dimensión, a no ser que el tiempo de gradiente también sea incrementado (16, 20, 29). En esta parte del trabajo, se predijo y confirmó una importante mejora en la capacidad de picos bi-dimensional corregida, utilizando la división de caudal activa (ver tablas 2.2.3 y 2.2.4).

Tabla 2.2.4 Efecto del modo utilizado, tiempo de análisis y tiempo de ciclo de la segunda dimensión en la capacidad de picos bi-dimensional corregida y en número de picos bi-dimensionales observados.

a) 12 s		Tiempo de Análisis [min]					
		15		30		60	
Modo		sin división	con división	sin división	con división	sin división	con división
$n'_{c,2D}$ <sup>a</sup>		360	793	1073	1534	2257	2912
Relación <sup>b</sup>		2.20		1.43		1.29	
# Picos Observados		36	113	111	158	165	213
Relación <sup>c</sup>		3.14		1.42		1.29	
b) 21 s		Tiempo de Análisis [min]					
		15		30		60	
Modo		sin división	con división	sin división	con división	sin división	con división
$n'_{c,2D}$ <sup>a</sup>		291	614	899	1221	1975	2456
Relación <sup>b</sup>		2.11		1.36		1.24	
# Picos Observados		43	80	103	128	154	184
Relación <sup>c</sup>		1.86		1.24		1.19	

<sup>a</sup> Capacidad de picos bi-dimensional corregida calculada según la ecuación 2.1.4. <sup>b</sup> Relación entre la capacidad de picos bi-dimensional corregida del modo con división y el modo sin división. <sup>c</sup> Relación entre el número de picos bi-dimensionales observados del modo con división y el modo sin división.

Nuestros cálculos (ver tabla 2.2.1) utilizando la división de caudal activa, predijo un aumento de 5 veces en la capacidad de picos de la primera dimensión (ver tiempo de análisis de 15 min) optimizando completamente no solo la longitud de la columna y la composición final del eluyente (como se hizo en el modo sin división de caudal), sino optimizando simultáneamente el caudal, la longitud de la columna y composición final del eluyente. Los resultados experimentales muestran un incremento de 4 veces en la capacidad de picos observada en la primera dimensión (ver tabla 2.2.1). Sin embargo, no todo este incremento es “capitalizado” en  $n'_{c,2D}$  porque tal incremento en la capacidad de picos de la primera dimensión (y por lo tanto una reducción en el ancho de pico promedio), va inevitablemente acompañado de un aumento en el efecto de sub-muestreo (ver ecuación 2.1.4) como fue mostrado por Davis *et al.* (7).

Para tiempos de análisis más largos (mostrado para 30 y 60 min), el incremento no es tan grande como para el tiempo de análisis de 15 min. Esto se debe a que la fracción dedicada al gradiente es mayor en relación al tiempo de re-equilibrio del sistema para ambos casos, con y sin división; esto queda representado por  $^1\lambda$  en la tabla 2.2.1. La capacidad de picos se incrementa a medida que  $^1\lambda$  se aproxima a la unidad. Este efecto también puede ser claramente observado en los cromatogramas de la primera dimensión de los experimentos bi-dimensionales. En las figuras 2.2.4 (a.1) y (a.2) el tiempo de análisis es de 15 min y el tiempo dedicado a la separación es aproximadamente la mitad para el caso sin división de caudal respecto al caso con división de caudal (ver tabla 2.2.1). A medida que el tiempo de análisis se incrementa, la diferencia relativa entre el tiempo de gradiente y el de re-equilibrio del sistema se hace más pequeña, aunque sigue siendo significativa.



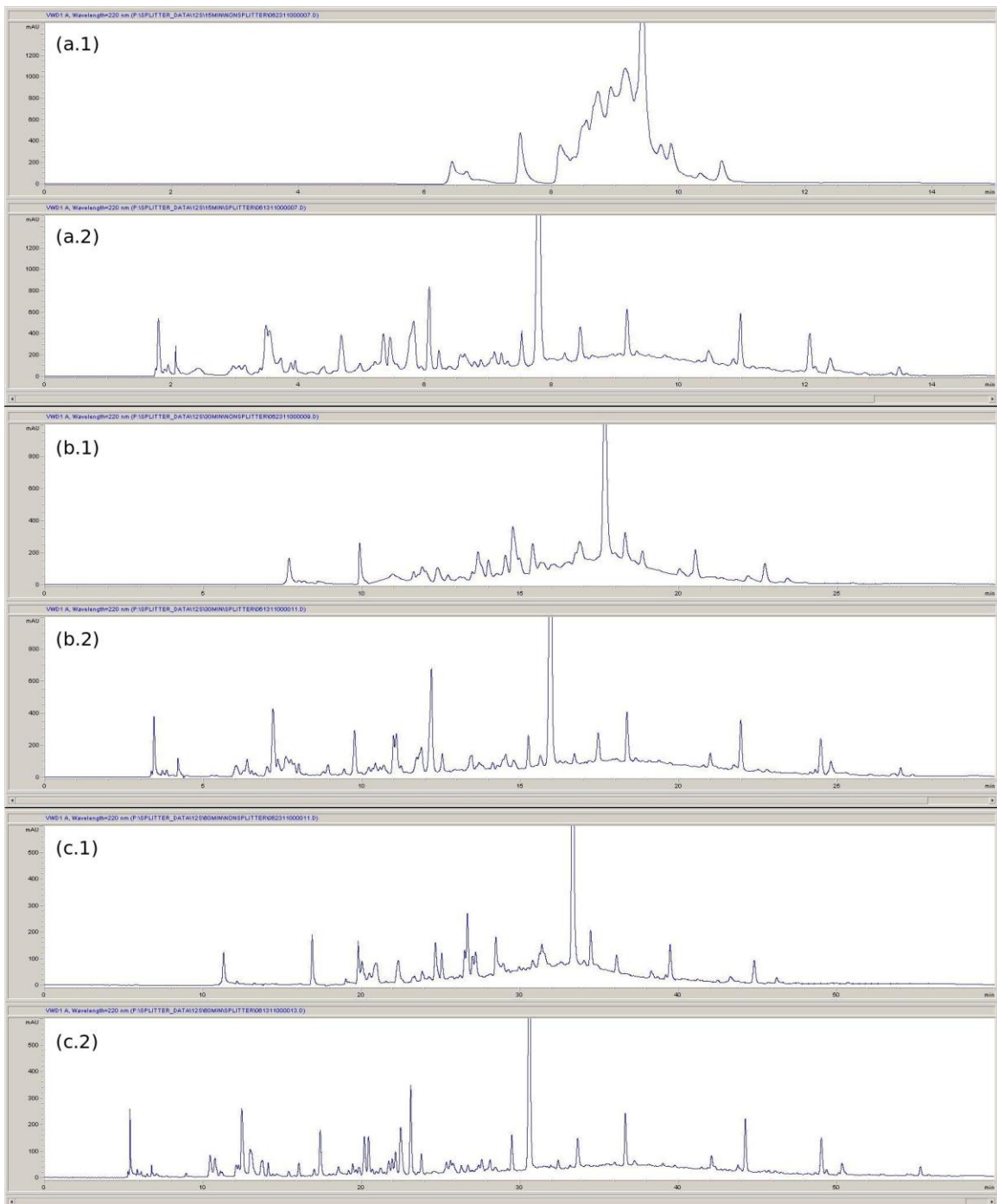


Figura 2.2.4 Cromatogramas de la muestra de maíz adquiridos con el detector de la primera dimensión durante las corridas bi-dimensionales. Los tiempos de análisis corresponden (a) 15 min, (b) 30 min (c) 60 min y los modos correspondientes son (x.1) sin división y (x.2) con división. Las condiciones experimentales se pueden ver en la tabla 2.2.1.

Hay dos factores que contribuyen al incremento en la capacidad de picos de la primera dimensión como se muestra en la tabla 2.2.1. Primero, el divisor de caudal permite un incremento muy importante en  ${}^l t_g$  para un mismo tiempo de análisis, como queda representado por  ${}^l \lambda$ . Segundo, el divisor de caudal nos permite trabajar en condiciones totalmente optimizadas de caudal, longitud de columna y composición final de la fase móvil. Esto resulta en una reducción en el ancho de pico promedio como se muestra en la tabla 2.2.1.

Ahora, ¿cuál de los dos efectos tiene un mayor impacto en la capacidad de picos bi-dimensional corregida? La respuesta no es tan evidente. La tabla 2.2.1 nos muestra que las relaciones entre  ${}^l \lambda$  y  ${}^l w$  son aproximadamente similares para los tres tiempos de análisis estudiados, sugiriendo que ambos factores contribuyen de igual forma, sin embargo veremos que esta comparación no es cierta.

La ecuación 2.1.4 nos muestra claramente que en condiciones de sub-muestreo severas, es decir que  $\langle \beta \rangle$  es bastante mayor a la unidad (ver tabla 2.2.1), entonces una reducción en  ${}^l w$  por la optimización es prácticamente cancelada por el incremento en el sub-muestreo. El incremento en  $\langle \beta \rangle$  al pasar del modo sin división al modo con división de caudal es importante (ver tabla 2.2.3). Haciendo algunos simples cálculos con la expresión de la derecha de la ecuación 2.1.4 muestra que para un tiempo de análisis de 15 min, el incremento en la capacidad de picos corregida bi-dimensional es casi exclusivamente debida al incremento en un factor de 2.07 en  ${}^l t_g$ , mientras el incremento debido únicamente a la reducción de  ${}^l w$  genera un factor de 1.07. El producto de ambos factores nos permite un incremento en un factor de 2.20 casi con perfecta concordancia con el incremento observado en  $n'_{c,2D}$ . Claramente el efecto dominante es el incremento en  ${}^l t_g$  y su efecto concomitante en  ${}^l \lambda$ .

También es importante notar (ver tabla 2.2.1) la menor composición final del componente orgánico en el gradiente cuando el caudal puede ser optimizado (modo con división de caudal). Esto ayuda a lograr un mejor enfocado de la muestra inyectada en la entrada de la columna de la segunda dimensión. Otra característica a notar en la tabla 2.2.4, es que para tiempos de análisis menores a 60 min, el tiempo de ciclo de 12 s produce valores mayores en la capacidad de picos bi-dimensional corregida y en el número de picos bi-dimensionales observados que el tiempo de ciclo de 21 s. Los cromatogramas bi-dimensionales en 3D para un tiempo de análisis de 30 min y tiempo de ciclo de 12 s se muestran en la figura 2.2.5.

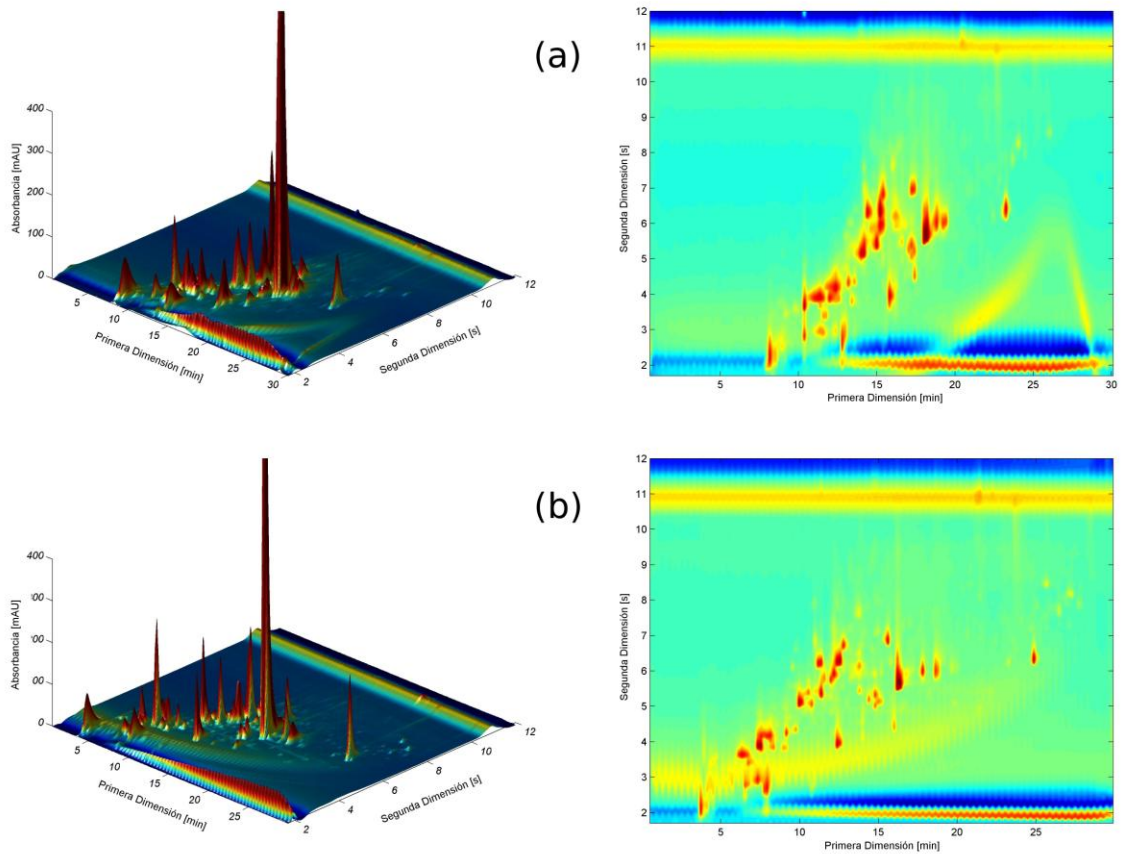


Figura 2.2.5 Representación en gráficos 3D y de contornos para un tiempo de análisis de 30 min y tiempo de ciclo de 12 s. (a) Modo sin división de caudal (b) Modo con división de caudal. Como se puede observar en la figura, el espacio cromatográfico es mejor utilizado cuando se utiliza la división de caudal. Ver condiciones experimentales en las tablas 2.2.1 y 2.2.2.

Es evidente en las figuras que los picos se distribuyen sobre un rango mayor de la primera dimensión cuando se utiliza división de caudal.

## 2.2.4 Conclusiones

En esta parte del trabajo hemos mostrado los beneficios de utilizar la división de caudal activa luego de la primera dimensión para optimizar las condiciones cromatográficas de la

primera dimensión y así incrementar el poder de separación en LC×LC en línea. Los puntos claves son los siguientes:

(1) La posibilidad de poder optimizar la primera dimensión independientemente de la segunda dimensión nos permitió incrementar la capacidad de picos bi-dimensional corregida y el número de picos bi-dimensionales observados en un factor 2 para un tiempo de análisis de 15 min.

(2) Esta mejora fue posible mayormente por reducir el tiempo de re-equilibrio y así aumentar el tiempo disponible para la separación en la primera dimensión. Un efecto menor es la reducción en el ancho de picos promedio de la primera dimensión como resultado de la optimización completa y simultánea del caudal, la longitud de la columna y la composición final del gradiente.

(3) El divisor de caudal activo permite el uso de columnas de mayor diámetro interno en la primera dimensión (por ejemplo de 4.6 mm), lo que podría resultar en una aún mejor utilización del tiempo dedicado al gradiente de la primera dimensión, incrementando aún más el poder de separación de LC×LC en línea.

(4) El uso de la división de caudal activa nos da el beneficio extra de flexibilidad y de poder controlar de forma precisa la cantidad de muestra transferida a la segunda dimensión. Esto puede ser automatizado y ajustado según sea necesario.

(5) Como la división de caudal es implementada luego de la primera dimensión, la reproducibilidad en la separación de la primera dimensión no es afectada por un cambio en la relación de división de caudal.

## 2.3 Referencias

- (1) Snyder, L. R.; Dolan, J. W.; Gant, J. R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *Journal of Chromatography A* **1979**, *165*, 3–30.
- (2) Wang, X.; Stoll, D. R.; Schellinger, A. P.; Carr, P. W. Peak capacity optimization of peptide separations in reversed-phase gradient elution chromatography: fixed column format. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 3406–3416.
- (3) Giddings, J. C. Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods. *Analytical Chemistry* **1967**, *39*, 1027–1028.
- (4) Giddings, J. C. *Unified Separation Science*; 1st ed.; Wiley-Interscience, 1991.
- (5) Horie, K.; Kimura, H.; Ikegami, T.; Iwatsuka, A.; Saad, N.; Fiehn, O.; Tanaka, N. Calculating Optimal Modulation Periods to Maximize the Peak Capacity in Two-Dimensional HPLC. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3764–3770.
- (6) Murphy, R. E.; Schure, M. R.; Foley, J. P. One- and Two-Dimensional Chromatographic Analysis of Alcohol Ethoxylates. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4353–4360.
- (7) Davis, J. M.; Stoll, D. R.; Carr, P. W. Effect of First-Dimension Undersampling on Effective Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations. *Anal. Chem.* **2007**, *80*, 461–473.
- (8) Gilar, M.; Daly, A. E.; Kele, M.; Neue, U. D.; Gebler, J. C. Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in single- and two-dimensional high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1061*, 183–192.

- (9) Schoenmakers, P. J.; Vivó-Truyols, G.; Decrop, W. M. C. A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1120*, 282–290.
- (10) Poppe Hans Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods. *Journal of Chromatography A* **1997**, *778*, 3–21.
- (11) Seeley, J. V. Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, *962*, 21–27.
- (12) Vivó-Truyols, G.; van der Wal, S.; Schoenmakers, P. J. Comprehensive Study on the Optimization of Online Two-Dimensional Liquid Chromatographic Systems Considering Losses in Theoretical Peak Capacity in First- and Second-Dimensions: A Pareto-Optimality Approach. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8525–8536.
- (13) Leboda, R.; Gierak, A.; Hubicki, Z.; Łodyga, A. Effect of zirconium on preparation and sorption properties of complex carbon-mineral adsorbents. *Materials Chemistry and Physics* **1991**, *30*, 83–91.
- (14) Jackson, P. T.; Carr, P. W. Study of polar and nonpolar substituted benzenes and aromatic isomers on carbon-coated zirconia and alkyl bonded phases. *Journal of Chromatography A* **2002**, *958*, 121–129.
- (15) Tanaka, N.; Tanigawa, T.; Kimata, K.; Hosoya, K.; Arai, T. Selectivity of carbon packing materials in comparison with octadecylsilyl- and pyrenylethylsilylsilica gels in reversed- phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1991**, *549*, 29–41.
- (16) Li, X.; Stoll, D. R.; Carr, P. W. Equation for Peak Capacity Estimation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **2008**, *81*, 845–850.

- (17) Snyder, L. R.; Dolan, J. W. *High-performance gradient elution: the practical application of the linear-solvent-strength model*; John Wiley and Sons, 2007.
- (18) Stoll, D. R.; Carr, P. W. Fast, Comprehensive Two-Dimensional HPLC Separation of Tryptic Peptides Based on High-Temperature HPLC. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5034–5035.
- (19) Stoll, D. R.; Cohen, J. D.; Carr, P. W. Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1122*, 123–137.
- (20) Potts, L. W.; Stoll, D. R.; Li, X.; Carr, P. W. The impact of sampling time on peak capacity and analysis speed in on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 5700–5709.
- (21) Horváth, K.; Fairchild, J. N.; Guiochon, G. Generation and Limitations of Peak Capacity in Online Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 3879–3888.
- (22) Liu, Z.; Phillips, J. B. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface. *Journal of Chromatographic Science* **1991**, *29*, 227–231.
- (23) Tranchida, P. Q.; Casilli, A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Generation of improved gas linear velocities in a comprehensive two-dimensional gas chromatography system. *Analytical chemistry* **2007**, *79*, 2266–2275.
- (24) Schure, M. R. Limit of Detection, Dilution Factors, and Technique Compatibility in Multidimensional Separations Utilizing Chromatography, Capillary Electrophoresis, and Field-Flow Fractionation. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 1645–1657.



- (25) Gu, H.; Huang, Y.; Filgueira, M.; Carr, P. W. Effect of first dimension phase selectivity in online comprehensive two dimensional liquid chromatography (LC × LC). *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 6675–6687.
- (26) Huang, Y.; Gu, H.; Filgueira, M.; Carr, P. W. An experimental study of sampling time effects on the resolving power of on-line two-dimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 2984–2994.
- (27) Horváth, K.; Fairchild, J. N.; Guiochon, G. Detection issues in two-dimensional on-line chromatography. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 7785–7792.
- (28) Horváth, K.; Fairchild, J.; Guiochon, G. Optimization strategies for off-line two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 2511–2518.
- (29) Guiochon, G.; Marchetti, N.; Mriziq, K.; Shalliker, R. A. Implementations of two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1189*, 109–168.
- (30) Stoll, D. R.; Li, X.; Wang, X.; Carr, P. W.; Porter, S. E. G.; Rutan, S. C. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1168*, 3–43.
- (31) Marchetti, N.; Fairchild, J. N.; Guiochon, G. Comprehensive Off-Line, Two-Dimensional Liquid Chromatography. Application to the Separation of Peptide Digests. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2756–2767.
- (32) Eeltink, S.; Dolman, S.; Ursem, M.; Swart, R.; McLeod, F.; Schoenmakers, P. J. Maximizing the Peak Production Rate in Off-line Comprehensive Two-dimensional Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection. *LC-GC Europe* **2009**, *22*, 404–413.

- (33) Wei, Y.; Lan, T.; Tang, T.; Zhang, L.; Wang, F.; Li, T.; Du, Y.; Zhang, W. A comprehensive two-dimensional normal-phase  $\times$  reversed-phase liquid chromatography based on the modification of mobile phases. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 7466–7471.
- (34) Dugo, P.; Favoino, O.; Luppino, R.; Dugo, G.; Mondello, L. Comprehensive Two-Dimensional Normal-Phase (Adsorption)–Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2525–2530.
- (35) Jandera, P.; Hájek, T.; Česla, P. Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 1995–2006.
- (36) Groskreutz, S. R.; Swenson, M. M.; Secor, L. B.; Stoll, D. R. Selective comprehensive multi-dimensional separation for resolution enhancement in high performance liquid chromatography. Part I: Principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1228*, 31–40.
- (37) François, I.; de Villiers, A.; Tienpont, B.; David, F.; Sandra, P. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography applying two parallel columns in the second dimension. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1178*, 33–42.
- (38) MacNair, J. E.; Lewis, K. C.; Jorgenson, J. W. Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 983–989.

## **Capítulo III**

### **Instrumentación en cromatografía líquida bi-dimensional**

#### **3.1 Introducción**

Al momento de la escritura de este trabajo no se encuentra disponible en el mercado un instrumento comercial para realizar esta técnica. Sin embargo, con la creciente necesidad de reducir el tiempo de análisis y aumentar el poder de separación, cada vez es mayor la cantidad de componentes que se pueden adquirir para poder ensamblar un instrumento para realizar cromatografía líquida bi-dimensional en línea sin realizar mayores modificaciones en los mismos. Sin embargo, esto restringe enormemente el despegue de la técnica limitándola principalmente a laboratorios de investigación y desarrollo que cuenten con los recursos para poder armar el instrumento y para desarrollar las herramientas necesarias para el procesamiento y análisis de datos, siendo este último obstáculo tanto o más complejo que el primero (*1*).

Podemos visualizar un diagrama general del instrumento para LCxLC en-línea en la figura 3.1.1.

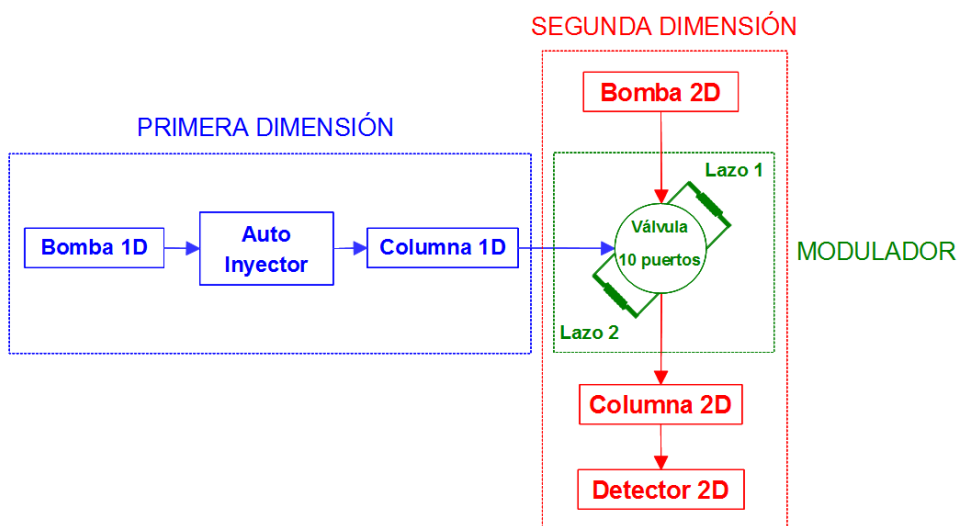


Figura 3.1.1 Diagrama general de componentes de un sistema para realizar cromatografía líquida bi-dimensional en línea.

Podemos ver a la primera dimensión como un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) convencional, que se encuentra conectado a un dispositivo que colecta el eluyente en dos lazos de forma alterna, conocido como el dispositivo de muestreo o modulador. Mientras uno de estos lazos es llenado por el eluyente de la primera dimensión, el otro lazo es inyectado y analizado en la segunda dimensión. Podemos pensar en la segunda dimensión del sistema como en un detector selectivo del eluyente de la primera dimensión (2). De este modo se puede utilizar un sistema HPLC convencional y realizarle modificaciones menores para poder utilizarlo como la primera dimensión, acoplado a un detector selectivo como se muestra en la figura 3.1.2.

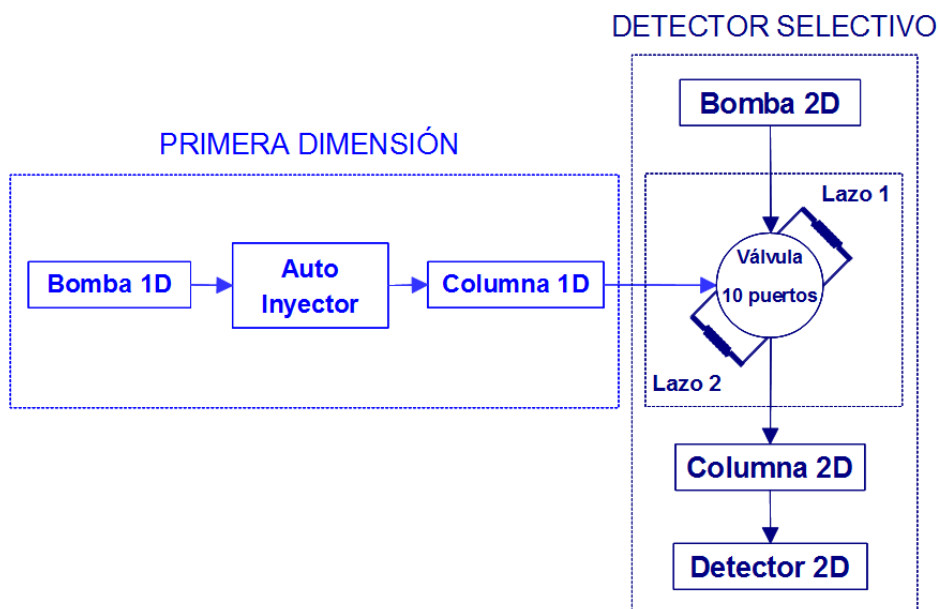


Figura 3.1.2 Diagrama de un sistema para realizar cromatografía líquida bi-dimensional en línea representando la primera dimensión como un equipo de cromatografía líquida de una dimensión convencional y la segunda dimensión como un detector selectivo.

Cuando consideramos a la segunda dimensión como un sistema cromatográfico para realizar LCxLC en línea hay aspectos claves a tener en cuenta. Los principales factores que fueron identificados y analizados en este trabajo son el dispositivo de muestreo o modulador, el sistema de bombeo de fase móvil, el sistema de termostatación y el detector. Todos estos componentes tienen un rol crítico para poder realizar LCxLC en-línea rápida y obtener gradientes reproducibles para el análisis con tiempos de ciclo menores a 20 segundos. El desarrollo de instrumentación de alta presión combinado con columnas de partículas muy pequeñas (menores a 2  $\mu\text{m}$ ) pone de manifiesto las limitaciones de los instrumentos convencionales de HPLC para realizar gradientes rápidos.

Ya que varios de los efectos que se van a discutir en los siguientes párrafos se basan en la observación de los cromatogramas bi-dimensionales, comencemos por interpretar la línea de base y las distintas representaciones de los datos.

Si consideramos un único cromatograma de un único ciclo de la segunda dimensión, notaremos que la línea de base es mucho más distorsionada que lo que se suele ver en un experimento de cromatografía líquida convencional. Esto se debe a que el gradiente debe ser muy rápido y los cambios en el índice de refracción y absorbancia de la fase móvil durante el gradiente afectan al detector óptico (3), en este caso uno de arreglo de diodos adquiriendo a 220 nm. La figura 3.1.3 muestra las distintas partes de la línea de base y la figura 3.1.4 muestra diferentes formas de representar un cromatograma de un blanco bi-dimensional en línea.

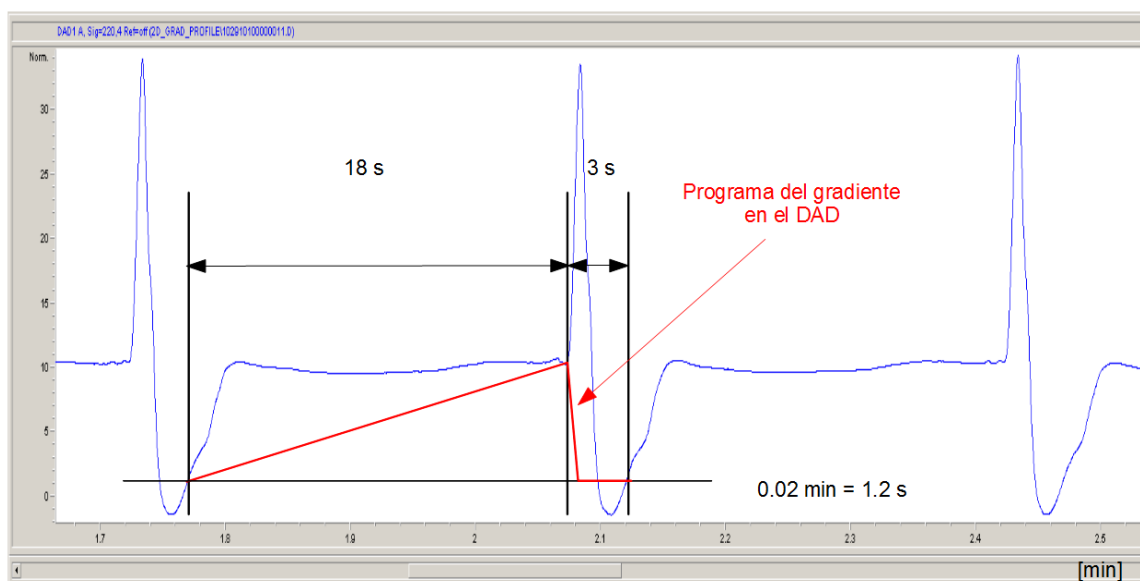


Figura 3.1.3 Descripción de la línea de base de la segunda dimensión en un tiempo de ciclo de 21 s con un tiempo de gradiente de 18 s y 3 s de re-equilibrado a un caudal de 3.0 mL/min. La detección es a 220 nm con un ancho de ranura de 4 nm y sin referencia. El trazo rojo representa el programa lineal del gradiente de 0 – 100 % B utilizando en el canal A agua y en el canal B acetonitrilo. En este ejemplo, no hubo columna presente y la válvula no se rotó.

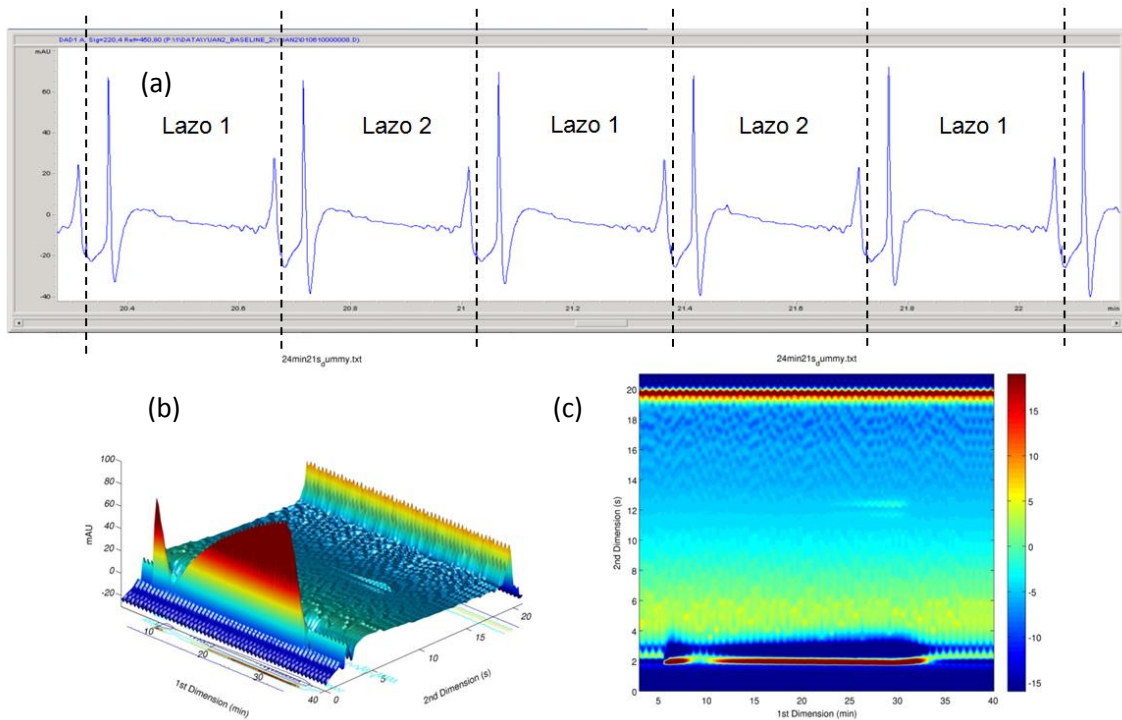
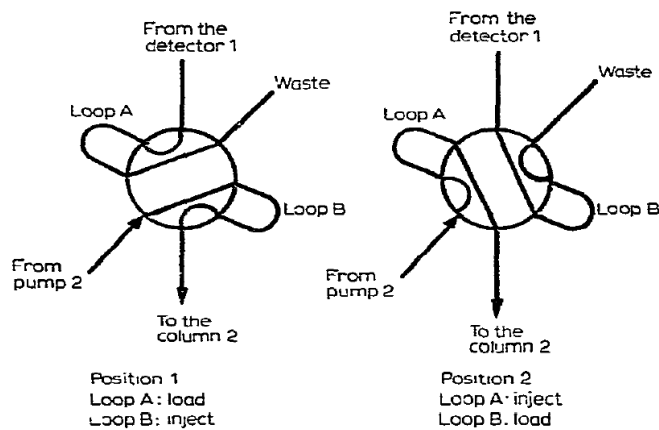


Figura 3.1.4 Distintas representaciones de los datos coleccionados durante una corrida cromatográfica bi-dimensional en línea. (a) cromatogramas de la segunda dimensión en serie como son adquiridos durante el experimento (b) representación en 3D utilizando Matlab (c) representación en gráfico de contornos utilizando Matlab.

## 3.2 Dispositivo de muestreo ó modulator

### 3.2.1 Evolución

La primera interface entre la primera y segunda dimensión fue utilizada en LCxLC por Erni y Frei en el año 1978 (4). La misma consistía en una válvula de 8 puertos configurada como se muestra en la figura 3.2.1.



**Fig. 3. Schematic diagram of an eight-port dual-loop injection valve for injection into the second column without loss.**

Figura 3.2.1 Diagrama de conexión de la válvula de 8 puertos utilizada en el primer experimento de cromatografía líquida bi-dimensional en línea publicado por primera vez por Erni y Frei (4).

Muchos años después, no parecieran haberse realizado grandes mejoras en este dispositivo de fundamental importancia. La principal configuración utilizada hoy en día por la casi totalidad de los trabajos que se encuentran en la literatura es la válvula de 10 puertos configurada como se muestra en la figura 3.2.2, y utilizada por primera vez por Jorgenson *et al.* (5) en el año 1990.



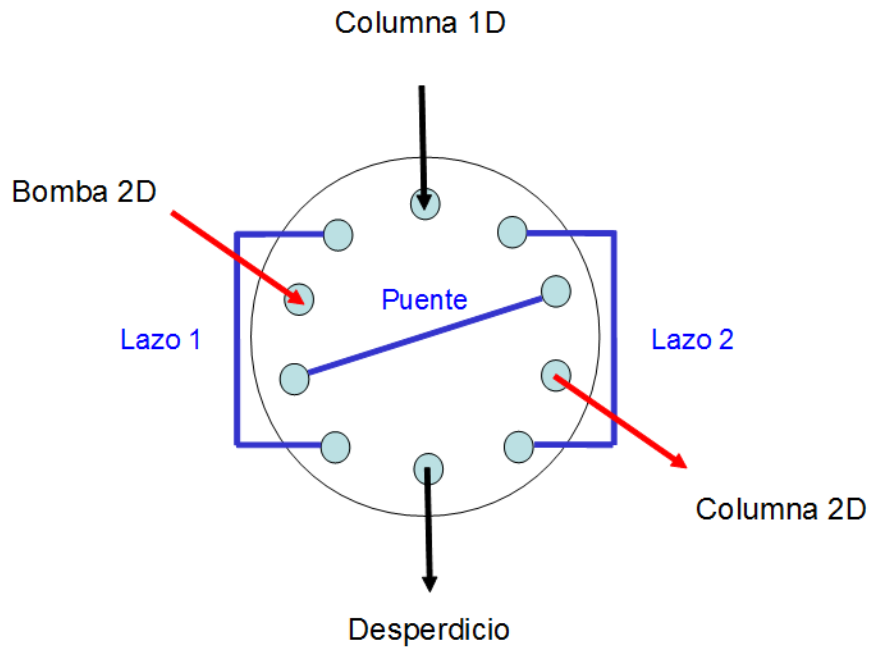


Figura 3.2.2 Diagrama de configuración y conexiones del dispositivo de muestreo (o modulador) más habitualmente utilizado en cromatografía líquida bi-dimensional en línea.

Si bien este diseño es adecuado en muchas aplicaciones, es fundamental entender sus características y limitaciones. Ya que la mayoría de los trabajos de LCxLC en línea utilizan tiempos de ciclo de varios minutos (con el terrible efecto de sub-muestreo que conlleva), los disturbios que se generan en los primeros segundos en la línea de base de cada corrida de la segunda dimensión, como parte del proceso de muestreo la primera dimensión, suelen ser ignorados o descartados. Como ya se ha expuesto en este trabajo, la velocidad de la segunda dimensión (2D) es crítica para obtener alta eficiencia en relativamente cortos tiempos de análisis y defectos en la línea de base de varios segundos causados por el dispositivo de muestreo, pueden hacer imposible la utilización de tiempos de ciclo del orden de segundos.

### **3.2.2 Características del modulador**

Las características fundamentales que se deben tener en cuenta en el diseño del modulador implementado a través de una válvula, son las siguientes:

1. No debe interrumpir el caudal durante su actuado. Si bien con el diseño de válvulas esto no es posible de evitar, ya que al tener que cambiar de posición indefectiblemente interrumpe el flujo de la fase móvil, esto se puede minimizar utilizando una muy alta velocidad de rotación de la válvula. Las válvulas neumáticas han sido por muchos años las que logran mayores velocidades de rotación y por lo tanto menores defectos en la línea de base.
2. Que el camino de la fase móvil y la muestra sea idéntico para las dos posiciones. Cualquier diferencia en el mismo, producirá una diferencia en el mezclado de la fase móvil o en el mezclado de la muestra con la fase móvil generando diferencias en la forma de los picos y en la línea de base durante ciclos consecutivos. Es importante tener en cuenta que los volúmenes de muestra que se transfieren de la primera a la segunda dimensión suelen ser grandes comparados con los volúmenes de las columnas utilizadas en la segunda dimensión (por ejemplo, 40  $\mu\text{L}$  inyectados en una columna con un volumen muerto de 70  $\mu\text{L}$  es habitual).

### **3.2.3 Configuración del modulador**

Cuando analizamos la configuración más frecuentemente utilizada en la válvula de 10 puertos (ver figura 3.2.3) podemos notar que la posición relativa del tubo utilizado como conexión (puente), cambia respecto a la posición del lazo que contiene la muestra.

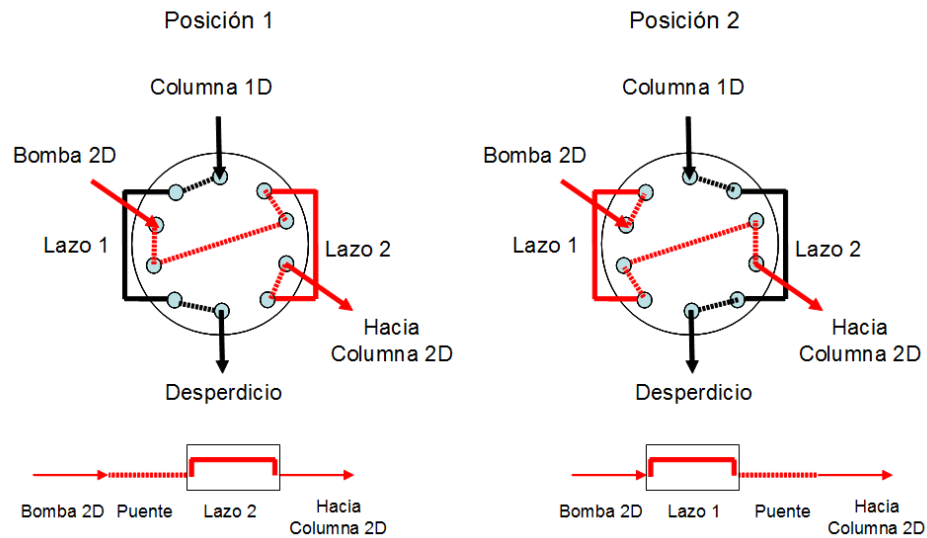


Figura 3.2.3 Arriba: diagrama de conexión usual de la válvula de 10 puertos. Abajo: detalle de la posición relativa del puente de conexión respecto de los lazos en ambas posiciones.

Esto no sólo genera una diferencia en el mezclado de la muestra con la fase móvil, sino que también introduce una diferencia en la posición relativa de los lazos conteniendo la muestra, respecto al puente. Si bien a primera vista parece que el volumen de este tubo de conexión es despreciable, veremos que no sólo es significativo, sino que es un factor importante en la reproducibilidad del tiempo de retención de los componentes inyectados en la segunda dimensión. Este efecto es más importante cuanto menor es el caudal utilizado en la segunda dimensión, y cuanto mayor es el volumen del tubo de conexión. Algunos valores estimados del desplazamiento de los máximos se muestran en la tabla 3.2.1.

Tabla 3.2.1 Cálculo del corrimiento de un pico en la segunda dimensión para algunos ejemplos utilizando distintos caudales y diámetros internos del tubo utilizado como puente en la figura 3.2.3

Caudal 2D [mL/min]	Diám. Interno Puente [pulg]	Volumen [uL] Puente 10 cm	Corrimiento [min]	Corrimiento [ms]
3.0	0.005	1.3	0.00043	26
3.0	0.007	2.5	0.00083	50
2.0	0.005	1.3	0.00065	39
2.0	0.007	2.5	0.00125	75
1.0	0.005	1.3	0.0013	78
1.0	0.007	2.5	0.0025	150

Cuando se utiliza una válvula de 8 puertos como la que se muestra en la figura 3.2.1, pareciera tener la ventaja de ser “simétrica” respecto a la configuración. Sin embargo, podemos notar que el vaciado de los lazos se realiza en sentido inverso para un lazo respecto del otro. Esto hace que la posición de la muestra en cada uno de los lazos sea diferente si consideramos que las bandas muestreadas en la primera dimensión pueden ser angostas, y que no se trabaja a lazo completamente lleno, para evitar pérdida de muestra debido al perfil parabólico de la fase móvil. La solución que se propone en este trabajo es un nuevo diseño de válvula de 8 puertos con una disposición simétrica y concéntrica como la del esquema que se muestra en la figura 3.2.4.

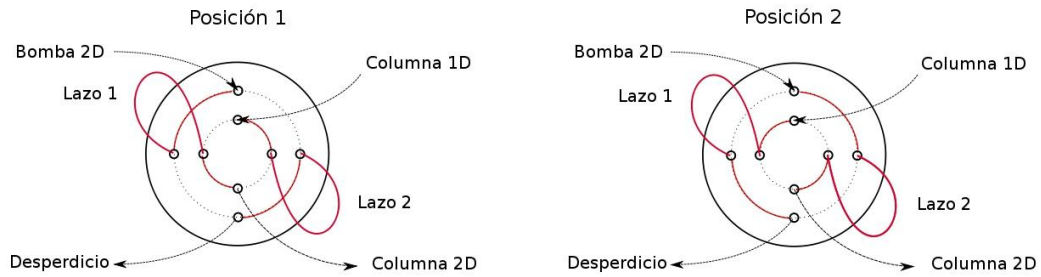


Figura 3.2.4 Prototipo propuesto de válvula concéntrica simétrica de 8 puertos.

Este diseño hace que tanto el llenado como el vaciado de los lazos se realice en la misma dirección para ambos casos, sin existir ningún tubo de unión como en la válvula de 10 puertos. Está válvula no existe en el mercado actual y no fue fabricada aún para poder mostrar sus beneficios; una configuración similar puede ser lograda con dos válvulas de cuatro puertos (válvulas 2x4) como se muestra en la figura 3.2.5. El hecho de utilizar dos válvulas tiene la desventaja de tener el doble de partes móviles y la posibilidad de que se desgasten de forma diferente con el tiempo, si bien aquí son adecuadas para demostrar el principio.

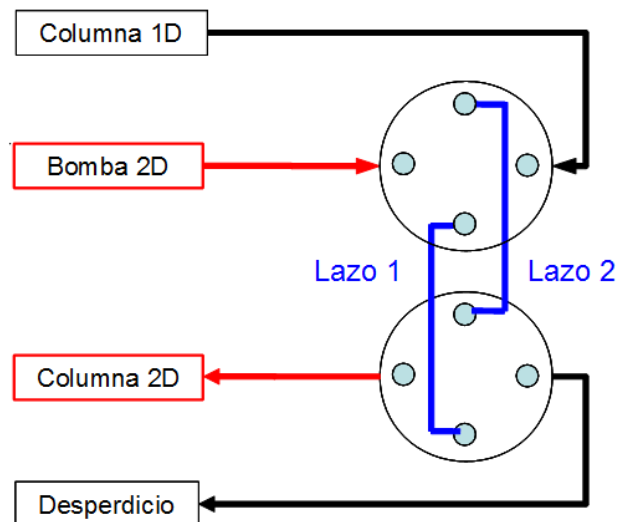


Figura 3.2.5 Configuración de 2 válvulas de 4 puertos para emular el funcionamiento de la válvula de 8 puertos concéntrica y simétrica. Nótese que esta configuración no posee puente como la configuración de la válvula de 10 puertos de la figura 3.2.2.

Finalmente, como se mencionó entre las características deseadas para un dispositivo modulador, la velocidad es esencial. Las válvulas más rápidas que se encuentran disponibles en el mercado actualmente son de tipo neumáticas. La velocidad de rotación especificada por el fabricante es del orden de los 10 ms cuando se utiliza helio a 100 psi para accionar el mecanismo. En el instrumento utilizado, se probó variar la presión de helio hasta un valor de 50 psi sin notar un efecto en el cromatograma. En comparación, las válvulas accionadas por un motor eléctrico de última tecnología logran tiempos de rotación de unos 250 ms, habiendo algunas reportadas en el orden de los 150 ms. La siguiente figura muestra el efecto en la línea de base de la segunda dimensión, para un tiempo de ciclo de 21 s, cuando se utiliza una válvula electrónica y una neumática. Como se puede notar en la figura siguiente, al comienzo de cada ciclo, la distorsión en la línea de base causada por la válvula más lenta (trazo rojo) es mucho mayor que para la válvula más rápida (trazo azul).

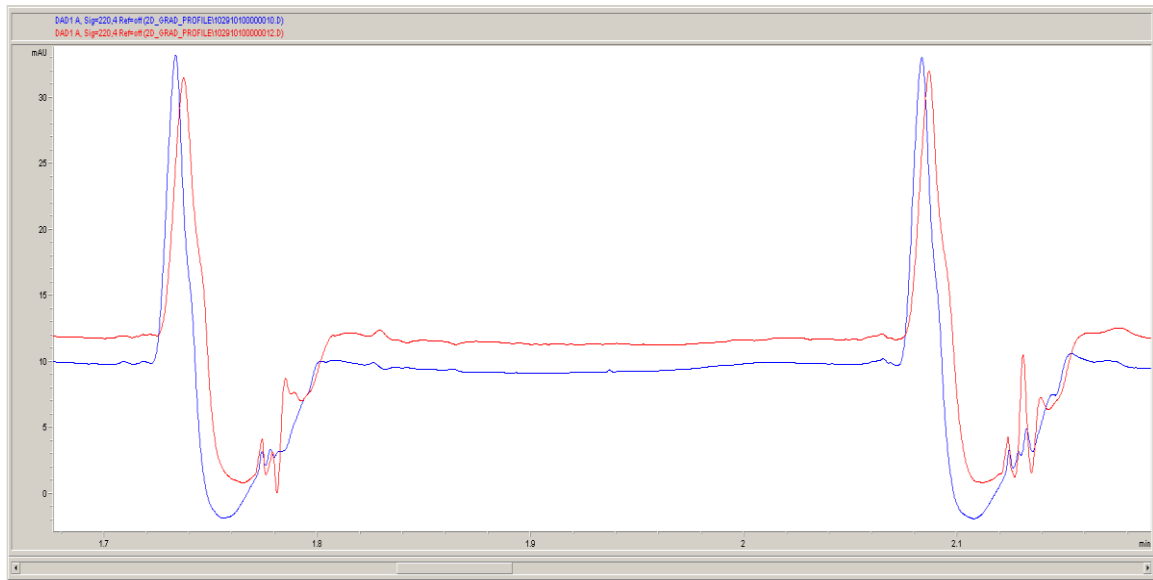


Figura 3.2.6 Comparación en la distorsión generada por dos válvulas diferentes bajo las mismas condiciones. La línea roja corresponde a una válvula electrónica Rheodyne MX II con un tiempo de rotación de unos 250 ms. La línea azul corresponde a una válvula neumática VICI C72X accionada con helio a 80 psi y un tiempo de rotación estimado en unos 20 ms. Gradiente de la segunda dimensión es 0 a 100 % B en 18 s, el tiempo de re-equilibrio es de 3 s. Caudal de 3 mL/min. Inyección de 34  $\mu$ L de agua. No hay columna instalada.

### 3.3 Sistema de bombeo

Como se ha mencionado en la sección 1.2.3, la modalidad en gradiente permite alcanzar mayor capacidad de picos que en modo isocrático. Sin embargo, los aspectos relacionados al diseño de la bomba a tener en cuenta son considerablemente más complejos. Mientras que en modo isocrático, uno puede simplemente preparar la fase móvil con la composición deseada de forma externa y utilizar una única bomba, para elución en gradiente la mezcla de los componentes individuales de la fase móvil debe ser generada durante la corrida; por lo tanto comienzan a tener importancia factores como la capacidad del mezclado de los solventes, diferencias de compresibilidad de cada uno de los solventes, contracción de volumen durante el mezclado (6), cambios de temperatura a raíz de la generación de calor de mezclado, etc. A

primera vista un gran mezclador, situado estratégicamente antes del inyector, debería ser la solución a muchos de estos problemas. Sin embargo, grandes volúmenes de mezclado también producen una gran resistencia a los cambios de composición de la fase móvil, limitando la “velocidad” del gradiente. Por velocidad entendemos a la capacidad del sistema por producir un cambio de composición grande en un tiempo (o volumen) reducido. Cuando comparamos las características del gradiente de la primera y la segunda dimensión, se hace evidente que en la segunda dimensión el cambio de composición y re-equilibrado del sistema deben ser extremadamente rápidos. Si bien se puede obtener un importante aumento en el poder de separación optimizando la primera dimensión como se discutió en el capítulo 2.2, el hecho de no poseer un sistema de bombeo adecuado para la segunda dimensión puede arruinar por completo cualquier intento de utilizar tiempos de ciclos del orden de algunas pocas decenas de segundos. Por este motivo, esta sección se centrará en las necesidades para el sistema de bombeo de la segunda dimensión. Como se puede observar en la figura 3.3.1, cuando se programa un gradiente en el sistema cromatográfico, hay una demora en el tiempo que tarda en llegar el mismo hasta la columna. Esto se lo conoce como tiempo de demora de gradiente (del inglés: *delay or dwell time*). Estrictamente, se lo debe definir en función del volumen.



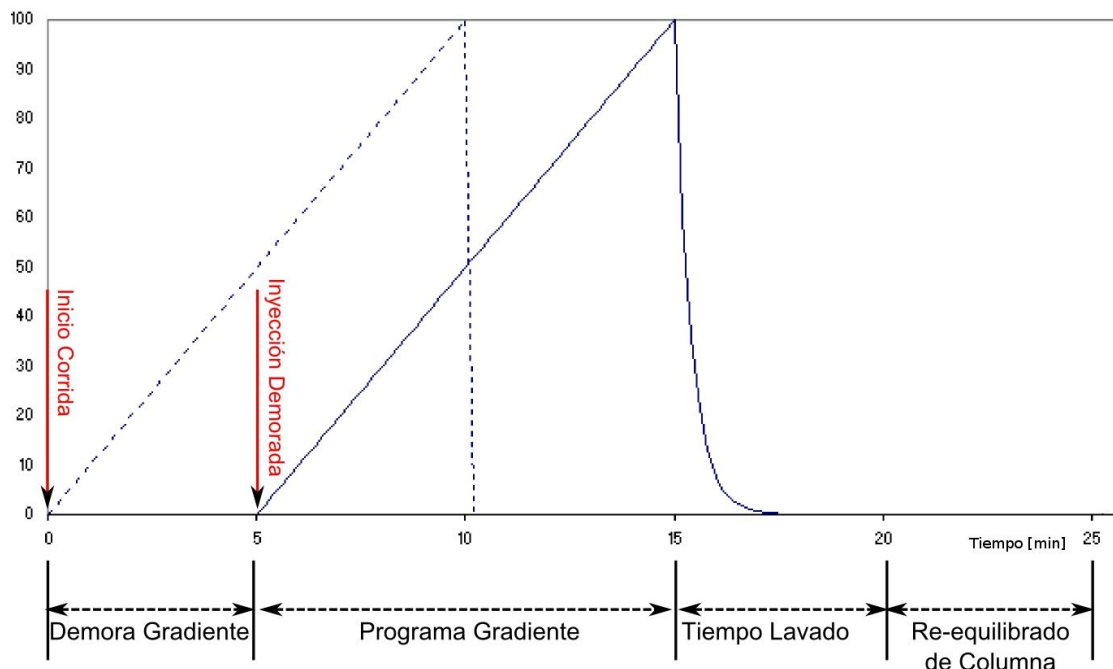


Figura 3.3.1 Diagrama de sucesos en elución en gradiente. Cuando se produce el inicio de la corrida, la bomba comienza el gradiente (línea azul a guiones). Si uno desea inyectar al comienzo del gradiente, puede utilizar la inyección demorada. En este ejemplo, el volumen de demora del gradiente es de 1.0 mL y el caudal utilizado es de 0.2 mL/min. Una vez finalizado el gradiente, hay un tiempo de enjuague del sistema con el solvente inicial del gradiente y luego un tiempo de re-equilibrado de la columna.

También podemos notar que al finalizar el gradiente programado y re-establecer las condiciones del solvente inicial, hay una demora que se conoce como tiempo de lavado (del inglés: *flush-out time*). Si bien estos conceptos están muy relacionados, es importante notar que el volumen de demora es, por definición, el volumen total entre el punto de mezclado de los dos solventes del gradiente en la bomba hasta la entrada de la columna; el tiempo de lavado depende principalmente del volumen y de las características de diseño del componente mezclador. Analicemos un ejemplo para mostrar de forma más clara el efecto. Es en general aceptado que se necesitan dos veces el volumen de demora de gradiente para lavar el sistema de bombeo y volver a las condiciones del solvente inicial en el gradiente. Supongamos un

sistema de bombas con un volumen de demora de gradiente de 1.0 mL. Si se utiliza un caudal de 0.2 mL/min nos llevaría aproximadamente 5 min lavar el sistema de bombeo. Si bien esto podría ser aceptable en un análisis de 20 min, hace que sea imposible realizar un análisis en el orden de 30 s con un gradiente de 0-100 % como se propone para cada ciclo de la segunda dimensión en este trabajo, sin importar el caudal que se intente utilizar. Por esta razón, no solo se utilizan caudales muy elevados en la segunda dimensión, sino que es crítico maximizar la eficiencia del mezclador utilizando uno del menor volumen posible. Por supuesto, hay una relación de compromiso entre la efectividad en el mezclado y el volumen del mismo. Como podemos ver en la figura 3.3.2, al utilizar un mezclador “casero” construido relleno con perlas de vidrio un guarda-columnas, se logra un volumen de mezclado de unos 25  $\mu$ L pero se pueden observar defectos en el perfil de la línea de base que son más reducidos en mezcladores más modernos y de similar volumen. Parte de las mejoras que se realizaron a un equipo bi-dimensional fue reemplazar la bomba que se utilizaba en la segunda dimensión para reducir considerablemente el ruido de la línea de base. La bomba que estaba en funcionamiento era una Agilent 1100 a la cual se le había reemplazado el mezclador original, que tiene un volumen de 400  $\mu$ L, por uno realizado con un guarda columnas con perlas de vidrio de 1 mm. Por otro lado, el amortiguador de pulsos que viene incorporado en la bomba, que tiene un volumen interno considerable, había sido conectado solamente a través de uno de los canales (es decir, antes del punto de mezclado). El amortiguador de pulso no puede ser eliminado del circuito en esta bomba ya que el sensor de presión está integrado a él; si el sensor de presión no se encuentra presente, la bomba no funciona (sin mencionar los riesgos de no tenerlo). La bomba utilizada para la mejora fue una Agilent 1200, la cual posee el sensor de presión separado del amortiguador de pulsos. Respecto al mezclador, es importante notar que la eficiencia de mezclado necesario queda determinada también por las características del gradiente y de la fase móvil utilizada. El

mezclador original se reemplazo por uno de mejor tecnología construido también por Agilent. El nombre del producto es JetWeaver V35 y tiene un volumen interno de aproximadamente 35  $\mu\text{L}$ . Si bien el volumen fue mayor que los aproximadamente 25  $\mu\text{L}$  del mezclador casero antes mencionado, la eficiencia del mezclado es muy superior. En la figura 3.3.2 se muestra la comparación de la línea de base cuando se utiliza la bomba Agilent 1100 y solamente se cambia el mezclador utilizado. Se puede notar que si bien el volumen del mezclador JetWeaver V35 es solo 10  $\mu\text{L}$  mayor, la eficiencia en el mezclado es muy superior, casi eliminando los pulsos generados por la falta de mezclado de ambos canales de la bomba.

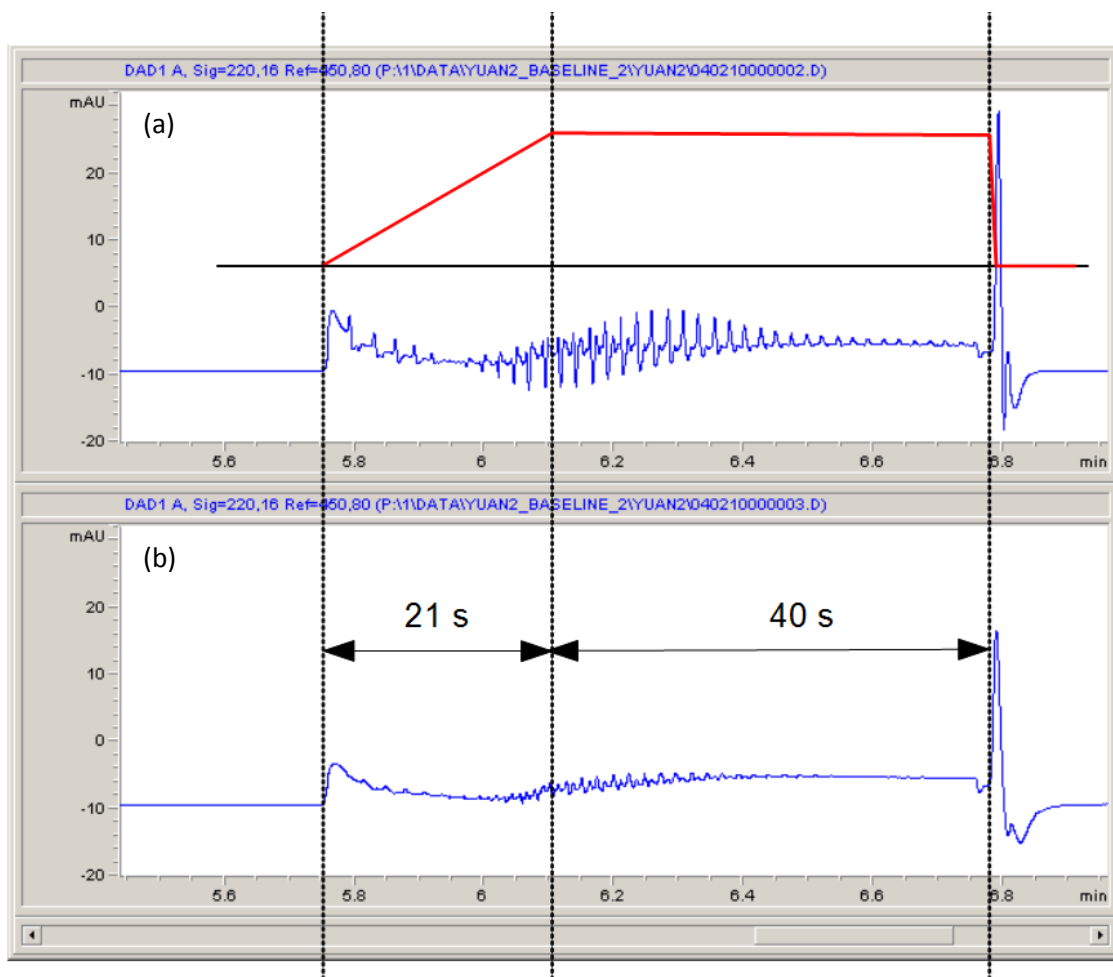


Figura 3.3.2 Comparación de la línea de base utilizando dos mezcladores diferentes en el sistema de bombeo de la segunda dimensión. La bomba es Agilent 1100 con el amortiguador de pulsos conectado en un solo canal. (a) Mezclador casero de 25  $\mu$ L (b) mezclador JetWeaver V35. La línea roja representa el programa de gradiente utilizado. Canal A: agua, canal B: acetonitrilo; El programa comienza con 100 % A y luego 0-100 % B en 21 s. Luego se mantiene en 100 % B durante 40 s y vuelve a 100 % A. La detección se realizó a 220 nm.

En el caso de las fases móviles que utilizan ácido trifluoroacético, se ha mostrado la necesidad de utilizar mezcladores excesivamente más eficientes que para la mayoría de las otras fases móviles utilizadas típicamente en fase reversa. Por esta razón, varios fabricantes de equipamiento moderno que utilizan mezcladores pequeños, ofrecen además un mezclador alternativo de mayor tamaño, exclusivamente para este tipo de aplicación.

Un enfoque utilizado en varias ocasiones para reducir el re-equilibrado del sistema de bombeo de la segunda dimensión consiste en duplicar el equipamiento. Por ejemplo, para reducir el tiempo de re-equilibrio del sistema a un mínimo, se pueden utilizar dos sistemas de bombeo de forma alterna y así, mientras un sistema de bombeo realiza el gradiente en la segunda dimensión, el otro sistema se re-equilibra. Varios ejemplos citados en la literatura han utilizado este principio para aumentar la velocidad de análisis de la segunda dimensión (y por tanto la de muestreo de la primera dimensión). En nuestra experiencia, la simplicidad es clave para poder obtener experimentos reproducibles y evitar costos excesivos de recursos para la puesta en marcha y el mantenimiento de sistemas LCxLC. La práctica muestra que no es simple lograr que un único equipo, con un único sistema de bombeo y una única columna se comporte de forma reproducible a mediano plazo. En el caso de utilizar dos sistemas paralelos en la segunda dimensión, ya sea de bombas, columnas o ambas, es excesivamente complicado lograr que se comporten de forma igual y consistente a lo largo del tiempo. Por esta razón, este enfoque solo se menciona por completitud, pero no se lo recomienda ya que se considera fundamental reducir la complejidad del sistema y maximizar la reproducibilidad en una técnica analítica.

### **3.4 Sistemas de termostatación de la columna y alta temperatura**

La estrategia destacada durante este trabajo para acelerar la velocidad de la segunda dimensión, es el uso de alta temperatura. Para esto, es crítico seleccionar un sistema de termostatación adecuado y conocer las limitaciones del mismo. La mayoría de los hornos comerciales para cromatografía líquida suelen alcanzar temperaturas de hasta 80 °C. Algunos más modernos pueden llegar hasta 100 °C, pero son muy pocos los que logran alcanzar temperaturas de hasta 200 °C (7). En la mayoría de los experimentos realizados durante esta tesis, la temperatura de la segunda dimensión fue de 110 °C. Hay dos grandes problemas con

el uso de elevadas temperaturas que se deben minimizar, y los cuales tienen consecuencias diferentes. El primero y más clásico es la variación de la temperatura. Si la temperatura de la columna y de la fase móvil que ingresa en la misma no permanece constante, la reproducibilidad en los tiempos de retención se verá negativamente afectada como también puede ser afectada la línea de base (8). Por lo tanto, mantener la temperatura lo más estable posible, es de fundamental importancia. En el caso que se utilice un gradiente de temperatura, la reproducibilidad del mismo será crítica para lograr la mejor reproducibilidad posible en los tiempos de retención. Este problema se presenta tanto a bajas como a altas temperaturas y es en general bien conocido entre los cromatografistas. El segundo y no tan conocido problema, es la diferencia de temperatura entre la columna y la fase móvil que ingresa en la misma (9). Ya fue demostrado que, dependiendo de las dimensiones de la columna, de su permeabilidad (esto es, del diámetro de partículas del relleno) y del caudal de fase móvil, si existe una diferencia de temperatura, se genera un gradiente de temperatura radial (alterando la viscosidad de la fase móvil y los factores de retención) y el pico cromatográfico se distorsiona. Esta diferencia es de aproximadamente 5 °C o mayor para columnas de 4.6 mm de diámetro rellenas con partículas porosas de 5 µm (10). La forma de evitar este problema es precalentando la fase móvil a la misma temperatura de la columna antes de que ingrese a la misma. Esto indica que no solamente se ha de tener en cuenta la temperatura a la cual se desea trabajar, sino también el caudal necesario. La longitud y diámetro del tubo utilizado para el pre-calentamiento, y el tipo de contacto con el elemento termostatizador, son determinantes de la temperatura y caudal máximos al cual el horno podrá ser utilizado sin generar una diferencia de temperatura considerable entre la fase móvil ingresante y la columna. Un aspecto clave a tener en cuenta, es el diámetro interno de la columna utilizada. Cuanto menor sea el mismo, menor es la posibilidad de generar un gradiente de temperatura radial en la columna y más efectiva será la termostatación de la misma. El otro aspecto

importante es el método de termostatación de la columna elegido. Existen tres principios diferentes de termostatación (7):

1. Calentamiento en baño de aire: Este principio era casi exclusivamente utilizado en los primeros equipos para cromatografía líquida y, lamentablemente, aún hay algunos equipos comerciales que lo utilizan. Es un método muy poco eficiente porque el tiempo para alcanzar el equilibrio, dependiendo las condiciones utilizadas, puede llegar a ser de hasta 60 min a temperaturas cercanas a la ambiente. Incluso, si se utiliza un tubo de “precalentamiento” de la fase móvil, si el baño es de aire, la efectividad será muy baja. La razón principal es que el aire es un buen aislante.
2. Calentamiento en baño líquido: En este caso, el contacto entre la columna y el fluido de termostatación es muy efectivo. Se puede utilizar agua hasta temperaturas de unos grados por debajo de su punto de ebullición, o también aceites de siliconas que pueden ser utilizados sin problemas hasta 200 °C. Si además se utiliza para precalentar la fase móvil un tubo de acero inoxidable de unos 15 cm y 0.005 pulgadas de diámetro interno, se puede estar seguro de no tener problemas de ensanchamiento de banda por diferencia de temperatura entre la columna y la fase móvil hasta los 200 °C utilizando caudales de hasta 4 mL/min. Los principales inconvenientes de esta forma de calentar son: a) la incomodidad y poca practicidad al momento de cambiar la columna cromatográfica; b) el espacio que ocupa el baño de termostatación y la longitud de los tubos necesarios para realizar las conexiones.
3. Por contacto metálico: Si se utiliza una pieza metálica, como de cobre o aluminio para encapsular la columna cromatográfica, se puede lograr un dispositivo muy compacto y excelente para controlar la temperatura de la columna. Una ventaja importante de este modo de calentamiento es que se puede cambiar la temperatura de forma

relativamente rápida en comparación al método 2, ya que la inercia térmica asociada a la masa del elemento calefactor es mucho menor. También en este caso sigue siendo fundamental precalentar la fase móvil. El mayor inconveniente de este método es que se necesita una camisa metálica para cada tipo de columna utilizada, lo cual puede encarecer considerablemente o incluso limitar las opciones.

Aunque no ha sido utilizado en este trabajo, se pueden utilizar gradientes de temperatura para modificar la retención de los analitos en el tiempo, de forma “similar” a las temperaturas programadas que se emplean en cromatografía de gases y con un efecto similar al aumento en la concentración del modificador orgánico. Para implementar estos gradientes, solo el tercer modo de calefacción antes presentado sería el adecuado.

Por último, es importante tener en cuenta las características del detector conectado luego de la columna. Algunos detectores pueden operarse a altas temperaturas, donde incluso mejoran su sensibilidad (espectrómetro de masas, por dispersión de luz, etc.). Otros detectores requieren que el eluyente se encuentre a temperaturas cercanas a la ambiente. Algunos hornos modernos diseñados para alta temperatura, utilizan un intercambiador de calor entre el tubo de entrada de la fase móvil a la columna y el de la salida hacia el detector. Esta implementación tiene la gran ventaja de aprovechar la diferencia de temperatura entre la entrada y la salida para lograr los dos objetivos: precalentar la fase móvil antes de la columna y de enfriarla a la salida de la misma.

### **3.5 Características del detector**

Al momento de utilizar un detector para LCxLC hay que tener en cuenta no solamente los aspectos clásicos de compatibilidad con la fase móvil y la muestra sino que además, al realizar gradientes muy rápidos a caudales elevados, los picos a detectar son muy angostos (ancho en la base menores a 0.5 s). Esto conlleva la necesidad de utilizar celdas de detección



de volúmenes muy pequeños y con una muy elevada frecuencia de muestreo para minimizar los efectos de ensanchamiento de banda en el detector. De la variedad de detectores que se encuentran en el mercado para HPLC, prácticamente todos los de última generación ofrecen frecuencias de muestreo que rondan los 100 Hz. Detectores de múltiples canales como el de Arreglo de Diodos (DAD), de Espectrometría de Masas (MS) y Fluorescencia tienen una gran ventaja que es la selectividad y agregan una “tercera dimensión” de separación que puede ser aprovechada con técnicas quimiométricas adecuadas. Sin embargo, detectores como los de tipo electroquímicos pueden ofrecer en ciertos casos mayor sensibilidad y selectividad. Siendo que las características y beneficios de todos estos detectores se encuentran bien documentadas y publicitadas por sus fabricantes, se discutirán principalmente las particularidades de algunos de ellos en su acoplamiento con un sistema rápido de LCxLC en línea.

El detector MS tiene la formidable característica de ser extremadamente selectivo. Esto hace que su uso en algunas áreas sea indispensable para la identificación de los componentes en la muestra. Este es el caso en proteómica y otras áreas de la bioanalítica. Sin embargo, ciertas características de la segunda dimensión pueden complicar el uso de tal detector. Ya que es fundamental que el tiempo de análisis de la segunda dimensión sea corto, se suelen utilizar caudales de varios mililitros por minuto. El hecho que la fase móvil sea líquida implica que la muestra debe ser vaporizada para introducir los analitos en el detector. Esto restringe el caudal máximo en muchos de ellos a menos de un mililitro por minuto. Muchos investigadores optan por utilizar un divisor de caudal para reducir el caudal al detector pero esto afecta de forma muy negativa la reproducibilidad en la cuantificación. Los detectores de MS tienen en general una tasa de muestreo más reducida que los ópticos y puede reducirse mucho dependiendo el rango de masas que se esté analizando. En el caso de detectores de MS acoplados, como ser los de triple cuadrupolo, éste valor puede ser demasiado bajo para

ser aceptable cuando los picos son muy angostos. Una particularidad de mayor importancia en la combinación de detectores de MS con la cromatografía bi-dimensional, es que muchas fases móviles que son incompatibles para LC-MS por sus efectos de supresión en la ionización, podrían ser utilizados en LCxLC-MS ya que al ser utilizados en la primer dimensión, son separados como solvente de inyección en la segunda dimensión, permitiendo la correcta ionización de los analitos.

En el instrumento utilizado en este trabajo se compararon detectores DAD. Estos detectores, si bien no se comparan con un detector MS en la selectividad e información estructural que puede proveer, tienen ventajas importantes en cuanto a reproducibilidad, compatibilidad con la fase móvil, costo de adquisición y costo de mantenimiento. Estas dos últimas, constituyen la razón principal que determinan su utilización masiva junto con los detectores UV-VIS. En el caso de su aplicación como detector en la segunda dimensión, hay que tener en cuenta que un cambio de composición de la fase móvil produce un cambio en el índice de refracción que se refleja en una señal que perturba la línea de base. Estos cambios de composición pueden ser de dos tipos:

1. Falta de mezclado de la fase móvil: como se mencionó anteriormente en la sección de la bomba, para realizar gradientes rápidos, es necesario comprometer el sistema de mezclado. Si el mezclado no es suficiente, producirá disturbios en la línea de base que se pueden asemejar mucho a picos cromatográficos y pueden ser muy difíciles de distinguir.
2. Cambio de composición por el gradiente: este cambio de composición es inevitable en la técnica de gradiente y determina la forma tan particular de la línea de base observada en los experimentos. Ese efecto ha sido un problema por muchos años en HPLC y se ve extremadamente acentuado en gradientes rápidos

(menores a 30 s) con cambios de composición de 0 a 100% del solvente orgánico. Sin embargo, una gran ventaja de LCxLC es que son muchas las inyecciones que se realizan en la segunda dimensión. Suponiendo un sistema que funcione en condiciones reproducibles, se puede utilizar la redundancia de la información de la línea de base para hacer una corrección adecuada y así mejorar radicalmente el proceso de detección y cuantificación de los picos cromatográficos como se detalla en el capítulo V.

Es por esta razón que es deseable que un detector óptico utilizado en LCxLC sea lo más inmune posible a los cambios de índice de refracción. En el caso de los detectores utilizados en este trabajo, se ve una importante mejora en la sensibilidad del detector Agilent Infinity 1290 respecto al modelo Agilent SL 1200 plus tanto en su comportamiento respecto al índice de refracción, como en la relación señal ruido para el mismo volumen de celda de 1.0  $\mu\text{L}$ . En el pasado ha habido diseños de detectores de fabricantes como Waters que aseguran gran inmunidad al cambio de índice de refracción, pero el volumen de la celda hace que no sea adecuado para los pequeños picos que se deben analizar.

### **3.6 División de caudal activa**

En la sección 2.2 se discutió la optimización de la cromatografía líquida bi-dimensional en línea utilizando división de caudal luego de la columna de la primera dimensión. Sin embargo, la división de caudal utilizando una “T” de acero no es en sí ninguna novedad y es utilizada muy habitualmente para reducir el caudal que recibe un detector de masas acoplado a un cromatógrafo líquido. Lo novedoso fue su aplicación para optimizar de forma independiente la primera dimensión, y la implementación en el instrumento con una tercera bomba que permite controlar con alta precisión el volumen de muestra que se transfiere a la

segunda dimensión. A continuación se muestra un diagrama detallado de los componentes utilizados en el sistema optimizado.

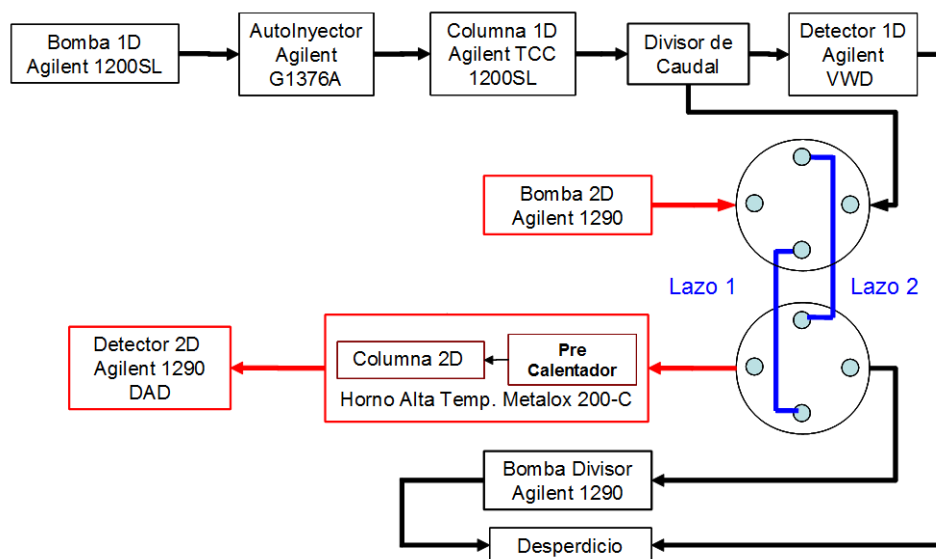


Figura 3.6.1 Detalle de componentes utilizados para el instrumento totalmente optimizado para cromatografía líquida bi-dimensional en línea.

Como se puede notar en la figura, la bomba del divisor está ubicada después de las válvulas y actúa como un restrictor del caudal. En este caso fue implementado con una bomba Agilent 1290 Infinity lo cual es exageradamente caro para el propósito. La recomendación sería utilizar una bomba de jeringa que posee una excelente precisión en el control de caudales en el rango que se necesita ( $10 - 150 \mu\text{L}/\text{min}$ ) y tienen un costo de la décima parte respecto de la bomba que se utilizó.

### 3.7 Conclusiones

Como se mostró en la figura 3.6.1, con los conocimientos adquiridos estudiando el funcionamiento y efecto de cada una de las partes del cromatógrafo líquido bi-dimensional,

se ensambló un equipo completamente nuevo con todas las implementaciones antes mencionadas. A saber:

La primera dimensión es un sistema de cromatografía convencional, conectada a un divisor de caudal y luego a un par de válvulas de 4 puertos, actuadas neumáticamente, que emulan una configuración similar a la que se obtendría con una válvula de 8 puertos concéntrica como se mostró en la figura 3.2.4. Las válvulas se conectaron luego con la bomba del divisor para poder controlar de forma precisa el caudal que circula a través de los lazos y por lo tanto la relación de división de caudales.

En la segunda dimensión se utilizó una bomba de última generación Agilent 1290 con un mezclador JetWeaver V35. El horno utilizado fue uno diseñado especialmente para alta temperatura, con un sistema de precalentamiento de la fase móvil e intercambiador para enfriar el eluyente de la columna. El detector utilizado fue un Agilent 1290 Infinity con un nuevo diseño de celda basado en fibra óptica, que tiene un camino óptico de 6 mm para una celda de 1.0  $\mu\text{L}$ . Este detector es menos sensible a los cambios de índice de refracción y posee mejor relación señal/ruido que el utilizado en el instrumento anterior (Agilent 1200 SL plus). El resultado fue un sistema con una excelente reproducibilidad, una línea de base con menos artefactos y mejor sensibilidad. La siguiente figura muestra de forma cualitativa los cromatogramas bi-dimensionales obtenidos, los que claramente reflejan la evolución que hubo en los sistemas que se optimizaron durante este trabajo.

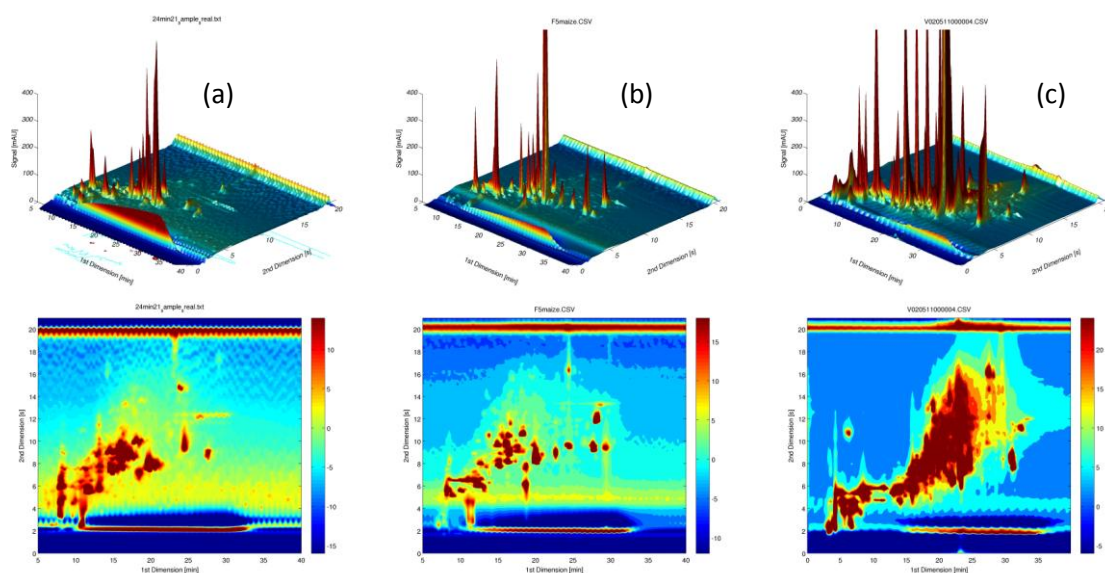


Figura 3.7.1 Comparación de los tres sistemas optimizados. En los tres casos la inyección corresponde a nominalmente la misma muestra de extracto de maíz. La detección se realizó en los tres casos a 220 nm; la fase de la segunda dimensión fue en todos los casos ZirChrom-CARB 3.0  $\mu\text{m}$  contenida en una columna de 33 x 2.1 mm que se mantuvo a 110 °C. El tiempo de ciclo fue de 21 s. En los tres casos mostrados, la diferencia radica mayormente en la bomba y el detector de la segunda dimensión: (a) bomba Agilent 1100 con un mezclador casero de 25  $\mu\text{L}$ , el amortiguador de pulsos conectado solo en el canal A y un detector Agilent 1200 SL; (b) bomba Agilent 1200 SL con un mezclador JetWeaver V35, sin amortiguador de pulsos y el mismo detector que en (a). En el equipo utilizado en (c) la bomba es Agilent 1290 con un mezclador JetWeaver V35 y un detector Agilent 1290 Infinity.

Los cromatogramas que se muestran en la figura fueron obtenidos de configuraciones que presentan las siguientes características: (a) posee en la segunda dimensión una bomba Agilent 1100 con el mezclador casero de 25  $\mu\text{L}$  y el detector Agilent 1200 SL. El sistema (b) es el cromatograma obtenido de la primera optimización realizada que consistió en utilizar una bomba Agilent 1200 SL en la segunda dimensión, a la cual se le reemplazó el mezclador original por un JetWeaver V35 (ver sección 3.3) y se removió el amortiguador de pulsos del circuito. La notable mejora fue la disminución en el ruido de la línea de base por la mejor

capacidad de mezclar la fase móvil del nuevo mezclador. Este efecto es especialmente notorio al comienzo y al final del gradiente de la segunda dimensión. Comparar la zona entre 14 y 19 s para (a) y (b). El instrumento correspondiente a (c) fue un equipo totalmente nuevo ensamblado durante este trabajo, y los componentes y conexiones son los mostrados en la figura 3.6.1. Este sistema es el que presenta mejor sensibilidad y menor ruido en la línea de base y es el sistema utilizado actualmente en los estudios cuantitativos.

### 3.8 Referencias

- (1) Stoll, D. R. Recent progress in online, comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for non-proteomic applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 979–986.
- (2) Stoll, D. R.; Li, X.; Wang, X.; Carr, P. W.; Porter, S. E. G.; Rutan, S. C. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1168*, 3–43.
- (3) Choiket, Konstantine; Rozing, Gerard The Physicochemical Causes of Baseline Disturbances in HPLC, Part I – TFA-Containing Eluents. *LC GC EUROPE* **2003**.
- (4) Erni, F.; Frei, R. W. Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures. *J. Chromatogr. A* **1978**, *149*, 561–569.
- (5) Bushey, M. M.; Jorgenson, J. W. Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 161–167.
- (6) Billen, J.; Broeckhoven, K.; Liekens, A.; Choiket, K.; Rozing, G.; Desmet, G. Influence of pressure and temperature on the physico-chemical properties of mobile phase mixtures commonly used in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1210*, 30–44.
- (7) Teutenberg, T. *High-Temperature Liquid Chromatography: A User's Guide for Method Development*; Royal Society of Chemistry, 2010.
- (8) Openhaim, G.; Grushka, E. Temperature-dependent refractive index issues using a UV–visible detector in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, *942*, 63–71.



- (9) Poppe, H.; Kraak, J. C. Influence of thermal conditions on the efficiency of high-performance liquid chromatographic columns. *J. Chromatogr.* **1983**, 282, 399–412.
- (10) Thompson, J. D.; Brown, J. S.; Carr, P. W. Dependence of Thermal Mismatch Broadening on Column Diameter in High-Speed Liquid Chromatography at Elevated Temperatures. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 3340–3347.

## Capítulo IV

### Desarrollo de fases estacionarias

#### 4 Introducción

En cromatografía líquida siempre ha sido de fundamental interés mejorar la eficiencia y la velocidad de la separación. Mayor eficiencia implica un aumento en el poder de separación y es objetivo fundamental de cualquier desarrollo de método aplicado a mezclas complejas en muestras farmacéuticas, proteómicas y metabolómicas. La creciente demanda de alta productividad ha tenido un rol fundamental en el desarrollo de separaciones rápidas y de nuevas fases estacionarias (1).

Al momento de seleccionar las fases estacionarias a utilizar para resolver una determinada separación, se debe comenzar por considerar la muestra a analizar. De acuerdo con su tamaño las muestras se clasifican en dos grandes grupos.

**Pequeñas moléculas:** Consideraremos como moléculas pequeñas a aquellas cuyos pesos moleculares se encuentran por debajo de los 2000 Da. En este grupo trabajamos principalmente con muestras metabolómicas compuestas de analitos relativamente hidrofílicos a moderadamente hidrofóbicos.

**Grandes moléculas:** En esta categoría ubicaremos a aquellas especies con pesos moleculares mayores a 2000 Da. El estudio de proteínas intactas o polímeros, y en general de todas las grandes moléculas, son un grupo de muestras que requieren un tratamiento y análisis muy diferente al de las pequeñas moléculas.

Este trabajo se centró en pequeñas moléculas. Como se mencionó en el capítulo I, una de las condiciones fundamentales para poder hacer buen uso del espacio bi-dimensional, es que la selectividad de las fases estacionarias en cada dimensión sea muy diferente. Al momento de estudiar las diferentes combinaciones de fases estacionarias que se pueden usar, las posibilidades son muy grandes. Sin embargo, entre los objetivos de esta parte del trabajo se encuentra facilitar la tarea de desarrollo del método al momento de realizar cromatografía líquida bi-dimensional en línea. Para esto, en este trabajo se decidió realizar cromatografía de fase reversa en ambas dimensiones. Las razones para esta decisión son principalmente la compatibilidad de fases móviles entre ambas dimensiones y la gran variedad de fases estacionarias disponibles. Se estima que al menos el 90 % de la cromatografía líquida que se practica hoy día se hace en fase reversa. Eso se debe a la gran cantidad de muestras que se pueden resolver por esta técnica y también por el buen entendimiento que en general existe sobre los mecanismos de separación. Sin embargo, el hecho de utilizar fase reversa en ambas dimensiones, puede hacer muy compleja la tarea de encontrar columnas de muy diferente selectividad u “ortogonales” en los mecanismos de retención hacia un dado analito.

Las columnas de carbono, como se detalla más adelante, poseen una serie de características que las hace una excelente elección para la segunda dimensión en cromatografía líquida bi-dimensional. Entre estas características se encuentra la gran diferencia de selectividad con respecto a casi la totalidad de las columnas ligadas de fase reversa, su gran poder de retención que ayuda a enfocar la muestra al ser inyectada en la segunda dimensión y su estabilidad química a muy elevadas temperaturas.

## 4.1 Estudio de la selectividad de la columna utilizada en la primera dimensión en cromatografía líquida bi-dimensional en línea

El primer paso es definir el criterio para seleccionar fases estacionarias que sean bien diferentes para este estudio.

### 4.1.1 Comparación de fases estacionarias

Un método muy conocido y sobre el cual existe una gran base de datos de columnas analizadas, es el Modelo de Substracción Hidrofóbica (HSM, del inglés: “*Hydrophobic Subtraction Model*”) para fase reversa desarrollado por Snyder *et al.* (2). Más de 400 columnas de fase reversa fueron caracterizadas utilizando los 5 parámetros de selectividad del modelo HSM. Estos son: hidrofobicidad ( $H$ ), factor estérico ( $S^*$ ), acidez por puente de hidrógeno ( $A$ ), basicidad por puente de hidrógeno ( $B$ ) y actividad de intercambio catiónico ( $C$ ). Con estos parámetros se puede utilizar el factor  $F_s$  para establecer la diferencia de selectividad entre dos fases estacionarias.  $F_s$  se define a través de la ecuación 4.1.1:

$$F_s = \{ [12.5(H_2 - H_1)]^2 + [100(S_2^* - S_1^*)]^2 + [30(A_2 - A_1)]^2 + [143(B_2 - B_1)]^2 + [83(C_2 - C_1)]^2 \}^{1/2}$$

Para poder comparar entre un gran número de fases estacionarias, Zhang *et al.* desarrollaron un método gráfico basado en el modelo HSM (3).

En la tabla 4.1.1 se muestran los valores de  $F_s$  para cada par de las columnas seleccionadas para este estudio. Los valores de  $F_s$  fueron calculados utilizando la ecuación anterior y los correspondientes parámetros del modelo HSM ( $H$ ,  $S^*$ ,  $A$ ,  $B$ , y  $C$ ) medidos de trabajos previos realizados en el grupo de Carr (datos no publicados). De acuerdo con Snyder *et al.*, valores de  $F_s$  de 3 o menores, indican columnas cuya selectividad es virtualmente idéntica. Si el valor de  $F_s$  es mayor a 30, el par de columnas se considera extremadamente diferente. En el caso de la

fase estacionaria de carbono, es tan diferente al resto de las fases estacionarias ligadas, que los parámetros característicos del modelo HSM no pueden ser utilizados para describirla. Las particularidades y detalles de los mecanismos de retención de las fases de carbono no están completamente elucidados (4) y tampoco son el objeto de este trabajo.

Tabla 4.1.1 Valores de  $F_s$  de las columnas seleccionadas utilizando el método HSM <sup>a</sup>

	C3 <sup>b</sup>	CN <sup>c</sup>	C8 <sup>d</sup>	HC-COOH <sup>e</sup>	F5 <sup>f</sup>	Bonus <sup>g</sup>
Bonus <sup>g</sup>	247	241	256	269	320	0
F5 <sup>f</sup>	75	80	68	54	0	
HC-COOH <sup>e</sup>	26	32	23	0		
C8 <sup>d</sup>	12	18	0			
CN <sup>c</sup>	7	0				
C3 <sup>b</sup>	0					

<sup>a</sup> Los valores de  $F_s$  fueron calculados en base a la ecuación 4.1.1 para un pH 2.8; cada valor de  $F_s$  compara las dos fases estacionarias de la fila y columna correspondiente.

<sup>b</sup> C3: Zorbax 300SB-C3 (partículas de 3.5  $\mu\text{m}$ ).

<sup>c</sup> CN: Zorbax SB-CN (partículas de 3.5  $\mu\text{m}$ ).

<sup>d</sup> C8: Zorbax 300SB-C8 (partículas de 3.5  $\mu\text{m}$ ).

<sup>e</sup> HC-COOH: fase sintetizada en el laboratorio HC-COOH por Zhang *et al.* (5) (partículas de 5  $\mu\text{m}$ ).

<sup>f</sup> F5: Discovery HS-F5 (partículas de 3  $\mu\text{m}$ ).

<sup>g</sup> Bonus: Zorbax Bonus-RP (partículas de 3.5  $\mu\text{m}$ ).

Como se puede ver en la tabla, la fase Bonus tiene una selectividad muy diferente a las otras cinco; el rango de  $F_s$  está entre 241 y 320 con respecto a las fases CN y F5 respectivamente.

La fase F5 es probablemente la segunda fase más diferente luego de la fase Bonus, todas con valores de  $F_s$  más grandes que 30. Snyder *et al.* se han referido a la fase F5 como a una de las más diferentes al resto. En general, las duplas que incluyen a la fase HC-COOH arrojan menores valores de  $F_s$  que las que incluyen a la fase F5, dos de las cuales (fases de C3 y C8) están por debajo de 30. También es interesante notar que los valores de  $F_s$  indican que separaciones en las fases C3, C8 y CN deberían ser similares a pesar de las importantes diferencias en la química de sus superficies. Los valores de  $F_s$  permiten realizar una elección de columnas con fases que tiene diferencias considerables en selectividad. Sin embargo, el otro criterio que se utilizó para seleccionarlas fue que tuviesen poca retentividad en comparación con la columna de la segunda dimensión. La fase C8 fue elegida porque representa a una de las fases estacionarias más comúnmente utilizadas en fase reversa y se encuentra cerca del centro de gravedad de las algo más de 400 fases estacionarias utilizadas para construir los gráficos.

## **4.1.2 Parte experimental**

### **4.1.2.1 Materiales y reactivos**

El acetonitrilo de grado cromatográfico fue adquirido de Burdick and Jackson (Muskegon, MI); agua del mismo grado fue de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El ácido fosfórico (>85%) fue adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y el ácido perclórico (70%) de Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ). Los patrones utilizados fueron los mismos utilizados para el estudio realizado en la sección 2.1.2. Los cartuchos de extracción en fase sólida utilizados para la preparación de las muestras fueron de C18 (500 mg) y de carbono (500 mg, SimpleQ) adquiridos de Agilent Technologies (Wilmington, DE).

#### **4.1.2.2 Preparación de las muestras**

Las muestras utilizadas en este estudio fueron el extracto de maíz, un concentrado de jugo y una muestra de orina. En todos los casos la preparación de la muestra fue exactamente igual al procedimiento descrito para el extracto de maíz en la sección 2.1.2, con la salvedad de que se partió inicialmente de una alícuota de 10 mL de muestra tanto para el jugo como para la orina.

El equipo para cromatografía bi-dimensional utilizado para este estudio fue el mismo descrito en la sección 2.1.3.

#### **4.1.2.3 Columnas cromatográficas seleccionadas**

Las seis columnas de fase reversa estudiadas para la primera dimensión fueron las siguientes: Discovery HS-F5 (Supelco, Bellefonte, PA, 2.1 mm x 10 cm, 3  $\mu$ m), Zorbax SB-C3 (Agilent Technologies; Wilmington, DE, 2.1 mm x 10 cm, 3.5  $\mu$ m), Zorbax SB-C8 (Agilent Technologies; Wilmington, DE, 2.1 mm x 10 cm, 3.5  $\mu$ m), Zorbax SB-CN (Agilent Technologies; Wilmington, DE, 2.1 mm x 5 cm (2), 3.5  $\mu$ m), Zorbax Bonus-RP (Agilent Technologies; Wilmington, DE, 2.1 mm x 10 cm, 3.5  $\mu$ m), y una fase sintetizada por Zhang *et al.* en este laboratorio que llamaremos HC-COOH (5) y que fue rellena en una columna de 50 mm x 2.1 mm). La fase HC-COOH ha sido sintetizada introduciendo una pequeña cantidad de grupos carboxilato en una plataforma hidrofóbica híper-entrecruzada, de forma que presenta un mecanismo de retención combinado de fase reversa e intercambiador catiónico débil. Las otras fases estacionarias son comerciales y sus características se pueden consultar en los sitios de los fabricantes. La columna de la segunda dimensión fue rellena en el laboratorio con partículas de 3.0  $\mu$ m de carbono sobre óxido de zirconio (8% p/p de

carbano, ZirChrom-CARB (ZirChrom Separations, Inc.; Anoka, MN) en un tubo de 33 mm x 2.1 mm.

#### 4.1.2.4 Condiciones cromatográficas

Fue necesario utilizar dos condiciones diferentes para poder eluir todos los analitos presentes en las diferentes muestras. Para que la comparación fuera válida, se ajustaron las condiciones en cada columna para que en todos los casos la muestra eluyera en la ventana del gradiente. Es decir, todas tuvieran el mismo espacio de separación utilizado en la primera dimensión. Las condiciones utilizadas se muestran en la tabla 4.1.2.

Tabla 4.1.2 Condiciones cromatográficas utilizadas en los experimentos

Primera dimensión		Segunda dimensión	
Condición de elución 1			
A: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1.5 mM en agua; B: AcN		A: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM en agua; B: AcN	
Tiempo (min)	% B	Tiempo (min)	% B
0	0	0	0
24	50	0.30	100
24.01	0	0.31	0
Condición de elución 2			
A: HClO <sub>4</sub> 10 mM en agua; B: AcN		A: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM en agua; B: AcN	
Tiempo (min)	% B	Tiempo (min)	% B
0	0	0	0
24	50	0.30	100
24.01	0	0.31	0



### **4.1.3 Resultados y discusión**

La selección de la columna es crítica en el desarrollo de métodos para cromatografía líquida bi-dimensional en línea. En esta sección del estudio se investigaron varios tipos de columnas ligadas para fase reversa para ser utilizadas en la primera dimensión cuando en la segunda dimensión se utiliza una columna de carbono sobre óxido de zirconio. Ya que hay más de 1500 materiales diferentes para fase reversa en el mercado, sin mencionar muchos otros en desarrollo, sería muy poco eficiente intentar probar todas las fases estacionarias. Además, muchas de ellas tendrán propiedades muy similares. Por esto, se seleccionaron varias columnas con características bien diferentes basándonos en el modelo HSM para comparar la selectividad de las mismas.

#### **4.1.3.1 Análisis utilizando la muestra de maíz**

Ya que se intenta comparar las columnas para la primera dimensión, es importante analizar los cromatogramas de la primera dimensión y confirmar que se está utilizando adecuadamente este espacio de separación. La figura 4.1.1 muestra los seis cromatogramas de la primera dimensión de la muestra de maíz con cada una de las columnas estudiadas en la condición de elución 1. Podemos notar en la figura que la muestra de maíz es muy compleja y probablemente contenga cientos o tal vez miles de compuestos. Aunque se observan picos bien definidos, hay una “montaña” en todos los cromatogramas que indica claramente la gran cantidad de compuestos no resueltos. Es claro que para este tipo de muestras y en este tiempo de análisis, la cromatografía de una dimensión no es suficiente. Otra característica que se puede notar observando los picos más grandes, es que de hecho estas fases estacionarias muestran diferente selectividad en la primera dimensión.

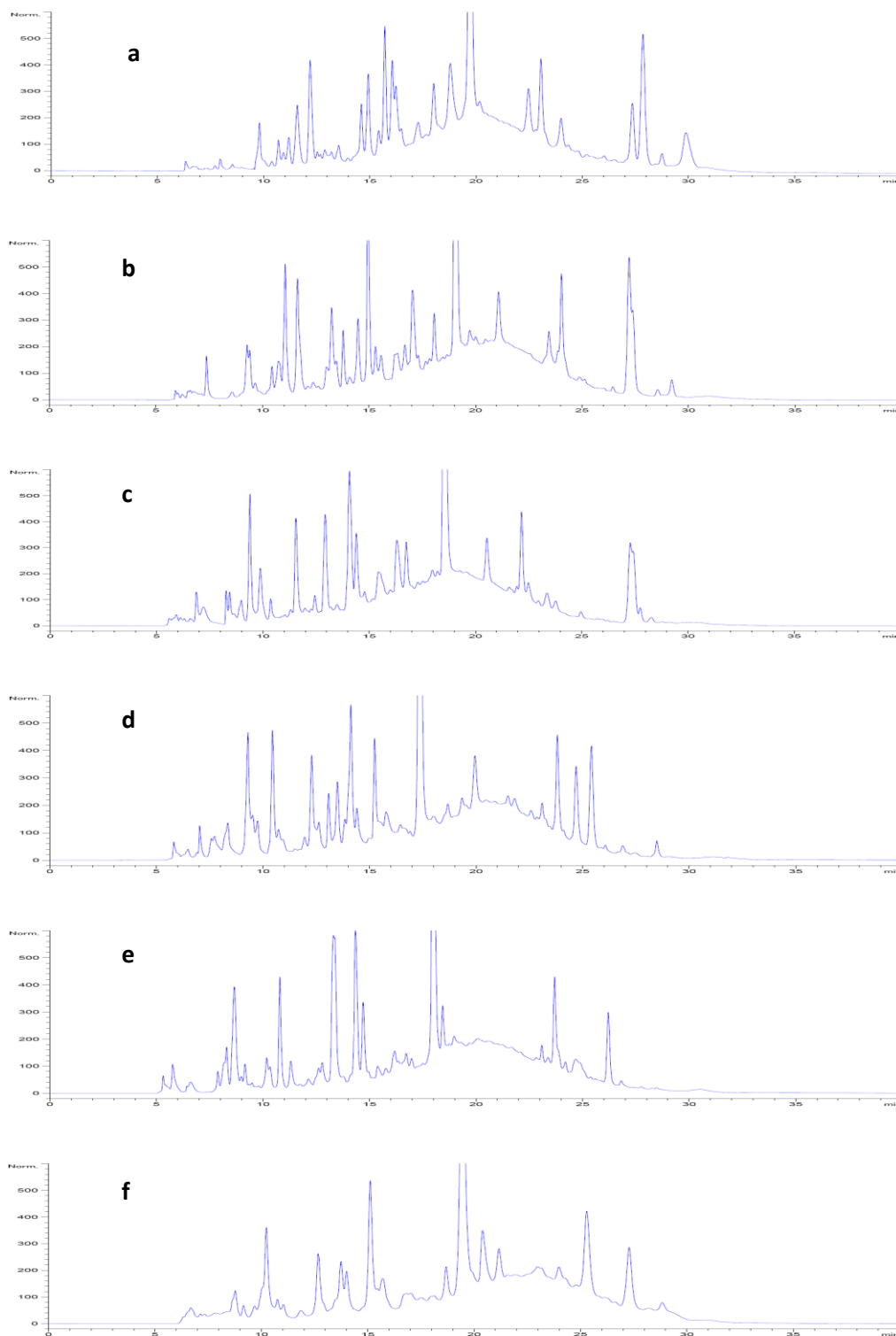


Figura 4.1.1 Cromatogramas obtenidos de la primera dimensión eluyendo la muestra de maíz de las seis columnas estudiadas. a) F5: Discovery HS-F5; b) C3: Zorbax SB-C3; c) C8: Zorbax SB-C8; d) CN: Zorbax SB-CN; e) Bonus: Zorbax Bonus-RP; f) HC-COOH: fase sintetizada en el laboratorio HC-COOH. Ver condiciones cromatográficas en la tabla 4.1.2.

Las siguientes figuras muestran los cromatogramas bi-dimensionales en 3D (figura 4.1.2), gráficos de contorno (figura 4.1.3) y diagrama de aprovechamiento del espacio bi-dimensional (figura 4.1.4) de las seis columnas estudiadas para la primera dimensión, acopladas con la columna de carbono sobre óxido de zirconio en la segunda dimensión. A primera vista podemos observar en los gráficos de 3D de la figura 4.1.2, que la línea de base es bastante más plana en comparación con los cromatogramas de la primera dimensión mostrados en la figura 4.1.1.

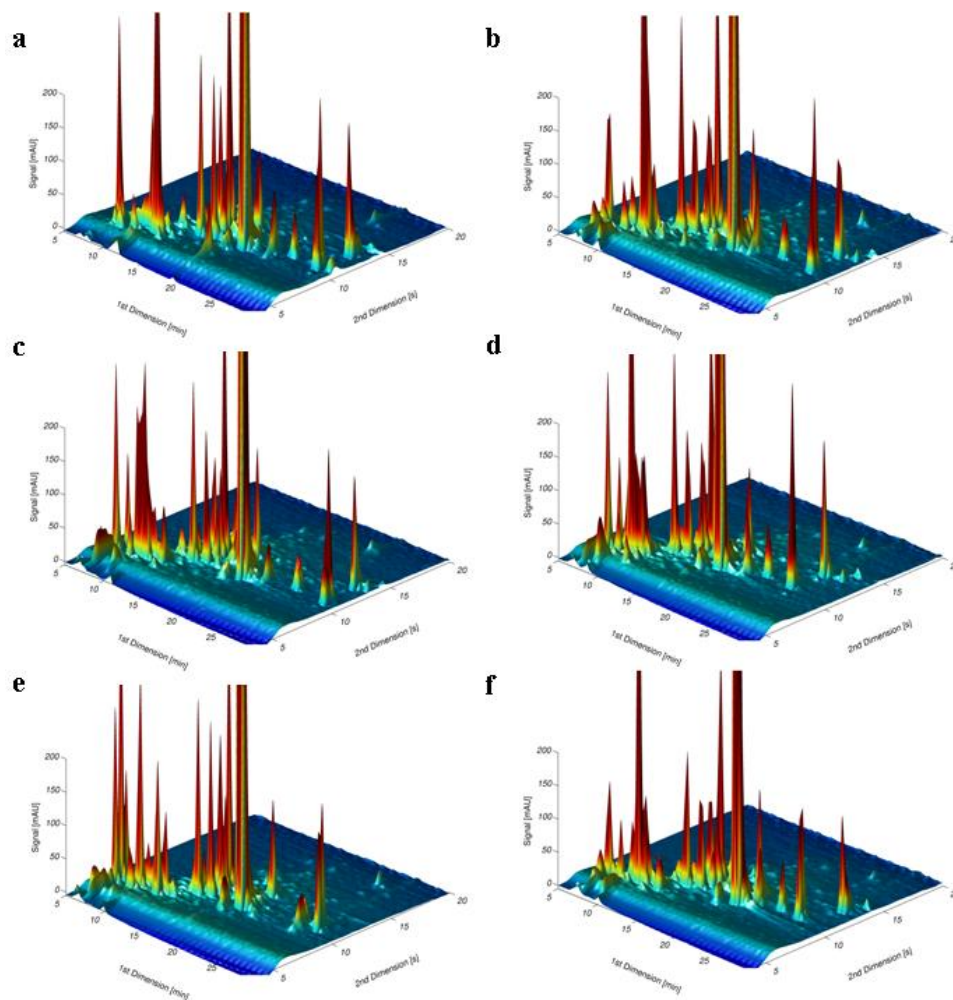


Figura 4.1.2 Cromatogramas bi-dimensionales en gráficos de 3D para la muestra de maíz utilizando las seis columnas seleccionadas para la primera dimensión y la columna de carbono sobre óxido de zirconio en la segunda dimensión. a) F5: Discovery HS-F5; b) C3: Zorbax SB-C3; c) C8: Zorbax SB-C8; d) CN: Zorbax SB-CN; e) Bonus: Zorbax Bonus-RP; f) HC-COOH: fase sintetizada en el laboratorio HC-COOH. Ver condiciones cromatográficas en la tabla 4.1.2.

Los cromatogramas en 3D no muestran una clara ventaja para ninguna de las seis columnas de la primera dimensión. En este caso, los gráficos de contorno mostrados en la figura 4.1.3 son más adecuados para tal comparación ya que muestran de forma más clara los patrones de distribución de los picos.

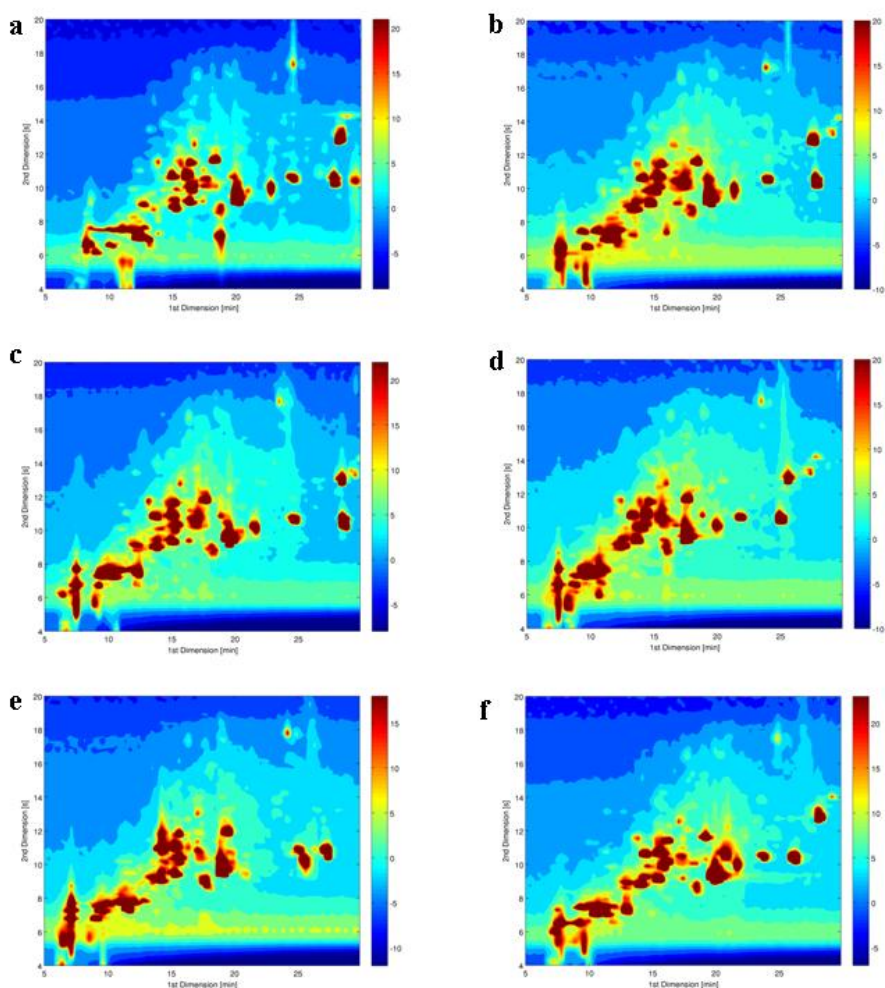


Figura 4.1.3 Representación en gráfico de contornos donde se puede observar la distribución de los picos en el espacio bi-dimensional. a) F5: Discovery HS-F5; b) C3: Zorbax SB-C3; c) C8: Zorbax SB-C8; d) CN: Zorbax SB-CN; e) Bonus: Zorbax Bonus-RP; f) HC-COOH: fase sintetizada en el laboratorio HC-COOH. Ver condiciones cromatográficas en la tabla 4.1.2.

Si bien se puede notar diferencias en la ubicación de algunos picos, la distribución de la mayoría de los picos muestra un patrón muy parecido. Esto no significa que una fase estacionaria no pueda ser muy superior a las otras para uno o varios compuestos específicos, sino que las grandes diferencias observadas en  $F_s$  no se reflejan en un patrón de comportamiento drásticamente diferente para la muestra de maíz en los cromatogramas bi-dimensionales.

Como se ha explicado antes, el factor de cubrimiento ( $f_{cuber}$ ) es una medida cuantitativa del aprovechamiento del espacio bi-dimensional. En la figura 4.1.4 podemos observar la distribución de picos y cómo el espacio bi-dimensional es utilizado.

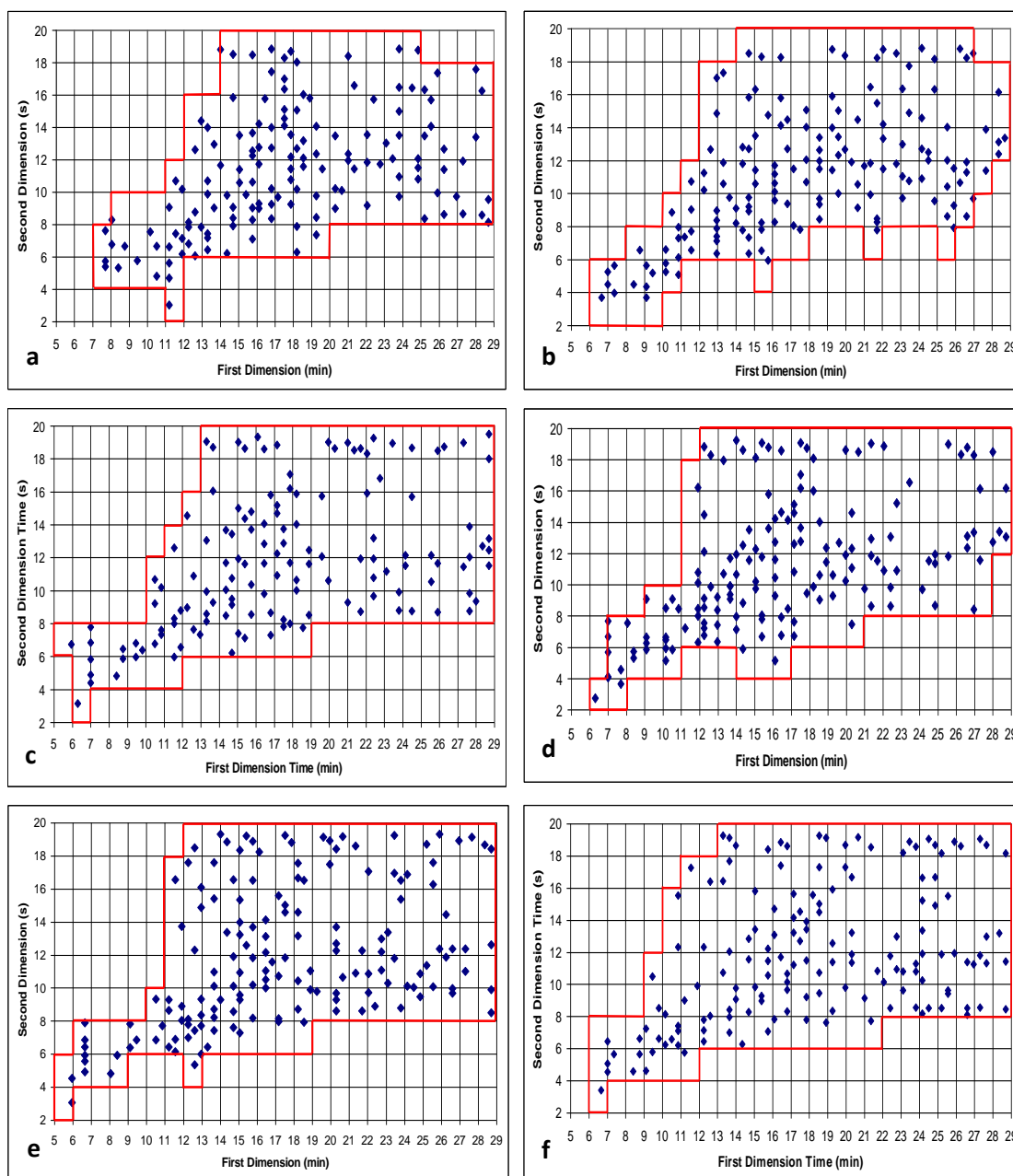


Figura 4.1.4 Diagramas para el cálculo del factor de cobertura donde se puede observar la distribución de los picos detectados y el grado de aprovechamiento del espacio bi-dimensional utilizado. a) F5: Discovery HS-F5; b) C3: Zorbax SB-C3; c) C8: Zorbax SB-C8; d) CN: Zorbax SB-CN; e) Bonus: Zorbax Bonus-RP; f) HC-COOH: fase sintetizada en el laboratorio HC-COOH. Ver condiciones cromatográficas en la tabla 4.1.2.

La grilla en este caso fue tomada en 1 min a lo largo de la primera dimensión y de 2 s a lo largo de la segunda dimensión. Nuevamente, la inspección visual de los gráficos de los patrones y el aprovechamiento del espacio bi-dimensional, indica que son similares.

La tabla 4.1.3 resume los resultados de los experimentos cromatográficos bi-dimensionales, especialmente en términos de la capacidad de picos y del número de picos observados. Se pueden observar diferencias entre las seis fases estacionarias de la primera dimensión en cuanto a la capacidad de picos.

Tabla 4.1.3 Resultados de LCxLC en línea para la muestra de maíz en la condición de elución 1

Columna	$^1n_c^b$	$^2n_c^c$	$\langle\beta\rangle^d$	$n'_{c,2D}^e$	$f_{cober}^f$	$n^*_{c,2D}^g$	Picos <sub>1D</sub> <sup>h</sup>	Picos <sub>2D</sub> <sup>i</sup>
HC-COOH <sup>a</sup>	60	32	1.89	1016	0.63	640	42	152
F5 <sup>b</sup>	72	34	2.17	1128	0.55	620	57	147
C8 <sup>c</sup>	87	33	2.53	1135	0.58	658	68	136
C3 <sup>d</sup>	90	34	2.61	1172	0.56	657	64	154
CN <sup>e</sup>	92	31	2.66	1072	0.60	643	61	153
Bonus <sup>f</sup>	97	33	2.79	1147	0.59	677	69	157

<sup>a</sup> Nomenclatura de columnas. Ver tabla 4.1.1.

<sup>b</sup> Capacidad de picos de la primera dimensión.

<sup>c</sup> Capacidad de picos de la segunda dimensión.

<sup>d</sup> Factor de sub-muestreo calculado según la ecuación 2.1.3.

<sup>e</sup> Capacidad de picos bi-dimensional corregida calculada según la ecuación 2.1.4.

<sup>f</sup> Factor de cobertura obtenido de la fracción del espacio utilizado de la figuras 4.1.4.

<sup>g</sup> Capacidad de picos bi-dimensional efectiva calculada según la ecuación 2.1.5.

<sup>h</sup> Número de picos observados en los cromatogramas de la primera dimensión.

<sup>i</sup> Número de picos observados en los cromatogramas bi-dimensionales.



Es interesante notar que incluso siendo la misma muestra y condiciones experimentales,  $^1n_c$  fue bastante mayor para la fase Bonus (97) que para la fase HC-COOH (60). La capacidad de picos de la segunda dimensión es la misma en todos los casos (~33) ya que en todo ellos se utilizó la misma columna. El factor de corrección por sub-muestreo  $\langle\beta\rangle$ , depende tanto del tiempo de ciclo como del ancho de los picos de la primera dimensión. Si  $^1n_c$  disminuye, también lo hará  $\langle\beta\rangle$ . El factor de sub-muestreo fue 1.89 y 2.79 para las fases HC-COOH y Bonus, respectivamente. Como resultado, el rango en la capacidad de picos bi-dimensional corregida ( $n'_{c,2D}$ ) varía solo de 1016 para la fase HC-COOH hasta 1172 para C3, como se muestra en la tabla 4.1.3. El factor de cobertura varió desde 0.55 para la fase F5 hasta 0.63 para la fase HC-COOH, lo cual confirma que los patrones de separación para las seis columnas fueron similares. Esto vuelve a afirmar las conclusiones previas en cuanto a la capacidad de picos de la primera dimensión y su menor efecto en la capacidad de picos bi-dimensional corregida ( $n'_{c,2D}$ ) cuando el tiempo de gradiente para la primera dimensión es el mismo. El número de picos observados se correlaciona muy bien con la capacidad de picos bi-dimensional efectiva ( $n^*_{c,2D}$ ). De la misma forma sucede para la primera dimensión, observándose 42 picos para la fase HC-COOH hasta 69 picos para la fase Bonus y el número de picos de la cromatografía bi-dimensional que varió de 136 (fase C8) a 157 (fase Bonus). Ya que el tiempo de análisis estuvo por encima del “límite” de los 5-10 min, no es de sorprender que la cromatografía bi-dimensional genere mayor poder de resolución y número de picos observados que la cromatografía de una dimensión (primera dimensión).

Ya hemos mencionado que los factores de cobertura son relativamente subjetivos y muy dependientes del tamaño de la grilla. Por esta razón, se manejó el mismo criterio y tamaño de grilla para todos los casos. Valores similares de factores de cobertura indican que las seis columnas de la primera dimensión, muy diferentes en selectividad entre sí, generan el mismo

grado de “ortogonalidad” cuando están acopladas con una columna de carbono sobre óxido de zirconio en la segunda dimensión.

#### **4.1.4 Muestras de orina y jugo**

El análisis de los cromatogramas de la primera dimensión y bi-dimensionales para las muestras de orina y jugo, lleva a conclusiones similares a las obtenidas en el análisis anterior para la muestra de maíz (resultados no mostrados). Las condiciones cromatográficas de la primera dimensión deben tenerse en cuenta para lograr un método ortogonal en cromatografía líquida bi-dimensional en línea. Es decir, fases estacionarias con muy diferente selectividad en la primera dimensión, al ser acopladas con una fase de carbono en la segunda dimensión, generarán patrones de separación similares siempre que los componentes de la primera dimensión estén adecuadamente distribuidos en el gradiente.

#### **4.1.5 Conclusiones**

Luego de estudiar las diferentes fases en la primera dimensión cuando se las combina con una fase estacionaria de carbono en la segunda dimensión, podemos concluir que:

La fase estacionaria de carbono tiene una selectividad muy diferente a la de cualquier otra fase estacionaria enlazada de fase reversa. Esto resultó en que, aún cuando se utilizaron seis fases estacionarias con selectividades muy diferentes (seleccionadas utilizando el factor  $F_s$  de Snyder), las distribuciones de picos fueron muy similares en los cromatogramas bi-dimensionales.

Esto hace que el desarrollo de métodos en cromatografía líquida bi-dimensional para pequeñas moléculas se simplifique enormemente al momento de seleccionar fases estacionarias para realizar fase reversa en ambas dimensiones. Mientras se utilice carbono en

la segunda dimensión, hay bastante flexibilidad para elegir la columna para la primera dimensión.

## **4.2 Fases estacionarias para la segunda dimensión: deposición de carbono sobre partículas superficialmente porosas de núcleo sólido de 2.7 $\mu\text{m}$ de diámetro**

Como se mencionó en el capítulo I, entre las diferentes propuestas existentes para aumentar la velocidad de análisis en cromatografía líquida, se incluyen el uso de columnas monolíticas y el empleo de alta temperatura; recientemente, el uso de partículas de tamaño reducido (menores a 2  $\mu\text{m}$ ) y parcialmente porosas (núcleo sólido) de sílice han atraído mucha atención a los cromatografistas que buscan reducir el tiempo de análisis en cromatografía líquida. Las partículas parcialmente porosas han evolucionado considerablemente desde su introducción hace 40 años. El tamaño se ha reducido drásticamente desde un diámetro de ~ 30  $\mu\text{m}$  con una capa porosa de 1 – 2  $\mu\text{m}$  de espesor (6) hasta las más recientemente desarrolladas partículas de 2.7  $\mu\text{m}$  de diámetro, que contienen un núcleo sólido 1.7  $\mu\text{m}$  y una corteza de material poroso de 0.5  $\mu\text{m}$  de espesor. Claramente, la distancia que un soluto debe migrar en la fase móvil estanca en el interior de las partículas es mucho menor si se considera un núcleo impenetrable. Por esta razón, mejora la velocidad de transferencia de masa en comparación con la que tiene lugar con partículas del mismo tamaño completamente porosas, sin perder demasiada capacidad de carga de muestra. En principio, estas características las hace especialmente adecuadas en separaciones rápidas. Varios estudios recientes han mostrado que a altas velocidades lineales, las columnas rellenas con partículas de núcleo sólido de 2.7  $\mu\text{m}$ , pueden tener una eficiencia comparable a las que contienen partículas

porosas de menos de 2  $\mu\text{m}$ , pero con una permeabilidad correspondiente a rellenos de 2.7  $\mu\text{m}$  y, en consecuencia, con una contrapresión mucho menor y menor demanda para el instrumento (7). También se considera que la baja dispersión en el tamaño de partículas es otra razón que contribuye en lograr menores alturas de plato teórico (8). Se han informado eficiencias similares a las obtenidas con columnas rellenas de partículas porosas de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , por lo que pueden usarse columnas más cortas y alcanzar resoluciones comparables a las de partículas más grandes (de 3.5 a 5  $\mu\text{m}$ ) pero en tiempos de análisis más cortos.

Estas características sugieren que las partículas parcialmente porosas de núcleo sólido son también muy adecuadas para emplear en la segunda dimensión en LCxLC rápida en línea (9, 10). Sin embargo, hay varios detalles a considerar. Primero, a diferencia de las partículas completamente porosas, actualmente solo hay una limitada variedad de fases estacionarias disponibles con partículas de núcleo sólido para fase reversa (como octil (C8) y octadecil (C18)), aunque sí hay varios materiales para cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) (11, 12). Segundo, las separaciones rápidas en LCxLC en línea utilizan frecuentemente muy altas temperaturas ( $> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en la segunda dimensión para aumentar la velocidad de análisis. Para esto es necesario que la fase estacionaria sea térmicamente estable, además de tener una selectividad lo más diferente posible a la primera dimensión. Tercero, cuando se utiliza fase reversa en ambas dimensiones (9, 13–15) es muy beneficioso que la segunda columna sea mucho más retentiva que la primera, para lograr el enfoque de la muestra transferida a la cabeza de la segunda columna. Lamentablemente las partículas parcialmente porosas de núcleo sólido tienen un área superficial algo menor que las completamente porosas. En principio, la alta retentividad de las fases estacionarias de carbono soluciona todos estos inconvenientes. La alta estabilidad térmica y química de las fases estacionarias de carbono y

su particular selectividad cromatográfica han sido discutidas muchas veces (16, 17). Por estas razones utilizábamos partículas completamente porosas de 3  $\mu\text{m}$  de carbono sobre óxido de zirconio (C/ZrO<sub>2</sub>) en la segunda dimensión en LCxLC en línea. Los materiales basados en zirconio solo están disponibles en partículas con un área superficial relativamente baja (entre 20-25 m<sup>2</sup>/g vs. 200 m<sup>2</sup>/g para materiales típicos basados en sílice con tamaño de poro de 80 Å). Por esta razón, en trabajos previos de este laboratorio, se había desarrollado un método para depositar carbono sobre partículas de alúmina o de sílice de alta superficie específica.

Este método consistió en depositar iones metálicos de Al (III) desde una solución acídica homogénea conteniendo urea que luego se hidroliza e incrementa el pH de la solución. En este procedimiento se reduce la posibilidad de obstrucción de los pequeños poros que pueden afectar el proceso de transferencia de masa dentro de la partícula. La presencia de la especie metálica activa la superficie de la sílice para permitir el posterior depósito de carbono que se consigue a través de la deposición química de vapor (ver sección 4.2.1.2). Estudios realizados posteriormente (18) mostraron que las partículas de sílice recubiertas con carbono mantienen todas las propiedades deseadas de una fase estacionaria de carbono grafitico. En este trabajo, hemos desarrollado un material de núcleo sólido recubierto con carbono (que denominaremos PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>) utilizando el método antes mencionado. Las columnas conteniendo este material se han probado cromatográficamente evaluando su utilidad para el relleno de columnas para la segunda dimensión en LCxLC en línea.

## **4.2.1 Experimental**

### **4.2.1.1 Químicos utilizados**

Los productos químicos utilizados en este estudio fueron de grado analítico o mejor y se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El acetonitrilo de grado cromatográfico

fue adquirido de Burdick y Jackson (Muskegon, MI, USA) y el agua del mismo grado (18.2 M $\Omega$ ) fue preparada con un sistema de purificación Barnstead Nanopure II (Dubuque, IA, USA) y luego hervida para remover dióxido de carbono antes de ser utilizada. La preparación de cuatro patrones de indoles utilizados en la comparación de la capacidad de picos entre C/ZrO<sub>2</sub> y PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> fue igual a la descrita anteriormente en la sección 2.1.2. Se prepararon patrones de 5-hidroxi-triptamina (IHT), 3-acetil-L-lisina (IAL), indol-3-etanol (IE) y indol-3-ácido butírico (IBA). El extracto de maíz utilizado para los experimentos bi-dimensionales se preparó como se describió en la sección 2.1.3.

#### **4.2.1.2 Preparación de las columnas de carbono**

El soporte de núcleo sólido Poroshell 120 (2.7  $\mu$ m) fue obsequio de Agilent Technologies (Wilmington, DE, USA). El procedimiento para el tratamiento de sílice con Al (III) y su recubrimiento con carbono consiste en dos etapas:

Primero: es necesario activar la superficie del soporte de sílice. Esto se logra depositando Al (III) sobre la superficie de la sílice a partir de una solución de alúmina. La solución se prepara a partir de cloruro de aluminio en una solución acidificada con ácido clorhídrico 0.1 molar. La concentración de aluminio en solución debe ser diluida (10-40 mM). La cantidad de aluminio utilizada se calcula en base a la superficie específica y cantidad de sílice a preparar, sobre la base de que en la superficie de la sílice se encuentran 8  $\mu$ mol/m<sup>2</sup> de grupos silanoles y que éstos reaccionan con el Al (III) en una estequiometría 1:1. Las partículas de sílice se preparan en una concentración de 0.025 % p/v y deben ser agitadas y sonicadas para eliminar el aire remanente en los poros. Finalmente se le agrega un exceso de urea (0.5 molar). Esta solución es calentada a ebullición en reflujo bajo constante agitación. La urea se descompone térmicamente generando amonio, produciendo un incremento lento y homogéneo del pH de la solución. La reacción se detiene cuando la medida del pH de la solución a 100 °C llega a

4.1 (típicamente unas dos horas después). La solución se enfría rápidamente en baño de hielo y es luego filtrada y lavada con agua de grado cromatográfico. Las partículas son luego secadas a 100 °C en horno de vacío durante 24 hs.

Segundo: se debe depositar carbono sobre las partículas de sílice recubiertas con Al (III). Esto se llevó a cabo utilizando la deposición química por vapores de hexano. El equipo consiste en un reactor de cuarzo en el cual se introducen las partículas y luego se elimina todo el oxígeno purgándolo con nitrógeno. Una vez eliminado el oxígeno, se calienta el reactor hasta 700 °C y se comienza a pasar nitrógeno enriquecido en vapores de hexano a un caudal de 200 mL/min. El hexano utilizado como fuente de carbono se mantuvo en baño de hielo a 0 °C. El depósito de carbono se realizó durante 6 hs. La fase estacionaria así preparada fue enviada para análisis elemental a Atlantic Microlabs (Norcross, GA, USA) y así determinar el contenido de carbono. Para mayor detalle del método e instrumento utilizados, consultar los trabajos de Paek *et al.* (18, 19).

Las partículas de C/ZrO<sub>2</sub> (3 μm, carga de carbono de 8 %, p/p) fueron un obsequio de ZirChrom Separations Inc. (Anoka, MN, USA). Todas las fases estacionarias utilizadas fueron rellenas en columnas de 33 mm x 2.1 mm. Para el procedimiento de empaque de las fases, las partículas se suspendieron en 21 mL de tetrahidrofurano y se sonicaron durante 20 min. Se utilizó el método de filtrado (20), que consiste en empujar las partículas de fase estacionaria, suspendidas en un solvente adecuado, a través de la columna con la frita de salida instalada. De esta forma, el lecho se va formando a medida que las partículas quedan “atrapadas” en la columna. El solvente para empujar las partículas fue tetrahidrofurano a una presión de 7000 psi. La presión se mantuvo hasta juntar 90 mL del solvente eluido de la columna. Los tubos y terminales de acero inoxidable utilizados fueron adquiridos de Isolation

Technologies (Hopdale, MA, USA). La bomba utilizada para empujar el solvente fue una Haskel 16501 (Haskel International Inc., Costa Mesa, CA, USA).

#### **4.2.1.3 Instrumentación**

Las corridas cromatográficas fueron realizadas en un equipo HP 1090 LC controlado por el software Chemstation A.10.01 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) con excepción de los análisis LCxLC, en el cual el equipo utilizado fue descrito en la sección 2.1.3. El equipo HP 1090 estaba equipado con un sistema de bombas binario, auto-inyector, compartimiento de termostatación de columna y detector ultra-violeta (UV) de arreglo de diodos. Para las inyecciones de los patrones a alta temperatura (80 °C), la fase móvil fue precalentada con un prototipo de precalentamiento que fue obsequio de Systec Inc. (New Brighton, MN, USA).

#### **4.2.1.4 Estudio de curvas de van Deemter**

Estos estudios fueron realizados para las fases estacionarias PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub>, utilizando nitrohexano como soluto de prueba. Este soluto fue elegido ya que posee una relativamente buena retención y no muestra un elevado coileo como el exhibido por muchos otros compuestos aromáticos polares como el nitrobenzeno. El número de platos teóricos fue medido en función del caudal, y fue corregido por efecto extra columna. Las medidas de dispersión extra columna fueron realizadas en las mismas condiciones, pero reemplazando la columna por una unión de volumen-cero inyectando el mismo volumen de nitrohexano. Los coeficientes de difusión del nitrohexano en las diferentes condiciones fueron calculados utilizando la correlación de Wilke-Chang (21).



#### **4.2.1.5 Condiciones cromatográficas para el análisis bi-dimensional**

En la primera dimensión se utilizó una columna Zorbax SB-C3 (100 mm x 2.1 mm, con partículas de 3.5  $\mu\text{m}$ ) que fue obsequio de Agilent Technologies (Wilmington, DE, USA). El solvente en el canal A fue buffer de fosfato 20 mM ajustado a pH 5.7 y el solvente en el canal B fue acetonitrilo. Se realizó un gradiente de 0 – 50 % B en 24 min. y luego 50 – 0 % B a los 24.01 min permitiendo 16 minutos para re-equilibrar el sistema a un caudal 0.1 mL/min.

En la segunda dimensión se utilizaron ambas columnas de carbono (PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub>) para comparar la capacidad de picos. En el canal A se utilizaron dos soluciones acuosas de ácidos. La primera fue ácido fosfórico 10 mM y la segunda fue ácido perclórico 100 mM. En el canal B se utilizó acetonitrilo. El gradiente en la segunda dimensión fue de 0 – 100 % B in 18 s seguido por 3 s de re-equilibrio a un caudal de 3.0 mL/min. La temperatura en la segunda dimensión se mantuvo a 110 °C. Las capacidades de picos de la segunda dimensión fueron estimadas como se describió en la sección 2.1.4.

### **4.2.2 Resultados y discusión**

#### **4.2.2.1 Caracterización cromatográfica**

En la tabla 4.2.1 podemos observar varios resultados importantes de la comparación de los diferentes materiales estudiados recubiertos con carbono. Como se muestra en la tabla, columnas rellenas con esta nueva fase estacionaria poseen un número de platos teóricos considerablemente mayor que aquellas conteniendo las partículas de C/ZrO<sub>2</sub> y C/Al/SiO<sub>2</sub>. Al comparar con la columna rellena con C/ZrO<sub>2</sub> (3  $\mu\text{m}$ ), la columna conteniendo PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> (2.7  $\mu\text{m}$ ) tiene una superficie específica por unidad de volumen muerto comparable, esperándose por lo tanto similar retentividad siempre que el comportamiento cromatográfico de ambas fases sea similar. Durante los experimentos, se registró la misma

caída de presión en ambas columnas. Esto permitió el uso del material PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> en LCxLC sin utilizar ningún instrumento especial por el menor tamaño de partículas. Varios estudios han mostrado que las partículas de núcleo sólido son más homogéneas en tamaño que las completamente porosas (8, 22). Esto podría ser la razón por la cual las partículas de 2.7 μm y las de 3.0 μm dieron lugar a lechos de permeabilidad similar.

Tabla 4.2.1 Comparación de algunas características de los materiales de carbono utilizados

	N <sup>a</sup>	d <sub>p</sub> (μm)	ΔP <sup>b</sup> (bar)	A.S./V <sub>m</sub> <sup>c</sup>	ω <sub>0.5</sub> <sup>d</sup>	k' <sup>e</sup>	A	B	C	h <sub>min</sub> <sup>g</sup>	v <sub>opt</sub> <sup>h</sup>
C/ZrO <sub>2</sub>	4100	3.0	58	133	25	5.8	1.4	8.4	0.040	2.6	14.5
PSH C/Al/SiO <sub>2</sub>	5277	2.7	55	132	28	6.0	1.4	5.1	0.053	2.5	9.8
25 % C/Al/SiO <sub>2</sub>	2804	5.0	20	262	74	6.2 <sup>f</sup>	1.9	7.6	0.031	2.8	15.8

Condiciones: T = 40 °C, F = 0.4 mL/min., columnas de 33 mm x 2.1 mm

<sup>a</sup> Número de platos teóricos. Fase móvil: 20/80 acetonitrilo/agua; nitrohexano como soluto de prueba.

<sup>b</sup> Presión del sistema utilizando acetonitrilo/agua 50/50.

<sup>c</sup> El A.S. (área superficial) fue calculado por el método BET, la densidad de la sílice y del óxido de zirconio y la porosidad total (0.66, 0.58 and 0.63 de arriba hacia abajo) para una columna de 33 mm x 2.1 mm. El volumen muerto V<sub>m</sub> se midió utilizando acetona.

<sup>d</sup> Ver condiciones en la figura 4.2.11.

<sup>e</sup> Ver condiciones en la figura 4.2.6.

<sup>f</sup> Los datos, incluyendo A, B y C para 25 % C/Al/SiO<sub>2</sub> fueron tomados de un trabajo de Paek *et al.* (18).

$$^g h_{\min} = A + 2(B * C)^{1/2}$$

$$^h v_{\text{opt}} = (B/C)^{1/2}$$

El depósito de carbono sobre las partículas PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> fue de aproximadamente 7 % p/p, determinado por análisis elemental. Esto en principio parece poco pero corresponde a unas cuatro monocapas, suponiendo un recubrimiento uniforme. En trabajos previos con las partículas completamente porosas de 5 μm, se necesitaron aproximadamente unas 4 – 5 monocapas de carbono para lograr un recubrimiento “completo” del soporte. El recubrimiento se calculó en base a la superficie específica medida con el método de BET y el % C (18). En el caso del material de núcleo sólido, se aplicó una corrección por el peso del núcleo que tiene un diámetro de 1.7 μm. Este nivel de recubrimiento de carbono fue adecuado para permitir la recuperación total de ácido benzoico, el cual fue utilizado para probar la presencia de sitios accesibles con Al (III) no recubiertos. Una vez pasada la prueba, no se continuó incrementando el recubrimiento de carbono para evitar la pérdida de superficie específica y la obstrucción de poros. Sin embargo, podría ser necesario agregar algún agente para bloquear sitios activos y evitar distorsión en la forma de las bandas cromatográficas por interacción tanto con grupos silanoles libres como con sitios con Al (III) que no han sido completamente cubiertos con carbono. Esto se discute más adelante.

#### **4.2.2.2 Selectividad Hidrofóbica**

Se utilizaron series homólogas de nitroalcanos y alquilbencenos para estudiar la selectividad hidrofóbica de las partículas PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y de C/ZrO<sub>2</sub>. La figura 4.2.1 muestra un cromatograma de la separación de una serie de nitroalcanos.

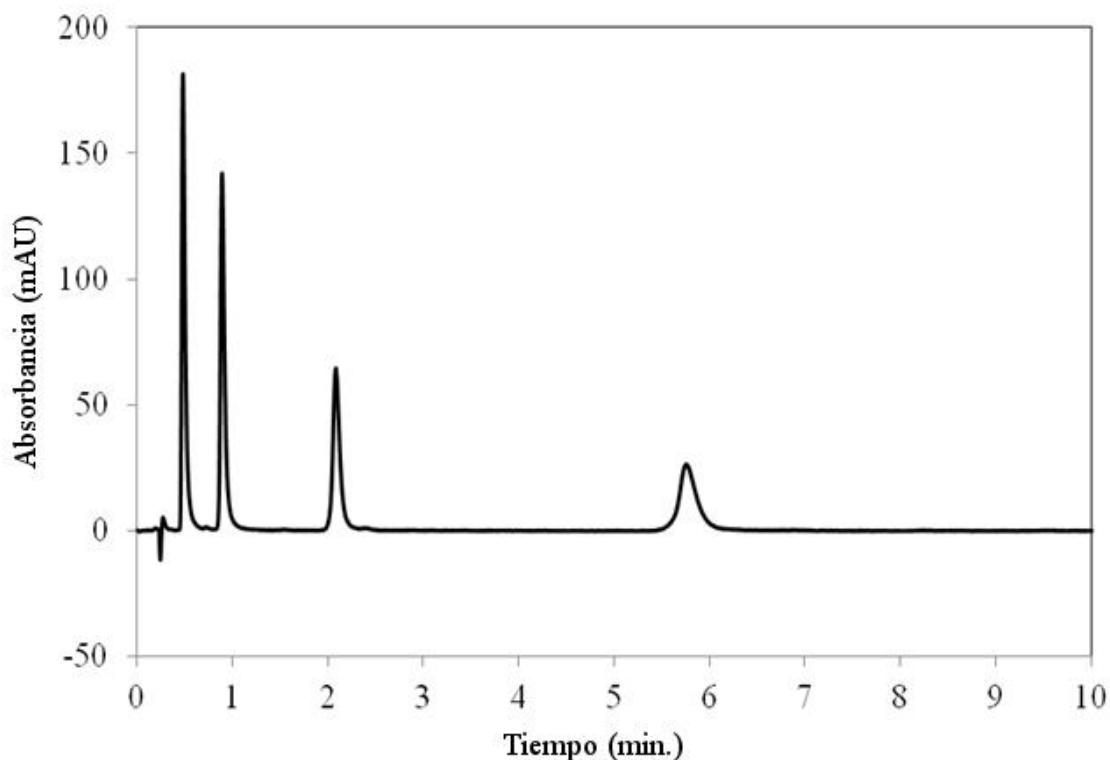


Figura 4.2.1 Separación de serie homóloga de nitroalcanos (nitropropano, nitrobutano, nitropentano y nitrohexano) en una columna conteniendo PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>. Condiciones: F = 0.4 mL/min., 20/80 Acetonitrilo/Agua, T = 40 °C, detección a 210 nm, columna de 33 mm x 2.1 mm.

En la figura 4.2.2 se representa el  $\log k'$  vs. el número de grupos metileno de las series homólogas utilizadas (nitroalcanos y alquilbencenos) en las columnas con partículas PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y con C/ZrO<sub>2</sub>. El incremento lineal de  $\log k'$  por grupo metileno adicionado, prueba que la nueva fase estacionaria exhibe características de fase reversa. Estas características son similares a las de otras fases estacionarias de carbono que hemos estudiado en cuanto a que la gráfica no es completamente lineal para homólogos aromáticos con 1 – 2 grupos metileno, como se observa en la figura 4.2.2 (b).

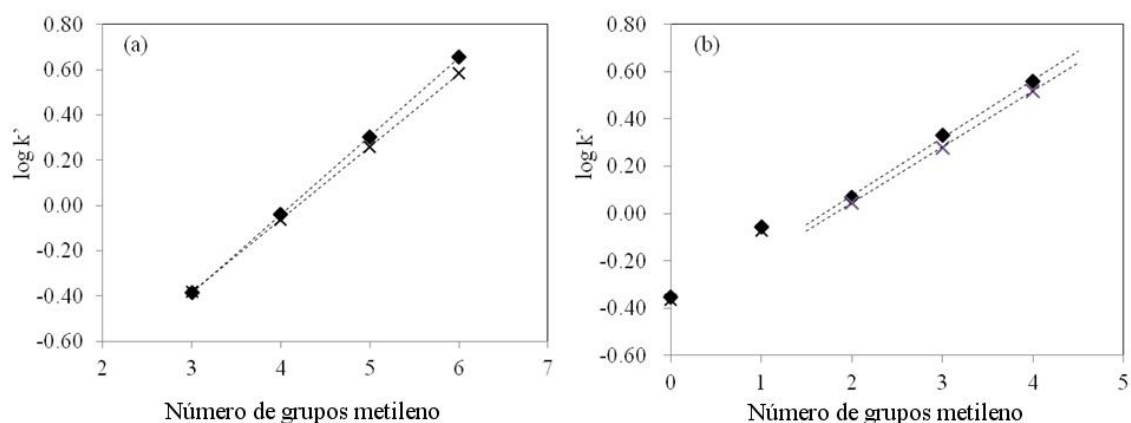


Figura 4.2.2  $\log k'$  vs. número de grupos metileno para (a) nitroalcanos (nitropropano, nitrobutano, nitropentano y nitrohexano); (b) alquilbencenos (benceno, tolueno, etilbenceno, propilbenceno y butilbenceno). Condiciones:  $F = 0.4$  ml/min.,  $T = 40$  °C, 35/65 acetonitrilo/agua en (a), 50/50 acetonitrilo/agua en (b); (♦) PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>; (X) C/ZrO<sub>2</sub> (columna de 33 mm x 2.1 mm).

Basados en la ecuación de Martin (23), las pendientes de los gráficos fueron convertidas a energías libres de transferencia para el grupo metileno desde la fase móvil a la fase de carbono. ( $\Delta G_{\text{CH}_2} = -2.3BRT$ ; B es la pendiente de la línea en la figura 4.2.2, R es la constante de los gases y T es la temperatura); los valores se muestran en la tabla 4.2.2. Se incluyen también los datos obtenidos en columnas con las partículas de C/Al/SiO<sub>2</sub> para ser comparadas con los de PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>. Las afinidades de grupos metileno de los diferentes tipos de sílices recubiertas con carbono son similares, aunque menos intensas son las que se observan en C/ZrO<sub>2</sub> como se puede inferir de los valores de  $\Delta G_{\text{CH}_2}$ . Por lo tanto, grupos apolares interactúan más fuertemente con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> o C/Al/SiO<sub>2</sub> que con C/ZrO<sub>2</sub>. Esta comparación también sugiere que la interacción hidrofóbica es relativamente independiente del soporte de sílice, aunque diferente a la observada en óxido de zirconio. Las intersecciones con el eje de ordenadas en la figura 4.2.2 también fueron comparadas en la tabla 4.2.2. La ordenada al origen representa la suma de dos términos: la relación de fases de la columna y la

contribución a la energía libre de los grupos terminales en las moléculas. Si las fases estacionarias fueran químicamente idénticas, las diferencias en las ordenadas al origen entre las fases solo deberían reflejar la diferencia entre las distintas relaciones de fases, y por tanto ser independiente del tipo de serie homóloga. Sin embargo, como se observa en la mencionada tabla, hay una clara variación en las ordenadas que presentan las fases respecto a las series homólogas. Por ejemplo, la diferencia entre PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub> para los nitroalcanos es mayor que para los alquilbencenos. Considerando que ambos materiales tienen una relación de fases similar, estas diferencias indican que los grupos nitro interactúan con C/ZrO<sub>2</sub> más intensamente que con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>. Por tanto, se concluye que estos materiales, a pesar de estar todos cubiertos con carbono, no son químicamente idénticos.

Tabla 4.2.2 Resultados de la regresión y  $\Delta G_{CH_2}$  para las distintas fases estacionarias

Fase	Nitroalcanos <sup>a</sup>				Alquilbencenos <sup>b</sup>			
	Pendiente	Ordenada al origen	R <sup>2</sup>	$\Delta G_{CH_2}$ <sup>c</sup> (kcal/mol)	Pendiente	Ordenada al origen	R <sup>2</sup>	$\Delta G_{CH_2}$ <sup>c</sup> (kcal/mol)
C/ZrO <sub>2</sub>	0.322	-1.349	0.9999	-461	0.235	-0.412	0.9999	-336
PSH C/Al/SiO <sub>2</sub>	0.346	-1.424	0.9999	-495	0.25	-0.44	0.9981	-356
25 % C/Al/SiO <sub>2</sub> <sup>d</sup>	0.339	-1.21	0.9999	-486	0.256	-0.074	1.0000	-367

<sup>a, b</sup> La pendiente y ordenada obtenidas por regresión lineal de  $\log k'$  vs.  $n_{CH_2}$  se basaron en los datos de las figura 4.2.2 (a) y (b) respectivamente.

<sup>c</sup> Energía libre de transferencia por grupo metileno entre las fases móvil y estacionaria (obtenida de la pendiente).

<sup>d</sup> Las partículas contienen un 25 % de carbono depositado sobre partículas de Al/SiO<sub>2</sub> de 5  $\mu\text{m}$ . Datos obtenidos de la publicación de Paek *et al.* (18).

Ver condiciones en la figura 4.2.2.

#### 4.2.2.3 Comparación de Selectividad con gráficos $\kappa$ - $\kappa$

Diferencias y similitudes entre la selectividad de las fases de carbono también pueden ser comparadas a través de los gráficos conocidos como  $\kappa$ - $\kappa$  introducidos por Horváth (25). Consisten en la representación del  $\log k'$  vs.  $\log k'$  de un set de solutos cuidadosamente seleccionados obtenidos en las dos columnas que se quieren comparar. Una pendiente unitaria con una buena correlación sugiere que el mecanismo de retención en ambas columnas es el mismo y que presentan selectividad equivalente. El set de compuestos no ionizables fue el comúnmente utilizado en los estudios de relaciones lineales de energías de solvatación (LSER) para fase reversa (26). La figura 4.2.3 muestra tres diferentes gráficos  $\kappa$ - $\kappa$  basados en la combinación de los diferentes pares de columnas PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>, C/ZrO<sub>2</sub>

y C/Al/SiO<sub>2</sub>. Las pendientes y coeficientes de correlación fueron obtenidos por regresión lineal. Todos los pares de fases estacionarias de carbono muestran el mismo mecanismo de retención. Esto indica que las distintas afinidades de metileno anteriormente discutidas para PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub> no son lo suficientemente significativas para causar grandes diferencias en la selectividad cromatográfica. Basados en la similitud con C/ZrO<sub>2</sub>, podemos inferir una selectividad similar entre PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y el material basado en carbono gráfico poroso Hypercarb (4). Estos resultados confirman que el método utilizado para el depósito de carbono produce una fase estacionaria con una selectividad cromatográfica similar, independientemente del sustrato de sílice utilizado.

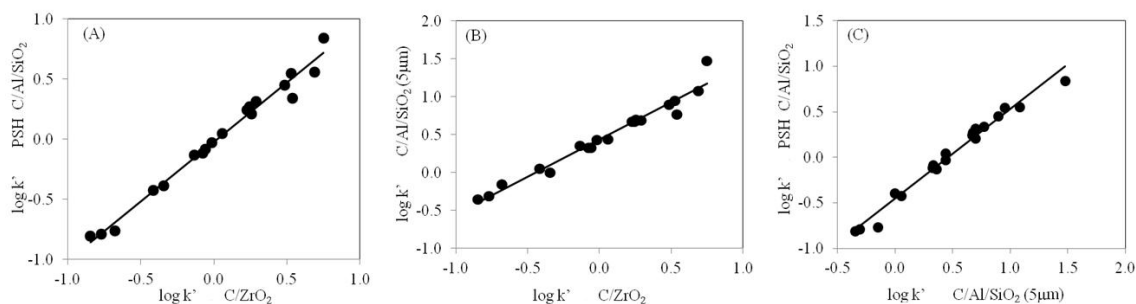


Figura 4.2.3 Comparación de selectividad para distintas fases estacionarias recubiertas con carbono a través de gráficos  $\kappa$ - $\kappa$ . Condiciones:  $F = 0.4$  mL/min.,  $T = 40$  °C, detección a 210 nm, 50/50 acetonitrilo/agua, columnas de 33 mm x 2.1 mm; (A)  $R^2 = 0.983$ , pendiente =  $0.99 \pm 0.03$ ; (B)  $R^2 = 0.962$ , pendiente =  $0.98 \pm 0.05$ ; (C)  $R^2 = 0.979$ , pendiente =  $0.98 \pm 0.04$ . Los solutos son N-bencilformamida, alcohol bencílico, fenol, 3-fenilpropanol, benceno, anisol, benzonitrilo, tolueno, acetofenona, etilbenceno, p-xileno, bromobenceno, metilbenzoato, propilbenceno, p-clorotolueno, butilbenceno, nitrobenceno, p-diclorobenceno y benzofenona en orden de retención creciente en C/ZrO<sub>2</sub>.



#### 4.2.2.4 Estudio de eficiencia de columnas de carbono

Se han evaluado las eficiencias de las tres columnas conteniendo las diferentes fases recubiertas con carbono, midiendo los platos teóricos en iguales condiciones. Es común que las fases estacionarias de carbono presenten una eficiencia muy dependiente del soluto utilizado; esto podría ser atribuido a la presencia de un cierto grado de heterogeneidad química en la superficie (27, 28). Por lo tanto, las eficiencias fueron calculadas a partir del cromatograma de los compuestos del estudio LSER. La figura 4.2.4 muestra el recuento de platos para cada compuesto relativo al benceno para las diferentes fases estacionarias. En la figura 4.2.5 se comparan las eficiencias en las fases PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub>. Los solutos en las figuras 4.2.4 y 4.2.5 están ordenados en número de platos crecientes para C/ZrO<sub>2</sub>. Estos gráficos muestran la fuerte dependencia del analito utilizado en la medición del número de platos teóricos. De forma general, se observa que la columna con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> muestra cambios en el número de platos teóricos más semejantes al C/Al/SiO<sub>2</sub> que al C/ZrO<sub>2</sub>. Los recuentos de platos para los derivados de benceno más polares decrecen más drásticamente en la columna con C/ZrO<sub>2</sub> que para aquella con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>. Al comparar con C/ZrO<sub>2</sub> (figura 4.2.5), el material de PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> da lugar a columnas más eficientes (de hasta ~ 5.6 veces) particularmente para los compuestos polares. Esto sugiere que los sitios activos que causan el ensanchamiento de banda para estos compuestos son más prevalentes en la fase C/ZrO<sub>2</sub> que en la fase PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>. Una consecuencia muy favorable de este comportamiento es que en las columnas conteniendo PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> se obtendrán mayores capacidades de picos para metabolitos considerando que, en general, se trata de moléculas polares.

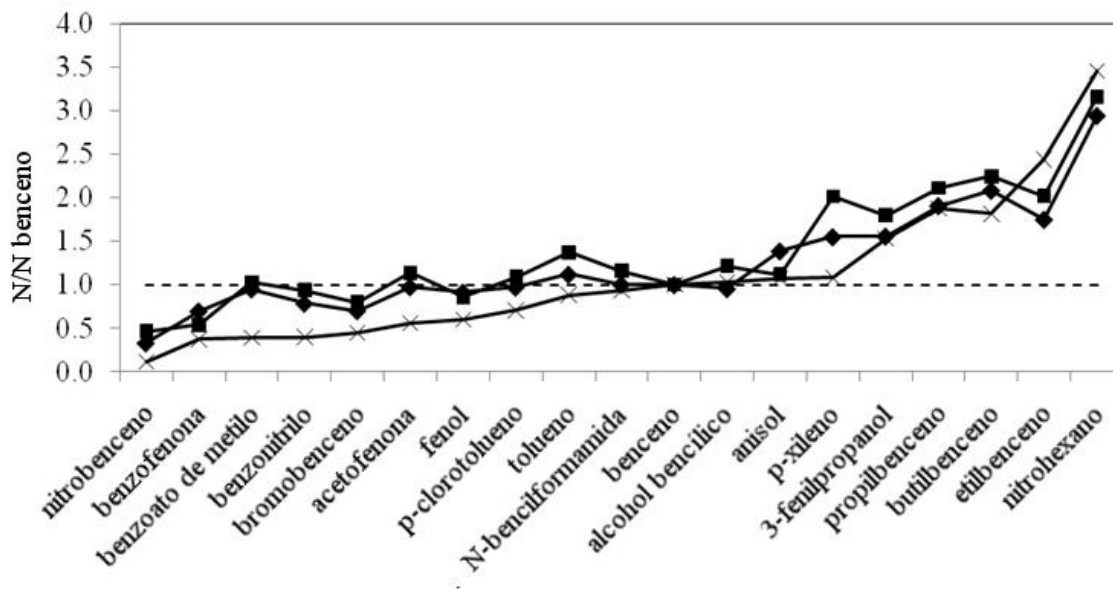


Figura 4.2.4  $N/N_{\text{benceno}}$  para cada fase vs. soluto. (X)  $C/ZrO_2$ ; (◆)  $PSH\ C/Al/SiO_2$ ; (■)  $C/Al/SiO_2$ .

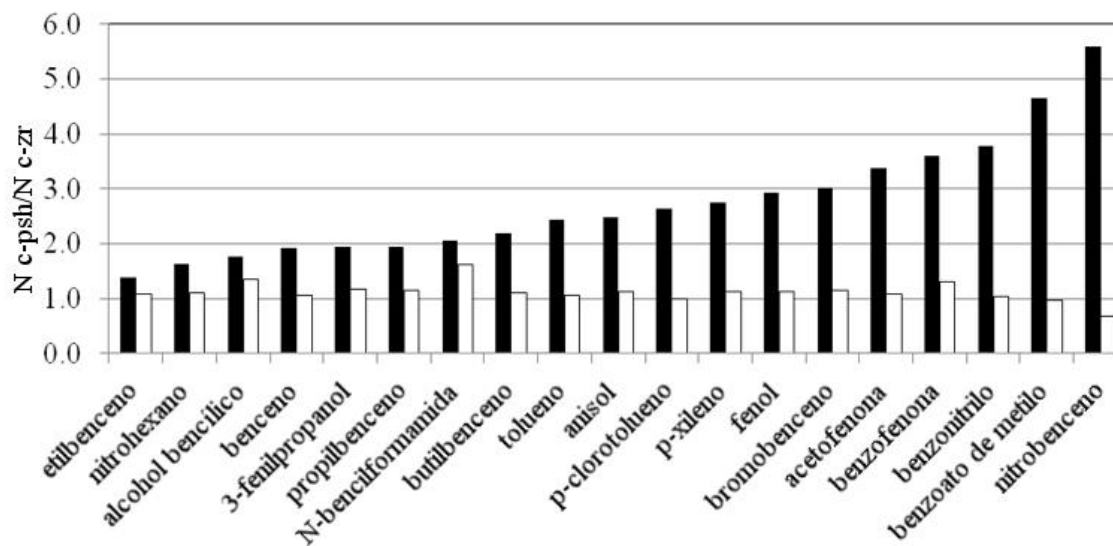


Figura 4.2.5  $N_{\text{PSH}\ C/Al/SiO_2}/N_{\text{C}/ZrO_2}$  (barras negras),  $k'_{\text{PSH}\ C/Al/SiO_2}/k'_{\text{C}/ZrO_2}$  (barras blancas) vs. soluto. Ver condiciones experimentales en la figura 4.2.3.

#### 4.2.2.5 Estudios de caudal

El comportamiento cinético de la fase PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> fue evaluado y comparado con el de C/ZrO<sub>2</sub>. La figura 4.2.6 muestra las curvas de altura de plato teórico en función de la velocidad lineal para estas columnas utilizando nitrohexano como soluto de ensayo.

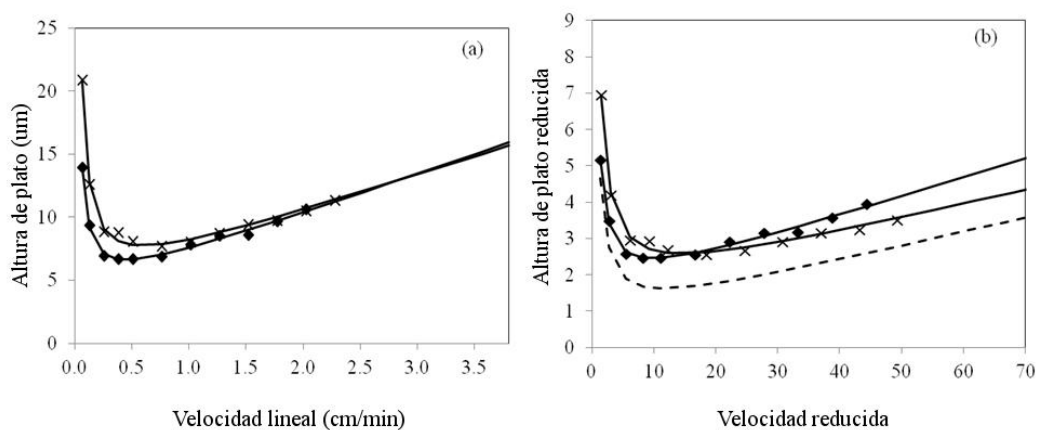


Figura 4.2.6 Curvas de van Deemter para diferentes columnas (a) en función de sus parámetros sin reducir y (b) reducidos. Los símbolos corresponden a (♦) PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y (X) C/ZrO<sub>2</sub>; la línea continua corresponde a la curva de ajuste a la ecuación 4.2.3. Condiciones: T = 40 °C, detección 210 nm, 31/69 acetonitrilo/agua, columnas de 33 mm x 2.1 mm. La línea discontinua corresponde a PSH C18 (columna de 100 mm x 4.6 mm) calculada en base a los parámetros reportado por Cabooter *et al.* (8).

Es evidente en la figura 4.2.6, que la altura de plato que se observa para la columna con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> es menor que la que contiene C/ZrO<sub>2</sub>. Esta mayor eficiencia con la fase PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> se extiende en el rango de velocidades lineales estudiado. La altura de plato fue convertida a su equivalente reducido (h) y graficada en función de la velocidad lineal reducida (v<sub>r</sub>) obtenida según la ecuación 4.2.2 (figura. 4.2.6):

$$v = \frac{u_e d_p}{D_m}$$

donde  $u_e$  es la velocidad lineal intersticial de la fase móvil,  $d_p$  es el diámetro de partícula y  $D_m$  es el coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil calculado mediante la ecuación de Wilke-Chang (21).

Las curvas fueron ajustadas a la curva de van Deemter en términos reducidos para obtener los coeficientes A, B y C según la ecuación 4.2.3:

$$h = A + B/v + Cv$$

donde cada parámetro representa diferentes fenómenos cinéticos que contribuyen a la dispersión de la banda cromatográficas. “A” corresponde a la dispersión Eddy, reflejando la calidad del empaque del relleno en la columna. “B” representa la dispersión de la banda debido a la difusión longitudinal y “C” refleja las características de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los resultados del ajuste se muestran en la tabla 4.2.2. Los datos graficados de  $h$  vs.  $v$  ajustan bien a la ecuación de van Deemter como se muestra en la figura 4.2.6.

La cantidad de muestra inyectada en los experimentos estuvo por debajo del rango de sobrecarga de la fase estacionaria. Por tanto, valores mayores de la altura de plato reducida ( $h$ ) para PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> no pueden ser atribuidos a diferencias en la carga entre las columnas rellenas con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> o con C/ZrO<sub>2</sub>. Como se muestra en la tabla 4.2.1, el valor de A es muy similar para ambas fases estacionarias ( $A \sim 1.4$ ), pero un tanto más elevado que lo deseado ( $A \sim 1.0$ ) y considerablemente mayor que lo que se suele observar en columnas comerciales de C18 ( $A < 1$ ). Esto indica que es posible mejorar la eficiencia aun más con un proceso de relleno más eficiente, y así reducir aún más el valor de  $h$ . Los valores de los

términos B y C muestran muy buena concordancia con los reportados recientemente para fases estacionarias basadas en C18 y partículas de núcleo sólido por Cabooter *et al.* (8), lo cual es otra evidencia de que tanto el tratamiento con Al (III), como el depósito de carbono, tienen un efecto muy menor en las propiedades cinéticas. Sin dudas, la mayor diferencia entre ambas fases estacionarias carbonosas es el término B. El valor que presenta el material PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> es sustancialmente menor que el obtenido con C/ZrO<sub>2</sub>. Este es el comportamiento generalmente observado para los materiales de núcleo sólido y es consecuencia del menor recorrido disponible para los solutos durante el proceso de difusión en las partículas. Este comportamiento es el mismo que el reportado por múltiples estudios (8, 29, 30) donde se comparan los materiales de núcleo sólido con los completamente porosos de iguales propiedades físicas y químicas. De acuerdo con Guiochon (31), el término B decrece con el inverso del diámetro del núcleo sólido. Por tanto, es de esperar menores valores del término B para partículas de núcleo sólido que para las que son totalmente porosas. Un menor término B es especialmente relevante en la zona de bajas velocidades lineales donde la difusión longitudinal del soluto es el factor predominante en la dispersión; como nuestro interés se centra en la aplicación de estos materiales para la construcción de columnas que sean operadas en zonas de muy elevadas velocidades lineales, un menor término B no tiene implicancias prácticas en LC x LC. El material PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> contenido en columnas analíticas tiene buenas propiedades de transferencia de masa como se observa en el valor del término C (0.03 – 0.05), lo cual lo hace especialmente adecuado para altas velocidades lineales.

#### **4.2.2.6 Comparación en la capacidad de picos con derivados de indoles**

El uso de fases estacionarias de carbono para el análisis de metabolitos es de particular interés debido a su alta capacidad de retener compuestos más polares que las fases

estacionarias ligadas (16). Por esto, hemos utilizado una mezcla de cuatro derivados de indoles, que incluyen compuestos neutros, ácidos y básicos, para comparar la eficiencia de los materiales de PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub> para dar columnas de alta capacidad de picos. La misma fue estimada en este trabajo utilizando la ecuación 2.1.1.

La composición del gradiente fue ajustada para obtener una ventana de retención similar para ambas fases estacionarias y mantener la pendiente del perfil del gradiente constante. Un gradiente de mayor poder de elución fue necesario para el material PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>. Se utilizó un buffer de ácido fosfórico como fase móvil acuosa para la segunda dimensión. También se decidió comparar el cromatograma con aquel obtenido utilizando un buffer de ácido perclórico ya que el anión perclorato es conocido por formar pares iónicos con compuestos catiónicos y así modificar la retención y mejorar la forma del pico cromatográfico (32). De hecho, se observó un incremento en la retención de los indoles catiónicos (IHT y IAL) al cambiar el fosfato por el perclorato. Otra ventaja a considerar para el uso de ácido perclórico en vez de ácido fosfórico, es que tiene muy baja señal en el UV permitiendo obtener líneas de base con menos ruido y por tanto permitiendo alcanzar menores límites de detección.

En la tabla 4.2.3 se comparan los anchos de picos de los analitos obtenidos en las columnas PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub> utilizando las distintas fases móviles. No se reportan valores de anchos de picos para C/ZrO<sub>2</sub> con buffer perclórico ya que la recuperación de los analitos con grupos carboxílicos fue muy baja. Cuando se utilizó buffer de ácido fosfórico, se obtuvo aproximadamente un 10 % más en capacidad de picos con el material PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> respecto al material de C/ZrO<sub>2</sub> utilizando la misma pendiente de gradiente.

Tabla 4.2.3 Comparación de ancho de pico a mitad de altura (en min) y capacidad de picos para columnas conteniendo C/ZrO<sub>2</sub> y PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>

$\phi^a$	C/ZrO <sub>2</sub>		PSH C/Al/SiO <sub>2</sub>		
	0.00 – 0.36	0.05 – 0.41	0.08 – 0.36	0.08 – 0.36	0.08 – 0.36
	10 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM HClO <sub>4</sub> <sup>b</sup>	100 mM HClO <sub>4</sub> <sup>c</sup>
IHT <sup>d</sup>	0.116	0.087	0.098	0.035	0.034
IAL	0.025	0.046	0.055	0.036	0.033
IE	0.044	0.040	0.044	0.040	0.040
IBA	0.048	0.043	0.049	0.056	0.044
$n_c^e$	35	38	34	49	55

<sup>a</sup> Fracción de acetonitrilo durante el gradiente.

<sup>b,c</sup> Antes y después del tratamiento con ácido oxálico 5 mM en ácido perclórico 100 mM por unos 300 volúmenes de columna.

<sup>d</sup> 5-hidroxi-triptamina (IHT), 3-acetil- $\epsilon$ -L-lisina (IAL), indol-3-etanol (IE) y indole-3-ácido butírico (IBA).

<sup>e</sup> Capacidad de picos calculados según la ecuación 2.1.1.

Condiciones: canal A utiliza el buffer ácido correspondiente; canal B es acetonitrilo; la fracción de B ( $\phi$ ) se aplica en un gradiente de 0 – 3.5 min, F = 1.0 ml/min, T = 80 °C, detección 220 nm.

Los cromatogramas obtenidos en una de las condiciones en ambas columnas se comparan en la figura 4.2.7, donde se confirma el orden de elución en ambas columnas.

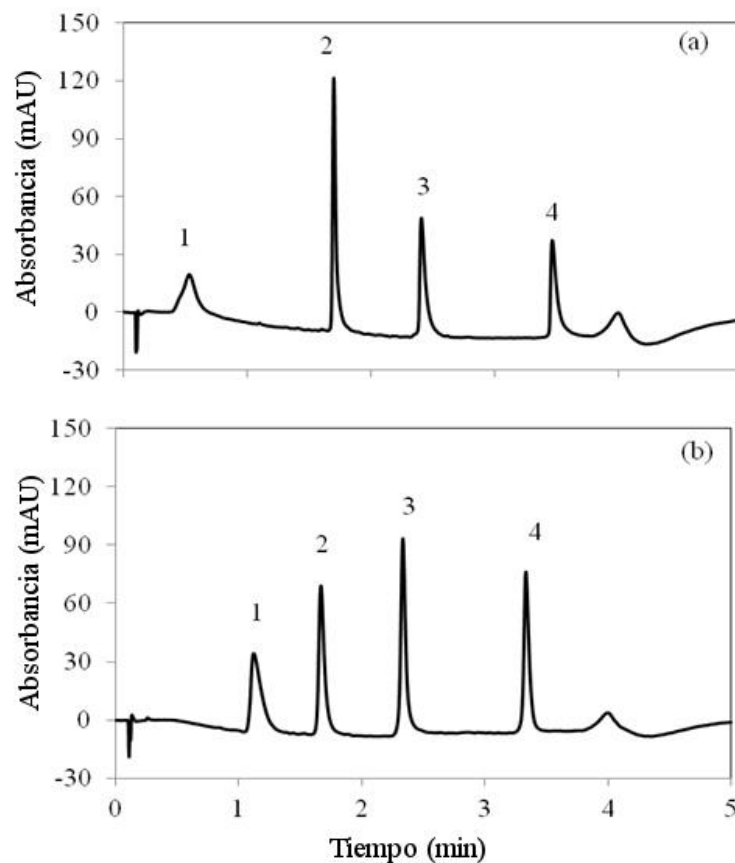


Figura 4.2.7 Separación de una mezcla de cuatro derivados de indoles en (a) C/ZrO<sub>2</sub>; (b) PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>. Condiciones: A, ácido fosfórico 10 mM en agua; B, acetonitrilo; gradiente de 0 – 36 % B para (a); gradiente de 5 – 41 % B para (b) en 0 – 3.5 min; F = 1 ml/min, T = 80 °C, detección 220 nm, columnas de 33 mm x 2.1 mm. El orden de elución es (1) IHT, (2) IAL, (3) IE y (4) IBA. Nomenclatura mostrada en la tabla 4.2.3.

Es importante notar que el IHT no fue prácticamente retenido en la columna con C/ZrO<sub>2</sub> a pesar que el solvente inicial fue 100% acuoso mientras que fue razonablemente retenido en la columna con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>. Además, se incrementó la capacidad de picos en un 50 % en la columna PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> utilizando buffer perclórico de mayor concentración (pH = 1.0), comparado con el buffer fosfórico utilizando la misma pendiente de gradiente. Esto se debe a la notable mejora en la forma del pico de los indoles catiónicos en presencia de perclorato. Esto se puede atribuir a la presencia de trazas de sílice expuesta en la superficie PSH



C/Al/SiO<sub>2</sub> y que la formación de pares iónicos entre perclorato y especies catiónicas reducen su interacción con los grupos silanoles libres en la superficie del soporte. Además, el derivado indólico con grupo funcional carboxílico (IBA) mostró picos más angostos luego de tratar la fase de PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> con ácido oxálico. Esto sugiere también la presencia de Al (III) expuesto, ya que la complejación con el ácido oxálico reduce interacciones entre el metal y el grupo carboxilato del derivado indólico. En el caso del IAL, que también posee un grupo ácido carboxílico, no fue prácticamente beneficiado por el tratamiento. Este compuesto tiene un pK<sub>a</sub> más bajo (estimado en 2.2 por analogía con la lisina). Un pK<sub>a</sub> más bajo indica que el grupo carboxílico deprotonado será una base de Lewis más débil y por tanto interactúa menos con la superficie del óxido metálico.

En síntesis, la combinación en el uso de buffer perclórico luego del tratamiento del material con ácido oxálico produjo los mejores resultados en capacidad de picos para las columnas rellenas de PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>.

#### **4.2.2.7 Comparación en el efecto del solvente de inyección en la forma de la banda**

En estudios previos se ha mostrado que mayor superficie específica, y por tanto mayor retentividad, reduce el efecto devastador que un solvente de inyección de distinta viscosidad y polaridad puede tener en la forma de los picos, permitiendo el enfocado de los analitos inyectados en la cabeza de la columna. Las condiciones experimentales utilizadas en este estudio son similares a las utilizadas en la segunda dimensión de un experimento de LC x LC en línea, donde relativamente grandes volúmenes de muestra se inyectan en una columna de pequeño volumen. La fase PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> mostró una retentividad un tanto mayor que la fase C/ZrO<sub>2</sub> aunque esta retentividad fue dependiente del analito utilizado. Por tanto, se estudió el efecto del solvente usado en la muestra de inyección cuando se inyectaba sobre la columna de PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y se lo comparó con el efecto sobre las fases C/ZrO<sub>2</sub> y C/Al/SiO<sub>2</sub> en las

mismas condiciones. Las condiciones de gradiente se ajustaron para lograr que el primero y el último de los analitos eluyeran en la misma ventana de gradiente para todos los casos. Para la fase PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> fue necesario un gradiente más fuerte que para C/ZrO<sub>2</sub> pero más débil que para la fase C/Al/SiO<sub>2</sub> de mayor superficie específica. Se prepararon mezclas de derivados de indoles en solventes con fracción orgánica creciente, desde 20 hasta 80 % v/v de acetonitrilo en buffer. Un volumen relativamente grande de muestra (25 µl) fue inyectado en cada columna como se muestra en la figura 4.2.8.

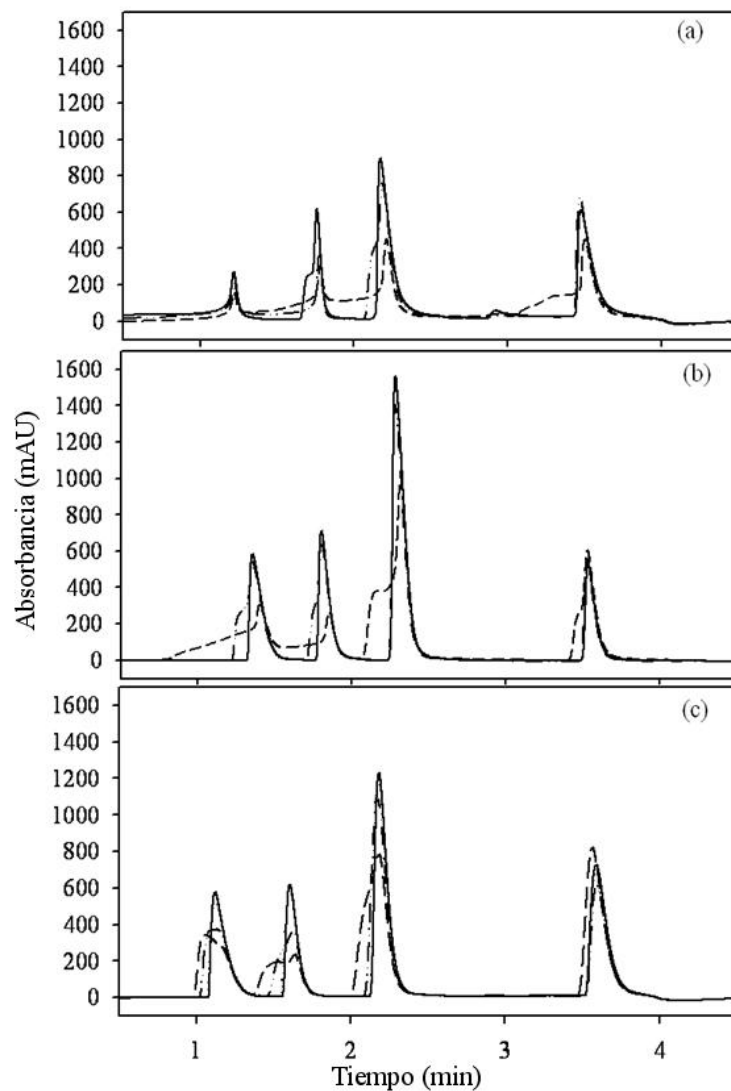


Figura 4.2.8 Separación de una mezcla de cuatro derivados de indoles en las columnas (a) C/ZrO<sub>2</sub>, (b) PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> (c) C/Al/SiO<sub>2</sub> (5 μm). Condiciones: A, ácido perclórico 20 mM en agua; B, acetonitrilo; gradiente de 5 – 33 % B para (a); gradiente de 8 – 36 % B para (b); gradiente de 18 – 50 % B para (c) en 0- 3.5 min; F = 1 ml/min, T = 80 °C, detección 220 nm, inyección de 25 μL, columnas de 33 mm x 2.1 mm. Los solventes en la muestra inyectada fueron 20/80 (línea continua), 40/60 (línea doble punto y guión), 80/20 (línea de guiones) para B/A.

Al comparar con  $C/ZrO_2$ , el PSH  $C/Al/SiO_2$  muestra un mayor enfocado de la muestra en la cabeza de la columna, lo cual alivia el efecto del solvente en la muestra inyectada, produciendo mejor resolución y sensibilidad. Sin embargo, el efecto no es tan bueno como lo es en el material de mayor superficie específica  $C/Al/SiO_2$ . Como se muestra en la figura 4.2.8, es evidente que los picos más retenidos (y por tanto mejor enfocados) son menos afectados por la composición del solvente. Esta comparación pone de manifiesto la importancia en el uso de un material con la mayor retentividad posible para la columna utilizada en la segunda dimensión en LCxLC y la mejora que se puede lograr con una fase estacionaria adecuada.

#### **4.2.2.8 Uso de PSH $C/Al/SiO_2$ en LCxLC rápida en línea**

Se utilizó el material PSH  $C/Al/SiO_2$  como fase estacionaria en la segunda dimensión del sistema LCxLC para evaluar sus potenciales beneficios. La muestra utilizada de extracto de maíz y las condiciones experimentales fueron las mismas utilizadas en la comparación del poder de resolución entre PSH  $C/Al/SiO_2$  y  $C/ZrO_2$ . Ya que el buffer de ácido perclórico permitió obtener picos más angostos y de mayor retención para los patrones de indoles, también fue utilizado en este experimento, además del buffer de ácido fosfórico.

La figura 4.2.9 (a) muestra los cromatogramas LCxLC 3D con las capacidades de picos estimadas para la segunda dimensión producidas en el experimento utilizando los buffers y las columnas de carbono antes mencionadas.

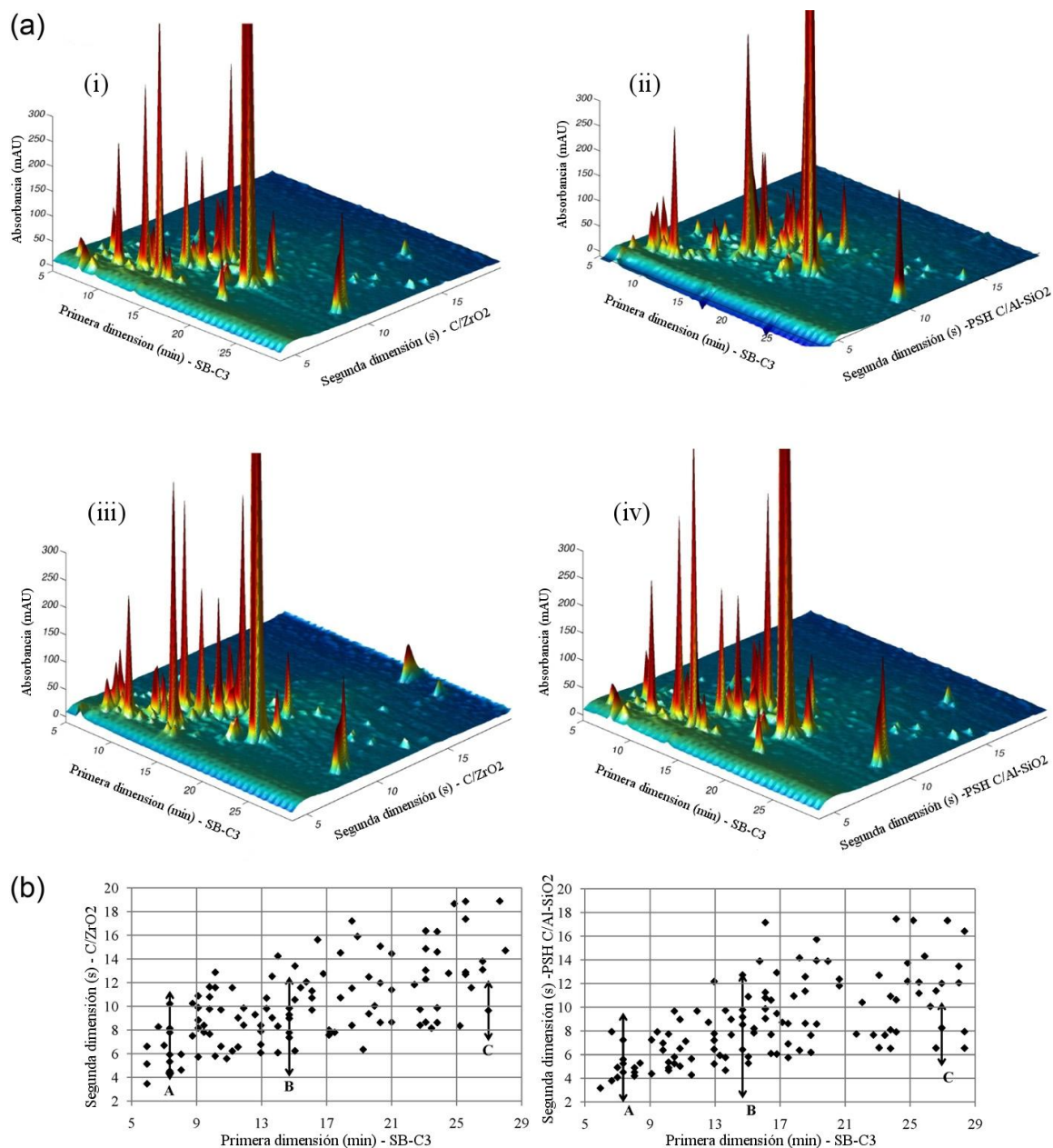


Figura 4.2.9 (a) Cromatogramas 3D de separaciones en LCxLC con columnas con  $C/ZrO_2$  y  $PSH\ C/Al/SiO_2$  en la segunda dimensión; Primera dimensión: solvente A es buffer de fosfato 20 mM a pH 5.7; solvente B es acetonitrilo; gradiente 0 – 50 % B en 24 min; columna SB-C3 de 100 mm x 2.1 mm. Segunda dimensión: solvente A es ácido fosfórico 10 mM para (i) y (ii); solvente A es ácido perclórico 100 mM para (iii) y (iv). Solvente B es acetonitrilo en todos los casos. Columnas de 33 mm x 2.1 mm. Gradiente 0 – 100 % B en 18 s. y 3 s. de re-equilibrio. Las capacidades de picos de la segunda dimensión para (i), (ii), (iii) y (iv) fueron 34, 39, 35 y 43 respectivamente. (b). Distribución de picos observados en LCxLC utilizando  $C/ZrO_2$  con buffer fosfórico (izquierda) y  $PSH\ C/Al/SiO_2$  con buffer perclórico (derecha) en la segunda dimensión. Las flecha marcadas como A, B y C corresponden a la ventana de tiempo mostrada en los cromatogramas de la figura 4.2.10.

Se observó un incremento en la altura de varios picos del extracto de maíz al cambiar de buffer fosfórico a perclórico en ambas columnas. En general, con la fase estacionaria PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> se obtuvo mayor capacidad de picos en la segunda dimensión para la mezcla de indoles que con la fase C/ZrO<sub>2</sub> para ambos buffers. La diferencia entre ambos materiales fue de un 15 % y un 23 % más en capacidad de picos para el buffer fosfórico y perclórico, respectivamente.

Se realizó el recuento de picos de la muestra de maíz utilizando el procedimiento descrito en la sección 2.1.5. Se analizó la distribución de picos de las columnas con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y con C/ZrO<sub>2</sub> en las corridas LCxLC utilizando los distintos buffers. Como se observa en la figura 4.2.9 (b) no hubo una diferencia apreciable en la distribución de picos observada. De hecho, el recuento de picos encontrados tanto con la fase PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> como con C/ZrO<sub>2</sub> es similar (114 picos para PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> vs. 110 para C/ZrO<sub>2</sub>). Sin embargo, el C/Al/SiO<sub>2</sub> fue menos afectado por el efecto del solvente de inyección en comparación con C/ZrO<sub>2</sub>. La figura 4.2.10 muestra la superposición de cromatogramas de la segunda dimensión para ambas fases estacionarias tomadas aproximadamente al comienzo (A), mitad (B) y final (C) del gradiente de la primera dimensión como se designó en la figura 4.2.9 (b). Las fracciones B y C corresponden a fracciones más avanzadas en el gradiente de la primera dimensión, conteniendo mayor proporción de solvente orgánico, lo cual genera mayores problemas en la forma del pico de la segunda dimensión.

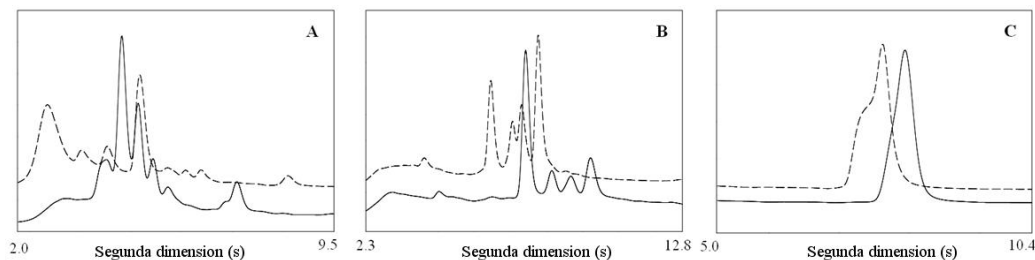


Figura 4.2.10 Cromatogramas individuales de la segunda dimensión para  $C/ZrO_2$  (línea discontinua) y para PSH  $C/Al/SiO_2$  (línea solida) al comienzo (A), mitad (B) y final (C) del gradiente de la primera dimensión como se designó en la figura 4.2.9 (b).

Como se muestra en la figura 4.2.10, las formas de los picos eluidos de las columnas con PSH  $C/Al/SiO_2$  y  $C/ZrO_2$  no son significativamente diferentes para las fracciones A y B ya que es una región donde el solvente de inyección es relativamente débil. Éste no es el caso cuando se observa la fracción C, que muestra un pico bien formado eluido de la columna PSH  $C/Al/SiO_2$ , que aparece notoriamente deformado en  $C/ZrO_2$ . Por tanto, el mejor enfoque en PSH  $C/Al/SiO_2$  resulta en picos más angostos y por tanto mayores capacidades de picos en la segunda dimensión que  $C/ZrO_2$ . Estos resultados muestran que el uso de PSH  $C/Al/SiO_2$  en la segunda dimensión puede mejorar el poder de resolución para LC x LC y es una buena alternativa al material basado en  $C/ZrO_2$ .

#### 4.2.2.9 Capacidad de carga de muestra

La cantidad de muestra que se puede inyectar en un material determinado (capacidad de carga) es una característica de gran importancia. Cuando una columna es sobrecargada, muestra comportamientos de isothermas no lineales incluyendo distorsión de pico y cambios en la retención dependientes del tamaño de la inyección. Un problema asociado con las partículas de núcleo sólido es su relativamente menor capacidad de carga de muestra respecto a las partículas completamente porosas por su menor superficie específica. Varias

publicaciones también han mostrado la inherente baja capacidad de carga de las fases estacionarias basadas en carbono (33, 34). Por tanto, se estudió la capacidad de carga para las columnas rellenas con PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> respecto a otros materiales.

Se inyectaron diferentes cantidades de nitrohexano en columnas con fases de carbono y de ODS. Se observó el cambio en el número de platos teóricos como función de la cantidad inyectada. En general, la tendencia en el cambio de eficiencia como función de la carga de muestra es bastante similar, aunque los materiales con mayor superficie específica (C/Al/SiO<sub>2</sub> y ODS) mantienen el valor inicial durante más carga de muestra.

Para comparar la capacidad de carga de las diferentes columnas utilizamos el modelo cinético de Langmuir propuesto por Lucy-Wade-Carr (35) y así obtener la capacidad de carga analítica ( $\omega_{0.5}$ ), que se define como la carga de muestra que produce una disminución del 50 % en el número de platos teóricos respecto al valor límite  $N_0$  ( $N_0$  es el máximo número de platos obtenido en condiciones de comportamiento lineal en la isoterma), representado en la ecuación 4.2.4:

$$\frac{N}{N_0} = \frac{1 + 1.489\omega'}{1 + 1.489\omega' + 2.489\omega'^2}$$

donde  $\omega' = \omega / \omega_{0.5}$  es la carga de muestra relativa. Los valores de  $\omega_{0.5}$  y  $N_0$  se obtuvieron con un ajuste no lineal de los datos experimentales a la ecuación anterior. La figura 4.2.11 muestra el ajuste del recuento de platos teóricos normalizados como función de la carga de muestra.



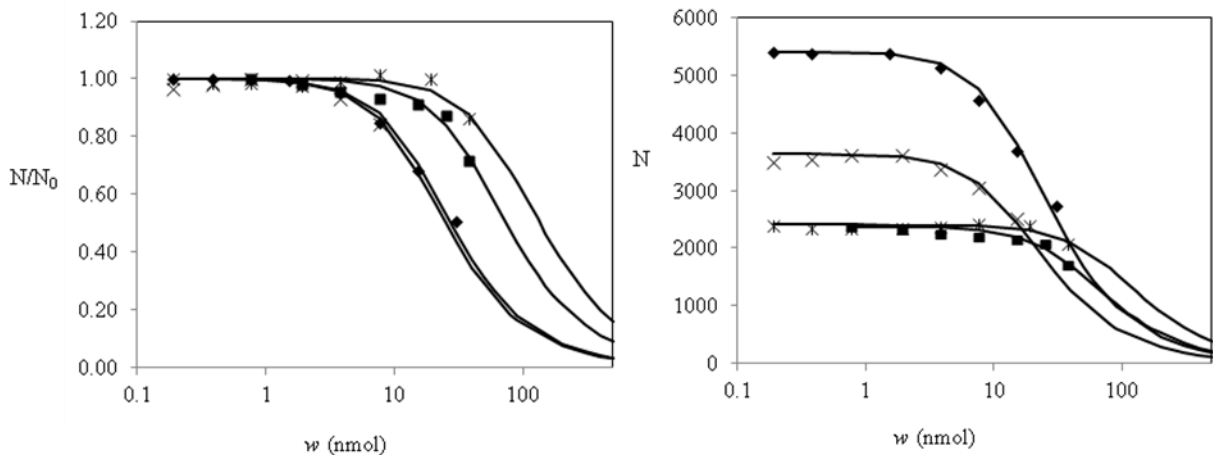


Figura 4.2.11 Efecto de la carga de muestra para el número de platos teóricos normalizados (izquierda) y el número de platos teóricos (derecha) para (\*) ODS, (■) 5  $\mu\text{m}$  C/Al/SiO<sub>2</sub>, (◆) PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y (X) C/ZrO<sub>2</sub>. La línea continua corresponde al mejor ajuste de los datos a la ecuación 4.2.4;  $\omega_{0.5} = 135, 74, 28$  y  $25$  para ODS, C/Al/SiO<sub>2</sub>, PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub> respectivamente. Condiciones:  $F = 0.4$  mL/min,  $T = 40$  °C, detección 210 nm; composición de solvente 43/57, 35/65, 31/69 acetonitrilo/agua para ODS, 25 % C/Al/SiO<sub>2</sub>, C/ZrO<sub>2</sub> respectivamente. Columnas de 33 mm x 2.1 mm.

Las curvas generadas se ajustan bien a los datos experimentales. Como es de esperar, el ODS tiene una mayor capacidad de carga que las fases de carbono. El material de C/Al/SiO<sub>2</sub> con mayor superficie específica, es menos sensible a la carga de muestra que el PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> y C/ZrO<sub>2</sub>. La carga de muestra de PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> ( $\omega_{0.5} = 28$  nmol) es comparable con la de C/ZrO<sub>2</sub> ( $\omega_{0.5} = 25$  nmol), lo cual era de esperar teniendo en cuenta los valores de superficie específica mostrados en la tabla 4.2.1.

### 4.2.3 Conclusiones

Se ha desarrollado una fase estacionaria recubierta con carbono utilizando como sustrato partículas de núcleo sólido de última generación (Poroshell 120, 2.7  $\mu\text{m}$ ), aplicando el

método de depósito de carbono sobre partículas completamente porosas descrito anteriormente por Paek *et al.* El depósito de Al (III) prácticamente no afecta la estructura de poros original de la sílice. Luego del recubrimiento con carbono, el material resultante (PSH C/Al/SiO<sub>2</sub>) puede ser introducido en columnas que exhiben mayor eficiencia (~ 160,000/m) que el producto comercial de 3 µm C/ZrO<sub>2</sub> (~ 124,000/m). De hecho, las eficiencias conseguidas con la columna de PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> fueron de hasta ~ 5.6 veces para algunos derivados aromáticos polares, de particular interés para muestras biológicas de metabolitos polares.

El material sintetizado PSH C/Al/SiO<sub>2</sub> produjo mejores resultados en minimizar el efecto de distorsión de picos por el efecto del solvente de inyección, aunque no fue tan bueno como el mostrado por las partículas completamente porosas de C/Al/SiO<sub>2</sub> anteriormente desarrolladas por Paek *et al.*

### 4.3 Referencias

- (1) Guillarme, D.; Ruta, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *397*, 1069–1082.
- (2) Snyder, L. R.; Dolan, J. W.; Carr, P. W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 77–116.
- (3) Zhang, Y.; Carr, P. W. A visual approach to stationary phase selectivity classification based on the Snyder–Dolan Hydrophobic-Subtraction Model. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6685–6694.
- (4) Jackson, P. T.; Carr, P. W. Study of polar and nonpolar substituted benzenes and aromatic isomers on carbon-coated zirconia and alkyl bonded phases. *J. Chromatogr. A* **2002**, *958*, 121–129.
- (5) Zhang, Y.; Huang, Y.; Carr, P. W. Optimization of the synthesis of a hyper-crosslinked stationary phases: A new generation of highly efficient, acid-stable hyper-crosslinked materials for HPLC. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 1407–1422.
- (6) Kirkland, J. J. Superficially porous silica microspheres for the fast high-performance liquid chromatography of macromolecules. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1239–1245.
- (7) Zhang, Y.; Wang, X.; Mukherjee, P.; Petersson, P. Critical comparison of performances of superficially porous particles and sub-2  $\mu\text{m}$  particles under optimized ultra-high pressure conditions. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4597–4605.
- (8) Cabooter, D.; Fanigliulo, A.; Bellazzi, G.; Allieri, B.; Rottigni, A.; Desmet, G. Relationship between the particle size distribution of commercial fully porous and superficially porous high-performance liquid chromatography column packings and their chromatographic performance. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7074–7081.

- (9) Cesla, P.; Hájek, T.; Jandera, P. Optimization of two-dimensional gradient liquid chromatography separations. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3443–3457.
- (10) Alexander, A. J.; Ma, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography separations of pharmaceutical samples using dual Fused-Core columns in the 2nd dimension. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 1338–1345.
- (11) Chauve, B.; Guillarme, D.; Cléon, P.; Veuthey, J. Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 752–764.
- (12) David V., M. Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1193*, 85–91.
- (13) Cacciola, F.; Jandera, P.; Hajdú, Z.; Česla, P.; Mondello, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel gradients for separation of phenolic and flavone antioxidants. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1149*, 73–87.
- (14) Stoll, D. R.; Carr, P. W. Fast, Comprehensive Two-Dimensional HPLC Separation of Tryptic Peptides Based on High-Temperature HPLC. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5034–5035.
- (15) Jandera, P.; Hájek, T.; Česla, P. Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1995–2006.
- (16) Knox, J. H.; Ross, P. Carbon-Based Packing Materials for Liquid Chromatography: Structure, Performance, and Retention Mechanisms. *Adv. Chromatogr.* **1997**, *37*, 73–119.
- (17) Unger, K. K. Porous carbon packings for liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 361A–375A.

- (18) Paek, C.; McCormick, A. V.; Carr, P. W. Preparation and evaluation of carbon coated alumina as a high surface area packing material for high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 6475–6483.
- (19) Paek, C.; McCormick, A. V.; Carr, P. W. New method for development of carbon clad silica phases for liquid chromatography: Part I. Preparation of carbon phases. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1359–1366.
- (20) Neue, U. D. *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*; 1st ed.; Wiley-VCH, 1997.
- (21) Wilke, C. R.; Chang, P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *AIChE Journal* **1955**, *1*, 264–270.
- (22) Baker, J. S.; Vinci, J. C.; Moore, A. D.; Colón, L. A. Physical characterization and evaluation of HPLC columns packed with superficially porous particles. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 2547–2557.
- (23) Melander, W. R.; Horváth, C. Stationary phase effects in reversed-phase chromatography II. Substituent selectivities for retention on various hydrocarbonaceous bonded phases. *Chromatographia* **1982**, *15*, 86–90.
- (24) Tchaplá, A.; Colin, H.; Guiochon, G. Linearity of homologous series retention plots in reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 621–625.
- (25) Melander, W.; Stoveken, J.; Horváth, C. Stationary phase effects in reversed-phase chromatography: I. Comparison of energetics of retention on alkyl-silica bonded phases. *J. Chromatogr. A* **1980**, *199*, 35–56.
- (26) Vitha, M.; Carr, P. W. The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1126*, 143–194.
- (27) Barton, S. S.; Boulton, G. L.; Harrison, B. H. Surface studies on graphite: Acidic surface oxides. *Carbon* **1972**, *10*, 395–400.

- (28) West, C.; Elfakir, C.; Lafosse, M. Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3201–3216.
- (29) Oláh, E.; Fekete, S.; Fekete, J.; Ganzler, K. Comparative study of new shell-type, sub-2  $\mu\text{m}$  fully porous and monolith stationary phases, focusing on mass-transfer resistance. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 3642–3653.
- (30) Wang, X.; Barber, W. E.; Carr, P. W. A practical approach to maximizing peak capacity by using long columns packed with pellicular stationary phases for proteomic research. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1107*, 139–151.
- (31) Gritti, F.; Guiochon, G. Comparison of heat friction effects in narrow-bore columns packed with core–shell and totally porous particles. *Chem. Eng. Science* **2010**, *65*, 6310–6319.
- (32) Dai, J.; Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T.; Lucy, C. A.; Carr, P. W. Effect of anionic additive type on ion pair formation constants of basic pharmaceuticals. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1069*, 225–234.
- (33) Colin, H.; Ward, N.; Guiochon, G. Comparison of some packings for reversed-phase high-performance liquid-solid chromatography: I. Some analytical considerations. *J. Chromatogr. A* **1978**, *149*, 169–197.
- (34) Unger, K.; Roumeliotis, P.; Mueller, H.; Goetz, H. Novel porous carbon packings in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1980**, *202*, 3–14.
- (35) Lucy, C. A.; Wade, J. L.; Carr, P. W. Study of preparative reversed-phase chromatography by application of kinetic and equilibrium models of column overload. *J. Chromatogr. A* **1989**, *484*, 61–82.

## **Capítulo V**

### **Procesamiento y representación de los datos**

#### **5.1 Introducción**

La falta de herramientas de software robustas, simples de utilizar y comercialmente disponibles es sin duda uno de los principales factores que demoran la rápida adopción de la LCxLC en línea para el análisis de muestras complejas. Esto está cambiando de a poco y ya se encuentran al menos dos productos comerciales, de los cuales uno va mostrando un rápido y constante desarrollo.

Es habitual que la misma compañía que se encarga de desarrollar un instrumento, sea la que promueve el desarrollo de todas las herramientas necesarias para la mejor utilización de la técnica. En el caso de GCxGC en línea, ya se encuentra comercialmente disponible hace varios años. Si bien conceptualmente GCxGC en línea es muy similar a LCxLC en línea, hay diferencias prácticas muy importantes. La complejidad que agrega la fase móvil líquida, tanto en la detección como en la interface, ha desalentado el interés por su comercialización. La complejidad en su uso y el entrenamiento necesario para el correcto uso es otro factor a tener en cuenta. Desde el punto de vista del software, no debería haber grandes diferencias en el procesamiento de los datos provenientes de un sistema GCxGC o LCxLC. Pero las empresas que fabrican los instrumentos GCxGC y poseen tal software, no lo suelen ofrecer como un producto flexible; el mismo está diseñado para sus sistemas y aunque se lo pudiera adquirir comercialmente, no podría ser modificado y adaptado para las necesidades específicas de LCxLC en línea, por restricciones de licencia.

Es también importante entender que siendo una técnica que aún está en fuerte desarrollo, la necesidad de contar con herramientas que el investigador pueda modificar es de mayor importancia. Por esta razón vemos que casi la totalidad de los grupos de investigación que trabajan en LCxLC han enfrentado la ardua tarea de desarrollar sus propias aplicaciones.

## **5.2 Razones para diseñar un software en este trabajo**

Este trabajo no fue la excepción, y la necesidad de contar con estas herramientas fue rápidamente identificada. Así es que durante este trabajo se desarrollaron las herramientas necesarias para poder procesar, analizar y visualizar los datos apropiadamente. A continuación se presenta un diagrama de flujo de datos, que es el utilizado por el software desarrollado en esta tesis. Como podemos ver en la figura 5.2.1, son muchos los pasos que se deben seguir para llegar a resultados de simple interpretación, e incluso varios de los pasos son opcionales y se deben aplicar dependiendo de las características de los datos.



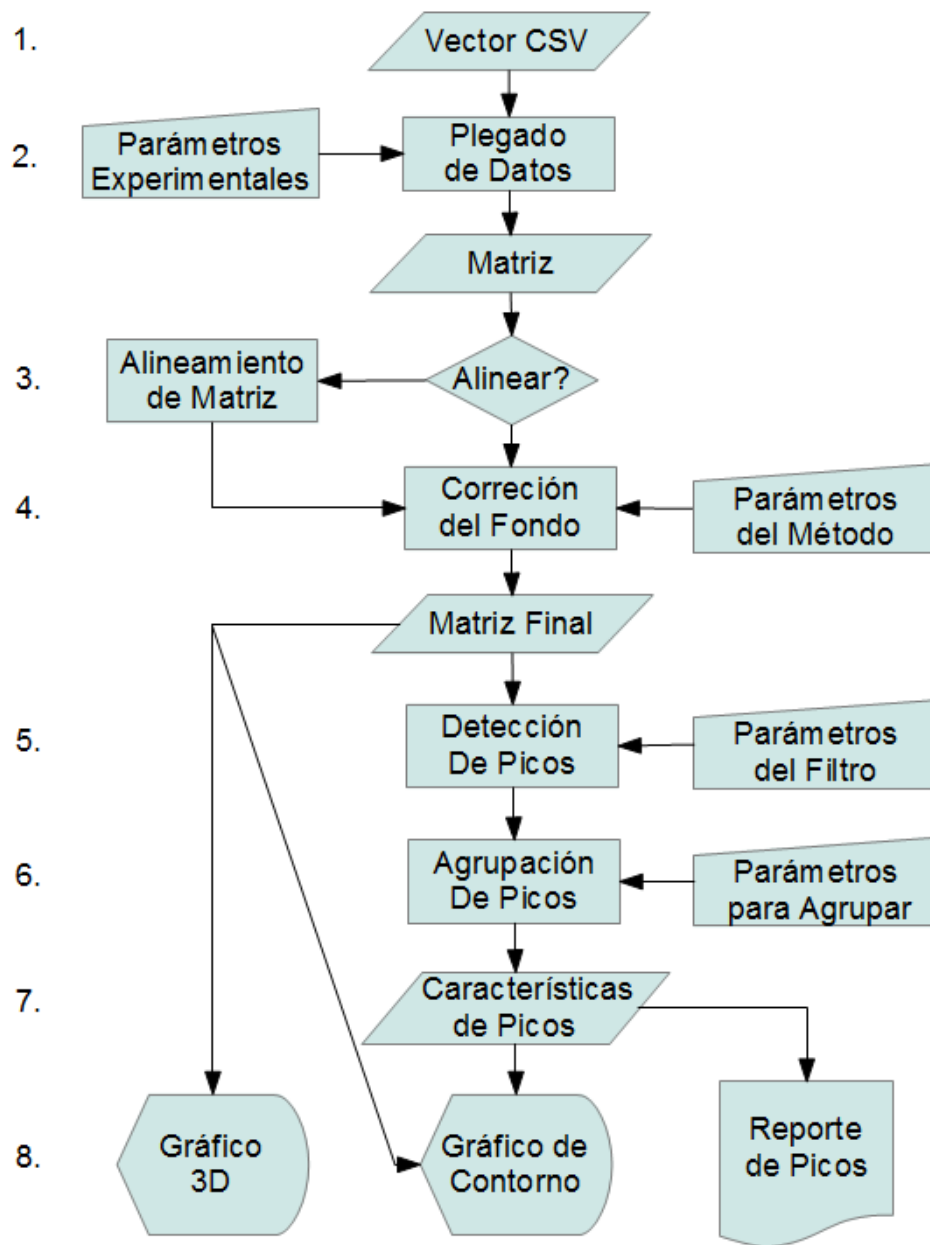


Figura 5.2.1 Diagrama de flujo de datos utilizado en el software desarrollado para el procesamiento, análisis y detección de los datos obtenidos en los experimentos de LCxLC en línea.

A continuación se describen de forma general las características de los datos y los procedimientos correspondientes a las etapas numeradas del 1 al 8 en la figura 5.2.1.

1. Los datos son adquiridos por el software del fabricante de los componentes utilizados para ensamblar el instrumento, Chemstation de Agilent. El experimento bi-dimensional es adquirido como un único cromatograma que contiene todos los ciclos de la segunda dimensión en serie. Este cromatograma es exportado por el software a un archivo de valores separados por comas (CSV) que es leído por el software desarrollado y convertido a un vector que contiene en la primer columna el tiempo en minutos para el cual se obtuvo cada dato y en la segunda columna el valor de la señal en mili unidades de absorbancia (mAU) para cada punto correspondiente de la primera columna.
2. Con los parámetros del experimento, como tiempo de ciclo de la segunda dimensión y la frecuencia de la adquisición de datos del detector, se procede a eliminar la columna correspondiente al tiempo, y se “pliega” cada una de las corridas bi-dimensionales individuales para formar una matriz que contiene cada ciclo muestreado de la primera dimensión en las columnas y cada punto de la segunda dimensión tomado por el detector en las filas.
3. El alineamiento es opcional y puede ser interno o externo. Si es interno, se puede alinear, por ejemplo, cada cromatograma sucesivo de la segunda dimensión al cromatograma anterior, o a uno de referencia. Esto se implementó buscando minimizar el coeficiente de correlación entre el cromatograma a alinear y el de referencia. Si es externo, se busca alinear todo el cromatograma con otro cromatograma bi-dimensional de otro experimento. Esto suele ser de interés en la utilización de métodos quimiométricos como PARAFAC y no fue implementado aún.

En general, la alineación intenta solucionar problemas en el diseño o la falta de reproducibilidad del instrumento. Si bien ha sido de utilidad en ciertos casos, se considera que en la medida de lo posible, el problema debe ser corregido en lo instrumental en vez de desarrollar herramientas de software para solucionar problemas del instrumento.

4. La corrección de fondo se realiza a través del método de corrección ortogonal de fondo (oBGc) que se discute en detalle más adelante. Los parámetros permiten seleccionar el método más adecuado según el tipo de datos a procesar.
5. La detección de los picos cromatográficos se realiza en este caso a través de los máximos en la señal invertida obtenida luego de aplicar un filtro gaussiano de derivada segunda en modo de ventana deslizante. De esta forma, el máximo de la señal filtrada corresponde a la posición del máximo en el cromatograma original de donde se lee el valor de absorbancia. Los dos mínimos antes y después de cada máximo, corresponden a los puntos de inflexión de un pico (aproximadamente) gaussiano que pueden utilizarse para estimar el ancho del pico. Alternativamente se implementó un filtro gaussiano de derivada primera en modo de ventana deslizante para detectar los límites de integración según el método clásico.
6. Idealmente, la segunda dimensión debe ser lo suficientemente rápida como para poder tomar varias muestras de cada pico cromatográfico que eluye de la primera dimensión. Si esto no fuera así, durante el proceso de muestreo de la primera dimensión, estaríamos juntando lo que ya fue separado. Peters *et al.* (1) desarrollaron un algoritmo para poder determinar si dos picos encontrados en cromatogramas sucesivos de la segunda dimensión, corresponden o no, al mismo pico cromatográfico de la primera dimensión. Los parámetros que se utilizan para la decisión son el criterio de superposición de los picos y el criterio de unimodalidad. En el software

aquí desarrollado se realizó una implementación del algoritmo como fue descrito en el trabajo antes mencionado.

7. Una vez detectados los picos individuales de cada cromatograma y agrupados según el criterio mencionado en el inciso anterior, se pueden obtener las características de los picos bi-dimensionales encontrados. En la implementación actual se pueden reportar los siguientes datos de los picos:
  - a. Tiempo de retención en la primera dimensión, calculado a través del promedio de los tiempos de retención, ponderados por la altura de los picos de fracciones sucesivas muestreadas para cada uno de los componentes de un único pico de la primera dimensión.
  - b. Tiempo de retención en la segunda dimensión representado a través del tiempo de retención del pico más alto de los picos agrupados.
  - c. Ancho del pico en la base para la segunda dimensión estimado a través del ancho en los mínimos de la derivada segunda ó alternativamente a través de la derivada primera.
  - d. Suma de la altura de todos los picos individuales que componen un pico bi-dimensional.
  - e. Número de picos agrupados para formar el pico bi-dimensional.
8. El resultado del procesamiento de los datos puede ser visualizado a través de imágenes y en un archivo generado como reporte de los picos detectados con los parámetros del experimento y las características de los picos mencionadas en el inciso anterior. Los gráficos generados siguen siendo de fundamental importancia ya que la inspección visual del cromatografista sigue siendo aún el mejor criterio de aceptación.

En la gran mayoría (si no la totalidad) de los software para cromatografía, cuando se analizan muestras complejas, es necesario el ajuste manual de los parámetros de detección e integración de los picos. En ese aspecto, la herramienta aquí propuesta no es la excepción a la regla.

A continuación se muestra una imagen de la interfaz gráfica del software desarrollado implementado en Matlab.

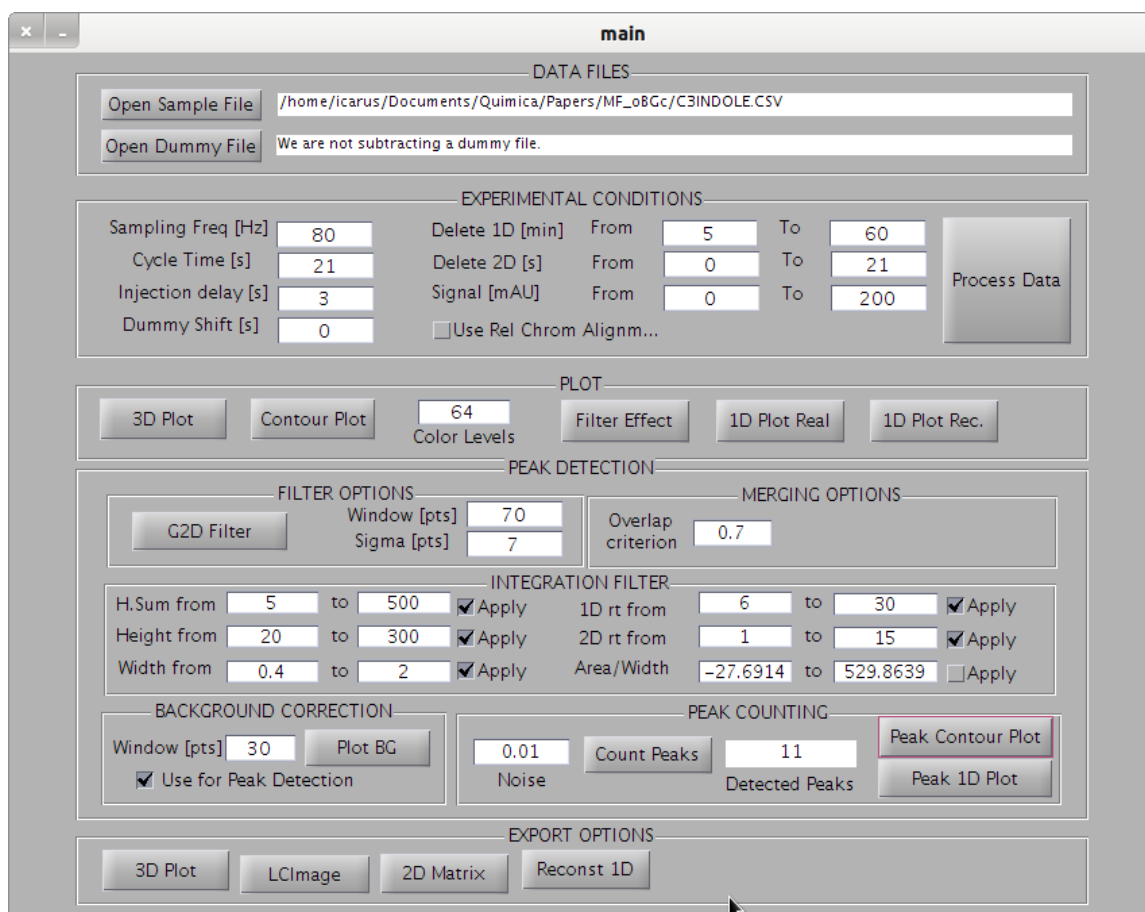


Figura 5.2.2 Interface gráfica del usuario para el software de procesamiento y representación de datos de cromatografía bi-dimensional desarrollado en Matlab.

### **5.3 Método para corrección de fondo para cromatografía líquida bi-dimensional acoplada con DAD**

La detección de picos es uno de los pasos claves en el proceso de análisis de muestras metabolómicas. Este proceso es fuertemente afectado por la señal de fondo que puede mostrar una importante variación con el tiempo. La corrección de fondo es un paso muy importante que debe ser realizado antes de cualquier análisis cuantitativo para reducir la complejidad del proceso de detección de picos y mejorar los resultados cuantitativos.

Ha sido demostrado que en un sistema cromatográfico bi-dimensional, cuando un pico de la primera dimensión es muestreado por la segunda dimensión, tanto la altura como el área resultante de la serie de muestras de la segunda dimensión, representan adecuadamente al pico de la primera dimensión, cuando se logra muestrear al menos 3 veces al pico de la primera dimensión (2). Cuando los picos no están completamente resueltos, encontrar los límites de integración se hace más complicado. En este caso, la altura de pico es un mejor estimador de la cantidad del analito (fines cuantitativos) que el área. Incluso cuando los límites de integración son adecuadamente asignados, si por ejemplo un pico relativamente pequeño eluye antes de un mayor, la altura de pico es especialmente recomendada como medida cuantitativa del pico menor en lugar del área (3).

La altura del pico es también muy importante para poder determinar correctamente el ancho de los picos cromatográficos (4). Si la línea de base tiene una deriva significativa, la altura del pico puede ser muy afectada y corregir la línea de base se hace indispensable. La magnitud del efecto de la línea de base en la cuantificación de picos cromatográficos puede ser muy variada, dependiendo de la forma de la línea de base y de la región en la cual los picos eluyen, además del tamaño del pico.

Cuando no se realiza la corrección de fondo de la señal, el análisis quimiométrico puede ser también afectado ya que la mayoría de la varianza puede ser debida al fondo (5). Si bien el método descrito en este trabajo es demostrado con datos de un solo canal, puede ser aplicado a datos de detectores con múltiples canales. Los detectores de múltiples canales son aquellos que tienen la capacidad de generar varias señales (canales) simultáneas en función del tiempo; en este caso las distintas longitudes de onda del espectro obtenido con el detector DAD serían los múltiples canales. En un detector de espectrometría de masas, cada relación de masa sobre carga ( $m/z$ ) correspondería a cada canal.

### **5.3.1 Parte experimental**

En este trabajo se utilizaron dos tipos de datos diferentes para mostrar y discutir el principio de funcionamiento de la corrección ortogonal de fondo (oBGc). El primer tipo de datos consiste en corridas cromatográficas bi-dimensionales de muestras reales (datos reales), realizadas con los instrumentos descritos en este trabajo. El segundo tipo de datos se generó adicionando picos gaussianos bi-dimensionales simulados, a una serie de réplicas de corridas en blanco, es decir, sin muestra inyectada (datos híbridos).

Datos reales: Los datos reales de las corridas LCxLC en línea fueron tomados de un experimento publicado por Gu *et al.* (6). A continuación se incluye una breve descripción de las condiciones:

La columna de la primera dimensión fue Agilent Zorbax Bonus-RP 100 x 2.1 mm con partículas de 3.5  $\mu\text{m}$ . El solvente en el canal A fue buffer de fosfato 10 mM a pH: 5.7 y en el canal B acetonitrilo. Se utilizó un gradiente lineal de 0 a 24 min, 0 a 50 % B. A los 24.01 min el programa retornaba a las condiciones iniciales. El caudal fue de 0.1 mL/min y la temperatura se mantuvo a 40 °C.

La columna de la segunda dimensión fue de 33 x 2.1 mm, rellena en el laboratorio con partículas de 3.0  $\mu\text{m}$  de ZirChrom-CARB (ZirChrom Separations, Anoka, MN). La fase móvil en el canal A fue ácido fosfórico 10 mM y acetonitrilo en el canal B. El gradiente lineal utilizado fue de 0 a 0.30 min, 0 a 100 % B. A los 0.31 min el programa retornaba a las condiciones iniciales, permitiendo unos 3 s para el re-equilibrado del sistema y completando el tiempo para un ciclo de muestreo de 21 s. El caudal fue de 3.0 mL/min y la temperatura se mantuvo a 110 °C.

Las muestras utilizadas corresponden a una mezcla patrón de derivados de indoles (baja complejidad) y una muestra de un jugo (elevada complejidad). El procedimiento para la preparación de las muestras está descrito en detalle en la referencia antes mencionada.

Datos híbridos: Los experimentos para las corridas en blanco bi-dimensionales se realizaron como se describe a continuación.

Productos Químicos. El agua y acetonitrilo de grado cromatográfico se obtuvieron de Fisher Scientific (Pittsburg, PA, USA). El ácido perclórico de grado analítico fue adquirido de Mallinkdrodt Baker (Paris, Kentucky, USA). Todos los materiales fueron utilizados como se recibieron y las fases móviles fueron preparadas gravimétricamente ( $\pm 0.01$  g) y utilizadas sin posterior filtrado. Condiciones cromatográficas: Las fases móviles utilizadas tanto en la primera como en la segunda dimensión fueron ácido perclórico 10 mM en agua en el canal A y acetonitrilo en el canal B. La columna de la primera dimensión fue una Agilent Zorbax SB-C3 100  $\times$  4.6 mm con partículas de 3.5  $\mu\text{m}$ . El gradiente fue de 0 a 56 % B en 0 a 24.5 min y 0 % B a los 24.51 min. El caudal fue de 0.5 mL/min y el caudal en la bomba del divisor fue de 0.1 mL/min. La columna fue termostatazada a 40 °C. Para la segunda dimensión, la columna utilizada fue de las mismas características que la descrita para los datos reales. El gradiente fue de 0 a 100 % B en 0 a 0.15 min, y 0 % B a los 0.16 min. Se re-equilibró el sistema por unos 3 s completando un tiempo de ciclo de 12 s. El caudal fue de 3 mL/min y la



columna fue termostatzada a 110 °C. La configuración del equipo utilizado fue la que se describió en la sección 2.2, para el modo con división de caudal activa.

Luego, utilizando un simple programa realizado en Matlab R14 (R2011b, The Mathworks Inc, MA, USA), se simularon 20 picos gaussianos bi-dimensionales utilizando la siguiente ecuación:

$$Señal = Area \times \exp - \frac{1}{2} \left( \left( \frac{X - t_R^{1D}}{\sigma^{1D}} \right)^2 + \left( \frac{Y - t_R^{2D}}{\sigma^{2D}} \right)^2 \right)$$

donde  $X$  e  $Y$  corresponden a la variable independiente en cada dimensión;  $t_R^{1D}$  y  $t_R^{2D}$  corresponden a los tiempos de retención en la primera y segunda dimensión respectivamente;  $\sigma^{1D}$  y  $\sigma^{2D}$  representan la desviación estándar del pico gaussiano en la primera y segunda dimensión respectivamente. Los tiempos de retención de los picos simulados para ambas dimensiones fueron generados de forma pseudo-aleatoria, bajo una distribución uniforme, utilizando la función rand() de Matlab. La altura de pico fue también generada pseudo-aleatoriamente con una distribución exponencial, utilizando una altura promedio de 20 unidades (mAU). Los picos gaussianos bi-dimensionales así generados fueron sumados a cada una de las 5 réplicas de las matrices de los cromatogramas de las corridas en blanco. De esta forma, las características de los picos presentes eran perfectamente conocidas y el fondo es bien representativo de un experimento real.

Procesamiento de los datos. Todos los datos fueron adquiridos por el software de Agilent Chemstation como un único cromatograma con las múltiples corridas sucesivas de la segunda dimensión y luego exportado a un archivo csv para ser procesados posteriormente en Matlab utilizando programas propios.

## 5.3.2 Resultados y discusión

### 5.3.2.1 Estructura del fondo de la línea de base en LCxLC rápida acoplada con DAD

Varios autores han demostrado que la mejor forma de maximizar la capacidad de picos en LCxLC es utilizando elución en gradiente en ambas dimensiones (7–9). Cuando se utiliza elución en gradiente, el cambio de composición de la fase móvil genera distorsión en la línea de base principalmente por los siguientes dos efectos: (1) diferencia en absorbancia y (2) diferencia en el índice de refracción de los solventes mezclados. Ya que los gradientes en la segunda dimensión deben ser muy rápidos (0-100 % en 9 s a 3.0 mL/min) para minimizar el efecto de sub-muestreo, la línea de base es fuertemente distorsionada, especialmente por los cambios en el índice de refracción. La estructura del fondo (o línea de base) bi-dimensional puede ser descrita de la siguiente forma. La figura 5.3.1 muestra un único cromatograma de la segunda dimensión de una serie completa de un experimento bi-dimensional. Por conveniencia, vamos a dividir este cromatograma en tres regiones diferentes (A, B y C), que corresponden a tres características diferentes.

A). En la primer región (entre 0 y 3 s) se puede observar un pico muy angosto causado principalmente por la diferencia en el índice de refracción del solvente proveniente de la primera dimensión y el de la fase móvil al comienzo del gradiente de la segunda dimensión (prácticamente 100% acuosa). El gradiente de la primera dimensión comienza con una fase móvil de composición 100 % acuosa y luego la fracción del componente orgánico se va incrementando paulatinamente. Como el gradiente de la segunda dimensión siempre comienza con una composición de fase móvil 100% acuosa, el pico angosto en la región A va creciendo en magnitud como se muestra en la figura 5.3.1. Asimismo, dependiendo de la velocidad de rotación del dispositivo modulador y del volumen relativo de muestra transferida a la segunda dimensión respecto del volumen muerto de la columna, los

primeros segundos de la línea de base de cada corrida bi-dimensional pueden ser afectados. Desde ese punto de vista, cuanto más rápido sea el dispositivo modulador, mejor. Normalmente son pocos los picos de muestra que eluyen en esta sección.

B). La siguiente región comprende de los 3 s hasta 19 s en la figura 5.3.1. La “montaña” y luego la decreciente (a veces negativa) línea de base es debido a ambos efectos, tanto diferencias en el índice de refracción como en la absorbancia entre los solventes mezclados durante el gradiente; algunos pequeños defectos también se observan y son debidos a la falta de mezclado de los solventes del gradiente. Ésta es la región donde la mayoría de los picos de la muestra se encuentran.

C). La última región, entre los 19 s y 21 s, muestra un pico más ancho y de la misma altura en cada ciclo de la segunda dimensión, generado por el “lavado” del sistema (bomba, mezclador, tuberías, columna y detector) cuando el gradiente retorna rápidamente a las condiciones iniciales. Este pico también es debido principalmente a un rápido cambio en el índice de refracción de la fase móvil; este pico no es tan angosto como el pico de la región A, ya que el cambio de solvente que produce la perturbación debe atravesar el mezclador de la bomba. Aunque sea indeseable, algunos picos de la muestra que no se han logrado eluir completamente durante el gradiente, podrían eluir en esta región.

Como se puede observar, las líneas de base en LCxLC rápida con gradiente en ambas dimensiones acoplada con detectores UV (y probablemente cualquier detector óptico), pueden ser muy complicadas por las grandes variaciones que presentan y lo variado de sus características. Son éstas las variaciones que debemos remover de cada cromatograma individual de la segunda dimensión cuando se analiza una muestra real.

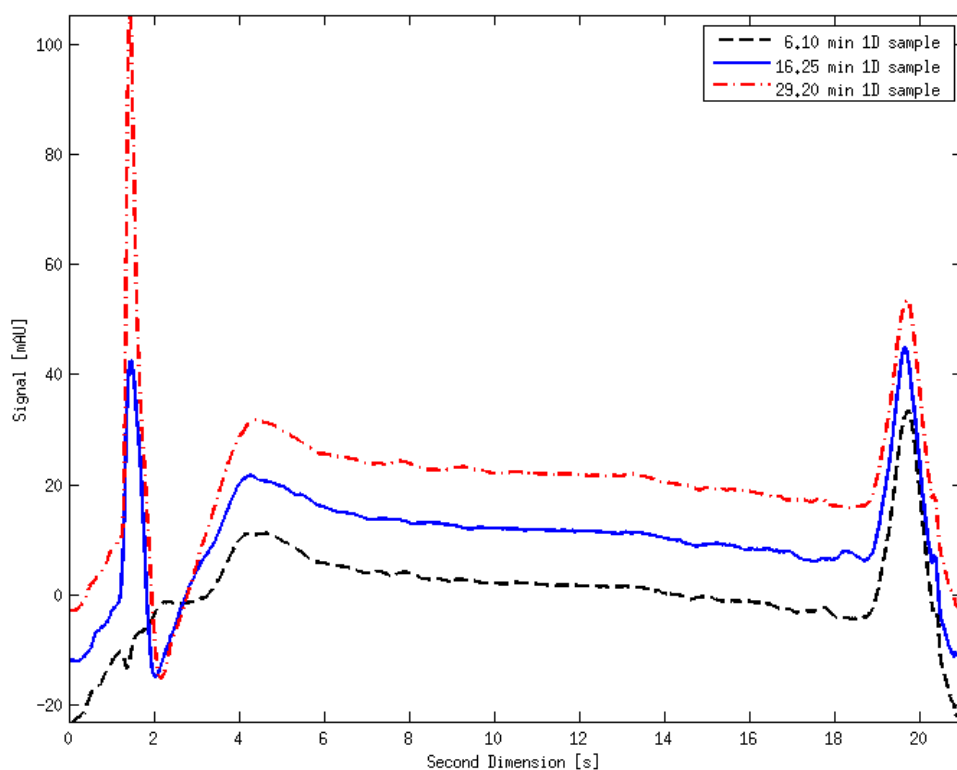


Figura 5.3.1 Estructura de la línea de base de tres cortes de un cromatograma bi-dimensional tomados a diferentes tiempos de la primera dimensión. El pico observado cerca de los 2 s varía según la composición del solvente de la muestra proveniente del gradiente de la primera dimensión.

Como se mencionó antes, se espera que la variación a lo largo de la primera dimensión sea suave o nula, permitiendo obtener muchos cromatogramas de la segunda dimensión altamente reproducibles que generarán el cromatograma bi-dimensional. Esta suave, o casi nula variación a lo largo de la primera dimensión, se espera principalmente en las regiones B y C, aunque no en la zona donde eluye el solvente en la región A. Ésta es una característica fundamental en la que se basa el método oBGc.

Muchos métodos para la corrección de distintos tipos de líneas de base han sido desarrollados en las últimas décadas tanto para cromatografía como para espectroscopía. Si bien son más populares los métodos aplicados a datos de una dimensión, se ve un crecimiento importante

en el desarrollo de técnicas quimiométricas para corrección de fondo y también para resolver y cuantificar (10–12). Está más allá del objetivo de éste trabajo revisar y probar cada uno de ellos. Al lector interesado se le recomienda leer una revisión recientemente realizada por Komsta (5). Como prueba de concepto del método oBGc aquí desarrollado, dos técnicas populares de corrección de línea de base serán utilizadas. Una consiste en el uso de la función mediana aplicada como una ventana deslizante. Esta función fue aplicada a cromatografía de una dimensión por primera vez por Moore y Jorgenson en 1993 (13). Para poder obtener un óptimo resultado, el tamaño de la ventana deslizante utilizada debe ser de al menos el doble del ancho de los picos cromatográficos que serán “filtrados”, para obtener la línea de base que, en un segundo paso, será substraída del cromatograma original. Estos dos autores remarcan en el artículo que *“funciona mejor cuando los picos de interés se encuentran en una escala de tiempo muy diferente respecto al fondo no deseado”*. El otro método de corrección de línea de base utilizado es el propuesto por Mazet *et al.* (14). Los autores aplicaron un ajuste polinómico a datos espectroscópicos para obtener un ajuste al fondo, que luego era substraído de la señal original. El código implementado en Matlab del método que desarrollaron fue amablemente compartido por los autores y está disponible bajo la licencia FreeBSD en las contribuciones del sitio web de TheMathworks (15).

Cuando consideramos la línea de base de un único cromatograma bi-dimensional con la estructura que se muestra en la figura 5.3.2, encontramos que ninguno de los métodos propuestos puede ajustarse al fondo. En la figura 5.3.2 (a), los dos métodos antes mencionados son utilizados.

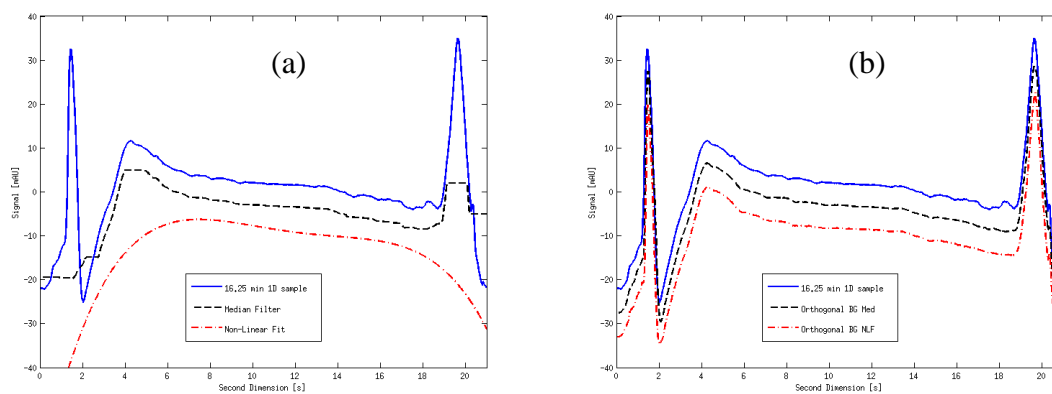


Figura 5.3.2 Comparación de distintos métodos para corrección de la línea de base en un único y típico cromatograma de la segunda dimensión. Línea continua azul: cromatograma original de la segunda dimensión. Línea a guiones negra: reproducción de la línea de base aplicando el filtro-mediana. Línea a guión y punto roja: ajuste polinómico a la línea de base. (a) Métodos de corrección de línea de base aplicados de forma convencional. (b) Métodos de corrección de línea de base aplicados según el método oBGc.

A pesar de que los parámetros utilizados en estos filtros pudieran ser levemente mejorados, claramente ninguno de los dos métodos es capaz de reproducir la línea de base y por lo tanto al substraer tal ajuste del cromatograma original generaría una serie de artefactos extraños. En el caso del filtro-mediana, si se hubiera utilizado una ventana de menor tamaño, se estarían removiendo picos reales de la muestra al substraer la línea de base del cromatograma. Con el ajuste polinómico no fue posible reproducir el fondo incluso utilizando funciones de grado mucho mayor.

El método oBGc se basa en los métodos convencionales, pero en dos pasos: 1) los métodos se aplican a lo largo de la primera dimensión para cada punto sucesivo de los datos adquiridos en la segunda dimensión. 2) la línea de base obtenida es substraída del cromatograma a lo largo de la primera dimensión. La gran ventaja de este método radica en que los efectos de la línea de base causados por el gradiente de la primera dimensión, prácticamente eluyen en el

tiempo muerto de la segunda dimensión, dejando una línea de base limpia para cualquier corte posterior de la primera dimensión.

La figura 5.3.3 corresponde a un gráfico de contornos de un cromatograma bi-dimensional de la muestra compleja de jugo que contiene una gran cantidad de picos cromatográficos.

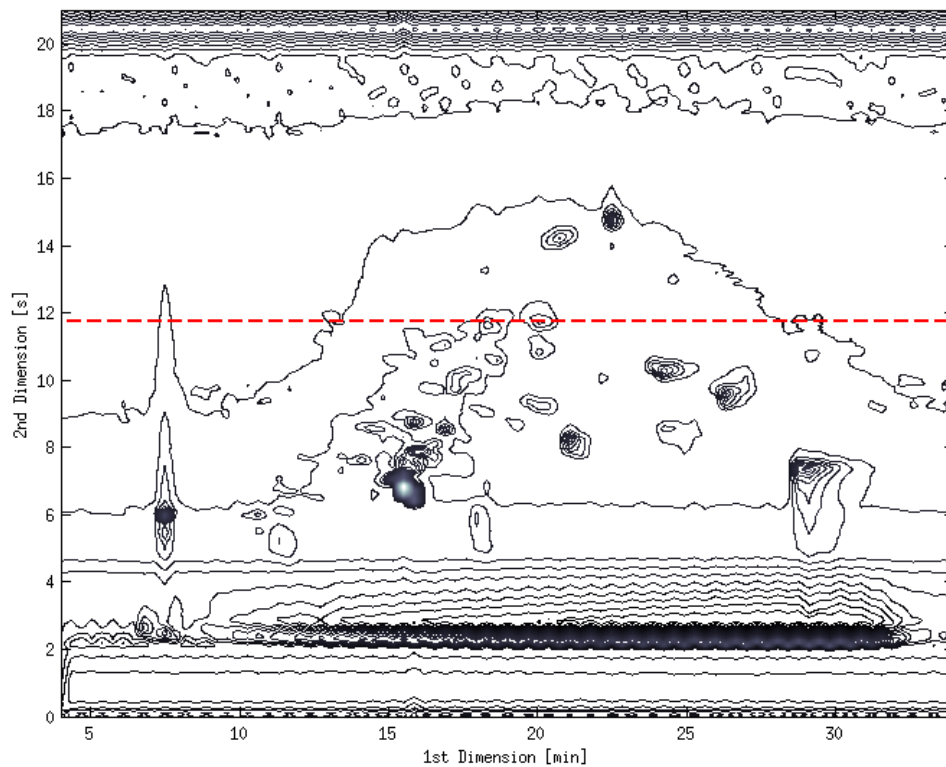


Figura 5.3.3 Representación por gráfico de contornos del cromatograma bi-dimensional de la muestra compleja de jugo. La línea roja representa el corte a lo largo de la primera dimensión de un cromatograma tomado a los 11.75 s de la segunda dimensión. Las condiciones experimentales se describen en la sección 5.2.

Si tomamos un corte a lo largo de la primera dimensión como se representa por la línea roja de la figura 5.3.3 y graficamos la intensidad de la señal vs. tiempo de retención de la primera dimensión, esto representará un cromatograma de la primera dimensión tomado a los 11.75 s de la segunda dimensión. En este caso, la segunda dimensión tiene un tiempo de ciclo de 21 s

y los datos en el detector son adquiridos con una frecuencia de 80 Hz. Esto nos provee de 1680 puntos y, por lo tanto, de 1680 cromatogramas a lo largo de la primera dimensión para cada punto de la segunda dimensión. De esta forma, la función de ajuste se aplica a cada uno de estos 1680 cromatogramas donde cada uno nos proveerá la línea de base a cada punto de la segunda dimensión. Al juntarlos todos, se logra recrear la estructura completa del cromatograma bi-dimensional que luego puede ser utilizado para substrair el fondo al cromatograma bi-dimensional para obtener la corrección deseada. El resultado de aplicar el método oBGc para la corrección de una corrida bi-dimensional en blanco, se muestra en la figura 5.3.2 (b) para el mismo cromatograma de la segunda dimensión que en la figura 5.3.2 (a). En la figura 5.3.4 se muestra el resultado de aplicar este procedimiento para dos muestras diferentes. La primera es una muestra simple con relativamente pocos picos; ambos métodos proveen una casi perfecta estimación del fondo que se encuentra a unas 7 mAU por encima del cero. La segunda es una muestra compleja con muchos componentes no resueltos. Incluso para el caso de la muestra compleja, ambos métodos logran producir una estimación razonable del fondo. En ambos casos de la figura 5.3.4, las curvas de ajuste obtenidas con los métodos de corrección están desplazadas en 5 mAU para mejor visualización. Utilizando los mismos métodos pero de forma ortogonal a la dirección en que se adquieren los datos de la segunda dimensión hace que la corrección de fondo sea muy simple.



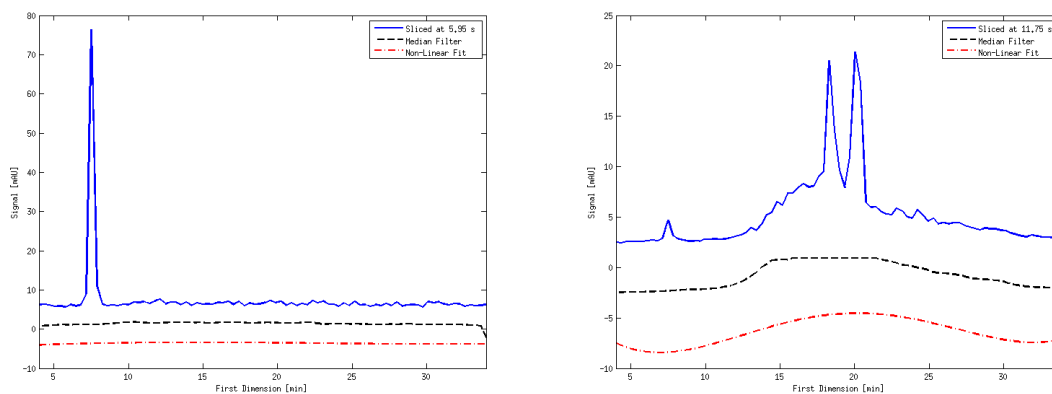


Figura 5.3.4 El trazo azul corresponde al cromatograma del corte a lo largo de la primera dimensión tomado a los 5.95 s de la segunda dimensión de un cromatograma bi-dimensional de una muestra de patrones (izquierda) y del corte a lo largo de la primera dimensión tomado a los 11.75 s de la segunda dimensión de un cromatograma bi-dimensional de una muestra de jugo (derecha). En ambos casos, el trazo a guiones negro es la línea de base generada luego de aplicar el filtro-mediana y el trazo rojo a puntos y guiones es la línea de base generada luego de aplicar el ajuste polinómico del método de Mazet *et al.* (14).

En la figura 5.3.5 (a) se muestra un típico cromatograma híbrido bi-dimensional en gráficos 3D con 20 picos gaussianos bi-dimensionales adicionados a una corrida en blanco como se describió en la sección experimental. Cuando aplicamos el método oBGc utilizando el filtro-mediana, generamos la estructura del fondo como se muestra en la parte (b) de la misma figura. Es evidente que la banda generada en la región A de la segunda dimensión no es completamente reproducida; el uso de un filtro mediano con una ventana más angosta hubiera reproducido mejor esta zona, pero también hubiera reproducido picos reales de la muestra que después serían substraídos. En la figura 5.3.5, al substraer el fondo mostrado en (b) al cromatograma original mostrado en (a), obtenemos el cromatograma mostrado en (c). Podemos observar que la mayoría del fondo es removido aplicando este procedimiento.

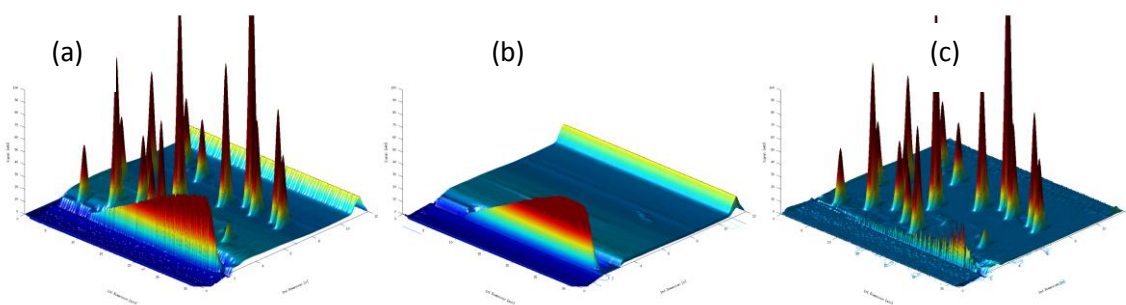


Figura 5.3.5 Representación en gráficos 3D de (a) uno de los cromatogramas bi-dimensionales híbridos (b) fondo generado aplicando el método oBGc utilizando el filtro-mediana (c) resultado de sustraer el fondo obtenido al cromatograma híbrido.

Para poder medir el efecto del fondo en la altura de los picos cromatográficos y en la reproducibilidad cuando se aplica el método oBGc, el mismo set de 20 picos sintéticos es adicionado a las 5 réplicas de corridas en blanco reales como se explicó en la sección experimental. Se procedió a detectar los picos presentes y la altura de pico fue medida para los dos casos, sin la corrección de fondo y con la corrección utilizando el método oBGc con filtro-mediana. Cuando no es aplicada la corrección de fondo, las alturas de los picos más pequeños se ven fuertemente afectadas por el fondo, como se puede ver en la tabla 5.3.1. El error promedio cuando no se aplica la corrección de fondo es de 3 mAU, y a pesar que esto parece ser un número pequeño, es reducido en un factor de 40 cuando se aplica el método oBGc. La desviación estándar relativa porcentual en la altura de los picos es realmente una medida de la reproducibilidad del instrumento LCxLC, ya que los picos son sintéticamente generados y son exactamente los mismos en todos los casos. La reproducibilidad cuando se aplica la corrección oBGc es mejorada en un factor de 3.5. Cuando se consideran muestras complejas, las características de los pequeños picos son muy importantes en la caracterización de la muestra y de su perfil, es como obtener la “huella digital” de la misma.

Tabla 5.3.1 Error y reproducibilidad en la altura de pico sin y con corrección de fondo

Valores simulados <sup>a</sup>			Detección sin oBGc <sup>b</sup>			Detección con oBGc <sup>c</sup>		
Altura real [mAU]	t <sub>R</sub> 1D [min]	t <sub>R</sub> 2D [s]	Altura aparente <sup>d</sup> [mAU]	% ER <sup>e</sup>	% RSD <sup>f</sup>	Altura aparente <sup>d</sup> [mAU]	% ER <sup>e</sup>	% RSD <sup>f</sup>
1.76	6.0	5.11	6.36	261	7.77	1.73	-1.87	3.34
2.16	16.0	7.44	5.38	148	6.29	2.14	-1.09	1.71
3.91	22.2	9.99	6.91	76.6	4.07	3.79	-3.23	5.07
4.85	9.8	4.26	9.54	97.0	3.54	4.78	-1.25	0.58
5.10	27.6	8.81	7.88	54.5	3.17	4.99	-2.04	0.40
5.83	9.4	8.05	8.77	50.4	4.67	5.80	-0.57	0.86
7.16	24.2	6.01	11.4	58.9	2.82	7.12	-0.55	0.39
7.85	27.2	9.84	10.8	37.3	2.43	7.80	-0.58	0.20
10.8	21.6	2.64	7.05	-34.7	6.63	10.7	-0.50	0.74
11.2	18.0	4.74	15.8	40.9	2.20	11.2	-0.32	0.22
12.4	10.0	10.4	15.6	26.2	2.38	12.2	-1.54	0.68
12.8	3.2	9.18	15.8	23.5	3.75	12.7	-0.52	0.50
14.2	20.4	9.69	17.1	20.4	1.67	14.1	-0.54	0.41
16.1	15.2	4.69	20.7	28.5	1.97	16.1	-0.22	0.44
20.2	10.8	3.39	24.8	22.9	2.43	20.0	-0.51	0.12
22.7	25.2	9.14	25.6	12.6	0.93	22.7	-0.24	0.13
24.4	6.4	9.35	27.3	12.1	1.76	24.3	-0.16	0.27
38.5	18.4	3.00	38.8	0.76	0.17	38.5	-0.02	0.98
40.5	5.8	3.96	45.3	11.8	0.79	40.4	-0.22	0.12
66.2	11.4	10.4	69.5	4.86	0.51	66.0	-0.32	0.07
			Promedio	47.7	3.00	16.7	-0.81	0.86
			Media	27.3	2.43	11.7	-0.53	0.42

<sup>a</sup> Valores reales de los picos generados de forma sintética y luego adicionados a las 5 réplicas de las corridas bi-dimensionales en blanco.

<sup>b</sup> Detección de picos en las 5 réplicas de los cromatogramas híbridos realizada sin aplicar corrección de fondo.

<sup>c</sup> Detección de picos en las 5 réplicas de los cromatogramas híbridos realizada luego de aplicar el método oBGc para la corrección de fondo.

<sup>d</sup> Altura promedio de los picos detectados en las 5 réplicas de los cromatogramas híbridos.

<sup>e</sup> Error porcentual relativo del promedio de la altura de los picos con respecto a la altura real de los valores simulados.

<sup>f</sup> Desviación estándar relativa porcentual de la altura de los picos detectados en las 5 réplicas con respecto a la altura real de los valores simulados.

Cuando tomamos en cuenta la reproducibilidad a largo plazo (incluso para el mismo instrumento), la capacidad de poder remover el fondo juega un papel aún más importante al momento de comparar resultados. El resultado es un procedimiento de cuantificación simple, más exacto y más preciso. Este método puede ser aplicado con modificaciones menores a otras técnicas bi-dimensionales.

Si bien los efectos del cambio rápido de solvente no tienen un efecto tan marcado en otros detectores como el de espectrometría de masas, la elevada reproducibilidad, interferencia de co-eluyentes, capacidad de funcionar a muy elevados caudales y bajo costo inicial y de mantenimiento, hacen que el DAD sea un detector muy útil para LCxLC en línea como se mencionó en el capítulo III.

### **5.3.3 Conclusiones**

(1). El método oBGc puede corregir de forma efectiva el fondo en LCxLC en línea utilizando muchos de los ya existentes métodos de corrección de línea de base.

(2). Esta corrección de fondo permite mejorar la detección de los picos y sus características.

(3). La reproducibilidad de las alturas es mejorada luego de aplicar el método oBGc ya que la variación del fondo producido por el sistema es mayormente reducido.

## 5.4 Referencias

- (1) Peters, S.; Vivó-Truyols, G.; Marriott, P. J.; Schoenmakers, P. J. Development of an algorithm for peak detection in comprehensive two-dimensional chromatography. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1156*, 14–24.
- (2) Amadormunoz, O.; Marriott, P. Quantification in comprehensive two-dimensional gas chromatography and a model of quantification based on selected summed modulated peaks. *J. Chromatogr. A* **2007**.
- (3) Data Analysis and Signal Processing in Chromatography, 1998 - Attila Felinger.djvu.
- (4) Lan, K.; Jorgenson, J. W. Automated Measurement of Peak Widths for the Determination of Peak Capacity in Complex Chromatograms. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 709–714.
- (5) Komsta, ě. Comparison of Several Methods of Chromatographic Baseline Removal with a New Approach Based on Quantile Regression. *Chromatographia* **2011**, *73*, 721–731.
- (6) Gu, H.; Huang, Y.; Filgueira, M.; Carr, P. W. Effect of first dimension phase selectivity in online comprehensive two dimensional liquid chromatography (LC  $\times$  LC). *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 6675–6687.
- (7) Cesla, P.; Hájek, T.; Jandera, P. Optimization of two-dimensional gradient liquid chromatography separations. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 3443–3457.
- (8) Jandera, P.; Hájek, T.; Česla, P. Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1995–2006.

- (9) Vivó-Truyols, G.; van der Wal, S.; Schoenmakers, P. J. Comprehensive Study on the Optimization of Online Two-Dimensional Liquid Chromatographic Systems Considering Losses in Theoretical Peak Capacity in First- and Second-Dimensions: A Pareto-Optimality Approach. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8525–8536.
- (10) Goicoechea, H. C.; Culzoni, M. J.; García, M. D. G.; Galera, M. M. Chemometric strategies for enhancing the chromatographic methodologies with second-order data analysis of compounds when peaks are overlapped. *Talanta* **2011**, *83*, 1098–1107.
- (11) Bailey, H. P.; Rutan, S. C.; Carr, P. W. Factors that affect quantification of diode array data in comprehensive two-dimensional liquid chromatography using chemometric data analysis. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 8411–8422.
- (12) Thekkudan, D. F.; Rutan, S. C.; Carr, P. W. A study of the precision and accuracy of peak quantification in comprehensive two-dimensional liquid chromatography in time. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4313–4327.
- (13) Moore Jr, A. W.; Jorgenson, J. W. Median filtering for removal of low-frequency background drift. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 188–191.
- (14) Mazet, V.; Carteret, C.; Brie, D.; Idier, J.; Humbert, B. Background removal from spectra by designing and minimising a non-quadratic cost function. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, *76*, 121–133.
- (15) Background correction - File Exchange - MATLAB Central. <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/27429-background-correction> (accessed March 8, 2012).

## Capítulo VI

### Conclusiones generales y proyectos a futuro

#### 6.1 Resultados generales

Como resultado de este trabajo de tesis se logró un más profundo entendimiento de la cromatografía líquida bi-dimensional en línea y como mejorarla para resolver mezclas complejas en tiempos relativamente cortos. Se han analizado diferentes tipos de muestras de moléculas pequeñas, y es habitual lograr separaciones donde se observan cientos de picos cromatográficos en tiempos de análisis de 30 min.

En el capítulo II se estudió cómo maximizar el poder de resolución del sistema bi-dimensional implementando la división de caudal después de la primera columna y logrando duplicar el poder de resolución en un tiempo de análisis de 15 min. Esta ganancia se pudo lograr gracias a la optimización del uso del tiempo de gradiente de la primera dimensión pudiendo ésta última ser optimizada de forma independiente de la segunda dimensión.

Se estudió el efecto del tiempo de ciclo de la segunda dimensión y su relación con el tiempo de gradiente de la primera dimensión para optimizar la separación bi-dimensional. Se comprobó experimentalmente que el mejor tiempo de ciclo es aquel que provee la mayor producción de picos por unidad de tiempo en la segunda dimensión, pero que también hay una dependencia con el tiempo de gradiente de la primera dimensión. Este tiempo de ciclo óptimo resultó estar alrededor de los 12 s permitiendo un gradiente de 9 s y 3 s para re-equilibrar el sistema para tiempos de análisis menores a 60 min.

En el capítulo III se estudiaron los distintos factores que limitan al instrumental moderno para poder ser utilizado en un sistema de cromatografía líquida bi-dimensional en línea. Se estudiaron distintas configuraciones de dispositivos moduladores y se identificó como uno de los componentes clave para minimizar la distorsión en la línea de base durante los primeros segundos de la segunda dimensión. Se diseñó un prototipo de válvula de 8 puertos concéntrica que solucionaría las limitaciones y problemas de las válvulas que se encuentran en el mercado actual.

Se implementó un sistema de división de caudal luego de la columna de la primera dimensión, donde la relación de división se controla muy precisamente con una bomba ubicada luego del dispositivo modulador. Esto permite lograr un control total del volumen de muestra transferido a la segunda dimensión sin sacrificar reproducibilidad en el instrumento permitiendo optimizar la primera dimensión de forma independiente de la segunda.

En el capítulo IV se estudiaron distintas fases estacionarias. Se comprobó que cuando se utiliza fase reversa en ambas dimensiones, es de fundamental importancia que la fase estacionaria de la segunda dimensión sea de carbono. Esto se comprobó utilizando seis columnas de selectividad muy diferente en la primera dimensión sin encontrar grandes diferencias en los patrones de distribución de los picos en el espacio bi-dimensional.

Sobre la base de la importancia de la segunda dimensión y las ventajas de una fase estacionaria de carbono, se estudió una fase estacionaria obtenida aplicando un método anteriormente desarrollado para partículas de sílice completamente porosas de 5  $\mu\text{m}$ , a partículas de sílice parcialmente porosas de 2.7  $\mu\text{m}$ . Se estudió su aplicación como fase estacionaria para la segunda dimensión en LCxLC en línea, comprobando que en general es un material superior a los recientemente utilizados recubiertos con carbono sobre partículas completamente porosas de sílice u óxido de zirconio.



En el capítulo V se diseñó e implementó un software en el entorno Matlab para procesar y representar los datos obtenidos en los experimentos bi-dimensionales. Entre las características de la herramienta creada, se desarrolló un método nuevo para corregir el fondo generado por los cambios en el índice de refracción cuando se acopla un detector óptico como el de arreglo de diodos a la segunda dimensión de un sistema LCxLC en línea. Esto mejoró radicalmente la detección y cuantificación de picos cromatográficos en el espacio bi-dimensional siendo una importante contribución al método.

## **6.2 Proyectos a futuro**

Siendo esta técnica aún joven en comparación con la gran mayoría de los métodos instrumentales de separación, hay temas que van a requerir estudio a corto plazo:

### **6.2.1 Detección con espectrómetro de masas y comparación con DAD**

Si bien la detección óptica con DAD es muy conveniente por muchas de las razones mencionadas en el capítulo III, el detector de masas sigue siendo la herramienta más específica para identificar compuestos y elucidar nuevas estructuras. Acoplar un detector de masas a un sistema LCxLC en línea rápido es de fundamental importancia y también lo es una comparación crítica entre ambos detectores.

### **6.2.2 Utilización de métodos quimiométricos**

Los análisis realizados en este trabajo, si bien se adquirieron múltiples canales con el detector DAD, fueron realizados a una única longitud de onda. El uso de métodos quimiométricos para caracterizar el perfil de muestras complejas de metabolitos (perfil metabolómico) debe ser estudiado a la luz de la gran reproducibilidad del nuevo instrumento logrado. La combinación de un instrumento con muy alto poder de resolución y excelente

reproducibilidad acoplado con un detector de arreglo de diodos, puede permitir la caracterización de muestras biológicas en tiempos de análisis relativamente cortos (menores a 30 minutos).

### **6.2.3 Mecanismos de retención alternativos para la primera dimensión**

Siendo las muestras biológicas de muy alta importancia para la salud actual, es necesario estudiar la combinación de otros mecanismos de separación en la primera dimensión, como puede ser intercambio iónico.