

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**



---

**TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

***“Desarrollo y optimización de metodologías separativas de análisis de citrulina y aminoácidos metabólicamente relacionados”***

---

***Agustín Acquaviva***

Año 2014

Director: Dra. Cecilia Castells

Co-Director: Dra. Lilian Romero

El presente trabajo de Tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. El mismo estuvo bajo la dirección de la Dra. Cecilia Castells, y la co-dirección de la Dra. Lilian Romero.

# AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las cuales quisiera agradecer profundamente por el acompañamiento, su ayuda, y los consejos durante la realización de todo este trabajo, no solo desde lo laboral sino también por lo que aportaron desde el compañerismo, el aguante y la amistad, e hicieron que esto en gran parte fuera posible. Es por esto que quisiera agradecer:

- A toda mi familia de sangre, tanto a los que están, como a quienes me acompañan y guían desde arriba. Todos ellos han hecho lo posible e imposible para que pueda cumplir mis objetivos.
- A mis familiares de la vida, a esos tíos y primos con los que he crecido, disfrutado y aprendido.
- A mis directores por enseñarme, bancarme y guiar en todo momento.
- A todos mis compañeros y amigos que estuvieron y están en el LIDMA, con los cuales compartimos el día a día, dentro y fuera del ámbito laboral.
- A los amigos que me dio la Facultad, esos con los que uno pasaba horas estudiando o trabajando, que elegía y elige para compartir una salida, un partidito de fútbol, y por sobre todo, siempre estuvieron y están listos cuando se los necesita.
- A quienes fueron mis compañeros de cátedra por toda su solidaridad y enseñanza.
- A mis compañeros y amigos de Valencia, a quienes les debo muchísimo de todo lo realizado en este trabajo. Pero principalmente agradecer, por hacer de mi estadía un entorno rodeado por su enorme solidaridad, afecto, y calidez humana.
- A mis amigos de Saladillo, que pese a la distancia física, siguen cada día presentes y firme cuando se los necesita.
- A Tama, mi pareja, mi amiga, mi vida... quien me acompaña, protege, y aguanta como nadie.

**¡¡MUCHAS GRACIAS!!**

***”Digo la verdad cuando afirmo que desconozco otras regiones, que mi ignorancia de otras realidades es innumerable, pero en cambio puedo reivindicar la búsqueda apasionada en el camino que seguí”.***

**Ernesto Sabato**

# INDICE GENERAL

Aportes científicos	7
OBJETIVOS GENERALES	9
INTRODUCCIÓN GENERAL	10
I CAPÍTULO: DERIVATIZACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS	14
I.1 INTRODUCCIÓN	14
I.2 EXPERIMENTAL	22
I.2.1 Reactivos e Instrumentación	22
I.2.2. Derivatización	23
I.3 RESULTADOS	24
I.3.1 CONCENTRACIÓN Y pH DEL BUFFER	24
I.3.2 RELACIÓN ENTRE REACTIVOS	26
I.3.3 TIEMPO DE REACCIÓN	28
I.3.4 QUENCHER DE REACCIÓN – REPRODUCIBILIDAD	29
I.4 CONCLUSIONES PARCIALES	33
II CAPÍTULO COLUMNAS COMERCIALES	34
II.1 INTRODUCCIÓN	34
II.1.1 Columnas particuladas convencionales y uso de la temperatura	35
II.1.1.a Influencia de la temperatura en la retención	37
II.1.1.b Influencia de la temperatura en la selectividad para sistemas RPLC	38
II.1.2 Columnas de menor tamaño con partículas sub-2 $\mu$ m.	39
II.1.3. <i>Columnas monolíticas comerciales y fabricadas en el laboratorio. Descripción y características generales</i>	40
II.1.3.1 Monolitos Poliméricos	42
II.1.4 Columnas con partículas de núcleo sólido (fused core).	44
II.2 EXPERIMENTAL	47
II.2.1 Reactivos e instrumentación	47
II.3 RESULTADOS	47
II.3.1 HTLC CON COLUMNA PARTICULADA CONVENCIONAL	47
II.3.2 COLUMNAS RELLENAS CON PARTÍCULAS DE NÚCLEO SÓLIDO Y PELÍCULA POROSA	55
II.3.2.1 EFECTO DEL pH DE LA FASE MÓVIL	55
II.3.2.2 TEMPERATURA DE LA COLUMNA	56
II.3.2.3 SEPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE FMOC-AAs	57
II.3.2.4 APLICACIÓN A UNA MUESTRA DE PLASMA HUMANO	58
II.3.3 COLUMNA RELLENA MONOLÍTICA	59
II.3.3.1 CAUDAL DE LA FASE MÓVIL	60
II.3.3.2 TEMPERATURA DE LA COLUMNA	61
II.3.3.3 SEPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE FMOC-AAs	61
II.3.3.4. APLICACIÓN A UNA MUESTRA DE PLASMA HUMANO	62
II.3.4 COMPARACIÓN ENTRE LAS COLUMNAS HALO Y CHROMOLITH	63
II.3.5 VALIDACIÓN EMPLEANDO LA COLUMNA CHROMOLITH	66
II.3.5.1 Selectividad	66
II.3.5.2 Linealidad	67

II.3.5.3 Efecto de Matriz	71
II.3.5.4 CALIBRACIÓN POR ADICIONES ESTÁNDAR (AE)	73
II.3.5.4.1 LOD y LOQ	76
II.3.5.5 CALIBRACIÓN POR ESTÁNDAR EXTERNO (EE)	76
II.3.5.5.1 LOD y LOQ	79
II.3.5.6 PRECISIÓN	79
II.3.5.7 EXACTITUD (RECUPERACIÓN)	80
II.3.5.8 USO DE UN ESTANDAR INTERNO (EI) EN EL MÉTODO DE CALIBRACIÓN DE AE	81
II.4 CONCLUSIONES PARCIALES	84
III CAPÍTULO: MICROESCALA	85
III.1 INTRODUCCIÓN	85
III.1.1 Diseño, síntesis y evaluación de columnas capilares monolíticas poliméricas	87
III.1.2. Resumen	89
III.2 EXPERIMENTAL	89
III.2.1 Reactivos	89
III.2.2 Instrumentación	90
III.2.3. Soluciones	92
III.3 RESULTADOS	92
III.3.1. Preparación de la columna monolítica	92
III.3.2. Permeabilidad cromatográfica	96
III.3.3. Caracterización morfológica	96
III.3.4. APLICACIÓN EN CEC	104
III.3.5. APLICACIÓN EN NANO Y MICRO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	113
III.3.5.1. Observaciones preliminares y discusión	113
III.3.5.2. Condiciones de trabajo	119
III.3.5.3. Perfil del gradiente: cambio (retorno) de la válvula a bypass a diferentes tiempos	120
III.3.5.4. Tiempo de rotación a “bypass”	123
III.3.5.5. Sincronización de tiempos de encuentro (match time)	127
III.3.5.6. Cálculo de los parámetros de tiempo preestablecidos	129
III.3.5.7. Cromatogramas obtenidos con y sin sincronización del sistema.	130
III.3.5.8. Comparación entre columnas (monolítica polimérica y particulada)	137
III.3.6. APLICACIÓN A UN SISTEMA CROMATOGRÁFICO CAPILAR ACONDICIONADO EN EL LABORATORIO	139
III.3.6.1. DESCRIPCIÓN DE LOS MODULOS	141
III.3.6.2. Estudio de caudales y presión en el nuevo sistema	142
III.3.6.3. TIEMPO DE DEMORA ( $t_{de}$ ) Y ANÁLISIS DE ELUCIÓN EN GRADIENTE	147
III.3.6.4. APLICACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL SISTEMA CAPILAR-LC	149
III.4 CONCLUSIONES PARCIALES	162
CONCLUSIONES GENERALES	164
REFERENCIAS	165

# Aportes científicos

Como consecuencia del desarrollo de este trabajo de Tesis se produjeron los siguientes trabajos:

## a- Publicaciones

1. **Título:** “Synchronized gradient elution in capillary liquid chromatography”  
**Revista:** Journal of Chromatography A. **Volumen:** 1318 **Páginas:** 142-148  
**Referato:** Si. **Autores:** E. J.Carrasco-Correa, A. Acquaviva, J. M. Herrero-Martínez, G. Ramis-Ramos. **Año:** 2013.
2. **Título:** “Reliable and simple analytical methods for determination of citrulline and metabolically related amino acids by liquid chromatography after derivatization. Comparison between monolithic and core-shell column”.  
**Revista:** Anal. Methods. **Volumen:** 6. **Páginas:** 5830-5837. **Referato:** Si.  
**Autores:** Agustín Acquaviva, Lilian Romero, Cecilia Castells, Guillermo Ramis-Ramos, José Manuel Herrero-Martinez. **Año:** 2014

## b- Congresos

1. Evento: XXXVI HPLC 2011 Carácter de participación: Presentación Póster. Lugar: Budapest, Hungría Fecha: 19-23/Junio/2011. Trabajo: “Determination of Citrulline in Human Plasma samples using a RP-HPLC method”. Autores: A. Acquaviva, L. Romero, C. Castells.
2. Evento: VI Congreso Argentino de Química Analítica. Carácter de participación: Presentación Póster. Lugar: Ciudad de Santa Fe, Santa Fe, Argentina Fecha: 26-29/Septiembre/2011. Trabajo: “Determinación de Citrulina en muestras de plasma humano usando un método en RP-HPLC”. Autores: A. Acquaviva, L. Romero, C. Castells
3. Evento: 29th International Symposium on Chromatography. Carácter de participación: Presentación Póster. Lugar: Torun, Polonia. Fecha: 9-13/Septiembre/2012. Trabajo: “Simultaneous determination of prominent amino acids involved in small intestine diseases by HPLC after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride”. Autores: A. Acquaviva, C. Castells, L. Romero, G. Ramis-Ramos, J. M. Herrero-Martinez

4. Evento: COLACRO XIV. Carácter de participación: Presentación Póster. Lugar: Florianopolis (SC), Brasil. Fecha: 2-5/Octubre/2012. Trabajo: "Method development for the determination of prominent amino acids involved in small intestine diseases by RP-HPLC. Use of two different last generation columns". Autores: A. Acquaviva, L. Romero, C. Castells, J. M. Herrero-Martinez
5. Evento: 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2013). Carácter de participación: Presentación Póster. Lugar: Amsterdam, Holanda. Fecha: 16-20/Junio/2013. Trabajo: "Method validation for the analysis of citrulline and related amino acids in plasma by using the last generation monolithic column in RP-HPLC mode". Autores: A. Acquaviva, L. Romero, C. Castells, J. M. Herrero-Martinez
6. Evento: 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2013). Carácter de participación: Presentación Póster. Lugar: Amsterdam, Holanda. Fecha: 16-21/Junio/2013. Trabajo: "How to Control and Optimize Gradient Elution in Capillary Liquid Chromatography". Autores: E. Carrasco-Correa, A. Acquaviva, G. Ramis-Ramos, J. M. Herrero-Martinez.
7. Evento: 7° Congreso Argentino de Química Analítica. Carácter de participación: Presentación Póster. Lugar: Mendoza, Argentina. Fecha: 1-4/Octubre/2013. Trabajo: "Validación de un método para el análisis de citrulina y aminoácidos relacionados en plasma empleando una columna monolítica comercial en RP-HPLC". Autores: A. Acquaviva, L. Romero, C. Castells, J. M. Herrero-Martinez
8. Evento: 7° Congreso Argentino de Química Analítica. Carácter de participación: Presentación Póster. Lugar: Mendoza, Argentina. Fecha: 1-4/Octubre/2013. Trabajo: "Optimización de un sistema de cromatografía de líquidos a escala nanométrica. Aplicación a la separación de aminoácidos derivatizados en columnas capilares de fase inversa". Autores: J. Rodenas-Montano, A. Acquaviva, J. M. Herrero-Martinez, C. Castells.
9. Evento: 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques (ITP 2013). Carácter de participación: Presentación Oral. Lugar: Tenerife, España. Fecha: 6-9/Octubre/2013. Trabajo: "How to control and optimize gradient elution in capillary and nano liquid chromatography ". Autores: E. Carrasco-Correa, A. Acquaviva, G. Ramis-Ramos, J. M. Herrero-Martinez.



# OBJETIVOS GENERALES

Este trabajo, tuvo como principales objetivos:

- Estudiar y desarrollar métodos separativos mediante HPLC y técnicas relacionadas trabajando con columnas de dimensiones reducidas, empleando nuevas estrategias.
- Preparar (in-situ) columnas monolíticas de tipo poliméricas en capilares de sílice. Caracterización y empleo como rellenos cromatográficos.
- El análisis y optimización de sistemas miniaturizados para HPLC de equipos comerciales y uno desarrollado en el laboratorio.
- Abocar los estudios previos al desarrollo de un método robusto para la separación y análisis de citrulina, y aminoácidos metabólicamente relacionados. Esta determinación implica la optimización de la derivatización de los aminoácidos para su detección UV, su separación con las distintas columnas y condiciones, y la validación del sistema analítico integral.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es sin dudas, una técnica madura, ampliamente usada en laboratorios analíticos, especialmente en el modo de fase inversa. Existe, no obstante, una demanda creciente de métodos rápidos de separación y cuantificación de analitos mediante HPLC, especialmente en laboratorios que deben implementar rutinas de análisis. La disminución en los tiempos de análisis puede lograrse usando columnas más cortas y trabajando a altos caudales, a expensas de la capacidad resolutive del sistema. Para mantener una capacidad de resolución dada se reduce el tamaño de las partículas de relleno, lo cual limita la longitud de la columna y la velocidad lineal que es posible usar para mantener una caída de presión soportable por un sistema de bomba típico de un equipo HPLC. Estas limitaciones han dado lugar a numerosas investigaciones que permitieron mejoras instrumentales y el desarrollo de nuevos materiales. Entre las mejoras instrumentales se destaca la aparición de una nueva generación de equipos que poseen bombas capaces de proveer fase móvil a caudales razonables y a presiones de más de 1000 atm [1,2]. Estos instrumentos, que se conocen como U-HPLC o UPLC por “ultra-high pressure liquid chromatography” poseen un costo sumamente elevado, convirtiéndose en poco accesibles en muchos laboratorios. Los estudios y desarrollos de diferentes materiales han dado lugar a las columnas monolíticas [3–5] en las que una sola pieza altamente porosa (monolito) de material silíceo o polimérico constituye la matriz de la fase estacionaria en reemplazo de las típicas partículas porosas empleadas para desarrollar fases estacionarias. La estructura de este monolito posee una porosidad superior al 80% (en comparación al 60-65% de porosidad total de las columnas basadas en partículas porosas), lo que implica mayores permeabilidades del lecho y, en consecuencia, que se pueda aumentar la velocidad de fase móvil sin que se produzcan grandes caídas de presión. Por otra parte, su estructura macroporosa permite el flujo convectivo de solvente, por lo que el transporte de material hasta la superficie estacionaria resulta más eficiente que el mecanismo difusivo, produciendo menores resistencias a la transferencia de material, esto es, la pérdida de eficiencia a altos caudales no es tan significativa.

Otro tipo de material particulado recientemente desarrollado consiste en esferas de sílice compacta (no porosa) de menos de 2 micras cubiertas de una superficie porosa de un espesor de aproximadamente 0,5 micras [6,7]. Las partículas poseen un diámetro total de algo más de 2,5 micrones. Este material constituye el relleno de la columna cromatográfica, teniendo la ventaja de que la resistencia que ejerce a la aplicación de caudales normales es mucho menor que la de partículas menores a 2 micras. Por otra parte, el hecho de que el intercambio entre las fases ocurra sólo en la "cáscara" porosa, disminuye sensiblemente la resistencia a la transferencia de materia, por lo que las eficiencias serían similares a las de partículas de tamaños inferiores a 2 micrones.

Una estrategia diferente en relación con la posibilidad de reducir tiempos de análisis empleando instrumentos convencionales consiste en emplear partículas de sílice de diámetro reducido y simultáneamente aumentar la temperatura de la columna. La consecuencia hidrodinámica es una disminución en la viscosidad del eluyente, con la consecuente disminución en la caída de presión desarrollada, y el aumento en los coeficientes de difusión de los analitos, lo que implica mejoras en la transferencia de materia en fase móvil. Esta estrategia ha sido estudiada en relación con columnas rellenas con material particulado y también con columnas monolíticas a base de sílice [8].

Un objetivo de este trabajo ha sido el de avanzar hacia el desarrollo de metodologías cromatográficas que tiendan a la miniaturización, esto es, métodos de cromatografía de líquidos en los que se reduzcan significativamente los volúmenes de solventes y de muestra a inyectar, y al aumento de la velocidad de análisis, esto es, a reducir tiempos de análisis por muestra, pero empleando instrumentos de cromatografía convencionales con mínimas modificaciones. Entendemos que la disponibilidad de instrumentos de UPLC para lograr estos objetivos no es frecuente en la mayoría de los laboratorios, por lo que es nuestro interés la búsqueda de alternativas más accesibles al desarrollo de métodos rápidos y en escala de micro-LC.

En relación con la aplicación de estas metodologías a muestras reales se estudió la separación y análisis de aminoácidos derivatizados con cloruro de

FMOOC (cloroformiato de 9-fluorenilmetilo), con el fin de tener un método robusto y de bajo costo de análisis de los aminoácidos citrulina, arginina, prolina, glutamina, ácido glutámico y ornitina en fluido plasmático. La posible transferencia del método a laboratorios de rutina implica que los métodos a desarrollar sean robustos y generales, esto es, que el derivado pueda detectarse por uv-visible y por fluorescencia, que el proceso pueda automatizarse, y que se empleen reactivos fácilmente manipulables.

### **Importancia de medir la concentración de citrulina en plasma.**

En el intestino delgado se produce la absorción de nutrientes y las transformaciones metabólicas en las que el epitelio intestinal cumple un papel fundamental. Entre ellas ocurre la transformación de glutamina en citrulina, la cual es adsorbida hacia el plasma. Los niveles de citrulina circulantes dependen principalmente de la capacidad del intestino en producirla a partir de sus precursores, por lo que se ha propuesto emplear a esta sustancia como un indicador de la funcionalidad enterocitaria [9]. Distintas condiciones que alteren la fisiología de la mucosa intestinal serían potencialmente reflejadas en alteraciones en los niveles de citrulina plasmática. Se ha propuesto en la literatura evaluar los niveles de citrulina plasmática como marcador específico de disfunción intestinal (al igual que se usa creatinina como marcador de disfunción renal o las enzimas TGO/TGP para anomalías a nivel hepático). Sin embargo, hasta el momento no existe acuerdo al respecto dado los resultados informados del dosaje de citrulina en distintas patologías en las que se compromete el tejido intestinal [10].

La determinación de citrulina en plasma desproteinizado se puede realizar por CEC [11], CE [12], mediante HPLC, empleando columnas de fase inversa y derivatización pre- o post-columna del grupo amino para su detección [13–15]. Muchos de estos métodos, poseen procedimientos experimentales complejos. Como reactivos derivatizantes se pueden emplear diversos compuestos, siendo el o-ftaldehído en combinación con 2-mercaptoetanol [16] el descrito con mayor frecuencia. Si bien esta reacción de derivatización es rápida, los derivados formados no son estables, lo que convierte al método en poco

robusto. En este trabajo se propuso estudiar la derivatización con FMOC-Cl [17]. El uso de este agente derivatizante permite llevar a cabo reacciones rápidas de condensación con el grupo amino para dar el correspondiente carbamato, a temperatura ambiente; y los derivados obtenidos son estables. Por fluorescencia pueden detectarse niveles de analito de fmol y también, aunque con mayores límites de detección, pueden cuantificarse por absorción UV.

# I CAPÍTULO: DERIVATIZACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

## I.1 INTRODUCCIÓN

La cuantificación de aminoácidos se realiza en todo tipo de muestras biológicas, desde los fluidos y tejidos corporales humanos a diversos alimentos naturales y sintéticos. Por ejemplo, en bioquímica clínica, el cambio de las concentraciones de aminoácidos en suero puede ser correlacionado con ciertas enfermedades [18], por lo tanto, la determinación de las concentraciones de aminoácidos libres se puede utilizar como un indicador bioquímico de varios trastornos patológicos. En particular, los niveles de citrulina, arginina, y otros compuestos relacionados con el ciclo de la urea (cuyo proceso metabólico se desarrolla mayormente en el hígado) se pueden utilizar en el diagnóstico clínico de patologías en procesos de división celular, curación de heridas, sistema inmune, en la liberación de hormonas, el síndrome de intestino corto, y trastornos de la capacidad de absorción del intestino delgado [19].

Por otro lado, los aminoácidos son componentes importantes de los alimentos, proporcionando los bloques necesarios para la biosíntesis de proteínas. A su vez, los mismos contribuyen directamente al sabor de los alimentos, como así también son precursores de los compuestos que aportan al aroma. El cambio en las concentraciones de aminoácidos también se utiliza para seguir los procesos de fermentación y maduración de alimentos [20]. Estos son algunos de los campos de aplicación en los que es de interés conocer los niveles de concentración de los aminoácidos en distintas muestras.

Desde el punto de vista analítico, el objetivo principal consiste en desarrollar y validar un método de análisis que sea preciso y sensible. Han sido propuestas numerosas metodologías para la separación y análisis de estos compuestos, entre ellas, cromatografía líquida de alta performance (HPLC) [21–23], electroforesis capilar [24,25], y cromatografía de intercambio iónico [26,27], asociados a métodos de detección, incluyendo principalmente los de luz UV

[28], derivados mediados por fluorescencia [24], por espectrofotometría indirecta [25], electroquímica y de fluorescencia inducida por láser [29]. De estas técnicas separativas, la más difundida en los laboratorios analíticos es HPLC. También se ha propuesto un método específico para la determinación de citrulina (Cit) por cromatografía de interacción hidrofílica con detección MS/MS en gotas de sangre secas para monitorear la función del injerto intestinal luego de un trasplante. Este método es altamente sensible pero presenta poca precisión y es de muy elevado costo para cada análisis como para la implementación hospitalaria o clínica [30].

La mayoría de los métodos de análisis de aminoácidos, implica una reacción de derivatización empleando reactivos (agentes derivatizantes) que dependen en mayor parte del método de detección. Las reacciones de derivatización analítica son una forma de síntesis de química orgánica, en la cual el objetivo es tener idealmente un 100 % de rendimiento de un único producto puro. La derivatización es empleada por dos razones principales: 1) permitir el análisis de compuestos que no pueden ser directamente sometidos a determinado método de análisis, por su volatilidad, estabilidad, etc, y 2) para mejorar la calidad del análisis a través del aumento de la detectabilidad (sensibilidad) o mejora en el comportamiento químico. En el caso del estudio de los aminoácidos por HPLC, la derivatización busca incrementar la detectabilidad por adición de un grupo cromóforo o fluoróforo que, además, aumente el tamaño y la hidrofobicidad de la molécula para, simultáneamente, aumentar la retentividad en columnas de fase inversa.

Una reacción de derivatización de aminoácidos deberá cumplir una serie de condiciones para ser adecuada e implementarse en HPLC: (a) los derivados deberían ser obtenidos en reacciones de derivatización precolumna rápidas, (b) en soluciones preferentemente acuosas, y (c) a temperatura ambiente (d) la preparación debe ser simple, cuantitativa y económica, resultando en productos de alta sensibilidad y selectividad.

En el caso de cromatografía líquida los reactivos de derivatización son a menudo aquellos que han sido diseñados para los métodos de detección clásicos como el uso de luz ultravioleta (arreglo de diodos DAD y detector de

longitud de onda variable) y fluorescencia (FLD). En los últimos años se ha enfocado hacia el diseño de reactivos de derivatización especiales para los aminoácidos para su aplicación en la detección a nivel de trazas por espectrometría de masa [31,32].

### **Reactivos de derivatización**

El desarrollo del análisis de aminoácidos nace en 1820 cuando Braconnot aisló la glicina de un hidrolizado de gelatina [33]. Luego en 1848, Mulder demostró que la glicina contenía nitrógeno, y en 1883 Kjeldahl propuso un método para la determinación precisa de nitrógeno contenido en una muestra de proteínas [34]. A partir de 1910 la mayoría de los aminoácidos han sido aislados y se han descrito sus estructuras. A medida que aumentaba el número de aminoácidos y su conocimiento, fue posible agruparlos en base a características químicas comunes. En esa época se descubrió que todos los aminoácidos tienen la misma fórmula general y difieren solamente por la estructura química de sus cadenas laterales. En su estructura básica el aminoácido contiene dos funcionalidades principales, un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>).

La introducción de la cromatografía abrió nuevas vías para el análisis de los aminoácidos. Martin y Syngge aportaron el primer ejemplo mediante cromatografía de partición, separando los acetyl derivados de ciertos aminoácidos [35]. Aunque este método separaba con éxito los ácidos monocarboxílicos y mono-amino no resultaba práctico para otros tipos de aminoácidos. Más tarde se introdujeron los métodos de cromatografía de intercambio iónico que resolvieron varios de los problemas para poder realizar cuantificaciones, permitiendo la separación en columna de los aminoácidos sin derivatización previa [36]. Las modificaciones de los procedimientos han mejorado las separaciones de aminoácidos. Las características del relleno, el tamaño y temperatura de la columna, el pH de las soluciones amortiguadoras y la fuerza iónica se han ido modificando para mejorar la resolución de mezclas de aminoácidos y obtener separaciones específicas. La cuantificación se ha mejorado enormemente mediante reacciones de derivatización, a través de los



grupos carboxílicos o aminos. La derivatización del grupo amino ha sido la más difundida, mientras que para el grupo carboxílico uno de los pocos ejemplos disponibles es con HCl en butanol aplicado al análisis con ESI/MS/MS sin separación cromatográfica [37] y con separación cromatográfica [38]. Dado que, los reactivos más populares para los aminoácidos son aquellos que reaccionan con el grupo amino, el resto del capítulo describirá el uso de estos agentes.

Los reactivos más comunes que se han descrito confieren al producto absorbancia de radiación UV o de fluorescencia (FL), como el cloruro de dansilo (DNS) [39], cloruro de dabsilo (DBS) [40], cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl), [28,41], o-ftalaldehído (OPA) combinado con varios tioles [42], 4-cloro-7-nitrobenzofurazano [43], isotiocianato de fenilo [44], y carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo [45]. Por otro lado, en los últimos años se ha producido un rápido crecimiento en el diseño y desarrollo de reactivos de derivatización de aminoácidos que están especialmente pensados para aplicaciones LC/ESI/MS: (5-N-succinimidoxi-5-oxopentil) bromuro de trifenil-fosfonio (SPTPP) [32], carbamato de 3-aminopiridil-N-hidroxisuccinimidilo (APDS), ácido N-hidroxisuccinimido N-alquilnicotínico (CN-NA-NHS) [31], yoduro de p-N,N,N-trimetilamonioanilil carbamato-N-hidroxisuccinimidilo (TAHS) [46] y N,N-dimetil-2,4-dinitro-5-fluorobenzilamina (DMDNFB) [47].

De todos los agentes anteriormente nombrados, los principales requisitos de un derivatizante se cumplen principalmente para o-ftalaldehído (OPA) y el FMOC-Cl. Esto se debe principalmente a que: (1) ambos reactivos proporcionan reacciones rápidas, (2) ambos derivatizados se pueden obtener en soluciones acuosas, y a temperatura ambiente; y (3) ambos reactivos proporcionan derivados de alta selectividad y sensibilidad, pudiendo ser detectados, por detección UV, como por fluorescencia.

La derivatización con FMOC-Cl fue elegida para el presente trabajo, dado que el reactivo OPA es poco menos estable y puede degradarse más fácilmente, sumado a que el FMOC-Cl presenta la ventaja que reacciona tanto con los

grupos amino primarios como con los secundarios para formar los carbamatos correspondientes (Figura I.1.).



**Figura I.1** Reacción de derivatización de los aminoácidos con FMOC-Cl.

Molnár-Perl y colaboradores [28,45,48] han publicado varios trabajos que describen un estudio profundo y detallado sobre las condiciones de derivatización de aminoácidos usando ambos reactivos, OPA y FMOC-Cl. En estas investigaciones, sin embargo, la citrulina no ha sido incluida.

De la literatura, y especialmente de los trabajos de Molnár-Perl, se pueden extraer las siguientes conclusiones generales respecto de la reacción entre aminoácidos y FMOC-Cl: que la concentración de FMOC (mM) expresada en el volumen final de la mezcla de reacción debe estar en exceso y que la relación molar de los reactivos se expresa en función de los amino ácidos (AAs) totales presentes en la mezcla ( $[FMOC]/[AAs]^T$  donde el superíndice "T" se refiere a la concentración total de aminoácidos), que el medio debe ser alcalino y que el exceso del derivatizante debe ser reducido por algún paso post-reacción. Esta última condición se debe a que el exceso de FMOC se hidroliza dando FMOC-OH, sub-producto de reacción interferente y detectable, tanto para detección UV como para fluorescencia. Esta interferencia está principalmente asociada al gran exceso del sub-producto, lo que genera un pico cromatográfico que puede afectar la resolución respecto de picos de interés adyacentes.

En el presente trabajo, nos centramos principalmente en la determinación de citrulina libre (Cit) en muestras de plasma humano, y los cinco aminoácido metabólicamente relacionados (arginina, ácido glutámico, glutamina, prolina y

ornitina). Sus estructuras, pKa y log P se indican en la Figura I.2. La Cit, es un amino ácido no proteico cuyo nombre proviene del fruto sandía en latin (Citrullus vulgaris). Así mismo es una importante fuente de arginina endógena, siendo la absorción en intestino la principal fuente de citrulina en los seres humanos, y la fruta de la cual deriva su nombre, la mayor fuente alimentaria externa [49]. Los niveles de Cit libres en plasma se establecen en términos científicos como citrulinemia, la cual es medida como un marcador eficiente cuando la superficie activa del intestino delgado se ve afectada en su integridad. Esta vía de ingreso al plasma ha sido la causa de que se proponga la citrulinemia para el control de la nutrición parenteral y enteral, además de ser un indicador de control pre y post transplante del intestino delgado [30]. La Figura I.3. muestra un esquema del metabolismo de citrulina en el organismo humano, y la tabla I.1. resume los valores reportados de concentración de Cit en diferentes fluidos humanos, y la correspondiente técnica empleada en la determinación.

a) Arginina (Arg)

pKa<sub>1</sub>: 2.03  
pKa<sub>2</sub>: 12.10  
pKa<sub>3</sub>: 9.00  
Log P: -0.060

b) Citrulina (Cit)

pKa<sub>1</sub>: 2.51  
pKa<sub>2</sub>: 9.88  
Log P: -1.373

c) Ácido Glutámico (Glu)

pKa<sub>1</sub>: 2.56  
pKa<sub>2</sub>: 9.58  
pKa<sub>3</sub>: 4.15  
Log P: -0.969

d) Glutamina (Gln)

pKa<sub>1</sub>: 2.18  
pKa<sub>2</sub>: 9.00  
Log P: -1.576

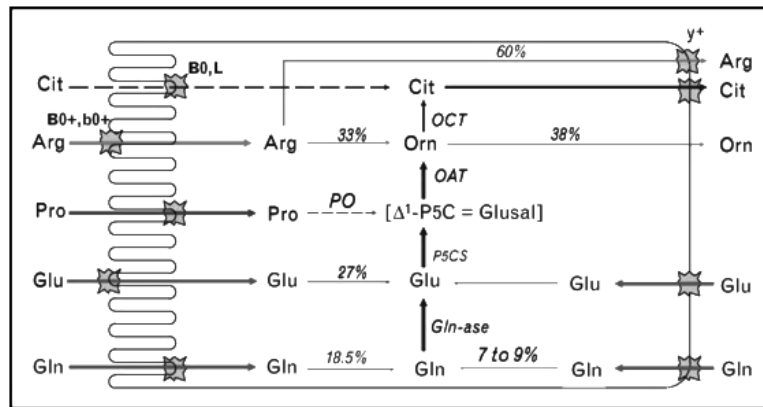
e) Prolina (Pro)

pKa<sub>1</sub>: 1.95  
pKa<sub>2</sub>: 10.42  
Log P: -0.060

f) Ornitina (Orn)

pKa<sub>1</sub>: 1.94  
pKa<sub>2</sub>: 8.65  
pKa<sub>3</sub>: 10.76  
Log P: -0.874

**Figura I.2.** Estructura, pKa y Log P de los seis aminoácidos estudiados [50].



**Figura I.3.** Metabolismo de citrulina y aminoácidos relacionados en los enterocitos. Arg, Cit, D1-P5C, D1-L- pirrolina-5-carboxilato; Gln; Gln-asa, glutaminasa; Glu; Glusal, glutamato semialdehído; OAT, ornitina aminotransferasa; OCT, ornitina carbamoiltransferasa; Orn; P5CS, D1-P5C sintasa; PO, prolina oxidasa; Pro. Los porcentajes indican la contribución de diferentes vías para el metabolismo de cada aminoácido [3]; estas se ven reflejadas en los espesores de la flechas. Las flechas punteadas son caminos metabólicos secundarios.

**Tabla I.1.** Compilación de valores de concentración de citrulina en distintos tejidos obtenidos de varias fuentes bibliográficas. El trabajo de Lepage y col. (1997) describe los efectos de la edad en la concentración de cit en plasma. IEC: Cromatografía de intercambio iónico. ESI: detección por espectrometría de masa con ionización por electroespray. Nin: Ninhidrina. OPA: o-phtaldialdehído. PTC: fenil tiocarbamil. \*Compilación de varias fuentes.

Fluido o tejido biológico	Organismo humano	[ $\mu\text{M}$ ]	Método	Referencia
Plasma	Recién nacidos	16 -32	IEC	Lepage y col. (1997)
	Niños	12-39	IEC-Nin	Scriver y col. (1965)
	Adultos	20-38	RPLC-OPA RPLC-PTC RPLC-OPA HPLC-ESI	Pappas y col. (2002) Zhang y Kayc (2004) Alteheld y col. (2004) Martens y col. (2003)
Orina	adultos	$4 \pm 4$	HPLC-ESI	Martens y col. (2003)
Cerebro	indistinto	0.02-0.1 ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	*	Perry (1982)
Músculo	indistinto	$170 \pm 13$	RPC	Alteheld y col. (2004)

## **OPTIMIZACIÓN DE LA DERIVATIZACIÓN**

La sistematización y automatización de un método HPLC para cuantificar aminoácidos en muestras biológicas requiere de un ajuste de todas las variables involucradas en la reacción para lograr una reproducibilidad adecuada. Para este fin, varias condiciones de reacción fueron investigadas: concentración del buffer (borato de sodio) y su pH, relación molar entre reactivos, y el tiempo de reacción, junto con diferentes enfoques para minimizar la presencia de impurezas en las mediciones del blanco de reacción y formas alternativas de detener (“quenchar”) rápidamente la reacción para mejorar la reproducibilidad del protocolo de derivatización. El estudio de la relación de concentración entre reactivos y tiempo de reacción fue analizado usando como base de partida el trabajo publicado por Molnár-Perl [48].

## **I.2 EXPERIMENTAL**

### **I.2.1 Reactivos e Instrumentación**

Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl) y ácido cítrico se obtuvieron de Fluka (Buchs, Suiza); arginina (Arg), citrulina (Cit), ácido glutámico (Glu), prolina (Pro), ornitina (Orn) y glutamina (Gln) fueron adquiridos de BDH (Poole, Reino Unido); clorhidrato de feniletilamina (99%, Phea) y clorhidrato de tiramina (98%, Tyrn) de Aldrich (St. Louise, MO, EE.UU.); heptano a Mallinckrodt Químicos (St. Louis, MO, EE.UU.); pentano y ácido acético (glacial) a Merck (Darmstadt, Alemania); ácido tricloroacético (TCA), hidróxido de amonio, bórax, y ácido fórmico (85 % p/p) a Anedra (Argentina) y acetonitrilo de grado HPLC (ACN) fue obtenido de Baker (Ciudad de México, México). El agua fue purificada por medio de un sistema Milli-Q Pure (Simplicity, Millipore, MA, EE.UU.). A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico.

Para la reacción de derivatización se usó un vortex Genie 2 (Scientific industries, EE.UU), una centrifuga Eppendorf 5417 (Eppendorf North América

Inc., Nueva York, EE.UU.), una balanza analítica modelo Adventurer Pro (Ohaus, EE.UU.) y un equipo de ultrasonidos modelo 8890 (Cole Parmer, EE.UU.). Para el estudio cromatográfico se utilizó un equipo HPLC 1100 series (Agilent Technologies) con degasificador y detector UV de longitud de onda variable. Los solventes usados como fase móvil fueron filtrados con membranas de 45  $\mu\text{m}$  de nylon o celulosa de Micron Separations (Westborough, EE.UU.), dependiendo si la naturaleza de los solventes era orgánica o acuosa respectivamente.

Los pHs fueron medidos con un peachimetro AR25 accumet Research (Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU), utilizando un electrodo Schott Blue-line 11 pH (Cole-Parmer, East Bunker Court Vernon Hills, EE.UU.).

Las columnas usadas en esta sección fueron: Shimadzu ODS, 15 x 0,25 cm d.i, 5  $\mu\text{m}$ , y Chromolith Performance RP18 (100 x 4,6 mm d.i.).

## **I.2.2. Derivatización**

La reacción de derivatización optimizada se llevó a cabo en un tubo eppendorf agregando los reactivos en el siguiente orden: 150  $\mu\text{L}$  de solución de buffer borato de sodio 0,4 M pH 9,2, 100  $\mu\text{L}$  de solución estándar de AAs<sup>T</sup>, 50  $\mu\text{L}$  de la muestra de plasma desproteínizada, y 300  $\mu\text{L}$  de solución de FMOC-Cl en ACN. Esta solución de reactivo se preparó en cuatro concentraciones diferentes de AA<sup>T</sup>: 1,7, 2,8, 7,2 y 14 mM, para mantener una relación constante entre los reactivos de FMOC-Cl y AAs<sup>T</sup> en la construcción de la curva de calibración. La mezcla se homogeneizó por agitación durante 1 min a temperatura ambiente, la reacción se inactivó con 20  $\mu\text{L}$  de una solución de Tyrn 75 mM, homogeneizando nuevamente por agitación durante 1 min. El blanco de derivatización se preparó también por el mismo procedimiento, reemplazando los patrones y muestras por agua desionizada. Todas las soluciones finales se filtraron a través de membranas de nylon de 0,22 micras (Micron Separaciones, Inc., Westborough, EE.UU.).

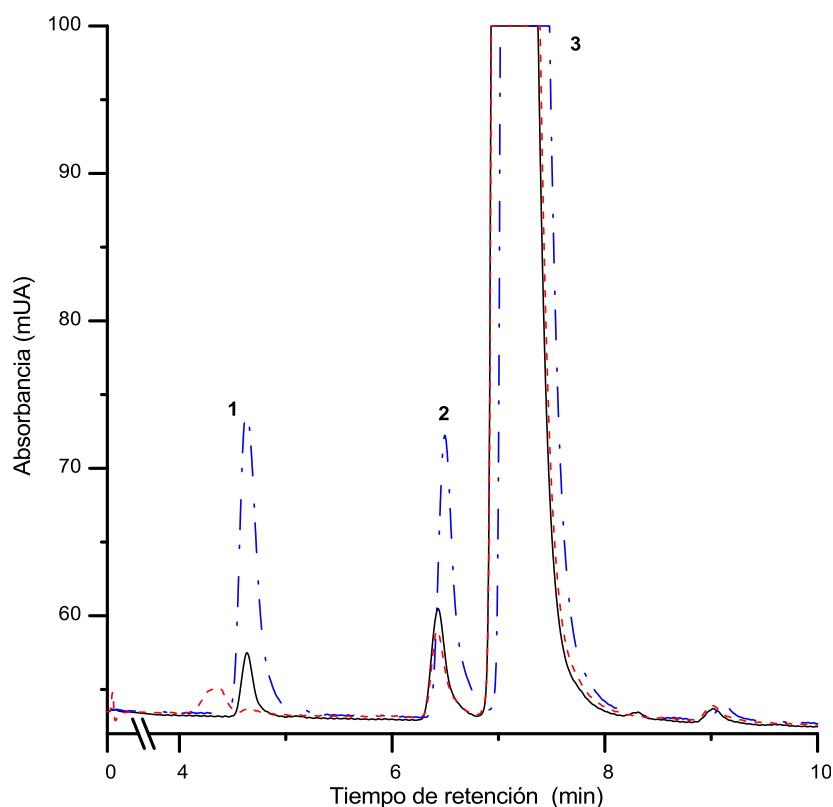
## I.3 RESULTADOS

### I.3.1 CONCENTRACIÓN Y pH DEL BUFFER

La reacción de formación del carbamato en un grupo amino a partir de un cloroformiato tiene lugar a pH cercano a 9 [51–54]. Las soluciones amortiguadoras más comunes que proveen pH cercano a 9, son tampones carbonato y borato. El buffer de derivatización seleccionado fue borato de sodio dado que el mismo es el más usado para las reacciones de derivatización con FMOC-Cl. Para el análisis del pH de reacción la fuerza iónica del mismo fue fijada en 0,4 M y el rendimiento de reacción fue evaluado a diferentes pHs dentro del rango amortiguador de dicho buffer (8,2; 9,2 y 10,2).

En la Figura I.4. se comparan las áreas del pico de citrulina derivatizado obtenidas de los cromatogramas resultantes bajo estas condiciones de pH. Las señales de los picos más bajas en intensidad (y por ende menor concentración) se produjeron cuando se llevó a cabo la reacción a un pH de 10,2, lo cual se atribuyó a un aumento de la velocidad de hidrólisis del reactivo FMOC-Cl. Este producto de FMOC-OH, genera otra desventaja a este pH, ya que el pico del mismo está sobrecargado y su perfil dificulta la evaluación de los picos de los derivados de aminoácidos adyacentes. Como se muestra en la Figura I.4., la señal de pico más alto (y por lo tanto el mayor rendimiento) se logró a un pH de 9,2. A pH 8,2, la altura del pico fue significativamente menor lo que indica que la reacción fue incompleta, en el tiempo de reacción fijado. Por tanto, un pH de 9,2 fue seleccionado para los siguientes estudios en la derivatización.





**Figura I.4.** Efecto del pH del buffer en el rendimiento de reacción. Columna: Chromolith Performance RP18 (100 × 4.6 mm d.i.). Condiciones de elución: 30 /70 % (v/v) buffer acetato de sodio 25 mM pH 4,5 / ACN; caudal 3 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura, 25 °C. pH 8,20 (negro); pH 9,20 (azul) and pH 10,20 (rojo). Identificación de picos: 1=FMOC-Cit; 2=Impureza de FMOC; 3=FMOC-OH. Detección 260 nm. Volumen de inyección 5 µL.

La influencia de la fuerza iónica en la reacción ha sido previamente estudiada dentro del rango 0,01 M a 0,4M [55,56]. En este estudio, se propuso evaluar el rendimiento de la reacción a fuerzas iónicas mayores, desde 0,4 a 0,8 M. La Tabla I.2. contiene los resultados obtenidos para el derivado de Cit, el FMOC-OH y el carbamato de FMOC-Tyrn. Las áreas medidas de los picos de FMOC-Cit fueron similares en el rango de fuerza iónica probado, aunque el pico de FMOC-OH fue menor cuando la concentración de buffer borato fue 0,8 M. A esta última concentración del buffer no se produjo ningún aumento en el área del pico de FMOC-Tyrn. Estos resultados sugieren que el buffer borato de sodio debería mantenerse a 0,8 M para esta reacción, sin embargo la velocidad

de disolución de la sal de bórax a esta concentración es muy lenta, por lo que se decidió no utilizar tan alta concentración, ya que podría dificultar su uso en la práctica. Por lo tanto, una concentración de 0,4 M fue seleccionado como la óptima para el buffer borato en la derivatización.

**Tabla I.2.** Valores de áreas relativos para los picos de FMOC-Cit y FMOC-OH, a distintas fuerzas iónica, con y sin tratamiento por agregado de Tiramina (Tyrn).

	Buffer Borato de sodio		
	[0,8M]	[0,6M]	[0,4M]
FMOC-Cit/ sin Tyrn	15500	16000	18000
FMOC-OH/ sin Tyrn	30000	31000	32000
FMOC-Cit con Tyrn	10000	10250	10300
FMOC-OH con Tyrn	8500	23000	21500

### I.3.2 RELACIÓN ENTRE REACTIVOS

La relación [FMOC/AAs<sup>T</sup>] seleccionada fue 10/1. Dicha elección se basa principalmente en dos criterios: el uso de mayores cantidades de FMOC en la derivatización produce un pico del sub-producto hidrolizado más ancho que podría interferir con los picos de interés cercanos (Glu y Pro) y la segunda razón, no menos importante, fue la facilidad de trabajar con números enteros para los cálculos de preparación de las soluciones stock. Los resultados se muestran en la tabla I.3.

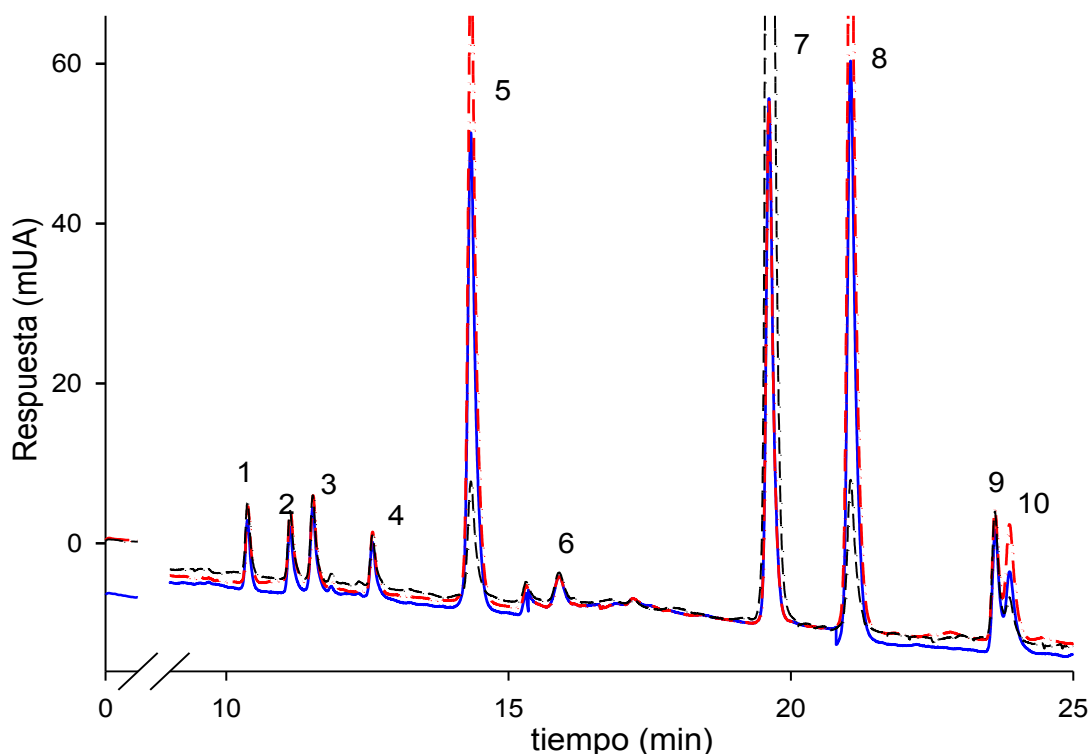
**Tabla I.3.** Los valores corresponden a las alturas de picos en unidades relativas. Se realizaron triplicados para cada relación de reactivos. Los valores de % RSD (desviación estándar relativa porcentual) fueron entre 0,1 y 7,4.

	[FMOC/AA <sup>T</sup> ]												
	5/1	7/1	9/1	10/1	11/1	13/1	15/1	17/1	20/1	25/1	35/1	45/1	55/1
<b>Cit</b>	21.35	23.45	27.6	29.6	28.6	28.9	31.3	31.05	32.6	29.2	29.4	29.5	28.7
<b>Arg</b>	16.1	17.55	20.75	21.2	21.7	22.1	23.8	23.65	25.15	22.1	22.05	22.15	21.5
<b>Pro</b>	25	24.55	24.65	23.65	23.9	23.5	24.75	24.25	24.85	24.05	24.95	25.4	25.8
<b>Gln</b>	7.9	8.3	9.8	9.7	10.3	10.5	11.5	11.6	12.5	5.85	5.85	5.55	5.8
<b>Glu</b>	10.6	12.8	15.9	15.7	18.25	18.9	21.8	22.25	25.45	28.95	30.35	30.7	30.1
<b>Orn</b>	29.85	32.2	36.65	34.75	34.95	34.55	36.35	35.3	36.3	32.1	30.9	30.35	28.8
<b>FMOC-OH</b>	48.5	55.95	83.6	88.8	96.85	111.2	126.9	136.3	183.1	240.75	301.85	579.55	876.05
<b>Tyrn</b>	434.15	660.85	860.95	958.25	1015.65	1184.35	1456.8	1616.8	1832.4	1455.7	909.55	384.55	87.55

De los resultados obtenidos para la relación entre reactivos, puede observarse que la diferencia no es significativa entre 10/1 y las restantes, y que las desviaciones relativas alcanzadas fueron bajas. La elección de la relación 10/1 se basó en los dos criterios anteriormente mencionados.

### I.3.3 TIEMPO DE REACCIÓN

Se partió de una concentración media de aminoácidos totales de 240  $\mu\text{M}$  (40  $\mu\text{M}$  de cada uno), y se derivatizó con el FMOC-Cl necesario para mantener una relación de FMOC/AAs<sup>T</sup> de 10/1. Con estas soluciones se procedió al estudio del efecto del tiempo de reacción sobre el rendimiento de la derivatización, a tres tiempos 1, 10 y 20 minutos. Cada determinación se realizó por triplicado.



**Figura I.5.** Efecto del tiempo de reacción en la derivatización. Relación FMOC/AA<sup>T</sup> 10/1. Columna: Chromolith Performance RP18 (100 × 4,6 mm i.d.). Condiciones de elución: gradiente lineal de 10 - 80 % (v/v) ACN a 2 %ACN min<sup>-1</sup>; caudal 2 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura, 25 °C. 1 min (---); 10 min (—) y 20 min (-.-.-). Identificación de picos: 1=FMOC-Arg; 2= FMOC-Gln; 3= FMOC-Cit; 4= FMOC-Glu; 5= FMOC-OH; 6=FMOC-Pro; 7=FMOC-Tyrn; 8= impureza de FMOC; 9= FMOC-Orn y 10= impureza de FMOC. Detección 260 nm. Vol. de inyección 5  $\mu\text{L}$ .

Como se puede observar el tiempo de derivatización no influye en el rendimiento de los carbamatos de aminoácidos formados entre 1y 20 minutos. Por otro lado, en la Figura I.5. también se puede observar la influencia del tiempo de reacción sobre el equilibrio de formación de los sub-productos más abundantes en la reacción, el FMOC-OH y la FMOC-Tyrn. El aumento en el tiempo de reacción produce un aumento en la cantidad de FMOC-OH formado, respecto del FMOC-Tyrn, para una misma proporción de los reactivos. Este efecto de velocidad y equilibrio de hidrólisis no fue estudiado con mayor detalle ya que el tiempo no afectaba al rendimiento de los aminoácidos derivatizados. En base al análisis del tiempo de reacción se observó que hubo una buena reproducibilidad con el agregado de este “quencher” (uso de Tyrn), cuyos resultados se discuten en la siguiente sección. Finalmente se seleccionó 1 min como el necesario para alcanzar el máximo rendimiento en las condiciones experimentales establecidas.

#### **I.3.4 QUENCHER DE REACCIÓN – REPRODUCIBILIDAD**

Dado que la reacción de derivatización se lleva a cabo con un gran exceso de FMOC-Cl, y la formación del carbamato con el aminoácido compite con la hidrólisis del cloruro de ácido a temperatura ambiente, se hizo necesaria la evaluación de la reproducibilidad de la reacción. Para este propósito, se trataron dos cuestiones: i) un incremento en la reproducibilidad de la reacción (expresada en términos del rendimiento de la reacción) y ii) una reducción en el pico de FMOC-OH, que eluye en la región central del cromatograma, y así disminuir la interferencia con los analitos que eluyen cerca del mismo.

Tres estrategias han sido reportadas en la literatura para resolver este problema en particular:

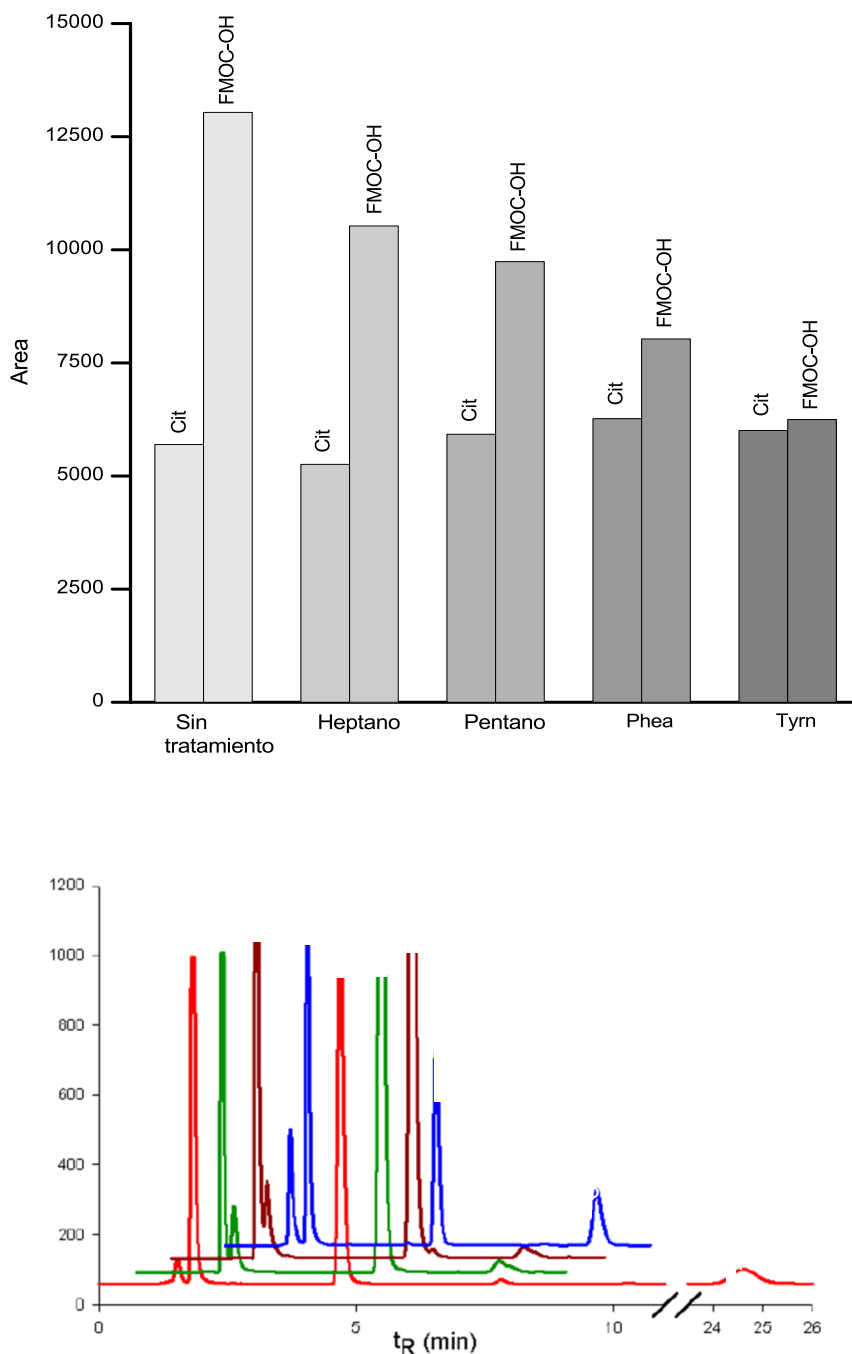
a) El uso de solventes orgánicos inmiscibles [45,57,58] para frenar la reacción, y extraer el exceso de FMOC-OH dentro de la fase acuosa. Para este fin fueron seleccionados como extractantes *n*-pentano y *n*-heptano;

b) ácidos fuertes tales como HCl se han utilizado para reducir el pH de la solución después de un tiempo de reacción fijo [56]; y

c) la adición de un exceso de una amina primaria para producir una reacción secundaria destinada a consumir el FMOC-Cl que no ha reaccionado, previo a su reacción de hidrólisis. Esta amina, añadida después del tiempo de reacción (1 min), reacciona con el exceso de FMOC-Cl para generar un nuevo carbamato [55]. El uso de tiramina (Tyrn) y feniletilamina (Phea) como aminas reaccionantes fue utilizado en este trabajo, tras la consideración de que los derivados de FMOC resultantes eran mucho más hidrófobos y por lo tanto no causarían ninguna interferencia dentro de la ventana de separación de los FMOC-AAs. Se trata además de dos aminas que no se encuentran en el plasma humano.

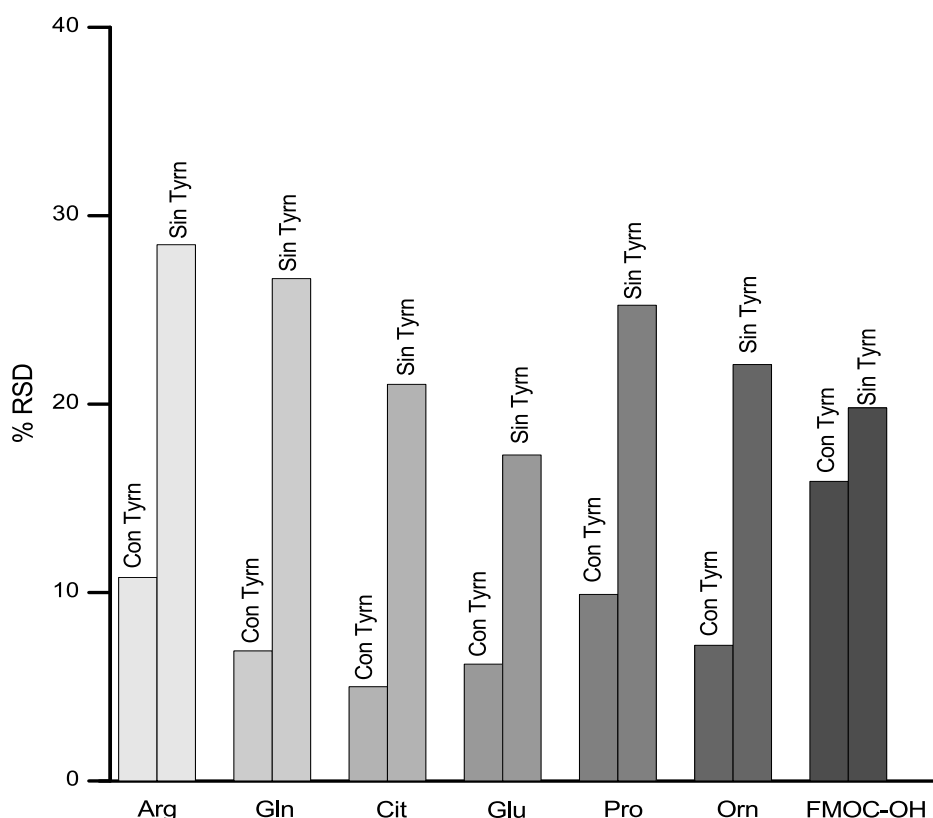
La Figura 1.6.a. presenta los resultados obtenidos de área de pico correspondientes a FMOC-Cit y FMOC-OH después de aplicarse los diferentes tratamientos para interrumpir la reacción de derivatización. El uso de los disolventes no miscibles n-pentano y n-heptano produjo una reducción de aproximadamente 30 % en el área del pico de FMOC-OH, pero el uso de los disolventes no miscibles seguido de su extracción sería un proceso difícil de automatizar si el protocolo se implementa en un inyector automático de un equipo HPLC. Por otro lado, el uso de cualquiera de las aminas ensayadas como agente “stopper” (o quencher) arrojó mejores resultados: produjo reducciones significativas en el área de FMOC-OH (50 %), y con Tyrn (la de mejores resultados de las dos aminas) las áreas de los picos de cit e hidrolizado llegó a ser similar para un nivel alto del analito. Una ventaja adicional de Tyrn sobre Phea es que el derivado eluyó antes del pico correspondiente al de FMOC-Orn, y sin interferir en la elución de ninguno de los otros 5 aminoácidos de interés, lo que disminuye el tiempo de análisis total. Finalmente, el uso de un ácido inorgánico (HCl) se descartó porque el empleo de HCl para detener la reacción proporcionó varios inconvenientes: los cromatogramas presentan un pico de FMOC-OH asimétrico, una reducción del área del mismo poco significativa, y aparecen en el cromatograma dos picos pequeños adicionales.

En la Figura I.6.b. se muestran cromatogramas de varios de los diferentes tratamientos.



**Figura I.6. a.** Área de pico para Fmoc-Cit y Fmoc-OH con diferentes tratamientos luego del minuto de derivatización: extracción con solvente orgánico y reacción química. Condiciones de elución y columna como en la Figura I.5..b. Cromatogramas de Fmoc-Cit de acuerdo al tratamiento. Phea (rojo), Tyrn (azul), pentano (verde) y heptano (bordo). Columna: Shimadzu ODS, 15 x 0,25 cm I.D., 5  $\mu$ m. Fase móvil: (50/50) buffer acetato 25 mM pH 3,75 / ACN. Temperatura: 25°C. F = 0,39 mL min<sup>-1</sup>. Picos: 1- Fmoc-Cit, 2- Fmoc-OH, 3- Fmoc-Tyrn y 4- Fmoc-Phea. Detección 260 nm. Vo. de inyección 5  $\mu$ L.

No solo se observó que la adición de Tyrn condujo a una reducción del pico del hidrolizado, sino también a una mejora en la precisión en las áreas de los picos de los aminoácidos. Esta conclusión se obtiene sobre la base de un estudio de la reproducibilidad de la reacción llevada a cabo con y sin el agregado de una solución estándar de esta amina al finalizar la reacción de derivatización de los AAs. Con este fin, la reacción se realizó por quintuplicado en una mezcla de ensayo de aminoácidos (en una concentración promedio de AA<sup>T</sup> de 150 μM, y cada replicado fue luego inyectado dos veces para su análisis cromatográfico ( $n = 5 \times 2 = 10$ ). De este análisis se observó que hubo una significativa reducción de la desviación estándar relativa (por debajo de 12 %) para la mayoría de los aminoácidos cuando la reacción se interrumpió con un exceso de Tyrn después de 1 min (Figura I.7.). Estos niveles de precisión son satisfactorios, para muestras que involucran un pretratamiento y niveles de concentración relativamente bajos.



**Figura I.7.** Reproducibilidad de área de pico de FMOC-Cit. Desviación estándar relativa (% RSD) para una serie de duplicados de inyección de 5 réplicas de derivatización ( $n=10$ ) con y sin adición de tyrn, incluyendo al pico de FMOC-OH. Las condiciones de elución y columna se detallan en la Figura I.5.



## I.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Las condiciones de derivatización incluyendo el pH del buffer y su concentración, la reducción de las especies que interfieren en el cromatograma, el tiempo necesario de la reacción, y la relación entre reactivos para una máxima eficiencia, fueron optimizadas a fin de lograr rendimientos de reacción satisfactorios (pH 9,20; [0,4M] y FMOC/AA<sup>T</sup>: 10/1). Para mejorar la reproducibilidad de esta reacción, además, se ensayó la adición de Tyrn como un inhibidor (quencher) de la hidrólisis del FMOC, encontrándose excelentes resultados en la reducción de la importante interferencia del FMOC-OH, y además, en la disminución de los valores de % RSD alcanzando valores de hasta un 5 % para aminoácidos en concentraciones de 40 μM en la mezcla, valores comunes para las reacciones de derivatización que involucran más de una etapa.

## II CAPÍTULO: COLUMNAS COMERCIALES

### II.1 INTRODUCCIÓN

Desde el advenimiento de la cromatografía líquida de alta eficiencia, se han desarrollado e investigado numerosas maneras de reducir el tiempo de análisis y mantener una buena resolución en las separaciones. Entre las estrategias analíticas se han propuesto, por ejemplo, el uso de: elevadas temperaturas mediante el empleo de columnas térmicamente estables (80–200 °C) [59,60] el empleo de soportes monolíticos [61–63], la reducción en el diámetro promedio de partículas de relleno a valores inferiores a 2 μm (para su uso en UHPLC) [64,65], y finalmente el uso de partículas sub-3 μm de núcleo sólido y película porosa (“fused core”) [66,67]. Tales avances se deben principalmente a la necesidad de afrontar el estudio de numerosas muestras en análisis de rutina, como así también el de estudios de muestras muy complejas que implican la separación de un número significativo de picos en el cromatograma en un tiempo razonable. En campos tan diversos como toxicología, química clínica, medicina forense y en análisis ambiental, que generalmente requieren información analítica en muestras muy complejas, esta demanda de mejoras en la performance de los métodos es permanente [68].

En la Tabla II.1 se escriben y comparan las ventajas e inconvenientes de cada una de las estrategias desarrolladas en términos cualitativos.

Con el fin de realizar los procedimientos más rápidos, manteniendo el rendimiento cromatográfico aceptable, es necesario un compromiso entre la velocidad de flujo, longitud de la columna, la resolución y la presión del sistema. La ecuación 1, forma integrada de la ecuación de D’Arcy, indica la dependencia entre la caída de presión en el sistema, y las variables operativas.

$$\Delta P = cte \frac{LF\eta}{d_p^2 d_c^2} \quad (1)$$

Siendo  $\Delta P$  la caída de presión, L la longitud de la columna, F el caudal,  $\eta$  la viscosidad,  $d_p$  diámetro de partícula, y  $d_c$  el diámetro interno de la columna.

A su vez la ecuación general de la resolución (ecuación 2) establece que la resolución es directamente proporcional a la raíz cuadrada del número de platos de la columna N, además de su relación con las características del sistema a través del factor de retención (k), y del factor de selectividad ( $\alpha$ ).

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \sqrt{N} \frac{k}{k+1} \quad (2)$$

El número de platos es función del tamaño de las partículas y longitud de la columna. El incremento del caudal con el fin de reducir el tiempo de análisis es posible siempre que la eficiencia no disminuya afectando la separación de las bandas, sumado a que la caída de presión del sistema sea aceptable a fines operativos.

El empleo de UHPLC con columnas conteniendo partículas sub-2 $\mu$ m permite acelerar el análisis o bien aumentar el poder de resolución, pero el instrumento posee un costo comercial muy elevado, incluyendo su mantenimiento, respecto a un HPLC convencional. Vale mencionar que la mejor configuración en cromatografía líquida no debe ser solo seleccionada por su performance cinética, sino también teniendo en cuenta características adicionales como la necesidad de un equipo específico, el tiempo de vida útil de las columnas bajo condiciones extremas [69], los riesgos de degradación térmica [70], etc. A continuación se describen con mayor detalle las alternativas analíticas para poder aumentar la velocidad de análisis, poniendo énfasis en las que se centró este trabajo para la determinación de cit y aminoácidos relacionados en muestras de plasma.

### **II.1.1 Columnas particuladas convencionales y uso de la temperatura**

Una valiosa herramienta poco explorada es la cromatografía de líquidos a alta temperatura (HTLC) [71,72]. El interés por la temperatura usando fases móviles acuosas bajo el modo de fase reversa ha sido moderado debido al temor de

descomposición de los analitos y fases estacionarias. Actualmente se han introducido rellenos térmicamente estables y se ha demostrado que la descomposición de la muestra es poco probable dado el tiempo reducido en el que permanece en la columna. En la bibliografía, el término "alta temperatura" no está definido exactamente, pero junto con la expresión "temperatura elevada" son ambos los más utilizados, para un rango de 60 a 200 °C (siempre que sean inferiores a la temperatura supercrítica de la fase móvil en cuestión). El efecto de la temperatura sobre el rendimiento cromatográfico es consecuencia del efecto de temperatura sobre las propiedades físicas y químicas del sistema. Un incremento de la temperatura produce: i. disminución de la viscosidad del eluyente; ii. aumento del coeficiente de difusión de todos los solutos, que es proporcional a la temperatura absoluta e inversamente proporcional a la viscosidad del eluyente; y iii. cambios en los factores de retención de los solutos, que generalmente decrecen con el aumento de la temperatura. La consecuencia general son cambios significativos en diferentes parámetros cromatográficos.

Un aumento de la temperatura (valores de 80 a 200 °C) puede inducir una reducción de 2 a 3 veces en la viscosidad de la fase móvil [72], lo que permite la aplicación de mayores velocidades de flujo con una contrapresión limitada, pero menor que las alcanzadas a temperatura ambiente. La ecuación (3) expresa la relación entre la velocidad lineal de la fase móvil,  $u$ , y la altura equivalente de plato teórico,  $H$ ,

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (3)$$

$A$  es un término independiente de la velocidad, y refleja el parámetro de difusión Eddy (tortuosidad del lecho),  $B$  es el parámetro que refleja la difusión longitudinal y es proporcional al coeficiente de difusión del soluto y  $C$  es el coeficiente que representa la resistencia a la transferencia de masa tanto en fase móvil como estacionaria.

Al aumentar la temperatura, la velocidad óptima se incrementa en gran medida sin impacto en la eficiencia debido al aumento en los coeficientes de difusión de la mayoría de los compuestos [73]. Además, el aumento de la difusividad aumenta la velocidad de transferencia de masa. De esta manera se consigue una disminución del parámetro C de la ecuación de van Deemter (ecuación 3) [74], resultando, por lo general, en una mejor eficiencia de la columna [75]. Respecto del término A, aunque se producirá una mejora en el flujo laminar no se espera un cambio significativo en este término en relación con el aumento de la temperatura.

Otra potencial ventaja de la disminución de la viscosidad de la fase móvil con el aumento de la temperatura, es que, se pueden emplear mayores longitudes de columnas con contrapresiones aceptables, incrementando el número de platos, aunque puede dificultarse trabajar a caudales operacionales razonables [76]. Por otra parte, la disminución en la retención implica que puedan incrementarse las proporciones de solvente acuoso disminuyendo el solvente orgánico para compensar la pérdida de retención; esto es, se disminuye el consumo de solventes no acuosos.

El mayor impulso hacia el empleo rutinario de HTLC proviene de distintas empresas y grupos de investigación que han introducido fases estacionarias comerciales mucho más estables, como  $ZrO_2$ , que pueden ser sometidas hasta  $250\text{ }^\circ\text{C}$  [77], columnas de grafito poroso [78], y columnas de alúmina [79,80] y de óxido de titanio [81]. Existe además una tendencia hacia el empleo de columnas de diámetro angosto en HTLC, para lograr una termostatación radialmente más homogénea, y en consecuencia, obtener menor dispersión de las bandas.

#### **II.1.1.a Influencia de la temperatura en la retención**

La influencia de la temperatura en la retención puede estimarse a partir de la ecuación de van't Hoff:

$$\ln k = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta \quad (4)$$

donde  $\Delta H$  y  $\Delta S$  representan el cambio de entalpía y de entropía asociadas con la transferencia del soluto entre las fases, respectivamente,  $R$  es la constante de los gases,  $T$  es la temperatura absoluta y  $\beta$  es la relación de fases de la columna.

Si se representa el  $\ln k$  en función de  $1/T$ , se obtiene una gráfica que puede ser lineal, donde la entalpía está dada por la pendiente de la recta obtenida. Las interacciones típicas de los sistemas de fase inversa tienen valores de entalpía aproximadamente de  $-10$  a  $-15 \text{ kJ mol}^{-1}$  para moléculas pequeñas, mientras que moléculas de mayor peso molecular tienen valores significativamente mayores (negativos), indicando que la retención será más afectada por un cambio de temperatura que la correspondiente a un soluto con menor entalpía de transferencia.

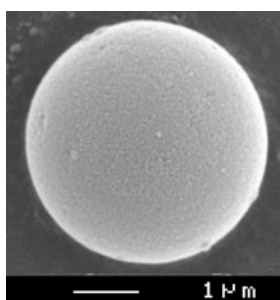
#### **II.1.1.b Influencia de la temperatura en la selectividad para sistemas RPLC**

Si la diferencia de entalpía de dos solutos a diferentes temperaturas se relaciona con un único mecanismo de retención (tales como interacciones hidrofóbicas en series homólogas), se espera una disminución de la selectividad de los mismos como resultado del aumento de temperatura, aunque poco significativa [59]. En general, se ha demostrado que los efectos de la temperatura sobre la retención en los compuestos son significativamente más pequeños que los cambios por modificación en la composición de la fase móvil. En el caso de que coexistan equilibrios secundarios, como por ejemplo solutos con grupos ionizables, tales como electrolitos débiles o aminoácidos, la situación es más compleja. La dependencia del factor de retención con la temperatura estará afectada por las entalpías correspondientes a estos equilibrios ácido-base. Esto es, cuando se trabaja con mezclas de analitos en diferentes mezclas complejas, la selectividad puede ser muy dependiente de la temperatura.

### II.1.2 Columnas de menor tamaño rellenas con partículas sub-2 $\mu\text{m}$ .

En la última década, se ha desarrollado instrumental para operar con columnas rellenas con partículas sub-2  $\mu\text{m}$  y longitudes de columna de 5 cm [2], Estas columnas rellenas poseen muy baja permeabilidad y, con fines prácticos, resultan incompatibles con los sistemas instrumentales convencionales dado que se necesitan bombas con capacidad de mantener una velocidad razonable con altísimas caídas de presión. Esto último puede deducirse fácilmente de la ecuación de Darcy (ecuación 1) donde  $\Delta P$  es inversamente proporcional a  $d_p^3$  cuando se opera a la velocidad óptima,  $u_{\text{opt}}$ . Así nace el término cromatografía líquida a ultra altas presiones (UHPLC o UPLC), acrónimos usualmente usados para definir el empleo de columnas empacadas con partículas de sub-2 $\mu\text{m}$ , e incorporadas en instrumentos con bombas que operan con un mayor requerimiento a la contrapresión ( $\Delta P > 400$  bares, hasta valores de 1200 bares).

La Figura II.1. muestra una imagen obtenida en el microscopio electrónico de barrido (SEM) de una partícula de sílice de 1,8  $\mu\text{m}$ . Estas partículas presentan un gran reto en su empaque dentro del tubo soporte con el fin de hacer columnas reproducibles y robustas. Esto es, los requisitos de “hardware” incluyen una superficie interna perfectamente pulida del tubo que constituye la columna, y fritas especiales capaces de retener estas partículas pequeñas, y no sufrir obstrucción.



**Figura II.1.** Imagen SEM de una partícula porosa de 1,8  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Por otra parte, las partículas pequeñas por sí solas no hacen posible el cumplimiento de las condiciones favorables de la ecuación de van Deemter si la tecnología del instrumento no permite aprovechar el aumento de la velocidad, mayor resolución, y sensibilidad, con un coste no menor de una alta

presión en el sistema. El primer sistema rápido y dedicado para la separación de ultra alta presión se desarrolló en el año de 2004, y se demostró que el tiempo de análisis se podía reducir hasta un intervalo de 1 a 2 min para muestras sencillas sin pérdida de resolución y sensibilidad [83]. Este instrumento fue capaz de trabajar hasta 1000 bares (15.000 psi). Otro aspecto de los instrumentos que también fue considerado es la reducción de los espacios extracolumna con el fin de minimizar la dispersión, ya que estos efectos son dramáticos en las separaciones de escala reducida [84].

Las principales ventajas y limitaciones de la UHPLC se resumen en la tabla II.1.

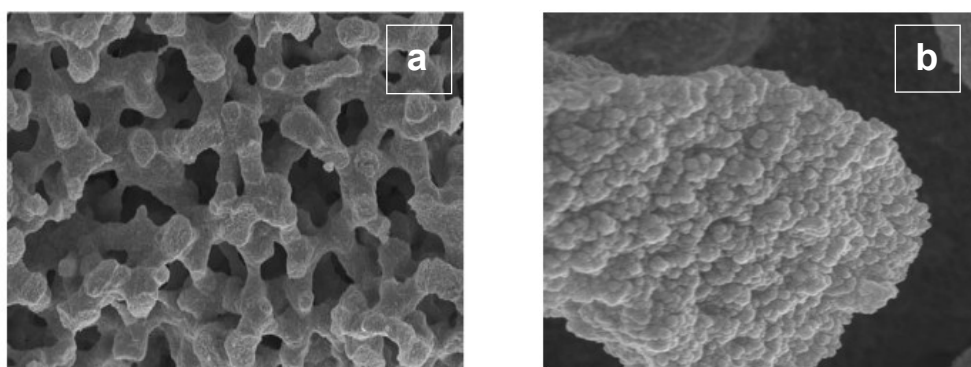
### **II.1.3. Columnas monolíticas: comerciales y fabricadas en el laboratorio.**

#### ***Descripción y características generales.***

Las primeras preparaciones de estos medios de separación de “pieza-única” se remontan a finales de la década de los 60 y principio de los 70 [85] aunque se puede decir que estas columnas monolíticas son una reciente adquisición en la analítica para las técnicas cromatográficas [86]. Estas columnas se componen de una sola pieza de un material poroso continuo, que se une a la pared de un tubo (soporte del lecho), por lo que la fase móvil debe filtrarse a través de él. El material poroso se caracteriza por un tamaño de poro de distribución bimodal. Los poros de gran tamaño están interconectados por los canales por los que circula la mayoría, o prácticamente la totalidad, de la fase móvil. El tamaño medio de estos canales denominados macroporos, controla la permeabilidad de la columna, junto con la tortuosidad y constricción del lecho. El otro tipo de poros que conforma dicha distribución son los mesoporos, estos son los de menor tamaño, y en los que se produce la retención de los analitos. Todos estos parámetros junto con la estructura de los mesoporos permiten controlar la cinética de transferencia de masa, y consecuentemente la eficiencia de la columna. Tallarek y colaboradores, demostraron que las columnas monolíticas de sílice poseen elevadas permeabilidades, equivalentes a columnas rellenas con partículas de 11µm [87].



Existe una significativa disparidad entre las propiedades físicas de los dos tipos de columnas monolíticas existentes, inorgánicas (óxidos de silicio, zirconio [88], titanio [89]) o de carbón grafitico [90], y poliméricas orgánicas (como por ejemplo, poli(meta)acrilatos, poli estireno-divinilbenceno, y poliacrilamidas [91]). Los primeros sintetizados a base de sílice, fueron introducidos por Tanaka y colaboradores [86]. Estos son muy difíciles de preparar, pero comercialmente son los de mayor disponibilidad (entre ellos las marcas comerciales son Chromolith de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Onyx de Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU., "basado en la tecnología monolítica con licencia de Merck KGaA"). La Figura II.2. muestra una micrografía electrónica de la estructura de poros de estos monolitos a base de sílice.



**Figura II.2.** Imágenes SEM de a) estructura general con macroporos y b) focalización sobre un glóbulo para mostrar los mesoporos de relleno cromatográfico monolítico de Sílice.

Por otra parte, las columnas monolíticas poliméricas son más fáciles de preparar aunque uno de sus principales inconvenientes es la reproducibilidad de producción. La gran variedad de posibilidades para el desarrollo de columnas combinado con la gran diversidad de la necesidad de análisis de matrices complejas, hace que sea difícil de definir productos comerciales de éxito. Aun así, existen algunas pocas columnas comerciales disponibles del tipo poliméricas [92]. Las columnas monolíticas comerciales actuales poseen eficiencias similares a la de las columnas de relleno con 5  $\mu\text{m}$  de partículas, aunque menores a las de las columnas modernas rellenas con la nueva generación de partículas (sub-2  $\mu\text{m}$ ). Una comparación de las propiedades de

los monolitos indica que poseen dos grandes ventajas sobre las columnas rellenas: una alta permeabilidad y una baja resistencia a la transferencia de masa. Aunque estas todavía sufren de un inconveniente importante, una alta contribución a la difusión turbulenta, que incrementa la altura de plato teórico (HETP). La porosidad externa de columnas monolíticas es de aproximadamente un 50 % mayor que la de columnas de rellenas, por lo tanto, presentan un área de superficie específica más baja y, en consecuencia, menor retentividad.

Sobre una base práctica, las columnas monolíticas parecen tener la gran ventaja sobre columnas rellenas, como el ser más resistente al taponamiento que suelen generar las muestras reales complejas. Esto es particularmente útil para las muestras de origen biológico (como por ejemplo, muestras de plasma u orina). Pese a las ventajas enumeradas, los monolitos no tienen un amplio uso entre los cromatografistas, y menos de un 1 % llega a emplear columnas a base de sílica [93].

### **II.1.3.1 Monolitos Poliméricos**

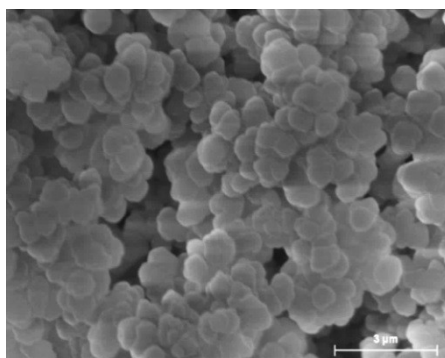
Los lechos continuos de polímero orgánico fueron introducidos por Hjertén y su grupo en 1989 [94]. Para sintetizar este tipo de estructura porosa, la mezcla de polimerización debe contener, al menos, un agente entrecruzante, y dos tipos de agentes porógenos: un macro-porógeno y un meso-porógeno. La adición necesaria de un monómero adicional (monómero funcional) ayuda a controlar la estructura porosa y le confiere la naturaleza química al lecho. La elección de los porógenos depende principalmente de la polaridad del monómero funcional y entrecruzante empleados. Varios polímeros y copolímeros son utilizados para la preparación de columnas monolíticas como los provenientes de acrilamida y metacrilamida o sus derivados, empleando un agente entrecruzante como metilen diacrilamida; estireno o sus derivados, con divinil benceno como entrecruzante, y ésteres de acrilato o metacrilato por polimerización de metacrilato de butilo u otros derivados alquílicos, siendo dimetacrilato de etilenglicol el agente entrecruzante más empleado. Estos últimos monolitos son

los más investigados, siendo evaluados por primera vez como rellenos cromatográficos en 1997 por Svec y colaboradores [95] e introducidos originalmente para su uso en HPLC a principios de 1990 [96].

Los monolitos de polímero orgánico se preparan, principalmente, mediante procedimientos de polimerización por radicales libres o polimerización por metátesis de apertura de anillo (ROMP), o por procesos de policondensación. El molde elegido para la síntesis, por lo general un capilar de sílice fundida, se llena con la mezcla de reacción mediante una jeringa, y la co-polimerización de los monómeros de vinilo es posteriormente desencadenada por cualquiera de los diferentes procesos de iniciación (catalizador redox, térmica, radiación UV o rayos  $\gamma$ ), conduciendo finalmente a una matriz polimérica macro-porosa y micro-globular. La polimerización iniciada térmicamente con 2,2' azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) como iniciador de radicales ha sido el método estándar para monolitos de poli-metacrilato y poli-acrilato.

Existen varias ventajas asociadas con los monolitos poliméricos, incluyendo una alta estabilidad incluso en condiciones extremas de pH (2-12), la preparación rápida y sencilla, una amplia selección de monómeros disponibles con diferentes polaridades, y fácil funcionalización cuando se utiliza como monómero funcional el metacrilato de glicidilo, o cualquier otro monómero a través de una reacción química *in-situ*.

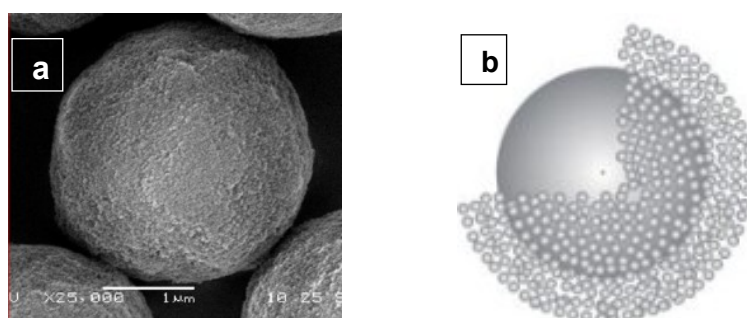
La Figura II.3. muestra la imagen SEM de un relleno típico polimérico de monómeros metacrílicos.



**Figura II.3.** Imagen SEM de relleno cromatográfico monolítico polimérico de butil metacrilato-co- dimetacrilato de etilenglicol.

#### II.1.4 Columnas con partículas de núcleo sólido y película porosa (fused core).

Este enfoque se remonta a los principios de la cromatografía líquida, Horváth y colaboradores fueron los pioneros con este tipo de partículas sintetizadas con un núcleo sólido rodeado por una capa de material poroso [97]. Luego Kirkland [98] desarrolló productos similares y mejorados con utilidad para cromatografía líquido-líquido y cromatografía líquido-sólido (adsorción). Estas partículas, superficialmente porosas ("fused core") están disponibles desde 2007, en columnas bajo licencia de la marca Halo de Advanced Materials Technology (Wilmington, Delaware, USA). Las mismas poseen 2,7 o 1,7  $\mu\text{m}$  de diámetro, compuestas por un núcleo sólido de 1,7 o 1,25  $\mu\text{m}$  de diámetro, y una superficie porosa externa de 0,5 o 0,23  $\mu\text{m}$  de espesor, respectivamente. En comparación con las partículas totalmente porosas de igual dimensión, el camino difusional es mucho más corto, dado que en núcleo es sólido y los analitos no pueden penetrar en él (esto disminuye la resistencia a la transferencia de masa, término C de la ecuación de van Deemter) [99]. Esto también contribuye a limitar la dispersión axial de los solutos y minimizar el ensanchamiento de los picos, especialmente a altas velocidades lineales [4]. En la Figura II.4. se muestra este tipo de partículas.

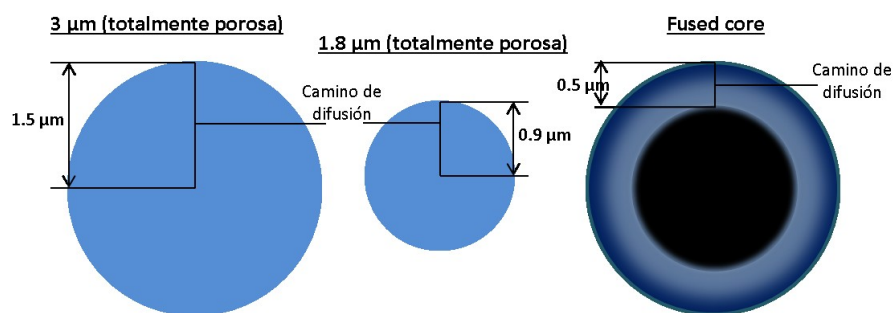


**Figura II.4.** a) Imagen SEM partícula superficialmente porosa HALO y b) representación de la conformación de las partículas tipo fused core.

Las significativas ventajas asociadas a las columnas cromatográficas conteniendo partículas de núcleo sólido no se deben sólo a la reducción en el tiempo de análisis, sino también por las propiedades mecánicas que presentan.

La evaluación de distribución de tamaños demostró que se obtiene un material con una estrecha distribución de tamaño, lo que genera una menor contribución al término A de la ecuación de van Deemter (difusión Eddy) [100].

La Figura II.5. ilustra tres tipos diferentes de partículas cromatográficas previamente descritas, indicando cual es el camino difusional respectivo, y por consiguiente su contribución a la reducción a la resistencia a la transferencia de masa.



**Figura II.5.** Comparación de la longitud de difusión entre diferentes partículas empleadas en HPLC. El trayecto más corto para la difusión de moléculas de soluto en las partículas de núcleo sólido reduce la dispersión axial de los solutos y minimiza el ensanchamiento de los picos.

Una síntesis de ventajas y desventajas de las estrategias descritas se resumen en la Tabla II.1.

**Tabla II.1.** Ventajas y desventajas generales de las estrategias propuestas en HPLC para aumentar la velocidad de análisis manteniendo las eficiencias.

Estrategia	Ventajas	Desventajas
Monolitos	<p>Baja contrapresión por su alta permeabilidad</p> <p>compatible con equipos convencionales</p> <p>se pueden sintetizar en el laboratorio</p>	<p>Transferencia de método no directa</p> <p>Baja resistencia a pH &gt; 8 (para muchas fases estacionarias), y <math>\Delta P &lt; 200</math> bares.</p> <p>Las columnas comerciales son mayormente de C18 y C8, y en pocas dimensiones.</p>
Partículas de núcleo sólido	<p>Buena calidad de empaquetamiento</p> <p>Columna para partículas de 2.7 <math>\mu\text{m}</math> acoplables a HPLC convencionales</p>	<p>Menor cantidad de químicas disponibles.</p> <p>Retención y capacidad de carga ligeramente menor que en partículas convencionales.</p> <p>Menores resistencia a la caída de presión (<math>\Delta P &lt; 600</math> bares) respecto a partículas sub-2<math>\mu\text{m}</math>.</p>
Cromatografía a alta temperatura (HTLC)	<p>Químicamente amigable: menor cantidad de solvente orgánico para mantener la retentividad.</p> <p>Mejoras en la forma de picos para compuestos básicos y grandes moléculas.</p> <p>Mejoramiento en la performance aplicando en sistemas UHPLC.</p> <p>Grandes reducciones de tiempos de análisis</p>	<p>Estabilidad de los solutos y fases estacionarias a <math>T &gt; 100</math> °C.</p> <p>Necesidad de instrumentación especial.</p> <p>Métodos difíciles de transferir por cambios de selectividad con temperatura</p> <p>Grandes caídas de presión con partículas muy pequeñas.</p>
UHPLC	<p>Fácil transferencia de métodos con HPLC</p> <p>Bajos tiempos de análisis</p> <p>Gran cantidad de proveedores y diferencias químicas en partículas sub-2 <math>\mu\text{m}</math></p>	<p>Necesidad de equipos especiales (capacidad de <math>\Delta P</math> hasta 1200 bares) y volúmenes extracolumna menores.</p> <p>Altos costos del sistema.</p> <p>La compresibilidad de los solventes y el calentamiento por fricción constituyen un problema serio a <math>\Delta P = 1000\text{bar}</math></p>

## **II.2 EXPERIMENTAL**

### **II.2.1 Reactivos e instrumentación**

Los reactivos fueron enumerados en la sección experimental del capítulo I. Además, en los experimentos que se describen a continuación se emplearon muestras de plasma de un hombre voluntario que fueron tomadas en el laboratorio de análisis clínicos, de la Dirección de salud de la UNLP, en la sede de la Facultad de Ciencias Exactas.

Las columnas que se sumaron para este estudio fueron: a) core-shell C18 (Agilent technologies, Willmington) 50 x 2,1 mm, 2,7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, b) Chromolith RP-C18 (Merck, Darmstadt) 100 x 4,6 mm y c) Zorbax SB-C18 (Agilent, Palo Alto) 75 x 4,6 mm, 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

El equipo HPLC fue descrito en la sección experimental I.2.

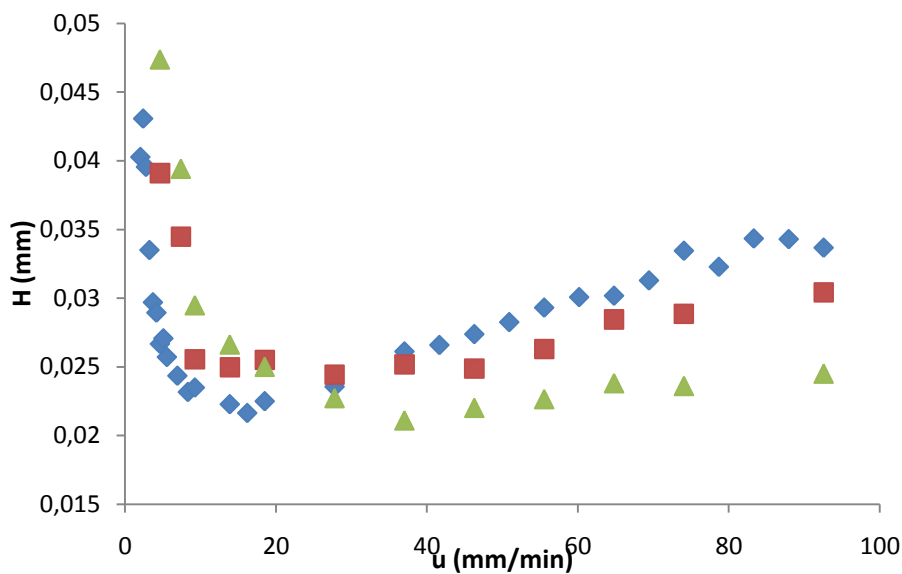
## **II.3 RESULTADOS**

### **II.3.1 HTLC CON COLUMNA PARTICULADA CONVENCIONAL**

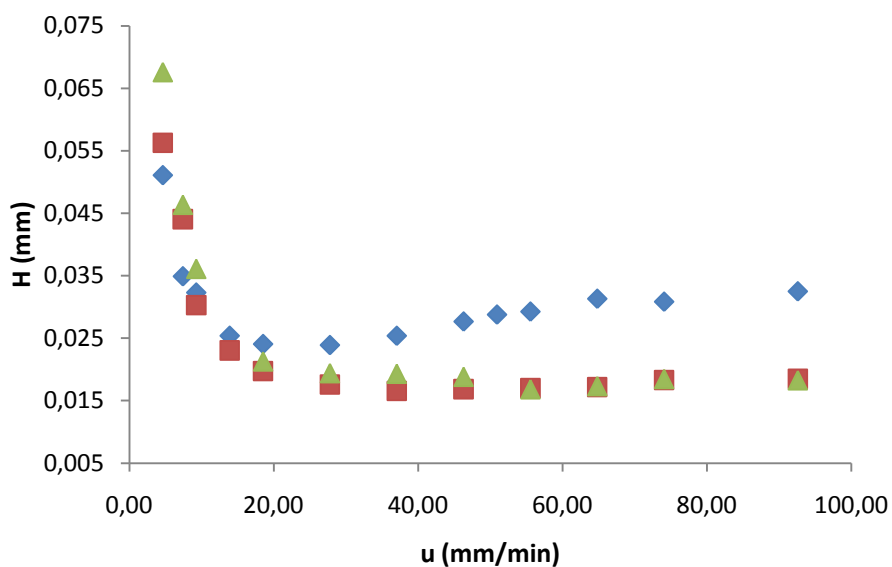
Se realizó un análisis de eficiencia de una columna convencional de C18 (Zorbax SB-C18), empleando como solutos a los derivados de FMOC de los aminoácidos Arg y Pro, a distintas velocidades para obtener de esta manera las curvas de van Deemter. La elección de estos dos analitos se basó en que el primero es el más rápido en eluir y el segundo uno de los más retenidos. Se analizaron tres temperaturas teniendo en cuenta la máxima temperatura operacional recomendada por fabricantes para esta columna (90 °C). Las temperaturas de análisis fueron, 25, 50 y 85 °C. Para estas temperaturas se obtuvieron los valores experimentales de altura equivalente de plato teórico en un rango de velocidades de fase móvil establecido, y finalmente se determinaron los parámetros A, B y C con sus correspondientes desviaciones estándar para cada una de las curvas de van Deemter.

En las Figuras II.6.a y II.6.b. se muestran los resultados experimentales para ambos aminoácidos derivatizados. Las condiciones de elución fueron

seleccionadas a fin de tener una buena resolución para el par FMOC-Pro y FMOC-OH.



**Figura II.6.a.** Curvas de van Deemter para FMOC-Arg.  $\blacklozenge$  (25 °C),  $\blacktriangle$  (50 °C), y  $\blacksquare$  (85 °C). Condiciones de elución: fase móvil 47/53 % v/v, buffer formiato de amonio pH 3,75 25 mM / ACN. Detección 260 nm. Volumen de inyección 2  $\mu$ L.



**Figura II.6.b** Curvas de van Deemter para FMOC-Pro.  $\blacklozenge$  (25 °C),  $\blacktriangle$  (50 °C), y  $\blacksquare$  (80 °C). Condiciones de elución: fase móvil 47/53 % v/v, buffer formiato de amonio pH 3,75 25 mM / ACN. Detección 260 nm. Volumen de inyección 2  $\mu$ L.



A partir de los resultados experimentales, se hicieron los ajustes estadísticos para obtener los valores de los tres coeficientes de la ecuación de van Deemter y sus desvíos estándar (tabla II.2.).

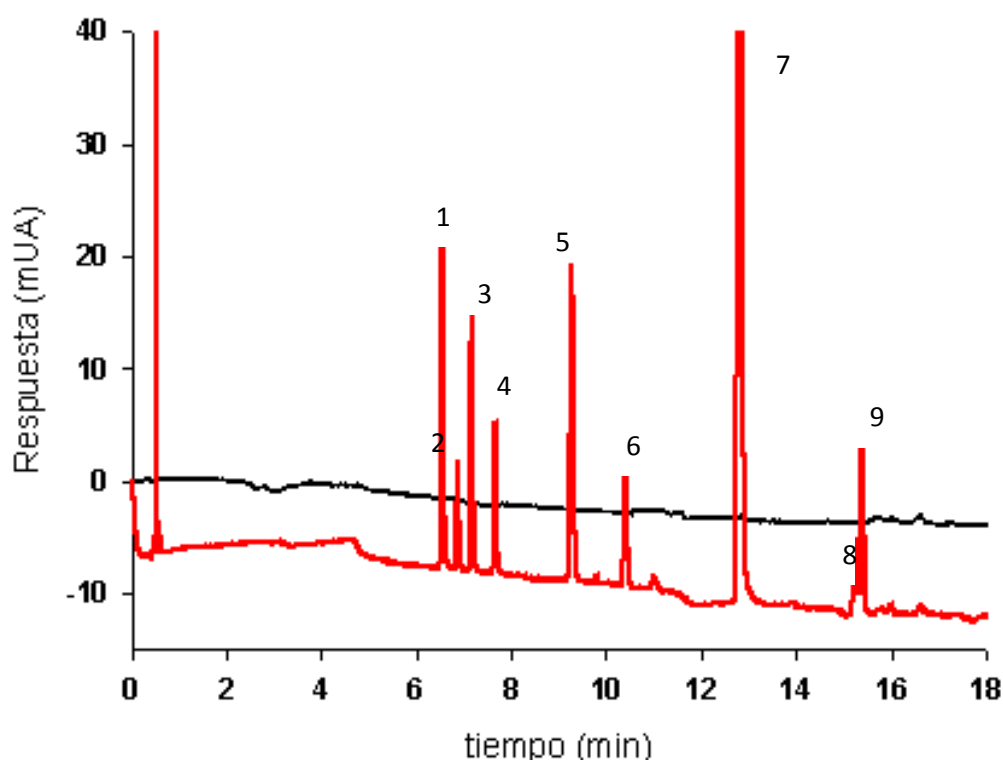
**Tabla II.2.** Valores de los coeficientes de la ecuación de van Deemter (ecuación 3). Entre paréntesis se muestra el desvío estándar correspondiente; *r* corresponde al coeficiente de correlación del ajuste propuesto.

T (°C)	Arg				Pro			
	A	B	C	<i>r</i>	A	B	C	<i>r</i>
<b>25</b>	0,0154 (8x10 <sup>-4</sup> )	0,056 (0,003)	0,00001 (1x10 <sup>-5</sup> )	0,966	0,012 (0,002)	0,17 (0,01)	0,00001 (3x10 <sup>-5</sup> )	0,976
<b>50</b>	0,016 (0002)	0,10 (0,01)	0,00009 (3x10 <sup>-5</sup> )	0,945	0,006 (0.002)	0,24 (0.02)	0,00009 (3x10 <sup>-5</sup> )	0,989
<b>80</b>	0,014 (0,.002)	0,15 (0,01)	0,00009 (2x10 <sup>-5</sup> )	0,963	0,006 (0,002)	0,28 (0.01)	0,00009 (2x10 <sup>-5</sup> )	0,997

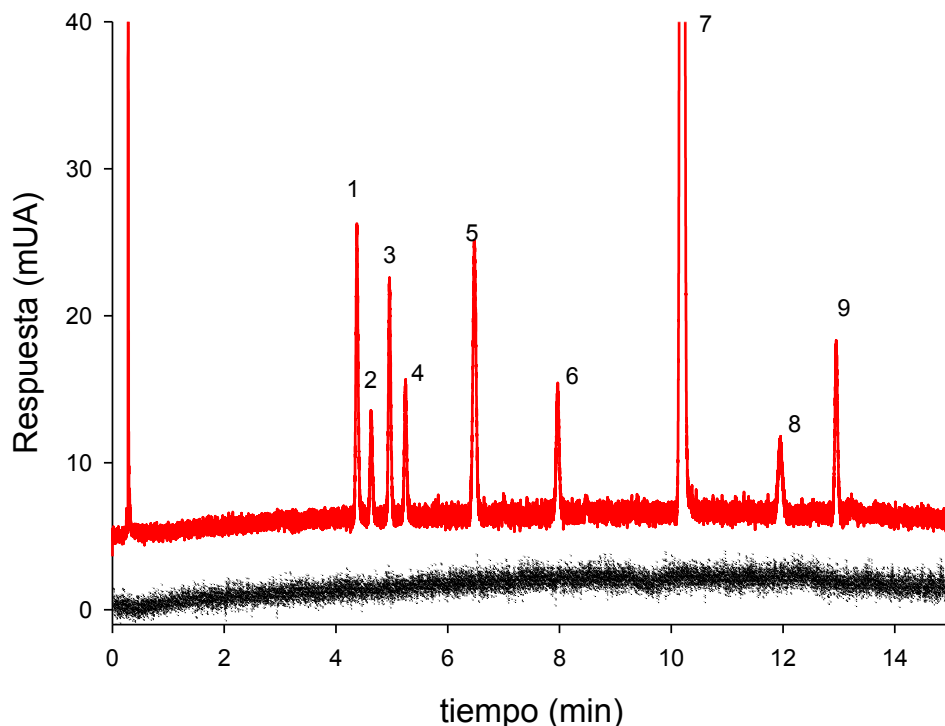
De los resultados obtenidos a través de las curvas de van Deemter, se pudo observar que no hubo cambios significativos para ninguno de los analitos respecto al mínimo de altura de plato teórico, cuando se incrementó la temperatura. Sin embargo, como es de suponer, el aumento de la temperatura produce una disminución de H cuando el término C se hace relevante, ya que involucra la resistencia a la transferencia de masa. Esto puede explicarse dado el cambio de viscosidad de la fase móvil y el aumento del coeficiente de difusión de los analitos. Los valores de eficiencia alcanzados fueron mejores para el caso de Pro, ya que las curvas se mantienen relativamente a un mismo valor, y más bajo que el de Arg, con el aumento del caudal. Dado que la arginina eluye rápidamente a 80 °C, los efectos extracolumna adquieren mayor importancia en la dispersión de pico (valor de H), efecto que resulta despreciable para los analitos más retenidos, como en este caso, para Pro.

Luego de conocer las performance de los analitos, se evaluó la separación de los seis derivatizados a estas tres temperaturas, para un dado gradiente de fase móvil. Previo al análisis cromatográfico de los aminoácidos se estudió el comportamiento de la línea de base realizando una falsa inyección (elución sin muestra). Este análisis fue realizado, dado que las condiciones experimentales de temperatura y caudales extremos produjeron una importante contribución del ruido sobre la línea de base lo que significará una pérdida significativa de la sensibilidad del método, ya que los límites de detección serán más altos que los que se podrían obtener sin esta interferencia.

Las Figuras II.7 y II.8 muestran los cromatogramas correspondientes a las separaciones de los 6 aminoácidos realizadas a 50 y 85 °C.



**Figura II.7.** En rojo, cromatograma de una solución patrón de seis aminoácidos ( $AA^T$  37  $\mu M$ ), y en negro un blanco de corrida sin inyección. Columna: Zorbax SB-C18 (75 x 4.6 mm, 3,5  $\mu m$  de tamaño de partícula). Condiciones de elución: gradiente lineal a 2 %ACN  $min^{-1}$ , comenzando en 10% ACN; caudal 2  $mL min^{-1}$ . Temperatura 50 °C. Identificación de picos: 1=FMOC-Arg; 2= FMOC-Gln; 3= FMOC-Cit; 4= FMOC-Glu; 5= FMOC-OH; 6=FMOC-Pro; 7=FMOC-Tyrn; 8= impureza de FMOC y 9= FMOC-Orn. Detección 260 nm. Volumen de inyección 5  $\mu L$ .



**Figura II.8.** En rojo, cromatograma de una solución patrón de seis aminoácidos ( $AA^T$  37  $\mu M$ ), y en negro un blanco de corrida sin inyección. Columna: Zorbax SB-C18 (75 x 4,6 mm x 3,5  $\mu m$  de tamaño de partícula). Condiciones de elución: gradiente lineal de 2 %ACN  $min^{-1}$  comenzando en 10 %ACN; caudal 4 mL  $min^{-1}$ . Temperatura 85 °C. Identificación de picos: 1=FMOC-Arg; 2= FMOC-Gln; 3= FMOC-Cit; 4= FMOC-Glu; 5= FMOC-OH; 6=FMOC-Pro; 7=FMOC-Tyrn; 8= impureza de FMOC y 9= FMOC-Orn. Detección 260 nm. Volumen de inyección 5  $\mu L$ .

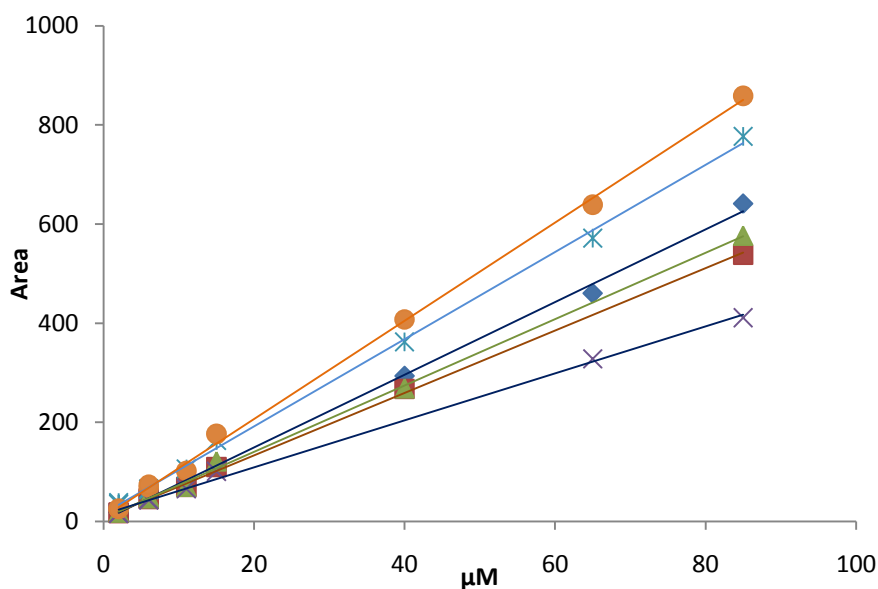
Para ambas temperaturas se pudo observar una buena resolución entre los aminoácidos e interferentes, aunque se consigue una reducción del 18 % en el tiempo de análisis cuando se utilizó una temperatura de 85 °C y un caudal de 4 mL  $min^{-1}$ . Pero esta última condición cromatográfica tuvo la desventaja de presentar un gran ruido en la línea de base, que puede ser atribuido al alto caudal, y sumado a que la temperatura es superior a los puntos de ebullición para ambos componentes empleados en la fase móvil (el ácido fórmico y ACN). Este efecto, se trató de contrarrestar utilizando una contrapresión entre la entrada del detector y salida de la columna, empleando un regulador de contrapresión de 3 bares, pero los resultados no presentaron mejoras, sino que solo se produjo un aumento significativo de la caída de presión del sistema.

Para complementar el análisis por HTLC, se trabajó a 50 °C, por la calidad de la línea de base, y se realizó una calibración por estándar externo para evaluar los límites de detección en estas condiciones de temperatura. Las condiciones de elución fueron seleccionadas a fin de alcanzar la mayor resolución entre pares críticos (tal como se describe en la Figura II.6.). La curva de calibración se construyó con 9 niveles cada uno por duplicado (ver tabla II.3).

**Tabla II.3.** Cantidad de cada uno de los reactivos en la preparación de los derivados para cada uno de los niveles de la curva de calibración por estándar externo.

c/[AA] [μM]	Nivel	[AA] <sup>T</sup> [μM]	Replicas	Patrón (volumen)		Buffer [μL]	Derivatizante		[FMOC] / [AA] <sup>T</sup> [μM]
				[μL] Patrón [2.4mM]	Agua [μL]		[μL] FMOC-Cl [10mM]	ACN [μL]	
2	0	12	2	3	147	150	120	180	166,7
6	1	36	2	9	141	150	120	180	55,6
11	2	66	2	16,5	133,5	150	120	180	30,3
15	3	90	2	22,5	127,5	150	120	180	22,2
25	4	150	2	37,5	112,5	150	120	180	13,3
40	5	240	2	60	90	150	120	180	8,3
65	6	390	2	97,5	52,5	150	120	180	5,1
85	7	510	2	127,5	22,5	150	120	180	3,9
100	8	600	2	150	0	150	120	180	3,3

Del análisis cromatográfico se obtuvieron las rectas que se representan en la Figura II.9, y los valores correspondientes a la regresión lineal de cada curva se muestran en la tabla II.4.



**Figura II.9.** Curvas de calibración de área de pico en función de la concentración de estándar para cada aminoácido. (◆) Arg, (■) Gln, (●) Orn, (▲) Cit, (✱) Pro y (✕) Glu. Las líneas representan las regresiones lineales respectivas a cada curva.

**Tabla II.4.** Parámetros de la curva de calibración para cada aminoácido y las desviaciones estándar correspondientes.

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
<b>Pendiente (±s)</b>	7,4 (0,1)	6,29 (0,08)	6,7 (0,1)	4,8 (0,1)	8,8 (0,1)	9,9 (0,1)
<b>ordenada (±s)</b>	2 (5)	7 (2)	6 (3)	14 (4)	16 (5)	7 (4)
<b>S<sub>y/x</sub></b>	8,24	6,03	7,75	8,417	10,757	9,470
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9990	0,9990	0,9986	0,9974	0,9986	0,9991

De los resultados de la calibración se obtuvieron los límites correspondientes para este método utilizado. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se evaluaron usando la convención de la IUPAC [101]:

$$LOD = 3,28S_0 \quad (5)$$

$$LOQ = 10S_0 \quad (6)$$

donde  $S_0$  es:

$$S_0 = \frac{S_{x/y}}{b} \left\{ \frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{X}^2}{Q_{xx}} \right\}^{1/2} \quad (7)$$

siendo  $S_{x/y}$  la desviación estándar de la regresión,  $b$  la pendiente,  $n$  el número de réplicas,  $m$  el número de muestras del calibrado,  $\bar{X}$  es la concentración media del calibrado, y  $Q_{xx}$  corresponde a la suma de cuadrados de  $x$ .

De acuerdo a lo establecido, en la tabla II.5. se muestran los LOD y LOQ para cada analito.

**Tabla II.5.** Valores de LOD y LOQ calculados siguiendo la convención de la IUPAC.

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
LOD ( $\mu\text{M}$ )	3	2,4	2,7	4,5	3,1	2,5
LOQ ( $\mu\text{M}$ )	9	7,2	8,3	3,7	9,5	7,4

En síntesis, se optimizó la separación y análisis de los FMOC-amino ácidos en una columna convencional operada a 50 °C. El tiempo de análisis fue de 16 minutos y las cifras de mérito para los seis derivados han sido determinadas.

### II.3.2 COLUMNAS RELLENAS CON PARTÍCULAS DE NÚCLEO SÓLIDO Y PELÍCULA POROSA

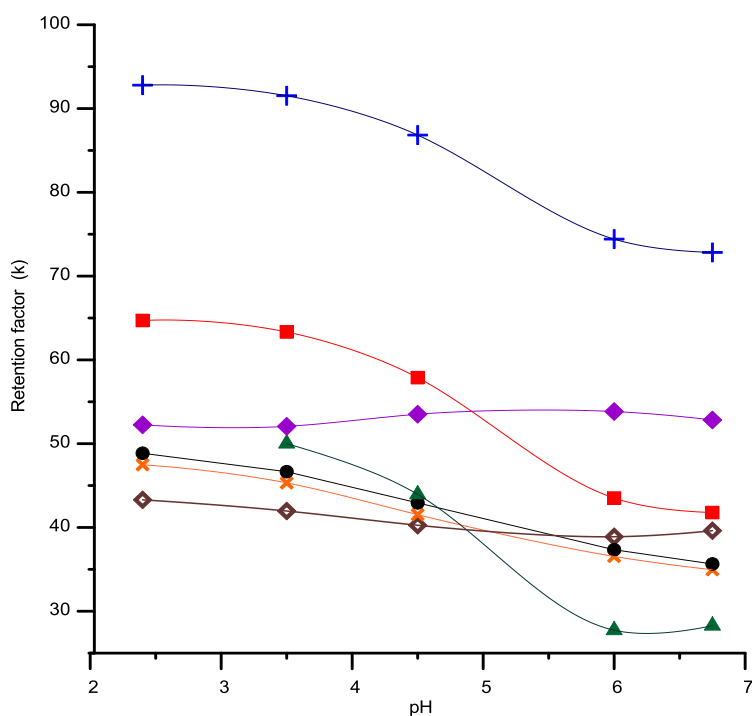
En primer lugar se analizó el efecto de la composición de la fase móvil bajo el modo gradiente de elución. Entre las diferentes mezclas de eluyentes, se han probado las combinaciones de modificador orgánico (MeOH o ACN) junto con la solución amortiguadora de formiato de amonio 25 mM y pH 3,75. Bajo estas variables, se obtuvieron mejores picos y eficiencias cuando se empleó ACN en una elución empezando a 10 %v/v ACN, e incrementando de a 2 % por minuto hasta un 80 %v/v ACN.

#### II.3.2.1 EFECTO DEL pH DE LA FASE MÓVIL

Para este estudio fueron seleccionadas varias soluciones buffer con el fin de analizar la influencia de la naturaleza y pH. Los amortiguadores fueron citrato, acetato y formiato de amonio, cuyos respectivos ácidos presentan un pKa de 3,08; 4,74; y 5,4; 4,75; y 3,74. Las soluciones se prepararon en el rango de pH de 2,5 a 6,8 manteniendo constante la concentración total del buffer en 25 mM.

El pH fue medido en agua pura,  ${}^w\text{pH}$ , siguiendo la convención de la IUPAC [102], y calibrando el electrodo combinado según lo establecido por NIST [103], esto es, no se tuvo en cuenta el cambio en el equilibrio de disociación por la presencia del solvente orgánico.

La Figura II.10. muestra la influencia del pH del eluyente sobre los factores de retención de seis aminoácidos. Cuando se incrementó el pH de la fase móvil, se observó una disminución de la retención la cual se atribuyó a la ionización del grupo carboxílico de los aminoácidos a pHs superiores a 5. Aunque el par Gln / Cit mostró una resolución prácticamente independiente del pH, la mayor parte de los picos mostraron una disminución en la separación a aumentar el pH en la fase móvil. Sobre la base de estos resultados, se seleccionó un pH de la fase móvil de 3,75 (preparado con formiato de amonio), con un compromiso razonable entre las variables resolución (Rs) y tiempo de análisis. A este pH, los valores de Rs alcanzados fueron por encima de 1,4 y no se observaron interferencias de picos aportados por el blanco que hayan co-eluido con ellos.



**Figura II.10.** Factor de retención ( $k$ ) vs. pH de la fase móvil. Columna: core-shell C18 ( $50 \times 2,1$  mm,  $2,7 \mu\text{m}$  tamaño de partícula). Elución en gradiente de 10 - 80 % (v/v) ACN a  $2\% \text{ACN min}^{-1}$ , caudal:  $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ . Fase acuosa: 25 mM buffer citrato de amonio a diferentes pHs. Temperatura,  $25^\circ\text{C}$ . Fmoc-Arg (◆); Fmoc-Gln (×); Fmoc-Cit (●); Fmoc-Glu (▲); Fmoc-OH (◆); Fmoc-Pro (■) y Fmoc-Orn (+). Detección 260 nm. Volumen de inyección  $5 \mu\text{L}$ .

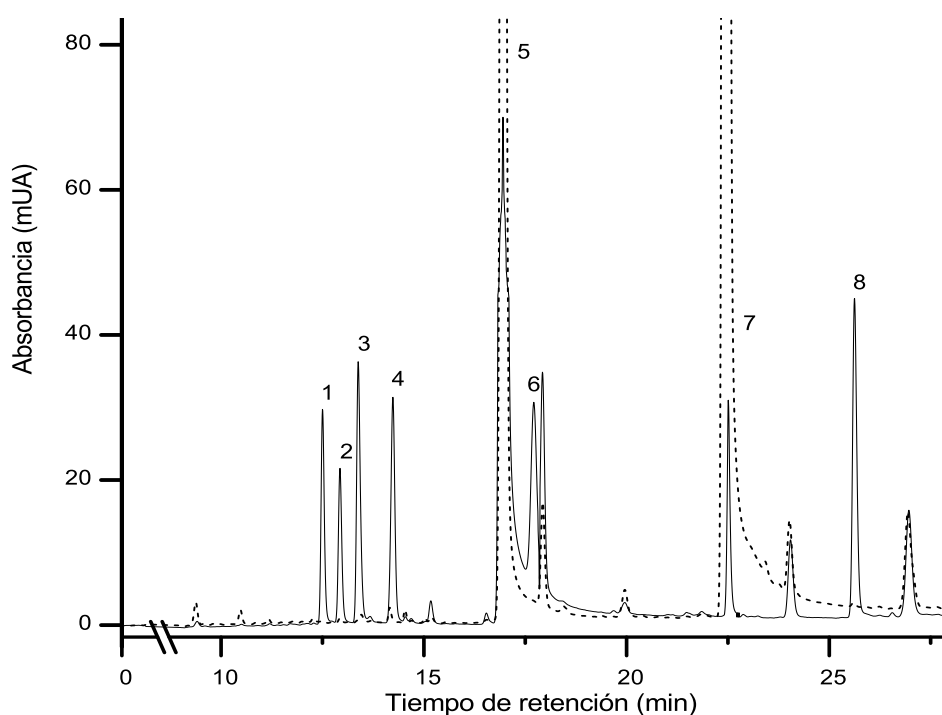
### II.3.2.2 TEMPERATURA DE LA COLUMNA

Dada la relativamente baja permeabilidad de este tipo de columnas, las caídas de presión alcanzadas (a velocidades lineales regulares), son frecuentemente cercanas a los límites de presión permitidos para cualquier equipo de HPLC convencional, por lo que un aumento de temperatura produciría una disminución de la viscosidad y consecuentemente una reducción en la presión. Usando el gradiente de elución óptimo se estudiaron dos temperaturas:  $25^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente) y  $45^\circ\text{C}$  (máxima temperatura operacional recomendada por los fabricantes). Pese a observarse menores caídas de presión a  $45^\circ\text{C}$ , este aumento de la temperatura no produjo cambios significativos en el tiempo de análisis, ni en la eficiencia cromatográfica. Por esta razón, se seleccionó como temperatura de trabajo  $25^\circ\text{C}$  con el fin de mantener un método simple (bajo costo, sin necesidad de un compartimento termostatazador), y fácil de transferir a laboratorios de análisis clínicos de rutina.



### II.3.2.3 SEPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE FMOC-AAs

Se realizó la derivatización de una mezcla de los seis aminoácidos a una concentración total de 240  $\mu$ M, siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo I. La Figura II.11. muestra un cromatograma de dos eluciones superpuestas, un blanco y una mezcla de estándares de los aminoácidos. Se pueden observar pequeñas señales de picos desconocidos (impurezas) que pertenecen al blanco de reacción. Sin embargo, no hay co-elución entre los aminoácidos y las impurezas que puedan afectar a la posterior cuantificación.

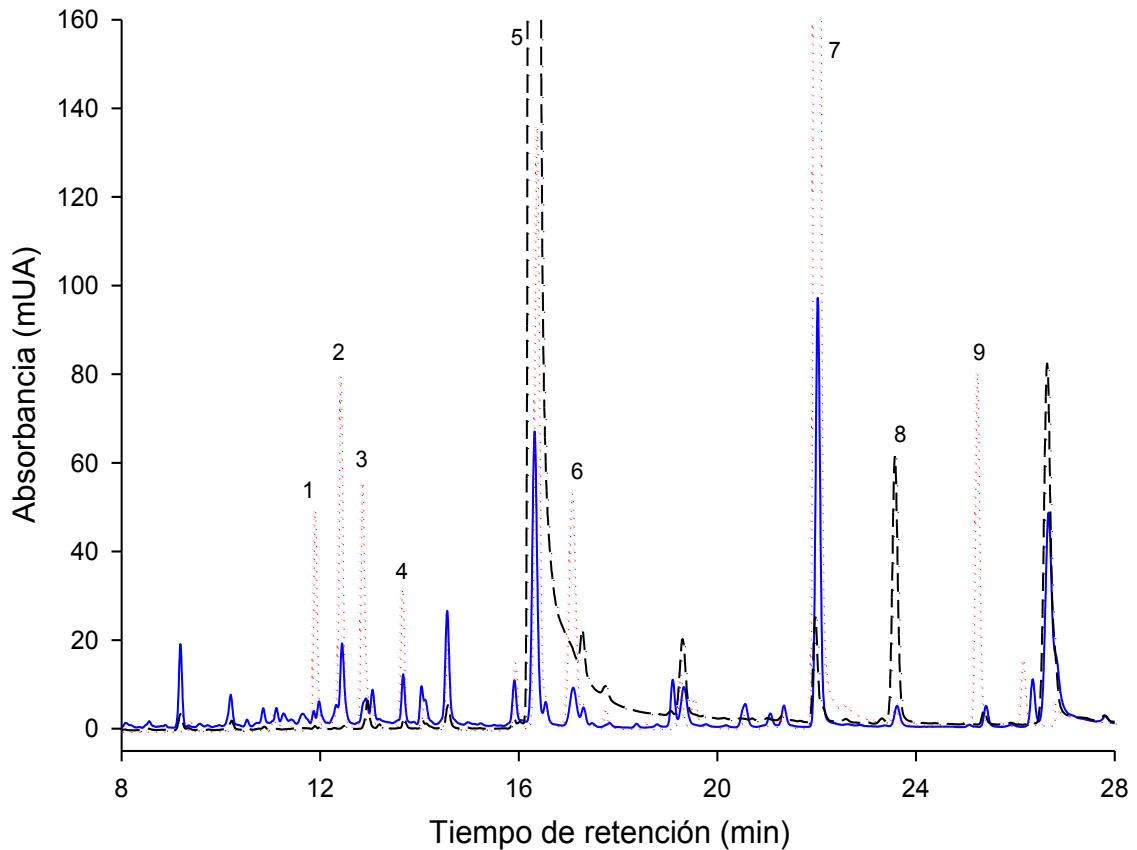


**Figura II.11.** Cromatograma obtenido con la columna de núcleo sólido Halo. Blanco (- - -) con la adición de Tyrn y cromatograma correspondiente a solución estándar de los FMOC-AAs (—). Condiciones del gradiente de elución como en Figura II.10. Temperatura, 25 °C. Picos: 1=FMOC-Arg; 2=FMOC-Gln; 3=FMOC-Cit; 4=FMOC-Glu; 5=FMOC-OH; 6=FMOC-Pro; 7=FMOC-Tyrn y 8=FMOC-Orn. Detección 260 nm. Volumen de inyección 5  $\mu$ L.

### II.3.2.4 APLICACIÓN A UNA MUESTRA DE PLASMA HUMANO

Los procedimientos generalmente usados para el pretratamiento de fluidos biológicos, como plasma, para su posterior análisis por HPLC, requiere principalmente la eliminación de las proteínas, las cuales podrían precipitar en la columna cromatográfica, y ocluir principalmente la entrada de la misma. Esto traería un aumento de la caída de presión y una disminución en la eficiencia cromatográfica, pero con el mayor agravante que es la reducción en la vida útil de la columna.

Se han propuestos numerosos métodos para remover las proteínas de fluidos biológicos [104]. Para este trabajo se seleccionó el de la adición de un ácido, como el ácido tricloroacético (TCA). Las proteínas se precipitaron por adición de 100  $\mu\text{L}$  de solución 30 % p/v por cada 1 mL de muestra de plasma, seguido por centrifugación a 7000g durante 5 min. Una porción del sobrenadante resultante se extrajo (50  $\mu\text{L}$ ) para la posterior derivatización y análisis cromatográfico. La identificación de los analitos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con aquellos correspondientes a los estándares; como así también por sobreagregado con solución estándar a las muestras. La Figura II.12 muestra los cromatogramas del blanco, plasma sin adicionar y adicionado con estándares.



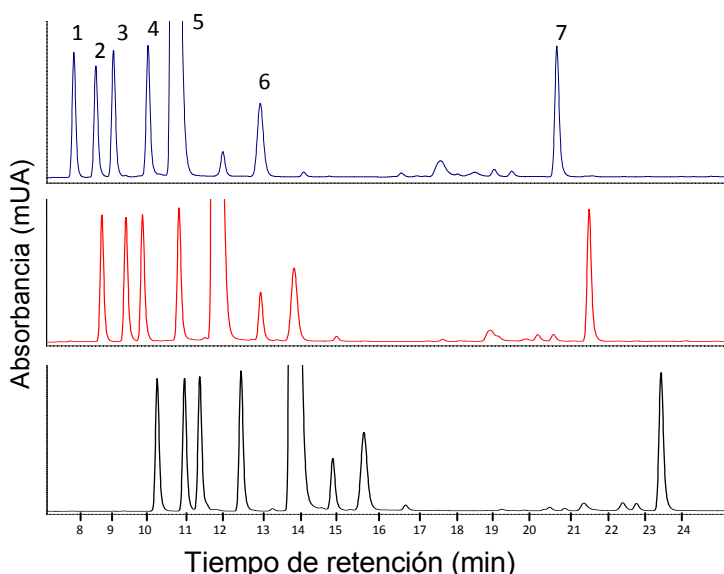
**Figura II.12.** Cromatograma obtenido con la columna Halo. Referencias: (- - -), blanco (—) Plasma derivatizado sin la adición de solución estándar, y (....) Plasma derivatizado con la adición de 120  $\mu\text{M}$  de  $\text{AA}^T$ . Condiciones del gradiente de elución como en Figura II.10. Temperatura, 25  $^{\circ}\text{C}$ . Picos: 1, Fmoc-Arg; 2, Fmoc-Gln; 3, Fmoc-Cit; 4, Fmoc-Glu; 5, Fmoc-OH; 6, Fmoc-Pro; 7, Fmoc-tyrn, 8, impureza, y 9 Fmoc-Orn. Detección 260 nm. Volumen de inyección 5  $\mu\text{L}$ .

### II.3.3 COLUMNA RELLENA MONOLÍTICA

La separación de los aminoácidos también fue estudiada en la columna monolítica comercial, Chromolith. Se partió de las mismas fases móviles que las usadas para la columna HALO. Las principales variables a estudiar fueron caudal y temperatura, teniendo como base los resultados de los análisis previos.

### II.3.3.1 CAUDAL DE LA FASE MÓVIL

Se varió el flujo de 2 a 4 mL min<sup>-1</sup> pero manteniendo el mismo gradiente y composición inicial de los solventes, de 10 %ACN. En la Figura II.13. se muestran los cromatogramas obtenidos para este estudio.

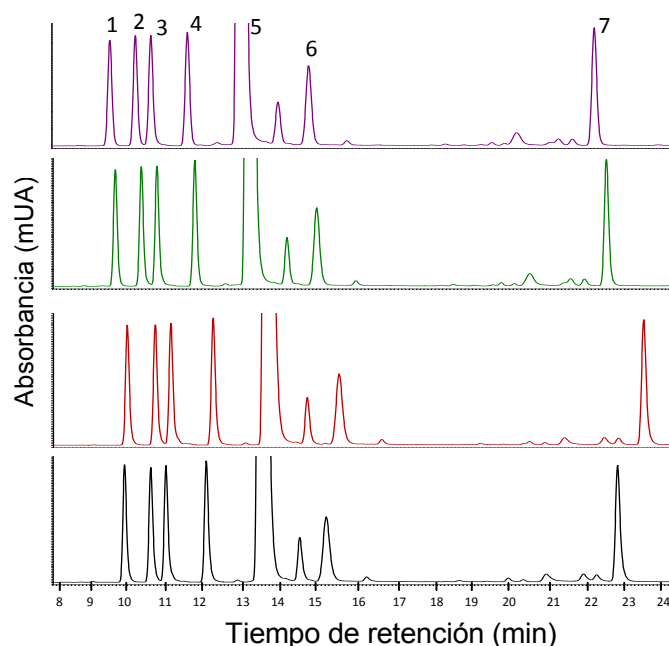


**Figura II.13.** Cromatogramas de una mezcla de estándares de los seis aminoácidos ( $AA^T$  240  $\mu$ M) a tres caudales de fase móvil. Columna: Chromolith 10 x 0.46 cm. Caudales: (F)= 2 (—), 3 (—) y 4 mL min<sup>-1</sup> (—). La fase móvil se varió linealmente manteniendo el valor de la pendiente del gradiente (2 % B min<sup>-1</sup>). Solvente A: buffer formiato de amonio 25 mM pH: 3,75 y solvente B: ACN. Temperatura 25 °C. Identificación de picos: 1 FMOC-Arg, 2 FMOC-Gln, 3 FMOC-Cit, 4 FMOC-Glu, 5 FMOC-OH, 6 FMOC-Pro y 7 FMOC-Orn. Detección 260 nm. Volumen de inyección 5  $\mu$ L.

No se observaron mejoras significativas en la simetría de los picos en el intervalo de 2-3 mL min<sup>-1</sup>; sin embargo a 4 mL min<sup>-1</sup>, la resolución del par crítico Gln / Cit se redujo, y la caída de presión estaba cerca de la más alta presión de trabajo recomendada por el fabricante de la columna (200 bares). Se seleccionó un flujo de 2 mL min<sup>-1</sup> como un compromiso entre la eficiencia, la resolución y tiempo de análisis.

### II.3.3.2 TEMPERATURA DE LA COLUMNA

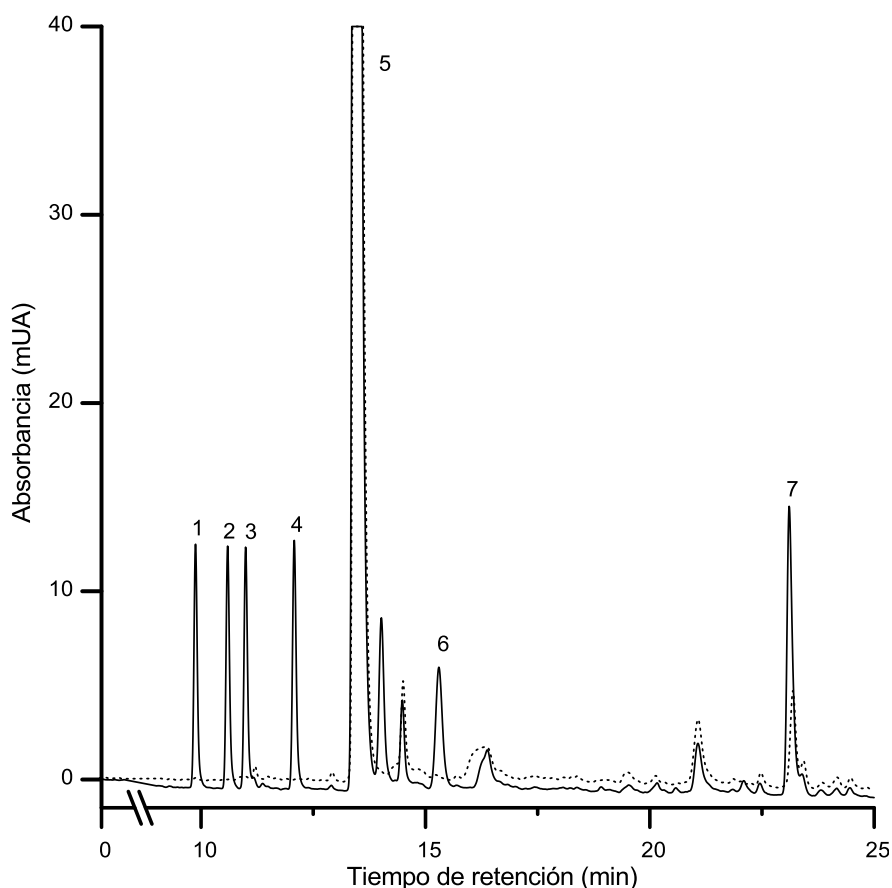
Manteniendo el gradiente y un flujo de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ , se procedió a evaluar la temperatura de la columna estableciendo los siguientes valores 15, 25, 35 y 45 °C (Figura II.14.). Al igual que con el uso de la columna de núcleo sólido, los efectos de la temperatura fueron muy poco significativos sobre la eficiencia y la reducción del tiempo de análisis, por lo tanto, se seleccionó una temperatura de 25 °C con el fin de simplificar el protocolo cromatográfico.



**Figura II.14.** Cromatogramas de una mezcla de estándares de los seis aminoácidos ( $AA^T$  240  $\mu\text{M}$ ) a cuatro temperaturas. Columna: Chromolith 10 x 0,46 cm. La fase móvil se varió desde A-B (90-10 %) a A-B (20-80 %) en 35 minutos. Siendo A buffer formiato 25 mM pH 3,75 y B ACN.  $F= 2 \text{ mL min}^{-1}$ . Las temperaturas fueron 15 (—), 25 (—), 35 (—) y 45 °C (—). La identificación de picos es la misma que la Figura II.12. Detección 260 nm. Vol. de inyección 5  $\mu\text{L}$ .

### II.3.3.3 SEPARACIÓN DE ESTÁNDARES DE FMOC-AAs

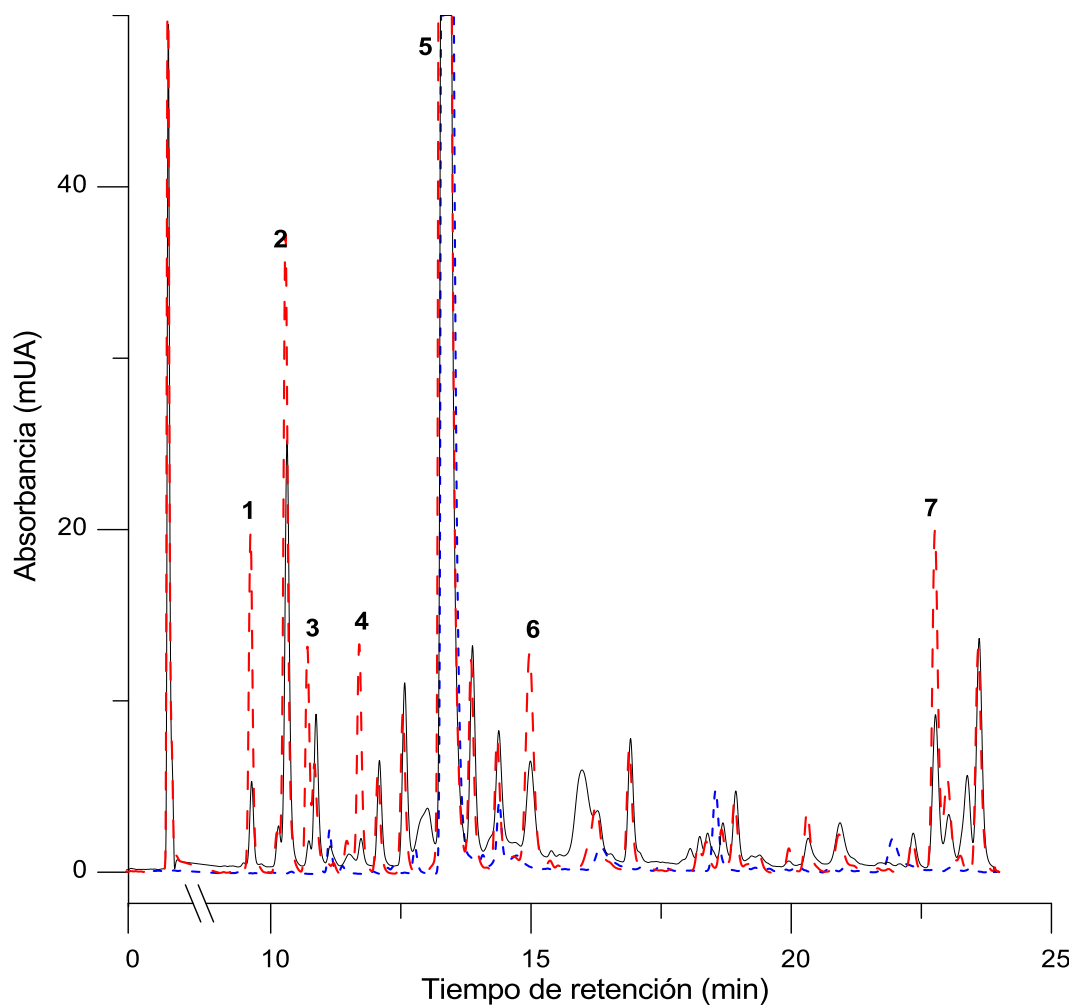
La Figura II.15. muestra la separación de una mezcla estándar de aminoácidos en la columna monolítica comercial en las condiciones óptimas. La selectividad no pudo ser mejorada por pequeñas modificaciones en la composición de la fase móvil.



**Figura II.15.** Cromatograma obtenido con la columna Chromolith. Blanco de derivatización (---) y cromatograma correspondiente a las soluciones estándar de los Fmoc-AAs (—). Condiciones de elución igual que en Figura II.13. Temperatura, 25 °C. Identificación: 1= Fmoc-Arg; 2= Fmoc-Gln; 3= Fmoc-Cit; 4= Fmoc-Glu; 5= Fmoc-OH; 6= Fmoc-Pro; 7= Fmoc-Orn. Detección 260 nm. Volumen de inyección 5  $\mu$ L.

#### II.3.3.4. APLICACIÓN A UNA MUESTRA DE PLASMA HUMANO

Utilizando la columna monolítica Chromolith se realizó el mismo procedimiento de pretratamiento de una muestra de plasma humano, que el desarrollado con la columna Halo en la sección II.3.2.4. La Figura II.16. muestra el cromatograma obtenido para una muestra de plasma con y sin sobreagregado de una solución de estándares de los seis aminoácidos, y el cromatograma del blanco de derivatización.



**Figura II.16.** Cromatogramas del blanco de los reactivos (azul), plasma humano desproteínizado sin (negro) y con (rojo) la adición de una mezcla de estándares de los seis aminoácidos ( $240 \mu\text{M}$  de  $\text{AA}^T$ ). El gradiente de elución y la identificación de picos igual que la aplicada en la Figura II.15. Detección 260 nm. Volumen de inyección  $5 \mu\text{L}$ .

### II.3.4 COMPARACIÓN ENTRE LAS COLUMNAS HALO Y CHROMOLITH

Se realizó la comparación de dos columnas cromatográficas de diferente tecnología. Con el objetivo evaluar la performance cromatográfica de cada una, y para su comparación se determinó la capacidad de pico ( $P_c$ ) y la resolución global ( $R_{s_G}$ ) para los seis estándares de aminoácidos. La capacidad de pico fue obtenida de la siguiente ecuación [105]:

$$P_c = 1 + \frac{t_G}{w} \quad (8)$$

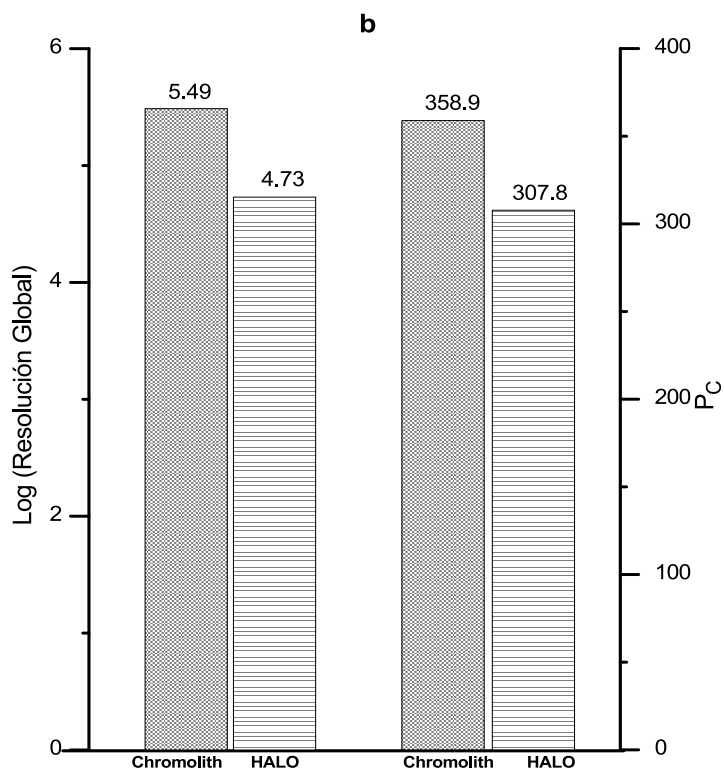
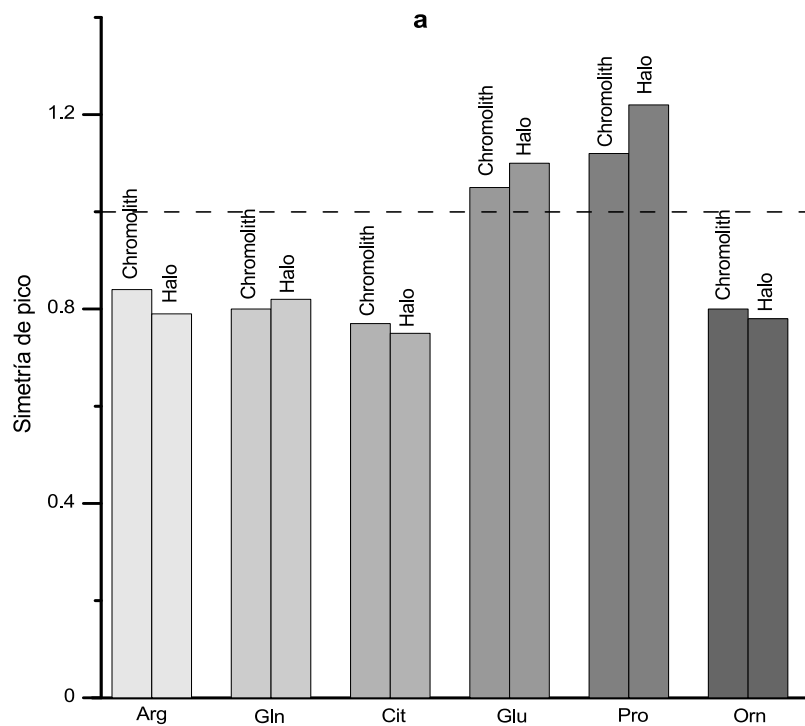
donde  $w$  es el ancho de pico promedio a  $4\sigma$  (13.4 % de la altura de pico) en unidades de tiempo (como fue medido experimentalmente) y  $t_G$  es el tiempo del gradiente aplicado.

Dado que las muestras fueron analizadas bajo diferentes condiciones de gradiente de elución el número de platos no fue considerado un parámetro adecuado para comparar ambas columnas. Es por esto que se decidió estimar la resolución global ( $Rs_G$ ) como una estimación integral que incluye las eficiencias, como así también de las selectividades de los picos relevantes e impurezas.

La resolución global ( $Rs_G$ ) fue determinada como la media geométrica de la resolución entre pares de picos consecutivos. Para estos cálculos fueron incluidos, los picos no resueltos y pares de picos desconocidos. Finalmente también se incluyó el estudio de las simetrías de pico para todos los aminoácidos bajo las condiciones optimizadas comparando ambas columnas.

En la Figura II.17 a y b, se muestran los valores de tres parámetros evaluados para la comparación. En el caso de la simetría de pico no se observaron diferencias significativas entre columnas, siendo dicho parámetro calculado como el ancho de pico a 10% de la altura de pico. Si se observa la Figura II.17.b, la columna Chromolith provee la mejor performance cromatográfica para estos solutos en particular. Además, el tiempo de análisis es reducido en un 30 % comparado con la columna de núcleo sólido. Dado que, además, la caída de presión en la columna monolítica no fue alta (150 bares), esta columna fue seleccionada para realizar una validación completa del método cromatográfico como se detalla en la próxima sección.





**Figura II.17.** Evaluación de la performance en la separación para las columnas Halo y Chromolith:(a) simetría de pico y (b) log (Resolución global) y capacidad de pico (Pc). Condiciones de elución como en las Figuras II.10. y II.14. respectivamente.

### **II.3.5 VALIDACIÓN EMPLEANDO LA COLUMNA CHROMOLITH**

A través de la validación de un método se busca la verificación de determinados parámetros, con requisitos específicos para los mismos, con el objetivo de demostrar que el método es idóneo para un uso previsto [106]. Los resultados de la validación de un método pueden usarse para juzgar la calidad, confiabilidad y consistencia de un resultado analítico, por lo que la validación debe ser parte integral de cualquier buena práctica analítica. Diferentes organizaciones, como FDA [107] (Administración de Alimentos y Medicamentos), ISO [108] (Organización Internacional de Normalización), EPA (Agencia de Protección Ambiental), ICH [109,110] (Conferencia Internacional de Armonización), y otras agencias regulatorias, han definido conjuntos ligeramente diferentes de parámetros requeridos para una validación analítica completa. No todas las definiciones y requisitos se encuentran completamente armonizados y todavía existen diferencias de enfoque, por ejemplo en el ámbito farmacéutico [111]. Es por esto que se tomaron como aspectos que deben estudiarse para la validación de un método analítico a los parámetros: selectividad, linealidad, sensibilidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), exactitud y precisión.

Las condiciones utilizadas para la separación fueron aquellas previamente optimizadas. Se usaron dos métodos de calibración, el método de las adiciones estándar (AE) y el de estándar externo (EE), los cuales fueron comparados en la aplicación cromatográfica para muestras de plasma humano.

#### **II.3.5.1 Selectividad**

Este parámetro hace referencia al grado en que se puede determinar una serie de entidades químicas, en particular en una mezcla compleja, sin interferencia de otros componentes en la mezcla. Un método que es perfectamente selectivo hacia un analito o grupo de analitos se dice que es específico [112].

Dado que la cromatografía se basa en medidas dinámicas continuas con una separación en flujo, la selectividad en las medidas se pueden dividir en (1) selectividad en la detección y (2) selectividad en la separación [112]. En ese

sentido, la selectividad en HPLC se obtiene, mayormente, al elegir las condiciones de separación apropiadas cuando se dispone de sistemas de detección universales como DAD. Se han propuesto diferentes maneras de evaluar la selectividad asociada a distintas técnicas analíticas, uno de los términos comúnmente usados en cromatografía es la resolución [113]:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)} \quad (9)$$

donde  $t_R$  es el tiempo de retención en minutos, y  $w$  el ancho de pico en la base, en minutos. Los resultados cromatográficos mostraron que la resolución para los analitos de interés era mayor a 1,2.

Por otro lado, otra aproximación también usada para caracterizar este parámetro en la validación, es la comparación de pendientes obtenidas de la regresión por estándar externo y por adiciones estándar (análisis del efecto de matriz sección II.3.5.3) [114]. Aunque sin dudas, el mejor análisis estaría dado por la comparación cromatográfica de inyecciones de muestras con y sin los analitos de interés, lo que es imposible, desde el punto de vista biológico para aminoácidos en plasma o el empleo de detección por espectrometría de masas.

### **II.3.5.2 Linealidad**

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad de generar respuestas instrumentales directamente proporcionales a las concentraciones de analito (en soluciones estándares o muestra), dentro de un rango determinado. La curva de calibración para cada uno de los aminoácidos fue construida usando los valores de área de los picos de cada analito en función de las respectivas concentraciones de estándar de analito o de patrón sobreagregado, dependiendo del método de calibración usado. Se realizó el análisis de regresión lineal para establecer la ecuación de la curva de calibración:

$$y = bx + a \quad (10)$$

donde  $y$  es el área,  $x$  la concentración,  $b$  la pendiente y  $a$  la ordenada al origen.

Se sugiere que esta propiedad debe ser evaluada con tres replicados y a un mínimo de cinco niveles de concentración [114]. Para su evaluación se prepararon 7 niveles de concentración de AA<sup>T</sup> cada uno por triplicado, y se determinó cada uno de ellos por duplicado de inyección. Las tablas II.6. y II.7. resumen las cantidades para la preparación de cada uno de los niveles de las curvas de calibración AE o EE respectivamente, cuyas derivatizaciones fueron realizadas en un volumen final de 600 µL.

Para métodos analíticos se sugiere usar el test- $F$  como una posible aproximación para chequear y definir la linealidad de cualquier función de calibración. Para esto se debe proceder al cálculo de la relaciones de varianza de Fisher a través de la expresión:

$$F_{(i-2)/(ij-1)} = \frac{\sigma_{y/x}^2}{\sigma_y^2} \quad (11)$$

donde  $(i-2)$  e  $(ij-1)$  corresponden a los grados de libertad para  $i$  niveles y  $j$  réplicas del numerador y denominador respectivamente,  $\sigma_{y/x}$  es el desvío estándar de los residuos de la regresión y  $\sigma_y$  es la estimación del ruido instrumental.

El valor de  $F$  calculado experimentalmente se contrastó con el valor de  $F$  crítico determinado a través de tablas estadísticas con un 95% de confianza [115]. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla II.8.

El  $F_{\text{crítico}}$  para 5 (7-2) y 14 (21-7) grados de libertad es de 3,663. Por lo tanto, se puede concluir que hay un buen ajuste lineal (ecuación 10) de los datos experimentales en el rango de concentraciones estudiado y con ambos métodos de calibración (EE: 2-100 µM y AE: 0-40 µM).

**Tabla II.6.** Cantidad de cada uno de los reactivos en la preparación de los derivados para cada nivel de la curva de calibración por adiciones estándar.

C <sub>sob</sub> (c/[AA])	Nivel	C <sub>sob</sub> [AA] <sup>T</sup>	Replicas	C <sub>aprox</sub> plasma [μM] en 10μl	Muestra y Patrón			Buffer [μL]	Derivatizante		[FMOC-Cl] / [AA] <sup>T</sup>
					Plasma [μL]	Patron [1.05mM] [μL]	Agua [μL]		FMOC-Cl [10mM] [μL]	ACN [μL]	
0.0	0	0	3	83	20	0	130	150	120	180	24,1
3,3	1	20	3	83	20	11,4	118,6	150	120	180	19,4
6,7	2	40	3	83	20	22,8	107,2	150	120	180	16,3
13,3	3	80	3	83	20	45,7	84,3	150	120	180	12,3
25,0	4	150	3	83	20	85,7	44,3	150	120	180	8,6
33,3	5	200	3	83	20	114,3	15,7	150	120	180	7,1
38,3	6	230	3	83	20	130	0	150	120	180	6,4

**Tabla II.7.** Cantidad de cada uno de los reactivos en la preparación de los derivados para cada nivel de la curva de calibración por estándar externo.

c/[AA]	Nivel	[AA] <sup>T</sup>	Replicas	Patrón		Buffer	Derivatizante		[FMOC-Cl] / [AA] <sup>T</sup>
[μM]		[μM]		Patrón [2.4mM] [μL]	Agua [μL]	[μL]	[μL] FMOC-Cl [10mM]	ACN [μL]	
2	0	12	3	3	147	150	120	180	166,7
6	1	36	3	9	141	150	120	180	55,6
11	2	66	3	16,5	133,5	150	120	180	30,3
15	3	90	3	22,5	127,5	150	120	180	22,2
25	4	150	3	37,5	112,5	150	120	180	13,3
40	5	240	3	60	90	150	120	180	8,3
65	6	390	3	97,5	52,5	150	120	180	5,1
85	7	510	3	127,5	22,5	150	120	180	3,9
100	8	600	3	150	0	150	120	180	3,3

**Tabla II.8.** Valores de  $F_{(I-2)/(IJ-I)}$  según la ecuación (11).

<i>F calculado</i>						
	Arg	Gln	CIT	Glu	Pro	Orn
EE	0,0080	0,187	0,0022	0,028	0,00017	0,080
AE	0,075	0,0659	0,056	0,145	0,00004	0,0253

### II.3.5.3 Efecto de Matriz

Este efecto consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes en la muestra (matriz). La forma de detectar efectos de matriz es utilizar la técnica de las adiciones estándar [116]. El mayor inconveniente de esta técnica es que necesitamos construir una recta de adiciones estándar para cada muestra que queramos analizar, lo cual supone un incremento sustancial en el volumen de trabajo en el laboratorio.

Para verificar si hay efecto de matriz en la determinación cromatográfica, se realizó la comparación de pendientes a través de un test-*t* de las regresiones lineales según los métodos de EE y AE, previo al análisis de varianzas entre métodos [116]. Las tablas II.9. y II.10. resumen los parámetros determinados para esta evaluación.

**Tabla II.9.** Valores estadísticos de cada método usando altura de pico ( $h$ ), para la comparación de las varianzas, a través de la determinación del parámetro  $F$  [5].  $S^2_{(x/y)}$  es la varianza de los residuos de  $y$ ;  $b$  es la pendiente de la recta de regresión;  $\Sigma(x - \bar{x})^2$  suma de cuadrados de las desviaciones a la media;  $n$  número de muestras;  $g.l.$  grados de libertad;  $F_{\text{calculado}}$  es el cociente de varianzas calculado y  $F_{\text{crítico}}$  es el factor que depende de  $n$  y  $g.l.$  para un grado de confianza de 95 %.

	Gln		Arg		Cit		Glu		Pro		Orn	
	EE	AE	EE	AE	EE	AE	EE	AE	EE	AE	EE	AE
$S^2_{(x/y)}$	0,248	0,061	0,390	0,061	0,689	0,273	0,166	0,035	0,053	0,020	0,612	0,610
$b$	0,169	0,233	0,242	0,282	0,280	0,330	0,152	0,224	0,105	0,122	0,451	0,557
$\Sigma(x - \bar{x})^2$	18,040	3,573	26,700	3,491	20,157	3,858	20,153	3,858	13,914	3,858	8,622	2,792
$n$	17	18	24	19	21	20	19	20	21	20	15	14
$g.l.$	16	17	23	18	20	19	18	19	20	19	14	13
$F_{\text{crítico}}$	3,01		2,85		2,74		2,95		2,88		3,52	
$F_{\text{calculado}}$	0,25		0,16		0,40		0,21		0,37		1,00	

**Tabla II.10.** Valores de las pendientes para cada método (curvas realizadas con las alturas de pico), y estadístico  $t$  calculado según [5].

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
<b>Adiciones estándar</b>	0,2814	0,2331	0,3299	0,2237	0,1222	0,5565
<b>Estándar externo</b>	0,2421	0,1693	0,2802	0,1525	0,1045	0,4511
<b>t (calculado)</b>	1,79	0,16	0,78	2,4	0,96	1,69

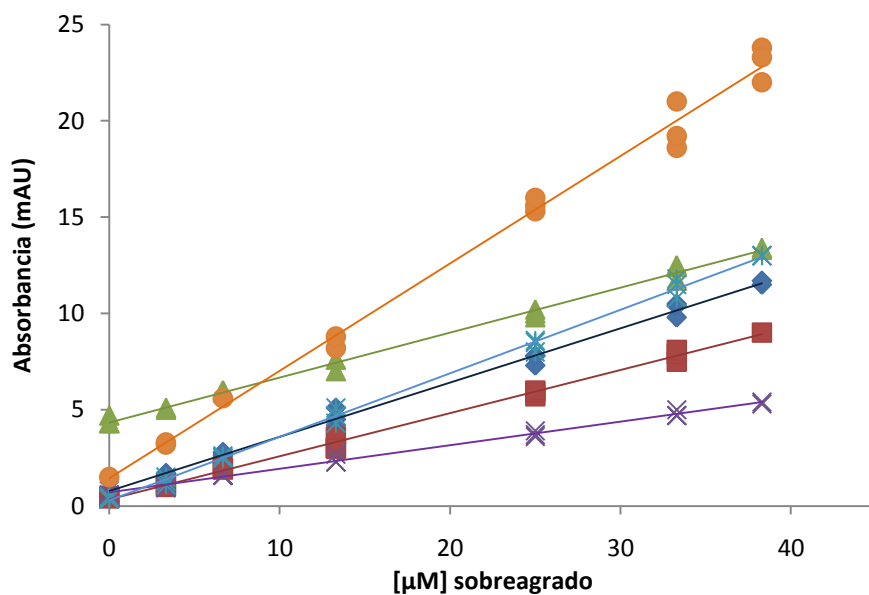


De los resultados obtenidos se determinó que las pendientes son estadísticamente similares, lo que indica la ausencia de efectos de matriz en la determinación. De aquí se concluye que la determinación puede realizarse por cualquiera de los dos métodos de calibración.

#### **II.3.5.4 CALIBRACIÓN POR ADICIONES ESTÁNDAR (AE)**

La identificación de picos de los analitos fue llevada a cabo por comparación de los tiempos de retención de los estándares, y también por adición de estándares a las muestra. Diferentes estudios han reportado que el contenido promedio de aminoácidos libres en una persona saludable está dentro del rango de 1840 a 3200  $\mu\text{M}$  [28,117,118]. Para realizar esta calibración por sobreagregados, la media aproximada de este rango (2500  $\mu\text{M}$  AA<sup>T</sup>) fue considerada como contenido base de aminoácidos en una muestra de plasma de un adulto normal. Esta consideración fue necesaria, para mantener una relación coherente entre la cantidad de FMOC adicionado y los aminoácidos totales a derivatizar. Las curvas de calibración se construyeron adicionando a cantidades constantes de un extracto de plasma de un hombre adulto voluntario (50  $\mu\text{L}$ ), seis cantidades diferente de soluciones estándar hasta una concentración máxima adicionada de 750  $\mu\text{M}$  de AA<sup>T</sup>.

Como se demostró anteriormente (II.3.5.2) las curvas fueron lineales, y en todos los casos los valores de las pendientes de las curvas de calibración no difieren de las obtenidas por el método de estándar externo. Las curvas de calibración de los seis AAs se muestran en la Figura II.18.



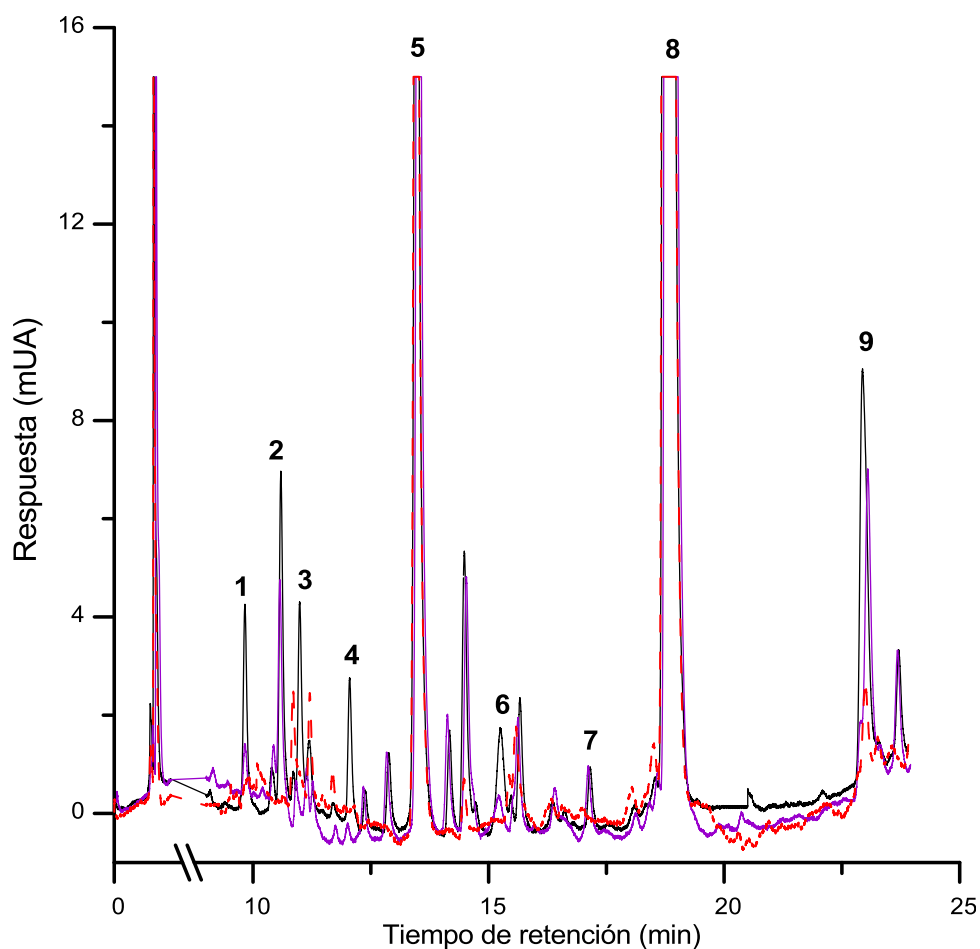
**Figura II.18.** Curvas de calibración de altura de pico en función de la concentración de estándar sobreagregado para cada aminoácido. (♦) Arg, (■) Glu, (●) Orn, (▲) Gln, (✱) Cit y (✱) Pro. Las líneas representan las regresiones lineales respectivas a cada curva.

Los resultados cuantitativos de la muestra de plasma analizada se resumen en la tabla II.11.

**Tabla II.11.** Parámetros de la curva de calibración para cada aminoácido y las desviaciones estándar correspondientes. La última fila corresponde a los valores de concentración (media ± SD, n = 3) hallada en la muestra de plasma.

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
<b>Pendiente (±s)</b>	0,281 (0,004)	0,233 (0,004)	0,329 (0,004)	0,224 (0,003)	0,122 (0,002)	0,56 (0,02)
<b>ordenada (±s)</b>	0,78 (0,09)	4,34 (0,09)	0,29 (0,09)	0,35 (0,06)	0,72 (0,05)	1,4 (0,4)
<b>S<sub>y/x</sub></b>	0,252	0,247	0,273	0,186	0,141	0,781
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9960	0,9948	0,9966	0,9966	0,9935	0,9927
<b>[μM] (±s)</b>	84 (1)	559 (2)	27,2 (0.9)	46,7 (0.9)	176 (1)	75 (2)

En la Figura II.19. se muestran tres cromatogramas superpuestos para el análisis del método AE. Uno de ellos es el blanco de reacción de derivatización, el cual permite caracterizar los picos de interferentes aportados por los reactivos involucrados en la derivatización, los otros dos cromatogramas corresponden a una muestra de plasma con y sin agregado de uno de los niveles de estándar.



**Figura II.19.** Cromatogramas correspondientes a dos niveles de la curva de calibración de AE. (---) muestra sin adición de estándar; (---) muestra con adición de  $13,3 \mu\text{M}$  de cada aminoácido y (-.-) blanco de reacción. Las condiciones de separación son las mismas que en la Figura II.15. Identificación: 1- FMOC-Arg, 2- FMOC-Gln, 3-FMOC-Cit, 4- FMOC-Glu, 5- FMOC-OH, 6- FMOC-Pro, 7- FMOC-ABU, 8- FMOC-Tyr y 9- FMOC-Orn.

#### II.3.5.4.1 LOD y LOQ

Estos límites fueron determinados para cada aminoácido y se resumen en la tabla II.12. Los LOD están comprendidos entre 0,6  $\mu\text{M}$  para Glu y Pro, y 5,4  $\mu\text{M}$  para Gln. Estos valores son menores a los reportados por otros autores en los cuales trabajan con FMOC como derivatizante de los aminoácidos, usando columnas convencionales de C-18 y detección UV (4-6  $\mu\text{M}$ ) [119]. Sin embargo, los valores obtenidos en este trabajo de tesis son mayores que aquellos que se pueden alcanzar por detección por fluorescencia (orden de los picomoles).

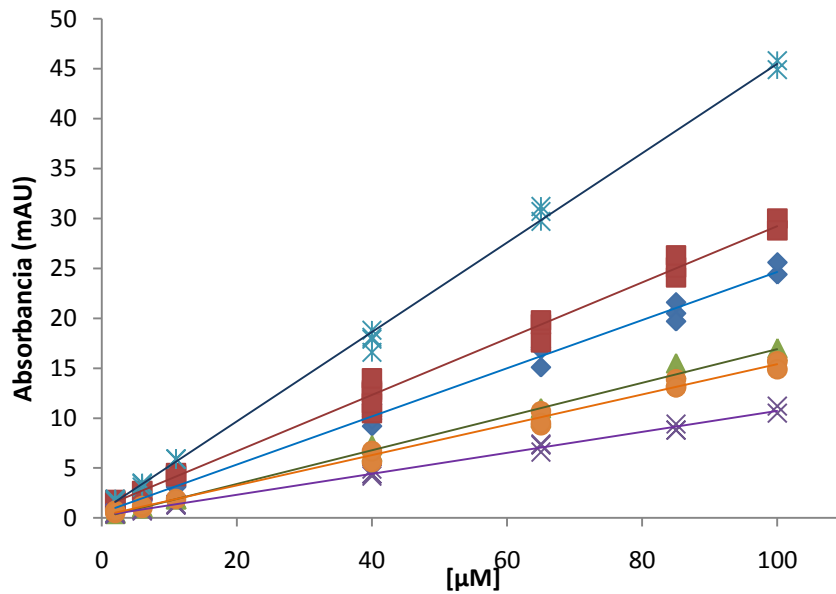
**Tabla II.12.** Valores de LOD y LOQ calculados siguiendo la convención de las ecuaciones 1 y 2 [101].

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
LOD ( $\mu\text{M}$ )	0,8	5,4	0,9	0,6	0,6	2,5
LOQ ( $\mu\text{M}$ )	1,6	17,2	2,7	1,8	1,6	7,7

#### II.3.5.5 CALIBRACIÓN POR ESTÁNDAR EXTERNO (EE)

Este método de análisis se aplica en la determinación de un analito, en el cual los componentes de la matriz, como así también, los reactivos usados en la preparación de la misma no interfieren en el análisis. Previamente fue demostrado que no existía efecto de matriz, mediante el análisis del estadístico  $t$  aplicado sobre las pendientes de las curvas entre los métodos EE y AE.

Las curvas de calibración de los seis AAs se muestran en la Figura II.20.



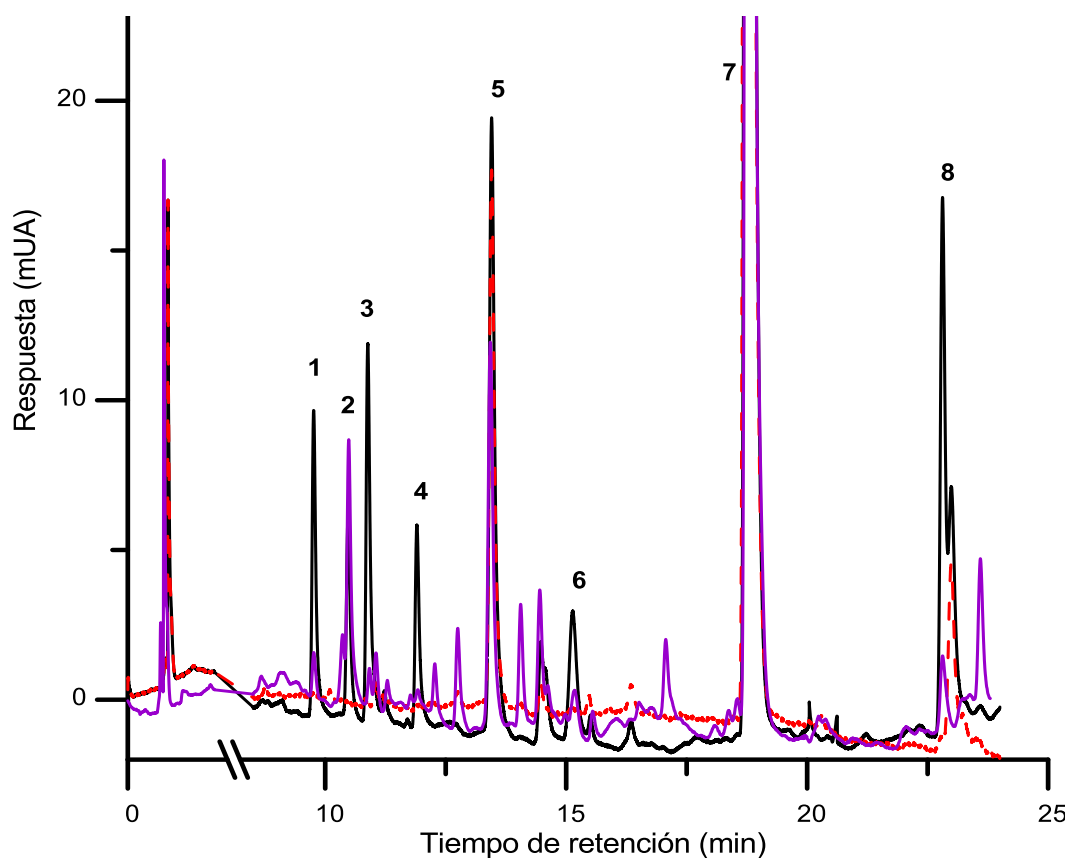
**Figura II.20.** Curvas de calibración de altura de pico en función de la concentración de estándar para cada aminoácido. (♦) Arg, (■) Cit, (●) Glu, (▲) Gln, (✱) Orn y (✕) Pro. Las líneas representan las regresiones lineales respectivas a cada curva.

En la tabla II.13., se resumen los parámetros de la calibración y las cifras de mérito de la curva de calibración por EE.

**Tabla II.13.** Parámetros de la curva de calibración para cada aminoácido y las desviaciones estándar correspondientes. La última fila muestra los valores de concentración (media ± SD, n = 3) hallada en una muestra de plasma de un hombre voluntario adulto.

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
<b>Pendiente (± SD)</b>	0,242 (0,004)	0,169 (0,004)	0,280 (0,006)	0,152 (0,003)	0,104 (0,002)	0,451 (0,009)
<b>Ordenada (± SD)</b>	0,5 (0,2)	0,02 (0,02)	1,1 (0,3)	0,2 (0,1)	0,22 (0,07)	0,6 (0,3)
<b>S<sub>y/x</sub></b>	0,6246	0,4984	0,8298	0,4079	0,2304	0,7825
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9942	0,9923	0,9912	0,9936	0,9954	0,9947
<b>[μM] (± SD)</b>	55 (5)	651 (6)	41 (6)	27 (5)	164 (4)	62(4)

En la Figura II.21. se muestran tres cromatogramas superpuestos analizados por el método EE. Uno de los cromatogramas es el blanco de reacción de derivatización y los otros dos cromatogramas corresponden a una muestra de plasma y a una solución de estándares de 40  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido.



**Figura II.21.** Cromatogramas correspondientes a un nivel de la curva de calibración de EE, el blanco de reacción y una muestra de plasma. (---) muestra de plasma; (----) solución de estándares 40  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido y (- -) blanco de reacción. Las condiciones de separación son equivalentes a la Figura II.15. Identificación: 1- Fmoc-Arg, 2- Fmoc-Gln, 3- Fmoc-Cit, 4- Fmoc-Glu, 5- Fmoc-OH, 6- Fmoc-Pro, 7- Fmoc-Tyrn y 8- Fmoc-Orn.

### II.3.5.5.1 LOD y LOQ

En la tabla II.14. se muestran los valores para cada aminoácido. Los límites alcanzados por este método fueron un poco más grandes, es decir, es menor la detectabilidad respecto al método de las AE.

**Tabla II.14.** Valores de LOD y LOQ calculados siguiendo la convención IUPAC (ecuac. 6 y 7).

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
LOD ( $\mu\text{M}$ )	2,6	1,7	3,8	1,6	1,0	3,2
LOQ ( $\mu\text{M}$ )	6,7	5,0	9,4	4,3	2,5	8,5

### II.3.5.6 PRECISIÓN

Para su evaluación se prepararon cinco soluciones de concentración 40  $\mu\text{M}$  de AAs<sup>T</sup>. Las muestras fueron derivatizadas individualmente y analizadas empleando la metodología descrita en la sección experimental. Para el ensayo de precisión intra-día (en el mismo día) se realizaron 5 réplicas a una concentración 40  $\mu\text{M}$  constante. Mientras que la precisión inter-día se realizó analizando las muestras en 3 días distintos (luego de 3 y 10 días posteriores a la primera derivatización). En ambos casos se determinó por duplicado de inyección, y se calculó la desviación estándar relativa porcentual (% RSD). Los resultados se informan en la Tabla II.15.

**Tabla II.15.** Evaluación de la precisión del método en función de RSD %.

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
Inter-día (luego de 3 y 10 días, n=3)	8,0	10,4	9,4	10,5	6,7	7,0
Intra-día (n=5)	6,5	8,6	7,1	6,7	9,3	9,6

De los resultados obtenidos se puede observar que la precisión es buena, con RSD menor a 10 % (10.5 % para Glu). Estos valores son razonables ya que se trata de muestras con un tratamiento previo a la determinación cromatográfica, la derivatización. Este pretratamiento realizado requiere de dos pasos, lo cual contribuye a estos valores de precisión.

### II.3.5.7 EXACTITUD (RECUPERACIÓN)

La exactitud es un parámetro que mide el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor real de un determinado analito en una muestra. Esta determinación se realizó adicionando una alícuota de solución estándar de aminoácidos a una muestra de plasma sin desproteinizar, luego se procedió a realizar la desproteinización con la solución de TCA, y finalmente se realizó la derivatización de una alícuota. El procedimiento global se repitió agregando tres niveles de concentración de estándar de AAs<sup>T</sup>, para iguales cantidades de muestra. La recuperación se calcula con la ecuación propuesta por Horwitz (1983):

$$\%R = 100 \frac{(A-B)}{C} \quad (12)$$

donde A es la concentración de la muestra más el patrón añadido, B la concentración de la muestra, y C es la concentración de patrón añadido.

Los niveles sobreagregados a la muestra de plasma sin desproteinizar (150 µL), fueron de 41,7; 208,3 y 416,7 µM de AAs<sup>T</sup> (por agregado de 50 µL de solución patrón de diferentes concentraciones respectivamente). Luego se realizaron dos centrifugaciones previa adición de 10 µL de TCA 30 %p/v (esta operación se realizó por duplicado). Del sobrenadante resultante se tomaron 50 µL y se aplicó el protocolo de derivatización. La recuperación se analizó por duplicado.

Con los datos experimentales de concentración obtenida (A), y recuperación se hizo un análisis de varianzas para corroborar homogeneidad (*test-F*). Como así



también se realizó una comparación de medias a través de un *test-t*. Del análisis estadístico se obtuvo que no hay diferencia entre las medias de los niveles (para un grado de confianza de 95 %), por lo que se obtuvo un promedio de recuperación, según se muestra en la tabla II.16.

**Tabla II.16.** Factores de recuperación porcentuales promedio a tres niveles adicionados. Entre paréntesis se muestran las desviaciones estándar.

	Arg	Gln	Cit	Glu	Pro	Orn
% R (s)	72(6)	91(4)	70(10)	76(10)	69(6)	66(8)

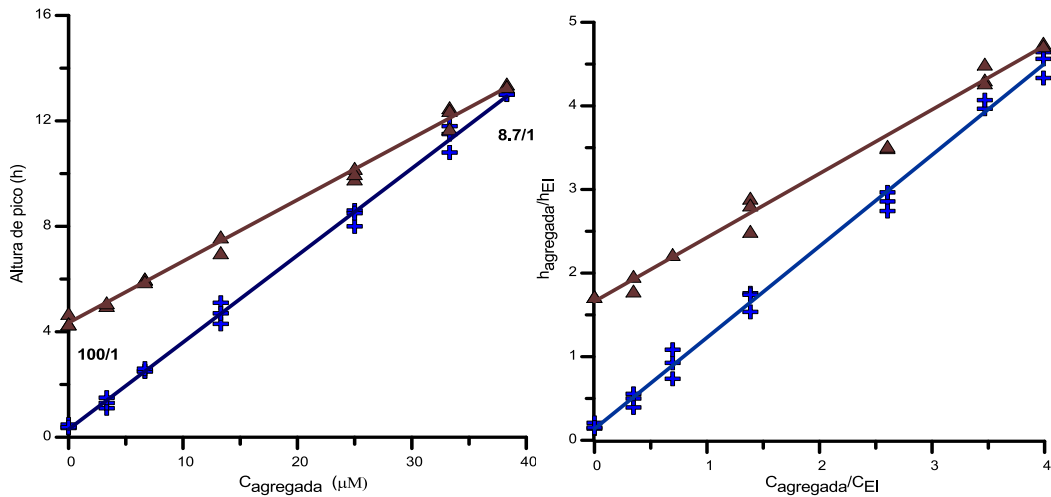
Esta determinación se realiza para observar los efectos de la desproteización sobre los aminoácidos. En este caso los valores muestran recuperaciones aceptables para el pre tratamiento realizado.

### II.3.5.8 USO DE UN ESTANDAR INTERNO (EI) EN EL MÉTODO DE CALIBRACIÓN AE

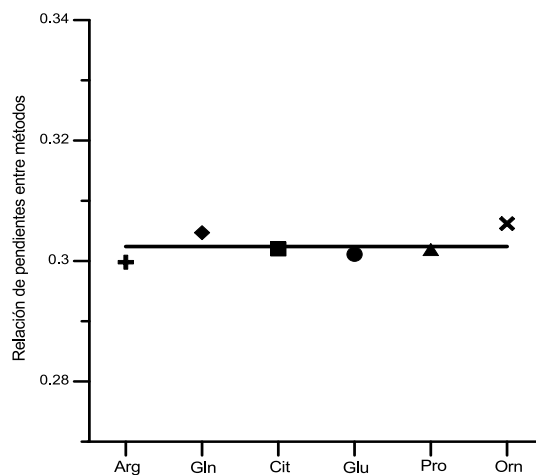
Se usó ácido amino butírico (ABU) como estándar interno en el método de AE. Este fue adicionado en una cantidad constante en la curva de calibración, para demostrar que la relación de FMOC/AAs<sup>T</sup> no era un limitante en la reacción cuando no se conoce la cantidad de aminoácidos en la muestra, y de esta manera poder independizar la relación FMOC/AAs<sup>T</sup> del contenido de aminoácidos libres presentes en una muestra de plasma. La tabla II.17 muestra los niveles y cantidades de cada solución para la elaboración de la curva. En las Figuras II.22 y II.23, se muestran los resultados obtenidos para dos de estos aminoácidos, Cit y Glu (la última Figura incluye a los seis). Para este análisis se procedió a comparar la curva de sobreagregados sin la presencia del estándar interno (Figura II.22.A), con las curvas obtenidas usando el EI (Figura II.22.B). La comparación de pendientes entre métodos se muestra en la Figura II.23.

**Tabla II.17.** Cantidades de cada uno de los reactivos (en  $\mu\text{L}$ ) en la preparación de los derivados para cada uno de los niveles de la curva de calibración por adiciones estándar, con el agregado de una cantidad constante de ABU (EI) en cada nivel.

$C_{\text{sob}} / [\text{AA}]$	Nivel	$C_{\text{sob}} / [\text{AA}]^T$	Replicas	$C_{\text{aprox}} \text{ plasma}$	Muestra			Buffer	Derivatizante		$[\text{FMOC-Cl}] / [\text{AAs}]^T$	ABU
					Plasma $[\mu\text{L}]$	Patrón $[1,05\text{mM}]$ $[\mu\text{L}]$	Agua $[\mu\text{L}]$		FMOC-Cl $[10\text{mM}]$ $[\mu\text{L}]$	ACN $[\mu\text{L}]$		
$[\mu\text{M}]$		$[\mu\text{M}]$		$[\mu\text{M}] \text{ en } 10\mu\text{l}$ $[\mu\text{L}]$								$[1,2\text{mM}]$ $[\mu\text{L}]$
0.0	0	0	3	83	20	0	130	150	120	180	24.1	5
3.3	1	20	3	83	20	11.4	118.6	150	120	180	19.4	5
6.7	2	40	3	83	20	22.8	107.2	150	120	180	16.3	5
13.3	3	80	3	83	20	45.7	84.3	150	120	180	12.3	5
25.0	4	150	3	83	20	85.7	44.3	150	120	180	8.6	5
33.3	5	200	3	83	20	114.3	15.7	150	120	180	7.1	5
38.3	6	230	3	83	20	130	0	150	120	180	6.4	5



**Figura II.22.** A) Curva de AE y B) Curva de AE incluyendo en cada muestra ABU como EI (9,6  $\mu\text{M}$ ) ambas para Cit (+) y Gln ( $\blacktriangle$ ), y variando las relaciones Fmoc/AA<sup>T</sup> desde 100/1 a 8,7/1. Las rectas son del ajuste lineal a cada curva.



**Figura II.23.** Valores de la relación de pendientes entre los métodos de AE con y sin EI ( $b_{\text{sin EI}}/b_{\text{con EI}}$ ) para cada uno de los aminoácidos. Orn (x), Pro ( $\blacktriangle$ ), Glu ( $\bullet$ ), Cit ( $\blacksquare$ ), Gln ( $\blacklozenge$ ) y Arg (+). La recta marca el promedio de los valores (0,302).

Se pudo observar que las respuestas de este estándar fueron reproducibles en todos los niveles de la curva, es decir, para todas las relaciones de Fmoc/AAs<sup>T</sup>. La comparación de las pendientes entre métodos (Figura II.23.) indica que, en el rango de concentraciones evaluado, el rendimiento de la derivatización es independiente de la relación entre Fmoc y contenido de AAs<sup>T</sup>, resultado muy significativo dado que en muestras reales de plasma existe una gran variabilidad en el contenido de AAs<sup>T</sup>, por innumerable razones (disfunción metabólica, edades del paciente, entre otras).

## II.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se desarrolló un método de HPLC-UV para la separación y determinación de citrulina y aminoácidos metabólicamente relacionados en plasma, en base a su derivatización pre-columna con FMOC-Cl.

Las condiciones de derivatización que incluyeron el pH del buffer y su concentración, la reducción de las especies que interfieren en el cromatograma, el tiempo de reacción y la relación entre reactivos, fueron primeramente optimizadas a fin de lograr rendimientos de reacción satisfactorios y altos valores de reproducibilidad. Por lo tanto, la adición de Tyrn como un inhibidor de la reacción de derivatización, reduce de manera significativa la cantidad de interferente, como lo es el subproducto hidrolizado de FMOC-OH; y mejora significativamente la reproducibilidad, dando valores de la RSD % entre 5 y 10,5 % para el contenido de aminoácidos en un nivel de 20 mM de cada uno.

La separación de los aminoácidos derivatizados se realizó en tres columnas cromatográficas distintas, una columna conteniendo partículas porosas y empleando temperatura, una columna rellena de partículas de núcleo sólido y una columna comercial de relleno monolítico a base de sílice.

También se realizó una optimización de las condiciones para la separación por HPLC de estos aminoácidos en soportes cromatográficos comerciales, y las performances resultantes fueron comparadas. La columna monolítica de sílice (Chromolith) mostró una mejor capacidad de pico y resolución global que la columna conteniendo partículas de núcleo sólido (Halo). De esta manera el lecho monolítico se utilizó para el desarrollo completo de una validación bajo condiciones óptimas de elución, que puede aplicarse al análisis exitoso de los aminoácidos en una muestra real de plasma. El protocolo propuesto constituye una metodología prometedora y fiable para la determinación de estos aminoácidos y para el control de sus niveles de concentración en varios trastornos de salud humana.

## III CAPÍTULO: MICRO ESCALA

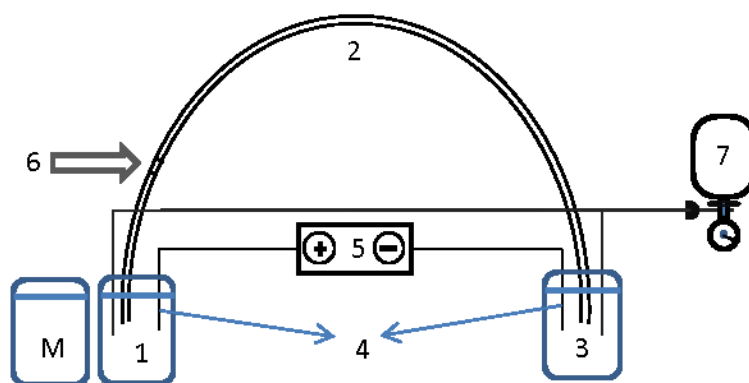
### III.1 INTRODUCCIÓN

La miniaturización de columnas en HPLC ha sido una de las principales tendencias de esta técnica de separación en los últimos años. Como se mencionó en el capítulo II, las columnas usadas en HPLC convencional de diámetros internos estándar (DI: 2,1 a 4,6 mm) se han ido sustituyendo con columnas de diámetros internos cada vez más reducidos [120].

Estos cambios han sido propuestos tanto para HPLC, como para CEC (electro cromatografía capilar). La CEC es una técnica híbrida entre la electroforesis capilar en zona (CZE) y HPLC. El interés por esta técnica ha sido motivado por la potencialidad de combinar la selectividad de HPLC con la miniaturización y la alta eficiencia de CZE [121–123]. La mayor parte de la investigación en esta técnica ha implicado el uso de capilares rellenos con partículas, comúnmente aquellos basados en sílice para HPLC (partículas de 3  $\mu\text{m}$  y también más pequeñas). Se trata de una técnica de separación en la que el transporte de la fase móvil a través de un capilar (50-200  $\mu\text{m}$  de DI) relleno con partículas de fase estacionaria, se consigue por el flujo electroosmótico (EOF) creado al aplicar un campo eléctrico, en lugar de un gradiente de presión como en HPLC. El flujo electroosmótico es generado por la presencia de una doble capa eléctrica que existe entre las interfaces solido-líquido. El EOF permite el uso de partículas más pequeñas y columnas más largas que en HPLC debido a la ausencia de una alta contrapresión. La separación se consigue mediante dos fenómenos: la partición de los analitos entre la fase móvil y la estacionaria y, para el caso de analitos cargados, por la diferencia en las movilidades electroforéticas. En la Figura III.1. se esquematiza un sistema empleado en CEC.

Hasta ahora, los principales inconvenientes asociados con capilares rellenos han impedido que CEC sea ampliamente aceptada como una técnica fiable en el campo analítico. Muchos de los problemas encontrados en esta técnica se originan a partir de la presencia de fritas. Aunque son necesarias para retener

las partículas en el interior de la columna, las fritas pueden ser responsables de la formación de burbujas, pudiendo resultar en una interrupción de la corriente en el capilar. Además, estos están fabricados con material de empaque sinterizado, creando usualmente zonas con heterogeneidades dentro de los capilares. También son difíciles de fabricar, lo que hace todo el proceso de desarrollo propio de la columna menos reproducible. Los problemas generales creados por las fritas pueden ser superados por el uso de fases estacionarias monolíticas, ya que se elimina la necesidad de fritas.



**Figura III.1.** Esquema de un sistema CEC. Referencias: 1,3: viales de solventes; 2: capilar de sílice fundida relleno (20-50 cm de longitud y 50-200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno); 4: electrodos; 5: fuente de energía; 6: ventana de detección; 7: Presión externa de 2-20 bares y M: vial de muestra.

Los argumentos a favor de la miniaturización son la reducción en el volumen de muestra necesaria para la inyección, disminución de los caudales de eluyente que conducen a la reducción de su consumo (los eluyentes contienen generalmente cantidades importantes de solventes orgánicos) y una reducida dilución de los analitos en la columna durante la separación, lo que resulta en un aumento de la detectabilidad de la señal analítica. Estas ventajas, sumado a que el empleo de bajos caudales permite un acoplamiento más eficaz con detectores tales como espectrómetros de masas, incentivan el interés por

reducir las dimensiones del sistema separativo y, consecuentemente, los volúmenes empleados.

Para desarrollar esta clase de metodologías separativas existen algunos equipos comerciales capaces de trabajar en condiciones de microescala. Alternativamente también se puede proceder a la adaptación de un equipo convencional de HPLC mediante el acople de sistemas miniaturizados de inyección, divisor de flujo y detección. Si bien estas adaptaciones permiten emplear instrumentos existentes, el principal inconveniente radica en que todos los volúmenes asociados al instrumento, esto es el volumen muerto interno, tiene que ser minimizado para reducir los efectos extracolumna que conllevan a importantes ensanchamientos de banda.

Existe una clasificación de los diferentes sistemas miniaturizados para cromatografía líquida [124], basada principalmente en las dimensiones de las columnas empleadas, como así también en el rango de caudales a los que se puede trabajar (tabla III.1).

**Tabla III.1.** Convención de dimensiones en cromatografía líquida.

<b>Denominación</b>	<b>Diámetro interno</b>	<b>Flujo</b>	<b>Capacidad de carga</b>
micro-HPLC	500 $\mu\text{m}$ – 1 mm	20 $\mu\text{l}/\text{min}$ – 40 $\mu\text{l}/\text{min}$	50-500 $\mu\text{g}$
HPLC capilar	100 $\mu\text{m}$ – 500 $\mu\text{m}$	300 $\text{nl}/\text{min}$ – 20 $\mu\text{l}/\text{min}$	1-50 $\mu\text{g}$
nano-HPLC	50 $\mu\text{m}$ – 100 $\mu\text{m}$	180 $\text{nl}/\text{min}$ – 300 $\text{nl}/\text{min}$	<1 $\mu\text{g}$

### **III.1.1 Diseño, síntesis y evaluación de columnas capilares monolíticas poliméricas**

Los capilares monolíticos han sido propuestos como una alternativa a las columnas de relleno tradicional para su uso en CEC y micro HPLC. La principal fuerza impulsora detrás de esta investigación se basa en que son fáciles de fabricar, el monolito se forma *in-situ*, a menudo a través de un proceso de

reacción en un solo paso, y sus propiedades, tales como la porosidad, área de superficie y la funcionalidad pueden ser adaptadas de acuerdo a las necesidades analíticas.

Con objeto de optimizar las propiedades cromatográficas de los monolitos es esencial controlar la morfología del lecho cromatográfico. Para esto es necesario un estudio sistemático de las condiciones de polimerización: naturaleza y composición de disolventes porogénicos, monómeros e iniciadores, además de la evaluación de formas de control de la polimerización por vía térmica, temperatura o en el caso de iniciación con UV, potencia y tiempos de irradiación. Los tamaños de poro y glóbulo se controlan principalmente mediante la relación monómero/disolventes porogénicos, y por la cantidad del solvente macroporógeno presente en la mezcla polimérica. La densidad de carga superficial (necesaria en CEC), se controla modificando el porcentaje de monómero cargado presente. Además, en caso de que sea conveniente se puede proceder a modificar la superficie del lecho después de polimerizar mediante la adición de un injerto por iniciación UV (photografting) de derivados capaces de polimerizar radicalariamente.

La formación del monolito se puede lograr *in situ*, esto es, dentro de cualquier reservorio tratado o no tratado previamente. En el caso de los capilares de sílice empleados como soporte del relleno, se debe sujetar el monolito de forma covalente a la superficie interior del capilar para evitar cualquier desplazamiento del mismo mediante el bombeo de la fase móvil a través de la columna. Esto se logra, entre otras formas, por silanización de la pared capilar, usualmente empleando metacrilato de 3-metoxisilil propilo [72].

Los monolitos producidos se pueden caracterizar morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para analizar la distribución de tamaños de poro suele emplearse la caracterización por porosimetría de intrusión de Hg, y la determinación del área específica superficial mediante la medición de isothermas de adsorción de nitrógeno (método BET). Finalmente se evalúa el comportamiento cromatográfico de las fases obtenidas a partir de parámetros como permeabilidad, eficiencia y selectividad.



### **III.1.2. Resumen**

En este estudio se desarrollaron métodos separativos rápidos empleando técnicas a escala reducida. En primer lugar se sintetizaron diferentes columnas basadas en monolitos de acrilato o metacrilato sobre capilares de sílice pre-tratados. Las dimensiones de los capilares fueron acordes al sistema cromatográfico a emplear.

Las fases estacionarias sintetizadas que resultaron adecuadas fueron utilizadas en el desarrollo de métodos para el análisis de citrulina y otros aminoácidos. Esto se hizo mediante cromatografía líquida empleando dos instrumentos comerciales de escala nano-HPLC y micro-LC, y otro de escala capilar adaptado de un HPLC convencional, a efectos de reducir los volúmenes extra-columna, poder proporcionar los caudales óptimos y trabajar bajo condiciones de presión normales (menores a 400 bares). Además se ensayaron columnas monolíticas poliméricas capilares para la determinación de los analitos de interés por CEC.

Las condiciones de fase móvil fueron también optimizadas buscando establecer el balance más adecuado entre tiempo de análisis y resolución.

## **III.2 EXPERIMENTAL**

### **III.2.1 Reactivos**

Para el desarrollo de las columnas monolíticas capilares se empleó metacrilato de butilo (BMA), etiléndimetacrilato (EDMA), cloruro de 2-(metacriloxi)etil-trimetilamonio (META), ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS), 1,4-butanodiol y 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato, lauril acrilato y 1-propanol adquiridos a Aldrich (Milwaukee, WI, USA). El  $\alpha,\alpha'$ -azobisisobutironitrilo (AIBN) de Fluka (Buchs, Suiza) fue usado como iniciador. Las columnas fueron sintetizadas dentro de un tubo capilar de sílice fundida de longitud y diámetros internos variables dependiendo de la técnica a emplear. Para micro-LC se usó

tubo capilar de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, para nano-LC se usaron capilares de 100  $\mu\text{m}$  (transparentes a la radiación UV), y para el sistema capilar tubos de 400 y 500  $\mu\text{m}$  (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA).

Los solventes acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) fueron de grado analítico, y provenientes de Schar-lab (Barcelona, España). El ácido fórmico (HCOOH) de Fluka (Suiza), hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl) de Sigma-Aldrich (Alemania), y agua nanopura. El agua desionizada se obtuvo del desionizador Barnstead (Sybron, Boston, MA, USA), y por medio de un sistema Milli-Q Pure (Simplicity, Millipore, MA, EE.UU.). A menos que se indique lo contrario, todos los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico.

Se preparó una mezcla conteniendo cuatro alquil bencenos (metil, etil, n-propil y n-butil benceno, de Sigma–Aldrich, Steinheim, Alemania), disueltos en ACN a concentración 1000 ppm de cada uno. Esta solución se diluyó con agua desionizada a 100 ppm, para luego ser inyectada. Se usó uracilo (Sigma–Aldrich) como marcador de tiempo muerto.

Los aminoácidos usados fueron descritos en la sección experimental I.2

### **III.2.2 Instrumentación**

El proceso de acondicionamiento de los capilares se realizó con una jeringa de 250  $\mu\text{L}$  Hamilton (Reno, Nevada, USA) acoplada a un sistema de infusión de KD Scientific (Holliston, MA, USA). Con el fin de secar los capilares y eliminar el aire de las mezclas de polimerización (oxígeno principalmente) se empleó una corriente de nitrógeno suministrada por un generador Gaslab NG LCMS 20 generator, de Equien (Madrid, España), o por medio de un tubo de gas nitrógeno envasado.

Para la homogeneización de los monolitos se utilizó un sonicador modelo 8890 (Cole Parmer, USA), y para su preparación una balanza analítica modelo Adventurer Pro (Ohaus, USA). Para iniciar la reacción de polimerización de la mezcla dentro del capilar se empleó una cámara UV (modelo CL1000) de UVP Inc. (Upland, CA, USA), equipada con 5 lámparas UV (5 x 8 W, 254 nm) o una

estufa Fisher (Fisher Scientific Co. USA). Una vez completada la polimerización, las columnas se limpiaron con MeOH como solvente utilizando una bomba isocrática, correspondiente a un equipo de HPLC 1100 Series (Agilent Technologies).

Las columnas fueron utilizadas en los siguientes equipos:

-Se usó un sistema de HPLC capilar de Agilent (serie 1200, Waldbronn, Alemania), constituido por un desgasificador (Agilent G1379B), una bomba capilar (G1376A) que proporciona un flujo primario que luego se divide por una válvula proporcional electromagnética (EMPV, G1361-60000), un sensor de flujo capilar (tasa de flujo máximo,  $20 \mu\text{L min}^{-1}$ ), un inyector automático (G1377A, 1260 serie infinity) con un dispositivo de medición de micro volúmenes que proporciona inyecciones de 0,01 a 8  $\mu\text{L}$  con el bucle capilar estándar instalado, y un DAD (G1315C) con una celda de cuarzo de 80 nL (6 mm de longitud de camino óptico).

-Se usó un sistema de nano HPLC de Agilent (serie 1200, Waldbronn, Alemania), con una bomba nano (G2226A).

-Un equipo HPLC Agilent Series 1100 con sistema de bomba binario y detector con detección UV-Vis DAD (260 nm) modificado con un divisor de flujo modelo P470 (Upchurch, Chromtech, USA) y una válvula de seis vías MXT Series II (Rheodyne, IDEX, USA), equipada con un adaptador para micro inyección M432 (Rheodyne, IDEX, USA), un filtro de PEEK en línea de porosidad 0,5  $\mu\text{m}$  (Upchurch, IDEX, USA), y un lazo de inyección (loop) construido en nuestro laboratorio de aproximadamente 34 nL realizado con un capilar de sílica fundida de 25  $\mu\text{m}$ .

Se utilizó un freezer Balay (BSH Electrodomésticos, Zaragoza, España) tanto para la conservación de los reactivos y muestras, como para mezclas de polimerización a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

-Los experimentos de CEC, se realizaron en un equipo HP3DCE (Agilent) equipado con un detector UV de arreglo de diodos. El equipo está presurizado en ambos extremos del capilar con un suplemento externo de nitrógeno. La

adquisición de datos se realizó con el programa ChemStation (Rev.A.10.01, Agilent).

La caracterización de los monolitos se realizó en un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 200, del Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física, LIMF), y un analizador de fisisorción Micromeritics (ASAP 2020 v3, perteneciente al CINDECA, Facultad de Ciencias Exactas).

### **III.2.3. Soluciones**

Con precisión analítica se pesaron los distintos aminoácidos para preparar soluciones madres por separado de cada uno de ellos en HCl 0,1 M (concentración final 10,5 mM). Luego se realizaron las diluciones necesarias.

Las reacciones de derivatización se desarrollaron tal como se describen en la sección I.2.2.

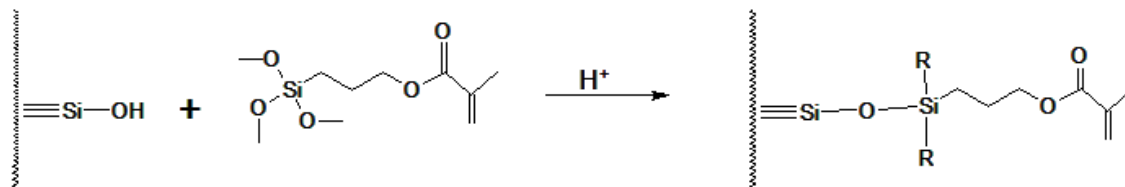
Se prepararon soluciones de estándares de cuatro alquil bencenos (tolueno, etil, propil y butil benceno) individualmente y una mezcla de los mismos. Se realizó el mismo procedimiento para tres compuestos ionizables (fenol, 4-clorocresol y 4-cloroanilina). Cada una de ellas en una concentración aproximada de 200 ppm. Se utilizó tiourea como marcador de tiempo muerto, del cual se preparó una solución madre de 500 ppm.

## **III.3 RESULTADOS**

### **III.3.1. Preparación de la columna monolítica**

El pre-tratamiento de la superficie interna de los capilares con el fin de anclar el monolito covalentemente a la pared. Consistió en la silanización de grupos –SiOH superficiales (Figura III.2.). La técnica consiste en hacer reaccionar los silanoles con 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato, de manera de funcionalizar con

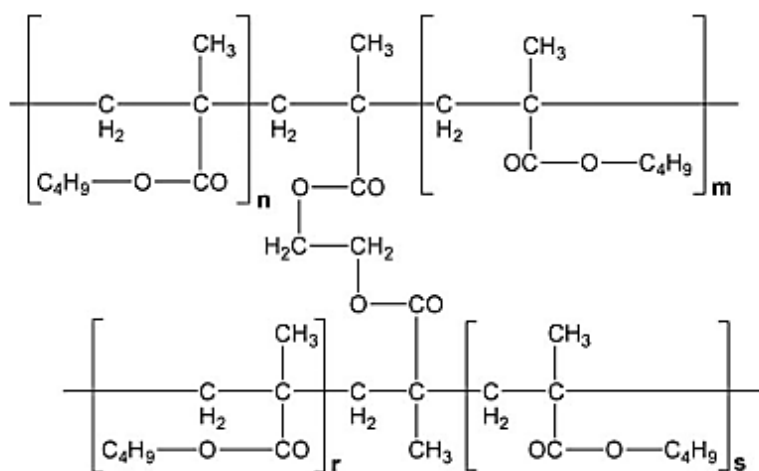
grupos metacrílicos, los cuales luego reaccionarán con los componentes de la mezcla polimérica en la etapa de la polimerización.



**Figura III.2.** Reacción de silanización en la pared del capilar de sílice fundida.

Las reacciones consistieron en hacer pasar sucesivamente por el capilar las siguientes disoluciones a un caudal aproximado de  $200 \mu\text{L min}^{-1}$ : acetona, agua, NaOH 0,2 M hasta pH básico (30 min), agua, HCl 0,2 M hasta pH ácido (30 min), agua, etanol pH 5, disolución del reactivo silanizante al 30 % p/v en etanol pH 5, y finalmente acetona. Luego, se aplicó una corriente de nitrógeno para secar el capilar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró de la fuente de nitrógeno, sellándose los extremos del capilar con septas de goma hasta su posterior uso.

En los capilares pretratados se sintetizaron monolitos por polimerización de diferentes mezclas de monómeros y solventes porogénicos. Las mezclas consistieron de un monómero funcional (lauril acrilato (LA) o butil metacrilato (BMA)), un agente entrecruzante (etilenglicol dimetacrilato (EDMA) o diacrilato de 1,3-butanodiol (BDDA)) y una mezcla de dos o más solventes formadores de poros (propanol, 1,4-butanodiol y agua, este último solo se usó para las mezclas con BMA), empleando como iniciador radicalario para polimerización térmica azo-bisisobutironitrilo (AIBN) o lauril peróxido (LPO). La Figura III.3. muestra la estructura química general de un monolito de BMA entrecruzado con EDMA.



**Figura III.3.** Estructura química de un polímero metacrílico entrecruzado con EDMA.  $n$ ,  $m$ ,  $r$  y  $s$ , corresponden a las diferentes longitudes de las unidades repetitivas.

En los casos de polimerizar el capilar para determinaciones por CEC se agregó a la mezcla de monómeros, un monómero cargado positiva o negativamente tal que facilite posteriormente la generación del flujo electrosmótico (EOF) por aplicación de un campo eléctrico. Se usó como monómero cargado positivamente el cloruro de [2-(metacriloxi)etil]-trimetil amonio (META) y el ácido de 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico (AMPS) como monómero cargado negativamente.

La mezcla de polimerización se preparó por pesada de cada uno de los analitos en una balanza analítica ubicada bajo campana. Posteriormente la mezcla se colocó en un baño de ultrasonidos durante un periodo de 10 min. Finalmente se coloca el recipiente bajo burbujeo de nitrógeno (para eliminar burbujas y aire como principal interferente en la polimerización), para finalmente proceder al relleno de capilares o almacenamiento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La polimerización se inició térmicamente en estufa o por radiación UV. Este proceso dependió principalmente del tipo de capilar que se usará para rellenar, y del tiempo disponible para la realización del mismo, dado que para la iniciación térmica son necesarias 24hrs, y para la iniciación por radiación UV solo 10 min de reacción a  $9 \times 10^6\text{ }\mu\text{J cm}^{-2}$  son suficientes para este tipo de

mezclas poliméricas empleadas. Se usaron capilares transparentes (sin capa externa de poliimida) de 100  $\mu\text{m}$  para la iniciación por radiación UV, y capilares normales (de silica fundida con cubierta protectora) de 100, 250 y 500  $\mu\text{m}$  para iniciación térmica.

La longitud de capilar necesario es dependiente de la técnica en que se va a emplear, pero siempre tiene que prepararse más de lo que se quiere como longitud efectiva (relleno) para asegurarse que esté todo polimerizado, ya que generalmente los extremos pueden quedar vacíos durante la manipulación en el sellado con septas. Para cromatografía líquida se sintetizaron los monolitos en trozos de 16 cm para trabajar luego con columnas de 15 cm. En tanto, para CEC, se trabajó relleno 8,5 cm de capilar de un total de 33,5 o 25 cm de un capilar de la misma longitud final. El volumen de capilar relleno se fijó dependiendo principalmente de los analitos a analizar, del monómero generador de flujo electrosmótico, y de la polaridad a la que se trabaje en el sistema.

El primer análisis que se lleva a cabo tras la síntesis es el de su permeabilidad. Este es un estudio visual sencillo que se realiza durante el lavado de la columna monolítica con MeOH, a diferentes caudales para comprobar si los caudales y presiones son cromatográficamente razonables, teniendo en cuenta la viscosidad. El fin de este lavado, es principalmente eliminar todo resto monomérico o de solvente que pueda haber quedado ocluido en el monolito.

Para caracterizar cada columna se estudiaron tres aspectos principales:

- + El efecto de las distintas proporciones de agente formador de macro-poros sobre la morfología y su tamaño,
- + La relación de monómero/agente entrecruzante para una relación de solvente porogénico dado, y
- + La relación monómero/solvente porogénicos. Para esto los monolitos fueron evaluados cualitativamente por microscopía de barrido electrónico (SEM) y se caracterizó su permeabilidad por cromatografía.

### III.3.2. Permeabilidad cromatográfica

Las propiedades de flujo de las diferentes columnas monolíticas fueron evaluadas por determinación de la permeabilidad  $\beta$ , que se obtiene de la relación entre presión y velocidad (ecuación integrada de D'arcy):

$$\beta = \frac{uL\eta}{\Delta P} \quad (1)$$

Donde  $u$  es la velocidad lineal de la fase móvil,  $L$  es la longitud de la columna,  $\eta$  la viscosidad de la fase móvil a la temperatura de trabajo, y  $\Delta P$  la caída de presión en el sistema.

Este factor solo se determinó en las columnas que mostraron una permeabilidad suficientemente alta durante el lavado (las cuales no incrementaban mucho la caída de presión en el sistema). Para medir los flujos se determinó la masa de fase móvil acumulada durante un período de tiempo dado, y se la convirtió a volumen por medio de su densidad a la temperatura de trabajo.

### III.3.3. Caracterización morfológica

Los rellenos monolíticos fueron analizados a través de dos técnicas diferentes. Se tomaron fotografías por microscopía de barrido electrónico (SEM), para caracterizar la superficie y tipos de poros del monolito; y se desarrollaron isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno (BET), para realizar una caracterización más precisa del sólido poroso.

Se utilizó SEM con el fin de observar si el monolito estaba bien adherido a la pared del capilar, como así también para determinar la morfología del mismo. Para la obtención de las imágenes se utilizó el modo de alto vacío. Se cortaron secciones de aproximadamente 0,5 cm de las columnas a estudiar, y se las insertó verticalmente en septas de goma para poder analizar la sección



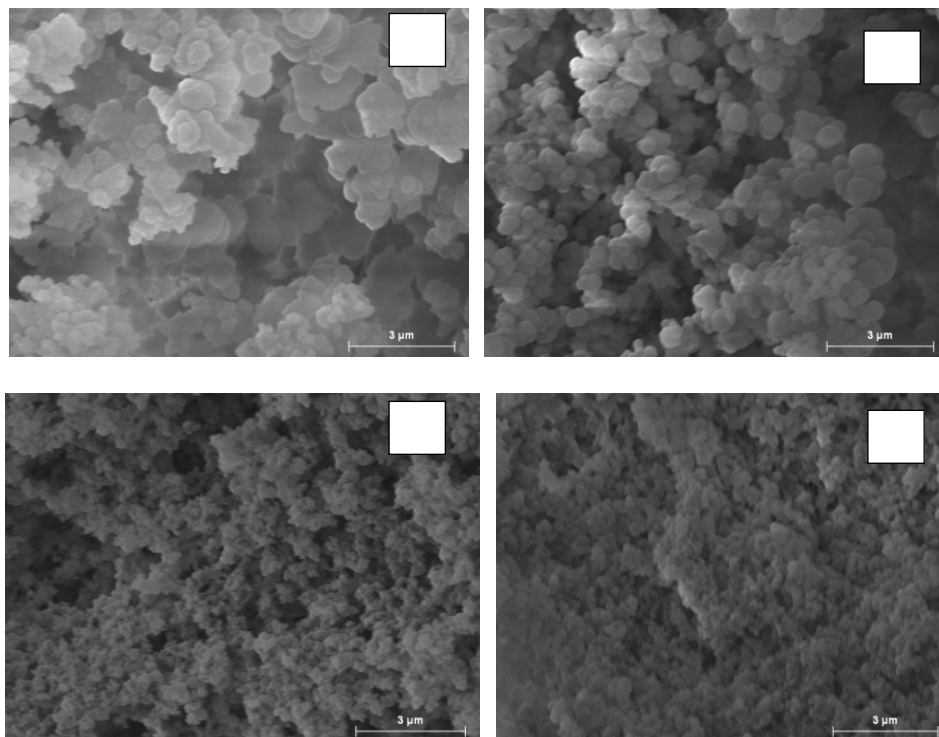
transversal del lecho cromatográfico. Posteriormente fueron cubiertas con una fina capa de oro, para permitir obtener imágenes de mejor calidad. Los análisis se hicieron con aumentos de 1000X y 9000X, permitiéndonos medir el diámetro de los poros, con el fin de comparar la porosidad de las diferentes columnas.

En el caso del BET nos permitió conocer el tamaño de los poros y el área superficial del relleno, pero con la desventaja de realizarse en el estado seco. Los polímeros monolíticos entrecruzados, tienen la particularidad de “hincharse” en presencia de mezclas hidro-orgánicas, lo que le confiere un pequeño cambio en la morfología respecto al estado seco. Esta diferencia entre la forma de caracterización y aquella presente durante la aplicación es una de las desventajas, aún no resueltas, para la caracterización del polímero ya que los datos medidos en estado seco pueden no reflejar la realidad de tamaño de poro bajo las condiciones operativas de los capilares durante el proceso cromatográfico

*-Monolitos para su aplicación en RP-HPLC:*

Para las diferentes mezclas se variaron las composiciones de las mismas y se obtuvieron los siguientes resultados.

*i) Efecto del contenido de 1,4-butanodiol*



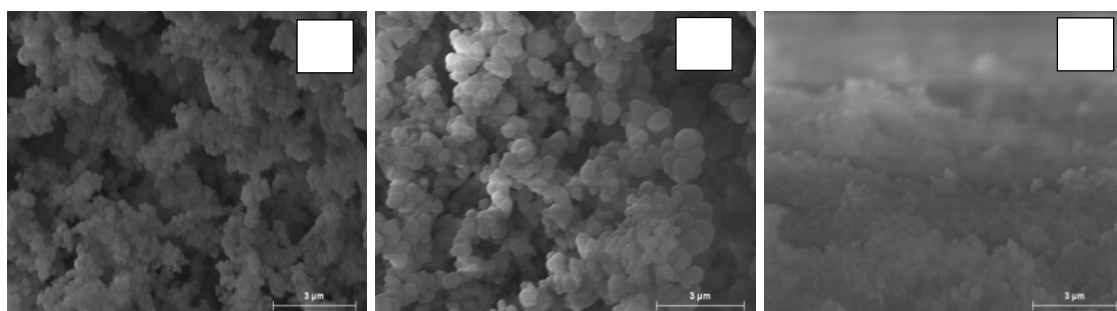
**Figura III.4.** Imágenes SEM de rellenos monolíticos conteniendo diferentes cantidades de 1,4-butanodiol en la mezcla polimérica y relación constante 60/40 monómero/entrecruzante. A) 18, b) 10, c) 8 y d) 5 % en peso respecto del total de la mezcla. Columnas de 15 cm x 300 µm.

En los cuatro rellenos que se muestran en la Figura III.4 la mezcla de solvente porogénico usada contenía agua. A través de las imágenes obtenidas por SEM, se observó el efecto de la cantidad de macroporógeno (1,4-butanodiol) en el solvente porogénico. Como se observa, el tamaño de glóbulo en la *Figura III.4.a* es mucho mayor que las otras tres, logrando que la columna tenga canales más grandes en su interior y en consecuencia una mayor permeabilidad. La mezcla de 5 % de 1,4-butanodiol (*Figura III.4.d*) resultó ser

de muy baja permeabilidad para fines prácticos, dado que los valores de presión alcanzados superaban los 150 bares sin tener flujo a la salida del capilar. El tamaño de glóbulo más grande trae como consecuencia una menor área superficial, lo que conlleva a una situación de compromiso final entre permeabilidad y eficiencia.

Teniendo en cuenta el análisis de permeabilidad y para continuar con el análisis del efecto de las otras variables sobre la morfología del lecho, se seleccionó la mezcla que contenía un 10 % de 1,4-butanodiol.

### *ii) Relación monómero/agente entrecruzante*

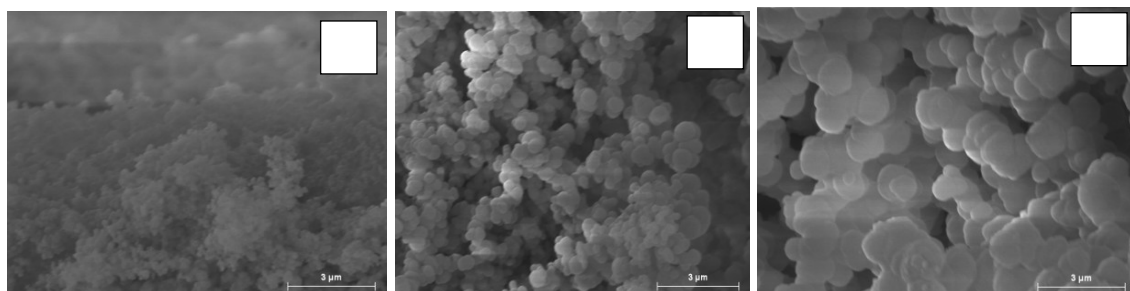


**Figura III.5.** Imágenes SEM de rellenos monolíticos conteniendo diferentes relaciones monómero/entrecruzante y un 10 % de 1,4-butanodiol en la mezcla polimérica. A) 50/50, b) 60/40, y c) 70/30.

Las tres imágenes de la Figura III.5. muestran el comportamiento esperado para las diferentes relaciones de monómero/entrecruzante. Una menor cantidad de monómero entrecruzante produce una estructura menos rígida, cuyos macroporos son pequeños, como así también lo son sus glóbulos. Como consecuencia, una menor cantidad de entrecruzante produce una disminución significativa en la permeabilidad del lecho cromatográfico.

En base a los resultados obtenidos de permeabilidad, se mantuvo la relación de 60/40 (monómero/entrecruzante), y se procedió a modificar la última variable en la composición de la mezcla, que corresponde a la relación entre monómeros y solvente porogénico.

### iii) Relación monómeros/solvente porogénico



**Figura III.6.** Imágenes SEM de rellenos monolíticos conteniendo diferentes relaciones monómero/solvente porogénico, un 10 % de 1,4-butandiol en la mezcla polimérica y una relación monómero/entrecruzante de 60/40. A) 30/70 (0,43), b) 40/60 (0,67), y c) 50/50 (1).

Las tres imágenes de la Figura III.6. muestran que un aumento en la relación entre ambos produce un monolito con un glóbulo de mayor tamaño, lo que reduce así el área específica de los poros, y consecuentemente la retención de los analitos. Pero como puede verse en la Figura III.6.c, los canales del lecho alcanzan un gran tamaño, lo que le confiere una mayor permeabilidad a la fase móvil.

La tabla III.2 muestra los valores de permeabilidad de las 3 columnas seleccionadas para la caracterización. El estudio se realizó a una composición 40/60 H<sub>2</sub>O/ACN en un rango de caudales de 10 a 60  $\mu\text{L min}^{-1}$ .

En complemento a la caracterización por SEM, se realizaron estudios para determinar el área superficial, tamaño y volumen de poro, como así también la distribución de tamaño para las tres mezclas poliméricas seleccionadas en los puntos i, ii e iii de esta sección del capítulo. Los resultados se detallan en la tabla III.2.

**Tabla III.2.** <sup>a</sup> Área superficial total luego de aplicar BET (Brunauer–Emmet–Teller) basado en poros entre 1 y 300nm. <sup>b</sup> volumen de poro específico aplicando BJH ( Barrett–Joyner–Halend) basado en poros entre 1-300 nm. <sup>c</sup> Se estudió en un rango de F2 de 10 a 60  $\mu\text{L min}^{-1}$  a una composición de fase móvil 60/40 ACN/H<sub>2</sub>O.

Referencia (Figura)	Área superficial (m <sup>2</sup> /g) <sup>a</sup>	Volumen de poro (cm <sup>3</sup> /g) <sup>b</sup>	Diámetro de poro (nm)	Permeabilidad $\beta$ (x 10 <sup>-14</sup> m <sup>2</sup> ) <sup>c</sup>
i)b)	62,4	0,27	17,1	1,1
ii)a)	75,4	0,31	16,3	0,2
iii)c)	50,5	0,24	19,3	0,03

Los resultados de BET, se pueden comparar con las imágenes SEM, principalmente los datos de área superficial. La mezcla cuya relación monómero/agente entrecruzante es de 50/50 ( ii-a ) es la que posee un área superficial mayor, pero un glóbulo y macroporos más pequeño, proporcionando una permeabilidad baja.

En base a todos los cambios realizados para cada una de las variables en la composición de la mezcla polimérica, se optó por la aplicación cromatográfica de un monolito con las siguientes relaciones: 10% de 1,4-butanodiol en la mezcla, relación monómero/entrecruzante 60/40, y relación monómero/solvente porogénico 40/60. Este monolito es empleado para su uso separativo en la sección III.3.3.8 de este capítulo, y sus principales características se detallan en la tabla III.2.

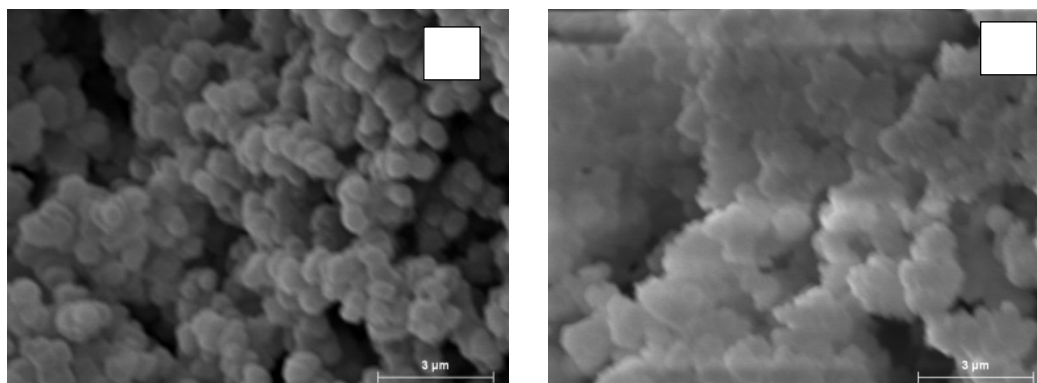
#### - Mezclas poliméricas para su aplicación en CEC

Para los diferentes ensayos de CEC se desarrollaron 2 tipos de mezclas. Una conteniendo una carga neta positiva (META) y otra negativa (AMPS). A partir de las mismas se desarrollaron columnas rellenas de 25 y de 8,5 cm de camino efectivo de relleno, con el fin de realizar los dos tipos de inyecciones posibles.

De los dos tipos de materiales se obtuvieron los siguientes resultados de caracterización:

i) Mezcla con AMPS como generador de EOF

Como punto de partida se seleccionó la composición de la mezcla que se optimizó para HPLC, con la diferencia que se adicionó un 0,5 % en peso del monómero AMPS respecto del total de la mezcla. Se ensayaron dos monómeros funcionales diferentes, BMA y LA (lauril acrilato). La Figura III.7 muestra las imágenes SEM de la sección transversal de las columnas capilares obtenidas luego de la polimerización por 20 horas a 60 °C.



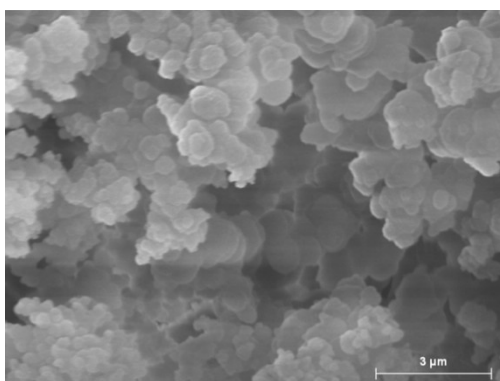
**Figura III.7.** Imágenes SEM de rellenos monolíticos conteniendo 10 % de 1,4-butanodiol en la mezcla polimérica y una relación 60/40 monómero/entrecruzante constante. 0,5 % de AMPS en la mezcla. a) LA b) BMA.

En la Figura III.7.a. se muestra la imagen SEM de la mezcla que contenía LA, y una mezcla porogénica binaria de 1,4-butanodiol y n-propanol. Esta columna resultó de buena permeabilidad al lavado con MeOH, pese a que este no es un factor relevante en CEC, ya que la fase móvil no circula por efecto de la presión, sino por la aplicación de un campo eléctrico.

En el caso de la Figura III.7.b corresponde a una mezcla de BMA con la misma cantidad de 1,4-butanodiol (10 %), pero cuyos solventes porogénicos fueron una mezcla ternaria que contenía agua en un 5 %. De la comparación de estos dos monolitos desarrollados, se puede observar que el tamaño del glóbulo es mucho menor para el que contiene BMA respecto de una de LA. Este efecto puede atribuirse a que es mayor la contribución del agua como agente porogénico (macroporógeno), que la hidrofobicidad de la cadena alquílica del monómero funcional (12 para el lauril en lugar de 4 grupos metílicos de BMA). Es por esto que, en consecuencia, el monolito de LA resulta más permeable, aunque con una menor área superficial, siendo de  $65,1\text{m}^2\text{ g}^{-1}$ , respecto de  $82\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$  para la de BMA.

ii) Mezcla con META para generar el EOF.

Para obtener un método tal de poder trabajar con un generador de EOF cargado positivamente, el polímero formado consistió en la mezcla base de las mismas características porcentuales que aquellas obtenidas para HPLC. De esta manera el monómero funcional seleccionado fue BMA. A continuación se muestra la imagen SEM de la mezcla óptima polimerizada en un capilar de sílice fundida de  $100\text{ }\mu\text{m}$  con el fin de emplearlo en CEC:



**Figura III.8.** Imágenes SEM de relleno monolítico BMA-co-EDMA-co-META conteniendo 10 % de 1,4-butanodiol en la mezcla polimérica, una relación 60/40 monómero/entrecruzante y relación 40/60 monómeros/solvente porogénico.0,5 % de META en la mezcla.

La Figura III.8 muestra la foto SEM, del monolito polimérico seleccionado para los experimentos en CEC. Este relleno fue caracterizado por isothermas de adsorción de nitrógeno, donde se obtuvieron valores de área superficial de  $77 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

### III.3.4. APLICACIÓN EN CEC

#### Localización de pico en CEC

El comportamiento de migración de compuestos cargados en CEC es el resultado de la contribución electroforética y la retención cromatográfica. Dada la complejidad de estas dos contribuciones simultáneas, no hay definido un factor de retención electrocromatográfico único que proporcione un significado amplio y con carácter fisicoquímico bien definido [125].

Para los siguientes análisis, se tomó el parámetro de medición de la posición de pico  $k''_{cc}$  [126], que se expresa en la ecuación 1. Este parámetro, que tiene un formalismo cromatográfico, ha sido propuesto en la literatura para CEC.

$$k''_{cc} = \frac{t_m - t_0}{t_0} \quad (2)$$

Donde  $t_m$  tiempo de migración del analito y  $t_0$  tiempo de migración de un marcador neutro e inerte.

Así como el factor de retención  $k$  en HPLC,  $k''_{cc}$  sirve como un “localizador de pico” y puede utilizarse para la evaluación de varios parámetros de separación como la selectividad y la resolución. A su vez este parámetro puede ser positivo o negativo cuando la velocidad electroforética de migración de un analito es co-direccional o contra-direccional al EOF, respectivamente.



## Resultados

La evaluación electrocromatografica del monolito se realizó con una muestra de estándares de citrulina y los aminoácidos derivados. Se derivatizó una mezcla de los 6 aminoácidos y a cada uno de ellos individualmente, y se preparó un blanco de reacción para determinar los interferentes proporcionados por los reactivos y matriz. Las primeras dos reacciones se realizaron a una concentración de 300  $\mu\text{M}$  de AAs<sup>T</sup> en la mezcla.

Como punto de partida, se seleccionó como fase móvil una mezcla de ACN y un buffer común para CEC, el *tris*/HCl a pH 8 con una concentración de 5mM.

### a) Empleo de AMPS

La síntesis del monolito usando este monómero con carga negativa no aportó resultados positivos para un desarrollo de método bajo esta modalidad. Para ambas condiciones de inyección y relleno de fase estacionaria (extremo corto y largo), no hubo buena reproducibilidad y en varias condiciones no fue posible la detección de los analitos. Estos resultados motivaron al empleo de META como generador del EOF.

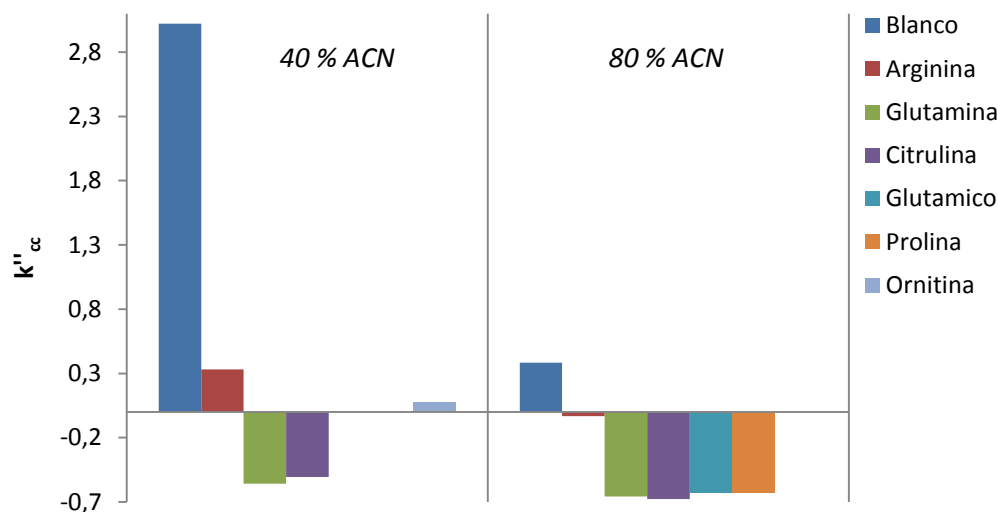
### b) Empleo de META

Este generador de EOF positivo aportó a la separación mejores resultados, pero solo cuando se realizó la inyección por el extremo corto del capilar (bajo polaridad negativa).

El estudio de las diferentes variables para la separación electrocromatográfica de los diferentes derivatizados de FMOC incluyó:

i) EFEECTO DEL %ACN A pH 8

Se usó buffer tris/HCl 5 mM a pH 8, y se realizó el análisis electrocromatográfico a dos composiciones de fase orgánica 40 y 80 %ACN.



**Figura III.9.**  $k''_{cc}$  vs % ACN de los seis aminoácidos. Columna: BMA-META-EDMA de 33,5 cm x 100  $\mu$ m (8.5 cm de relleno). Fase móvil: 60/40 y 20/80 buffer tris/HCl 5 mM a pH 8 / ACN.  $\Delta V$  aplicado 20 kV,  $i = 10$  y 24,3  $\mu$ A a 40 y 80 % ACN respectivamente, inyección 5 kV por 3 seg. Detección a 260 nm.

Como se observa en la Figura III.9. la retención de los aminoácidos es muy pobre y la separación entre ellos a una misma composición, tanto baja como rica en acetonitrilo, fue incompleta. La resolución más comprometida se presenta entre los pares Cit-Gln y Glu-Orn-Pro a 40 %ACN. La ausencia de Pro y Glu en la representación del gráfico de barras a 40 % se debe a que el Glu eluyó (migró) muy rápido dando un  $k''_{cc}$  de 0,08, y la Pro no pudo detectarse bajo estas condiciones experimentales.

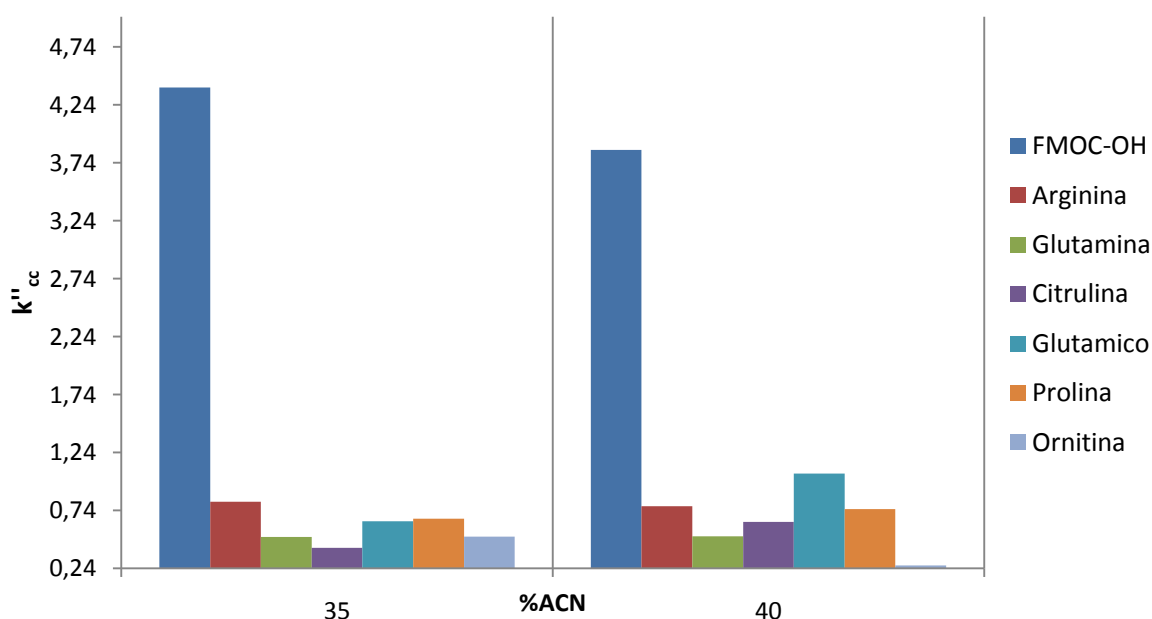
Los valores negativos en  $k''_{cc}$  se deben a que son valores relativos al tiempo de retención que adquiere la tiourea como marcador del EOF. A pH 8 la mayor parte de los aminoácidos está cargado negativamente (grupos carboxilatos), lo que genera una velocidad de migración superior a la del EOF poniendo en

evidencia de esta manera, la baja contribución a la retención hidrofóbica de estos analitos en particular.

Finalmente, lo que se obtuvo es una separación del tipo co-contradireccional, la cual es común en muestras que contengan componentes con diferentes cargas y/o neutros.

### ii) EFEECTO DEL % ACN A pH 4

Se usó para el análisis buffer acetato de sodio 5 mM, y se estudió la retención de los seis aminoácidos y el FMOC-OH (blanco) a 35 y 40 %ACN. Los porcentajes de solvente orgánico fueron reducidos para buscar el incremento en la retención hidrofóbica, respecto a la influencia de las movilidades.



**Figura III.10.**  $k''_{cc}$  vs % ACN de los seis aminoácidos derivatizados. Columna: BMA-META-EDMA de 33,5 cm x 100  $\mu$ m (8,5 cm de relleno). Fase móvil: 65/35 y 60/40 acetato de sodio 5 mM a pH 4 / ACN.  $\Delta V$  20 kV,  $i = 20,3$  y  $16,8 \mu$ A para 35 y 40 % ACN respectivamente, inyección 5 kV por 3 seg. Detección a 260 nm.

Si se compara respecto al estudio con buffer tris/HCl a pH 8 (Figura III.9.), se puede observar en la Figura III.10 que la retención fue mayor, para 40 %ACN a pH 4 y que la resolución global entre los diferentes pares críticos fue un 80 % mayor (Figura III.12). Sin embargo usando este sistema de fases móviles en ambas composiciones tampoco se logra una resolución aceptable y completa de los seis aminoácidos. Para 35 %ACN hay muchos pares críticos que presentan valores de  $k''_{cc}$  muy cercanos, mientras que para la composición de 40 %ACN, el par crítico más comprometido es Arg-Pro.

El efecto de la composición de solvente orgánico en la fase móvil influye considerablemente en la velocidad del EOF a través de la relación entre la permitividad y la viscosidad, como lo establece la ecuación de Smoluchowski:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta E}{\eta} \quad (3)$$

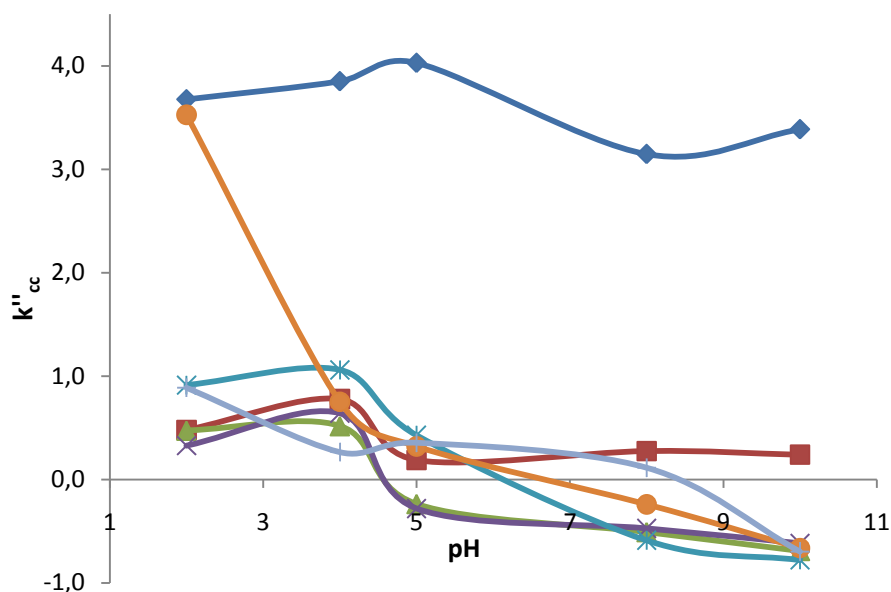
donde  $\varepsilon_0$  es la permitividad en el vacío,  $\varepsilon_r$  la constante dieléctrica del solvente,  $\zeta$  es el potencial zeta,  $E$  el potencial aplicado, y  $\eta$  la viscosidad.

Cabe destacar que la velocidad del EOF también depende de la densidad de carga de la superficie, la fuerza iónica del buffer y la temperatura. Estos factores también han sido evaluados y se discuten a continuación.

### *iii) $k''_{cc}$ vs pH a 40 %ACN*

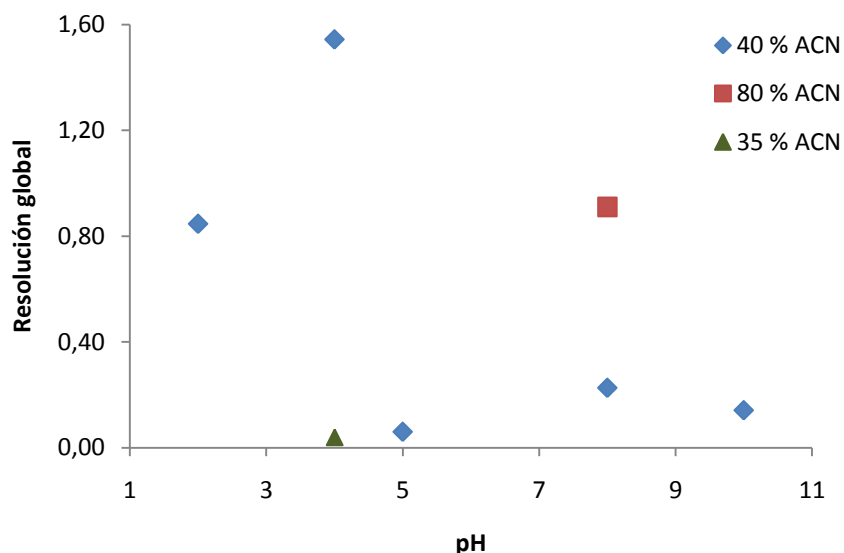
Este estudio se realizó con la finalidad de encontrar el pH óptimo. Para estas medidas se seleccionó una composición de fase móvil de 40 %ACN (de acuerdo a los resultados previos), y se variaron las diferentes soluciones reguladoras a una concentración 5 mM, empleándose borato de sodio pH 10, tris/HCl pH 8, acetato de sodio pH 4 y 5, y fosfato de sodio pH 2. De esta manera se determinó la retención y resolución global de los analitos en función del pH del buffer, tal como se muestra en las Figura III.11 y III.12

respectivamente. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado, obteniéndose valores de % RSD entre 0,8 y 4%.



**Figura III.11.**  $k''_{cc}$  vs pH de los seis aminoácidos. Columna: BMA-co-META-co-EDMA de 33,5 cm x 100  $\mu$ m (8,5 cm de relleno). (◆) Fmoc-OH, (■) Arg, (●) Pro, (▲) Gln, (✱) Glu, (Φ) Orn y (x) Cit. Fase móvil: 60/40 buffer 5 mM (a distintos pH) / ACN.  $\Delta V$  20kV. Las corrientes de los 5 pHs fueron 21,4; 16,8; 14; 10 y 7,8  $\mu$ A, inyección 5 kV por 3 seg. Detección a 260 nm.

De los resultados experimentales de  $k''_{cc}$  con el pH se pueden establecer tres conclusiones importantes: 1- El par crítico en todo el rango de pH es Gln-Cit, siendo pH 4 el más aceptable para dicho par, con una resolución de 1,1; 2- El aumento de pH produce una disminución en la retención de todos los AAs bajo las condiciones de separación establecidas, 3- Hay una muy baja contribución de retención hidrofóbica para este tipo de fase estacionaria desarrollada a base de metacrilatos.

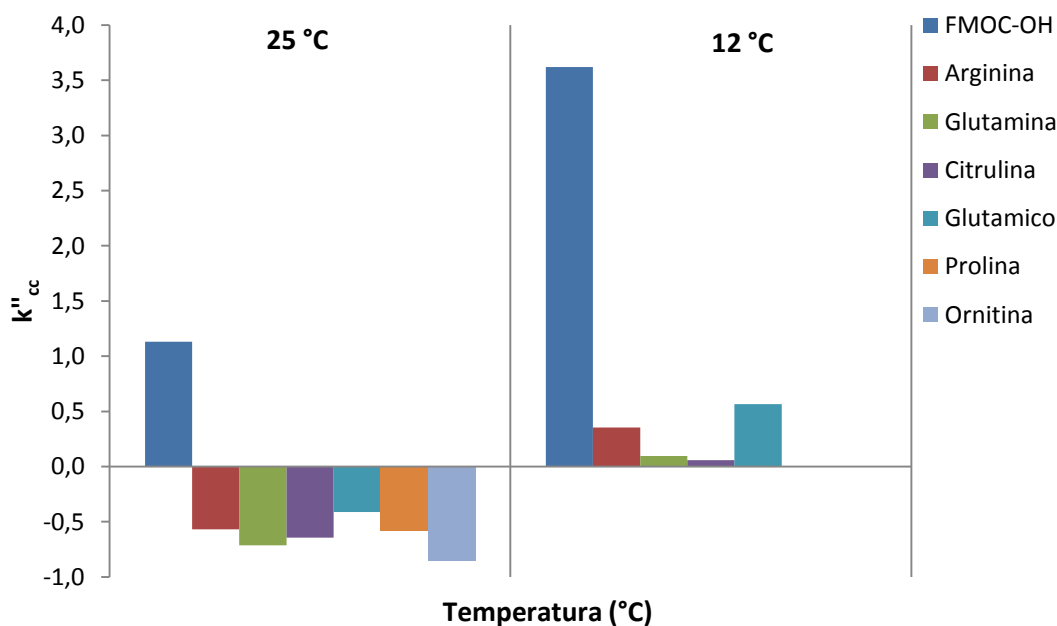


**Figura III.12.**  $R_{sG}$  vs pH de los pares críticos de los seis aminoácidos para diferentes pH y composición porcentual de ACN. Columna: BMA-co-META-co-EDMA de 33.5 cm x 100  $\mu$ m (8,5 cm de relleno). Fase móvil: 60/40 buffer 5 mM (para los distintos pH se emplearon bufferes: borato pH 10, tris/HCl pH 8, acetato pH 4 y 5, y fosfato pH 2) / ACN.  $\Delta V$  20kV. Las condiciones se indicaron en la Figura III.12.

De las variables experimentales analizadas en la separación de los FMOC-AAs por CEC, se pudo determinar que la condición menos desfavorable es trabajar a pH 4 utilizando acetato de sodio 5 mM en una relación 60/40 %v/v con ACN.

#### iv) EFECTO DE LA TEMPERATURA

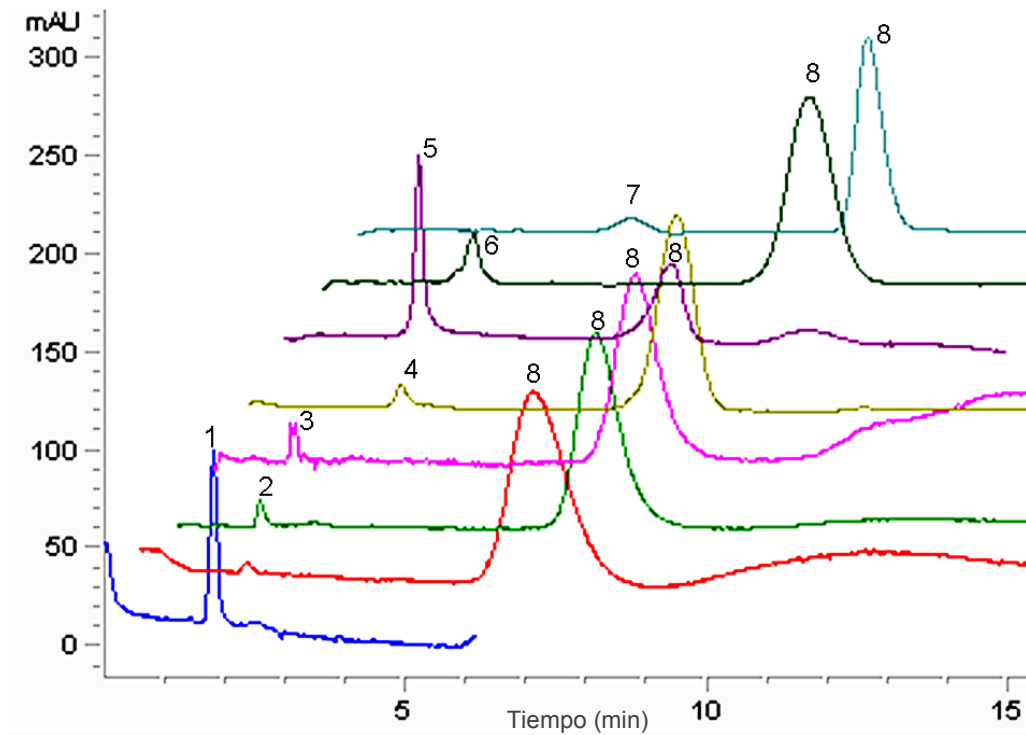
De los resultados obtenidos a diferentes composiciones de acetonitrilo, y de pHs, se optó por evaluar el efecto de la temperatura a 25 y 12 °C en la mejor condición obtenida de los análisis previos. Tal como se muestra en la Figura III.13, la reducción de la temperatura respecto a los análisis previos no produce ninguna mejora significativa en la resolución global de los aminoácidos, sino que solo aumenta proporcionalmente la retención de varios AAs, y otros como Pro y Orn no pudieron detectarse.



**Figura III.13.**  $k''_{cc}$  vs  $T$  para los seis aminoácidos. Columna: BMA-META-EDMA de 33,5 cm x 100  $\mu$ m (8.5 cm de relleno). Fase móvil: 60/40 buffer acetato pH 4, 5 mM a 25 y 12 °C. Potencial aplicado  $\Delta V$  20kV,  $i$ = 3,3 y 16,8  $\mu$ A para 12 y 25 °C respectivamente, inyección 5 kV por 3 seg. Detección a 260 nm.

En complemento a estos resultados, las determinaciones realizadas con el cambio de la fuerza iónica (concentración del buffer) y el porcentaje de monómero generador de EOF no produjeron ninguna mejora significativa para el desarrollo del método.

De este estudio y los resultados obtenidos se concluye que mediante el empleo de estas columnas monolíticas metacrílicas en CEC, no se logró una separación aceptable de los Fmoc-aminoácidos, tanto desde el punto de vista retentivo como para la resolución. Una de las principales causas puede atribuirse a las bajas áreas superficiales alcanzadas con las distintas mezclas poliméricas (un máximo de 85 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). La Figura III.14 muestra los ocho electrocromatogramas superpuestos (en *off-set*), para una de las mejores condiciones alcanzadas, empleando buffer acetato 5 mM pH 4 / ACN, en relación 60/40 %v/v.



**Figura III.14.** Electro cromatogramas individuales de los aminoácidos, el blanco y tiourea. Columna: BMA-META-EDMA de 33,5 cm x 100  $\mu$ m (8,5 cm de relleno). Fase móvil: 60/40 buffer 5 mM acetato de sodio / ACN.  $\Delta V$  20kV. La corriente 16,8  $\mu$ A, inyección 5 kV por 3 seg. Detección a 260 nm. Identificación de picos: 1- tiourea, 2- Gln, 3- Cit, 4- Pro, 5- Glu, 6- Arg, 7- Orn y 8- Fmoc-OH.



### **III.3.5. APLICACIÓN EN NANO Y MICRO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**

La característica distintiva de estos sistemas respecto de un instrumento convencional es, no solo la miniaturización de sus dimensiones, sino también la introducción de un divisor y de un sensor de flujo en el sistema de bombas. Esto permite reducir los caudales a valores del  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; y obligan a que el sistema de inyección sea también reducido.

Para hacer uso de este tipo de sistemas se debe conocer en detalle su funcionamiento, principalmente como está coordinado el sistema de inyección con los giros de las válvulas para el paso de la fase móvil. Una sincronización óptima implica la coordinación entre: i) la inyección de la muestra y el tiempo de inicio del gradiente en el módulo de bombas, y ii) el movimiento de la válvula de inyección después de la entrada del pulso de muestra, es decir entre el canal que conecta la válvula de inyección con la columna. En definitiva, se debe considerar: a) el tiempo necesario para que el inicio del gradiente alcance el puerto que conecta la válvula con la columna y, b) el tiempo de retorno de la válvula de inyección a su posición inicial.

En este análisis, en primer lugar, se realizó una sincronización de ambos sistemas, micro y nano-LC para trabajar en elución en gradiente, en el cual se evaluaron los siguientes parámetros: el tiempo de retraso del gradiente, tiempo de giro de válvula para la inyección, y el inicio del tiempo del gradiente. Estos estudios se realizaron con y sin columna según fuese necesario.

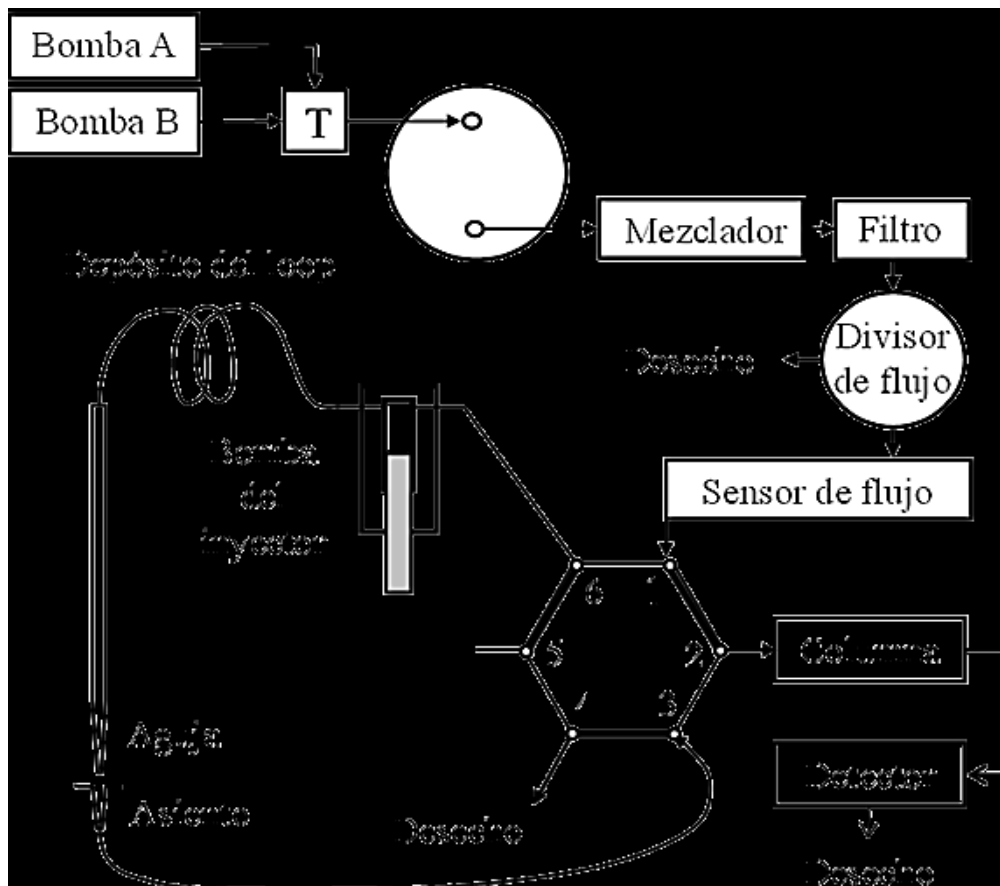
Una vez encontradas las mejores condiciones de sincronización del sistema, se compararon las separaciones de los seis aminoácidos de nuestro interés en una columna particulada y en una monolítica polimérica fabricada en el laboratorio.

#### **III.3.5.1. Observaciones preliminares y discusión**

En la Figura III.16. se muestra un esquema de los circuitos de flujo primario y secundario, su paso por el punto de mezcla (T) dentro del módulo de la bomba donde se genera un gradiente de fase móvil, la válvula divisora de flujo, la

válvula inyectora, y la columna hasta alcanzar la celda del detector. Este diagrama representa a sistemas micro, y también nano-LC, éstos solo difieren en los diámetros de los tubos conectores entre módulos y válvulas, y en los caudales de la válvula divisora de flujo, como el sensor electrónico. Los sistemas micro trabajan en un rango de caudales de  $0.01\text{--}20\ \mu\text{L min}^{-1}$  (cambiando el sensor de flujo puede ser extensible hasta  $100\ \mu\text{L min}^{-1}$ ), mientras que los sistemas nano, lo hacen en un rango de  $0.01\text{--}4\ \mu\text{L min}^{-1}$ .

El conocimiento exacto de los volúmenes de cada sector del sistema es necesario para la optimización de un gradiente. Los volúmenes de cualquier sistema de LC empezando desde la cámara de mezclado son relevantes en un gradiente de elución, dado que el retardo del gradiente (“delay volumen” DV, o “delay time” DT) incluye el volumen del sistema desde la cámara de mezclado hasta la cabeza de la columna. Esto es, desde el punto indicado como T en la Figura III.15, hasta la columna. En el caso de los sistemas reducidos estos volúmenes son significativamente más importantes en relación al tamaño de la columna que en el caso de usar columnas convencionales, y sumado a que los caudales son muy bajos, los tiempos asociados a la formación de un gradiente y comienzo en la cabeza de la columna pueden ser enormes. Con el fin de programar y sincronizar correctamente los distintos eventos que involucran movimientos de la válvula de inyección, se requieren transformar estos volúmenes extracolumna en datos de tiempos.



**Figura III.15.** Esquema de los sistemas micro y nano HPLC basado en la división (Split) de un flujo primario. T: es el mezclador de solventes. Dentro del divisor de flujo se encuentra el módulo denominado EMPV (Válvula proporcional electromagnética), encargado de censar el flujo y presión secundario.

A continuación se discuten en detalle los componentes principales del sistema:  
 A) Bomba, B) Inyector, y C) Columna.

A) Bomba con divisor de flujo.

El divisor de flujo recibe un caudal primario (F1) de eluyente del orden de los 200 – 1300  $\mu\text{L min}^{-1}$  que, dependiendo de la presión que detecta el sensor, cambia este caudal primario con el objetivo de asegurar un caudal secundario (F2) constante hacia la columna. El caudal F1, no es controlado por el operador. El operador selecciona entre tres rangos de caudal distintos posibles que ofrece el sistema operativo, pero no se conoce con exactitud el valor de F1

dentro de cada uno de esos rangos. Experimentalmente, se lo puede determinar, colectando el eluyente de ambos extremos del divisor de flujo, y midiendo el volumen total en un dado tiempo. La válvula divisora de flujo cambia este F1 en función de la presión que detecta el sensor. Sin embargo, este caudal F1 es alto como para que el tiempo que le demanda al gradiente recorrer desde el punto T a la válvula divisora de flujo sea razonablemente corto. La tabla III.3 y III.4 informan los valores de los volúmenes del instrumento nano-LC Agilent 1200 según la información brindada por el fabricante.

**Tabla III.3.** Los valores corresponden a los volúmenes que van desde el punto de mezcla (T) al divisor de flujo.

	Volumen estático [ $\mu\text{L}$ ]	Flujo primario, F1 [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Tiempo de retardo [s]
Capilar del mezclador	10		
Amortiguador	180		
Capilar amortiguador-filtros	6		
Filtro (100 $\mu\text{L}$ )	100		
Filtro (20 $\mu\text{L}$ )	20		
Filtro a divisor	6		
<b>TOTAL</b>	<b>322</b>	500	<b>38,6</b>

**Tabla III.4.** Los valores corresponden a los volúmenes que van desde el divisor al sensor de flujo.

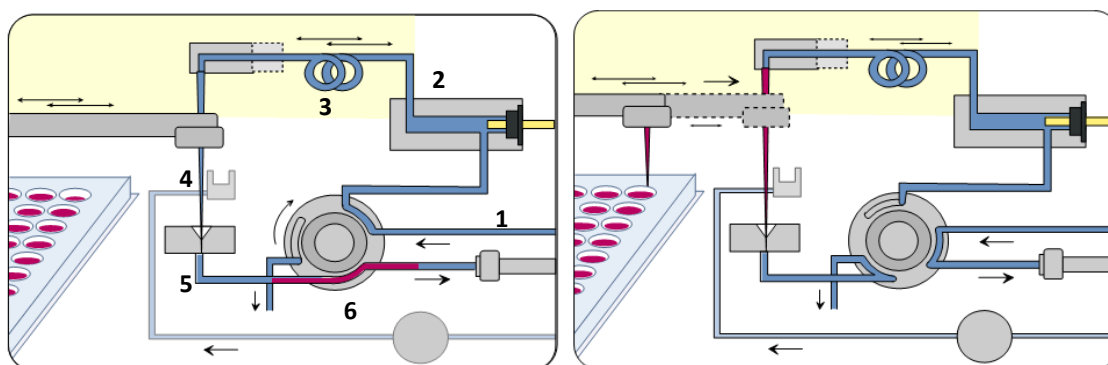
	Volumen Estático [ $\mu\text{L}$ ]	Flujo secundario, F2 [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	Tiempo de retardo [s]
Divisor	1		
capilar divisor - sensor	0,1		
Sensor de flujo (4 $\mu\text{L}$ )	0,15		
<b>TOTAL</b>	<b>0,35</b>	1	<b>21</b>

En base a este esquema, suponiendo un caudal  $F_1$  de  $500 \mu\text{L min}^{-1}$  medido, el tiempo que le demanda recorrer el volumen desde el punto T al divisor es de 38 segundos. Estos valores pueden cambiar en función de la presión, por lo que cada sistema (según columna y fase móvil empleados) tendrá un tiempo entre estas posiciones que será variable.

Como se puede observar en la tabla III.4, desde el divisor en adelante, el caudal es del orden de unos pocos  $\mu\text{L}$ . En este trabajo se fijó en  $1 \mu\text{L min}^{-1}$ , por lo que le debería demandar unos 20 segundos en recorrer el volumen comprendido entre el divisor de flujo y la salida del sensor.

### B) Válvula de inyección de seis puertos y dos posiciones.

Las dos posiciones que puede adquirir este tipo de válvulas durante su funcionamiento son “mainpass” (posición de inyección) y “bypass” (posición de carga), como se describen en el diagrama de la Figura III.16.



**Figura III.16.** Esquema del instrumento en las dos posiciones de la válvula: mainpass (izquierda) y en bypass (derecha). (1): capilar de conexión desde la bomba a la válvula, (2): “metering pump”, (3): lazo de inyección (loop), (4): aguja, (5): asiento de la aguja, (6): paso de conexión entre la válvula y capilar de entrada a la columna. Las flechas indican la dirección de flujo de la fase móvil de acuerdo a la posición de la válvula.

Las dos posiciones de la válvula, claramente tienen aportes de volúmenes muy diferentes. Las dimensiones de los capilares son relativamente pequeños en relación al lazo de inyección que mide 8  $\mu\text{L}$  para el sistema nano-LC y 40  $\mu\text{L}$  para el micro-LC. Así, por ejemplo para el sistema nano cuando está en mainpass los volúmenes a recorrer desde el sensor hasta la columna son del orden de 10  $\mu\text{L}$ , mientras que en el circuito en posición bypass es menor a 2  $\mu\text{L}$ . Es por esto que, una de las mayores contribuciones operacionales consiste en girar la válvula a bypass evitando que el gradiente atraviese el circuito mainpass, y evitar la reducción de la pendiente del gradiente por efectos de dilución en el sistema de inyección. De este modo, en este trabajo se hizo uso exclusivamente de medidas del tiempo de demora usando la válvula en modo bypass. Para este propósito la válvula debe retornar a la posición bypass luego de que la muestra haya sido inyectada. Se debe remarcar que antes de la llegada del frente del gradiente a la válvula, no hay diferencias en la composición de la fase móvil que llenan los circuitos de mainpass y bypass. Es por esto que la válvula puede cambiar a modo bypass a cualquier tiempo entre la inyección y la llegada del frente del gradiente al puerto de entrada de la válvula. A partir de esto, se define el tiempo de demora ( $t_{de}$ ) del gradiente, como el tiempo desde el inicio al momento en que se cambia la posición de la válvula.

### C) Columna cromatográfica.

Se empleó una columna de octadecilsilíce de 150 x 0,1 mm DI, rellena de partículas porosas de 3,5  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio. La reducción en el radio de la columna de más de 40 veces (de una columna convencional de 4,6 mm DI a una de 0,1 mm DI) tiene, al menos, dos implicancias inmediatas:

1) una reducción en el volumen de  $40^2 \sim 1600$  veces. Esto implica que el volumen de muestra a introducir ( $V_{iny}$ ) debe reducirse en el mismo orden. Esto es, un  $V_{iny} = 20 \mu\text{L}$  en la columna convencional representa un 1,1% del volumen de la columna y una inyección de 20 nL en la columna capilar representa un 2,4 % del volumen de capilar;

2) que existe una relación muy distinta entre los volúmenes de los tubos de conexión con los de la columna. Esto se trata de datos relevantes para la formación de un gradiente. Para una columna convencional, los volúmenes de los tubos de conexión respecto de las columnas representan aproximadamente un 0,2 % y si se suma un lazo de inyección de 100  $\mu\text{L}$  y un mezclador de 35  $\mu\text{L}$  (los aportes de los otros volúmenes son mucho menos importantes), estos constituyen un 8 % respecto al volumen de la columna. El tiempo de demora en este caso (dependiente principalmente del volumen del lazo y del mezclador) podrá ser de unas decenas de segundos hasta unos pocos minutos, dependiendo del caudal de trabajo fijado en el sistema.

En el caso del equipo nanoLC, se estima un volumen hasta la columna de 1,7  $\mu\text{L}$  (medido con acetona) con la válvula en posición "bypass", lo cual es aproximadamente el doble del volumen de la columna. Si la cromatografía se hiciese dejando la válvula en mainpass el volumen total será de unos  $\sim 10 \mu\text{L}$ , este volumen es unas 11 veces mayor que el volumen de la columna. Este volumen sería todo el que tiene que atravesar el gradiente previo a alcanzar la entrada de la columna, lo que en la práctica resulta una condición claramente desfavorable.

A continuación se describen las condiciones de trabajo, seguido de los parámetros que se necesitaron para sincronizar estos sistemas miniaturizados, y los experimentos llevados a cabo para medirlos.

### **III.3.5.2. Condiciones de trabajo**

La velocidad de flujo secundario fue fijada en  $1 \mu\text{L min}^{-1}$ , y las inyecciones fueron de 0,1  $\mu\text{L}$ . La elución en gradiente se llevó a cabo mediante la mezcla de una solución acuosa al 0,1 % de ácido acético (HACO) (mezcla A) con otra de ACN que contenía 0,1 % HACO (mezcla B). La elución se realizó de forma isocrática con la mezcla A para un tiempo variable, seguido de un aumento lineal del porcentaje de la mezcla B para un tiempo de gradiente de 8 min. Los experimentos dirigidos a medir el tiempo de demora (dwell time) y otros

parámetros del sistema se hicieron con 0,1 % de acetona o uracilo añadido a la mezcla B [127]. La longitud de onda para la detección de acetona y uracilo fue de 265 nm, y de 214 nm para los alquilbencenos.

### **III.3.5.3. Perfil del gradiente: cambio (retorno) de la válvula a bypass a diferentes tiempos**

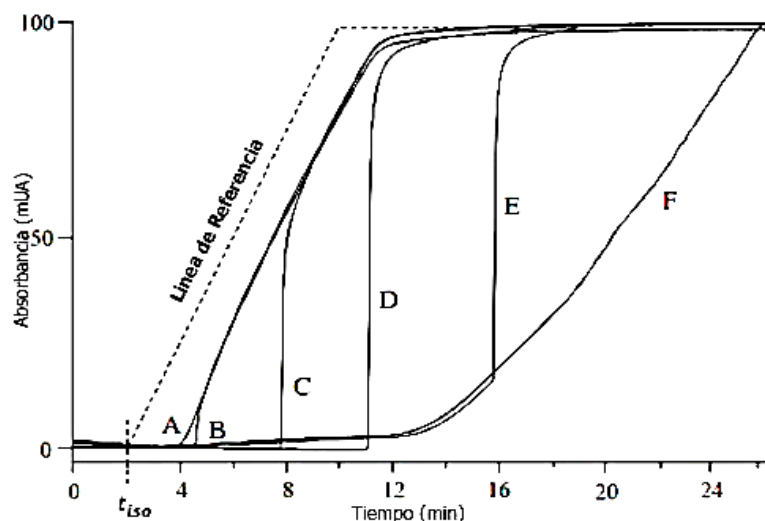
Con el objetivo de reducir el DV, la válvula se puede rotar de mainpass a bypass luego de que la muestra se inyecta e ingresa a la columna. Si bien el instrumento ofrece esta posibilidad desde el comando “low delay volumen” (minimizar el volumen de demora) que ofrece el programa del instrumento, se determinó que en dicha operación la válvula vuelve a bypass luego de un tiempo transcurrido desde la inyección que es insuficiente. Por lo tanto, primero se evaluó la ventaja de establecer el retorno de la válvula a bypass luego de la inyección y antes de la llegada del frente del gradiente a la válvula, en lugar de mantener la posición en mainpass. Como se mencionó anteriormente, la última opción tiene dos desventajas que son insignificantes en HPLC convencional pero de relevancia en sistemas miniaturizados, esto es, un largo  $t_{de}$  y la dilución de la fase móvil. Por el contrario, la gran ventaja de mantener el circuito en mainpass es evitar las contaminaciones entre corridas consecutivas, lo que se denomina efecto de memoria o “carryover”.

En la Figura III.17 se muestran los resultados de una serie de experimentos llevados a cabo a fin de establecer el tiempo de retraso sin columna. Para obtener las curvas, se hizo un análisis sin inyección de muestra. Dado que se programó un periodo isocrático inicial (2 min), el gradiente se inició al mismo tiempo que la inyección.

Si analizamos el caso del sistema micro-LC (Figura III.18), en el trazo A, la válvula se fijó para que retorne a bypass a 0,1 min luego de la inyección, antes de la llegada del frente del gradiente a la válvula. En el trazo B, la válvula se fijó a un tiempo para retornar a bypass ligeramente mayor que el tiempo requerido para que el gradiente alcance la válvula. Se pudo observar, que debido a la

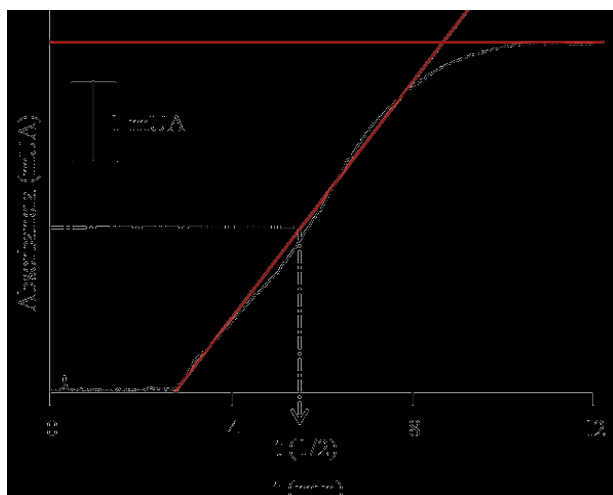


entrada parcial del gradiente en el bucle de inyección antes del cambio de posición de la válvula, la primera parte del gradiente se pierde, dando lugar a un paso brusco. La etapa inicial fue mayor para los trazos C - E, que se obtienen al incrementar los tiempos de espera antes de la rotación de la válvula. Sin embargo, la etapa inicial no estaba presente cuando se cambiaba la válvula a tiempos más largos, específicamente después de la llegada del final del gradiente a la válvula a través del camino interno del inyector, o cuando no se cambió la posición de la válvula en absoluto (trazo F). De esta manera también se observa en la curva F que existe un gradiente de menor pendiente y un tiempo mucho mayor que el real programado, consecuencia de la dilución de la fase móvil por el mezclado que ocurre en el interior del gran volumen interno del inyector. El tiempo real del gradiente para el trazo F fue de 11,8 min, en lugar de los 8 min programados (un aumento del 47 %). Por lo que, para reducir el tiempo de retardo al mínimo, así como para evitar el aumento del tiempo de gradiente, la válvula debe volver a bypass en cualquier momento posterior a la llegada del final de la muestra al puerto de ingreso correspondiente de la válvula, y antes de la entrada del frente de gradiente en el bucle de inyección. En principio, parece no ser crítico el tiempo para cambiar la válvula; sin embargo, cambiar la posición inmediatamente después de que la muestra ha dejado la válvula es la única manera de sincronizar este evento junto con el frente de gradiente. En caso contrario, cualquier retraso en el cambio de la válvula dará lugar a un período isocrático adicional anterior a la llegada del frente de gradiente a la válvula, y por lo tanto también a la entrada de la columna.



**Figura III.17.** Trazos obtenidos sin uso de columna, en el sistema micro-LC, mezclando dos fases móviles, A (agua conteniendo 0,1 % HAcO) y B (ACN con 0,1 % HAcO y 0,1 % acetona). En todos los casos se programó un período isocrático ( $t_{iso}$ ) de 2 min, y luego un gradiente de A a B en 8 min. Los trazos de A a F son los diferentes tiempos programados para retornar la válvula a bypass luego de la inyección: 2; 2,5; 4; 8; 12 y 30 min.

Para el caso del sistema nanoLC, la determinación del tiempo de demora se muestra en la Figura III.18, donde se observa que el tiempo de giro de la válvula fue optimizado (0,1 seg).



**Figura III.18.** Gráfica para la medida del tiempo de demora en el sistema nano-LC sin uso de columna mezclando dos fases móviles, A (agua conteniendo 0,1 % HAcO) y B (ACN con 0,1 % HAcO y 0,1 % acetona). Se programó un tiempo mínimo de giro (0,1 s) de la válvula a la posición de “bypass”,  $t_G$  8 minutos, y  $F$   $1 \mu\text{L min}^{-1}$ .

A partir de las Figuras III.17. y III.18. se calculó el tiempo de retraso del gradiente como:

$$t_{de} = t_{1/2} - \frac{t_G}{2} \quad (4)$$

Donde  $t_{1/2}$  es el tiempo al cual la señal de la línea de base ha incrementado un 50 % su señal y  $t_{G/2}$  es la mitad del tiempo del gradiente.

Y el volumen de retraso ( $V_{de}$ ) se obtiene como:

$$V_{de} = t_{de} \times F \quad (5)$$

Donde F es el flujo o caudal secundario empleado.

#### III.3.5.4. Tiempo de rotación a “bypass”

Para un mejor entendimiento del estudio de rotación de la válvula, se hará referencia a las posiciones de cada puerto de la válvula de seis vías según se enumeran en la Figura III.15, que servirán de guía en la descripción de este análisis.

Luego de la aspiración del volumen de muestra ( $V_s$ ), se produce la inyección por el cambio de la válvula a mainpass. Con la válvula en esta posición, el tiempo que requiere la última parte de la muestra en alcanzar la válvula ( $t_V$ ) está dado por el tiempo que dedica el frente de la muestra en alcanzar el puerto 2 ( $t_{SF}$ ), más el tiempo necesario para que toda la muestra salga del puerto 2 ( $t_S$ ):

$$t_V = t_{SF} + t_S \quad (6)$$

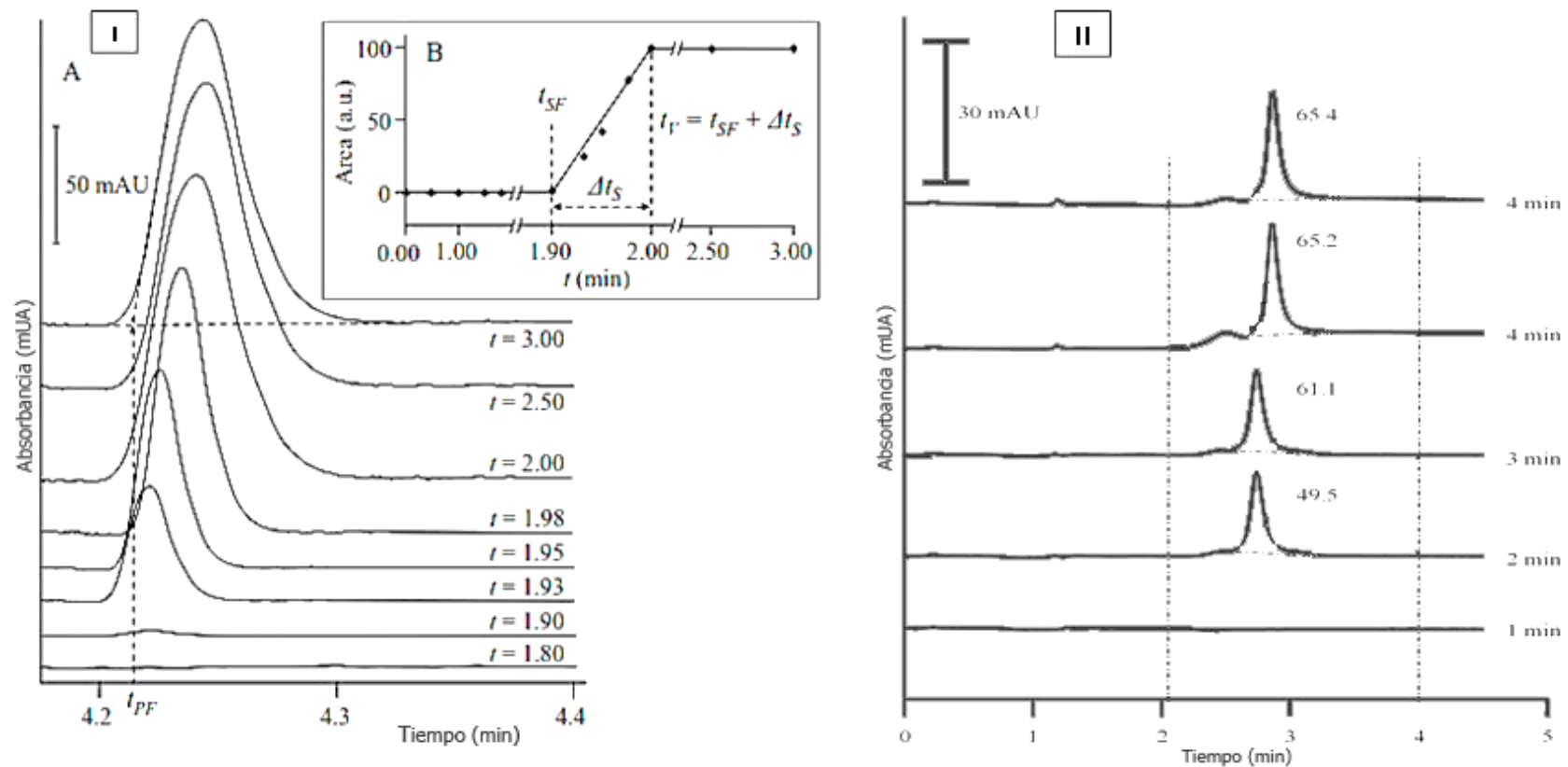
También debe mencionarse que  $t_{SF}$  no debe tomarse de la primera modificación de la línea de base producida por el pico de un soluto no retenido. La llegada de un marcador al detector se produce luego del  $t_{SF}$ , más el tiempo que involucra atravesar desde el puerto 2 a la celda del detector a lo largo de la

columna. A continuación se describe y propone un método simple para determinar  $t_V$ .

Para una serie de inyecciones, se cambió la válvula a bypass a valores de tiempos crecientes, que fueron desde 0 min hasta obtener un valor de área constante del pico del marcador. Como se observa en la Figura III.19.I.A, no se obtiene ningún pico cuando la válvula cambia a bypass antes de la llegada del frente de la muestra al puerto 2 ( $t < t_{SF}$ ). Cuando la válvula se cambia luego del paso del frente de la muestra por el puerto 2, pero antes de la llegada del final de la muestra, se pudo observar un pequeño pico. Finalmente, cuando la muestra completa atraviesa el puerto 2, mayores tiempos a este no producen ningún incremento en el área del pico. En la Figura III.19.I.B, se graficaron las áreas de picos en función del tiempo. En esta gráfica, el comienzo de la pendiente positiva, indica el tiempo de llegada al puerto 2 del frente de la muestra,  $t_{SF}$ . El punto donde la pendiente cambia para dar un “plateau” es  $t_V$ , y la diferencia entre los dos puntos donde las pendientes cambian es  $t_S$ . En principio no es necesario medir  $t_S$ , dado que puede ser calculado como el cociente entre el volumen de muestra y el caudal F2. Sin embargo, establecer experimentalmente  $t_S$  como se muestra en la Figura III.19.I.B, tiene la ventaja de mostrar las desviaciones entre los valores nominales y verdaderos de F2. En efecto, se ha observado que F2 no mantiene su valor nominal a altos valores de  $\Delta P$ . El sesgo puede producirse como resultado de la inadecuada calibración del sensor de flujo.

Vale mencionar que esta sincronización, que en principio debería ser simple de estimar a partir del conocimiento de los volúmenes implicados y los caudales de trabajo, resulta problemática por los efectos de contaminación entre muestras o efectos de memoria. En un sistema de dimensiones convencionales, la inyección se produce al pasar a mainpass, y la muestra se transfiere a la columna. La válvula permanece en esta posición durante el análisis de forma que el inyector automático sea continuamente atravesado por la fase móvil y, por lo tanto, el gradiente fluya a través de este volumen para alcanzar la columna. En estas condiciones raramente quedan restos de una muestra entre inyecciones. La posibilidad de volver a la posición de bypass tras haber realizado la inyección, puede tener graves consecuencias

de contaminación o efecto memoria que se observa cuando los picos residuales de una inyección anterior aparecen en una inyección de blanco con disolvente posterior. De esta manera se dará un efecto memoria entre las inyecciones consecutivas lo cual podrá derivar en resultados erróneos. El nivel de dicho efecto puede estimarse como el área del pico en la solución de blanco, expresado como un porcentaje del área en la inyección anterior.



**Figura III.19.** Experimentos para determinar  $t_V$ . Evaluación del tiempo de giro de válvula mediante inyección de 100 nL de acetona a diferentes tiempos de giro utilizando una columna Zorbax 300SB (150 mm x 100  $\mu$ m, 3,5  $\mu$ m) registrado a 254 nm en condiciones isocráticas. I) Sistema micro-LC. A- Cromatogramas obtenidos inyectando uracilo en presencia de la columna para diferentes tiempos ( $t$ ) de retorno de la válvula a bypass luego de la inyección. B- Área de los picos obtenidos (en unidades arbitrarias) en función del tiempo. Los símbolos están descritos en el presente capítulo. II) Sistema nano-LC. Los valores contiguos a los picos corresponden a las áreas de pico.

### III.3.5.5. Sincronización de tiempos de encuentro (match time)

La sincronización de la llegada del frente del gradiente y el final del pulso de la muestra a la entrada de la columna debe hacerse en el puerto 2 de la válvula. Esto solo puede realizarse cambiando (retornando) la válvula de inyección a bypass inmediatamente después de la llegada del final del pulso de la muestra al puerto 2. Es por esta razón que, el gradiente debe comenzar a un tiempo antes o después de la inyección tal que permita al frente del mismo llegar al puerto 1 simultáneamente con la llegada del fin del pulso de la muestra al puerto 2.

Un caso a considerarse es la inclusión opcional de un periodo isocrático en el método. Este debe programarse bajo condiciones de sincronización del sistema, pero se retrasaría aún más el frente del gradiente al puerto 1.

Como se discutió anteriormente, en determinadas condiciones de trabajo, el tiempo requerido por la fase móvil para moverse desde el mezclador de la bomba (T) a la válvula, debe complementarse con un tiempo de encuentro,  $t_M$ , que deberá sumarse o substraerse al tiempo inicial del gradiente. A continuación se describe como establecer el valor de  $t_M$ . Primero, se asigna un criterio para su signo, negativo cuando el tiempo requerido por el frente del gradiente para alcanzar la válvula es mayor que el tiempo requerido por la válvula para cambiar a bypass. Así, un valor negativo del tiempo de encuentro significa que el gradiente debe comenzarse antes de la inyección, el cual es el caso más común. De acuerdo con lo anterior el  $t_M$  viene dado por:

$$t_M = t_V - t_{BV} \quad (7)$$

donde  $t_{BV}$  es el tiempo requerido por la fase móvil para llegar a la válvula ("Before Valve").

El desplazamiento de la fase móvil desde el punto de mezclado hacia la válvula se produce parcialmente a F1 (antes del divisor) y parcialmente a F2 (desde el

divisor a la válvula). Es por esto que no puede ser fácilmente calculado o medido directamente. Como se deduce a continuación, una manera sencilla de obtener  $t_{BV}$  es haciendo uso de dos datos fácilmente medibles:

-El tiempo aparente de demora que es obtenido en presencia de columna ( $t'_{de}$ ) y el tiempo requerido en las mismas condiciones por un analito no retenido (como uracilo) para llegar a la celda del detector.

-El tiempo  $t'_{de}$ , es la suma de dos términos:  $t_{BV}$  y el tiempo requerido por la fase móvil para moverse desde la válvula hacia la celda del detector atravesando la columna:

$$t'_{de} = t_{BV} + \Delta t_{AV} \quad (8)$$

donde el subíndice  $AV$  indica posterior a la válvula (“after valve”), y en este tiempo ( $\Delta t_{AV}$ ) están incluidos, los tiempos que la fase móvil pasa entre la válvula y la entrada de la columna, dentro de la columna (el tiempo muerto de la misma), y luego de la columna antes de llegar a la celda del detector.

Por otro lado se tiene que el frente de la banda de un compuesto no retenido está dado por:

$$t_{PF} = t_{SF} + t_{AV} \quad (9)$$

donde el subíndice  $PF$  significa frente del pico (“peak front”).

Reorganizando las ecuaciones 6 y 8, y sustituyendo los valores resultantes de  $t_{SF}$  y  $\Delta t_{AV}$  en la ecuación 9, se tiene:

$$t_{PF} = t_V - \Delta t_S + t'_{de} - t_{BV} \quad (10)$$



De acuerdo con la ecuación 7, el tiempo de sincronización es la diferencia entre  $t_V$  y  $t_{BV}$ , por lo que sustituyendo en ecuación 10 y reordenando, se tiene:

$$t_M = t_{PF} + \Delta t_S - t'_{de} \quad (11)$$

Por lo tanto, el  $t_M$  puede ser calculado como el tiempo requerido por un marcador no retenido para llegar a la celda del detector, más el tiempo que requiere el volumen de la muestra para salir del puerto de la válvula, menos el tiempo aparente de demora; donde todos estos parámetros se determinan en presencia de columna y en las condiciones iniciales del gradiente. El primero de estos tres tiempos, el  $t_{PF}$ , puede obtenerse de los mismos experimentos en los que se calcula  $t_V$  si se usa un marcador no retenido (Figura III.19.I).

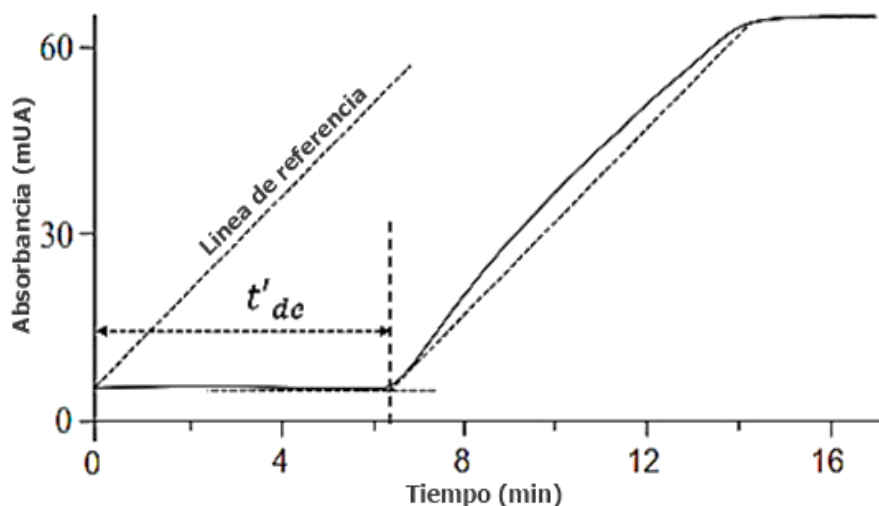
De acuerdo con el criterio adoptado en la ecuación 7, el  $t_M$  será en la mayoría de los casos negativo, lo que indica cuanto tiempo antes se debe iniciar el gradiente respecto a la inyección. Sin embargo, para grandes volúmenes de inyección y altos flujos primarios (que reducirían el  $t'_{de}$ ), el  $t_M$  podría ser positivo, lo que significa en este caso que el gradiente debe iniciarse luego de un período isocrático de elución que sea igual a  $t_M$ .

### III.3.5.6. Cálculo de los parámetros de tiempo preestablecidos

Como se dedujo de la ecuación 11, para calcular  $t_M$ , deben establecerse los valores de  $t_{PF}$ ,  $\Delta t_S$  y  $t'_{de}$  en las condiciones que se usarán para la separación de la muestra prueba. Los primeros dos, se determinaron en los experimentos que muestra la Figura III.19.I, siendo para el sistema micro-LC de 4,23 y 0,10 min respectivamente. Para establecer el último tiempo, se desarrolló un experimento similar al de la Figura III.18, pero en presencia de columna y sustituyendo acetona por uracilo.

En la Figura III.20, la línea de puntos a la izquierda es la referencia o línea teórica que se debe obtener para un tiempo de demora nulo y con un tiempo de

gradiente fijado de 8 min. La línea continua es la curva experimental obtenida con el progreso del gradiente. A lo largo del tiempo del gradiente, el trazo no creció de manera lineal, en vez de eso mostró una forma ligeramente curva.



**Figura III.20.** Evaluación del tiempo de demora aparente,  $t'_{de}$ , medido con columna mezclando la fase móvil A con la fase móvil B que contenía 0,1 % de uracilo, ver detalles en Figura III.17. La válvula se cambió a la posición bypass 0,1 min luego de la inyección.

El comienzo de la pendiente del trazo fue establecido en la intersección de la línea de base extrapolada con una línea recta tangente con la parte baja de las curvas, trazada con la misma pendiente que la línea de referencia como se indica en la Figura III.20. De los valores experimentales se obtuvo un  $t'_{de}$  de 6,30 min, y de acuerdo con la ecuación 11, un valor de  $t_M$  de -1,97 min.

### III.3.5.7. Cromatogramas obtenidos con y sin sincronización del sistema.

#### -Micro-LC

Se desarrollaron tres esquemas de trabajo para analizar la efectividad con y sin sincronización de este tipo de sistemas. Los esquemas son (A) sincronizado, (B) sin sincronización, pero con cambio de válvula a bypass, y (C) operación

convencional o sin sincronizar, y con válvula en posición mainpass. En la tabla III.5 se detallan los eventos para cada uno de los esquemas.

Como fue propuesto, la sincronización de la inyección de la muestra con el funcionamiento de la válvula y la bomba, se implementó como se indica en el esquema A de la tabla III.5. El principal problema con el programa de Agilent usado en este trabajo fue, como programar el inicio del gradiente a un tiempo dado antes de la inyección. Esta opción no se incluye en el programa del instrumento. Afortunadamente, la válvula de inyección puede operarse en cualquier momento e independientemente de la inyección. Entonces, se optó por inyectar la muestra e iniciar el gradiente simultáneamente, pero deteniendo el avance del pulso de la muestra hacia la válvula luego de un periodo corto de tiempo arbitrario. Esto fue realizado cambiando la válvula a bypass a los 0,1 min luego de la inyección. De acuerdo con los experimentos que se muestran en la Figura III.19.I,  $t_{SF} > 0,1$  min, por lo que este tiempo seleccionado fue lo suficientemente corto para prevenir que el frente de la muestra alcance la válvula. Luego se mantuvo la posición de la válvula en bypass durante el tiempo de sincronización determinado. Esto es equivalente a cambiar la válvula a mainpass para reanudar el avance del pulso de la muestra hacia la válvula. La válvula se cambió finalmente a bypass a  $t_V$ , para coincidir con la llegada del frente del gradiente y el final de la muestra a los puertos 1 y 2 de la válvula respectivamente.

**Tabla III.5.** Esquemas operacionales usados en un sistema (A) Sincronizado, (B) sin sincronización con cambio de válvula a bypass, (C) operación convencional o sin sincronizar con válvula en posición mainpass.

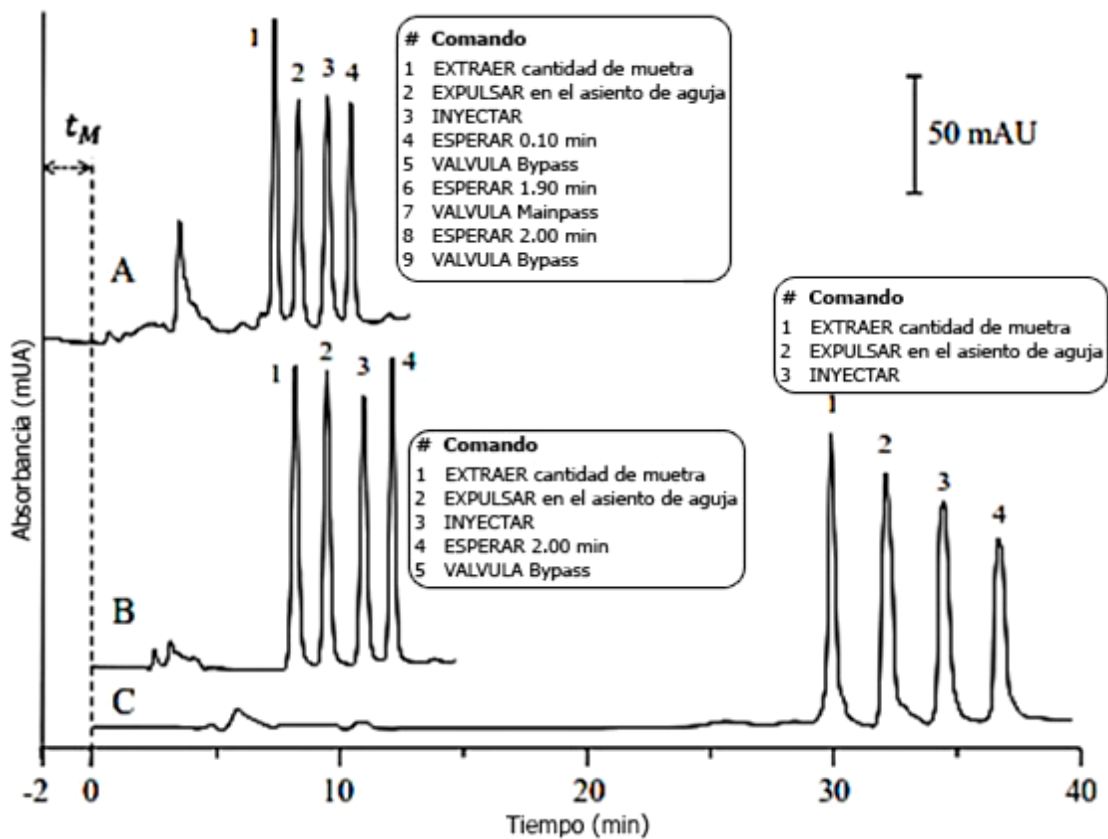
Esquema	Tiempo	Válvula	Elución	Suceso
<b>A</b>	$< 0$	Bypass	Isocrático	Comienzo: la muestra es aspirada
	0	Mainpass	Gradiente	Se inyecta la muestra y comienza el gradiente; el lapso para que el frente de la muestra alcance el puerto 2 es $t_{SF}$ (para cHPLC y en las condiciones de $t_{SF}$ 1,90 min a $F2$ 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ )
	0,1	Bypass	Gradiente	El pulso de la muestra es frenado antes de llegar al puerto de la válvula; el frente del gradiente aún no llegó a la válvula ( $t_{BV} > 0,1\text{min}$ )
	$t_M$	Mainpass	Gradiente (hasta completarse)	El pulso de muestra retoma el desplazamiento; el final de este pulso y el comienzo del gradiente llegan a la válvula al mismo tiempo.
	$t_V$	Bypass	Gradiente (si es requerido)	El frente del gradiente sale de la válvula inmediatamente después del final de la muestra
<b>B</b>	$<0$	Bypass	Isocrático	Comienzo: la muestra es aspirada
	0	Mainpass	Gradiente	Se inyecta la muestra y comienza el gradiente
	$t_V$	Bypass	Gradiente	El final de la muestra alcanza la válvula; el gradiente aún no llegó a la válvula.
	$t_V + t_M$	Bypass	Gradiente (hasta completarse)	El frente del gradiente llega a la válvula; los picos menos retenidos podrían haber sido total o parcialmente eluidos bajo condiciones isocráticas.
<b>C</b>	$<0$	Bypass	Isocrático	Comienzo: la muestra es aspirada
	0	Mainpass	Gradiente	Se inyecta la muestra y comienza el gradiente
	$t_V$	Mainpass	Gradiente (hasta completarse)	El final de la muestra alcanza la válvula; el frente del gradiente podría no haber llegado a la válvula o haber entrado al paso del inyector.
	$t \gg$	Mainpass	Gradiente (si es requerido)	El frente del gradiente alcanza la válvula pasando por la conexión interna del inyector, con gran retardo y dilución; cuando este llega a la columna los analitos pueden haber sido eluidos bajo condiciones isocráticas.

El esquema B de la tabla III.5 fue usado para implementar un modo de sincronización parcial, en el cual la válvula se cambia a bypass a  $t_V$ , pero el gradiente comienza simultáneamente con la inyección. Este proceso tiene la ventaja de ser simple, dado que no es necesario calcular el tiempo de encuentro, y puede ser implementado por el simple agregado de la orden de operación de la válvula al programa.

Finalmente, en el esquema C, el cromatograma se obtiene dejando la válvula en mainpass luego de la inyección (modo de elución convencional). Este esquema no necesita ninguna programación del sistema.

Estos tres esquemas de operación presentados fueron aplicados al análisis de una mezcla de alquil bencenos. En la Figura III.21, se muestran los cromatogramas y los esquemas de programación implementados en el instrumento.

Los tiempos de retención, eficiencias y simetría de picos para los tres esquemas de operación A, B y C, son comparados en la tabla III.6.



**Figura III.21.** Cromatogramas obtenidos inyectando 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla prueba conteniendo cuatro alquil bencenos. Los cromatogramas A, B y C, corresponden a la misma denominación de los esquemas empleados según tabla III.5. Las leyendas adjuntas a cada cromatograma corresponden a la programación fijada en el sistema.

Con el esquema A, el último pico eluye aproximadamente a los 10 minutos, mientras que se requirieron aproximadamente 12 y 36 minutos en los esquemas B y C respectivamente. Así, con los esquemas A y B, los analitos son eluidos con un marcado ahorro de tiempo con respecto al esquema C (36 %). Por comparación de los esquemas A y B, el último pico aparece antes para A, pero el tiempo ganado fue aproximadamente el mismo que aquel que se usó durante el tiempo de sincronización.

**Tabla III.6.** Tiempos de retención, eficiencias y simetría de picos para cuatro alquil bencenos para los esquemas A, B y C detallados en la tabla III.5. Los valores corresponden a un promedio de 3 inyecciones.

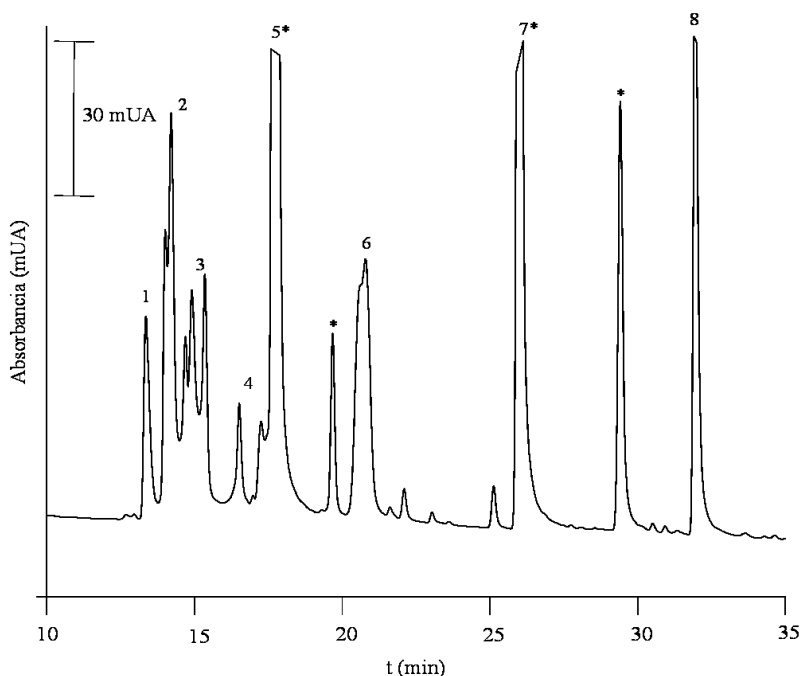
Pico	Tiempo de retención (min)			Número de platos aparentes por metro (N/L)			Factores de simetría		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	7,29	8,20	29,4	76200	32100	28400	0,92	0,94	2,00
2	8,23	9,96	31,8	62400	44600	26900	0,87	0,88	1,58
3	9,39	10,94	34,1	67400	55500	38300	0,91	0,93	1,32
4	10,33	12,09	36,3	103200	99200	43400	0,89	0,90	1,25

De la tabla III.6 se puede deducir que el número aparente de platos fue aproximadamente 120 y 60 % más altos en los esquemas A y B respecto del de C. Los factores de simetría fueron similares para los primeros dos esquemas, pero dos veces más grandes para el esquema C. De esta manera, alcanzar la optimización del sistema, permitió una gran mejora de los parámetros cromatográficos, y mayor control en la separación.

### **-Nano-LC**

Para este sistema se llevó adelante el mismo análisis de sincronización que para el equipo de LC capilar. Con el sistema optimizado, es decir conociendo los diferentes parámetros de tiempo, se optó por la aplicación cromatográfica de una mezcla de aminoácidos derivatizados. En base a lo previo, para inyectar los aminoácidos derivatizados, se propuso programar un tiempo en modo isocrático suficiente para que tanto la muestra como la composición de la fase móvil que llega a la columna sea la correcta. Se estudiaron diversos tiempos, siendo el tiempo de giro de la válvula de 4 minutos el que mejor resultado produjo (Figura III.19.II).

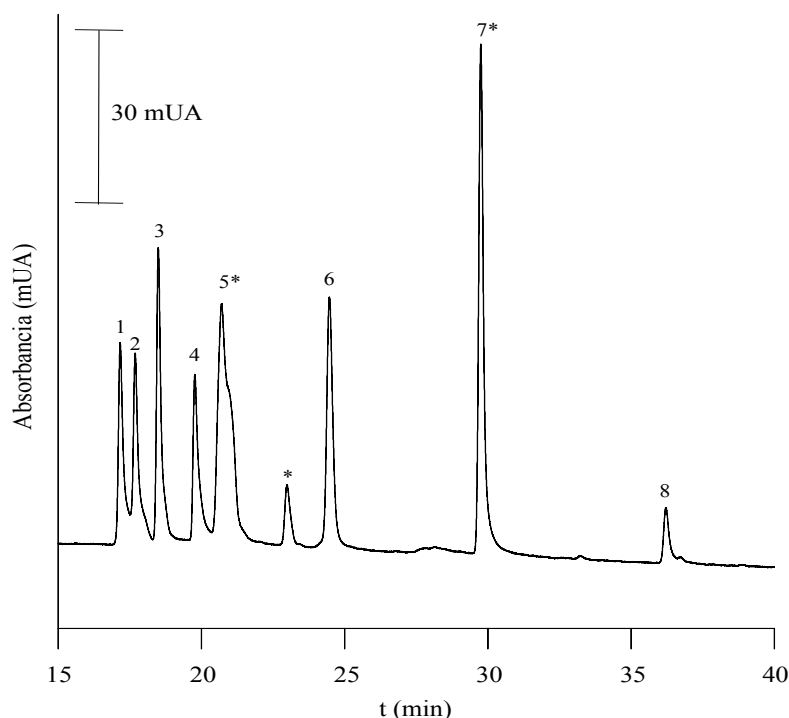
En el cromatograma de la Figura III.22 se observaron varios picos, algunos de ellos fueron debido al blanco (marcados con asterisco) y otros corresponden a los aminoácidos de interés, siendo algunos de estos picos dobles. Este último fenómeno, posiblemente puede ser atribuido, a las diferencias de viscosidad y fuerza eluotrópica entre el disolvente en el que se inyectó la mezcla de aminoácidos (50:50 ACN-buffer borato pH 9,20) y la composición inicial de la fase móvil (10-90 % ACN-buffer formiato pH 3,75 25 mM). Este fenómeno, llamado “fingering”, ha sido descrito por varios autores en la literatura [128,129].



**Figura III.22.** Cromatograma de los derivados de los aminoácidos con Fmoc. Condiciones: Columna Zorbax 300SB-C18 (150 mm x 100  $\mu$ m, 3,5  $\mu$ m), elución isocrática con 10 % de ACN durante 4 minutos seguido de un gradiente lineal desde 10 a 80 % ACN en 40 minutos; flujo 1  $\mu$ L  $\text{min}^{-1}$ ; temperatura 25  $^{\circ}\text{C}$ ; detección a 260 nm. Identificación de picos: 1,- Fmoc-Arg, 2, Fmoc-Gln, 3, Fmoc-Cit, 4, Fmoc-Glu, 5 Fmoc-OH, 6, Fmoc-Pro, 7 Fmoc-Tyrn, 8, Fmoc-Orn. Los picos marcados con asterisco se encontraron en el blanco de derivatización.

Para evitar este problema en la elución y mejorar los picos, se procedió a diluir la mezcla de aminoácidos a la composición inicial de gradiente. Como se observa en la Figura III.23 en este caso la forma de los picos fue mejorada, obteniéndose una condición de separación aceptable de los mismos.





**Figura III.23.** Cromatograma de los Fmoc-AAAs diluidos (1:10) en la misma composición inicial de la fase móvil. Condiciones y referencias igual que en Figura III.22.

### III.3.5.8. Comparación entre columnas (monolítica polimérica y particulada)

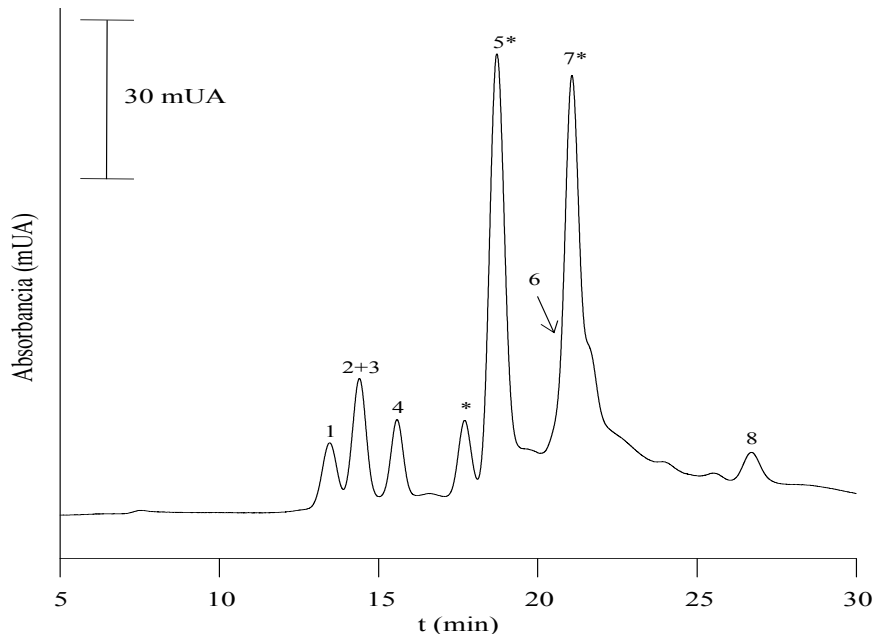
La posibilidad de utilizar columnas monolíticas para la separación de derivados de aminoácidos también fue investigada. Las condiciones iniciales para la preparación de columnas poliméricas, en particular, de BMA fueron adaptadas de los resultados obtenidos en este mismo capítulo. En la tabla III.7. se resumen las cantidades relativas de la mezcla de polimerización para la columna fabricada en nuestro laboratorio "columna 1". Se indica además, las dimensiones de la columna comercial empleada.

**Tabla III.7** Composición de la mezcla de polimerización estudiada y dimensiones de la columna comercial utilizada.

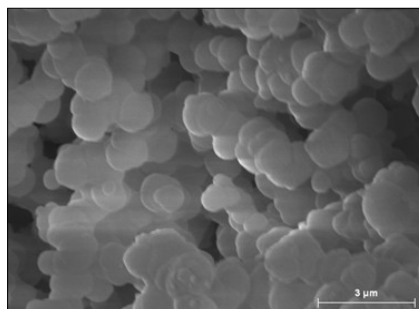
Columna	BMA/EDMA (% p/p)	Monómeros/porógenos (% p/p)	1,4-butanodiol/1-propanol/agua (% p/p/p)
1	60:40	40:60	17:73:10
2	ZORBAX 300 SB-C18 3,5 $\mu$ m 150 mm x 100 $\mu$ m		

Para este análisis, se optó por la polimerización realizada mediante el empleo de radiación UV en lugar de térmicamente reduciendo tiempos de polimerización a 10 min y con mejores reproducibilidades. Se utilizó una longitud de onda de 254 nm, dado que el iniciador utilizado fue AIBN. La fotopolimerización se realizó en una cámara UV (horno de entrecruzamiento), a la potencia máxima de irradiación que ofrece el equipo de 0,9 J/m<sup>2</sup>.

Utilizando la columna polimérica orgánica, los parámetros de tiempo de giro de válvula del sistema para nano-LC y las condiciones de gradiente optimizadas anteriormente, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura III.24. Los pares críticos fueron los derivatizados de Glu/Cit y Pro/Tyrn que presentaron co-elución. La resolución global obtenida con esta columna es claramente inferior en comparación con la obtenida empleando la columna de sílice particulada. La columna monolítica posee un menor carácter hidrofóbico atribuible a una cadena alquílica de sólo cuatro carbonos, una menor área superficial, y posee mayor permeabilidad, que se correlaciona con el tamaño de los glóbulos observables en la fotografía SEM (Figura III.25), lo que explicaría la menor retención en esta columna. Sin embargo, el ancho de los picos observables en el cromatograma es atribuible a la menor eficiencia de este sistema en comparación con el particulado de sílice.



**Figura III.24.** Cromatograma de estándares de aminoácidos derivatizados con FMOC. Columna monolítica de BMA (150 mm x 100  $\mu$ m de DI.). Condiciones e identificación de picos como en Figura III.22.



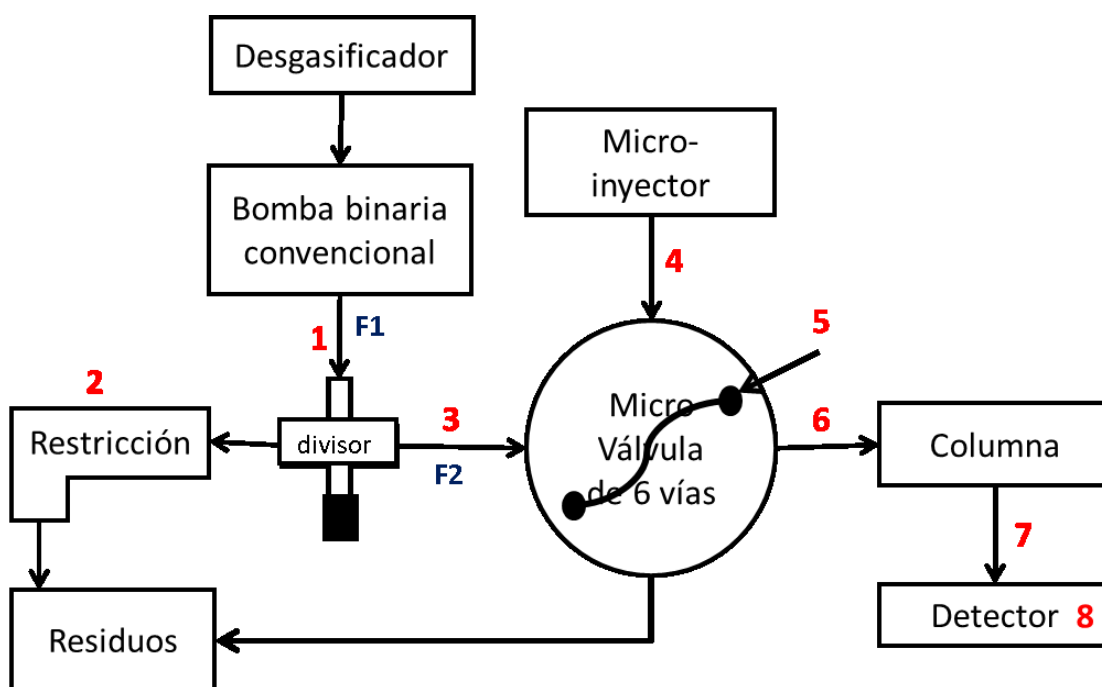
**Figura III.25.** Fotografía SEM de la columna monolítica polimérica (tabla III.7.).

### III.3.6. APLICACIÓN A UN SISTEMA CROMATOGRÁFICO CAPILAR ACONDICIONADO EN EL LABORATORIO

El principal objetivo de este punto de estudio, fue desarrollar en nuestro laboratorio las modificaciones necesarias para convertir un equipo HPLC convencional (Agilent 1100 series), en un sistema que se pueda trabajar a escala capilar. En el proceso de disminuir las dimensiones de las columnas cromatográficas, resultó necesario modificar los equipos convencionales de

HPLC de manera de disminuir radicalmente la dispersión extra-columna que podrían generar los mismos. Así, se debió reducir drásticamente el volumen de analito inyectado, las conexiones del sistema, el caudal de la fase móvil, y minimizar al máximo la celda de detección. La modificación del caudal puede ser posible por medio de divisores (activos o pasivos) que permiten reducir y regular el flujo de fase móvil. En cuanto al sistema de inyección, se emplean micro-inyectores, cuyo volumen está determinado por un bucle de inyección o “loop” capilar del orden de los nanolitros, y para la detección resulta necesario el uso de micro-celdas o, alternativamente, detección en línea (“on-column”).

En nuestro trabajo se empleó el sistema que se esquematiza en la Figura III.26, y con las conexiones que se detallan en la tabla III.8.



**Figura III.26.** Diagrama del sistema de cromatografía líquida capilar acondicionado en un sistema HPLC convencional. Los módulos principales agregados se muestran en la Figura III.22, y las dimensiones de las conexiones, en números del 1-7, siendo 8 el volumen de la celda del detector, y se detallan en la tabla III.5. F1 indica el caudal de la fase móvil fijado en el equipo, y F2 es el caudal proporcionado al sistema cromatográfico capilar.

**Tabla III.8.** Descripción de las dimensiones de los tubos de conexión en el sistema capilar. Las conexiones 1 y 2 son de PEEK, el resto corresponden a capilares de sílice fundida.

<b>Conexión (Referencia)</b>	<b>Longitud (cm)</b>	<b>Diámetro interno (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
1	20	50	0,4
2	Variable		
3	10	50	0,2
4	10	50	0,2
5	7	25	0,034
6	4,5	50	0,09
7	La columna se conectó directamente al detector		
8	---	---	1

### III.3.6.1. DESCRIPCIÓN DE LOS MÓDULOS

#### Puerto de micro-inyección

Un modo práctico para introducir la muestra en una válvula de 2 puertos y 6 vías, es adaptar tubos capilares de 360  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, para comunicarla con un puerto de inyección manual. Este puerto es compatible con jeringas de aguja estándar de calibre 22. Este adaptador no adiciona ningún volumen a la línea de fluido, dado que la aguja apoya directamente contra el tubo capilar empleado para la conexión con la válvula. Figura III.27.A.

#### Válvula de 6 vías de nano escala

Esta es una válvula Rehodyne de 2 puertos y 6 vías (Figura III.27.B). La válvula conecta todo el sistema: columna, fase móvil, lazo de muestra (loop) y residuos. El volumen interno entre puertos es de 28 nL.

### Válvula divisora de micro-flujo

Esta es una válvula para alta presión graduada, con aguja interna de acero inoxidable (Figura III.27.C). Posee un volumen interno que varía de 1,2 a 2,4  $\mu\text{L}$  dependiendo si está totalmente cerrada o abierta. La principal desventaja de este módulo, es que la máxima presión de trabajo es 276 bares, presión menor que la que soporta un sistema HPLC convencional.



**Figura III.27.** Imágenes de los 3 módulos que complementan a las bombas y detector convencional de HPLC. A) Válvula divisora de micro-flujo, B) Válvula de 6 vías de nano escala, y C) Puerto de micro-inyección.

### Acondicionamiento del sistema

En primera instancia se procedió a minimizar todos los volúmenes de las conexiones del HPLC. Esto incluyó quitar del sistema convencional la pieza mezcladora de solventes (“mixer”, número de parte G1312-87330), ya que aporta un volumen interno al sistema de 420  $\mu\text{L}$ . Este volumen generaría un gran retraso en el frente de solvente a la entrada de la columna, principalmente cuando se realizan gradientes de elución. Por esta razón el mezclador fue reemplazado por un conector de volumen muerto de acero inoxidable.

#### III.3.6.2. Estudio de caudales y presión en el nuevo sistema

Este análisis se realizó considerando el divisor de flujo utilizado para alcanzar los caudales del orden de los 2 – 100  $\mu\text{L min}^{-1}$ . La división de flujo fue pasiva,

ya que hay una dependencia con la división de un caudal primario, trabajando a contrapresión, y donde también el caudal secundario se ve fuertemente afectado por cambios en la temperatura y viscosidad del sistema. De esta manera, se realizó el estudio de dos variables para conocer los diferentes caudales proporcionados cuando se modificaba el flujo primario. Estas variables fueron: a) dimensiones del capilar de restricción (contrapresión), y b) composición de la fase móvil.

Las medidas de los caudales se realizaron recolectando y pesando las fases móviles que emergen de la restricción junto con las del F2, luego de un tiempo conocido, en las condiciones de flujo F1 establecidas.

**a) Diferentes capilares de restricción – válvula divisora de flujo abierta.**

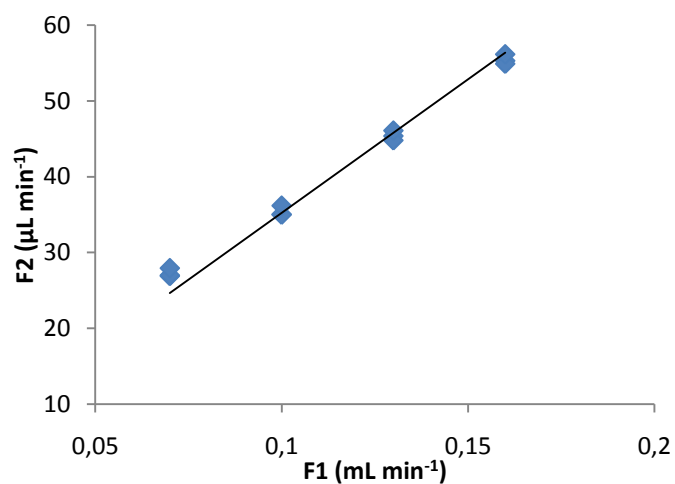
Usando como fase móvil una mezcla binaria MeOH/H<sub>2</sub>O 50/50 %v/v (máximo valor de densidad para esta mezcla), se cambió el capilar de restricción (longitud y/o diámetro interno), para generar una contrapresión tal que facilite un mayor o menor flujo secundario. En este caso se realizó el estudio utilizando una columna monolítica de 17 cm de longitud y 250 µm de diámetro interno (la mezcla polimérica de esta columna se detalló en la tabla III.4 de este capítulo).

*i) Capilar de sílice fundida de 44 cm x 50 µm*

En la siguiente tabla se resumen algunos valores de F2 obtenidos, para cada flujo primario. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

**Tabla III.9.** Valores de caudal fijados en la bomba binaria (F1), y los valores de caudal resultantes frente a la restricción de un capilar de 44 cm x 50 µm. Se indican las desviaciones para tres determinaciones de cada medida.

<b>F1 (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔP (bares)</b>	<b>F2 (promedio) (µL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>RSD</b>	<b>SD</b>
0,07	35	27,3	2,1	0,6
0,10	49	35,4	1,9	0,7
0,13	69	45,4	1,4	0,6
0,16	87	55,4	1,2	0,6



**Figura III.28.** Gráfica de la correlación lineal entre flujo primario y secundario. La regresión lineal tiene una pendiente de  $352 \pm 4$ , con ordenada cero. El coeficiente de correlación  $r$  es de 0.9987.

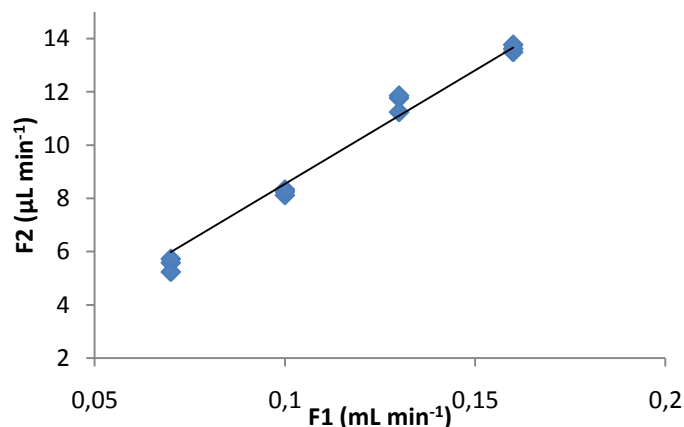
ii) Tubo PEEK de 10 cm x 50 μm

En la tabla III.10. se resumen los valores de F2 obtenidos, para cada flujo primario seleccionado. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

**Tabla III.10.** Valores de caudal fijados en la bomba binaria (F1) y los valores de caudal promedio resultantes frente a la restricción de un tubo PEEK de 10 cm x 50 μm. Se indican las reproducibilidades de triplicados de cada medida.

<b>F1 (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔP (bares)</b>	<b>F2 (promedio) (μL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>RSD</b>	<b>SD</b>
0,07	17	5,6	4,5	0,3
0,10	25	8,1	1,3	0,1
0,13	31	11,8	2,8	0,3
0,16	40	13,5	1	0,1





**Figura III.29.** Gráfico de la correlación lineal entre flujo primario y secundario. La regresión lineal tiene una pendiente de  $85 \pm 1$ , con ordenada cero. El coeficiente de correlación  $r$  es de 0.9983.

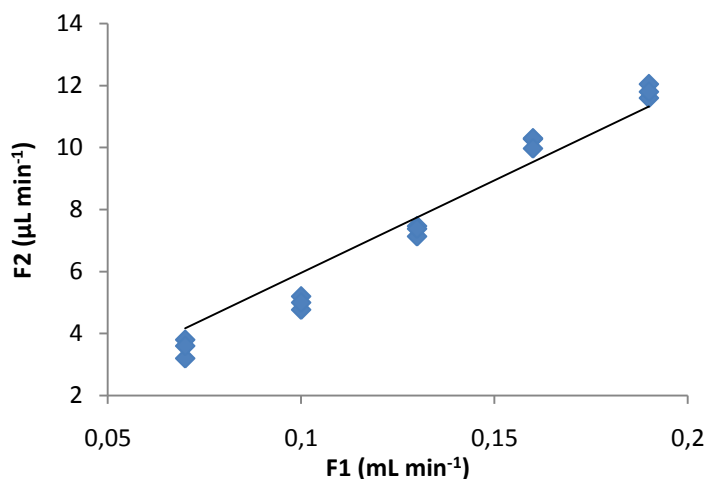
**b) Diferentes composiciones de fase móvil – válvula divisora de flujo abierta**

Para este estudio se mantuvo la misma restricción sobre la válvula divisora de flujo, empleándose el capilar de sílica de 44 cm x 50 μm. Como fase móvil se usaron dos mezclas binarias de ACN/H<sub>2</sub>O, y la misma columna monolítica de 17 cm de longitud y 250 μm de diámetro interno.

*i) Mezcla 70/30 H<sub>2</sub>O/ACN*

**Tabla III.11.** Valores de caudal fijados en la bomba binaria (F1) y los valores de caudal resultantes frente a la restricción de un capilar de 44 cm x 50 μm. Se indican las reproducibilidades de triplicados de cada medida.

<b>F1</b> <b>(mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔP</b> <b>(bares)</b>	<b>F2 (promedio)</b> <b>(μL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>RSD</b>	<b>SD</b>
0,07	35	3,5	8,7	0,3
0,10	51	5,0	4,3	0,2
0,13	65	7,3	2,4	0,2
0,16	81	10,2	1,8	0,2
0,19	98	11,8	1,9	0,2

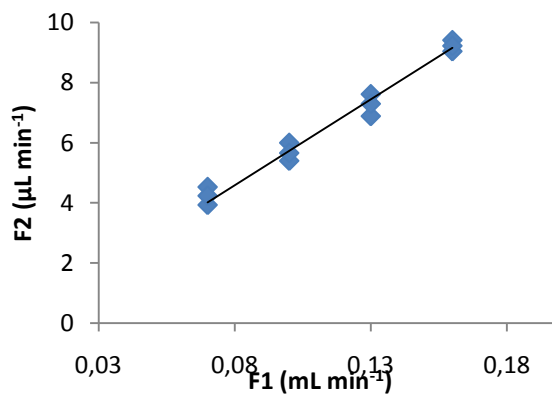


**Figura III.30.** Gráfico de la correlación lineal entre flujo primario y secundario. La regresión lineal tiene una pendiente de  $60 \pm 1$ , con ordenada cero. El coeficiente de correlación  $r$  es de 0.9929.

ii) Mezcla 20/80 H<sub>2</sub>O/ACN

**Tabla III.12.** Valores de caudal fijados en la bomba binaria (F1) y los valores de caudal resultantes frente a la restricción de un capilar de 44 cm x 50 μm. Se indican las reproducibilidades de triplicados de cada medida.

<b>F1 (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>ΔP(bares)</b>	<b>F2 (promedio) (μL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>RSD</b>	<b>SD</b>
0,07	19	4,2	7,1	0,3
0,10	27	5,7	5,3	0,3
0,13	35	7,3	5	0,4
0,16	43	9,2	2	0,2



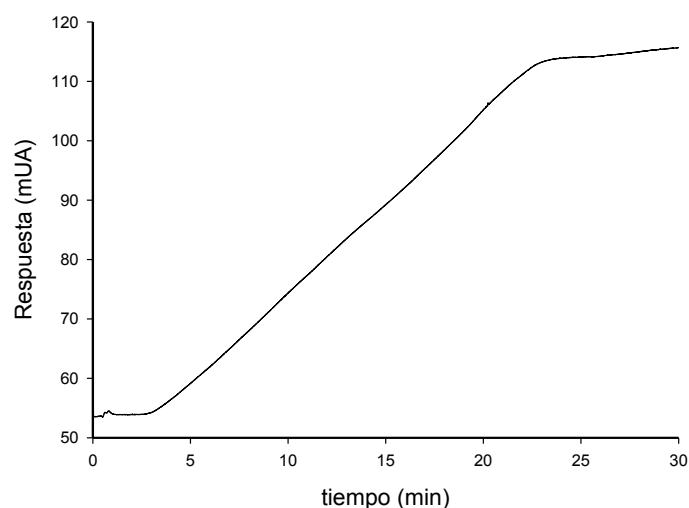
**Figura III.31.** Gráfico de la correlación lineal entre flujo primario y secundario. La regresión lineal tiene una pendiente de  $57.3 \pm 0.7$ , con ordenada cero. El coeficiente de correlación  $r$  es de 0,9983.

A partir de los resultados obtenidos, se puede demostrar que existe una gran dependencia entre el flujo primario (F1), fijado en las bombas binarias, con el caudal secundario (F2) de acuerdo a cual fuera la restricción de la válvula divisora de flujo, como así también la viscosidad del medio. Cabe destacar que la principal dependencia la establece la permeabilidad de la columna a emplear, no obstante debe existir la relación lineal entre las variables estudiadas. Por lo tanto el caudal debe ser determinado para cada condición de trabajo, ya que cada columna sintetizada tendrá una permeabilidad determinada.

Este desarrollo de optimización del sistema miniaturizado se complementó con el estudio del sistema para poder trabajar en condiciones de gradiente. Es por esto que se debió determinar el tiempo de demora (dwell time), para que una vez alcanzado el sistema óptimo, proceder finalmente al análisis cromatográfico de una muestra.

### **III.3.6.3. TIEMPO DE DEMORA ( $t_{de}$ ) Y ANÁLISIS DE ELUCIÓN EN GRADIENTE**

Como fue mencionado anteriormente, se eliminó el mezclador de solvente para reducir el volumen interno del sistema, y hacer así, compatible el instrumento convencional con una columna capilar. Esta eliminación exige que se evalúe el tiempo de demora,  $t_{de}$ . La determinación se realiza sin columna, por lo que se reemplazó y utilizó en su lugar, un capilar de 50  $\mu\text{m}$ .



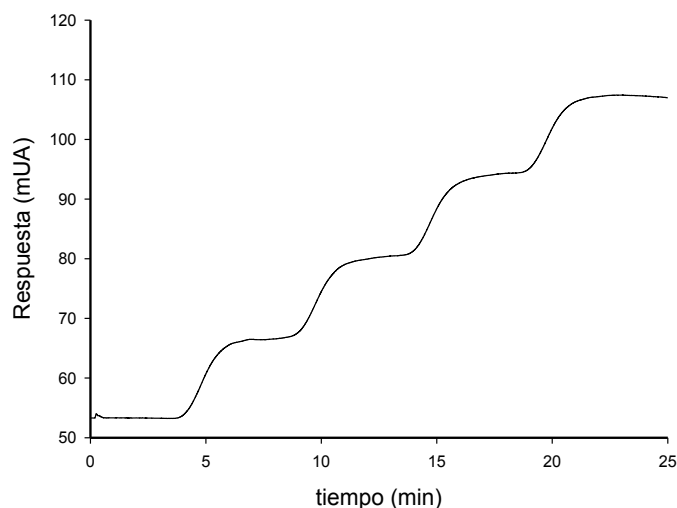
**Figura III.32.** Medida del tiempo de demora. Condiciones:  $F1\ 0,13\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$ . Tubo de contrapresión: capilar de 10 cm y  $50\ \mu\text{m}$  de diámetro interno. Composición de fase móvil: 0-80 %B en 20 min, siendo A agua y B 0,1 % de acetona en agua. Detección 265 nm.

Aplicando la ecuación 5 descrita en este capítulo se obtuvo el valor del tiempo de demora para este sistema, el cual fue de 2,75 min. El tiempo de demora en este instrumento adaptado es relativamente bajo, del orden de los tiempos registrados en cualquier cromatografía usando dimensiones convencionales. Esto representa una ventaja muy importante comparado a los instrumentos comerciales de micro- y nano-HPLC porque hace innecesario modificar el camino del eluyente que ingresa a la columna, evitando de este modo los efectos de memoria entre inyecciones.

Con el objetivo de tener conocimiento de la respuesta del sistema divisor de flujo y la llegada de los cambios de fase móvil para diferentes composiciones de ambas bombas del sistema binario, se llevó a cabo un gradiente escalonado. Este gradiente se describe en la tabla III.13.

**Tabla III.13.** Tiempo y composición porcentual escalonada. A = agua, B= 0,1% acetona en agua. Capilar de restricción de 10 cm x  $50\ \mu\text{m}$ .

<b>%B</b>	0	0	20	20	40	40	60	60	80	80
<b>Tiempo (min)</b>	0	2	3	7	8	12	13	17	18	22



**Figura III.33.** Gradiente escalonado según se indica en la tabla III.8. Caudal primario  $F1= 0,13 \text{ mL min}^{-1}$ .

El gradiente escalonado de la Figura III.33, muestra una muy buena respuesta a los cambios del solvente establecidos.

#### III.3.6.4. APLICACIÓN CROMATOGRÁFICA DEL SISTEMA CAPILAR-LC

El sistema HPLC adaptado a escala reducida fue usado para el análisis de una mezcla de 4 alquilbencenos empleando columnas monolíticas metacrílicas desarrolladas en el laboratorio, con el fin de demostrar la funcionalidad del sistema cromatográfico capilar. Para este fin el monómero metacrílico seleccionado es el de laurilo, dado que la cadena alquílica, es lo suficientemente larga como para aportar más hidrofobicidad respecto a uno de butilo.

Las composiciones de las mezclas poliméricas se detallan en la tabla III.14. Se realizaron 3 mezclas poliméricas, donde cada una de ellas se polimerizó térmicamente a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  a dos tiempos diferentes, 12 y 20 horas. El análisis de estos dos tiempos lleva a tener un monolito con una conversión completa y otra parcialmente completa, lo que debería aportar fases estacionarias con características diferentes. La polimerización a 12 horas fue frenada, retirando la

columna de la estufa, seguido del lavado con MeOH en el sistema cromatográfico.

De esta manera, a través de este estudio no solo se analizó el sistema adaptado, sino también como afecta la morfología del relleno monolítico en la separación y en los caudales de fase móvil operacionales.

**Tabla III.14.** Composiciones porcentuales respecto al peso total de las mezclas poliméricas. Ambas columnas se polimerizaron térmicamente por 12 y 20 horas a 60 °C.

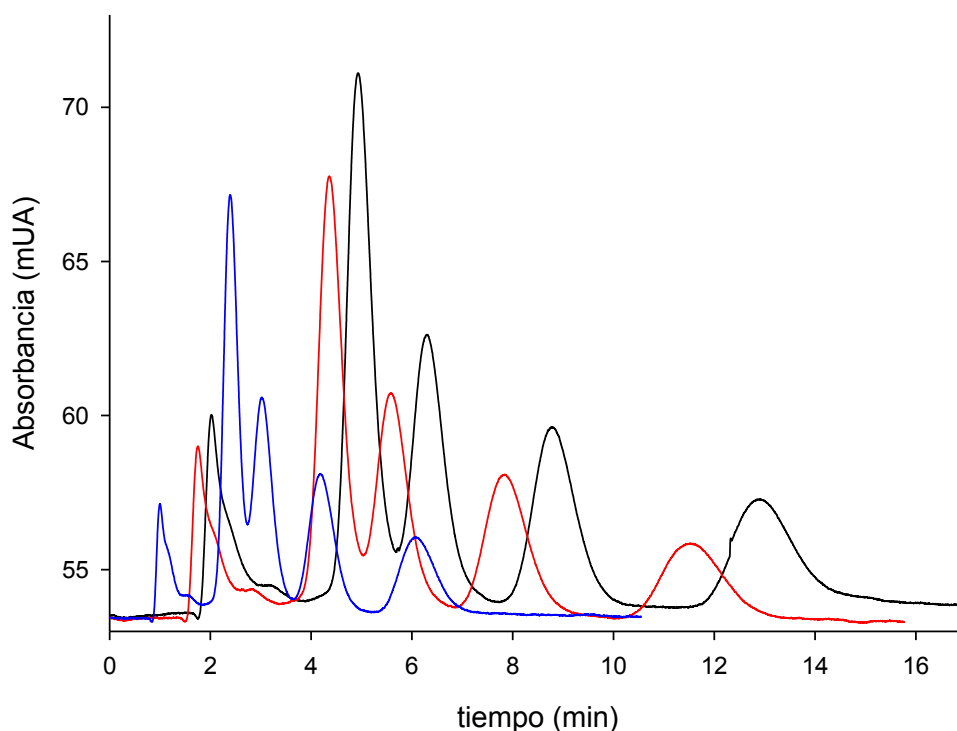
Mezcla	LMA	EDMA	1,4-Butanodiol	n-Propanol	AIBN	Monom./ entrecruzante	Monom./ porógenos
1	23,6	16,3	18,0	41,7	0,4	60/40	40/60
2	25,6	13,4	17,3	41,0	0,4	65/35	40/60
3	14,4	25,6	17,6	42,6	0,4	35/65	40/60

En la tabla III.14. se puede observar que para las 3 mezclas se mantuvo constante la relación monómeros/solvente porogénico en 40/60, y que para una cantidad similar de 1,4-butanodiol, se varió la relación de monómero/entrecruzante. El fin de estas mezclas fue buscar un aporte hidrofóbico significativo como fase estacionaria

Todas las columnas desarrolladas fueron de iguales dimensiones, 11 cm de longitud y 500  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. Además las mezclas 1, 2 y 3 se realizaron por duplicado.

### **Efecto del caudal F1**

Se estudió la separación a tres niveles de caudal diferentes proporcionados por la bomba primaria (F1), 0,15; 0,20; y 0,30  $\text{mL min}^{-1}$ . Para esto se utilizó la mezcla 2, que fue polimerizada durante 12 hrs a 60 °C.



**Figura III.34.** Cromatograma de alquilbencenos en columna monolítica 2 polimerizada durante 12 hrs (la composición se describe en tabla III.10.). Dimensiones: 11 cm x 500  $\mu\text{m}$ . Condiciones: F1 0,15 (negro); 0,2 (rojo) y 0,3 (azul)  $\text{mL min}^{-1}$ , 55 %B, siendo A  $\text{H}_2\text{O}$  y B ACN. F2: 20, 29 y 51  $\mu\text{L min}^{-1}$  respectivamente. Capilar de restricción de 10 cm x 50  $\mu\text{m}$ . Detección: 254 nm.  $\Delta P$ : 44, 60 y 74 bares. Vol. Inyección 34 nL. Identificación de picos según orden de elución: 1-uracilo, 2-tolueno, 3-etil benceno, 4-propilbenceno y 5- butilbenceno.

El aumento en el caudal proporcionado por las bombas binarias del sistema, F1, y por consiguiente el flujo F2 que ingresa a la columna, produce una reducción significativa del tiempo de análisis (50 %) para una misma restricción en el divisor de flujo. Así mismo, se obtuvo una resolución aceptable entre los dos analitos más comprometidos para todos los caudales ( $R_s$  de 0,98, correspondientes al segundo y tercer pico del cromatograma azul en la Figura III.34.). Para estas condiciones aplicadas se obtuvieron valores de caudal F2 acordes para este tipo de sistemas capilares y con una buena reproducibilidad ( $< 2,9\% \text{RSD}$ ).

La tabla III.15 resume los parámetros cromatográficos para las tres condiciones de caudal primario F1 empleadas.

**Tabla III.15.** Valores de factor de retención ( $k$ ), ancho de pico a mitad de altura ( $W_{0,5}$ ), resolución ( $R_s$ ) y eficiencia ( $N$ ). A, B y C son los tres caudales F1 0,15; 0,2 y 0,3 respectivamente. Los valores de tiempo muerto ( $t_M$ ) fueron de 2,02; 1,753 y 0,421 min.

Analito	k			W 0,5 (min)			Rs			N (platos por metro)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Tolueno	1,44	1,49	1,40	0,547	0,52	0,323	3,57	3,3	2,73	3040	3890	4520
Etil benceno	2,12	2,19	2,03	0,693	0,687	0,437	1,3	1,2	0,98	2660	3670	4570
Propil benceno	3,34	3,47	3,20	0,927	0,94	0,553	1,79	1,63	1,39	3170	3850	4950
Butil benceno	5,39	5,56	5,10	1,35	1,373	0,783	2,15	1,87	1,67	3330	3890	5070

Tal como se demostró en la sección anterior, en donde se estableció la relación lineal entre caudales y caída de presión, se pudo comprobar que bajo condiciones de separación y un sistema cerrado (conectado al detector), existe una buena correlación para  $F_2$  y  $\Delta P$ , con un coeficiente de correlación de 0,972.

### ***Efecto del tiempo de polimerización sobre la resolución cromatográfica***

Se compararon para cada una de las mezclas poliméricas (tabla III.14.), las resoluciones de alquilbencenos en dos columnas polimerizadas térmicamente, una a 12 y otra a 20 horas. Las separaciones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de caudal secundario ( $F_2$ ) y composición de fase móvil. El  $F_2$  se pudo ajustar para cada columna cambiando las dimensiones del capilar de restricción en cada caso (tabla III.16).

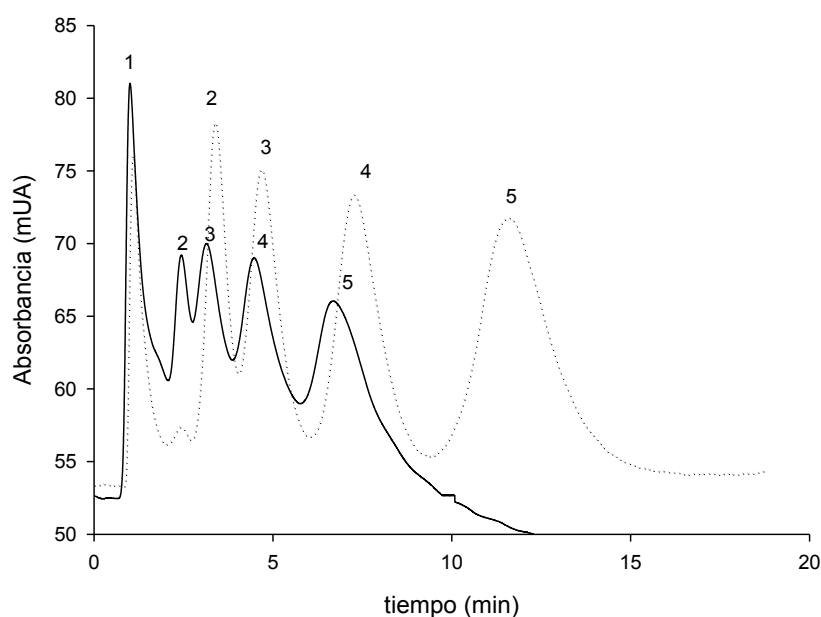


**Tabla III.16.** Valores experimentales obtenidos para cada una de las columnas monolíticas de 11 cm x 500 μm, para una misma composición de fase móvil.

Mezcla	Tiempo de polimerización (hrs)	F1 (mL min <sup>-1</sup> )	F2 (μL min <sup>-1</sup> )	ΔP (bares)	Dimensión restricción (cm x μm)	% ACN
M1	12	0,04	30	26	50X25	55
	20	0,095	35	49	50X50	55
M2	12	0,075	31	57	50X25	55
	20	0,13	30	58	50X50	55
M3	12	0,11	29	41	20X50	55
	20	0,17	33	86	50X50	55

### MEZCLA 1

La Figura III.35. presenta los cromatogramas obtenidos para las columnas sintetizadas a los dos tiempos de polimerización térmica a 60 °C.



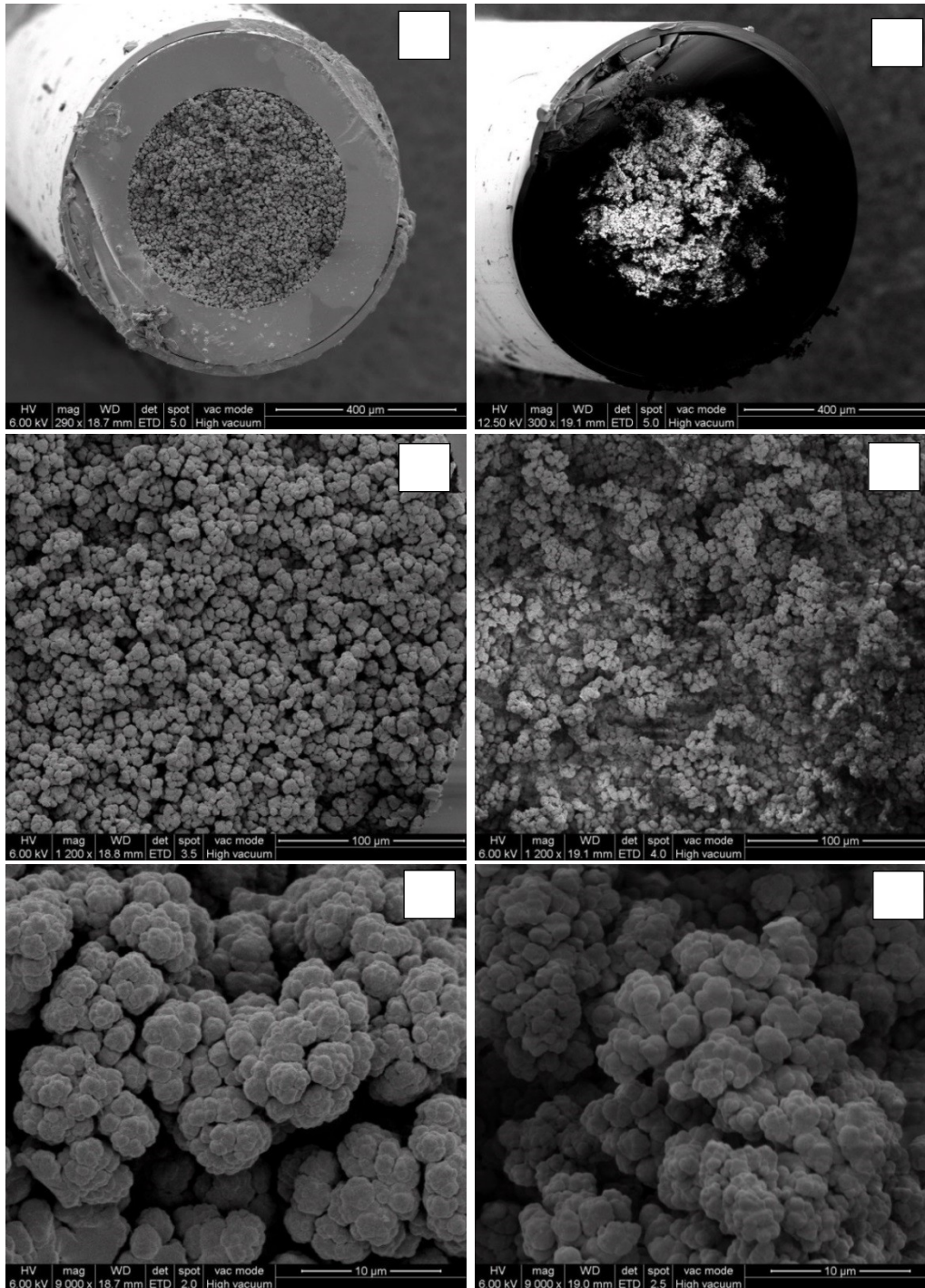
**Figura III.35.** Cromatograma de alquil bencenos en columna monolítica 1 polimerizada durante 12 (línea de puntos) y 20 horas (línea de continua). La composición se describe en la tabla III.10. Dimensiones: 11 cm x 500 μm. Las condiciones experimentales se describen en la tabla III.16. Vol. Inyección 34 nL. Detección: 254 nm. Identificación de picos: 1-uracilo, 2-tolueno, 3-etil benceno, 4-propilbenceno y 5- butil benceno.

De los cromatogramas se puede observar que para la mezcla 1, bajo las mismas condiciones de separación, se obtiene una mejor resolución y eficiencia para aquella columna que fue sometida a una polimerización de 12 horas. Los resultados cromatográficos relevantes se detallan en la tabla III.17.

**Tabla III.17.** Valores de factor de retención ( $k$ ), ancho de pico a mitad de altura ( $W_{0,5}$ ), resolución ( $R_s$ ) y eficiencia ( $N$ ) para las columnas monolíticas de la M1 polimerizadas durante 12 hrs. Los valores de tiempo muerto ( $t_M$ ) fueron de 1,077 y 1,005 min.

Analito	$k$		$W_{0,5}$ (min)		$R_s$		$N$ (platos m)	
	12	20	12	20	12	20	12	20
Tolueno	2,13	1,43	0,66	0,683	1,44	0,84	1440	710
Etil benceno	3,34	2,13	0,972	1,117	0,94	0,46	1280	440
Propil benceno	5,74	3,46	1,358	1,532	1,31	0,6	1580	470
Butil benceno	9,72	5,63	2,137	2,093	1,45	0,71	1620	560

Los resultados de eficiencia y resolución muestran una mejor separación para la columna que fue polimerizada durante 12 horas. La Figura III.36 muestra las imágenes SEM para estas dos columnas monolíticas, donde se puede diferenciar claramente la morfología de cada una de las columnas.



**Figura III.36.** Imágenes SEM a tres diferentes aumentos y zonas de la sección transversal de una columna monolítica de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro interno de la mezcla 1 polimerizada por 20 horas (a, b y c), y por 12 horas (d, e y f).

El tamaño individual de los glóbulos del polímero difiere significativamente, donde la estructura de poro con una polimerización por terminación forzada (12 horas) muestra rasgos de glóbulos menores frente a una conversión completa

(20 horas). De la comparación de la Figura III.36 b y e, se observa que el monolito polimerizado a 12 horas es más poroso con un tamaño de glóbulo más pequeño.

La diferencia entre ambos es que la fase de glóbulos de polímero inter-adheridos va perdiendo cada vez más su individualidad y la polimerización completa conduce a grupos más grandes. El resultado es una estructura con grupos de glóbulos mayores (Figura III.36.c).

En la tabla III.18 se detallan las propiedades de los poros de los rellenos monolíticos obtenidos por adsorción-desorción de nitrógeno para las tres mezclas poliméricas.

**Tabla III.18.** <sup>a</sup> Área superficial total luego de aplicar BET (Brunauer–Emmet–Teller<sup>9</sup>, y <sup>B</sup> Volumen de poro específico aplicando BJH (Barrett–Joyner–Halend) basados en poros entre 1-300 nm.

Mezcla	Tiempo de polimerización (hrs)	Diámetro de poro (nm)	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)-BET <sup>a</sup>	Volumen de poro (mL/g)-BJH <sup>b</sup>
M1	12	75	75	0,31
	20	57	33	0,27
M2	12	54	68	0,10
	20	39	18	0,06
M3	12	44	89	0,4
	20	18	22	0,18

Los resultados de caracterización por isotermas de adsorción muestran la tendencia correspondiente al tiempo de polimerización para el tamaño de glóbulos y área superficial en concordancia con lo observado en las imágenes SEM, y como se pudo demostrar experimentalmente en las separaciones cromatográficas. Similares resultados también fueron obtenidos para las mezclas M2 y M3 (descriptas en la tabla III.14). De estas mezclas se puede observar que el cambio en la relación monómero/entrecruzante afecta a las dimensiones de área superficial y volumen de poro.

Los bajos valores de áreas obtenidos, son típicos de monolitos metacrílicos. La mayor área obtenida para los monolitos con menor tiempo de polimerización puede explicarse por los pequeños glóbulos altamente entrecruzados que se forman en las primeras etapas de la polimerización donde se separan las fases rápidamente produciendo una mayor área superficial. Sin embargo, el hecho que el volumen total de poros esté entre 1 y 300 nm indica la gran ausencia de mesoporos en los glóbulos cuando el monolito se encuentra en estado seco.

Las separaciones obtenidas para las tres mezclas poliméricas de lauril metacrilato-co-etilen dimetacrilato a los dos tiempos de polimerización, reflejan una baja performance en la separación de moléculas pequeñas. Parte de esto se discute en la literatura, e incluye principalmente la justificación de una baja distribución de mesoporos, provocando una reducida área superficial.

El comportamiento general observado para aquellos monolitos sintetizados durante un tiempo menor (polimerización cortada luego de 12 horas), fue una retención levemente mayor bajo las mismas condiciones de separación. Dichas condiciones se lograron por el ajuste en el flujo F1 y en los capilares de contrapresión. De esto se pudo observar una menor permeabilidad para los rellenos monolíticos con menores tiempos de polimerización.

Cabe destacar, que se deberían esperar cambios en los tiempos del marcador de tiempo muerto, dado por los cambios en porosidad. La ausencia de este fenómeno, se puede deber en parte a que los cambios morfológicos no son significativamente grandes para que esto ocurra.

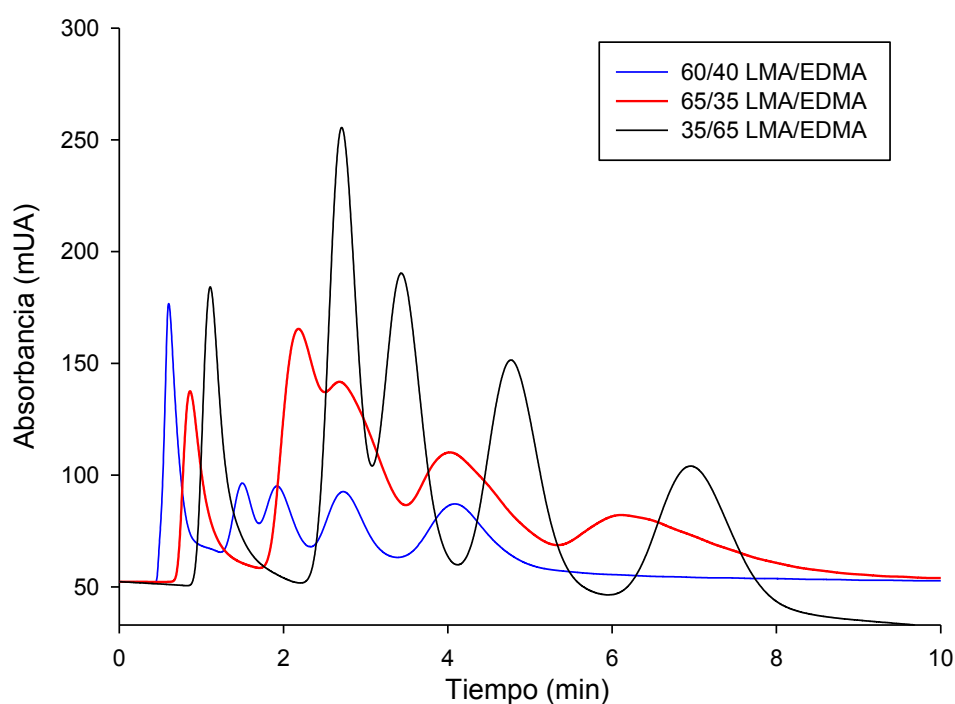
### ***Efecto de la relación monómero/agente entrecruzante***

Este análisis se realizó como estudio complementario para determinar la contribución a la hidrofobicidad del relleno con el aumento o disminución de la cantidad de LMA en la mezcla polimérica, teniendo en cuenta el consecuente cambio en la morfología. La comparación se llevó a cabo para las tres mezclas de la tabla III.14. polimerizadas durante 12 horas. Las condiciones

experimentales se detallan en la tabla III.19, y los resultados de la separación se muestran en la Figura III.37.

**Tabla III.19.** Valores experimentales obtenidos para cada una de las columnas monolíticas de 10 cm x 500  $\mu\text{m}$ , para una misma composición de fase móvil.

Mezcla	F1 ( $\text{mL min}^{-1}$ )	F2 ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	$\Delta\text{P}$ (bares)	Dimensiones restricción (cm x $\mu\text{m}$ )	% ACN
<b>M1</b>	0.06	43	35	50X25	55
<b>M2</b>	0.075	41	57	50X25	55
<b>M3</b>	0.11	38	39	20X50	55



**Figura III.37.** Separación de una mezcla de alquil bencenos en columnas monolíticas polimerizada durante 12 horas de la mezcla 1 (azul), mezcla 2 (rojo), y mezcla 3 (negro). La composición se describe en la tabla III.14. Dimensiones: 11 cm x 500  $\mu\text{m}$ . Las condiciones experimentales se describen en la tabla III.16. Volumen inyectado: 34 nL. Detección: 214 nm. Identificación de picos: 1-uracilo, 2-tolueno, 3-etil benceno, 4-propilbenceno y 5- butil benceno.

**Tabla III.20.** Valores de factor de retención ( $k$ ), ancho de pico a mitad de altura ( $W_{0,5}$ ), resolución ( $R_s$ ) y eficiencia ( $N$ ), para las tres mezclas descritas en la tabla III.14. Los valores de tiempo muerto ( $t_M$ ) fueron de 0,603; 0,862 y 1,107 min.

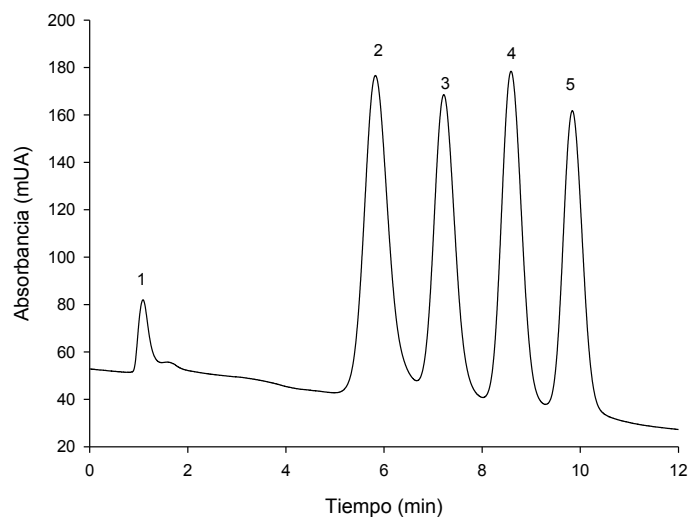
Analito	k			W <sub>0,5</sub> (min)			R <sub>s</sub>			N (platos x m)		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
Tolueno	1,49	2,62	3,49	0,355	0,542	0,393	2,01	1,95	2,92	990	900	2620
Etilbenceno	2,19	3,45	4,69	0,475	0,77	0,543	0,6	0,41	0,91	910	670	2210
Propilbenceno	3,52	5,67	6,91	0,592	1,307	0,703	0,89	0,76	1,27	1180	530	2550
Butilbenceno	5,78	9,13	10,54	0,855	1,983	0,999	1,11	0,74	1,52	1270	530	268

Los parámetros cromatográficos y los cromatogramas obtenidos muestran que una relación de 35/65 LMA/EDMA, genera una mayor resolución y retención, a expensas de un pequeño aumento del tiempo de análisis para una misma condición experimental aplicada. De la tabla III.18. se puede observar que la mezcla M3 tiene la mayor área superficial ( $89 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), lo que permite concluir que este cambio en el contenido de LMA no se debe analizar aisladamente. Es por esto que se toma la relación monómero/entrecruzante (LMA/EDMA), ya que es mayor el aporte sobre un pequeño cambio en la morfología, respecto a la adición de muchas cadenas alquílicas que estén poco accesibles.

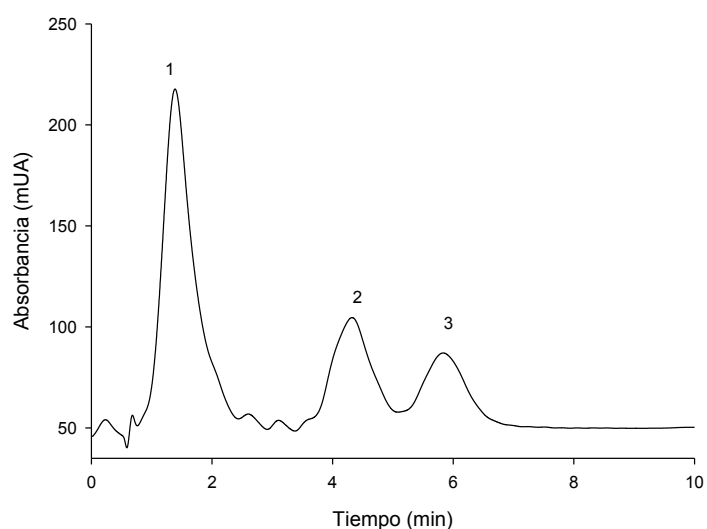
### Aplicación de un gradiente de elución

Se seleccionó la mezcla con mejor performance en condiciones isocráticas, correspondiente a la mezcla 3 polimerizada por 12 horas. Con esta columna se llevaron a cabo dos separaciones utilizando un gradiente en el sistema LC-capilar. A la separación de la mezcla de estándares de alquilbencenos, se adicionó la separación de una mezcla de compuestos ionizables de fenol, 4-

cloro-m-cresol y 4-cloro anilina. Los resultados se muestran en la Figura III.38 y III.39.



**Figura III.38.** Separación de una mezcla de alquilbencenos empleando la columna monolítica polimerizada durante 12 horas de mezcla 3. La composición se describe en la tabla III.10. Dimensiones: 11 cm x 500  $\mu\text{m}$ . Condiciones experimentales: F1 0,12 mL  $\text{min}^{-1}$ ; F2: 29  $\mu\text{L min}^{-1}$ ;  $\Delta P$  48 bares; capilar de restricción 20 cm x 50  $\mu\text{m}$ . La composición se varió de 40-100 % ACN en 20 minutos. Volumen inyectado: 34 nL. Detección: 214 nm. Identificación de picos según orden de elución uracilo, tolueno, etilbenceno, propilbenceno y butilbenceno.



**Figura III.39.** Separación de una mezcla de compuestos polares, empleando la columna monolítica polimerizada durante 12 horas de mezcla 3. La composición se describe en la tabla III.10. Dimensiones: 11 cm x 500  $\mu\text{m}$ . Condiciones experimentales: F1 0.175 mL  $\text{min}^{-1}$ ; F2: 41  $\mu\text{L min}^{-1}$ ;  $\Delta P$  98 bares; capilar de restricción 50 cm x 50  $\mu\text{m}$ . La composición se varió de 20-100 % ACN en 20 minutos. Volumen inyectado: 34 nL. Detección: 214 nm. Identificación de picos: 1) fenol, 2) 4-clorocresol y 3) 4-cloroanilina.



## Reproducibilidad

Se estudiaron las reproducibilidades de las columnas monolíticas en dos aspectos. Para dicho propósito se seleccionó la mezcla 3, para la cual el monolito generado proporcionó los mejores valores entre performance de separación y tiempo de análisis. Para la determinación de las reproducibilidades entre columnas y entre mezclas (misma mezcla por triplicado), se tomaron los parámetros de flujo secundario F2 obtenido para una misma restricción y el factor de retención del propilbenceno. De esta manera se prepararon y examinaron 2 mezclas de una misma composición preparadas por separado, generando dos columna por mezcla, cada una polimerizada a los dos tiempos de polimerización seleccionados, 12 y 20 horas. Los resultados se muestran en la Tabla III.21.

**Tabla III.21.** Mezclas de polimerización M3 según tabla III.10. condición de elución isocrática 45/55 H<sub>2</sub>O/ACN. El capilar de restricción para la columnas polimerizadas por 12 horas fue de 50 cm x 50  $\mu$ m, y para las de 20 horas 20 cm x 50  $\mu$ m.

Parámetros	12 horas				20 horas			
	Entre columnas (n=4)		Entre mezclas (n=2)		Entre columnas (n=4)		Entre mezclas (n=2)	
	promedio	% RSD	promedio	% RSD	promedio	% RSD	promedio	% RSD
<b>F2</b> ( $\mu$ L min <sup>-1</sup> )	29	4,3	32	6,9	38	4,9	40	7
<b>k propil benceno</b>	4,9	5,6	5,2	9,3	9,8	6,0	10,3	10,3

La reproducibilidad entre columnas obtenida para ambos tiempos de polimerización fue buena tanto en permeabilidad (constancia en F2) como en retentividad. Mientras que para las reproducibilidades entre mezclas los valores son un poco más elevados, entre 6,9 y 10,3 % de RSD. No obstante los valores confirman una buena reproducibilidad para ambos tiempos de polimerización térmica desarrollados.

### III.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se ha logrado sintetizar varias columnas monolíticas poliméricas metacrílicas con diferentes morfologías y características cromatográficas. Estas columnas fueron caracterizadas y empleadas en sistemas separativos miniaturizados.

Se encontró la imposibilidad de establecer y/o desarrollar un método separativo analítico efectivo para los FMOC-AAAs, bajo la modalidad CEC, empleando columnas monolíticas poliméricas metacrílicas para generadores de EOF positivo y negativo. Esto genera la necesidad de búsqueda de fases estacionarias más acordes para la contribución hidrofóbica, ya que la diferencia en movilidades electroforéticas no fue selectiva.

En HPLC a escala reducida, la entrada del gradiente dentro del paso interno del sistema de inyección retrasa en gran medida la llegada del frente del gradiente hacia la columna, reduciendo también la pendiente del gradiente por mezclado. Así, si la válvula de inyección se mantiene en “mainpass” durante la elución, se pierde el control de las condiciones de elución, lo que dificulta o impide una adecuada optimización y transferencia del método. Esto puede evitarse cambiando la posición de la válvula a la posición bypass luego de la inyección. Esta operación debe realizarse antes de la llegada del frente del gradiente a la válvula, y luego de que todo el pulso de la muestra haya pasado la válvula ( $t_V$ ). Para una buena optimización, estos dos sucesos pueden sincronizarse.

Se han demostrado los beneficios obtenidos por el cambio en la posición de la válvula a “bypass” inmediatamente después de  $t_V$ , o por el uso apropiado de  $t_V$  y  $t_M$  para sincronizar ambos sistemas miniaturizados a escala de micro y a escala de nanolitros.

Con el programa que controla el instrumento, se facilitó la sincronización de la elución, la opción de comenzar el gradiente antes de la inyección debió incluirse en el programa controlador.

En las condiciones óptimas del sistema sincronizado, se obtuvo una satisfactoria separación de los aminoácidos en la columna particulada en el sistema nano-LC. Las características de esta columna comercial fueron

comparadas con una columna monolítica de metacrilato desarrollada en el laboratorio, observándose una mejor eficiencia y resolución en la columna comercial.

Finalmente se ensambló y optimizó un sistema micro-LC sobre un equipo de HPLC convencional. En este sistema se optimizó la división de flujo, para obtener caudales razonables partiendo de una bomba binaria convencional hacia un sistema de micro-flujo. Sobre este sistema se llevó a cabo la separación de una mezcla de alquil bencenos usando distintas columnas monolíticas poliméricas de LMA-co-EDMA, obteniendo resultados muy prometedores para este sistema sencillo y económico. De este sistema se deben resaltar 3 grandes ventajas respecto a un sistema capilar comercial como el descrito en este capítulo: 1-Los volúmenes de las conexiones del sistema que aportan a la dispersión extra columna son menores (a excepción de la celda del detector), 2- no hay fenómenos de memoria entre inyecciones, y 3- el sistema no requiere de ninguna sincronización para la aplicación de un gradiente.

## CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de este trabajo de tesis permitió la evaluación de columnas modernas para cromatografía líquida como las monolíticas y las de partículas con núcleo sólido, como así también las partículas convencionales (porosas), para aumentar la velocidad de análisis en la separación de citrulina y aminoácidos metabólicamente relacionados. Para este análisis se estudió la derivatización pre-columna en todas sus variables de reacción (pH, concentración del buffer, tiempo, etc) alcanzando buenas reproducibilidades en la derivatización.

Se desarrollaron métodos separativos rápidos mediante cromatografía de líquidos trabajando con columnas monolíticas poliméricas de dimensiones reducidas a base de monómeros metacrílicos, las cuales fueron sintetizadas y caracterizadas en el laboratorio.

A su vez se llevó a cabo el análisis a una escala micro y nano (equipos comerciales) y a una escala capilar en un equipo convencional adaptado para tales fines utilizando las columnas monolíticas desarrolladas en el laboratorio.

Se validó un método separativo para aminoácidos en una columna monolítica comercial de sílice (Chromolith) para el análisis de citrulina, un aminoácido presente en plasma y de interés diagnóstico en el seguimiento de patologías que afectan la integridad de los enterocitos humanos.

# REFERENCIAS

- [1] Y. Xiang, Y. Liu, M.L. Lee, Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature., *J. Chromatogr. A.* 1104 (2006) 198–202.
- [2] J.E. MacNair, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, Ultrahigh-Pressure Reversed-Phase Liquid Chromatography in Packed Capillary Columns, *Anal. Chem.* 69 (1997) 983–989.
- [3] J.J. Kirkland, T.J. Langlois, J.J. Destefano, Fused Core Particles for HPLC Columns, (2007) 18–21.
- [4] J.J. Destefano, T.J. Langlois, J.J. Kirkland, Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: some performance comparisons with sub-2-microm particles., *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 254–260.
- [5] H. Kobayashi, T. Ikegami, H. Kimura, T. Hara, D. Tokuda, N. Tanaka, Properties of monolithic silica columns for HPLC., *Anal. Sci.* 22 (2006) 491–501.
- [6] K.K. Unger, R. Skudas, M.M. Schulte, Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal., *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 393–415.
- [7] R. Skudas, B. a Grimes, M. Thommes, K.K. Unger, Flow-through pore characteristics of monolithic silicas and their impact on column performance in high-performance liquid chromatography., *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2625–36.
- [8] J. Gotta, J.O. Grisales, M.R. Reta, C.B. Castells, Fast RPLC analysis of pharmaceutical compounds at intermediate temperatures by using a conventional instrument, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2645–2653.
- [9] P. Crenn, C. Coudray–Lucas, F. Thuillier, L. Cynober, B. Messing, Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans, *Gastroenterology.* 119 (2000) 1496–1505.
- [10] P. Crenn, K. Vahedi, A. Lavergne-Slove, L. Cynober, C. Matuchansky, B. Messing, Plasma citrulline: a marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease, *Gastroenterology.* 124 (2003) 1210–1219.
- [11] E. Domínguez-Vega, A.L. Crego, K. Lomsadze, B. Chankvetadze, M.L. Marina, Enantiomeric separation of Fmoc-amino acids by nano-LC and CEC using a new chiral stationary phase, cellulose tris(3-chloro-4-methylphenylcarbamate)., *Electrophoresis.* 32 (2011) 2700–2707.
- [12] V. Poinsoot, M.-A. Carpéné, J. Bouajila, P. Gavard, B. Feurer, F. Couderc, Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis., *Electrophoresis.* 33 (2012) 14–35.
- [13] D. Fekkes, a van Dalen, M. Edelman, a Voskuilen, Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthaldialdehyde., *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 669 (1995) 177–186.
- [14] G. Wu, C.J. Meininger, Analysis of citrulline, arginine, and methylarginines using high-performance liquid chromatography., *Methods Enzymol.* 440 (2008) 177–89.

- [15] E.L. Schwarz, W.L. Roberts, M. Pasquali, Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection., *Clin. Chim. Acta.* 354 (2005) 83–90.
- [16] M.C. García Alvarez-Coque, M.J. Medina Hernández, R.M. Villanueva Camañas, C. Mongay Fernández, Formation and instability of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids, *Anal. Biochem.* 178 (1989) 1–7.
- [17] S. Einarsson, B. Josefsson, Determination of AAs with FMOC and RPHPLC, *J. Chromatogr.* 282 (1983) 609–618.
- [18] Y.V. Tcherkas, L.A. Kartsova, I.N. Krasnova, Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. A.* 913 (2001) 303–308.
- [19] T. Fujita, K. Yanaga, Association between glutamine extraction and release of citrulline and glycine by the human small intestine., *Life Sci.* 80 (2007) 1846–1850.
- [20] P. Hernández-Orte, A. Guitart, J. Cacho, Changes in the concentration of amino acids during the ripening of vitis vinifera Tempranillo variety from the Denomination d'Origine Somontano (Spain), *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (1999) 144–154.
- [21] P. Herbert, L. Santos, A. Alves, Simultaneous Quantification of Primary, Secondary Amino Acids, and Biogenic Amines in Musts and Wines Using OPA/3-MPA/FMOC-Cl Fluorescent Derivatives, *J. Food Sci.* 66 (2001) 1319–1325.
- [22] J. Kirschbaum, B. Luckas, W.-D. Beinert, Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine, *J. Chromatogr. A.* 661 (1994) 193–199.
- [23] J. You, H. Sun, W. Lao, Q. Ou, Fluorescence properties of carbazole-9-yl-acetyl chloride and its application for the simultaneous determination of amino acids and biogenic amines via liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta.* 382 (1999) 51–65.
- [24] G. Nouadje, H. Rubie, E. Chatelut, P. Canal, M. Nertz, P. Puig, et al., Child cerebrospinal fluid analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.* 717 (1995) 293–298.
- [25] Y. Ma, R. Zhang, C.L. Cooper, Indirect photometric detection of polyamines in biological samples separated by high-performance capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 608 (1992) 93–96.
- [26] S.K. Sadain, J.A. Koropchak, Condensation nucleation light scattering detection for biogenic amines separated by ion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A.* 844 (1999) 111–118.
- [27] V.R. Villanueva, R.C. Adlakha, Automated analysis of common basic amino acids, mono-, di-, and polyamines, phenolicamines, and indoleamines in crude biological samples, *Anal. Biochem.* 91 (1978) 264–275.
- [28] a Jámbor, I. Molnár-Perl, Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride., *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 6218–6223..
- [29] Z. Chen, J. Wu, G.B. Baker, M. Parent, N.J. Dovichi, Application of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to the determination of

- biogenic amines and amino acids in brain microdialysate and homogenate samples, *J. Chromatogr. A.* 914 (2001) 293–298.
- [30] E. Curis, P. Crenn, L. Cynober, Citrulline and the gut., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 10 (2007) 620–626.
- [31] W.-C. Yang, H. Mirzaei, X. Liu, F.E. Regnier, Enhancement of Amino Acid Detection and Quantification by Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4702–4708.
- [32] S. Inagaki, Y. Tano, Y. Yamakata, T. Higashi, J.Z. Min, T. Toyo'oka, Highly sensitive and positively charged precolumn derivatization reagent for amines and amino acids in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 1358–1364.
- [33] H. Braconnot, No Title, *Ann. Chim. Phys.* (1820) 113.
- [34] J. Kjeldahl, A new method for the determination of nitrogen in organic matter, *Z. Anal. Chem.* 22 (1883) 10–1007.
- [35] A.J. Martin, R.L. Synge, A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins., *Biochem. J.* 35 (1941) 1358–1368.
- [36] R.L. Synge, Analysis of a partial hydrolysate of gramicidin by partition chromatography with starch., *Biochem. J.* 38 (1944) 285–294.
- [37] T. Santa, Derivatization in liquid chromatography for mass spectrometric detection., *Drug Discov. Ther.* 7 (2013).
- [38] P. Uutela, R.A. Ketola, P. Piepponen, R. Kostianen, Comparison of different amino acid derivatives and analysis of rat brain microdialysates by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 633 (2009) 223–231.
- [39] I. Krause, A. Bockhardt, H. Neckermann, T. Henle, H. Klostermeyer, Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives, *J. Chromatogr. A.* 715 (1995) 67–79.
- [40] W. Zhang, D.M. Kaye, Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthalaldehyde precolumn derivatization., *Anal. Biochem.* 326 (2004) 87–92.
- [41] H. Mao, W. Wei, W. Xiong, Y. Lu, B. Chen, Z. Liu, Simultaneous determination of l-citrulline and l-arginine in plasma by high performance liquid chromatography., *Clin. Biochem.* 43 (2010) 1141–1147.
- [42] H. Sultana, R. Onodera, M.M. Or-Rashid, S. Wadud, Convenient method for the determination of arginine and its related compounds in rumen fluid by reversed-phase high-performance liquid chromatography., *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 755 (2001) 321–329.
- [43] M.F. Malmer, L.A. Schroeder, Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with methanesulfonic acid hydrolysis and derivatization, *J. Chromatogr. A.* 514 (1990) 227–239.

- [44] I. Molnár-Perl, Quantitation of amino acids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately, *J. Chromatogr. A.* 987 (2003) 291–309.
- [45] A Jámbo, I. Molnár-Perl, Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride Literature overview and further study., *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 3064–3077.
- [46] K. Shimbo, A. Yahashi, K. Hirayama, M. Nakazawa, H. Miyano, Multifunctional and Highly Sensitive Precolumn Reagents for Amino Acids in Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5172–5179.
- [47] Z. Liu, P.E. Minkler, D. Lin, L.M. Sayre, Derivatization of amino acids with N,N-dimethyl-2,4-dinitro-5-fluorobenzylamine for liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1059–1065.
- [48] I. Molnár-Perl, Advancement in the derivatizations of the amino groups with the o-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride reagents., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1241–1269.
- [49] E. Curis, I. Nicolis, C. Moinard, S. Osowska, N. Zerrouk, S. Bénazeth, et al., Almost all about citrulline in mammals., *Amino Acids.* 29 (2005) 177–205.
- [50] William M. Haynes, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 93rd Editi, Taylor & Francis, FL, USA, n.d.
- [51] J. López-Cervantes, D.I. Sánchez-Machado, J. a Rosas-Rodríguez, Analysis of free amino acids in fermented shrimp waste by high-performance liquid chromatography., *J. Chromatogr. A.* 1105 (2006) 106–110.
- [52] D. Shanguan, Y. Zhao, H. Han, R. Zhao, G. Liu, Derivatization and Fluorescence Detection of Amino Acids and Peptides with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate on the Surface of a Solid Adsorbent, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2054–2057.
- [53] Y. Mengerink, D. Kutlán, F. Tóth, A. Csámpai, I. Molnár-Perl, Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents, *J. Chromatogr. A.* 949 (2002) 99–124.
- [54] J.-W. Kim, S.-U. Kim, H.S. Lee, I. Kim, M.Y. Ahn, K.S. Ryu, Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1002 (2003) 93–99.
- [55] B. Gustavsson, I. Betnér, I. Betnér, Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and 1-aminoadamantane, *J. Chromatogr. A.* 507 (1990) 67–77.
- [56] V. Lozanov, S. Petrov, V. Mitev, Simultaneous analysis of amino acid and biogenic polyamines by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization with N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide, *J. Chromatogr. A.* 1025 (2004) 201–208.
- [57] T. Näsholm, G. Sandberg, A. Ericsson, Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives, *J. Chromatogr. A.* 396 (1987) 225–236.



- [58] R. a Bank, E.J. Jansen, B. Beekman, J.M. te Koppele, Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate., *Anal. Biochem.* 240 (1996) 167–176.
- [59] C. V McNeff, B. Yan, D.R. Stoll, R.A. Henry, Practice and theory of high temperature liquid chromatography., *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1672–1685..
- [60] C.J. Dunlap, P.W. Carr, C. V. McNeff, D. Stoll, Peer Reviewed: Zirconia Stationary Phases for Extreme Separations, *Anal. Chem.* 73 (2001) 598 A–607 A.
- [61] H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography., *J. Chromatogr. A.* 954 (2002) 5–32.
- [62] N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, et al., Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations., *J. Chromatogr. A.* 965 (2002) 35–49.
- [63] F. Svec, J.M.J. Fre, Molded Rigid Monolithic Porous Polymers : An Inexpensive , Efficient , and Versatile Alternative to Beads for the Design of Materials for Numerous Applications, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (1999) 34–48.
- [64] N. Wu, A.M. Clausen, Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1167–1182.
- [65] D.T.-T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1836–1848.
- [66] G. Guiochon, F. Gritti, Shell particles, trials, tribulations and triumphs., *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 1915–1938.
- [67] J.J. Destefano, S. a Schuster, J.M. Lawhorn, J.J. Kirkland, Performance characteristics of new superficially porous particles., *J. Chromatogr. A.* 1258 (2012) 76–83.
- [68] E. Grata, J. Boccard, D. Guillarme, G. Glauser, P.-A. Carrupt, E.E. Farmer, et al., UPLC-TOF-MS for plant metabolomics: a sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 871 (2008) 261–270.
- [69] T. Teutenberg, J. Tuerk, M. Holzhauser, S. Giegold, Temperature stability of reversed phase and normal phase stationary phases under aqueous conditions, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1101–1114.
- [70] J.D. Thompson, P.W. Carr, A Study of the Critical Criteria for Analyte Stability in High-Temperature Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1017–1023.
- [71] F. D. Antia, C. Horváth, High-performance liquid chromatography at elevated temperatures: examination of conditions for the rapid separation of large molecules, *J. Chromatogr. A.* 435 (1988) 1–15.
- [72] B. Yan, J. Zhao, J.S. Brown, J. Blackwell, P.W. Carr, High-temperature ultrafast liquid chromatography., *Anal. Chem.* 72 (2000) 1253–1262.
- [73] H. Chen, C. Horváth, High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins, *J. Chromatogr. A.* 705 (1995) 3–20.

- [74] P. Pressltd, V.A.N. Deemter, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271–289.
- [75] J.H. Knox, Practical Aspects of LC Theory, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 352–364.
- [76] F. Lestremau, A. de Villiers, F. Lynen, A. Cooper, R. Szucs, P. Sandra, High efficiency liquid chromatography on conventional columns and instrumentation by using temperature as a variable. Kinetic plots and experimental verification., *J. Chromatogr. A.* 1138 (2007) 120–131.
- [77] J. Nawrocki, C. Dunlap, a. McCormick, P.W. Carr, Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *J. Chromatogr. A.* 1028 (2004) 1–30.
- [78] C. West, C. Elfakir, M. Lafosse, Porous graphitic carbon: a versatile stationary phase for liquid chromatography., *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3201–3216.
- [79] J.J. Pesek, M.T. Matyska, Modified aluminas as chromatographic supports for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 952 (2002) 1–11.
- [80] C.. Jaroniec, M. Jaroniec, M. Kruk, Comparative studies of structural and surface properties of porous inorganic oxides used in liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 797 (1998) 93–102.
- [81] J. Winkler, S. Marmé, Titania as a sorbent in normal-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 888 (2000) 51–62..
- [82] A.D. Jerkovich, J.S. Mellors, J.W. Jorgenson, R.E. Majors, The Use of Micrometer-Sized Particles in Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography, 21 (2003).
- [83] M.E. Swartz, UPLC™: An Introduction and Review, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 1253–1263.
- [84] K.J. Fountain, U.D. Neue, E.S. Grumbach, D.M. Diehl, Effects of extra-column band spreading, liquid chromatography system operating pressure, and column temperature on the performance of sub-2-microm porous particles., *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5979–5988.
- [85] M. Kubín, P. Špaček, R. Chromeček, Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate), *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 32 (1967) 3881–3887.
- [86] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography., *Anal. Chem.* 68 (1996) 3498–3501.
- [87] F.C. Leinweber, U. Tallarek, Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phases, *J. Chromatogr. A.* 1006 (2003) 207–228.
- [88] J. Randon, S. Huguet, A. Piram, G. Puy, C. Demesmay, J.-L. Rocca, Synthesis of zirconia monoliths for chromatographic separations., *J. Chromatogr. A.* 1109 (2006) 19–25.
- [89] J. Randon, J.-F. Guerrin, J.-L. Rocca, Synthesis of titania monoliths for chromatographic separations., *J. Chromatogr. A.* 1214 (2008) 183–186.

- [90] C. Liang, S. Dai, G. Guiochon, A Graphitized-Carbon Monolithic Column, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4904–4912.
- [91] F. Svec, Organic polymer monoliths as stationary phases for capillary HPLC, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1419–1430.
- [92] F. Svec, *Monolithic Stationary Phases for HPLC and Sample Preparation*, (2006).
- [93] R.E. MAJORS, *Highlights of HPLC 2008: Part I*, *LC GC North Am.* 26 (n.d.).
- [94] S. Hjertén, J.-L. Liao, R. Zhang, High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, *J. Chromatogr. A.* 473 (1989) 273–275.
- [95] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3646–3649.
- [96] F. Svec, J.M.J. Frechet, Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, *Anal. Chem.* 64 (1992) 820–822.
- [97] C.G. Horvath, S.R. Lipsky, Rapid analysis of ribonucleosides and bases at the picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns, *Anal. Chem.* 41 (1969) 1227–1234.
- [98] J.J. Kirkland, Controlled surface porosity supports for high-speed gas and liquid chromatography, *Anal. Chem.* 41 (1969) 218–220.
- [99] J.J. Salisbury, Fused-Core Particles: A Practical Alternative to Sub-2 Micron Particles, *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 883–886.
- [100] F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti, G. Guiochon, Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials., *J. Chromatogr. A.* 1157 (2007) 289–303.
- [101] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quanti @ cation capabilities 1 ( IUPAC Recommendations 1995 ), 391 (1999) 105–126.
- [102] J. Inczedy, T. Lengye, A.M. Ure, *Compendium of Analytical Nomenclature The Orange Book*, 3rd Editio, 1998.
- [103] R.G. Bates, *Treatise on Analytical Chemistry*, in: P.J. Kolthoff, I. M. Elving (Ed.), *Treatise Anal. Chem.*, first, John Wiley & Sons, Ltd., New York, 1978.
- [104] G.W. Sedgwick, T.W. Fenton, J.R. Thompson, Effect of protein precipitating agents on the recovery of plasma free amino acids, *Can. J. Anim. Sci.* 71 (1991) 953–957.
- [105] U.D. Neue, Theory of peak capacity in gradient elution, *J. Chromatogr. A.* 1079 (2005) 153–161.
- [106] I.E. Commission, *International Vocabulary of Metrology-Basic and General Concepts and Associated Terms:(VIM)*, ISO Copyright Office, 2007.
- [107] FDA, *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*, (2001) 1–25.
- [108] ISO, *ISO/IEC 17025: 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*, (2010) 1–28.

- [109] ICH, VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1), (2005) 1–17.
- [110] ICH, Validation of Analytical Procedures Methodology: Q2B Guideline, (2005) 1–6.
- [111] A. Bouabidi, E. Rozet, M. Fillet, E. Ziemons, E. Chapuzet, B. Mertens, et al., Critical analysis of several analytical method validation strategies in the framework of the fit for purpose concept., *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3180–3192.
- [112] H.Y. Aboul-Enein, Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods, *Accredit. Qual. Assur.* 5 (2000) 180–181.
- [113] M. Valcárcel, A. Gómez-Hens, S. Rubio, Selectivity in analytical chemistry revisited, *TrAC Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 386–393. doi:10.1016/S0165-9936(01)00092-9.
- [114] P. Araujo, Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 2224–2234.
- [115] J. Miller, J. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4th ed., Prentice Hall, Madrid, 2002.
- [116] L. Massart, B. Vandeginste, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, 1998.
- [117] L. Fernando, M. Ortega, C.J. Alméciga-díaz, I. Stella, M. Monsalve, O. Yaneth, et al., Cuantificación de aminoácidos en plasma empleando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia # Plasma amino acid quantification using High Performance Liquid Chromatography, 43 (2009).
- [118] L. Restrepo, J. Fajardo, L. Marina Angel, Metabolismo de aminoácidos y metodología simplificada para la evaluación de calidad proteínica en humanos, *Salud Uninorte.* 8 (1993) 3–14.
- [119] A. Fabiani, A. Versari, G.P. Parpinello, M. Castellari, S. Galassi, High-performance liquid chromatographic analysis of free amino acids in fruit juices using derivatization with 9-fluorenylmethyl-chloroformate., *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 14–8.
- [120] C. Legido-quigley, N.D. Marlin, V. Melin, A. Manz, N.W. Smith, Review Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography, 24 (2003) 917–944.
- [121] M.M. Dittmann, K. Masuch, G.P. Rozing, Separation of basic solutes by reversed-phase capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 887 (2000) 209–221.
- [122] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fre, Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography . 1 . Fine Control of Porous Properties and Surface Chemistry have been prepared within the confines of untreated, 2700 (1998) 2288–2295.
- [123] I.S. Lurie, T.S. Conver, V.L. Ford, Simultaneous separation of acidic, basic, and neutral organic compounds, including strong and moderate acids and bases, by capillary electrochromatography., *Anal. Chem.* 70 (1998) 4563–4569.
- [124] N.W. Smith, C. Legido-quigley, N.D. Marlin, V. Melin, *Capillary Liquid Chromatography Capillary and Micro - High Performance Liquid Chromatography*, in: *Encicl. Elsevier*, 2004: pp. 1–22.

- [125] A.S. Rathore, C. Horváth, Chromatographic and electrophoretic migration parameters in capillary electrochromatography., *Electrophoresis*. 23 (2002) 1211–1216.
- [126] A.S. Rathore, C. Horváth, Separation parameters via virtual migration distances in high-performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis and electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr. A*. 743 (1996) 231–246.
- [127] C.F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, 2003.
- [128] R.C. Castells, C.B. Castells, M.A. Castillo, Influence of differences between sample and mobile phase viscosities on the shape of chromatographic elution profiles, *J. Chromatogr. A*. 775 (1997) 73–79.
- [129] F. Khachik, G.R. Beecher, J.T. Vanderslice, G. Furrow, Liquid chromatographic artifacts and peak distortion: sample-solvent interactions in the separation of carotenoids, *Anal. Chem.* 60 (1988) 807–811.