

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA POLITECNICA SUPERIOR DE GANDIA

Grado en Ciencias Ambientales



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCOLA POLITÈCNICA
SUPERIOR DE GANDIA

“CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES POTENCIALES DE UNA COLUMNA MONOLÍTICA FUNCIONALIZADA CON MAGNETITA”

TRABAJO FINAL DE GRADO

Autor/a:

Marta Domingo Martí

Tutor/a:

Sagrario Torres Cartas

Susana Meseguer Lloret

GANDIA, 2018

RESUMEN

En este proyecto se ha optimizado una columna monolítica funcionalizada con magnetita (Fe_3O_4) para el análisis cromatográfico de fosfatos de adenosina (monofosfato de adenosina, difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina), que interaccionan con el hierro presente en la columna a través de los grupos fosfato presentes en su estructura.

Se ha partido de un estudio anterior en el que se estableció el procedimiento de preparación de estas columnas, así como la posibilidad de separar fosfatos de adenosina en unas condiciones determinadas. En primer lugar, se ha re-optimizado la fase móvil (composición y gradiente de separación) con la intención de mejorar la separación de los fosfatos de adenosina. Posteriormente, con la fase óptima, se ha optimizado la composición de la columna monolítica, así como su longitud y diámetro interno, a partir de la medida de los parámetros cromatográficos de tiempo de retención, eficacia, resolución y capacidad de pico.

A partir del cálculo de los coeficientes de variación de las medias de tiempo de retención y área de pico obtenidos para los tres fosfatos de adenosina, se han establecido los parámetros de calidad de la columna: repetibilidad entre medidas, reusabilidad, y repetibilidad y reproducibilidad en la preparación de la columna.

Palabras clave: columnas monolíticas, magnetita, fosfatos de adenosina, reproducibilidad, eficacia

ABSTRACT

In this project, the parameters of a monolithic column functionalized with magnetite (Fe₃O₄) have been optimized by the chromatographic analysis of adenosine and adenosine phosphates (adenosine monophosphate, adenosine diphosphate and adenosine triphosphate), due to the potential interactions between iron (present in the column) and phosphorus (present in the analysed compounds).

The preparation procedure of this column was established in a previous study, as well as the possible separation of the three adenosine phosphates under specific experimental conditions. Firstly, on the basis of that study, composition and mobile-phase gradient was re-optimized to improve adenosine phosphates separation. Subsequently, by measuring some chromatographic parameters -retention time, efficiency, resolution and peak capacity-, the length, internal diameter and composition of the monolithic column were optimized. These analyses were carried out by using the optimal mobile phase.

Figures of merit of the optimal column were established by means of chromatographic analysis of adenosine phosphates in optimal experimental conditions. Reusability, repeatability and reproducibility have been studied by calculating variation coefficients of retention time and peak area for the three adenosine phosphates.

Keywords: monolithic columns, magnetite, adenosine phosphate, reproducibility, efficiency

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Definición y clasificación de la cromatografía	1
1.2. Cromatografía líquida	2
1.2.1. Aspectos generales	2
1.2.2. Tipos de cromatografía líquida	3
1.2.3. El cromatógrafo	5
1.3. Características de la separación cromatográfica	6
1.3.1. Tiempo de retención y tiempo muerto	6
1.3.2. Factor de retención	6
1.3.3. Eficacia	7
1.3.4. Resolución	8
1.3.5. Capacidad de pico	8
1.4. Columnas usadas en HPLC	9
1.4.1. Columnas empaquetadas o convencionales	9
1.4.2. Columnas monolíticas	9
1.4.3. Tipos de columnas monolíticas	10
1.5. Preparación de columnas monolíticas	11
1.5.1. Soportes para la fase estacionaria monolítica	11
1.5.2. Reacción de polimerización	12
1.5.3. Funcionalización del monolito con nanopartículas	14
1.6. Caracterización de una columna cromatográfica	15
1.6.1. Solutos de prueba para la caracterización de columnas monolíticas funcionalizadas con magnetita.	16
2. CONTEXTO Y ANTECEDENTES	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	19
4.1. Material y reactivos	19
4.2. Instrumentación de laboratorio	19
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	20
5.1. Preparación de columnas monolíticas	20
5.1.1. Activación de la pared interna del soporte	21
5.1.2. Polimerización	21
5.1.3. Funcionalización de la columna con nanopartículas de magnetita	23
5.2. Condiciones empleadas en la separación de fosfatos de adenosina	25
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26

6.1. Re-optimización de la separación de fosfatos de adenosina	26
6.1.1. Estudio de la concentración de tampón en la fase acuosa	27
6.1.2. Reoptimización del gradiente	28
6.1.3. Identificación de los analitos	33
6.1.4. Comparación con la columna de referencia	33
6.2. Optimización de la mezcla de polimerización y dimensiones de la columna	35
6.2.1. Estudio del porcentaje de GMA	35
6.2.2. Estudio de la longitud de la columna	39
6.2.3. Estudio del diámetro interno de la columna	40
6.3. Calidad de la separación	41
6.3.1. Estudio de repetibilidad del proceso de medida	42
6.3.2. Estudio de reusabilidad de la columna	42
6.3.3. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad en la preparación de la columna	43
7. CONCLUSIONES.....	44
8. BIBLIOGRAFÍA	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición y clasificación de la cromatografía

La cromatografía es el método de separación más utilizado cuando se trata de muestras de carácter complejo. Esta técnica se emplea en todas las ramas de la ciencia para separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en muestras tanto líquidas como sólidas.

Fue denominada e inventada por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX (Valcárcel, 1988). Éste empleó dicha técnica para separar pigmentos vegetales, en concreto xantofilas y clorofilas. Para llevar a cabo la separación, se hacían pasar las disoluciones que contenían la mezcla de estos compuestos a través de unas columnas de vidrio rellenas con carbonato de calcio. Como resultado, Tswett pudo observar que en las columnas aparecían bandas coloreadas y, de esta forma, justificó el nombre que eligió para el método, ya que en griego *chroma* significa color y *graphein* escribir.

Los métodos cromatográficos pueden ser de dos tipos: *cromatografía en columna*, donde la fase estacionaria se encuentra dentro de un tubo estrecho por el cual se hace pasar la fase móvil; *cromatografía plana*, donde la fase estacionaria se encuentra fija sobre una superficie plana o en los intersticios de dicha superficie, y la fase móvil va desplazándose a través de la fase estacionaria por capilaridad o gravedad (Skoog, 1993).

En este proyecto vamos a centrarnos en las separaciones cromatográficas en columna. Estas separaciones se caracterizan por el desplazamiento de la muestra mediante una fase móvil, que puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, a través de una fase estacionaria, que suele ser un sólido particulado situado en el interior de la columna. Ambas fases son inmiscibles. Los componentes que se retienen fuertemente en la fase estacionaria se mueven lentamente con la fase móvil, mientras que los componentes que se unen de forma débil a dicha fase estacionaria se mueven con más rapidez. La consecuencia de esto es que los componentes se separan en bandas que pueden analizarse tanto cuantitativa como cualitativamente. Estas bandas se registran a la salida de la columna mediante un detector, que traduce la señal recibida en un pico cromatográfico.

Las técnicas cromatográficas en columna pueden ser clasificadas de forma general atendiendo al tipo de fase móvil:

- Cromatografía de gases: la fase móvil es un gas que atraviesa una fase estacionaria sólida o líquida adsorbida en un capilar.
- Cromatografía de líquidos: la fase móvil es un líquido que atraviesa una fase estacionaria sólida o líquida retenida en una columna.
- Cromatografía de fluidos supercríticos: la fase móvil es un fluido supercrítico, de propiedades entre líquido y gas, que atraviesa una fase estacionaria sólida retenida en una columna.

1.2. Cromatografía líquida

1.2.1. Aspectos generales

La cromatografía líquida, llamada habitualmente de alta resolución (*en inglés*, high performance liquid chromatography, HPLC), es una técnica que permite separar y determinar sustancias o mezclas en un periodo de tiempo corto y de forma tanto cuantitativa como cualitativa.

Las *técnicas cuantitativas* se basan en la comparación de la altura o el área de pico del componente de interés con disoluciones estándar, cuya concentración es conocida, de forma que se determina de forma exacta la cantidad del componente en cuestión. Por otro lado, las *técnicas cualitativas* sólo permiten identificar la presencia o ausencia del componente de interés, y se basan en la medida del tiempo de retención (Alzate, 2014).

La cromatografía líquida es adecuada para compuestos termolábiles, iónicos y poco volátiles. Algunas aplicaciones incluyen la separación de sustancias tales como ácidos nucleicos, hidrocarburos, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, fármacos, plaguicidas... entre otros.

La cromatografía de alta resolución presenta 4 reglas básicas (Alzate, 2014):

1. La fase móvil y la fase estacionaria deben tener polaridad opuesta.
2. Todos los solutos deben tener una polaridad similar y han de ser solubles en la fase móvil.
3. Se ha de cumplir el principio de propagación. Esto significa que todos los solutos que entran en la columna deben salir de ella.
4. Los solutos deben estar separados entre sí, es decir, deben tener una migración diferencial (principal objetivo).

1.2.2. Tipos de cromatografía líquida

La clasificación específica de la cromatografía líquida atiende al tipo de interacciones entre los analitos y las fases móvil y estacionaria (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la cromatografía líquida, (Rubinson, 2001)

Clasificación general	Clasificación específica	Fase móvil	Fase estacionaria
Cromatografía de líquidos (LC)	Cromatografía de reparto	Líquido	Sólido / Líquido adsorbido sobre sólido
	Cromatografía de adsorción	Líquido	Sólido
	Cromatografía de intercambio iónico	Líquido	Sólido con cargas electrostáticas
	Cromatografía de exclusión	Líquido	Sólido poroso

A continuación, se detallan los diferentes tipos de cromatografía líquida de alta resolución:

- **Cromatografía de reparto**

Es el tipo de cromatografía líquida de alta resolución más usado. Permite separar y determinar gran cantidad de sustancias orgánicas, entre ellos compuestos de interés ambiental tales como herbicidas, fungicidas, insecticidas, fenoles e hidrocarburos.

La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido adsorbido sobre el sólido. La separación es debida a la distribución diferente del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil. En función de la polaridad de las fases móvil y estacionaria, se distinguen 2 tipos de cromatografía de reparto:

- **Cromatografía en fase normal:** la fase estacionaria es polar (contiene grupos amino, ciano o alcohol) y la fase móvil es poco polar o apolar (isopropileter o hexano). En este tipo de cromatografía la polaridad del disolvente determina el tiempo de elución de los analitos: los disolventes más polares facilitan la elución de los analitos.
- **Cromatografía en fase inversa:** la fase estacionaria es apolar, con grupos C8 (n-octilo) o C18 (n-octadecilo), y la fase móvil es un disolvente polar (metanol, acetonitrilo, agua...). En este tipo de cromatografía la disminución de la polaridad de la fase móvil facilita la elución de los analitos.

- **Cromatografía de adsorción**

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es un sólido, el cual suele ser sílice o alúmina, ambas de carácter polar. En esta fase estacionaria, el analito es retenido mediante adsorción. Por otro lado, la fase móvil empleada es apolar, como por ejemplo el isooctano, diclorometano o el hexano.

- **Cromatografía de intercambio iónico o iónica**

La cromatografía iónica (IC) es un tipo de cromatografía líquida en la cual se emplea como fase estacionaria una resina de intercambio iónico insoluble y de gran masa molecular.

Los intercambios iónicos se basan en los equilibrios de intercambio entre los iones de la disolución y los iones del mismo signo que hay en la superficie de la resina.

Las fases móviles que se utilizan en este tipo de cromatografía suelen ser disoluciones acuosas con moderadas cantidades de disolvente orgánico miscible, como puede ser el metanol.

- **Cromatografía de exclusión por tamaño**

La cromatografía de geles o de exclusión por tamaño es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria está constituida por partículas poliméricas que contienen poros que permiten difundir las moléculas de soluto en función de cual sean sus tamaños moleculares.

Este tipo de cromatografía es utilizada para separar especies cuyo peso molecular es elevado, como pueden ser los polímeros o las proteínas. Sin embargo, no puede aplicarse a muestras cuyos analitos tengan dimensiones similares.

En la cromatografía líquida de alta resolución, la composición de la fase móvil es esencial en la separación. Se puede trabajar de dos formas distintas: en modo isocrático y en modo gradiente. Si se trabaja en **isocrático**, la composición de la fase móvil se mantiene constante durante toda la separación; si se trabaja en **gradiente**, la composición de la fase móvil se modifica durante el proceso de separación.

1.2.3. El cromatógrafo

El equipo de cromatografía líquida se compone de varios módulos (Figura 1): una bomba de alta presión para controlar la composición de la fase móvil y su velocidad de flujo; un sistema de inyección de la muestra, que puede ser una válvula manual con un loop de volumen fijo o un inyector automático, que permite tomar volúmenes variables y automatizar el proceso de medida; una columna de separación, que contiene la fase estacionaria; un sistema de detección o detector con transductor, que permite registrar la señal del analito (absorbancia, luminiscencia, masas, ...) y traducir los cambios de señal registrados en valores numéricos; y un equipo informático con software específico que controla los diferentes módulos y permite guardar y trabajar con los resultados.

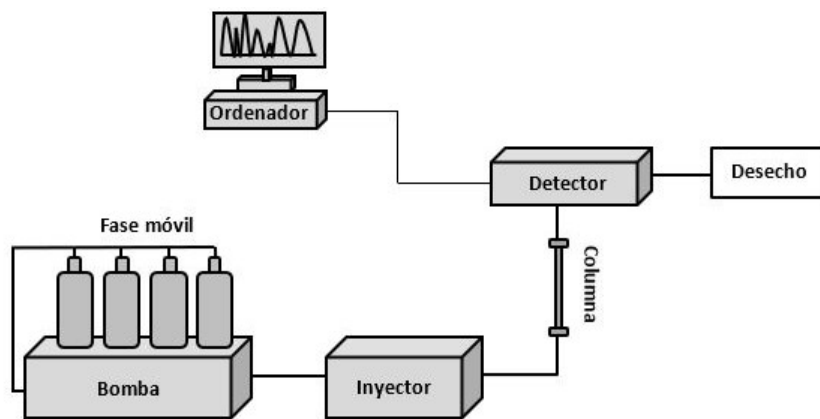


Figura 1. Esquema de un equipo de cromatografía líquida.

El detector registra los cambios en la respuesta en función del tiempo de elución, dando lugar a un registro llamado cromatograma (Figura 2). Los cromatogramas presentan una línea base, que se corresponde con la señal del detector al paso de la fase móvil. Cuando se produce la elución de uno de los componentes de la mezcla, aparece un pico en el registro del cromatograma. A partir del máximo del pico cromatográfico se definirá el tiempo de retención (t_r) del analito. La separación de la mezcla se completa cuando el cromatograma tiene tantos picos como compuestos hay en la mezcla a analizar.

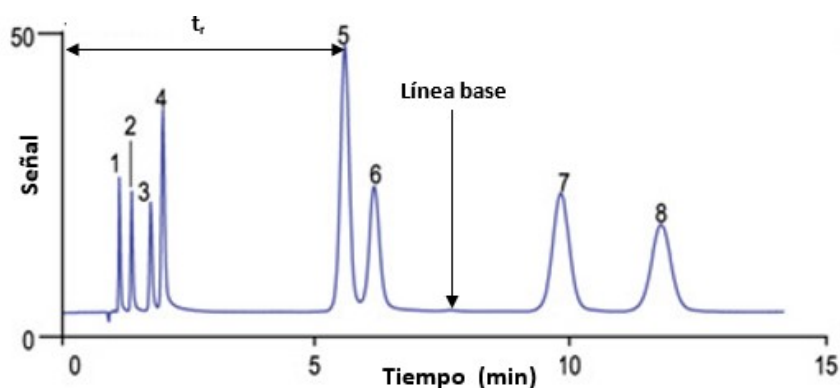


Figura 2. Ejemplo de cromatograma de un análisis de 8 carbohidratos: 1. Glicerol; 2. Xilitol; 3. Sorbitol; 4. Manitol; 5. Glucosa; 6. Fructosa; 7. Sacarosa; 8. Lactosa.

Fuente: Manuel, 2018

1.3. Características de la separación cromatográfica

Existen varios factores que caracterizan una separación cromatográfica: tiempo de retención, tiempo muerto, factor de retención, eficacia, resolución y capacidad de pico. A continuación, se explican cada uno de estos parámetros (Ayora,2018).

1.3.1. Tiempo de retención y tiempo muerto

El tiempo de retención (t_r) es el tiempo que transcurre desde que se inyecta la muestra en la columna hasta el momento en que el pico del analito "i" alcanza el máximo de señal en el detector. En este sentido, se define el tiempo muerto (t_m) como el tiempo necesario para que una especie que no se retiene en la fase estacionaria alcance el detector (Figura 3).

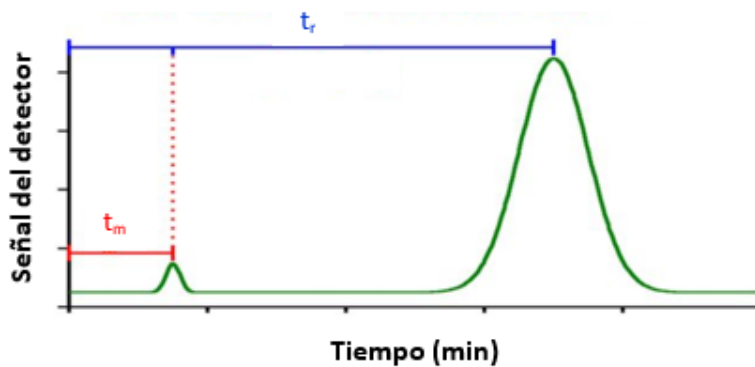


Figura 3. Representación del tiempo muerto (t_m) y el tiempo de retención (t_r) en un cromatograma.
Fuente: (Marianno, 2015)

1.3.2. Factor de retención

El factor de retención (k_i) es una medida de la velocidad a la que migran los solutos en la columna, y viene dado por la siguiente expresión, que tiene en cuenta el tiempo de retención y el tiempo muerto:

$$k_i = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Esta expresión indica la relación que existe entre el tiempo que pasa el soluto en la fase estacionaria y el tiempo que pasa en la fase móvil. Cuanto mayor es el valor del k_i de un compuesto "i" en una columna, mayor es su retención en la fase estacionaria.

1.3.3. Eficacia

La eficacia es un factor que está relacionado con la anchura de una banda o pico. La anchura de pico puede medirse en la base del cromatograma (w) o a mitad de su altura ($w_{1/2}$) (Figura 4).

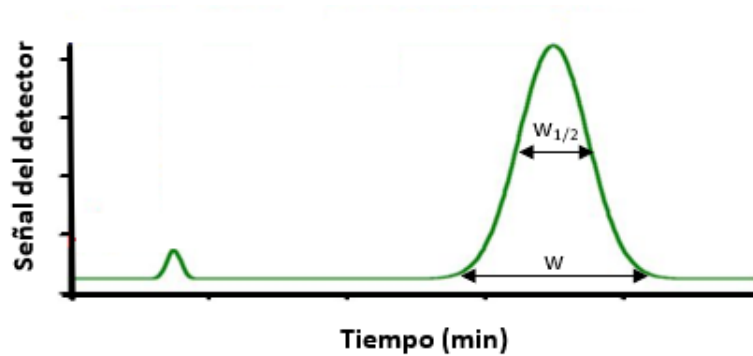


Figura 4. Representación de la anchura de un pico cromatográfico. Fuente: (Marianno, 2015)

Así pues, se podría decir que cuando los picos del cromatograma sean más estrechos, mayor será la eficacia de la columna.

La eficacia se mide para un pico del cromatograma mediante 2 factores: el número de platos teóricos (N) y la altura de plato teórico (H).

El número de platos teóricos puede calcularse a través de la siguiente ecuación:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

Cuanto mayor es N , mayor es la eficacia del pico.

Por otra parte, la altura de plato teórico se define a partir de N como:

$$H = \frac{L}{N}$$

donde L es la longitud de la columna cromatográfica. De este modo, cuanto menor sea la altura de plato teórico, mejor será la eficacia del pico.

Normalmente, el software que controla el equipo cromatográfico proporciona el valor de estos dos parámetros, N y H , para cada uno de los picos.

1.3.4. Resolución

La resolución es una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos compuestos. Este parámetro puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{2 \cdot [(t_r)_B - (t_r)_A]}{w_A + w_B}$$

donde: $(t_r)_A$ y $(t_r)_B$ son los tiempos de retención de los compuestos A y B, respectivamente; w_A y w_B son las anchuras en la base de los picos de los compuestos A y B, respectivamente. Así, la resolución que se obtiene es la resolución del pico B respecto del pico A.

La resolución de los picos también puede obtenerse de forma automática mediante el software del equipo cromatográfico. Se considera una separación entre picos adecuada cuando el valor de R_s es $\geq 1,5$.

Para un número de picos consecutivos, se define la resolución global como la media geométrica de la resolución entre picos consecutivos. Así, para 3 picos consecutivos (A, B y C), la ecuación sería:

$$R_G = \sqrt{R_{s1} \cdot R_{s2}}$$

donde R_{s1} es la resolución del pico B respecto de A, y R_{s2} la resolución C respecto de B. La resolución del pico A no puede calcularse puesto que no tiene un pico delante.

1.3.5. Capacidad de pico

Para los casos en que se usa la separación en modo gradiente, se ha definido otro parámetro: la capacidad de pico, P_c . Es una medida del número de bandas o picos que pueden resolverse con una resolución mayor que 1 (Dolan, 1999).

La capacidad de pico se calcula mediante la siguiente expresión:

$$P_c = 1 + \frac{t_G}{1,679 \cdot w_{1/2}}$$

donde t_G es el tiempo total del gradiente y $w_{1/2}$ es la anchura a mitad de la altura.

1.4. Columnas usadas en HPLC

La columna cromatográfica es un tubo de diferente naturaleza que contiene en su interior la fase estacionaria.

Existen dos tipos de columnas cromatográficas, las empaquetadas o convencionales y las monolíticas. A continuación, se explica de forma detallada ambos tipos.

1.4.1. Columnas empaquetadas o convencionales

Las columnas empaquetadas están formadas por partículas esféricas de tamaño pequeño. La naturaleza de las partículas será diferente en función del tipo de cromatografía. En fase normal, suelen ser polímeros de sílice, lo que proporciona a las columnas su carácter polar, el cual es característico.

Por otra parte, el carácter polar de la sílice puede modificarse recubriéndolas con otro tipo de moléculas orgánicas con grupos funcionales apolares, como cadenas de carbono de octadecilo (C18), cadenas de n-octilo (C8), grupo benceno (BZ) o grupo ciano (CN). Así, los polímeros modificados son utilizados como fase estacionaria en la cromatografía de fase inversa.

1.4.2. Columnas monolíticas

En las columnas monolíticas, la fase estacionaria es un polímero poroso y continuo que se sintetiza en el interior del tubo. Así pues, habrá una gran cantidad de canales a través de los cuales los compuestos químicos pueden pasar e interactuar con la fase estacionaria.

La ventaja que presentan estas columnas, frente a las empaquetadas o convencionales, es que para su sellado no es necesario la utilización de fritas o perlas poliméricas. Estas columnas se caracterizan también por ser altamente permeables, (poseen una porosidad elevada), son fáciles de preparar, versátiles, proporcionan elevada eficacia de separación, baja presión a velocidades de flujo grandes y bajo consumo de reactivos. Sin embargo, también presentan limitaciones como su baja área superficial, y en consecuencia, baja capacidad de carga, lo que limita la cantidad de analito que puede quedar retenido en la fase.

1.4.3. Tipos de columnas monolíticas

Las columnas monolíticas pueden clasificarse en dos categorías: columnas monolíticas de sílice y columnas monolíticas poliméricas (Cantó, 2009).

- Columnas monolíticas de sílice

Las columnas monolíticas de sílice consisten en un monolito formado por esqueletos interconectados, entre los cuales se distribuyen de manera determinada los poros, macroporos (>50 nm) y mesoporos (2-50 nm). Los poros limitan el flujo máximo que la columna admite y favorecen los procesos de adsorción y retención de los analitos o solutos. Este tipo de columnas pueden ser modificadas químicamente para así poder conseguir las necesidades y funcionalidad que el usuario requiere.

- Columnas monolíticas poliméricas

Son polímeros obtenidos a partir de una mezcla que contiene un monómero (base del polímero), un agente entrelazante, una mezcla de disolventes porogénicos y un iniciador radicalario.

Para que las separaciones cromatográficas sean más efectivas, el monolito puede funcionalizarse mediante la unión compuestos orgánicos con grupos funcionales de distinta naturaleza, o de nanopartículas de diferentes tipos, que permiten aumentar su área superficial y, por tanto, su capacidad de carga.

1.5. Preparación de columnas monolíticas

1.5.1. Soportes para la fase estacionaria monolítica

Estas columnas se preparan en tubos de distintos materiales, y debe asegurarse un anclaje fuerte del monolito sobre su pared interna.

Los materiales más habituales suelen ser tubos de sílice fundida, aunque también se han utilizado tubos de acero inoxidable, de propileno o de PEEK. Los tubos de sílice fundida hacen que las columnas monolíticas puedan usarse tanto en electrocromatografía (CEC) y en nano-HPLC, ya que los flujos de la fase móvil son bajos. Sin embargo, estos soportes no son adecuados para trabajar con HPLC convencional, donde es necesario que el soporte tenga un diámetro interno superior para trabajar con los flujos habituales. Por esta causa, se han empezado a usar soportes de fluoropolímeros como el polietiltetrafluoroetileno (ETFE) o el politetrafluoroetileno (PTFE).

El **PTFE**, llamado normalmente Teflón®, se caracteriza por poseer gran resistencia química y se utiliza en tubos que trabajan a bajas presiones. Este tipo de soporte alcanza una mayor resistencia si es recubierto por fibra de vidrio. El **ETFE**, conocido como Tefzel®, es un polímero termoplástico que resiste ácidos, bases y disolventes para HPLC.

Existen 3 formas de anclar el monolito a la pared interna de fluoropolímero (Catalá-Icardo, 2018):

- Ataque térmico. Se realiza a 60°C y con una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico y agua oxigenada. Este tipo de reacción generará grupos reactivos de tipo hidroxilo (OH) en la pared del teflón.
- Ataque en atmósfera de N₂ y a temperatura ambiente con el reactivo comercial Fluoroetch®. Este ataque genera grupos hidroxilo (OH) en la pared del teflón.
- Ataque con benzofenona (BZF) y etilen dimetacrilato (EDMA) en presencia de luz UV. Este tratamiento genera sobre la pared del soporte grupos reactivos tipo doble enlace para el anclaje del monolito a la pared. Este procedimiento, más conocido como *photografting*, es el que se ha empleado en el presente trabajo.

1.5.2. Reacción de polimerización

La mezcla de polimerización debe poseer un monómero, un agente entrelazante, uno o varios porógenos, y un iniciador radicalario. El primer paso de la reacción es la formación de radicales libres a partir del iniciador. A continuación, el monómero reacciona con los radicales libres y con el agente entrelazante. Esto conlleva el crecimiento de la cadena polimérica en el disolvente porogénico. Finalmente, tras la reacción de polimerización, se obtiene un polímero poroso rodeado de un líquido de carácter inerte que rellena los poros y que se elimina con el lavado de la columna (Cantó, 2009).

A continuación, se describen cada uno de los componentes de la mezcla de polimerización.

- Monómeros

Los monómeros son moléculas orgánicas simples que forman la unidad mínima de las macromoléculas. Los monómeros pueden unirse entre ellos o con otros diferentes mediante enlaces covalentes dando lugar a cadenas poliméricas lineales.

En la preparación de columnas monolíticas, los monómeros más habituales son los ésteres de acrilato ($CH_2 = CH - COO - R$) y metacrilato ($CH_2 = C(CH_3) - COO - R$).

La polaridad de estos compuestos se puede modificar en función de la naturaleza del radical R. Los ésteres de metacrilato más utilizados en la preparación de columnas monolíticas poliméricas son el metacrilato de laurilo (LMA), el metacrilato de estearilo (HMA), el glicidilmetacrilato (GMA) y el butilmetacrilato (BMA).

- Agente entrelazante

El agente entrelazante es un monómero cuya función es unir las cadenas de monómeros para formar redes poliméricas.

El agente entrelazante más utilizado en las columnas de ésteres de acrilato es el diacrilato de 1,3-butanodiol (BDDA). Sin embargo, para las columnas con ésteres de metacrilato, los agentes entrelazantes más utilizados son el divinilbenceno (DVB) y el dimetacrilato de etilenglicol (EDMA).

Se debe tener en cuenta que, si cambia el porcentaje del agente entrelazante en la mezcla, puede verse afectada la composición química del lecho monolítico y sus propiedades porosas, modificándose el tamaño de los poros y afectando a la permeabilidad y rigidez del monolito.

- **Porógenos**

Los porógenos son compuestos que permiten disolver los monómeros asegurando la homogeneidad de la mezcla de polimerización, sea cual sea su polaridad. Los restos de porógenos que quedan dentro de la columna, se eliminan mediante un lavado inicial.

El porcentaje y la naturaleza de los porógenos influye en el tamaño de poro final del monolito y, por tanto, en la presión de trabajo. Así pues, para que la columna no presente resistencia al paso de la fase móvil (bajas presiones) y dé lugar a separaciones rápidas, los poros deben ser de gran tamaño. Por el contrario, si los poros son de menor tamaño, la presión en la columna aumenta debido a que el monolito opone resistencia al paso de la fase móvil.

Entre los porógenos más empleados en la preparación de columnas monolíticas destacan el tetrahidrofurano (THF), 1-decanol, ciclohexanol y 1-dodecanol.

- **Iniciador radicalario**

El iniciador radicalario es una sustancia que favorece el inicio de la reacción de polimerización.

Para que la reacción comience, es también necesario el empleo de luz ultravioleta (fotoiniciación) o un aumento de la temperatura (iniciación térmica).

En la iniciación por radiación UV debe tenerse en cuenta la distancia a la fuente de radiación, y la intensidad y frecuencia de la radiación. Los reactivos de la mezcla de polimerización deben ser transparentes a la radiación UV para que la reacción sea totalmente efectiva.

Los fotoiniciadores más utilizados son el DMDA (2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona) y el AIBN (α,α' -azobisisobutironitrilo).

En la iniciación térmica se ha de tener en cuenta cual es la tolerancia de la polimerización frente a la temperatura. Por una parte, el tiempo de reacción disminuirá cuando la temperatura es más elevada de lo que debe, creando un polímero con una estructura porosa menos uniforme. Por otro lado, si la temperatura es demasiado baja, el efecto del iniciador puede inhibirse.

Los iniciadores térmicos que más se utilizan son el LPO (peróxido de laurilo), el BPO (peróxido de benzoilo) y el AIBN (α,α' -azobisisobutironitrilo).

En este proyecto, se ha preparado un monolito mediante iniciación térmica, empleando como monómero GMA, como agente entrelazante DVB, como disolventes porogénicos THF y 1-decanol, y como iniciador radicalario LPO (Figura 5).

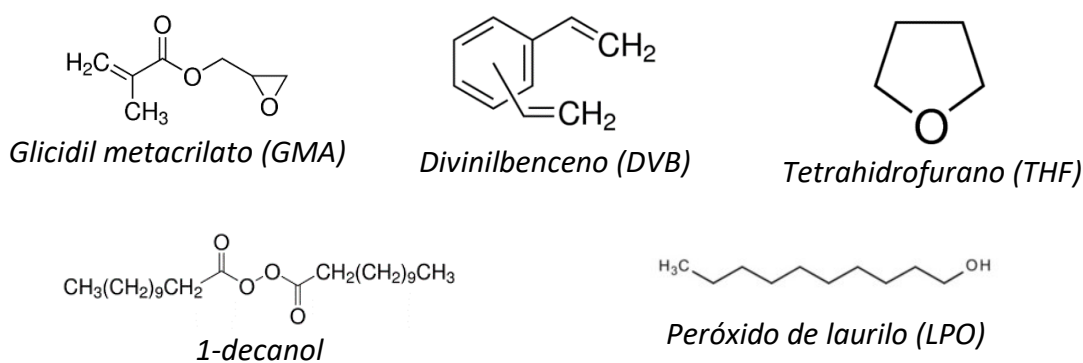


Figura 5. Fórmulas de los reactivos empleados en la mezcla de polimerización.

1.5.3. Funcionalización del monolito con nanopartículas

La capacidad de separación de los monolitos puede mejorarse mediante la adición sobre su superficie de grupos reactivos, durante o tras la polimerización, lo que se conoce como funcionalización. La presencia de los nuevos grupos funcionales permitirá la separación de analitos que interaccionen de forma selectiva con dichos grupos funcionales añadidos.

El interés actual por las fases poliméricas se ha acentuado debido a las oportunidades que ofrece la combinación con la nanotecnología. El desarrollo de esta última ha generado un creciente número de nanopartículas (NPs) y nanoestructuras de naturaleza y propiedades diferentes, de interesantes aplicaciones en ciencia y tecnología.

Las NPs son partículas de carácter microscópico que miden menos de 100 nm con una elevada área superficial. Así, las limitaciones que se han comentado para los monolitos poliméricos, en cuanto a su reducida área superficial y baja capacidad de carga, pueden superarse mediante el diseño de nuevos materiales híbridos que integran polímeros y NPs. Las nanopartículas más empleadas en la modificación de monolitos poliméricos son NPs de sílice, oro, plata o magnetita.

La inmovilización de las NPs en el polímero puede ser realizada mediante embebido o enlazado de las mismas. En el primer caso, las NPs están presentes durante la polimerización y quedan rodeadas del polímero, sin enlazar. En el segundo caso, las NPs se añaden tras la polimerización y quedan unidas al monolito mediante enlace químico.

En ocasiones, es necesario funcionalizar las NPs para unir las químicamente al monolito, o funcionalizar el monolito previamente a la unión de las NPs. En este trabajo, el monolito preparado ha sido modificado mediante la adición de NPs de magnetita funcionalizadas con 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS).

1.6. Caracterización de una columna cromatográfica

El desarrollo de nuevas columnas cromatográficas, como las columnas monolíticas poliméricas, funcionalizadas o no, requiere de la selección de las condiciones óptimas de preparación del sorbente y de la caracterización de la columna optimizada, para asegurar su utilidad y capacidad de separación.

En este sentido, en la preparación de la columna deben optimizarse parámetros tales como la composición de la mezcla de polimerización (%monómeros, %porógenos, %iniciador) y sus dimensiones (longitud y grosor). El estudio de estos parámetros debe realizarse empleando solutos de prueba, que deben retenerse y separarse empleando el polímero como fase estacionaria.

Así, mediante los solutos de prueba seleccionados, se establecen las condiciones para su separación: tipo y composición de la fase móvil, y velocidad de flujo. En caso de que la columna requiera una etapa de funcionalización, para mejorar la selectividad, además deberá realizarse un estudio de comparación de resultados respecto a una columna no funcionalizada (columna de referencia).

Además, el empleo de solutos de prueba adecuados permitirá establecer las características de la columna desde el punto de vista de la repetibilidad y reproducibilidad en la medida, así como de su reusabilidad, y también la reproducibilidad y repetitividad en la preparación de las columnas.

La reproducibilidad y repetitividad en las medidas se evaluarán mediante el estudio de los coeficientes de variación (%CV) de los parámetros cromatográficos (tiempos de retención y áreas) para los solutos seleccionados, realizando el análisis por triplicado con la misma columna en el mismo día (repetibilidad) o con la misma columna en diferentes días (reproducibilidad). El %CV se calcula como la desviación estándar de 3 réplicas de la medida dividida por el valor medio, y multiplicado por 100.

Por otra parte, la reusabilidad se evaluará mediante el estudio de los %CV de los parámetros cromatográficos para los solutos seleccionados, obtenidos al realizar su determinación en diferentes días a lo largo de los tres meses de trabajo, empleando siempre la misma columna.

Finalmente, si se quiere evaluar la reproducibilidad y repetitividad en la preparación de las columnas, se deberá proceder de la siguiente forma:

- **Repetitividad:** preparando una serie de 3 columnas en el mismo día, empleando la misma mezcla de polimerización. Y calculando los %CV de los parámetros cromatográficos mencionados (t_r y área para los solutos de prueba).
- **Reproducibilidad:** preparando una serie de 3 columnas en días diferentes, preparando cada día la mezcla de polimerización. Y calculando los %CV de los parámetros cromatográficos mencionados (t_r y área para los solutos de prueba).

1.6.1. Solutos de prueba para la caracterización de columnas monolíticas funcionalizadas con magnetita.

La adenosina es un nucleósido compuesto por la adenina unida a una ribofuranosa mediante enlace glicosídico, que tiene un papel fundamental en los procesos bioquímicos de transferencia de energía. Siendo el trifosfato adenosina (ATP) la fuente principal de energía en la célula para los sistemas de transporte y las actividades enzimáticas. Para obtener energía para las reacciones celulares, el ATP se hidroliza a difosfato de adenosina (ADP) y se libera en la reacción un grupo fosfato. En la hidrólisis de ADP a monofosfato adenosina (AMP) también se libera energía y otro grupo fosfato (Liu, 2014).

Los fosfatos de adenosina, AMP, ADP y ATP (Figura 6) son solubles en agua y tienen una naturaleza organofosforada con 1, 2 ó 3 grupo fosfato, siendo común toda la parte orgánica de la molécula procedente de la adenosina. Esta característica hace que los fosfatos de adenosina resulten ideales para emplearse como solutos de prueba en la evaluación de la capacidad de extracción o separación de sorbentes funcionalizados con magnetita, ya que el hierro de la magnetita interaccionara con los grupos fosfato de estas moléculas (Ali Alwy B.Sc., 2013).

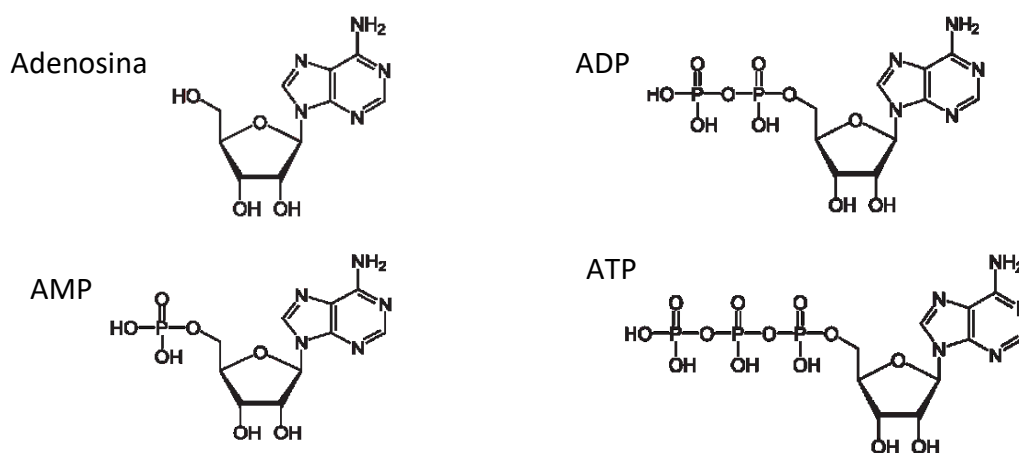


Figura 6: Estructura química de adenosina, monofosfato adenosina (AMP), difosfato adenosina (ADP) y trifosfato adenosina.

2. CONTEXTO Y ANTECEDENTES

Este proyecto se enmarca en un proyecto de investigación financiado por la Generalitat Valenciana titulado “Sistemas de separación basados en nuevos polímeros porosos y composites polímero-nanopartículas con aplicaciones industriales y medioambientales” (Referencia: PROMETEO/2016/145).

El trabajo que aquí presento es una continuación de un TFG realizado el curso pasado por este mismo grupo de investigación (Enguix, 2017). En dicho TFG se optimizó el procedimiento de preparación de una columna monolítica de GMA/DVB en tubo de fluoropolímero ETFE de 10 cm (d.i. 0,75 mm), y su funcionalización posterior con magnetita. En el proyecto se ensayaron diferentes procedimientos para la preparación del monolito funcionalizado con magnetita y, con el procedimiento óptimo, se comprobó que la columna permitía separar fosfatos de adenosina en unas condiciones determinadas.

Tomando como punto de partida la columna preparada en dicho TFG, se han realizado en este proyecto diferentes estudios para optimizar, por una parte, la separación de los fosfatos de adenosina, y por otra, la composición de la mezcla de polimerización y las dimensiones de la columna. Con las condiciones óptimas, se han evaluado parámetros de calidad como la repetibilidad, reproducibilidad y reusabilidad de la columna monolítica funcionalizada con magnetita, en la separación de fosfatos de adenosina.

3. OBJETIVOS

Los principales objetivos del presente proyecto son:

- Obtener rellenos poliméricos funcionalizados con nanopartículas de magnetita sobre tubos de flouropolímero ETFE para su empleo como sistemas de separación cromatográfica.
- Re-optimizar la composición de la fase móvil y el gradiente de elución para la separación de fosfatos de adenosina.
- Estudiar de la influencia de varios factores, como la composición de la mezcla de polimerización y las dimensiones de la columna, en la separación de solutos de prueba (fosfatos de adenosina).
- Estudiar la reproducibilidad, repetibilidad y reusabilidad de las columnas.

4. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Material y reactivos

En la preparación de las columnas se han utilizado tubos del fluoropolímero ETFE de 0,75 mm de diámetro interno (d.i.) y de 1,5 mm de diámetro interno.

A continuación, se incluye la lista de los reactivos químicos empleados en la realización de este proyecto:

- Acetona
- Acetonitrilo (ACN)
- Ácido clorhídrico
- Adenosina
- Benzofenona (BZF)
- 1-Decanol
- Dimetacrilato de etilenglicol (EDMA)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Divinilbenceno (DVB)
- Etanol
- Fosfatos de adenosina: AMP, ADP y ATP
- Fosfato sódico
- Glicidil metacrilato (GMA)
- Lauril peróxido (LPO)
- Metanol
- N₂ (gas)
- NPs de magnetita funcionalizadas con APTMS
- Tetrahidrofurano (THF)

Todos los reactivos detallados son de grado analítico o superior. Las disoluciones acuosas han sido preparadas empleando agua MiliQ.

4.2. Instrumentación de laboratorio

Los aparatos e instrumentos de laboratorio empleados en el desarrollo de este proyecto son:

- Cromatógrafo de líquidos de Agilent Technologies, Modelo Infinity 1200, equipado con bomba cuaternaria, inyector automático, y detector UV-vis de fila de diodos.
- Horno para columnas de Análisis Vínicos SL.
- Bombas de jeringa de Kd Scientific.
- Baño de ultrasonidos de GT Sonic.
- Estufa de P Selecta.
- Cámara UV con lámparas de 254 nm, de UVP.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Preparación de columnas monolíticas

En este proyecto se han preparado columnas monolíticas sin funcionalizar (columna referencia) y funcionalizadas con nanopartículas de magnetita (Imagen 1) siguiendo el protocolo establecido en un TFG anterior (Enguix, 2017).

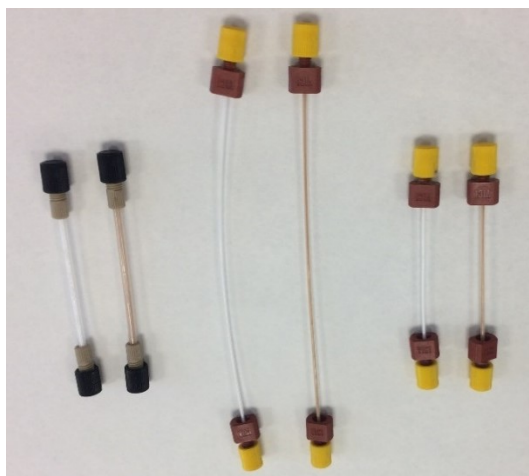


Imagen 1. Fotografía de algunas de las columnas preparadas: columnas de referencia (de color blanco) y sus correspondientes columnas funcionalizadas con nanopartículas de magnetita (de color marrón).

Se han preparado columnas de diferente longitud (entre 5-20 cm) y diferente diámetro interno (0,75 o 1,5 mm) en tubo de fluoropolímero ETFE (Tabla 2). En general, se ha empleado una relación monómero:entrecruzante de 40%GMA:60%DVB en la mezcla de polimerización, pero también se han preparado columnas con otras relaciones de monómero:entrecruzante (desde 30%GMA:70%DVB a 60%GMA:40%DVB). En todas las condiciones, se han preparado columnas de referencia y funcionalizadas con magnetita.

Tabla 2. Columnas preparadas en el desarrollo de este proyecto.

<i>Relación %GMA:%DVB</i>	<i>Longitud (cm)</i>	<i>d.i. (mm)</i>	<i>Columna</i>
30:70	10 cm	0,75	Referencia
			NPs
40:60	5 cm	0,75	Referencia
			NPs
	10 cm	0,75	Referencia
			NPs
	10 cm	1,5	Referencia
			NPs
15 cm	0,75	Referencia	
		NPs	
20 cm	0,75	Referencia	
		NPs	
50:50	10 cm	0,75	Referencia
			NPs
60:40	10 cm	0,75	Referencia
			NPs

A continuación, se describen las etapas necesarias para la preparación de la columna monolítica de 10 cm de longitud en tubo EFTE de 0,75 mm de diámetro interno, empleando la relación 40%GMA/60%DVB en la mezcla de polimerización.

5.1.1. Activación de la pared interna del soporte

Para preparar la columna, se corta un fragmento de tubo EFTE 0,75 mm d.i. de 15 cm, que al finalizar el proceso permitirá obtener una columna con una longitud de 10 cm. El interior del tubo se limpia con ayuda de una jeringa, primero con etanol, y posteriormente con acetona. Finalmente, se seca la pared interna del tubo pasando N_2 (g) durante 5-10 minutos.

Para realizar el ataque de la pared interna del tubo, en primer lugar, se hace pasar por el tubo una de disolución de BZF al 5% (en metanol) a una velocidad de flujo de 0,1 mL/min, mediante una bomba de jeringa (durante unos 15 min). Se cierran los extremos de la columna con sendos tapones, para evitar la pérdida de reactivo y la entrada de aire en el tubo. Se cubren los conectores y tapones con papel de aluminio, y se irradia la columna en la cámara ultravioleta durante 30 minutos a 254 nm.

A continuación, se pasa por el tubo una disolución del reactivo EDMA 15% (en metanol), a la misma velocidad de flujo, con ayuda de la bomba de jeringa. Se vuelven a tapar los conectores con papel de aluminio, se introduce el tubo en la cámara UV, y se irradia de nuevo con luz UV de 254 nm durante otros 30 minutos.

Tras la activación del tubo con BZF y EDMA, se hacen pasar aproximadamente 1,5 mL de metanol para eliminar los restos de reactivo y limpiar la columna. Finalmente, se seca el interior del tubo con N_2 (g).

Este procedimiento permite crear puntos de anclaje (dobles enlaces) en la pared interna del tubo sobre los cuales, posteriormente, se enlazarán el monolito.

5.1.2. Polimerización

El siguiente paso es la polimerización del monolito en el interior del tubo activado.

Para ello, se ha de preparar inicialmente la mezcla de polimerización, con un 33,33% de monómeros y un 66,67% de porógenos, en un vial de vidrio. Para preparar una columna con una relación monómero:entrecruzante 40% GMA:60% DVB, se ha de pesar de cada uno de los reactivos la cantidad que se especifica en la Tabla 3, en la que aparecen los valores teóricos de cada uno de los componentes de la mezcla, así como el porcentaje que representan sobre la masa final. Con 5 g de mezcla pueden prepararse 4 columnas del mismo tipo de polímero, con una longitud de 10 cm y 0,75 mm de diámetro interno.

Tabla 3: Masa de los componentes de la mezcla de polimerización y % que representa cada componente en la mezcla.

Componente	Masa (g)	Porcentaje en la mezcla
GMA	0,6667	13,33
DVB	1,0000	20,00
THF	0,3000	6,00
1-decanol	3,0333	60,67
TOTAL	5,0000	100
LPO	0,0500	1,00*

*1% respecto de la masa de la mezcla

Una vez preparada la mezcla, se pone el vial en el baño de ultrasonidos durante 3 min, para su homogenización. Posteriormente, se hace pasar N₂ durante 3-4 min a través de la mezcla para eliminar el oxígeno que pueda contener.

Antes de añadir la mezcla al tubo, se han de quitar los conectores a la columna y cortar los extremos del tubo que no han sido atacados por los reactivos EDMA y BZF, al estar tapados por los conectores, de forma que queda un tubo de aproximadamente 11 cm.

Finalmente, el tubo activado se introduce en un tubo de polipropileno sellado por uno de sus extremos y, con la ayuda de una jeringa, se introduce la mezcla de polimerización tanto por dentro como por fuera del tubo activado. Se tapa el tubo de polipropileno y se introduce de forma vertical en una estufa a 70°C durante 4 horas.

Tras la polimerización, se deja enfriar el tubo durante 10 minutos. Con un bisturí, se abre el tubo de polipropileno y, con la ayuda de unas pinzas, se extrae el tubo ETFE, con el relleno monolítico en su interior. Se limpia el exterior del tubo ETFE con papel, se ponen los conectores, se tapa y se etiqueta de forma que pueda ser reconocida la columna posteriormente.

La columna monolítica se lava con metanol, eliminando así los porógenos y los restos de reactivos que han quedado en los poros de la columna tras la polimerización. En la etapa de lavado de la columna monolítica se ha de proceder con cautela para evitar que una sobrepresión rompa la columna. Para la limpieza, se conecta la columna al equipo cromatográfico y se hace pasar metanol a un flujo inicial de 0,002 mL/min.

Una vez han salido los porógenos, se va aumentando el flujo poco a poco hasta llegar a un flujo de 0,5 mL/min, manteniendo la limpieza a dicho flujo durante 30 min.

Tras el lavado de la columna, esta se puede guardar cerrada a temperatura ambiente.

La columna preparada en este punto corresponde a lo que hemos llamado columna monolítica de referencia, sin funcionalizar. Si se realiza además la etapa descrita a continuación (punto 5.1.3), obtendremos la columna monolítica funcionalizada con magnetita.

5.1.3. Funcionalización de la columna con nanopartículas de magnetita

La funcionalización de la columna monolítica con NPs de magnetita, se lleva a cabo siguiendo el procedimiento que se describe a continuación.

En una etapa previa, las NPs de magnetita se han sintetizado y funcionalizado con el reactivo APTMS, según la reacción que se muestra en la Figura 7, siguiendo el procedimiento de (Lu, 2007). Las NPs funcionalizadas poseen un grupo amino libre, que se unirá posteriormente al monolito a través del grupo epóxido del GMA (Figura 7).

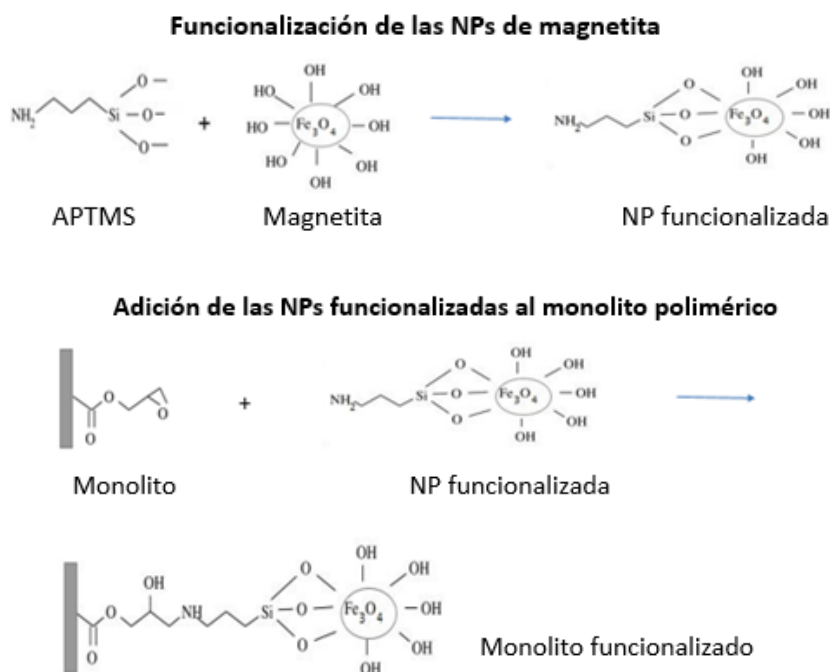


Figura 7: Reacciones de funcionalización de las NPs de magnetita y de adición de las NPs al polímero de GMA (Fuente: D. Enquix, 2017).

Para llevar a cabo la reacción de funcionalización del monolito, se ha de preparar, en primer lugar, una dispersión de 25 ppm de NPs funcionalizadas en DMSO con la ayuda de ultrasonidos (20 min). En el proceso de funcionalización (Figura 8), la dispersión de NPs funcionalizadas se inyecta en un loop de 3 mL. Para pasar esta dispersión a través de la columna, se emplea una bomba de HPLC cuya fase móvil, DMSO a 0,05 mL/min, empuja y hace pasar la dispersión por la columna. La columna se encuentra situada en un horno a 60°C. Cada 50 min, se rellena el loop con la dispersión recién agitada en el baño de ultrasonidos durante 2 min. El proceso de adición de NPs se prolonga unas 8-10, hasta obtener una columna completamente coloreada (color marrón) (Imagen 2). La etapa final del proceso es una etapa de lavado de la columna con DMSO durante 30 min.

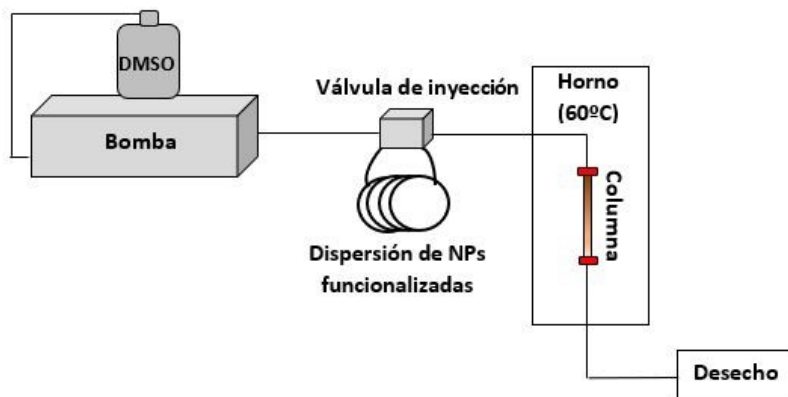


Figura 8. Esquema de adición de NPs.

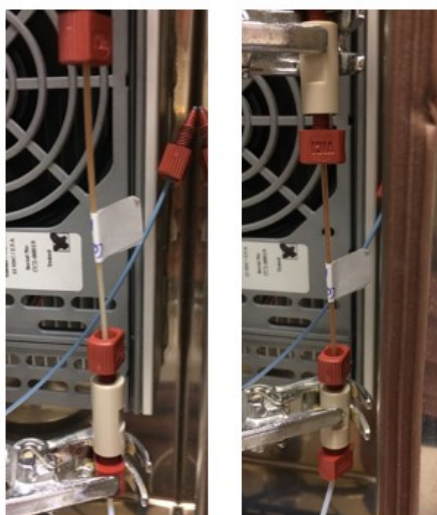


Imagen 2. Fotografía de columna en proceso de reacción (foto izda.) y en el punto final de la reacción (foto dcha.)

Una vez acabado el proceso de adición de NPs, se corta el extremo de la columna por el que se ha introducido la dispersión de NPs, puesto que quedan NPs aglomeradas. La columna, finalmente, se tapa y se mantiene a temperatura ambiente hasta su empleo como columna cromatográfica.

5.2. Condiciones empleadas en la separación de fosfatos de adenosina

Se detallan a continuación las condiciones cromatográficas finales establecidas para la separación de fosfatos de adenosina empleando las columnas monolíticas, funcionalizadas o no, que se han preparado.

Se prepararon disoluciones acuosas de 2000 ppm de adenosina (AD) y fosfatos de adenosina (AMP, ADP y ATP). Posteriormente, se preparó un blanco de 75 ppm AD, y una mezcla que contenía 75 ppm de AD y 150 ppm de cada uno de los fosfatos de adenosina. Se inyectó en el sistema cromatográfico 1 μ L del blanco o de la mezcla, y se aplicó un gradiente de separación a un caudal de 0,3 mL/min.

En la Tabla 4 se muestra el gradiente de separación establecido en este trabajo.

Tabla 4: Gradiente óptimo para la separación de fosfatos de adenosina.

Tiempo (min)	MeCN (%)	Tampón fosfato 2,5 mM pH 6,5 (%)
0	100	0
2	100	0
3	90	10
4	90	10
4,5	87	13
5,5	87	13
7	60	40
11	60	40
12	100	0
16	100	0

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La columna monolítica funcionalizada con magnetita desarrollada previamente (Enguix, 2017) se preparó a partir de una mezcla de polimerización que contenía una composición 40%GMA/60%DVB (monómero:entrecruzante) en un tubo de fluoropolímero ETFE de 10 cm de longitud y 0,75 mm de diámetro interno. La columna de referencia se preparó en las mismas condiciones, pero no se funcionalizó con magnetita.

En este trabajo, partiendo de la columna funcionalizada preparada en el proyecto anterior, se ha llevado a cabo la optimización de la cantidad de GMA en la mezcla de polimerización, y de las dimensiones de la columna que proporcionen una mejor separación de los fosfatos de adenosina. Por otra parte, se ha realizado un estudio de la repetibilidad de la separación de los solutos de prueba, y de las características de reproducibilidad, repetibilidad y reusabilidad de la columna optimizada.

6.1. Re-optimización de la separación de fosfatos de adenosina

Como se ha comentado, un primer resultado de la capacidad de separación de la columna monolítica funcionalizada con magnetita se obtuvo en el proyecto anterior. En dicho proyecto, se consiguió la separación empleando un gradiente de fase móvil Tampón fosfato pH 6,5 10 mM: Acetonitrilo (Tabla 5) a 0,3 mL/min.

Tabla 5. Gradiente de fase móvil empleado en el proyecto anterior (Enguix, 2017) para la separación de fosfatos de adenosina empleando la columna monolítica funcionalizada con magnetita.

<i>Tiempo</i>	<i>Tampón (%)</i>	<i>MeCN (%)</i>
0	0	100
2	0	100
7,5	40	60
11	40	60
12	0	100
16	0	100

Partiendo de estas condiciones, se han re-optimizado la concentración del tampón en la fase acuosa y las condiciones del gradiente de separación.

6.1.1. Estudio de la concentración de tampón en la fase acuosa

El mezclado de los componentes de la fase móvil, disolución tampón fosfato y acetonitrilo, genera una inestabilidad en la presión del sistema debido a la formación de burbujas cuando el porcentaje de la fase acuosa es bajo (aproximadamente entre 8-10%). Además, la inestabilidad en la presión se traduce unos minutos más tarde en un pico en el registro del cromatograma, que aparece solapado con del pico del ATP.

Para evitar esta perturbación, se varió la concentración del tampón fosfato de pH 6,5 entre 1,0-10 mM. En la Figura 9 se muestra la variación de la presión al realizar la determinación cromatográfica utilizando en la fase acuosa tampón 2,5 mM y 10 mM. Se observa que, al reducir la concentración del tampón (2,5 mM), la perturbación en la presión desaparece. Por otra parte, en la Figura 10, se muestran los cromatogramas de blanco y mezcla con tampón 2,5 o 10 mM en la fase acuosa. Se observa que los picos debidos a la variación de presión que aparecían con tampón 10 mM, desaparecen a concentración de tampón de 2,5 mM; por debajo de dicha concentración los picos cromatográficos van perdiendo eficacia.

La variación en la concentración del tampón no afectó a la separación de los 3 fosfatos de adenosina, por lo que se seleccionó 2,5 mM como la concentración óptima del tampón en la fase acuosa, concentración que se empleó en los siguientes estudios.

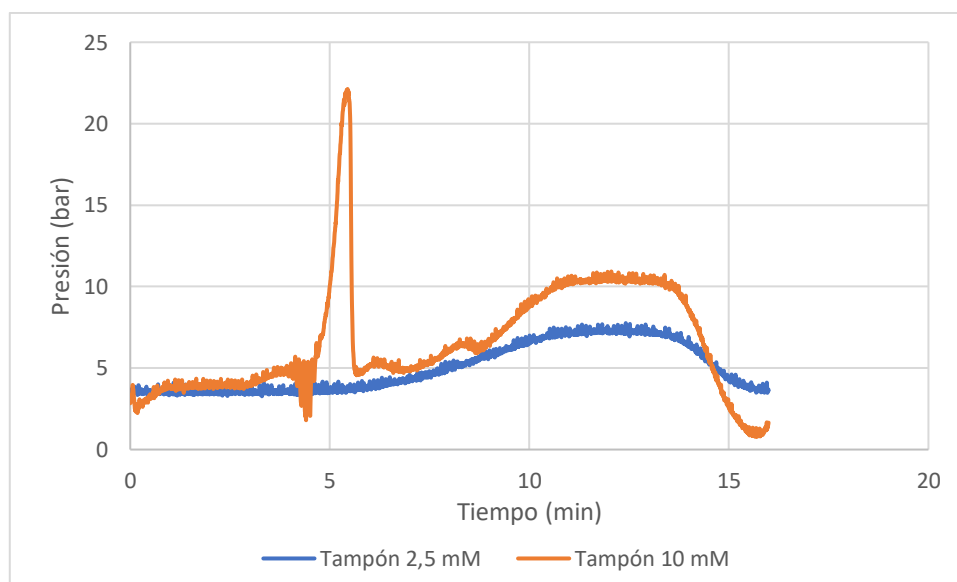


Figura 9. Variación de la presión a lo largo del tiempo de gradiente para dos concentraciones de tampón (2,5 mM y 10 mM)

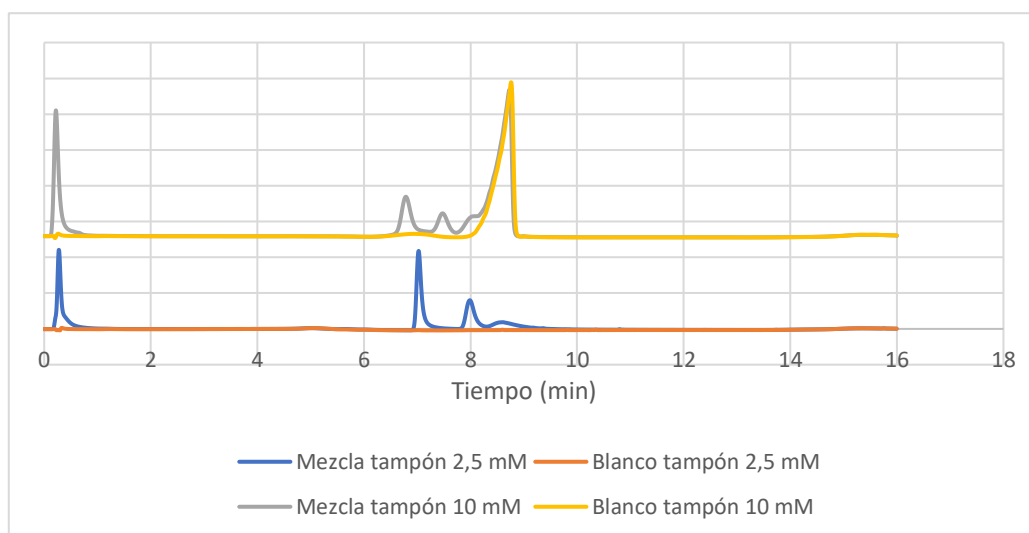


Figura 10. Cromatogramas de blanco y mezcla para dos concentraciones de tampón (2,5 mM y 10 mM).

6.1.2. Reoptimización del gradiente

A continuación, se mejoró la separación de los fosfatos de adenosina variando las condiciones del gradiente, que ha de empezar y terminar en las mismas condiciones. Todos los gradientes ensayados tienen una duración de 16 minutos: empiezan con un 0% de tampón (100% Acetonitrilo), se mantiene durante dos minutos, se aumenta progresivamente el % tampón hasta 40%, se mantiene este porcentaje durante 3,5-4 minutos, y se vuelve a las condiciones de inicio (100% Acetonitrilo), manteniéndolas 4-5 minutos para que se establezca la fase móvil antes de la siguiente inyección.

Para llegar al gradiente óptimo de separación, se han ensayado múltiples gradientes, pero sólo se muestran aquí los más significativos.

El gradiente de partida es el establecido en el anterior proyecto (Tabla 5). En la Figura 11 se representa la variación del porcentaje de tampón (%Tampón) con el tiempo en una gráfica, puesto que es una forma sencilla de entender los cambios en la fase móvil a lo largo del gradiente.

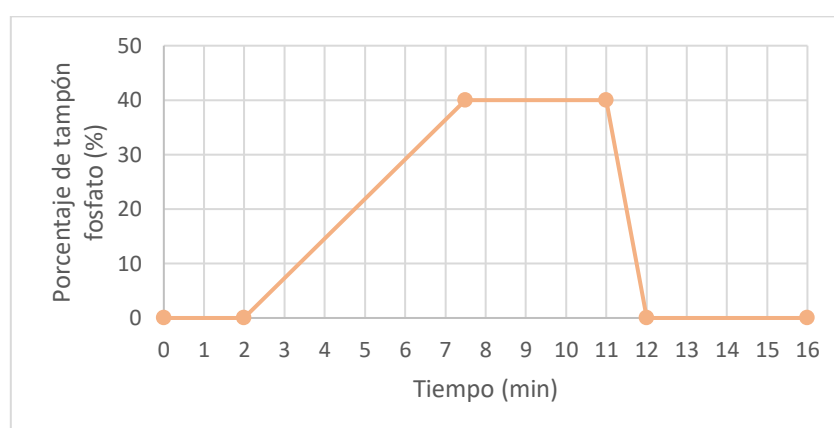


Figura 11. Variación del %Tampón con el tiempo (gradiente de partida).

Con este gradiente de partida, se obtuvo la separación de los fosfatos de adenosina que se muestra en la Figura 12.

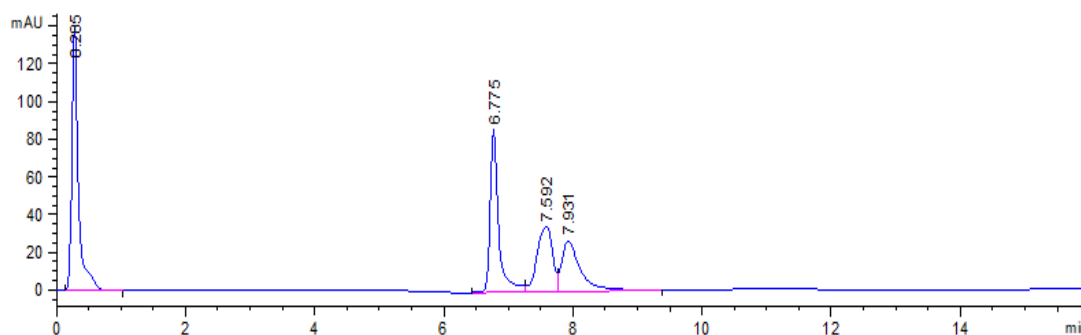


Figura 12. Separación de los fosfatos de adenosina con el gradiente inicial.

En el cromatograma obtenido empleando el gradiente de partida (Figura 12) se observa que la adenosina no se retiene en la columna, es el pico del frente, que nos dará el tiempo muerto del cromatograma ($t_r = 0,285$ min). Los 3 picos entre 6,5-8,5 minutos corresponden al AMP ($t_r = 6,775$ min), ADP ($t_r = 7,592$ min) y ATP ($t_r = 7,931$ min), respectivamente. Se observa en el cromatograma un ligero solape entre los picos de ADP y ATP.

Para intentar separar los picos de ADP y ATP, se realizó una primera modificación al gradiente anterior, que consistió en programar en el gradiente un escalón en el que se mantuvo el %Tampón en un 10% durante 1,5 minutos. Posteriormente, se aumentó el %Tampón hasta el 40%, porcentaje que se mantuvo constante durante 3,5 minutos, para bajar posteriormente a 0% tampón (Figura 13).

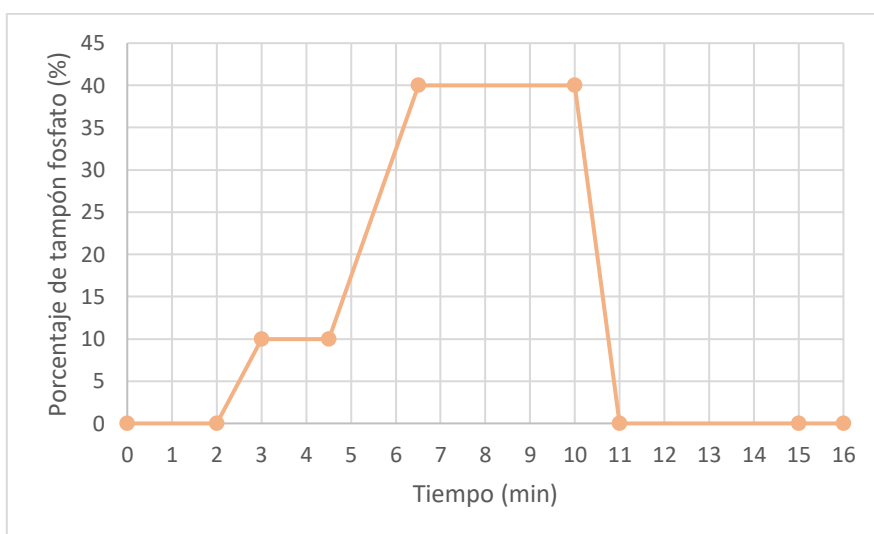


Figura 13. Variación del %Tampón con el tiempo (primera modificación del gradiente)

En la Figura 14 se muestra el cromatograma obtenido empleando esta primera modificación del gradiente. En este caso, el AMP está perfectamente separado ($t_r = 6,537$). Sin embargo, el ADP ($t_r = 8,305$) proporciona un pico deformado, con un hombro en la parte delantera del pico, y el ATP ($t_r = 8,542$) sigue ligeramente solapado con el ADP.

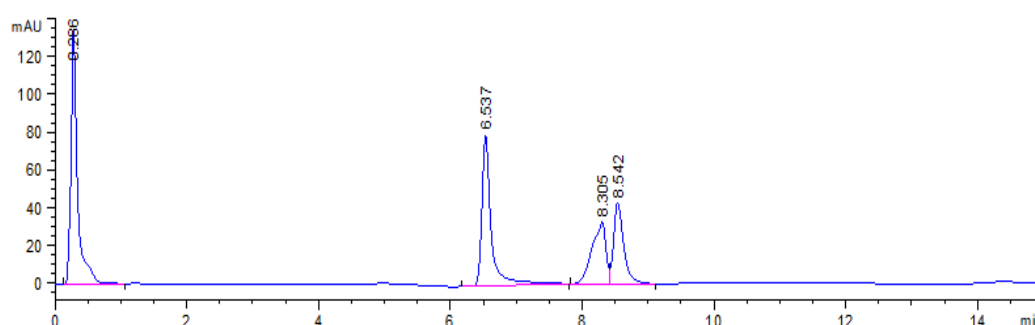


Figura 14. Separación de los fosfatos de adenosina en la primera modificación del gradiente.

Vistos los resultados anteriores, se modificó el gradiente inicial de forma que se incrementó la velocidad de cambio para llegar al 20% en un minuto, y después se llegó a un 40% de tampón fosfato con una pendiente más suave. Este porcentaje se mantuvo 3,5 minutos y finalmente vuelve a bajar a un 0% tampón (Figura 15).

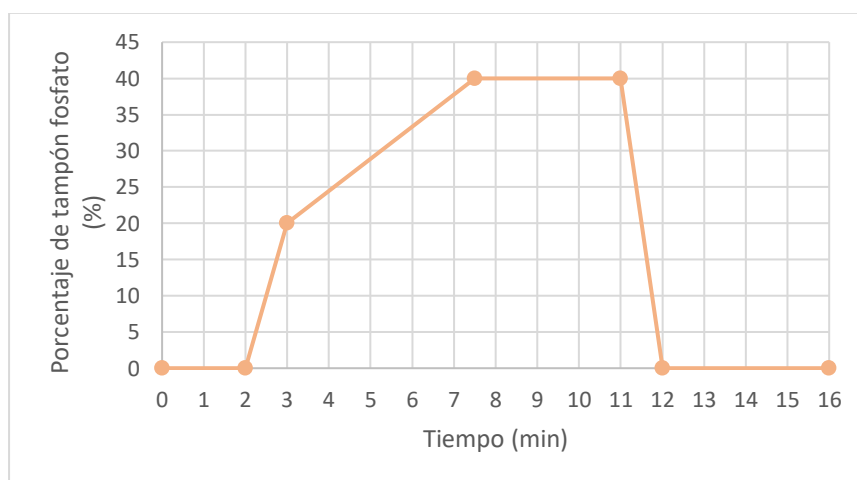


Figura 15. Variación del %Tampón con el tiempo (segunda modificación del gradiente)

El cromatograma de la mezcla en estas condiciones (Figura 16) muestra ahora que AMP y ADP (t_r 5,982 y 6,359 min respectivamente) tienen picos altos y estrechos, pero se han juntado demasiado. Por otra parte, ATP (t_r 6,605 min) es un pico más ancho y con algo de cola, ligeramente solapado con ADP. Por tanto, esta modificación del gradiente tampoco es adecuada para realizar la separación de fosfatos de adenosina.

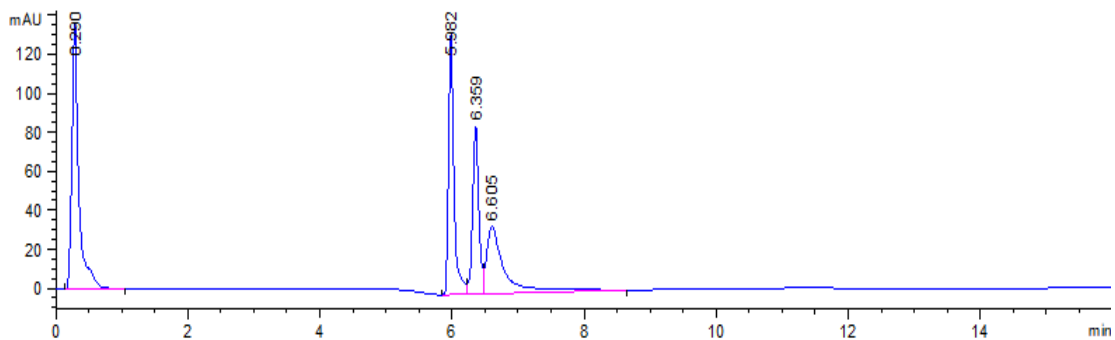


Figura 16. Separación de los fosfatos de adenosina en la segunda modificación del gradiente.

Debido a los resultados obtenidos en las modificaciones del gradiente anteriores, se introduce un tercer cambio (Figura 17). Este gradiente se caracteriza por la presencia de dos escalones en los que se mantiene el %Tampón constante. En primer lugar, se incrementa el porcentaje de tampón al 10 % del minuto 2 al 3, se mantiene el %Tampón durante un minuto, y se vuelve a subir hasta un 25%, manteniéndolo durante 1 minuto y, finalmente, se sube dicho porcentaje hasta un 40%, manteniéndolo durante 3,5 minutos, para bajarlo de nuevo a 0% tampón en el minuto 12.

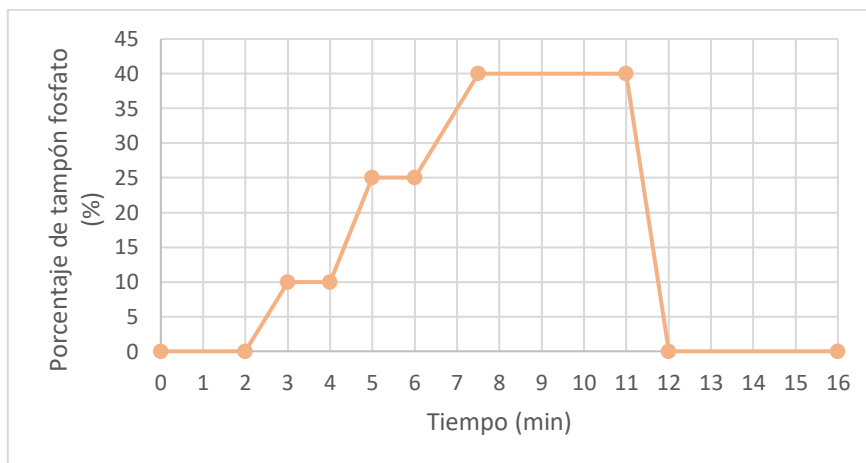


Figura 17. Variación del %Tampón con el tiempo (tercera modificación del gradiente)

Como puede observarse en la Figura 18, el AMP se separa perfectamente en estas condiciones ($t_r = 6,414\text{min}$), el pico del ADP ($t_r = 7,711\text{ min}$) vuelve a tener un pequeño hombro en la parte de delante, y el ATP ($t_r = 7,977\text{ min}$) aparece de nuevo ligeramente solapado con el ADP. Así que seguimos sin haber resuelto los 3 picos.

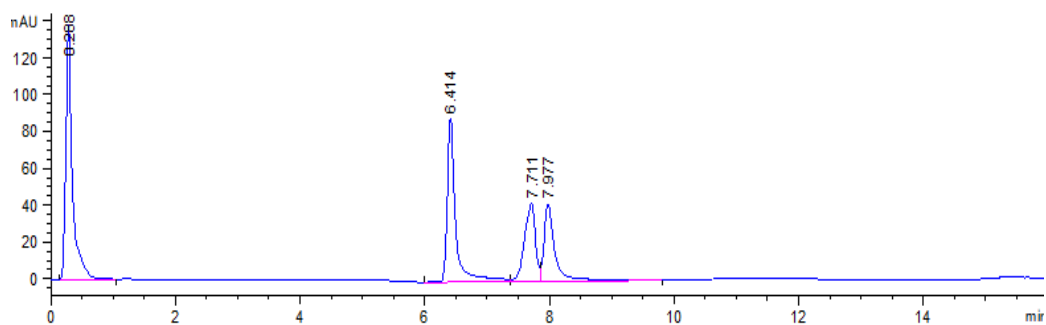


Figura 18. Separación de los fosfatos de adenosina en la tercera modificación del gradiente.

Finalmente, se realizó una cuarta modificación, que se caracteriza por tener mantener el porcentaje de tampón fosfato al 10% durante 1 minuto, subir dicho porcentaje hasta el 13% y volver a mantenerlo durante un minuto, subirlo hasta el 40%, mantener este porcentaje durante 4 minutos y, finalmente, bajar el %Tampón hasta el 0% en el minuto 12 (Figura 19).

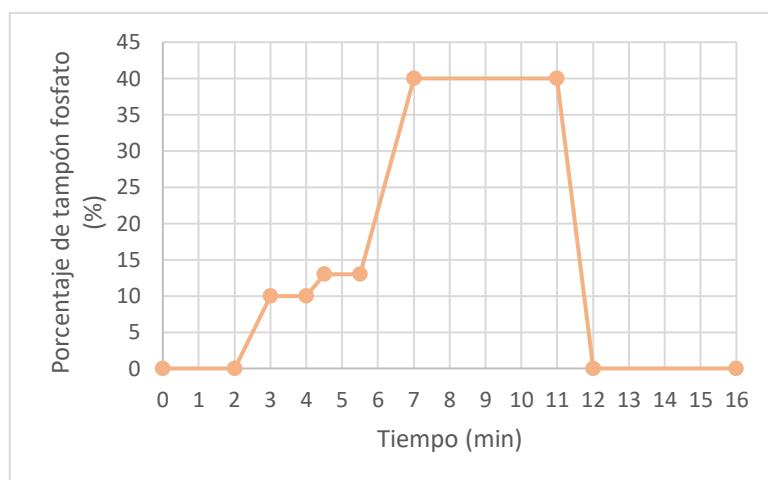


Figura 19. Variación del %Tampón con el tiempo (cuarta modificación del gradiente)

En esta última modificación del gradiente se obtiene una buena separación de los 3 fosfatos de adenosina (Figura 20): se observa que AMP ($t_r = 6,739$ min) está perfectamente separado de ADP ($t_r = 8,555$ min), y este último, está bien separado también de ATP ($t_r = 9,245$ min). Los 3 picos tienen además buena simetría, sin presencia de hombros ni grandes colas. Por ello, este gradiente se selecciona como óptimo.

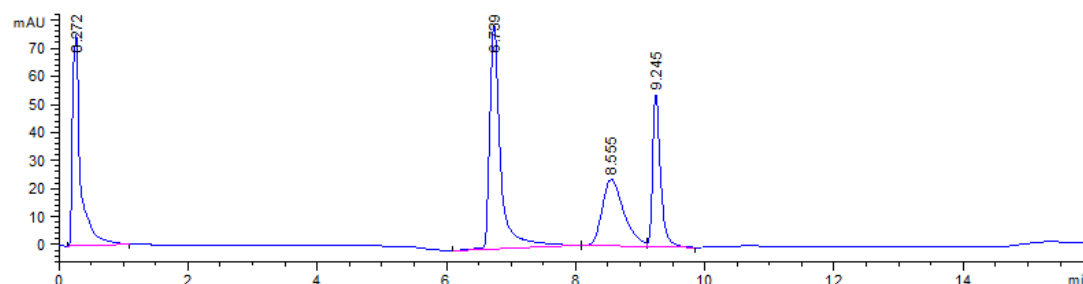


Figura 20. Separación de los fosfatos de adenosina con la cuarta modificación del gradiente.

6.1.3. Identificación de los analitos

Con el gradiente óptimo, se inyectó cada analito por separado (AD, AMP, ADP y ATP) (Figura 21). Con este estudio se identifican los 4 picos del cromatograma de la mezcla con cada uno de los analitos AD ($t_r = 0.272$ min), AMP ($t_r = 6,739$ min), ADP ($t_r = 8.555$ min) y ATP ($t_r = 9.245$ min) y, además, se asegura que el comportamiento individual de los analitos es igual que en la mezcla.

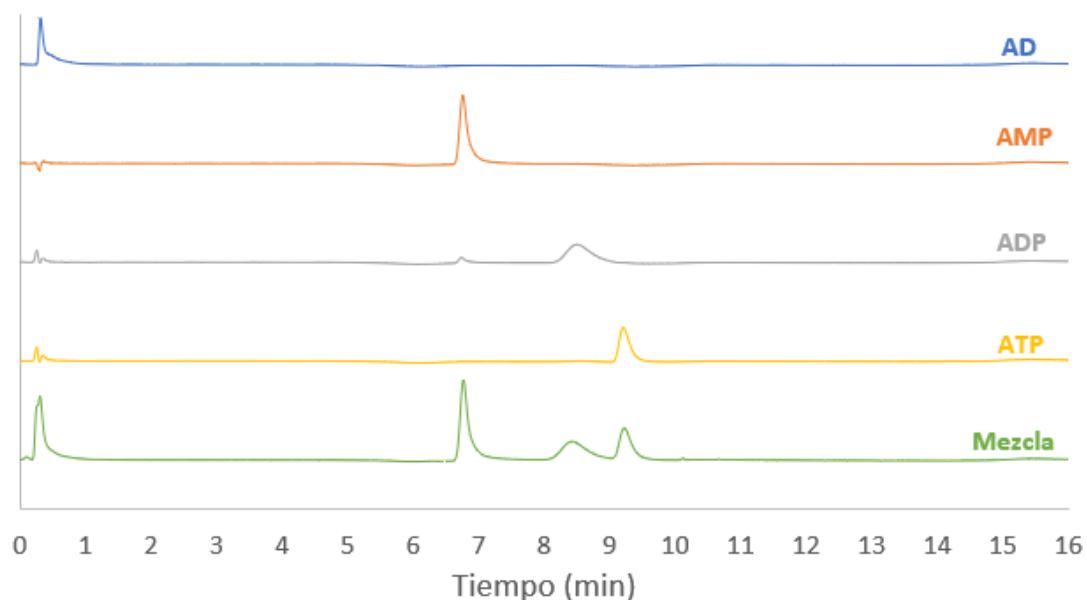


Figura 21. Cromatogramas individuales de AD, AMP, ADP, ATP y Mezcla con la columna funcionalizada con magnetita

6.1.4. Comparación con la columna de referencia

Una vez establecido el gradiente óptimo de separación, se realizó la comparación de la retención de los analitos empleando la columna monolítica funcionalizada con NPs de magnetita y la columna monolítica de referencia. En la Figura 22 se muestra el cromatograma de la mezcla de adenosina y los tres fosfatos de adenosina obtenido con la columna funcionalizada con NPs y con la columna de referencia. Puede observarse que la columna de referencia no es capaz de resolver bien la separación de la mezcla, obteniéndose picos más solapados, anchos y con cola. Además, el pico a $t_r=0,27$ min es más grande con la columna de referencia, lo que implica que parte de los analitos sale en el frente del cromatograma, de lo que se deduce que la retención es peor con esta columna.

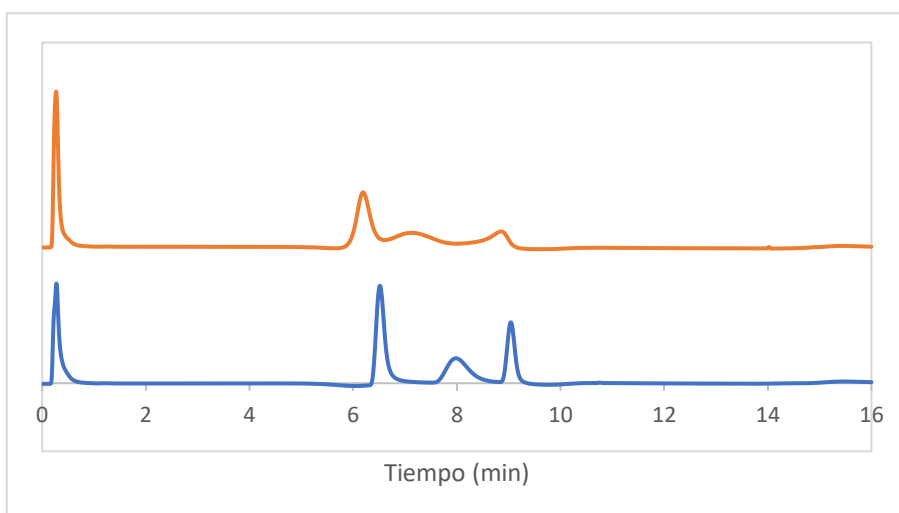


Figura 22. Cromatograma de Adenosina, AMP, ADP y ATP con la columna funcionalizada (azul) y con la columna de referencia (naranja).

En la Tabla 6 se muestran los parámetros cromatográficos obtenidos con las columnas de referencia y funcionalizada con NPs. Los tiempos de retención son superiores con la columna funcionalizada debido a una mayor cantidad de interacciones entre los analitos y la fase estacionaria, lo que indica mejor retención. Los parámetros que miden la eficacia de las columnas (N y P_c) proporcionan valores mejores con la columna funcionalizada, y la resolución, tanto individual como global, también es mejor con dicha columna. Estos resultados demuestran el papel clave de la presencia de NPs para la adecuada separación de estos compuestos fosforados.

Tabla 6. Parámetros cromatográficos de la columna de referencia y funcionalizada.

	Columna NPs	Columna Referencia
$t_{r\ AMP}$ (min)	6,502	6,204
$t_{r\ ADP}$ (min)	7,960	7,140
$t_{r\ ATP}$ (min)	9,043	8,850
N_{AMP}	7781	2623
N_{ADP}	1584	331
N_{ATP}	15656	2537
$P_{c\ AMP}$	18,2	11,4
$P_{c\ ADP}$	7,32	4,19
$P_{c\ ATP}$	18,5	8,20
$R_{s\ AMP}$	25,5	18,1
$R_{s\ ADP}$	2,66	0,910
$R_{s\ ATP}$	1,98	1,50
R_G	5,12	2,91

6.2. Optimización de la mezcla de polimerización y dimensiones de la columna

Una vez establecido el método óptimo para la separación de los fosfatos de adenosina, se puede utilizar éste para mejorar la composición de las columnas propuestas y estudiar el efecto que puede tener variar las dimensiones de las mismas.

Para caracterizar cada una de las columnas, se han inyectado por triplicado un blanco de adenosina y la mezcla de adenosina con los tres fosfatos de adenosina, para poder compararlas. La comparación entre columnas se hace en base a distintos parámetros: se ha determinado para cada pico cromatográfico el tiempo de retención, el área del pico, el número de platos teóricos (N), la altura de plato (H) y la capacidad de pico. También se han determinado la resolución individual de los picos y la resolución global. Todos los valores se han obtenido como la media aritmética de las 3 réplicas realizadas.

En todo el proceso de optimización se ha priorizado la mejora en la separación de los picos ADP/ATP, que tal como se ha visto en el apartado 6.1.2., serían los compuestos cuya separación es más crítica.

6.2.1. Estudio del porcentaje de GMA

Se ha llevado a cabo un estudio con diferentes cantidades de monómero en la mezcla de polimerización, variando el porcentaje de GMA en la relación monómero:entrecruzante (GMA:DVB) entre un 30% y un 60%, para establecer la influencia del porcentaje de GMA (%GMA) en las características de retención de la columna.

Respecto al **tiempo de retención** y al **área** de los picos, se observan tan sólo ligeros cambios para los 3 fosfatos de adenosina al modificarse el %GMA. En la Figura 23, se muestran los tiempos de retención para AMP, ADP y ATP obtenidos para columnas con un 30%, 40%, 50% y 60% de GMA. El tiempo de retención del AMP se encuentra alrededor de los 6,5 minutos, el de ADP entorno a los 8,5 minutos, y el de ATP alrededor de los 9 minutos.

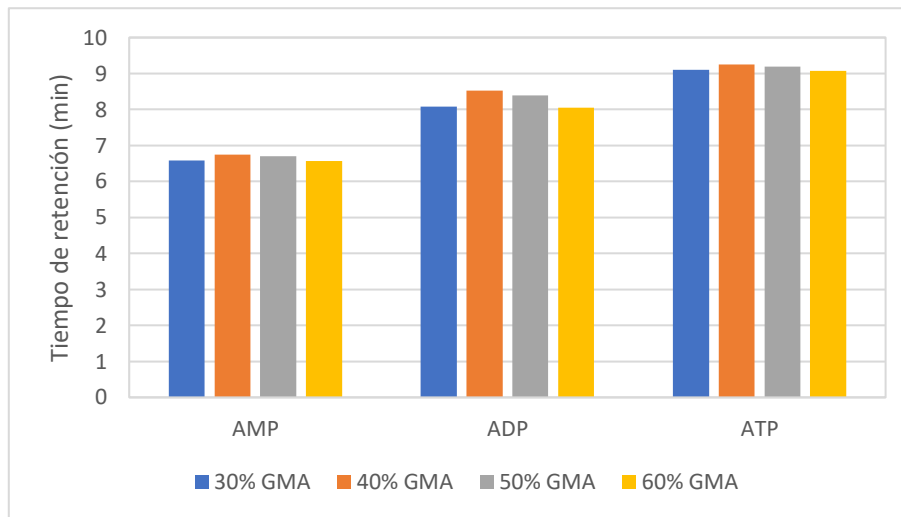


Figura 23. Tiempos de retención de los fosfatos de adenosina en columnas con diferente porcentaje de GMA.

Como se ha explicado en la introducción de la memoria, el **número de platos teóricos** (N) está relacionado con la eficacia de separación de la columna, de manera que cuanto mayor sea el valor de N, mayor será su eficacia. Tal como se observa en la Figura 24, para el AMP se obtienen valores similares de N con las columnas con un 40, 50 y 60% de GMA. Sin embargo, para la columna con un 30% de GMA los valores de N son un poco mayores. En el ADP el valor de N es bastante bajo en todos los casos, aunque se observa que para la columna con un 40% de GMA estos valores son mayores. Por último, para el ATP se observa claramente que el valor de N para la columna con un 40% de GMA es mucho mayor que para el resto de las columnas.

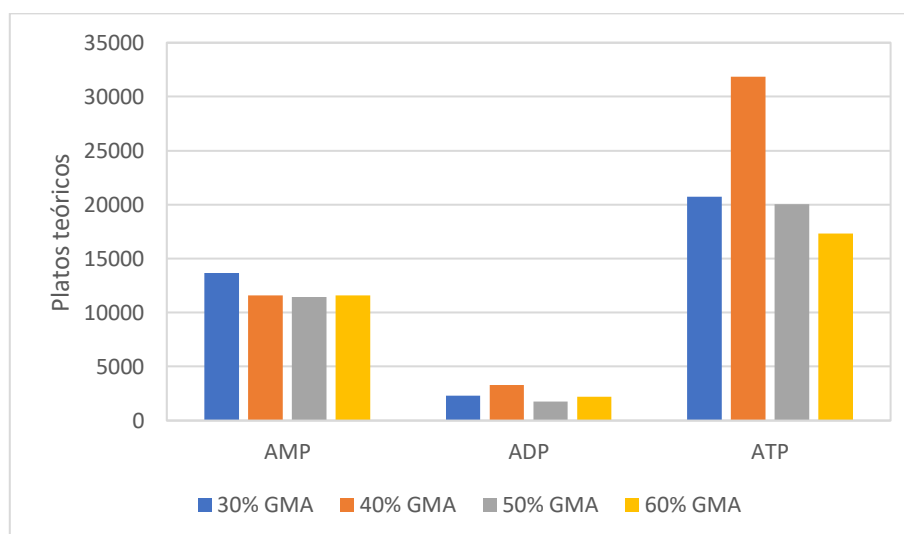


Figura 24. Platos teóricos (N) en las columnas con diferentes porcentajes de GMA.

Por otra parte, se ha calculado también la **altura de plato teórico (H)** de cada pico, parámetro también relacionado con la eficacia de los picos, de forma que cuanto menor sea la altura de plato, mejor es la eficacia de los picos. Como puede observarse en el Figura 25, el ADP es el compuesto que presenta mayor altura de plato, por lo que es el pico que se resuelve con menor eficacia. El menor valor de H para el ADP se obtiene con la columna de 40% de GMA, que sería la que proporcionaría mayor eficacia de separación para este pico. Para AMP y ATP, H es similar en cualquiera de las columnas estudiadas.

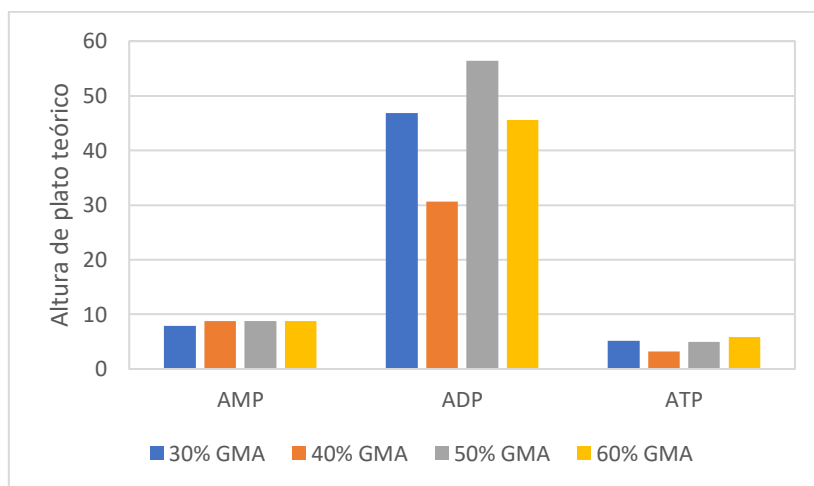


Figura 25. Altura de plato teórico (H) de los fosfatos de adenosina en las columnas con diferente porcentaje de GMA.

Para continuar con el estudio del efecto del %GMA en la separación, se ha calculado también **la resolución**. La resolución (R_s) es el parámetro que nos indica si 2 picos consecutivos están resueltos, es decir, separados, de forma que se considera que dos picos están resueltos si el valor de R_s es mayor de 1,5. Para establecer la influencia del %GMA en la resolución de los tres compuestos, se ha calculado la resolución de cada uno de los picos. Así, R_{S1} representa la resolución del AMP respecto de la adenosina, R_{S2} representa la resolución del ADP respecto del AMP y R_{S3} representa la resolución del ATP respecto del ADP. Por otra parte, se puede calcular la **resolución global** como la media geométrica de los 3 valores de resolución anteriores (R_{S1} , R_{S2} y R_{S3}).

En la Tabla 7 se muestran los valores de resolución y resolución global para la mezcla de adenosina y los tres fosfatos de adenosina, utilizando el gradiente de separación óptimo, con las columnas de 30%, 40%, 50% y 60% GMA. Todos los valores de resolución son mayores de 1,5, lo que nos indica que los fosfatos de adenosina están bien separados. La resolución global es similar en todos los casos.

Tabla 7. Resolución de los fosfatos de adenosina usando el gradiente óptimo con las columnas con diferente porcentaje de GMA

	R_{s1}	R_{s2}	R_{s3}	R_G
Columna 30%	31,4	3,29	2,22	6,11
Columna 40%	29,8	4,21	1,83	6,12
Columna 50%	27,9	3,21	1,51	5,14
Columna 60%	28,6	3,18	2,15	5,80

Por último, en la Figura 26 se muestra una gráfica con los valores de **capacidad de pico** de los fosfatos de adenosina con las columnas con diferente porcentaje de monómero. Para la columna con un 30% de GMA la capacidad de pico del AMP es ligeramente mayor. Sin embargo, para ADP y ATP la columna con un 40% de GMA posee una capacidad de pico mayor que con el resto de las columnas.

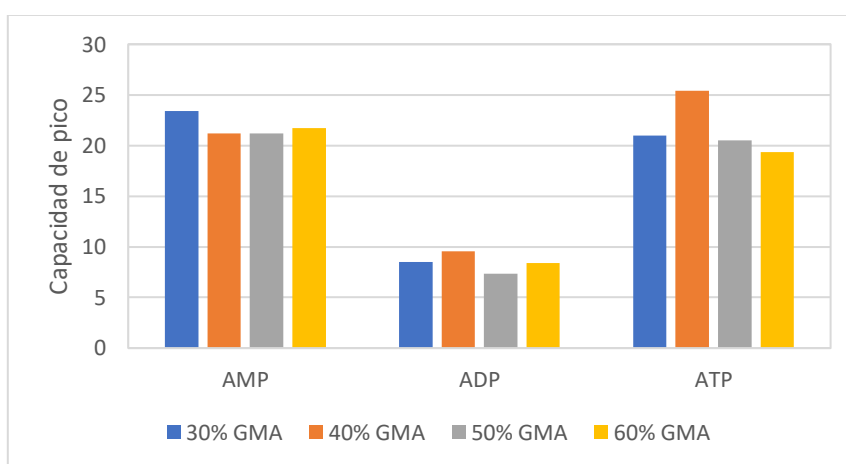


Figura 26. Capacidad de pico (P_c) en las columnas con diferentes porcentajes de GMA.

Teniendo en cuenta todos los parámetros estudiados, se seleccionó un %GMA del 40% en la relación monómero:entrecruzante (que quedará 40%GMA:60%DVB), ya que el valor de N y H son mejores para ADP y ATP, la resolución global es la mejor y la individual es siempre mayor que 1,5, y la capacidad de pico es ligeramente mejor para ADP y ATP con esta columna.

6.2.2. Estudio de la longitud de la columna

A continuación, se estudió la influencia de la longitud de la columna en la separación de los fosfatos de adenosina. Es interesante determinar este parámetro ya que cuanto mayor sea la longitud de la columna, no sólo se necesitan mayores cantidades de teflón y de los diferentes reactivos empelados en su síntesis, sino que, además, la columna resultante es más frágil en su manejo, y el proceso de funcionalización con las NPs aminadas también se hace más largo.

Para este estudio, se prepararon columnas monolíticas de diferentes longitudes (5, 10, 15 y 20 cm) y 0,75 mm de diámetro interno y un porcentaje de GMA del 40%. Y se estudiaron con las columnas funcionalizadas los mismos parámetros que en el apartado anterior: tiempos de retención, áreas, resolución, número de platos, etc.

Los **tiempos de retención** y las **áreas** de los fosfatos de adenosina con las diferentes columnas son muy similares, por lo que la longitud no parece influir en estos parámetros.

Respecto a la **eficacia de los picos**, en el AMP se observa un aumento en el número de platos teóricos al aumentar la longitud de la columna, comportamiento que no se observa con los otros fosfatos de adenosina. Sin embargo, para ADP y ATP se observa mejor eficacia con la columna de 10 cm de longitud (Figura 27). Los resultados con el estudio de la altura de plato dieron conclusiones similares.

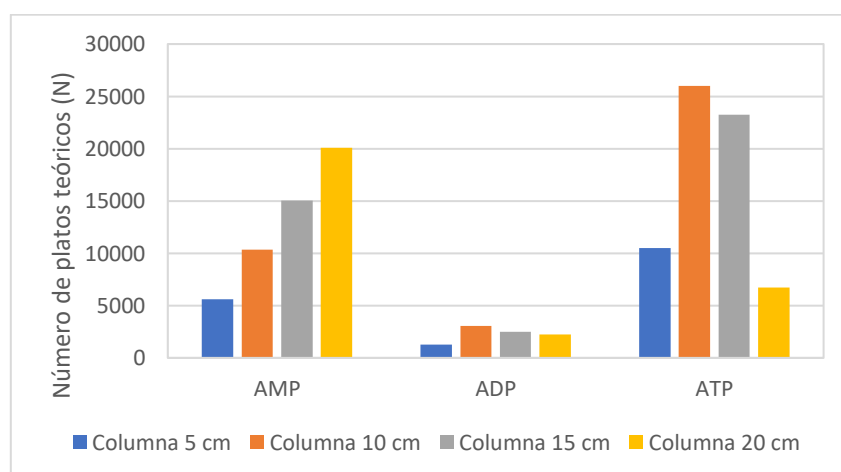


Figura 27. Número de platos teóricos (N) de los picos cromatográficos en las columnas con distinta longitud.

En cuanto a la **resolución de los picos**, las resoluciones individuales (Tabla 8) fueron adecuadas en todos los casos, con valores superiores a 1,5; la resolución global fue mejor a partir de una longitud de columna de 10 cm, con valores similares.

Tabla 8. Resolución de los fosfatos de adenosina y resolución global con columnas de diferente longitud.

	R_{s1}	R_{s2}	R_{s3}	R_G
Columna 5 cm	24,0	2,20	1,69	4,46
Columna 10 cm	28,2	4,03	1,66	5,74
Columna 15 cm	30,5	3,68	1,83	5,90
Columna 20 cm	34,9	3,21	1,62	5,67

Por último, se estudió la **capacidad de pico**, y se llegó a las mismas conclusiones que en el estudio de la eficacia: la mayor P_c se obtuvo para AMP con la columna de 20 cm, y para ADP y ATP con la columna de 10 cm.

Finalmente, se selecciona una longitud de columna de 10 cm, ya que aporta mejores características de H, N y P_c para ADP y ATP, y requiere menos tiempo de preparación.

6.2.3. Estudio del diámetro interno de la columna

A continuación, se estudió la influencia del diámetro interno de la columna en la separación de los fosfatos de adenosina. Es interesante determinar este parámetro ya que cuanto mayor sea el diámetro interno del tubo, mayor cantidad de relleno polimérico contiene la columna, lo que puede influir en la separación de los compuestos. Hay que resaltar que la preparación de la columna de mayor diámetro interno implica muchas más horas de reacción de adición de NPs para su funcionalización.

Para este estudio, se prepararon columnas monolíticas de diámetro interno 0,75 y 1,5 mm, y 10 cm de longitud con un porcentaje de GMA del 40%. Y se estudiaron los mismos parámetros que en el apartado anterior.

Los **tiempos de retención** para los tres fosfatos de adenosina han sido menores para la columna de 0,75 mm d.i., con una diferencia aproximada de 1 minuto (Figura 28).

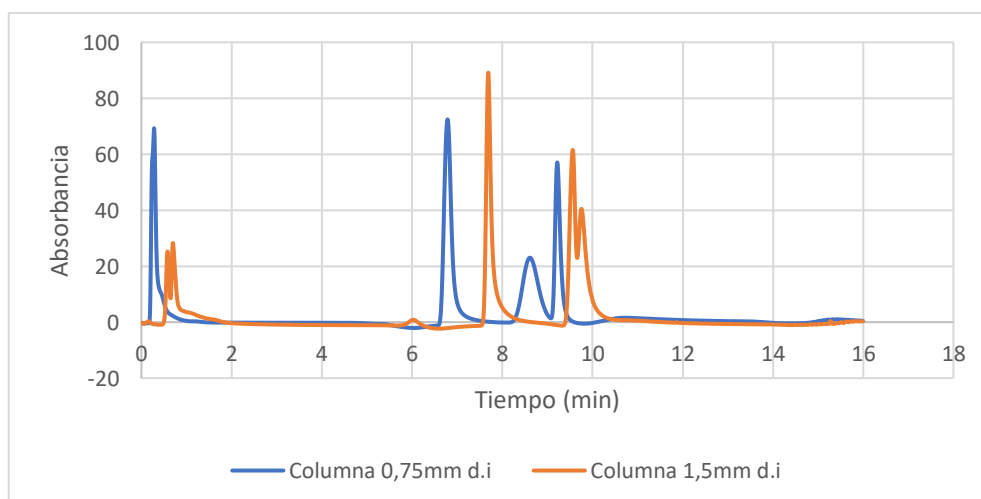


Figura 28. Cromatogramas con las columnas de 0,75 mm d.i (azul) y 1,5 mm d.i. (naranja)

El **área de pico** para AMP fue similar con las 2 columnas. Sin embargo, las áreas de pico de ADP y ATP no pudieron medirse bien con la columna de 1,5 mm d.i. porque los picos aparecían ligeramente solapados (Figura 28).

En cuanto a la **resolución**, en la Tabla 9, se observa que la resolución individual del ATP es menor de 1,5 para la columna de 1,5 mm d.i., lo que implica que hay solapamiento de pico, tal como se observa también en la Figura 27. Por lo tanto, la resolución global es mejor con la columna de 0,75 mm d.i.

Tabla 9. Resolución global de las columnas con d.i. diferente.

	R_{s1}	R_{s2}	R_{s3}	R_G
Columna 0,75 mm d.i.	29,3	3,80	1,57	5,60
Columna 1,5 mm d.i.	4,85	6,61	0,63	2,73

En el estudio de la **eficacia de la separación**, los parámetros N, H y P_c indicaron mejor eficacia para AMP y ADP con la columna de 1,5 mm d.i., y peor eficacia para ATP con esta misma columna.

Finalmente, se selecciona la columna de 0,75 mm d.i, ya que aporta mejores características de área de pico, resolución y eficacia para ADP y ATP, y mejor capacidad de pico para ATP. Además, el proceso de preparación de la columna resulta mucho más sencillo.

6.3. Calidad de la separación

El estudio del comportamiento de la columna monolítica funcionalizada con magnetita se ha realizado evaluando parámetros estadísticos como la repetibilidad del proceso de medida, la reusabilidad de la columna, y la repetibilidad y reproducibilidad en la preparación de la columna, usando para ello las condiciones óptimas encontradas en la determinación de los fosfatos de adenosina (40%GMA, 10 cm, 0,75 mm d.i.).

Para establecer estos parámetros, se ha deducido el coeficiente de variación (%CV) de las medidas del tiempo de retención y área de pico para AMP, ADP y ATP. Valores de coeficiente de variación inferiores al 10% indican una buena precisión del proceso evaluado.

6.3.1. Estudio de repetibilidad del proceso de medida

Para estudiar la repetibilidad del proceso de medida se han realizado en el mismo día y empleando la misma columna, 3 inyecciones de 3 disoluciones de la mezcla de AMP/ADP/ATP (Tabla 10).

Tabla 10. Repetibilidad del proceso de medida

	Promedio	Desv. Estandar	% CV
$t_{r\ AMP}$ (min)	6,717	0,013	0,197
$t_{r\ ADP}$ (min)	8,765	0,015	0,172
$t_{r\ ATP}$ (min)	9,346	0,008	0,0865
Área AMP	938	5	0,564
Área ADP	541,3	0,6	0,110
Área ATP	435	4	0,959

En todos los casos, los coeficientes de variación son menores de 0,96%, lo que indica una buena precisión del proceso de medida.

6.3.2. Estudio de reusabilidad de la columna

En el estudio de la reusabilidad, se ha empleado la misma columna en la medida de una mezcla de AMP/ADP/ATP. Se han empleado 4 medidas recogidas a lo largo los 3 meses de trabajo y se ha calculado el coeficiente de variación del tiempo de retención y el área de los analitos (Tabla 11).

Tabla 11. Reusabilidad de la columna

	% CV
$t_{r\ AMP}$ (min)	0,344
$t_{r\ ADP}$ (min)	1,42
$t_{r\ ATP}$ (min)	0,670
Área AMP	1,06
Área ADP	13,7
Área ATP	4,70

Los coeficientes de variación en este estudio son menores de 4,7% excepto en el área del ADP, donde el %CV es de 13,7%. La variación en el área medida para el ADP se debe a que, aunque la separación entre los picos es buena, el pico del ADP es más ancho que los de AMP y ATP, y tiene un poco de cola, por lo que la medida del área bajo el pico resulta menos precisa.

El estudio de la reusabilidad ha demostrado que la capacidad de separación de la columna ha permanecido estable durante los 3 meses de trabajo sin variaciones significativas.

6.3.3. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad en la preparación de la columna

A continuación, se ha estudiado la capacidad de reproducir los resultados con columnas preparadas en diferentes momentos.

En el estudio de repetibilidad se han preparado 3 columnas en un mismo día, empleando la misma mezcla de polimerización. Con las columnas funcionalizadas, se ha inyectado por triplicado la misma mezcla de AMP/ADP/ATP en cada una de las 3 columnas.

En el estudio de la reproducibilidad se han preparado 3 columnas en diferentes días, empleando mezcla de polimerización preparada cada día. Con las columnas funcionalizadas, se ha inyectado por triplicado la misma mezcla de AMP/ADP/ATP con cada una de las 3 columnas.

Los coeficientes de variación para los parámetros de tiempos de retención y área de pico en estos dos estudios se reflejan en la Tabla 12.

Tabla 12. Repetibilidad y reproducibilidad en la preparación de las columnas

	Repetibilidad	Reproducibilidad
	% CV	% CV
$t_{r\text{ AMP}}$ (min)	0,439	2,36
$t_{r\text{ ADP}}$ (min)	0,683	6,88
$t_{r\text{ ATP}}$ (min)	4,59	2,36
Área AMP	1,78	2,54
Área ADP	3,60	12,3
Área ATP	2,90	2,74

La repetibilidad ha dado %CV inferior a 4,6% en todos los casos, indicando una buena precisión de los resultados empleando columnas preparadas con la misma mezcla de polimerización en el mismo día. En cuanto la reproducibilidad, el %CV es menor de 6,9% en general, excepto para el área del ADP, que como se ha comentado anteriormente, resulta más imprecisa su medida.

7. CONCLUSIONES

Partiendo de un sistema cromatográfico con una columna monolítica polimérica funcionalizada con NPs de magnetita se ha realizado una reoptimización de la fase móvil utilizada, comenzando por la concentración del tampón de fosfato.

Se concluye que una concentración de tampón de 2,5 mM es la más adecuada ya que permite a la vez, una correcta separación de los analitos y la eliminación de las perturbaciones en el sistema debidas al mezclado de la fase acuosa con la fase orgánica durante en gradiente.

A continuación, en el estudio del gradiente de trabajo, se observó que cuando se hacían dos pequeños escalones entre el 10 y el 13% de la concentración de tampón, se consigue que desaparezca el solape entre el ADP y el ATP, teniendo estos picos una buena simetría sin hombros ni colas.

Los picos de los analitos han quedado identificados, observando el mismo comportamiento de forma individual o en la mezcla. Se deduce que existen interacciones entre el grupo fosfato y la magnetita, a medida que aumenta el número de grupos fosfato, la interacción es mayor y se incrementan los tiempos de retención ATP>ADP>AMP.

Al comparar la separación con la columna de referencia y la funcionalizada con NPs, se ha demostrado el papel fundamental de las NPs para una eficaz separación de los fosfatos de adenosina.

Con respecto al estudio de la composición de la fase estacionaria (columna monolítica), se varió la relación de GMA:DVD. Se esperaba que, a mayor porcentaje, habría mayor cantidad de puntos de anclaje para las NPs y, por lo tanto, mayor sería su efecto en la retención de los analitos. Sin embargo, los tiempos de retención y áreas no se modificaron, y los parámetros cromatográficos estudiados (N , H , R_s , R_G , P_c) solo proporcionaron ligeras variaciones, seleccionándose como óptimo un %GMA del 40% en la proporción GMA:DVB, la condición inicial.

Respecto a las dimensiones de las columnas, no se sabía cómo podía influir la variación de estas. La preparación de columnas con dimensiones mayores tiene aparejadas el incremento importante del tiempo de preparación y complicaciones en el trabajo de laboratorio.

En el estudio de la longitud de la columna (5, 10 y 20 cm), no se observaron mejoras al aumentar la longitud de la columna a partir de 10 cm. Por ello, se seleccionó la de 10 cm de longitud, cuyo proceso de preparación es más breve.

Respecto al diámetro, las columnas con un d.i. de 1,5 mm requieren muchas horas de adición de NPs para la funcionalización del monolito (20-25 horas), ya que contenían mayor cantidad de relleno polimérico. La columna de 0,75 mm d.i., dio tiempos de retención menores, y resolución y eficacia del ADP y ATP mejores que con la columna de 1,5 mm d.i., donde los picos de ADP y ATP aparecían ligeramente solapados.

Una vez que se ha caracterizado la columna óptima, es necesario demostrar la robustez de su funcionamiento, y para esto se han realizado los estudios que permiten evaluar la reproducibilidad de su comportamiento.

Los coeficientes de variación obtenidos en el estudio de reusabilidad de la columna muestran que es posible usarla durante un tiempo largo sin que se aprecie alteración. Se obtienen %CV en las áreas de los picos del orden del 4,7%, en columnas que se usan más de tres meses.

La reproducibilidad en el proceso de preparación también se ha demostrado con columnas preparadas en distintas circunstancias. La repetibilidad (distintas columnas, misma mezcla), proporciona %CV en los tiempos de retención inferiores a 4,6% y la reproducibilidad (distintas columnas, diferentes mezclas) da también coeficientes de variación muy adecuados (%CV < 6,9% para los t_r). Así pues, la columna presenta un comportamiento muy reproducible, tanto en su uso como en su preparación.

Como conclusión general, la columna monolítica modificada con NPs permite una separación eficaz de los fosfatos de adenosina bajo las condiciones experimentales optimizadas, y tiene un comportamiento reproducible, tanto en el uso como en la preparación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alzate Rodríguez, E. (2014). *Tipos de cromatografía*. Disponible en: <http://blog.utp.edu.co/docenciaedwin/files/2014/09/TIPOS-CROMATOGRAF%C3%8DA.pdf> [Fecha de consulta: 24 abril 2018].
- Ayora, M. J., *Tema 6: Técnicas cromatográficas*. Disponible en: http://www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/Quimica%20analitica%20ambiental/Tema6.pdf [Fecha de consulta: 24 abril 2018].
- Cantó Mirapeix M., “*Preparación y caracterización de nuevas columnas monolíticas de acrilato y metacrilato para electrocromatografía capilar*”, 2009.
- Catalá-Icardo M., S. Torres-Cartas, S. Meseguer-Lloret, E. F. Simó-Alfonso, J. M. Herrero-Martínez, “Photografted fluoropolymers as novel chromatographic supports for polymeric monolithic stationary phases”, *Talanta* 187 (2018) 216-222.
- Dolan J.W., L.R. Snyder, N.M. Djordjevic, D.W. Hill y T.J. Waeghe (1999). “*Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time I. Peak capacity limitations*”. *Journal of Chromatography A*, 857, 1-20.
- Enguix D., “*Desarrollo de nuevos rellenos modificados con nanopartículas de hierro para la determinación cromatográfica de compuestos organofosforados en agua*”, 2017.
- Liu D., T. Zhang, Y. Cheng, Q. Jia, “Poly(glycidyl methacrylate-co-Nmethylolacrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monolith coupled to high-performance liquid chromatography for the determination of adenosine phosphates in royal jelly”, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1826–1833
- Lu A. H., Salabas E. E., Schüth, “F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application” *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8) (2007) 1222-1244.
- Manuel, A. (2018). “Análisis de carbohidratos en baja concentración por HPAE-PAD”. Disponible en: <http://avibert.blogspot.com> [Fecha de acceso: 1 mayo 2018].
- Marianno, L. (2015). “Cromatograma típico para cálculo de parámetros cromatográficos.” Disponible en: https://pt.wikipedia.org/wiki/Cromatografia_líquida_de_alta_eficiência#/media/Archivo:Cromat.png [Fecha de consulta: 1 Mayo 2018].
- Rubinson K.A., J.F. Rubinson, “*Análisis Instrumental, 1ª edición*”, 2001, Editorial Pearson, Madrid
- Skoog D.A., Holler, Nieman, “*Principios de análisis instrumental 5ª ed*”, Editorial McGraw Hill, 1993.
- Valcárcel Cases M., A. Gómez Hens, “*Técnicas analíticas de separación*”, Ed. Reverté, Barcelona, 1988.