

NUEVOS COMPONENTES FLUÍDICOS PARA HPLC PORTÁTIL CON PREPARACIÓN DE MUESTRA INTEGRADA

David J. Cocovi Solberg

Universidad de las Islas Baleares, Departamento de Química, Grupo FITRACE
Universidad de Ciencias de la Vida y Recursos Naturales en Viena, Departamento de
Química, Instituto de Química Analítica

El objetivo de esta contribución es presentar la evolución y prospección de la línea de investigación compartida entre la Universidad de las Islas Baleares (UIB) y la Universidad de Ciencias de la Vida y Recursos Naturales de Viena (BOKU). La UIB tiene una larga historia en el desarrollo de técnicas de flujo, originándose en el grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente, y posteriormente en el grupo de Análisis por Inyección en Flujo y Análisis de Trazas (FI-TRACE), creado en 2012. Una de las técnicas de flujo más populares es el Análisis por Inyección Secuencial (SIA), desarrollado en 1990 por Růzicka y Marshall¹, que consigue automatizar de manera flexible la mayor parte de las operaciones llevadas a cabo por el analista. Como muchos de los lectores de Actualidad Analítica saben, este método se basa en el uso de una bomba bidireccional y un selector, conectados por una determinada longitud de tubo (holding coil, HC) cuya función es la de impedir que los líquidos manipulados en el selector se introduzcan en la bomba y subsecuentemente la contaminación cruzada. Las muestras y reactivos se aspiran secuencialmente y reaccionan por contacto directo en el interior del HC. La difusividad de muestras y reactivos a través de la interfaz de área igual a la sección del tubo es el motivo por el cual la cinética de las reacciones es más lenta que en el Análisis por Inyección en Flujo, y el inconveniente más importante del SIA, para el que se han propuesto muchas soluciones. Una de las técnicas con mayor potencial que permite el SIA es el Bead Injection (BI), que consiste en la manipulación de sorbentes de fase sólida en el interior del circuito fluídico tras suspenderlos en un disolvente apropiado. La suspensión se manipula como si fuera cualquier otro líquido; incluimos fritas en línea que permiten a los líquidos pasar a través, pero que impiden el movimiento del sorbente, por lo que este se compacta formando pequeñas columnas de extracción en fase sólida en línea. A continuación, la muestra se carga en la columna, esta se lava, y los analitos se miden directamente sobre el sorbente mediante técnicas ópticas, se eluyen offline y reservan para análisis mediante otra técnica, o se eluyen en línea a HPLC.

Métodos inteligentes

Uno de los recientes desarrollos entre las universidades de BOKU y UIB es el uso de métodos inteligentes para control de BI. La descarga del sorbente en el método de BI es el paso más complicado, puesto que este puede quedarse atascado tras ser compactado a elevadas presiones o ser perfundido por una muestra con materia particulada, sustancias de elevado peso molecular, o que se retienen irreversiblemente sobre él. Además, mientras que la carga se puede llevar a cabo a cualquier caudal, el caudal de descarga está limitado por la cavitación del disolvente, esto es, aspirar a caudales más elevados originara cavitación en vez de descarga. En una publicación reciente hemos utilizado las medidas de presión como indicador del estado de la microcolumna SPE² y un método inteligente para toma de decisiones a tiempo real. En primera instancia se calibra la presión del sorbente en el tubo frente a la masa de este que se recupera y la pendiente se introduce en el software. Para la aplicación, el usuario selecciona que masa de sorbente se requiere. El programa calcula automáticamente el volumen de suspensión que debe ser aspirada y empaqueta la columna SPE. En caso de que la presión sea inferior a la que corresponde a la masa deseada, el paso de carga se repite para la diferencia de masa, es decir, es un método de control proporcional. De igual manera para la descarga: si al final del paso de descarga la presión no corresponde a la del tubo vacío, el paso de descarga se repetirá hasta que el criterio de presión se cumpla dentro de una tolerancia especificada por el usuario.

Cromatografía de flujo turbulento

La cromatografía de flujo turbulento (TFC) es un modo de SPE patentado por Thermo como un método universal de preparación de muestra para muestras clínicas. Se basa en la diferente transferencia de masa entre compuestos de diferente peso molecular al ser cargados en la SPE a elevadas velocidades lineales: Los compuestos de bajo peso molecular entran en los poros del sorbente porque su transporte está dominado por difusión, mientras que los compuestos de elevado

peso molecular atraviesan la columna sin ser retenidos, independientemente de la química del sorbente porque su transporte está dominado por advección: debido a difusividades más pequeñas, no tienen tiempo de difundir hasta el sorbente y atraviesan la columna atrapadas en el flujo turbulento. Desde el punto de vista fluido, este principio es muy conveniente puesto que usa las mismas fases y tamaños de partícula (hasta 60 μm) que el BI.

Hemos aplicado el principio de TFC en BI y caracterizado la retención de componentes en función del peso molecular utilizando globulinas como modelos (figura 1).

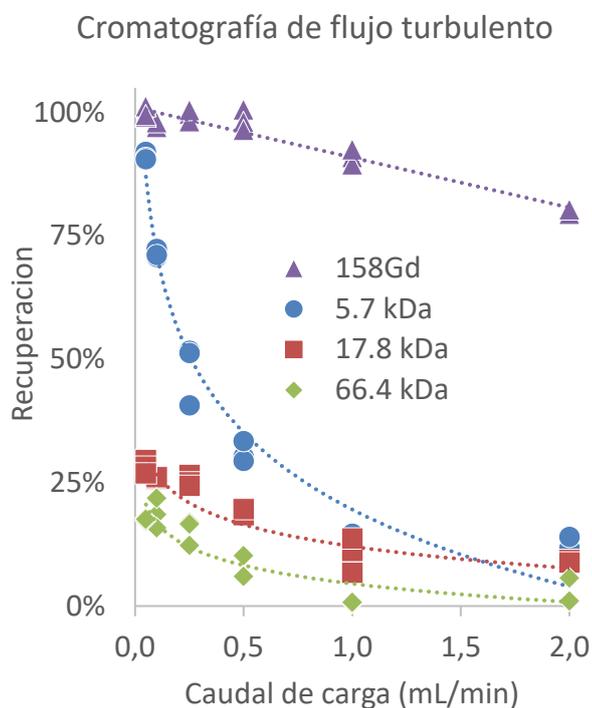


Figura 1. Recuperación de analitos de diferente peso molecular en función del caudal de carga.

El límite entre el transporte dominado por difusión y advección depende del peso molecular del analito, pero tomado como referencia que un compuesto se retiene cuando su recuperación es mayor que 80% y que se excluye cuando esta es menor de 20%, se pueden tomar como caudales representativos 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ para el 'modo SPE', y 1 mL/min para el 'modo TFC', en el que las sustancias de elevado peso molecular se excluirán de la columna. Este modo tiene un elevado potencial de aplicación en muestras ambientales y clínicas, donde p. ej. los ácidos húmicos o proteínas, respectivamente, son interferentes potenciales.

Convolución de válvulas

Una mejora respecto a las autoburetas utilizadas inicialmente es la inclusión de una válvula en la

cabeza de la jeringa, que permite rellenar la misma directamente desde un reservorio de portador, lo que acorta los tiempos de limpieza y mejora su eficiencia. Durante el desarrollo de software para control de equipos SIA³ y en un intento de hacer los métodos más fáciles de programar y usar, nos dimos cuenta de la convolución de las posiciones de ambas válvulas. Para rellenar la jeringa la válvula cabezal debe conectar con el portador, mientras que la posición del selector no es importante, mientras que para seleccionar cualquiera de los líquidos, el cabezal debe conectar con el HC.

Esta convolución de las posiciones de las válvulas permite que ambas válvulas sean actuadas con un solo motor, y por extensión, permite que una sola válvula con un rotor y estator suficientemente complejos mimetice la función de ambas válvulas. Gracias a las posibilidades que la impresión 3D brinda, en 2017 diseñamos y fabricamos un prototipo de válvula con el que sustituimos la válvula cabezal incorporada en la bomba de jeringa Cavro XP3000⁴ (figura 2).

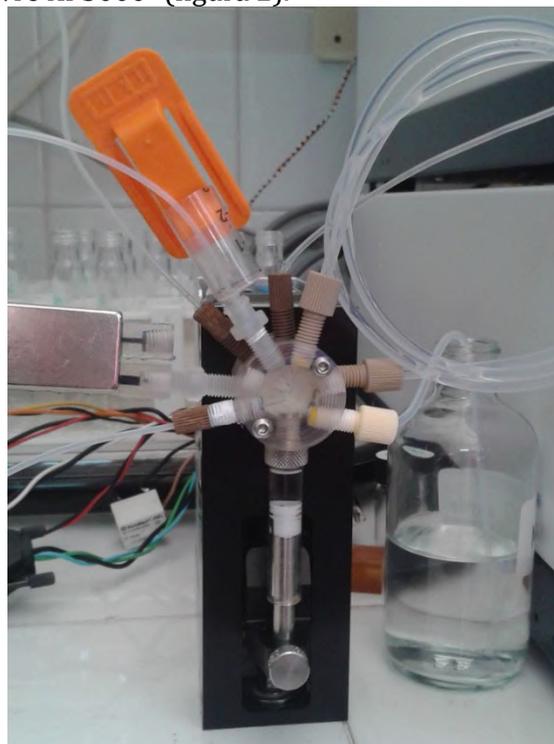
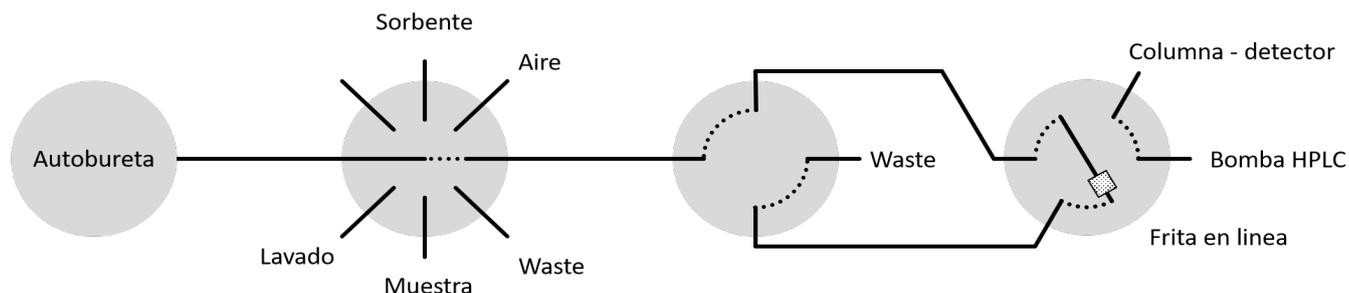


Figura 2. Fotografía del prototipo de válvula montado sobre la bureta automática Cavro XP3000 y que integra la funcionalidad completa del SIA (El HC puede verse en la parte superior derecha de la foto).

A pesar del éxito fluido de la válvula, la resina en la que estaba impresa tenía una compatibilidad química limitada, y el contacto constante con acetonitrilo prevenía su uso durante más de dos semanas. A un precio de 2.24 € por válvula, el estator podría haberse considerado un



consumible y ser reemplazado regularmente, pero preferimos fabricar un modelo permanente en un plástico como ULTEM o PEEK con mayor tolerancia a la presión y a disolventes. Nótese que un sistema SIA comercial cuesta cerca de 15000 €; los componentes individuales aprox. 1000 € por una bureta automática y 2500 € por un selector. El uso del prototipo presentado abarata el hardware de la técnica significativamente.

Figura 3. Esquema de una autobureta y 3 válvulas para BI con eliminación del sorbente por presión positiva.

En el grupo FITRACE hemos desarrollado varios métodos de bead injection utilizando diferentes plataformas fluidicas, tanto comerciales como fabricadas mediante impresión 3D. Aunque BI es una pareja perfecta para la cromatografía líquida, tanto por la versatilidad en la preparación de muestra como por la naturaleza de la interfaz fluidica, la elución convencional mediante heartcut presenta las desventajas de que (i) el eluato de alto poder eluotrópico originará ensanchamiento de bandas en LC a menos que la química de las columnas SPE y cromatográfica sean ortogonales, (ii) diferentes analitos presentan diferente enriquecimiento en diferentes fracciones del corte, y por lo tanto se requiere una exactitud exquisita en el corte para estudios cuantitativos y (iii) debido al corte, la transferencia del analito a la columna cromatográfica no es cuantitativa, por lo que la sensibilidad del método se ve mermada.

El uso del sorbente en el interior del bucle de inyección del HPLC soluciona los tres problemas anteriores, puesto que la elución del sorbente SPE se llevará a cabo mediante la misma fase móvil cromatográfica: las dos químicas no tienen que ser ortogonales, no se necesita calcular ningún corte y la transferencia de analito es cuantitativa por lo que la sensibilidad es óptima. Más aún, si el tamaño de partícula no es significativamente mayor en el sorbente SPE que en la columna LC, la resolución cromatográfica aumentará debido al volumen de fase estacionaria adicional (al igual que lo hará la presión de separación). Si por el contrario el

sorbente SPE es significativamente más grande, la transferencia de masa en el sorbente dominará el mínimo de Van Deemter y la banda de analitos entrará ensanchada en la columna cromatográfica, llevando a una disminución de la resolución.

Muchos hemos intentado hacer lo que los iniciados en el arte conocerán como 'bead injection con los beads en el bucle de inyección'. El primer inconveniente es que el sorbente no fluye

apropiadamente a través del inyector de HPLC. Los osados que han ensanchado el puerto del estator y el surco del rotor han descubierto el segundo problema: la reaspiración del sorbente es muy complicada debido a compactación tras someterlo a la alta presión del HPLC, incluso aunque dispongamos de control inteligente descrito en la sección anterior. La solución pasa por añadir una tercera válvula que invierte el flujo en el inyector del HPLC, para que tanto la carga y descarga del sorbente se lleven a cabo mediante presión positiva, como puede verse en la figura 3.

Contactamos a diferentes fabricantes de componentes fluidicos para explorar la fabricación de nuestro prototipo. VICI AG internacional se interesó por las posibilidades de diseñar válvulas dedicadas, lo que desembocó en una colaboración que dura hasta hoy en día. En principio el objetivo era diseñar una válvula capaz de realizar BI, con elución sin heartcut, 'heartcutless', es decir, con el sorbente en el bucle de inyección, y que fuera capaz de eliminar el sorbente mediante presión positiva. En 2021 obtuvimos un prototipo funcional que tolera hasta 120 bares y que es comercializado por VICI con número de modelo C5-2359D-CU. La figura 4 muestra su estator asimétrico.

Esta válvula permite preparar la muestra mediante SPE (preconcentración, limpieza, cambio de matriz y cromatografía de flujo turbulento) a tiempo real, así como técnicas derivadas (p. ej. derivatización sobre soporte sólido) sin fases separadas de tratamiento de muestra e inyección online. La

cantidad de puertos accesorios mantiene la flexibilidad del SIA, tal como demostramos en una publicación que se encuentra en preparación⁵ en la que muestras de suelo son extraídas en la propia válvula a tiempo real utilizando hidroxipropil- β -ciclodextrina en un test de bioaccesibilidad para determinar la fracción biodegradable de hidrocarburos aromáticos policíclicos así como su distribución entre diversas fases mineralógicas y las constantes cinéticas para su extracción de cada una de ellas.



Figura 4. Estator de la válvula C5-2359D-CU. Nótese el diseño no convencional altamente asimétrico, así como los puertos dedicados para la bomba (P), detector (D), bucle de inyección (L1, L2) y Waste (W).

Portabilidad, electrónica y software

La adición de una derivación entre el puerto dedicado a la bomba HPLC y uno de los puertos del selector, permite que la propia autobureta dispense la fase móvil. Se usó una bomba M6HP de VICI, que es capaz de ejercer hasta 100 bares de presión. Junto con la tolerancia del prototipo C5-2359D-CU permite la cromatografía con columnas monolíticas o columnas cortas core-shell, borrando las fronteras entre el SIA para la preparación de muestra y un cromatógrafo isocrático.

Para aumentar la portabilidad del SIA formado por la bomba M6HP y la válvula C5-2359D-CU, se eliminaron las carcasas y los controladores de los motores, consiguiendo un peso total por debajo de dos kilos. Una sola fuente de alimentación es suficiente para los dos motores puesto que en ningún caso se mueven simultáneamente: la válvula no se mueve mientras la bomba está en funcionamiento. Esta fuente original de 24 V y 2.4 A, se sustituyó por un microcontrolador STUSB4500 capaz de negociar la demanda de energía desde una interfaz USB-C, que se configuró a 20 V y 3 A. El efecto de la diferencia de 24 a 20 V es despreciable puesto que el sobrevoltaje desde el

valor de alimentación continua (3 V) solo se utiliza para alcanzar la saturación magnética de las bobinas en un tiempo inferior a la diferencia entre dos micropasos consecutivos. No se observó ningún efecto adverso por debajo de 2 mL/min. Es decir, el cromatógrafo isocrático con preparación de muestra integrada se alimenta por USB-C. Todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo con una fuente de alimentación por baterías USB-C de 60 W, que aumenta el peso del prototipo hasta 2.5 kg, como se muestra en la figura 5.

Los controladores de los motores de pasos se sustituyeron por un microcontrolador Adafruit STM32F405 y dos drivers TMC2209 controlados por código abierto en CircuitPython. Estos drivers se encargan de controlar la velocidad, aceleración y posición de los motores. En cuanto a la ejecución del método SIA o cromatográfico, a los chips anteriores se añadió una pantalla táctil y un sistema operativo dedicado almacenado en la memoria flash. Este sistema permite guardar los métodos, así como los datos adquiridos en una tarjeta SD. La ejecución del método se basa al igual que en el SIA convencional en seleccionar una posición de la válvula y aspirar o dispensar un determinado volumen a un determinado caudal. La adición de tiempos muertos, bucles y condicionales permite la ejecución de métodos inteligentes.



Figura 5. Fotografía del prototipo de HPLC portátil formado por la bomba de pistones axiales M6HP y la válvula C5-2359D-CU; controlador con pantalla táctil y power bank. El peso total está por debajo de 2.5 kg.

Generación de gradiente

La investigación actual se centra en la generación de gradiente en el sistema anterior que utiliza una sola bomba de 100 bares. La bomba de pistones axiales M6HP rellena los pistones sincronamente

con su descarga, es decir, dispensa el volumen de líquido que contiene en sus 100 μL de volumen interno, al mismo tiempo que rellena este volumen desde el puerto de aspiración. Los resultados de generación de un gradiente mediante válvula solenoide pre-M6HP, es decir, el mismo sistema que en una bomba de HPLC con gradiente de baja presión puede verse en la figura 6.

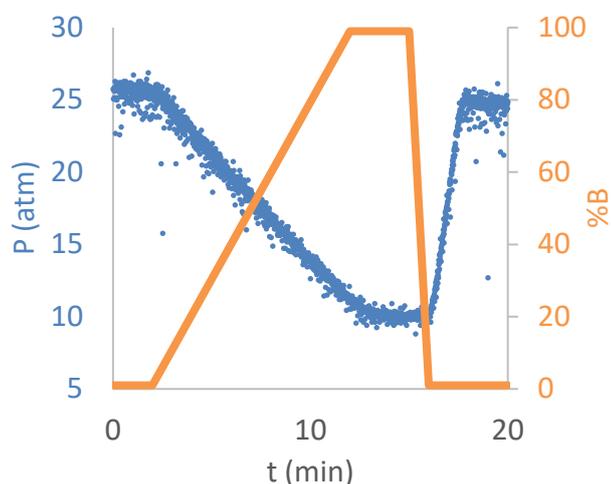


Figura 6. Gradiente generado mediante mezcla a baja presión y compresión con la bomba M6HP.

El consumo energético de la válvula solenoide y las pérdidas óhmicas asociadas hace esta solución poco atractiva cuando no se dispone de circuitos para reducir el voltaje cuando la válvula ha sido activada. Por otro lado, el uso de esos circuitos hace imposible tiempos de conmutación rápidos, como los que se necesitan cuando se requieren gradientes con composición muy baja de uno de los componentes. El impase puede solucionarse recurriendo a bombas piezoeléctricas. Estas operan bajo el mismo principio que las válvulas solenoides, con la salvedad de que el diafragma no se deforma por el desplazamiento de un núcleo magnético, sino por sus propiedades piezoeléctricas: el trabajo eléctrico es despreciable y gradientes entre 5 y 95 % pueden desarrollarse con ciclos de conmutación de la bomba piezoeléctrica de 0.5 s. Esta aproximación es adecuada para columnas cromatográficas de entre 4.6 y 1 mm de diámetro interno, es decir, a caudales de entre 1 mL/min y 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Conclusión

Hasta aquí se han presentado los desarrollos llevados a cabo entre las universidades de BOKU y UIB referentes a cromatografía líquida portátil. Como trabajo futuro está la selección de un detector adecuado para uso en el campo. Los primeros datos se han obtenido mediante fometría, pero las lámparas de deuterio tienen un

elevado gasto energético. Los detectores amperométricos se están considerando a medio plazo debido a su sensibilidad y facilidad de fabricación e integración, pero su selectividad puede resultar insuficiente para teniendo en cuenta la flexibilidad esperada de esta plataforma. Estamos preparando un proyecto en colaboración con el instituto ISAS de Dortmund (Alemania) para caracterizar un detector de movilidad iónica como candidato a detector de campo. Entre las ventajas están el bajo consumo energético, la sensibilidad en el rango de $\mu\text{g}/\text{L}$, la portabilidad, que reporta identificadores moleculares de los analitos (movilidad reducida), que añade una dimensión de separación adicional a la cromatografía y que la retención en fase reversa es más ortogonal a la movilidad reducida que a la espectrometría de masas⁶.

Agradecimientos

Estamos agradecidos a VICI AG International y a BMT Fluid Control Solutions GmbH por la provisión de los componentes fluidicos utilizados para obtener los datos aquí presentados. También al proyecto M2579 del Fondo Científico Austriaco y al Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto PID2020-117686RB-C33.

Referencias

- (1) Ruzicka, J.; Marshall, G. D. Sequential Injection: A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *237*, 329–343.
- (2) Cocovi-Solberg, D. J.; Schnidrig, S.; Hann, S. Sample Preparation under Turbulent Flow with Renewable Sorbent. *J. Anal. At. Spectrom.* **2021**, *36* (11), 2306–2311.
- (3) Cocovi-Solberg, D. J.; Miró, M. CocoSoft: Educational Software for Automation in the Analytical Chemistry Laboratory. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (21), 6227–6233.
- (4) Wang, H.; Cocovi-Solberg, D. J.; Hu, B.; Miró, M. 3D-Printed Microflow Injection Analysis Platform for Online Magnetic Nanoparticle Sorptive Extraction of Antimicrobials in Biological Specimens as a Front End to Liquid Chromatographic Assays. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (22), 12541–12549.
- (5) Cocovi-Solberg, D. J.; Schnidrig, S.; Miró, M.; Hann, S. Fluidic Platform for Renewable Solid Phase Extraction and Automatic Bioaccessibility Assessment in Solids, Inline Hyphenated to Liquid Chromatography. *Prep.*
- (6) Hernández-Mesa, M.; Ropartz, D.; García-Campaña, A. M.; Rogniaux, H.; Dervilly-Pinel, G.; Le Bizec, B. Ion Mobility Spectrometry in Food Analysis: Principles, Current Applications and Future Trends. *Molecules* **2019**, *24* (15), 1–28.