

Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas.

Parte III.

Práctica de laboratorio: optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil

Mara Sacristán San Cristóbal. Eva María Díaz Peña.
Borja Alarcón Aguares. Carlos Vicente Córdoba.
María Estrella Legaz González.

Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología.
Universidad Complutense de Madrid. Avenida José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid. España.

marasacristan@bio.ucm.es evam.diaz@bio.ucm.es
borjaestremera@hotmail.com cvicente@bio.ucm.es
melegaz@bio.ucm.es

Resumen: En la práctica que se plantea, el alumno debe resolver la separación de una mezcla de seis analitos en sus componentes individuales. Para ello se utilizan mezclas de fase móvil con eluciones isocráticas o en gradiente. El análisis de los resultados sobre factor de capacidad, eficiencia, selectividad y resolución, obtenidos en cada una de las condiciones de análisis, permite concluir las condiciones óptimas de la separación. Una vez elegida la mejor condición de análisis, se predice el orden de elución de los compuestos en función de sus características estructurales, masa molecular y polaridad, principalmente.

Palabras clave: Analito. Eficiencia. Elución isocrática. Elución en gradiente. Fase estacionaria. Fase móvil. HPLC. Polaridad. Resolución. Selectividad. Separación. Tiempo de retención.

INTRODUCCIÓN

El objetivo primario que se persigue en la separación de componentes de una mezcla es la adecuada resolución (R_s) entre los picos, con la mayor pureza y en el menor tiempo posible. El sistema de HPLC debe ser seleccionado sobre la base de las separaciones que interesa realizar, escogiendo fases estacionarias, fases móviles y detectores adecuados y compatibles con la mezcla objeto de estudio. Normalmente, el analito de interés tarda entre 5 y 10 veces más tiempo en recorrer la columna que un analito no retenido, de tiempo muerto (t_M). El t_M o V_M (volumen muerto) puede ser estimado como se indica a continuación:

$$V_M \approx Ldc^2/2; \quad t_M \approx Ldc^2/2F$$

donde, F , es el flujo de fase móvil, en ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) y d_c , el diámetro de la columna, en (cm).

Bajo condiciones óptimas (cerca de H_{\min}), el número de platos teóricos de una columna de longitud L es:

$$N \approx 3.500 L (\text{cm})/d_p (\mu\text{m})$$

donde, d_p , es el diámetro de partícula. Las partículas pequeñas reducen la difusión de Eddy (término A) y la distancia que el soluto debe difundir en la fase móvil (término C), (ver Introducción de la Parte I).

Una vez seleccionada la fase estacionaria, la optimización de la separación queda restringida a variar la temperatura o la fase móvil. En la presente práctica se discutirá exclusivamente el efecto de la fase móvil.

En el mecanismo de separación mediante reparto en fase reversa (RP-HPLC o RPC), la fase estacionaria es apolar y la fase móvil, moderadamente acuosa y polar. La fase estacionaria es sílice tratada con metil clorosilano de longitud de cadena variable (RMeSiCl), donde R, es una cadena lineal de grupos alquilo ($\text{C}_{18}\text{H}_{37}$). En este tipo de fase estacionaria, las moléculas polares eluyen antes que las menos polares o apolares. Una buena separación cromatográfica requiere un equilibrio adecuado entre las fuerzas intermoleculares existentes entre soluto, fase móvil y fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de polaridad relativa de cada uno de los reactivos. Las polaridades en orden creciente para varios grupos funcionales del analito son: hidrocarburos < éteres < ésteres < cetonas < aldehídos < amidas < aminas < alcoholes. La polaridad de los distintos grupos funcionales se muestra en la Tabla 1.

El agua es más polar que cualquier compuesto que contenga alguno de los anteriores grupos funcionales. La retención se puede incrementar añadiendo más agua a la fase móvil; haciendo la afinidad del analito hidrofóbico por la fase estacionaria hidrofóbica, más afín que por la fase móvil, ahora más hidrofílica. De igual manera, la retención puede disminuir añadiendo mayor cantidad de disolvente orgánico a la fase móvil. El mecanismo de fase reversa opera con el principio de fuerzas hidrofóbicas de tal manera que el ligamiento del analito a la fase estacionaria es proporcional a la superficie de contacto alrededor del segmento apolar del analito en asociación con el ligando en la fase móvil acuosa. Este efecto se denomina solvófobo (Fig. 1). La teoría del efecto solvófobo, propuesta por Horvath et al. (1976), propone que el soluto, debido a la alta tensión superficial de la fase móvil y a su propia hidrofobicidad, es expulsado de la fase móvil contra las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria.

Grupo Funcional		Momento Dipolar, μ (debyes)
Amina	-N=	0,8 a 1,4
Éter	-O-	1,2
Sulfuro	-S-	1,4
Tiol	-SH	1,4
Ácido Carboxílico	-COOH	1,7
Hidroxiilo	-OH	1,7
Halógenos	-F -Cl -Br -I	1,6 a 1,8
Éster	-COO-	2,3
Aldehído	-CHO-	2,5
Cetona	-CO-	2,7
Nitro	-NO ₂ -	3,2
Nitrilo	-C=N-	3,5
Sulfóxido	-SO-	3,5

Tabla 1. Polaridad de los diferentes grupos funcionales. Tomado de Smyth (1955).

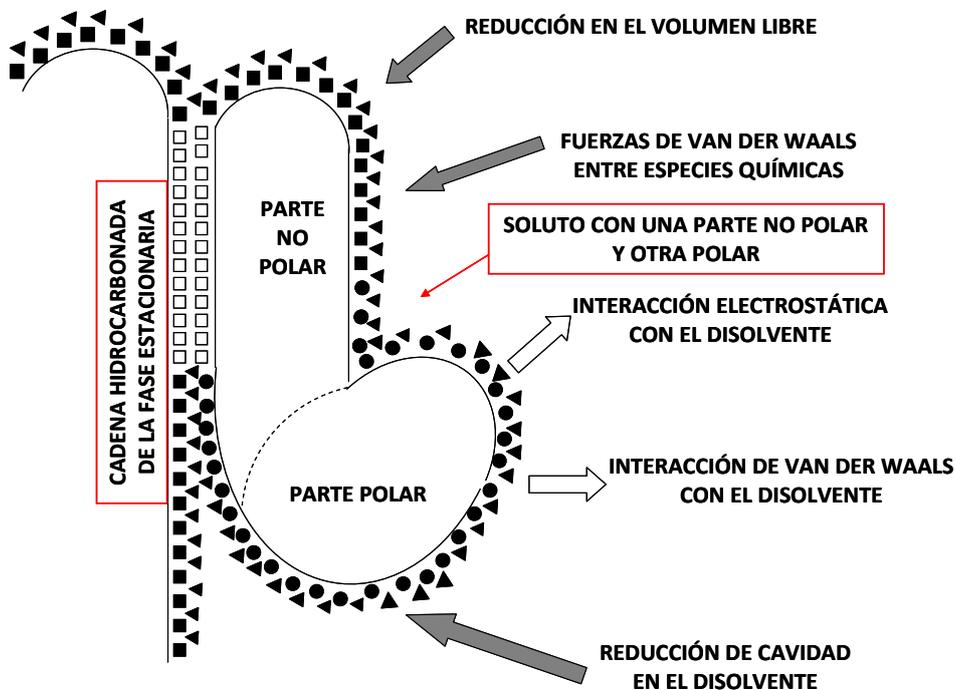


Figura 1. Ilustración esquemática de la asociación entre una molécula de un soluto que contiene una parte polar y otra apolar con una cadena hidrocarbonada de la fase estacionaria, efecto solvóforo. Las flechas rellenas en color gris indican las fuerzas que tienden a unir y las flechas vacías, las fuerzas que tienden a separar.

Al elegir una columna para una separación cromatográfica mediante mecanismo de reparto, la polaridad de la fase estacionaria ha de ser bastante similar a la de los analitos y, para la elución, se utiliza entonces una fase móvil con polaridad considerablemente distinta. Este procedimiento por lo general resulta más adecuado que si las polaridades del soluto y de la fase móvil son parecidas, pero difieren mucho con respecto a la fase estacionaria. En resumen, para obtener buenas separaciones en un tiempo razonable, tienen que armonizarse las polaridades del soluto, la fase móvil y la fase estacionaria.

Selección de la fase móvil en cromatografía de reparto

De los tres métodos para mejorar la resolución de una columna basados en la variación del número de platos teóricos (N), factor de capacidad (k') y selectividad (α), en cromatografía de líquidos, k' es el más fácilmente manipulable de los tres debido a que este parámetro depende considerablemente de la composición de la fase móvil. Para una separación adecuada:

- $0,5 \leq k' \leq 20$
- $R_s \geq 2$
- $P \leq 15$ MPa (150 bar)
- $0,9 \leq \text{factor asimetría } (A_s) \leq 1,5$

En algunos casos, el ajuste de k' no es suficiente para obtener picos individuales sin superposición y entonces se debe recurrir a la variación de α . La forma más fácil de producir variaciones en α es modificando la composición de la fase móvil, procurando mantener k' dentro de un intervalo razonable. La optimización de la fase móvil puede realizarse con dos métodos diferentes:

1. Método de **elución isocrática** (= composición constante), palabra acuñada por Csaba Horvath de la Yale University, uno de los pioneros en HPLC. Se lleva a cabo con un solo disolvente o con una mezcla de disolventes, constante, en el tiempo de análisis.
2. Método de **elución en gradiente**. Se lleva a cabo variando de forma continua la composición de los disolventes de forma que su fuerza vaya incrementando durante el tiempo de análisis (Fig. 2). Normalmente se procede de esta forma, utilizando una fuerza de fase móvil más débil al principio para ir incrementándola después. Existe dos tipos de gradientes:
 - **Lineales** (curva 5). La velocidad de cambio del disolvente fuerte es lineal en el tiempo.
 - **Exponenciales**. (curvas 1 a 4 y 6 a 9). Éstos a su vez pueden ser:
 - **Convexos** (curvas 1-4). Rápidas en alcanzar la composición final de la fase móvil. Se utilizan para picos superpuestos al final del cromatograma.

- Cóncavos (curvas 6-9). Lentas en alcanzar la composición final de la fase móvil. Se utilizan para picos superpuestos al principio del cromatograma.

Los diferentes tipos de gradientes se muestran en la Fig. 2.

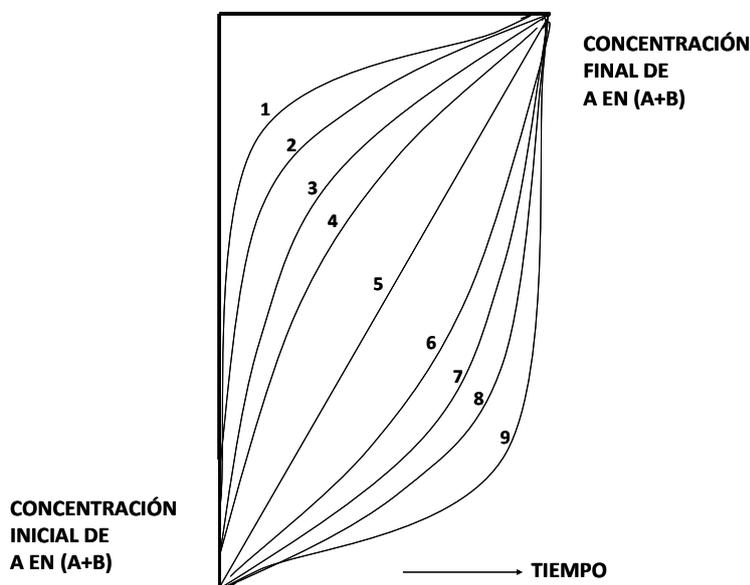


Figura 2. Diferentes tipos de gradientes de fase móvil. A, representa el disolvente más fuerte y B, el disolvente más débil en términos de fuerza extractiva de los solutos.

Efecto de la fuerza del disolvente sobre k'

A los disolventes que interaccionan fuertemente con los solutos, a menudo se les denomina disolventes “fuertes”. Para descubrir cuantitativamente la polaridad de los disolventes se han desarrollado varios índices. El más útil en cromatografía de reparto es el “índice de polaridad”, desarrollado por Snyder (P'). También se utilizan el parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ), (Hildebrand y Scott, 1962) y la fuerza eluotrópica como disolvente (ϵ^0). A continuación se describe brevemente cada uno de ellos.

a) Índice de polaridad (P')

Utilizando los datos de Rohrschneider (1969), Snyder en 1978, calculó los nuevos “coeficientes de reparto corregidos” (K_g'') para interacciones dispersivas y efectos de la masa molecular. Sabiendo que:

$$K_s = [s_s]/[s_m]$$

$$\log K_g'' = \log K_g' - \log K_v$$

donde, $K_g' = K_g V_s$ y, K_v , es un valor de K_g' para un hipotético n-alcano con el mismo volumen molar del soluto. Asumiendo que hay tres interacciones moleculares aditivas [donación de protones (d), aceptación de protones (e) y dipolos fuertes (n)], el coeficiente de reparto corregido para cada efecto contribuiría al total del índice de polaridad (P'), de manera que:

$$P' = \log (K_g'')_d + \log (K_g'')_e + \log (K_g'')_n$$

donde los subíndices d, e y n se refieren a las tres fuerzas. Este índice de polaridad mide la atracción intermolecular entre un soluto y un disolvente y, en resumen, se basa en las medidas de solubilidad para la sustancia en cuestión en tres disolventes: dioxano (un aceptor de protones de dipolo débil), nitrometano (un aceptor de protones de dipolo intenso) y etanol (un donador de protones de dipolo intenso). P' , por tanto, es una medida numérica de la polaridad relativa de varios disolventes. El índice varía entre 10,2 para un compuesto muy polar como el agua hasta 2 para fluoroalcanos muy poco polares. En la Tabla 2 se muestran los valores de éste y otros índices que ahora comentaremos, así como alguna de las propiedades de los disolventes más comúnmente utilizados como fases móviles en HPLC.

Snyder fue más allá y calculó también tres parámetros de selectividad representativas de las tres fuerzas (χ_d), (χ_e) y (χ_n) que no son objeto de estudio en este momento.

b) Parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ)

Este parámetro, a diferencia de P' , se define para un disolvente puro y fue introducido para predecir la solubilidad de unos líquidos en otros. El índice es una medida de las fuerzas entre moléculas o, de la presión interna de una sustancia. En la práctica se define como función de polaridades y se expresa como:

$$\delta = (\Delta E_{\text{vap}} / \bar{V})^{1/2}$$

donde, ΔE_{vap} , es la energía molar de evaporación, en ($\text{J}\cdot\text{cm}^{-3}$) y \bar{V} , el volumen molar del líquido. A bajas tensiones de vapor, esta igualdad se corresponde con la energía de vaporización por cm^3 . Los valores de δ incrementan con la polaridad, desde un valor 6 para los alcanos fluorosustituidos a 21 para el agua (Tabla 2). En la actualidad, se tienden a utilizar con más frecuencia las series eluotrópicas.

Disolvente	Índice de refracción	Límite inferior de transparencia en el UV	Punto de ebullición (°C)	Viscosidad a 20 °C (cP)	Parámetro de Hildebrand	Índice de polaridad (P')	Fuerza eluotrópica (ϵ° en Al_2O_3)	Fuerza eluotrópica (ϵ° en SiO_2)
				(η)	(δ)			
iso-octano	1,404	197-210	99,2	0,5	7	0,4	0,01	0,01
n-hexano	1,375	195	68,9	0,313	7,3	0	0,01	0,03
ciclohexano	1,427	200	80,7	0,98	8,2	0	0,04	0,04
n-decano	1,412	210	174,1	0,92	7,8	0,3	0,04	
tetracloruro de carbono	1,466	265	76,5	0,97	8,6	1,7	0,18	0,12
iso-propil éter	1,368	220	68,3	0,33-0,37	7,3	2,2	0,28	0,22
tolueno	1,496	285	101,6	0,59	8,9	2,3	0,29	0,23
benceno	1,501	280	80,1	0,65	9,2	3	0,32	0,25
cloroformo	1,443	245	61,2	0,57	9,2	3,4-4,4	0,36-0,4	0,26
diclorometano	1,424	232	40	0,44	9,6	3,4	0,4	0,32
cloruro de metileno	1,424	233	39,8	0,44	9,7	3,4	0,42	0,32
tetrahidrofurano	1,408	212-230	66	0,55	9,1	4,2	0,45	0,35
dicloruro de etileno	1,445	230	83,5	0,79	9,7	3,7	0,49	0,38
metil etil cetona	1,379	330	80	0,43	9,3	4,5	0,51	0,39
Acetona	1,359	330	56,3	0,32	9,6	5,4	0,56-0,58	0,47-0,53
Acetonitrilo	1,344	190	81,6	0,37	11,7	6,2	0,55-0,65	0,46
Acetato de etilo	1,37	256	77,1	0,46-0,47	9,1	4,3	0,58	0,41
Acetato de metilo	1,362	260	56,3	0,37-0,45	9,2	4,4	0,6	
Dimetil sulfóxido	1,478		189	2,24	12,8	6,5	0,62	
Piridina	1,51	305-330	115,3	0,94	10,7	5,3	0,71	
2-metoxietanol	1,401	220	124,6	1,72		5,7	0,74	
2-propanol	1,38	210+	82,4	2,35		4,3	0,82	
Etanol	1,361	205-210	117,7	1,2	12	5,2	0,88	0,68
Metanol	1,329	205	78,3	0,6	13,7	6,6	0,95	0,73
Ácido acético	1,372	210	64,7	1,1-1,26	12,4	6,2	alto	
agua	1,333	180	117,9	1	21	9	alto	

Tabla 2. Algunas propiedades de los disolventes más utilizados en HPLC. Los parámetros η , δ , P' y ϵ° definidos en el texto. Tomada de http://www.sanderkok.com/techniques/hplc/eluotropic_series_extended.html.

c) Fuerza eluotrópica o fuerza como disolvente (ϵ°)

Este parámetro define la energía de adsorción de cada disolvente por unidad de superficie de sílice respecto al valor de ϵ° del pentano, que es igual a "zero". Cuanto mayor es la polaridad del disolvente, mayor es su valor de ϵ° . En la Tabla 2 aparecen representados estos valores para los disolventes más utilizados. Los valores de ϵ° para otros adsorbentes como alúmina fueron calculados por Snyder (1968), quien demostró la siguiente relación:

$$\epsilon^\circ (\text{sílice}) = 0,77\epsilon^\circ (\text{alúmina})$$

Siempre y cuando los disolventes sean miscibles (ver Tabla. 3), se pueden hacer combinaciones binarias, ternarias o incluso cuaternarias variando las proporciones de cada uno de ellos con objeto de obtener una amplia gama de valores de ϵ° . Aunque

depende del sistema cromatográfico empleado y el valor de ε° no varía linealmente con la composición de una mezcla, en la práctica resulta útil la siguiente aproximación:

$$\varepsilon^{\circ}_{\text{mezcla}} \times \%_{\text{mezcla}} = \varepsilon^{\circ}_1 \times \%_1 + \varepsilon^{\circ}_2 \times \%_2$$

Queda lo suficientemente claro que a mayor valor de ε° , mayor es la polaridad del disolvente pero conviene recordar que:

- En cromatografía de reparto en “fase normal”, la fuerza de arrastre de la fase móvil es mayor cuanto mayor sea su valor de ε° . Por ejemplo, una fase móvil de n-hexano puro ($\varepsilon^{\circ} = 0,01$) tiene menor fuerza de arrastre que una mezcla de n-hexano:cloroformo (50:50, v/v) ($\varepsilon^{\circ} = 0,205$).
- En cromatografía de reparto en “fase reversa”, la fuerza de arrastre de la fase móvil es menor cuanto mayor sea su valor de ε° . Por ejemplo, una fase móvil de acetonitrilo puro ($\varepsilon^{\circ} = 0,65$) tiene menor fuerza de arrastre que una mezcla de acetonitrilo:acetona (50:50, v/v) ($\varepsilon^{\circ} = 0,605$).

Se había subrayado que la forma más fácil de mejorar R_s de dos especies es manipular el valor de k' , el cual puede a su vez modificarse cambiando el valor de la polaridad. Normalmente, un cambio de 2 unidades en el valor de P' origina una variación de unas 10 veces en k' . La elución en gradiente disminuye la retención de los últimos solutos haciendo que eluyan antes y sean más estrechos. También incrementa la altura del pico, lo cual es importante en análisis de trazas. El programa de gradiente puede incluir pasos de incremento rápido en la concentración del componente orgánico (el disolvente de mayor fuerza de arrastre, esto es, el menos polar en fase reversa) o pendientes a diferentes tiempos, de acuerdo a la separación óptima deseada. A continuación, se enumeran una serie de reglas generales para las operaciones en gradiente:

- a) La utilización de gradiente está justificada cuando se trata de mezclas de componentes con un amplio rango de polaridad.
- b) Es conveniente hacer primero un gradiente amplio (entre el 5% y el 100% de disolvente fuerte, en 40-60 minutos), para decidir si se utiliza una elución isocrática o en gradiente.

Si $\Delta t_R / t_G > 0,25$, utilizar elución en gradiente.

Si $\Delta t_R / t_G < 0,25$, utilizar elución isocrática.

donde, Δt_R , es la diferencia en t_R entre el primero y el último pico del cromatograma y t_G , el tiempo de gradiente: el tiempo en el que cambia la composición de la fase móvil.

- c) Si una vez realizado el paso anterior, se elige hacer un gradiente, eliminar las porciones de éste, anterior a la elución del primer pico y posterior a la elución del último pico. Hacer entonces el mismo gradiente mencionado en b).
- d) Si la separación que se obtiene es aceptable, hay que intentar reducir el tiempo del gradiente para reducir el tiempo de análisis. Si la separación no es aceptable intentar otro tipo de gradiente no lineal.

Una vez terminado el análisis en gradiente, la columna debe ser equilibrada de nuevo antes de hacer la siguiente inyección. Para ello se realiza un “re-equilibrado” que consiste en volver a las condiciones iniciales de composición de la fase móvil. Normalmente se realiza en unos 20 minutos pero es el cromatografista quien lo decide en función de las propiedades de la muestra y el sistema cromatográfico.

En la práctica que se plantea a continuación, se realizarán eluciones con fases móviles isocráticas y en gradiente, sin modificaciones de la fase estacionaria ni variación de la temperatura con objeto de obtener los valores más indicados de k’.



Tabla de Miscibilidad de Disolventes

	Solubilidad en agua %m/m	Índice de Refracción 20°C	UV (nm) Cutoff 1 AU	Punto de Ebullición °C	Viscosidad cPoise	Índice de Polaridad
Ácido Acético	100	1.372	230	118	1.26	6.2
Acetato de Butilo	7.81	1.399	215	118	2.98	3.9
Acetato de Etilo	8.7	1.372	260	77	0.45	4.4
Acetona	100	1.359	330	56	0.32	5.1
Acetonitrilo	100	1.344	190	82	0.37	5.8
Agua	100	1.333	200	100	1.00	9.0
Benceno	0.18	1.501	280	80	0.65	2.7
n-Butanol	0.43	1.394	254	125	0.73	4.0
Ciclohexano	0.01	1.426	200	81	1.00	0.2
Cloroformo	0.815	1.446	245	61	0.57	4.1
1,2 Dicloroetano1	0.81	1.444	225	84	0.79	3.5
Diclorometano2	1.6	1.424	235	41	0.44	3.1
Dimetilformamida (DMF)	100	1.431	268	155	0.92	6.4
Dimetil Sulfoxido (DMS)	100	1.478	268	189	2.00	7.2
Dioxano	100	1.422	215	101	1.54	4.8
Etanol	100	1.360	210	78	1.20	5.2
Eter Dietílico	6.89	1.353	220	35	0.32	2.8
Heptano	0.0003	1.387	200	98	0.39	0.0
Hexano	0.001	1.375	200	69	0.33	0.0
Metanol	100	1.329	205	65	0.60	5.1
Metil-t-Butil Eter3	4.8	1.369	210	55	0.27	2.5
Metil Etil Cetona4	24	1.379	329	80	0.45	4.7
Pentano	0.004	1.358	200	36	0.23	0.0
n-Propanol	100	1.384	210	97	2.27	4.0
Iso-Propanol5	100	1.377	210	82	2.30	3.9
Di-Iso-Propil Eter		1.368	220	68	0.37	2.2
Tetracloruro de Carbono	0.08	1.466	263	77	0.97	1.6
Tetrahidrofurano (THF)	100	1.407	215	65	0.55	4.0
Tolueno	0.051	1.496	285	111	0.59	2.4
Tricloroetileno	0.11	1.477	273	87	0.57	1.0
Xileno	0.018	1.500	290	139	0.61	2.5

Xileno	Triduoetileno	Tolueno	Tetrahidrofurano (THF)	Tetracloruro de Carbono	Di-Iso-Propil Eter	Iso-Propanol	n-Propanol	Pentano	Metil Etil Cetona4	Metil-t-Butil Eter3	Metanol	Hexano	Heptano	Eter Dietílico	Etanol	Dioxano	Dimetil Sulfoxido (DMS)	Dimetilformamida (DMF)	Diclorometano2	1,2-Dicloroetano1	Cloroformo	Ciclohexano	n-Butanol	Benceno	Agua	Acetonitrilo	Acetona	Acetato de Etilo	Acetato de Butilo	Ácido Acético
--------	---------------	---------	------------------------	-------------------------	--------------------	--------------	------------	---------	--------------------	---------------------	---------	--------	---------	----------------	--------	---------	-------------------------	------------------------	----------------	-------------------	------------	-------------	-----------	---------	------	--------------	---------	------------------	-------------------	---------------

■ Inmiscible □ Miscible

Tabla 3. Tabla de miscibilidad de algunos disolventes empleados en HPLC. Tomada de <http://www.cienytech.com/tablas/Tabla-miscibilidades-cruzada.pdf>.

OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

El objetivo que se plantea es la separación de seis sustancias de estructura molecular semejante en el menor tiempo posible, con la mejor R_s y los valores más adecuados de k' . Para ello, se realizarán separaciones cromatográficas en distintas condiciones de fase móvil, sin variar la fase estacionaria ni la temperatura. En primer lugar, se trabajará en condiciones isocráticas y después en gradiente de fase móvil.

Se calcularán los siguientes parámetros: k' , R_s , α y N para cada pico (o pareja de picos contiguos) obtenido y se discutirá cuál de los gradientes planteados por los alumnos es mejor y por qué. Por último, deberá discutirse y justificarse el orden de elución de las seis sustancias separadas.

En esta práctica, es el alumno el que debe plantear, en discusión con sus compañeros y el profesor, las condiciones de fase móvil que resultarían oportunas para la mejor separación cromatográfica. El profesor debe ir discutiendo con ellos las condiciones más adecuadas y evitar, en la medida de lo posible, que se pierda tiempo en pruebas que no conduzcan a resultados plausibles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Equipo cromatográfico. Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución

Cromatógrafo líquido. Spectra Physics 8810 (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA), con un "loop" de inyección de 20 μL .

Bomba. SP 8810 LC (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA), eléctrica alternante de pistón recíproco.

Fase estacionaria.

Columna: Mediterranea sea C18 (Teknokroma, S.C.L. Spain).

Tipo: Fase Reversa.

Longitud (L): 120 mm.

Diámetro de partícula (dp): 5 μm .

Diámetro interno (di): 4,6 mm.

Temperatura. 25°C.

Fase móvil.

Reservorio A: Acetonitrilo (ACN).

Reservorio B: 4% de ácido acético en agua Milli-Q.

Fase móvil: Según se especifique en cada condición.

Flujo de fase móvil: Según se especifique en cada condición, en ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

Detector SP 8490 UV-Visible (Thermo Electron Corporation, Asheville, NC, USA).

Longitud de onda de análisis: 280 nm (según los máximos de absorbancia obtenidos en los diferentes espectros de absorbancia de los seis analitos objeto de estudio, (ver Figs. 4 a 9).

Rango (UAFE): 0,005 unidades.

Sistema de integración. DataApex Clarity Lite™ software para Windows (DataApex Ltd., Praha, Czech Republic).

Muestras empleadas y composición de la mezcla

Se trata de seis fenoles de diversa naturaleza, de masa molecular (M.M.) distinta. La estructura de cinco de ellos es similar y la de otro, ácido clorogénico, diferente. La fórmula estructural de cada uno de ellos se muestra a continuación (Fig. 3).

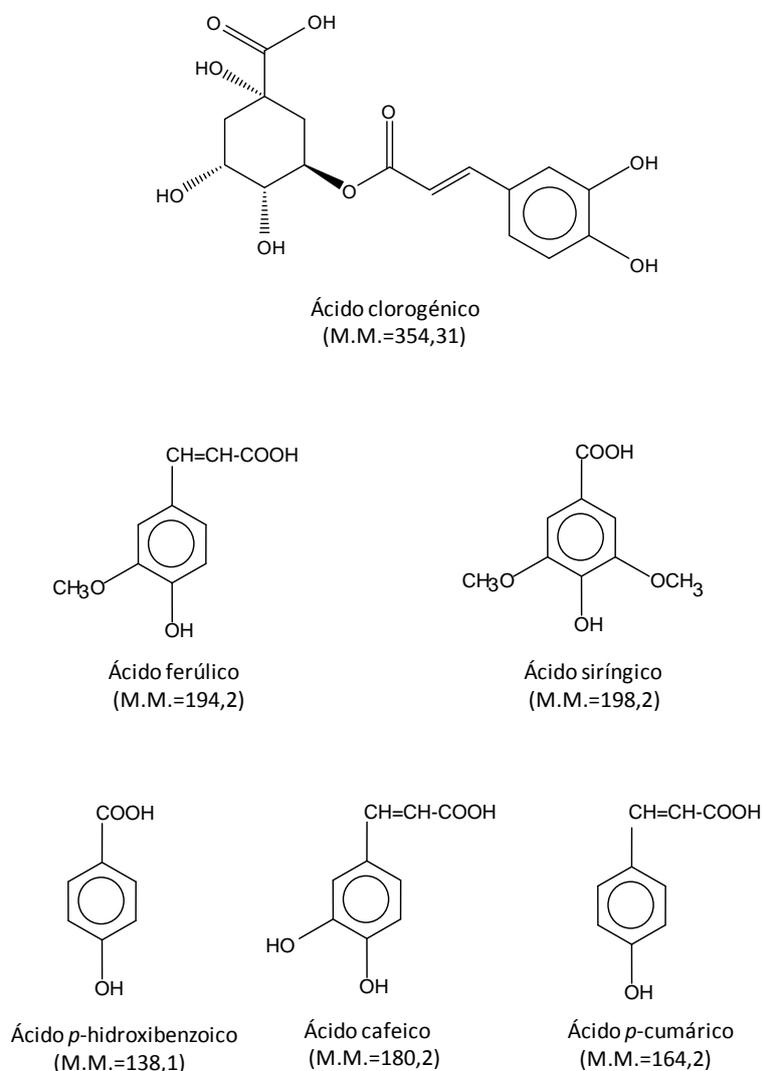


Figura 3. Estructura molecular de los ácidos clorogénico, ferúlico, siríngico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico y *p*-cumárico.

Composición cuantitativa

La concentración de todos ellos, excepto la de ácido clorogénico, es igual, $0,16 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, lo que da una masa inyectada de 3,3 ng. El ácido clorogénico se prepara a una concentración casi tres veces mayor, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, que da una masa inyectada de 10 ng. La composición cuantitativa de la muestra se muestra en la Tabla 4.

Sustancia	Concentración ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Masa inyectada (ng)
Ácido cafeico	0,16	3,3
Ácido clorogénico	0,5	10
Ácido ferúlico	0,16	3,3
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,16	3,3
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	0,16	3,3
Ácido siríngico	0,16	3,3

Tabla 4. Composición cuantitativa del contenido de la mezcla de análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lo primero que debe realizarse, como en los casos anteriores, es un espectro de absorbancia de cada uno de los analitos disueltos en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). En las Figs. 4 a 9 se muestran estos espectros. Excepto los ácidos siríngico y *p*-hidroxibenzoico que sólo muestran un máximo principal de absorbancia, todos tienen dos máximos, uno en el entorno de 235-240 nm y el otro a 325-330 nm. Sobre esta base, se elige una longitud de onda de análisis a la que todos los analitos muestren una cierta absorbancia. La situación de compromiso que se acepta es 280 nm, aunque podría haberse escogido otra longitud de onda en el entorno, siempre teniendo en cuenta los criterios de absorptividad de todos los analitos presentes en la muestra problema.

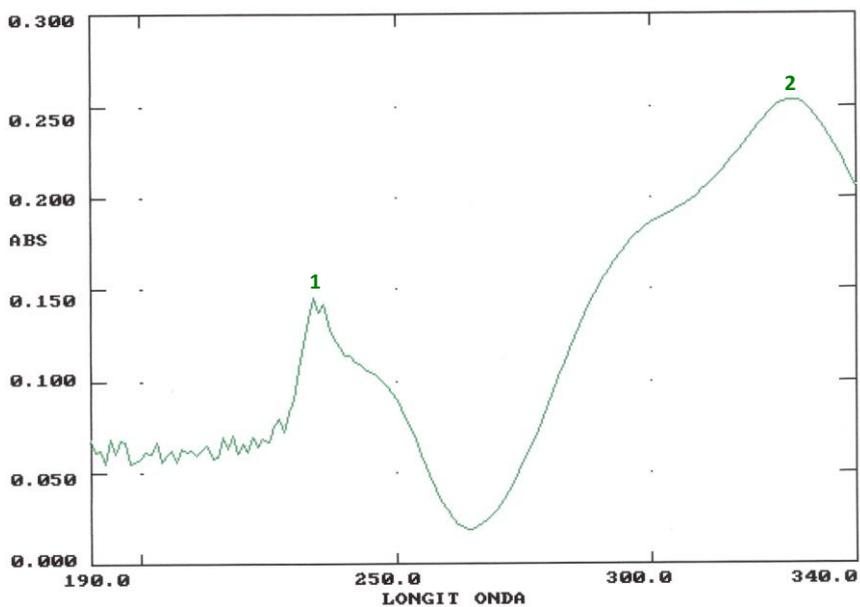


Figura 4. Espectro de absorción del ácido clorogénico a una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, los números 1 y 2 representan los máximos de absorción a 235 nm y 330 nm respectivamente.

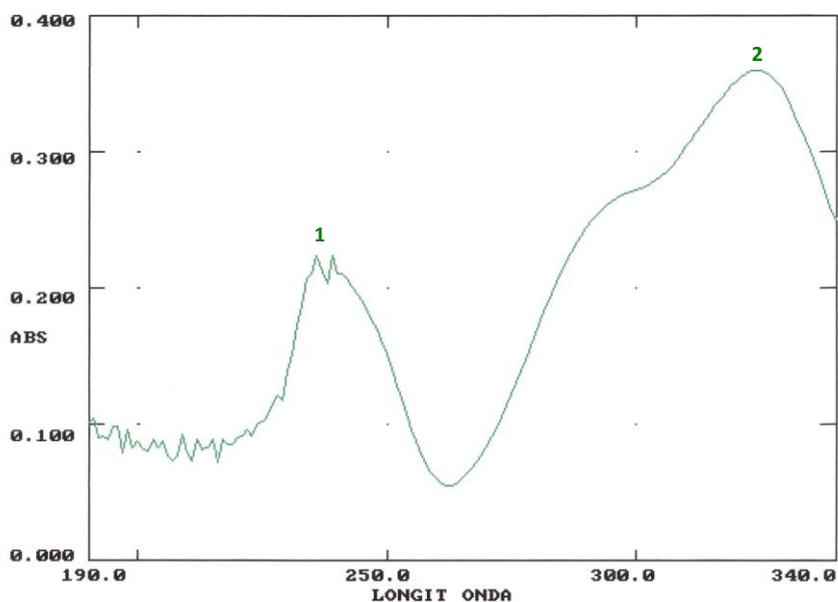


Figura 5. Espectro de absorción del ácido ferúlico a una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, los números 1 y 2 representan los máximos de absorción a 240 nm y 325 nm respectivamente.

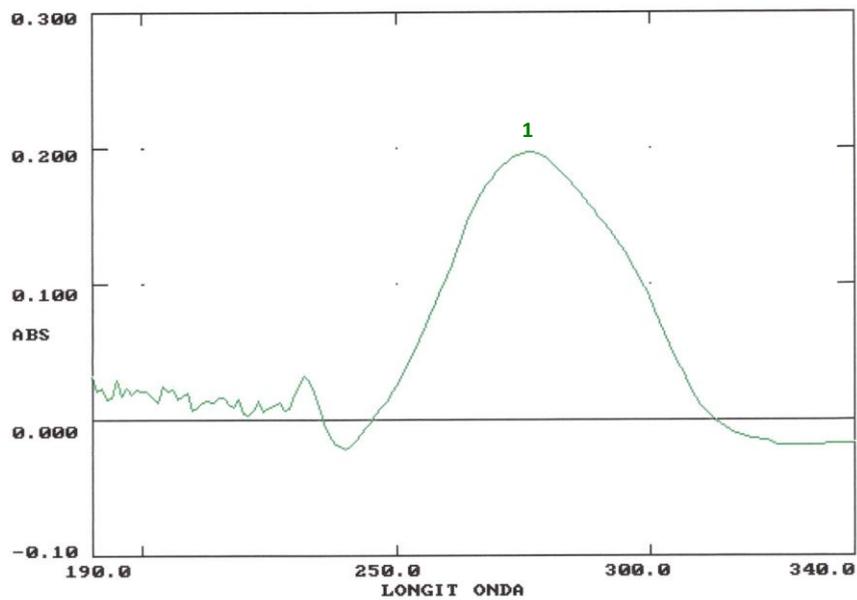


Figura 6. Espectro de absorción del ácido sirínico a una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, el número 1 representa el máximo principal de absorción a 280 nm.

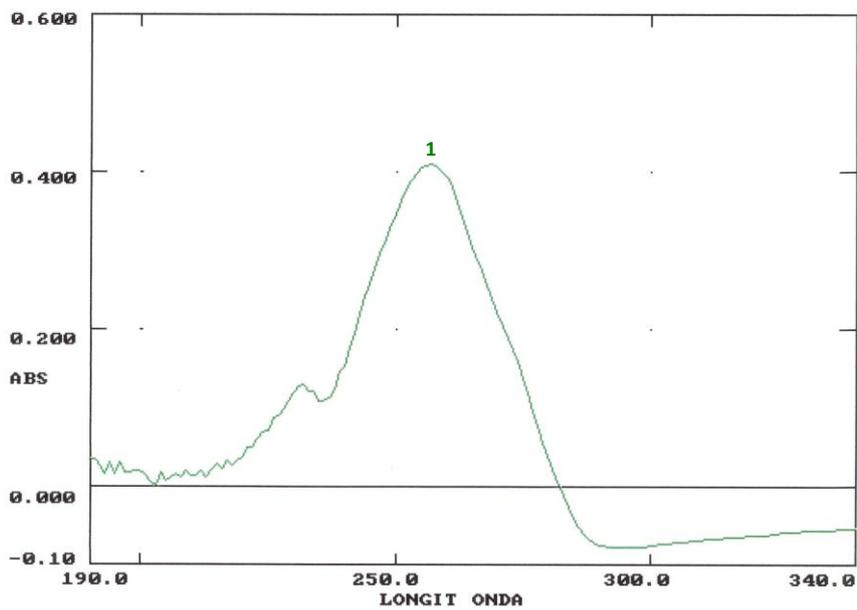


Figura 7. Espectro de absorción del ácido *p*-hidroxibenzoico a una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, el número 1 representa el máximo principal de absorción a 256 nm.

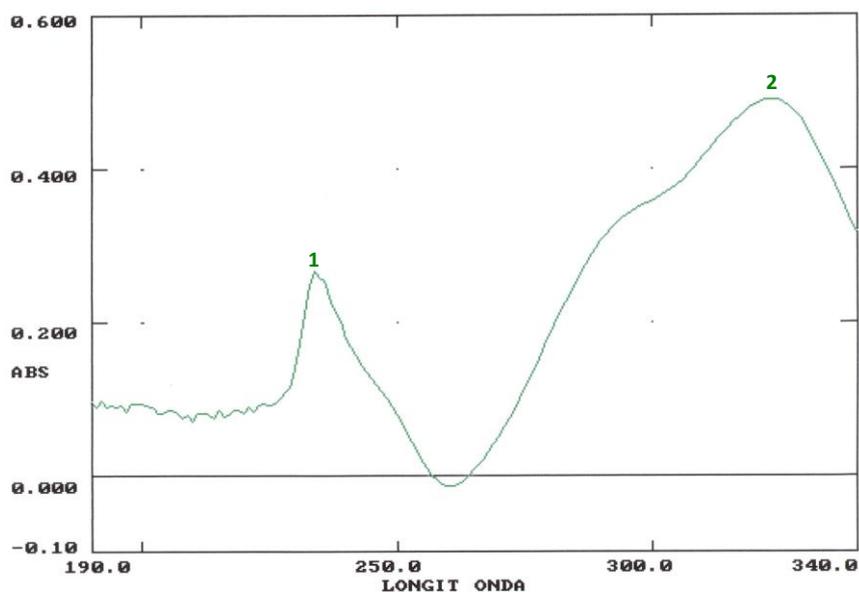


Figura 8. Espectro de absorción del ácido cafeico a una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, los números 1 y 2 representan los máximos de absorción a 235 nm y 325 nm respectivamente.

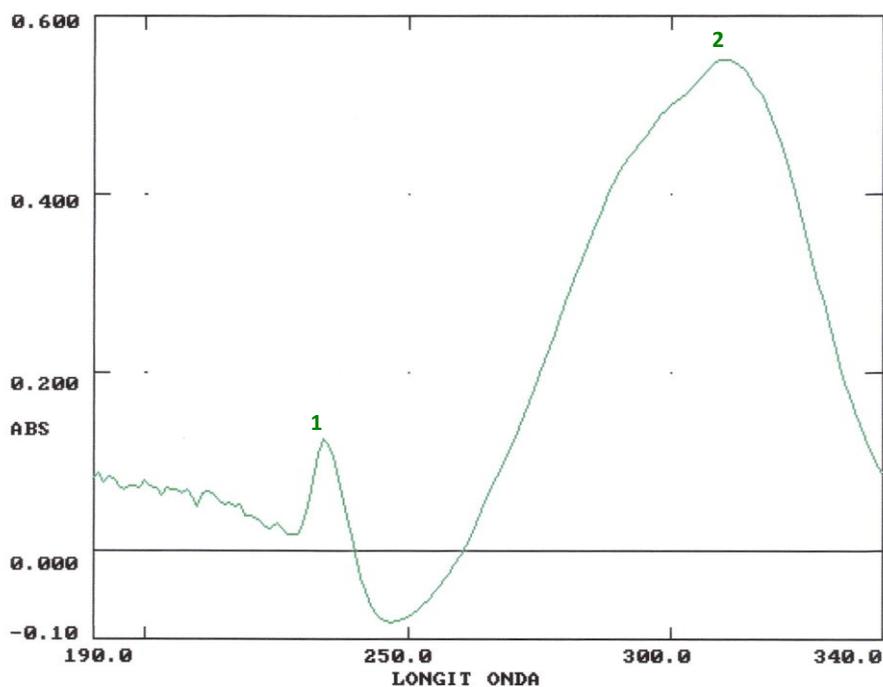


Figura 9. Espectro de absorción del ácido *p*-cumárico a una concentración de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ disuelto en 4% ácido acético en agua Milli-Q:ACN (80:20, v/v). Sobre la curva, los números 1 y 2 representan los máximos de absorción a 235 nm y 310 nm respectivamente.

Una vez escogida la longitud de onda de análisis, 280 nm, sin modificar la fase estacionaria, se procede a trabajar con diferentes fases móviles. Según se comentó, estas fases pueden ser constantes en su composición a lo largo del tiempo de análisis (procedimiento isocrático) o variar a lo largo del tiempo (procedimiento en gradiente). Si vamos de lo más sencillo a lo más complejo, debemos empezar por los análisis isocráticos.

1. Análisis isocráticos

Se plantean tres tipos de análisis isocráticos, según se muestra a continuación en la Tabla 5.

Análisis isocrático (nº)	Reservorio A (%)	Reservorio B (%)	Flujo (mL·min ⁻¹)
1	70	30	0,7
2	30	70	0,7
3	20	80	0,7

Tabla 5. Análisis isocráticos planteados. A: Acetonitrilo (ACN) y B: 4% de ácido acético en agua Milli-Q.

En los tres tipos de análisis se mantiene constante, tanto la composición de la fase móvil como la velocidad de flujo de ésta.

El análisis isocrático nº 1 tiene una fase móvil con una fuerza de arrastre muy grande, pues el acetonitrilo (ACN) está en una alta proporción. Los análisis isocráticos nº 2 y nº 3 tienen menor proporción de ACN en la mezcla y, por tanto, la fuerza eluotrópica de la fase móvil es menor. La diferencia de proporción de ACN entre el 70% y el 80% puede ser importante a la hora de la separación.

Se procede entonces a inyectar la muestra problema, preparada a la concentración que se especificó en la Tabla 4, en cada una de estas condiciones de análisis. En las Figs. 10-12 y en las Tablas 6-8 se muestran los cromatogramas obtenidos en cada uno de estos análisis, así como los resultados de la respuesta del detector, en cuentas de área y en porcentaje de cada pico.

Cromatograma obtenido mediante las condiciones del análisis isocrático nº1

En las condiciones de análisis isocrático nº 1 (Fig.10 y Tabla 6) sólo se obtiene un pico aun habiendo inyectado una muestra que estaba compuesta por seis sustancias. Todos los analitos eluyen juntos porque no da tiempo suficiente a que se produzca el correspondiente equilibrio de cada uno de ellos entre las fases estacionaria y móvil.

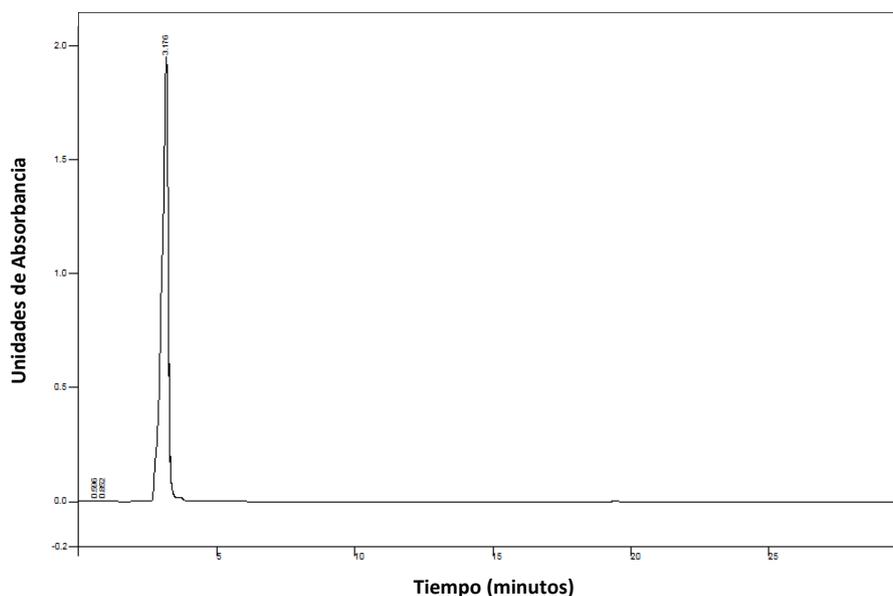


Figura 10. Cromatograma de la mezcla de los seis fenoles, realizado según las condiciones del análisis isocrático nº 1, con una composición de fase móvil: ACN: 4% ácido acético en agua Milli-Q) (70:30, v/v) y una velocidad de flujo $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	99,5	3,17	318,07

Tabla 6. Tabla del cromatograma de la mezcla de los seis fenoles, realizado según las condiciones del análisis isocrático nº 1, con una composición de fase móvil: ACN: 4% ácido acético en agua Milli-Q (70:30, v/v) y una velocidad de flujo $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Cromatograma obtenido mediante las condiciones del análisis isocrático nº2

En las condiciones de análisis isocrático nº 2 aparecen cuatro picos claros y resueltos (Fig. 11) con los tiempos de retención especificados en la Tabla 7. Existe un quinto pico, de $t_R=4,18 \text{ min}$ que no queda resuelto del siguiente (del pico de $4,36 \text{ min}$ que llamamos nº 3 en la Tabla 7) pero que comienza a aparecer.

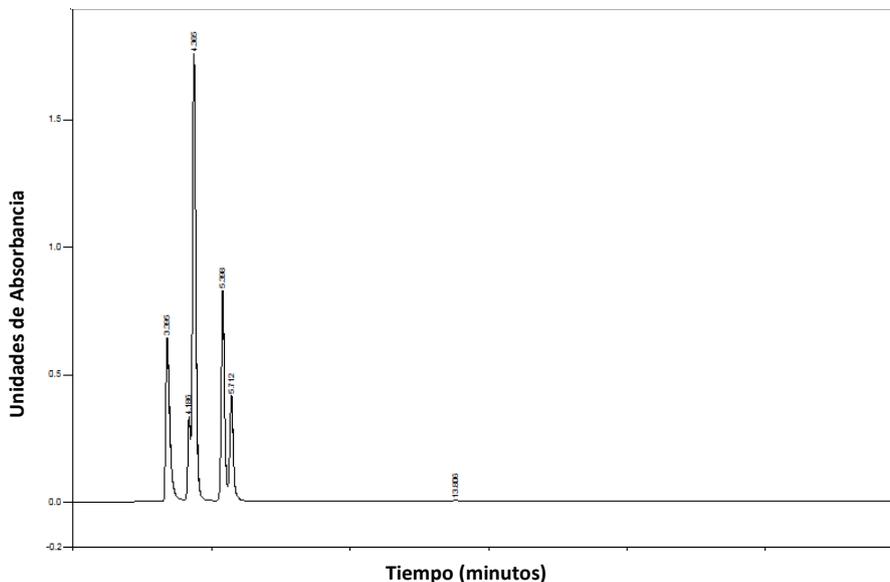


Figura 11. Cromatograma de la mezcla de los seis fenoles, realizado según las condiciones del análisis isocrático nº 2, con una composición de fase móvil: ACN: 4% ácido acético en agua Milli-Q (30:70, v/v) y una velocidad de flujo 0,7 mL·min⁻¹.

Pico (número)	Resultado (%)	t _R (min)	Cuentas de área (×10 ⁶)
1	16,17	3,39	57,66
2	8,38	4,18	29,89
3	44,31	4,36	158,03
4	20,96	5,39	74,74
5	10,18	5,71	36,3

Tabla 7. Tabla del cromatograma de la mezcla de los seis fenoles, realizado según las condiciones del análisis isocrático nº 2, con una composición de fase móvil: ACN: 4% ácido acético en agua Milli-Q (30:70, v/v) y un flujo 0,7 mL·min⁻¹.

Cromatograma obtenido mediante las condiciones del análisis isocrático nº3

En las condiciones del análisis isocrático nº 3 (Fig. 12 y Tabla 8), aparecen cinco picos, aunque la resolución entre el segundo y el tercero no es buena. Al haber disminuido la fuerza eluotrópica de la fase móvil, los solutos son capaces de interactuar más tiempo con la fase estacionaria y retenerse más en ella, logrando así una mejor separación.

La Tabla 9 muestra un resumen de los picos obtenidos en cada condición de análisis isocrático.

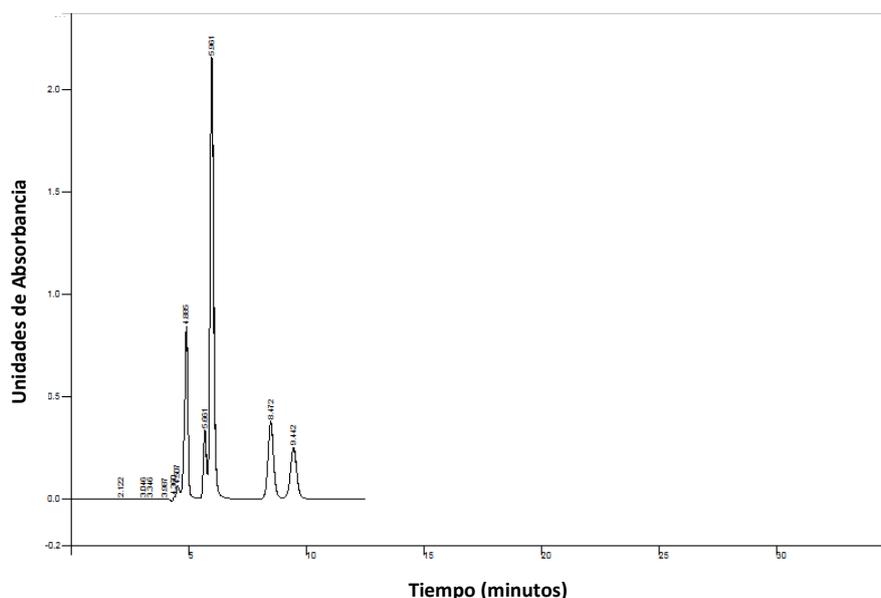


Figura 12. Cromatograma de la mezcla de los seis fenoles, realizado según las condiciones del análisis isocrático nº 3, con una composición de fase móvil: ACN: 4% ácido acético en agua Milli-Q (20:80, v/v) y una velocidad de flujo 0,7 mL·min⁻¹.

Pico (número)	Resultado (%)	t _R (min)	Cuentas de área (×10 ⁶)
1	20,9	4,88	59,8
2	8,21	5,66	23,49
3	54,48	5,96	155,9
4	9,7	8,47	27,76
5	6,72	9,44	19,22

Tabla 8. Tabla del cromatograma de la mezcla de los seis fenoles, realizado según las condiciones del análisis isocrático nº 3, con una composición de fase móvil: ACN: 4% ácido acético en agua Milli-Q (20:80, v/v) y un flujo 0,7 mL·min⁻¹.

Análisis Isocrático (nº)	Reservorio A (%)	Reservorio B (%)	Flujo (mL·min ⁻¹)	nº de picos	Tiempos de retención (min)
1	70	30	0,7	1	t _{R1} =3,17
2	30	70	0,7	5	t _{R1} =3,39
					t _{R2} =4,18
					t _{R3} =4,36
					t _{R4} =5,39
					t _{R5} =5,71
3	20	80	0,7	5	t _{R1} =4,88
					t _{R2} =5,66
					t _{R3} =5,96
					t _{R4} =8,47
					t _{R5} =9,44

Tabla 9. Resultados de los análisis isocráticos. A: Acetonitrilo (ACN) y B: 4% de ácido acético en agua Milli-Q.

2. Análisis en gradiente

A la vista de los resultados obtenidos mediante procedimientos isocráticos, se plantea la posibilidad de realizar un gradiente con objeto de obtener la separación completa de los seis solutos componentes de la muestra. El primer gradiente que se plantea es el que se refleja en la Tabla 10. Se trata de un gradiente lineal con dos pendientes diferentes; en los primeros 15 min más suave y algo más pronunciada entre los 15 y los 30 min, de forma también lineal. En la Fig. 13 se representa de forma gráfica, explicando también el “re-equilibrado” programado para la recuperación de la columna y la vuelta a las condiciones iniciales de fase móvil.

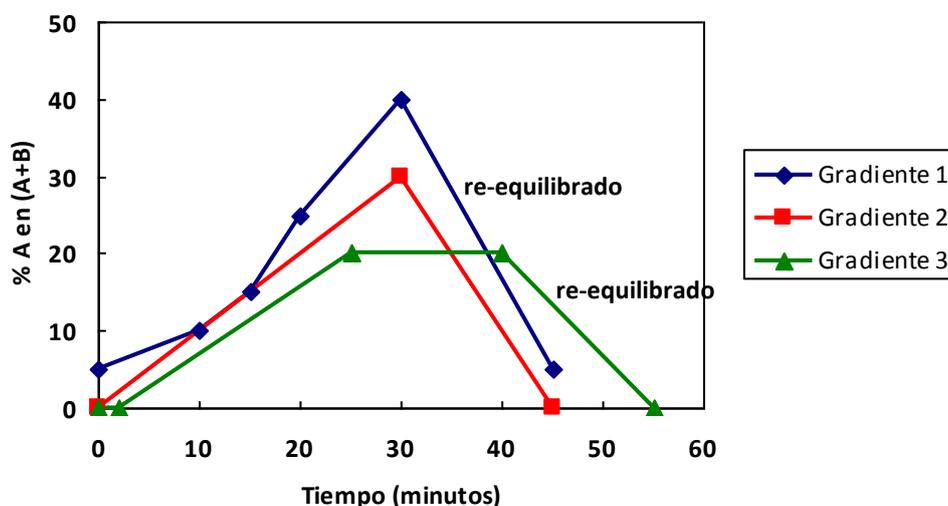


Figura 13. Representación gráfica de los gradientes empleados y su correspondiente “re-equilibrado”. A: Acetonitrilo (ACN) y B: 4% de ácido acético en agua Milli-Q.

TIEMPO (min)	%A	%B	Flujo (mL·min ⁻¹)
0	5	95	0,7
10	10	90	0,7
15	15	85	0,7
20	25	75	0,7
30	40	60	0,7
45	5	95	0,7

Tabla 10. Desglose de las distintas etapas que conforman el gradiente nº 1. A: Acetonitrilo (ACN) y B: 4% de ácido acético en agua Milli-Q.

Gradiente nº 1

Cuando la mezcla de las seis sustancias se cromatografía en las condiciones del análisis en gradiente nº 1, se separan los seis picos (Fig. 14 y Tabla 11). Sus t_R oscilan entre 15,24 min y 27,91 min y entre todos ellos se logra resolución. El cálculo exacto de k' , R_s , y $\alpha_{2:1}$, así como de N , se mostrará una vez analizados los tres gradientes que se plantean. En la Fig. 15 se observa el cromatograma original obtenido con este tipo de gradiente, de manera que el alumno pueda triangular los picos sobre él y calcular matemáticamente los parámetros.

Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente nº1

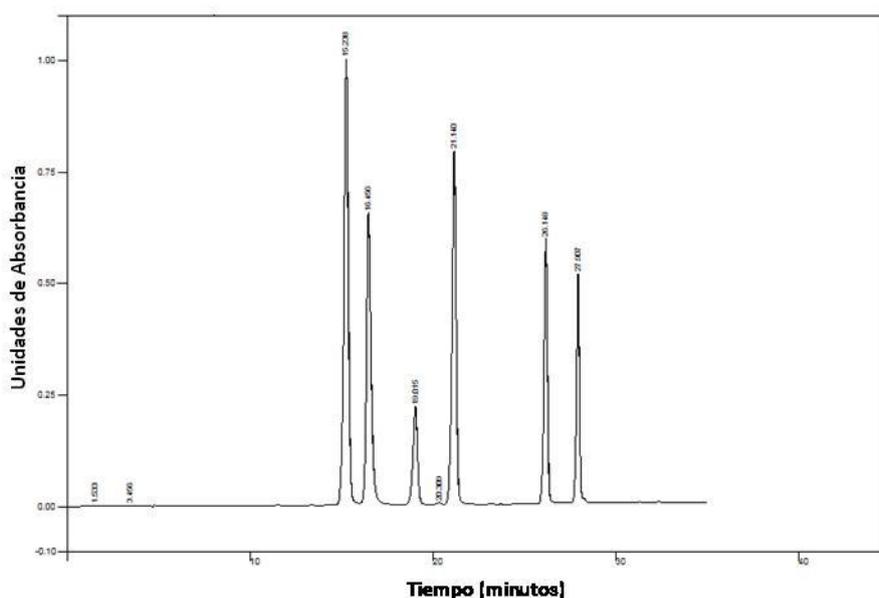


Figura 14. Cromatograma del análisis en el gradiente nº 1 de la mezcla de los seis fenoles.

Pico (número)	Resultado (%)	t_R (min)	Cuentas de área ($\times 10^6$)
1	28,65	15,24	168,94
2	19,96	16,46	117,67
3	6,58	19,01	38,79
4	21,37	21,14	126
5	13,13	26,15	77,44
6	9,91	27,91	58,44

Tabla 11. Tabla del cromatograma del análisis en el gradiente nº 1 de la mezcla de los seis fenoles.

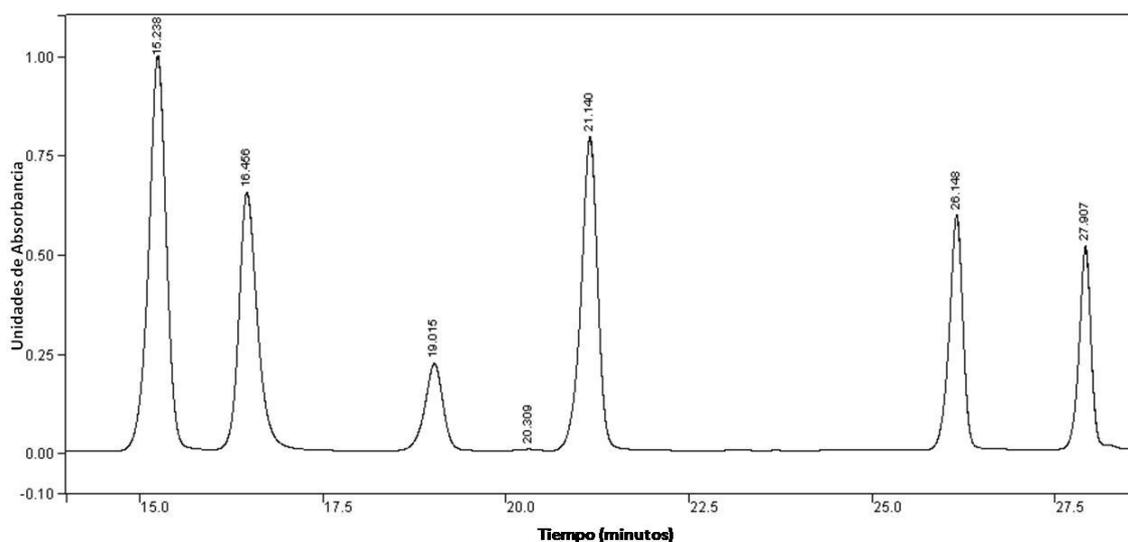


Figura 15. Ampliación del cromatograma del análisis en el gradiente nº 1 para la triangulación de picos.

Gradiente nº 2

El gradiente nº 2 es un gradiente lineal en 30 min de análisis donde se comienza en ausencia de disolvente fuerte (ACN) y éste alcanza un 30% en 30 min (Tabla 12). La Fig. 13 muestra el “re-equilibrado” de 15 min en este tipo de gradiente.

TIEMPO (min)	%A	%B	Flujo (mL·min ⁻¹)
0	0	100	0,7
30	30	70	0,7
45	0	100	0,7

Tabla 12. Desglose de las distintas etapas que conforman el gradiente nº 2. A: Acetonitrilo (ACN) y B: 4% de ácido acético en agua Milli-Q.

La muestra de los seis analitos cromatografiada en las condiciones del análisis en gradiente nº2 se resuelve en seis picos que se corresponden con los seis ácidos fenólicos. Los t_R oscilan entre 17,80 min y 31,18 min, apareciendo todos ellos resueltos entre sí (Fig. 16 y Tabla 13). El cálculo exacto de k' , R_s , y $\alpha_{2:1}$, así como de N , se mostrará una vez analizados los tres gradientes que se plantean. En la Fig. 17 se observa el cromatograma original obtenido con este tipo de gradiente, de manera que el alumno pueda triangular los picos sobre él y calcular matemáticamente los parámetros.

Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente nº 2

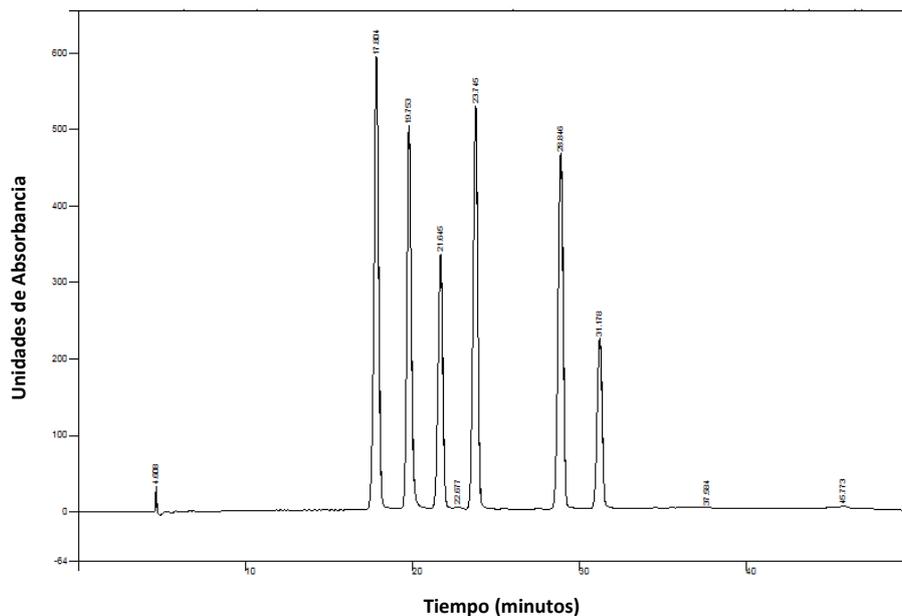


Figura 16. Cromatograma del análisis en el gradiente nº 2 de la mezcla de los seis fenoles.

Pico (número)	Resultado (%)	t _R (min)	Cuentas de área (×10 ⁶)
1	21,68	17,8	115,19
2	17,77	19,75	94,4
3	12,4	21,64	65,9
4	19,18	23,74	101,88
5	18,92	28,85	100,53
6	9,31	31,18	49,49

Tabla 13. Tabla del cromatograma del análisis en el gradiente nº 2 de la mezcla de los seis fenoles.

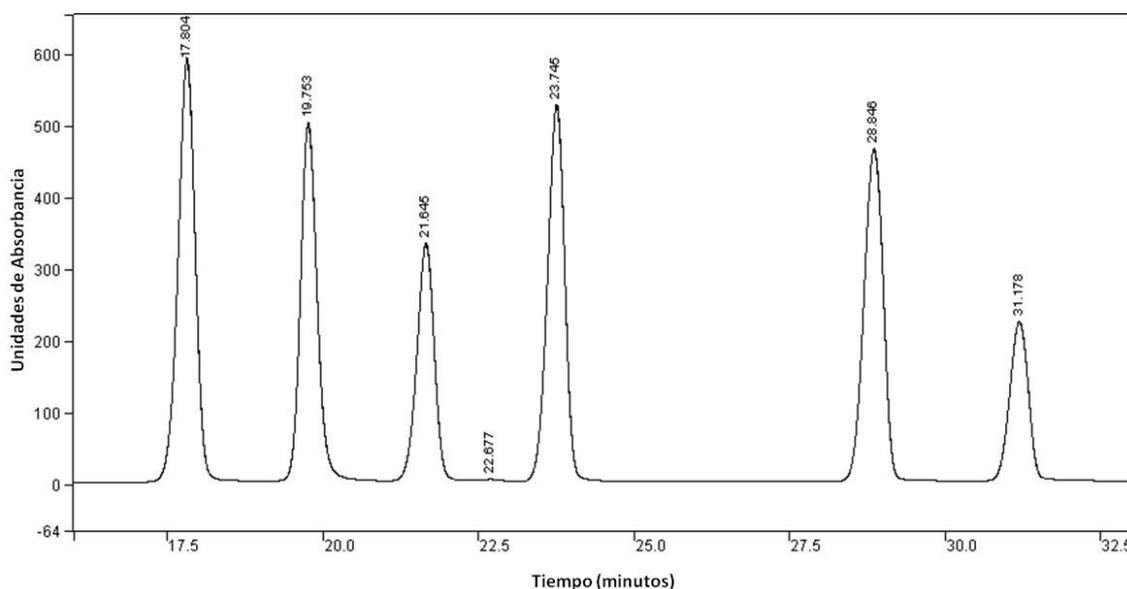


Figura 17. Ampliación del cromatograma del análisis en el gradiente nº 2 para la triangulación de picos.

Gradiente nº 3

El gradiente nº 3 es un gradiente de tipo cóncavo porque durante dos min mantiene la ausencia del disolvente fuerte (Tabla 14 y Fig. 13). A partir de ese tiempo existe un incremento casi lineal del porcentaje de ACN hasta conseguir un 80% en 25 min. Después se mantiene en estas condiciones durante otros 15 min. También se muestra el “re-equilibrado” de la columna que permite que las sucesivas inyecciones sean repetitivas.

TIEMPO (min)	%A	%B	Flujo (mL·min ⁻¹)
0	0	100	0,7
2	0	100	0,7
25	20	80	0,7
40	20	80	0,7
55	0	100	0,7

Tabla 14. Desglose de las distintas etapas que conforman el gradiente nº 3. A: Acetonitrilo (ACN) y B: 4% de ácido acético en agua Milli-Q.

En la Fig. 18 y en la Tabla 15 se muestran los resultados de la separación de los seis analitos en las condiciones de análisis en gradiente nº 3. Los t_R de los picos oscilan entre los 20,28 min y los 37,22 min. Como se observa, aunque todos los picos están bien resueltos entre sí, los tiempos de retención son mayores que los obtenidos en otras condiciones de gradiente planteadas.

Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente nº 3

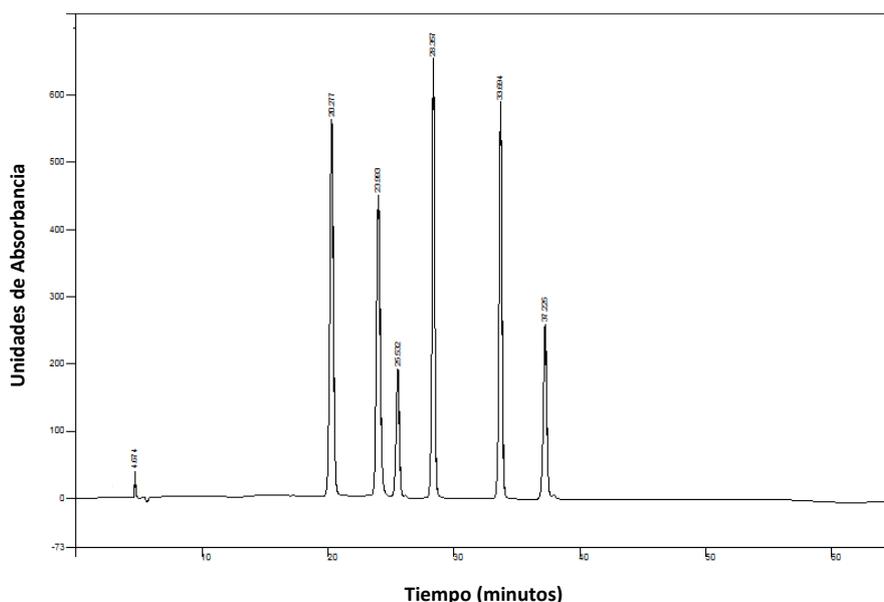


Figura 18. Cromatograma del análisis en el gradiente nº 3 de la mezcla de los seis fenoles.

Pico (número)	Resultado (%)	t _R (min)	Cuentas de área (×10 ⁶)
1	21,85	20,28	119,1
2	18,13	23,99	9,88
3	6,61	25,53	3,6
4	17,85	28,36	9,73
5	17,73	33,69	9,66
6	9,16	37,22	4,99

Tabla 15. Tabla del cromatograma del análisis en el gradiente nº 3 de la mezcla de los seis fenoles.

A la vista de los resultados obtenidos, se procede a realizar una cuantificación de los parámetros de retención más importantes, así como de la eficiencia obtenida para cada pico. Se han escogido los gradientes nº 1 y nº 2 para la cuantificación ya que, como se explicaba anteriormente, el tiempo de análisis se alarga excesivamente cuando se utiliza el gradiente nº 3. No obstante, éste último gradiente resulta interesante en el sentido de permitir una discusión con los alumnos en torno a que la mejor separación cromatográfica es la que se lleva a cabo en el menor tiempo y con los mejores resultados de resolución.

En la Tabla 16 se resumen los resultados en cuanto a t_R de los picos obtenidos en los tres tipos de gradiente.

Gradiente (nº)	nº picos	t _R pico 1 (min)	t _R pico 2 (min)	t _R pico 3 (min)	t _R pico 4 (min)	t _R pico 5 (min)	t _R pico 6 (min)
1	6	15,24	16,46	19,01	21,14	26,15	27,91
2	6	17,8	19,75	21,64	23,74	28,84	31,18
3	6	20,28	23,99	25,53	28,36	33,69	37,22

Tabla 16. Tiempos de retención de cada uno de los seis picos de la mezcla de seis fenoles, obtenidos en cada uno de los tres gradientes realizados.

ANÁLISIS DE LOS GRADIENTES 1 Y 2

Utilizando los cromatogramas originales ampliados (Figs. 15 y 17), el alumno puede hacer la triangulación de los picos según se explicó en la Parte I. Para ello, hay que tener en cuenta cuál ha sido la ampliación y proporcionar la escala utilizada. Una vez triangulados los picos, se calcularán matemáticamente algunos de los parámetros de retención (k' , R_s , y $\alpha_{2:1}$) y la eficiencia (N).

Nota importante

Los valores que se muestran en las Tablas 17 y 18, se han obtenido como resultado de la triangulación de cada uno de los seis analitos de la muestra problema en los diferentes gradientes, una vez ampliado el cromatograma (Figs 15 y 17), para

mayor comodidad en el tratamiento de las medidas. Cualquier alteración de la imagen que pudiera modificar estas medidas, repercutiría en los resultados. Se recomienda, por tanto, que la impresión en papel se haga conservando el tamaño del cromatograma.

Gradiente 1

En la Tabla 17 se muestran los resultados de los parámetros de retención y eficiencia obtenidos mediante la triangulación de los picos sobre la Fig. 15, en las condiciones del análisis isocrático nº 1. En este caso, 1 min equivale a 17,2 mm.

pico	ω_b (mm)	ω_b (min)	t_R (min)	t_M (min)	t_R (mm)	$t_{R'}$ (mm)	k'	N	$\alpha_{2:1}$	R_s (1)	R_s (2)
1	7,5	0,44	15,24	3,46	262,09	11,78	3,41	19.539	---	---	---
2	8	0,47	16,46		283,04	13	3,76	20.028	1,1	2,68	2,54
3	8	0,47	19,01		327,06	15,56	4,5	26.742	1,2	5,42	5,58
4	7,5	0,44	21,14		363,61	17,68	5,12	37.607	1,14	4,68	5,68
5	6	0,35	26,15		449,75	22,69	6,57	89.898	1,28	12,68	14,23
6	5,5	0,32	27,91		480	24,45	7,07	121.865	1,08	5,26	5,66

*1 min =17,2 mm

Tabla 17. Cálculo de algunos parámetros cromatográficos relacionados con la retención, resolución y eficiencia de los solutos, analizados según las condiciones de fase móvil del gradiente nº 1.

(1), Cálculo de R_s según la ecuación: $R_s = (2\Delta t_R) / (\omega_{b1} + \omega_{b2})$.

(2), Cálculo de R_s según la ecuación: $R_s = (\sqrt{N} / 4) (\alpha/\alpha-1)(k'_2 / 1+ k'_2)$.

Gradiente 2

En la Tabla 18 se muestran los resultados de los parámetros de retención y eficiencia obtenidos mediante la triangulación de los picos sobre la Fig. 17, en las condiciones del análisis isocrático nº 2. En este caso, 1 min equivale a 13,6 mm.

pico	ω_b (mm)	ω_b (min)	t_R (min)	t_M (min)	t_R (mm)	$t_{R'}$ (mm)	k'	N	$\alpha_{2:1}$	R_s (1)	R_s (2)
1	8	0,59	17,8	4,61	242,13	13,19	2,86	14.657	---	---	---
2	7	0,51	19,75		168,64	15,15	3,29	23.565	1,15	3,54	3,84
3	7	0,51	21,64		294,37	17,04	3,7	28.295	1,12	3,7	3,54
4	7	0,51	23,74		322,93	19,14	4,15	34.052	1,12	4,12	3,98
5	8	0,59	28,85		392,31	24,24	5,26	38.476	1,27	9,29	8,76
6	8	0,59	31,18		424,02	26,57	5,77	44.948	1,1	3,95	4,11

*1 min =13,6 mm

Tabla 18. Cálculo de algunos parámetros cromatográficos relacionados con la retención, resolución y eficiencia de los solutos, analizados según las condiciones de fase móvil del gradiente nº 2.

(1), Cálculo de R_s según la ecuación: $R_s = (2\Delta t_R) / (\omega_{b1} + \omega_{b2})$.

(2), Cálculo de R_s según la ecuación: $R_s = (\sqrt{N} / 4) (\alpha/\alpha-1)(k'_2 / 1+ k'_2)$.

El análisis comparativo de los resultados sobre parámetros de retención y eficiencia obtenidos mediante el uso de los gradientes 1 y 2, mostrados en las Tablas 17 y 18, respectivamente, nos permite sacar las siguientes conclusiones:

El gradiente nº1 permite la separación de todos los compuestos en 28 min mientras que en el gradiente nº2 se necesitan 31 min. En el gradiente nº 1 los picos eluyen entre 15,24 min y 27,91 min, es decir, en 12,67 min. En el gradiente nº 2 los picos eluyen entre el min 17,80 y el min 31, 18, es decir, en 13,38 min. Por tanto, en este sentido son bastante parecidos ambos gradientes.

El factor de capacidad (k') oscila entre 3,41 y 7,07 en el gradiente nº 1 y entre 2,86 y 5,77 en el gradiente nº 2. En ambos casos el valor es alto y diferente para cada analito.

La selectividad (α) es mayor entre los picos 1º y 2º y entre los picos 5º y 6º en el gradiente nº 2 que en el gradiente nº 1. Entre el resto de las parejas de picos, α es mayor en el gradiente nº 1. Parece por tanto que el gradiente nº 1 de fase móvil permite una mayor selectividad, en términos generales.

La resolución (R_s), entre las parejas de picos contiguos, es siempre superior a 1,5 lo que indica que los picos están resueltos hasta línea base en ambos tipos de gradiente. Excepto el valor de R_s , calculada como $[R_s = (2\Delta t_R) / (\omega_{b1} + \omega_{b2})]$ entre los picos 1º y 2º (3,54) en el gradiente nº 2, en el resto de los casos siempre es mayor en el gradiente nº 1.

La eficiencia de todos los picos (N), excepto el del que eluye en primer lugar, es siempre superior en el gradiente nº 1 que en el gradiente nº 2, por tanto, las condiciones de fase móvil empleadas en el gradiente nº 1 permiten separaciones más eficientes que en el gradiente nº 2.

En definitiva, sin ser inadecuado el gradiente nº 2, parece que sería más conveniente utilizar en gradiente nº 1 para la separación de estos seis analitos. La diferencia principal entre los dos gradientes estriba en el hecho de que en el gradiente nº 1 la fase móvil inicial tiene un 5% de ACN y alcanza en 30 min un 40 % mientras que el gradiente nº 2 comienza con una fase móvil sin ACN y éste sólo alcanza un valor del 30% en el mismo espacio de tiempo. Por tanto, parece deducirse que es necesario un cierto valor de fuerza eluotrópica inicial que permita la salida más temprana de los analitos y además lo hagan con mayor eficiencia. De hecho, la concavidad del gradiente nº 3 retrasa la elución de los picos en casi 7 min (Fig. 13 y Tabla 12) respecto a los otros dos gradientes. Se han calculado estos parámetros de retención y eficiencia como los más significativos aunque se pueden calcular otros muchos.

ORDEN DE ELUCIÓN DE LOS SEIS ANALITOS EN EL GRADIENTE 1

Para establecer el orden de elución en la mezcla de analitos hay que tener en cuenta varios factores:

- 1º La naturaleza de la fase estacionaria, en este caso apolar.
- 2º La naturaleza polar de la fase móvil en función del gradiente aplicado.
- 3º La masa molecular del analito.
- 4º La zona apolar del analito susceptible de interactuar con la fase estacionaria (efecto solvóforo).
- 5º El número y la naturaleza de las funciones polares de cada analito.

Análisis de las características de los analitos a separar

El ácido clorogénico (Fig. 3) es el analito de mayor masa molecular (354,31) y el que mayor número de grupos polares (8) posee, a gran distancia del resto de las moléculas en la mezcla. Sin embargo, no sólo la elevada masa molecular, sino también el efecto solvóforo juega en su contra, ya que posee dos núcleos de 6C, uno saturado y otro insaturado y una cadena isoprénica tetra-atómica. En otras palabras, su gran superficie apolar debe interactuar fuertemente con la fase estacionaria, compensando en gran manera la afinidad de sus ocho grupos polares por la fase móvil en su más alto grado de polaridad, al comienzo del gradiente ACN:4% ácido acético en agua Milli-Q (5:95, v/v). Además, como el porcentaje de ACN va aumentando la apolaridad de esta fase, debe esperarse que la elución del analito se retrase a favor de otros que posean menor superficie apolar (menor efecto solvóforo por tanto) y suficiente número de grupos polares. Hay que hacer notar que el ácido clorogénico es, además, el único analito de la mezcla que no posee ninguna función carboxilo.

¿Cuál sería la alternativa, si es que existe, en la mezcla? El resto de los analitos (Fig. 3) tiene masas moleculares muy semejantes, variando en un margen muy estrecho, tres de ellas entre 180,2 y 198,2 y otras dos entre 138,1 y 164,2. Todas ellas también, salvo los ácidos cafeico y ferúlico que tienen tres, poseen dos funciones polares, siendo siempre una de ellas un grupo carboxilo. Pero aún con respecto a esta última característica, hay una variación significativa. Este carboxilo está en un sustituyente monocarbonado (ácidos *p*-hidroxibenzoico y siríngico) o en una cadena insaturada de 3C (ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico). A su vez, los ácidos ferúlico y siríngico poseen una y dos funciones metoxilo respectivamente, lo que aumenta su apolaridad. Por tanto, la única alternativa frente al ácido clorogénico como primer analito eluido sería el ácido *p*-hidroxibenzoico, ya que posee la masa molecular más pequeña de la serie (138,1), un único anillo bencénico como único soporte del efecto solvóforo y dos funciones polares, siendo una de ellas un carboxilo que aparece como sustituyente monocarbonado. Por lo tanto, el ácido *p*-hidroxibenzoico sería el primer analito eluido ($t_R = 15,24$ min) y el segundo, el ácido clorogénico ($t_R = 16,46$ min); ver Tabla 17.

Por una razón semejante a la descrita, el ácido siríngico debería ser el tercer analito eluido. Sin embargo, dos grados de metoxilación no sólo aumentan su apolaridad sino también su masa molecular. Jugaría a favor suyo un sustituyente carboxilo monocarbonado, más polar que la misma función en una cadena 3C insaturada. En resumen, el ácido cafeico, de masa molecular 180,2, un núcleo bencénico y una cadena insaturada de 3C, pero con tres funciones polares y ningún

sustituyente metoxilo, tendría mayor polaridad y sufriría menor retención debida al efecto solvóforo que el ácido siríngico. Por tanto, el ácido cafeico es, en efecto, el tercer analito eluido ($t_R = 19,01$ min); ver Tabla 17.

A partir de este tercer analito, el efecto solvóforo aumenta con los diferentes grados de metoxilación, por lo que será necesario un aumento de la apolaridad de la fase móvil para compensar tal efecto. De los tres analitos restantes, el ácido siríngico es el único que no aumenta de forma notable su superficie de interacción con la fase estacionaria apolar al no poseer una cadena 3C insaturada. Por ello, debería ser el siguiente en eluir de la columna cuando el incremento en la proporción de ACN en la fase móvil sea suficiente. De hecho, la separación experimental demuestra que el ácido siríngico es el metabolito que eluye en cuarta posición ($t_R = 21,14$ min), ya netamente distanciado de los anteriores (Tabla 17). Nótese que el ácido cafeico es eluido unos minutos antes de que se alcance aproximadamente el 70% del incremento total del contenido en ACN de la fase móvil, proporción ésta que prácticamente coincide con la elución del ácido siríngico.

De los dos últimos analitos que restan por salir de la columna el orden no es dudoso. El ácido ferúlico es más apolar que el ácido *p*-cumárico gracias a una función metoxilo suplementaria. El ácido *p*-cumárico eluye en quinta posición ($t_R = 26,15$ min) y, por último, el ácido ferúlico ($t_R = 27,91$ min); ver Tabla 17. En la Tabla 19 se muestran los seis analitos objeto de separación, sus masas moleculares y el orden de elución obtenido en el gradiente nº 1.

Compuesto	M.M.	Orden de elución obtenido
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	138,1	1º
Ácido clorogénico	354,31	2º
Ácido cafeico	180,2	3º
Ácido siríngico	198,2	4º
Ácido <i>p</i> -cumárico	164,2	5º
Ácido ferúlico	194,2	6º

Tabla 19. Orden de elución de los seis analitos de la muestra problema en las condiciones de análisis del gradiente nº 1.

BIBLIOGRAFÍA

- Hildebrand, J. H. y Scott, R. L. 1962. *Regular Solutions*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Horváth, Cs., Melander, W. y Molnár, I. 1976. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *Journal of Chromatography A*, 125:129-156.

- Rohrschneider, L. 1969. A method for the characterization of stationary liquids in Gas Chromatography. II. Calculation of retention ratios. *Journal of Chromatography A*, 39:383-397.
- Smyth, C. P. 1955. *Dielectric Behaviour and Structure*. McGraw-Hill, New York.
- Snyder, L. R. 1968. *Principles of Adsorption Chromatography*. Dekker, New York.
- Snyder, L. R. 1978. Classification of solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatographic Science*, 16(6):223-234.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Dolan, J. W. y Snyder, L. R. 1989 *Troubleshooting LC Systems: A Comprehensive Approach to Troubleshooting LC Equipment and Separations*. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Dong, M.W. 2006. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. John Wiley and Sons, New York.
- García de Marina, A. y del Castillo, B. 1988. *Cromatografía Líquida de Alta Resolución*. Ed. Limusa, Méjico.
- Lloyd, R., Snyder, L. R., Glajch, J. L. y Kirkland, J. J. 1997. *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed. John Wiley and Sons, New York.
- Miller, J.M. 1988. *Chromatography: Concepts and Contrasts*. John Wiley and Sons, New York.
- Snyder, L. R. 1997. *HPLC Method Development*. John Wiley and Sons, New York.
- Snyder, L. R. y Dolan, J. W. 2006, *High Performance Gradient Elution*, John Wiley Interscience, New York.
- Snyder, L. R. y Dolan, J. W. 2007. *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. y Dolan, J. W. 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd Ed., John Wiley and Sons, New York.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. y Glajch, J. L. 1997. *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed., John Wiley and Sons, New York.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.forumsci.co.il/HPLC/program.html>

Study HPLC. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.studyhplc.com/index.php>

LCGC's Chrom Academy. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.chromacademy.com/>

Chemguide. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.chemguide.co.uk/>

HPLC. Consultada: 3 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.separationsnow.com/coi/cda/list.cda?catId=2737&type=Link&sort=az&chId=4>

Recibido: 14 junio 2010.

Aceptado: 3 de agosto 2011.