

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LOS PARAMETROS
QUE AFECTAN LA RETENCION EN
CROMATOGRAFIA POR PARES DE
IONES.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA
MA. ESTHER DEL REY DE PAREDES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY
DIVERSITY AND INCLUSION




JURADO:

PRESIDENTE	Dr. Armando Manjarrez Moreno.
1er. VOCAL	M. en C. Santiago Capella Vizcaíno.
SECRETARIO	M. en C. Francisco Rojo Callejas.
SUPLENTE	Dra. Luz Elena Vera Avila.
SUPLENTE	Dr. Alain Queré Thorent.

Sitio donde se desarrolló el tema:

División de Estudios de Posgrado.
Departamento de Química Analítica.
Facultad de Química,
U. N. A. M.

ASESOR DE TESIS



Dra. Luz Elena Vera Avila.

SUSTENTANTE



I. Q. Ma. Esther del Rey Leñero.

A mis padres, con cariño,
por el apoyo que siempre
me han brindado.

A mis maestros,
con cariño, respeto
y profunda admiración.

A Beti, Teté y Yuyo.

Mi más sincero reconocimiento a la Dra. Luz Elena
Vera Avila, por su inapreciable ayuda en la
realización de este trabajo, por su valiosa y
acertada dirección y paciencia.

Agradezco profundamente a mi querida ESCUELA NACIONAL PREPARATORIA, donde soy profesora desde hace 23 años, el haberme brindado la oportunidad de superación que tanto anhelaba.

Agradezco al Departamento de Química Analítica, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, U. N. A. M., el haberme proporcionado todas las facilidades para la realización de este trabajo.

RESUMEN.

Se presenta un estudio sistemático de los principales parámetros que intervienen en la fijación de contraiones catiónicos del tipo tetralquilamonio en columnas de fase inversa. Los resultados muestran que las variables que tienen mayor influencia sobre la fijación de estos compuestos son la concentración de contraion y de disolvente orgánico en la fase móvil, así como la hidrofobicidad del contraion.

Se deduce una ecuación matemática que permite calcular la concentración de contraion fijado por la fase estacionaria para diferentes valores de los parámetros antes mencionados. Esta ecuación permite además calcular el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de la columna bajo cualquier composición de fase móvil.

Los resultados anteriores sirvieron de base para efectuar un estudio más adecuado de la retención de solutos aniónicos en presencia de iones tetralquilamonio disueltos en la fase móvil. Este estudio demuestra que los factores que intervienen en mayor grado sobre la retención de los solutos son la concentración de contraion en la fase móvil y por lo tanto en la fase estacionaria, así como la concentración y tipo de sales disueltas en el eluyente.

El análisis de estos resultados permite deducir una expresión que relaciona, de una manera sencilla, el factor de capacidad del soluto con la concentración de contraión adsorbido en la fase estacionaria. En este modelo se propone que la retención del soluto en la fase estacionaria se lleva a cabo en 2 diferentes niveles:

- 1o. En una nube iónica difusa, asociada eléctricamente a la superficie iónica y
- 2o. Directamente sobre la superficie del empaque formando pares de iones con el contraion adsorbido.

ABSTRACT.

A systematic study of the influence of several parameters upon adsorption of tetralkylammonium ions on reversed-phases is presented. Results show that organic solvent content in mobile phase, counterion concentration in eluent and tetralkylammonium hydrofobicity are the most important variables.

A mathematical expression to calculate the counterion adsorbed for different combinations of these parameters is developed. Results from this study can be applied to calculate column equilibration times for any mobile phase composition.

These results are the basis for an adequate study of anionic solute retention in presence of tetralkylammonium ions in the mobile phase. Results show that counterion concentration in mobile phase and therefore in stationary phase, salt type and salt concentration in mobile phase are determinant variables.

The analysis of these results brought us to deduce a simple expression relating the capacity factor to the adsorbed counterion concentration in the stationary phase.

The retention model indicates that solute is present in the stationary phase at two different levels:

- 1st. Into a diffuse ionic cloud associated electrically to the ionic surface and
- 2nd. Directly, at the surface of the packing, where it forms ion pairs with the adsorbed counterions.

INDICE

	PG.
INTRODUCCION	4
CAPITULO I : LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS MODERNA	7
1) LA CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES	8
2) FORMACION DE PARES DE IONES	10
3) MECANISMOS DE RETENCION EN CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES	13
Descripción del sistema	13
a) Mecanismo de extracción del soluto en forma de par de iones por la fase estacionaria	14
b) Mecanismo de intercambio iónico	15
c) Mecanismos intermedios (mixtos)	17
-Cromatografía por interacción de iones	17
-Intercambio dinámico de complejos	23
-Intercambio iónico-desolvatación	26
4) ANTECEDENTES DIRECTOS DE ESTE TRABAJO	29
CAPITULO II: CONDICIONES EXPERIMENTALES	31
1) INSTRUMENTACION, MATERIALES Y REACTIVOS	31
a) Equipo	31
b) Columnas	31
c) Reactivos	33
Preparación de las fases móviles:	
-Contraiones	33
-Sales y reguladores de pH	33
-Fases móviles	34
-Solutos	34
2) SELECCION DE SOLUTOS Y CONTRAIONES PARA EL ESTUDIO DESARROLLADO	34

3) SELECCION DE LOS PARAMETROS CROMATOGRAFICOS A ESTUDIAR Y SU INTERVALO DE VARIACION	35
a) disolvente orgánico	35
b) pH	39
c) Concentración del contraion	39
d) Temperatura	40
e) Longitud de la cadena hidrocarbonada del contraion	40
f) Longitud de las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria	40
g) Concentración y tipo de sales disueltas en la fase móvil	41
CAPITULO III: ESTUDIO DE LA FIJACION DE IONES TETRALQUILAMONIO SOBRE FASES APOLARES QUIMICAMENTE UNIDAS	42
1) PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	42
2) RESULTADOS Y DISCUSION	45
a) Determinación de la isoterma de adsorción.	45
b) Influencia de la porporción de acetoniitrilo en la fase móvil sobre la fijación del contraion en fase estacionaria.	51
c) Influencia de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas del contraion sobre su adsorción en fase estacionaria.	54
d) Influencia de la concentración de sales disueltas en la fase móvil.	55
e) Influencia de la naturaleza de las sales disueltas en la fase móvil.	58
3) MODELO GENERAL DE ADSORCION DE IONES TETRALQUILAMONIO	60
a) Modelo lineal de primer grado -completo-	60
b) Modelo lineal de primer grado simplificado, -variables reducidas-	76
c) Modelo de variables reales	79
4) CONCLUSIONES SOBRE LA FIJACION DEL CONTRAION	80

CAPITULO IV : ESTUDIO DE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS	83
RESULTADOS	84
1) Efecto de la concentración de acetoni- trilo en el eluyente sobre la retención de los solutos	84
2) Efecto de la concentración de contraion sobre la retención de los solutos	88
3) Efecto de la concentración de sales en la fase móvil sobre la retención de los solutos	93
4) Efecto de la naturaleza del co-ion sobre la retención de los solutos	96
DISCUSION	98
1. Formación de pares de iones en la fase móvil o en la interfase previamente a su adsorción sobre la fase estacionaria	98
-Adsorción del soluto independiente del contraion	98
-Retención del soluto en presencia de contraion	99
2. Intercambio de iones dinámico	100
-Equilibrio de intercambio iónico	100
PROPOSICION DE UN MODELO DE RETENCION	100
PRUEBA DEL MODELO	107
CONCLUSIONES SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS	111
CAPITULO V : EJEMPLO DE APLICACION, SEPARACION DE SULFAS	112
1) Optimización de la separación	117
2) Reproducibilidad de los tiempos de retención	118
CONCLUSIONES GENERALES	120
BIBLIOGRAFIA	123

INTRODUCCION.

El amplio desarrollo observado en las últimas décadas en los campos de las ciencias bioquímicas, biomédicas y farmacéuticas ha sido en gran parte posible gracias al desarrollo paralelo de técnicas analíticas eficientes, rápidas, confiables y muy sensibles para el análisis de productos farmacéuticos y líquidos fisiológicos. En efecto, el análisis de los principales activos en los medicamentos y los metabolitos y compuestos diversos presentes en el organismo representa a menudo un problema delicado debido a las características químicas de estas sustancias, su baja estabilidad térmica y/o las bajas concentraciones a las que se encuentran en el organismo.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia ha sido el método de excelencia para resolver el delicado problema planteado por este tipo de compuestos. En particular, la cromatografía de intercambio iónico, y más recientemente, la cromatografía de pares de iones en fase inversa, han hecho posible el desarrollo de metodología adecuada para el análisis de compuestos biológicos y farmacéuticos que tienen carácter iónico o ionizable.

La Cromatografía de Intercambio Iónico, ya sea en resinas poliméricas o en sílices modificadas con grupos intercambiadores de iones, presenta algunas desventajas como son la cinética lenta de intercambio y la baja resistencia a la presión por parte de las resinas; y una baja selectividad en el caso de las sílices. Estos problemas impulsaron la búsqueda de vías alternas para la separación de compuestos iónicos y es así como se desarrolló en los últimos años de la década de los setentas la Cromatografía de Pares de Iones en fase inversa.

Las numerosas publicaciones de métodos de separación y análisis de compuestos iónicos muy diversos utilizando la cromatografía de pares de iones, ponen en evidencia la gran aceptación y popularidad que ha tenido esta técnica. Esto es sin duda debido a la buena estabilidad de la fase estacionaria, el bajo

costo de los disolventes utilizados como fase móvil y la versatilidad y flexibilidad de la técnica que permite realizar separaciones tanto de iones orgánicos como inorgánicos, catiónicos o aniónicos usando la misma columna.

La optimización de las separaciones en cromatografía de pares de iones en fase inversa se realiza a través de cambios en la composición de la fase móvil. Para ello se dispone de numerosos parámetros ajustables como son:

- La proporción y naturaleza de disolvente orgánico en la fase móvil.
- La concentración y tipo de sales o buffers disueltos en el eluyente.
- El pH.
- La naturaleza y concentración del contraion (ion de carga opuesta a la del soluto que se desea separar y que participa activamente en el proceso de retención)

Sin embargo, el ajuste rápido y lógico de esta gran variedad de parámetros y la implantación de métodos reproducibles para la resolución de un problema dado, pueden lograrse sólo a través de un conocimiento profundo de los mecanismos que participan en la retención de los solutos.

Los estudios realizados sobre este tema por numerosos investigadores han conducido a la proposición de una gran diversidad de mecanismos de retención; sin embargo, ninguno de estos modelos ha permitido explicar todas las observaciones que se han publicado al trabajar bajo condiciones experimentales muy variadas en cromatografía de pares de iones.

El problema parece ser más complicado cuando los contraiones disueltos en la fase móvil poseen un carácter hidrófobo marcado y se adsorben en la superficie de la fase estacionaria apolar. En efecto, esta adsorción depende de los mismos parámetros que afectan a la retención de los solutos.

Por lo mencionado anteriormente, el trabajo que aquí se presenta abarca dos grandes objetivos:

1o. Analizar la adsorción de contraiones hidrófobos en columnas de fase inversa para conocer, definir y predecir el efecto de variaciones en la composición de la fase móvil sobre el grado de fijación del contraion; para ello se seleccionaron como contraiones los iones tetralquilamonio simétricos, que con su estructura globular permitirán complementar otros estudios ya publicados en la literatura sobre contraiones aniónicos de cadena lineal.

Esta parte del trabajo está directamente relacionada con el conocimiento del estado de equilibrio de la columna y el tiempo requerido para alcanzarlo; por lo tanto, representa la base indispensable para la obtención de resultados significativos y reproducibles.

2o. Determinar, mediante un estudio profundo y secuencial, la influencia de los parámetros de la fase móvil sobre la retención de los solutos y en base a ello proponer un modelo de retención para la cromatografía de pares de iones con contraiones hidrófobos, con lo cual se pretende establecer bases firmes para alcanzar la optimización rápida y lógica de solutos iónicos mediante esta técnica.

CAPITULO I.

LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS MODERNA.

La cromatografía de gases ha sido durante muchos años la técnica de elección para la separación y análisis de mezclas complejas, ya que proporciona análisis rápidos, eficientes y sensibles, además de que se cuenta en la actualidad con una enorme disponibilidad de equipos completamente automatizados y computarizados; sin embargo, muchas muestras no pueden tratarse directamente mediante cromatografía de gases, ya sea por que son insuficientemente volátiles, o porque son térmicamente inestables y se descomponen bajo las condiciones de la separación.

En cromatografía de líquidos no se tienen estas limitaciones, por lo que se considera una técnica complementaria ideal para la separación de especies iónicas o ionizables y de productos que sean termolábiles o poco estables, tales como metabolitos animales y vegetales, ácidos nucleicos, polisacáridos, pigmentos vegetales, surfactantes, colorantes y proteínas, entre otros.

La flexibilidad de las separaciones por cromatografía líquida de alta eficiencia se debe principalmente a las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra y las de las 2 fases: móvil y estacionaria, lo cual ha permitido el desarrollo de una gran variedad de técnicas. Además, en cromatografía líquida se trabaja en general, a temperatura ambiente.

En la actualidad se cuenta con equipos para cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC, totalmente automatizados y controlados por microcomputadoras. Las columnas son mas durables y las fases estacionarias mas eficientes y versátiles, por lo que se tiene la posibilidad de hacer un gran número de separaciones individuales en una misma columna. La inyección de la muestra, mediante válvulas muestreadoras que pueden ser accionadas automáticamente, es muy precisa, aún para volúmenes

inferiores al microlitro. El flujo del disolvente se alcanza mediante sistemas de bombeo de alta presión que proporcionan un flujo preciso, programable, a través de las columnas, lo que conduce a separaciones altamente reproducibles. Se cuenta también con una gran variedad de detectores específicos, tales como refractómetros, espectrofotómetros (UV, visible, IR), fluorímetros y detectores electroquímicos, entre otros. Los avances más notables en los últimos años, en cuestión de tecnología de detectores, son sin duda los referidos al espectrofotómetro UV-visible de barrido rápido y a los detectores electroquímicos con varios electrodos indicadores y con tensiones sobreimpuestas.

Otro aspecto muy importante en la cromatografía de líquidos moderna es el desarrollo de nuevas técnicas de alta selectividad como son la cromatografía de pares de iones; la cromatografía de afinidad; la cromatografía de intercambio de ligantes y recientemente la cromatografía en fluidos en condiciones supercríticas, que se encuentra en la frontera entre la cromatografía de líquidos y la de gases.

LA CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES.

Por lo general, la extracción del medio acuoso de productos iónicos mediante un disolvente orgánico es difícil y poco adecuada para mezclas complejas, de ahí que la separación de este tipo de sustancias se haya realizado tradicionalmente por cromatografía de intercambio iónico en resinas.

El desarrollo de resinas de pequeña granulometría para la HPLC permite mejorar considerablemente la eficiencia de las separaciones, sin embargo, el tiempo de vida de las columnas es relativamente corto, debido a que las resinas del tipo divinilbenceno-poliestireno presentan baja resistencia a la presión, además de que su estructura polimérica produce una cinética lenta de intercambio.

Una alternativa posible son las sílices modificadas con grupos intercambiadores de iones que resisten mejor a la presión y que son más eficientes. Estas modificaciones se hacen mediante silanición, obteniéndose una sílice vinilada, la cual se hace reaccionar con estireno y luego se sulfona para obtener un intercambiador de cationes, o bien se le introduce

O bien se le introduce un grupo amonio cuaternario para efectuar intercambio de aniones; sin embargo, la baja capacidad de intercambio de estas fases ha limitado su uso.

Se ha tratado también de efectuar separaciones de compuestos iónicos mediante otras técnicas, como la cromatografía de intercambio de ligantes y la cromatografía de pares de iones.

La cromatografía de reparto con formación de pares de iones surge a mediados de la década de los setentas, cuando la cromatografía líquida llega a su máximo desarrollo. Estas separaciones se efectuaron sobre fases estacionarias impregnadas, trabajando en fase normal o en fase inversa.

En la literatura se encuentran publicados los trabajos de diversos autores, como los de Howard y Martin (1), quienes encontraron aplicaciones limitadas en este tipo de cromatografía debido a la baja eficiencia propia de las fases impregnadas; Horwitz y Bloomquist (2) prepararon columnas usando el ácido bis(2 etil hexil)fosfórico como fase estacionaria y una fase móvil acuosa. Wahlund et al (3) aplicaron en 1970 la cromatografía de pares de iones a polaridad de fases invertida para la separación de iones orgánicos de amonio. Eksborg et al (4) publicaron la cromatografía de pares de iones en fase inversa para aminofenoles utilizando como contraion el ácido 2(etil hexil)fosfórico. La eficiencia en todos estos casos fue muy baja.

El mecanismo de retención en la cromatografía de pares de iones con fases impregnadas era totalmente conocido: reparto del par de iones entre 2 líquidos no miscibles; de modo que aplicando los principios de la química de las disoluciones y las constantes de extracción líquido-líquido ya conocidas, era posible determinar las mejores condiciones para cada separación; sin embargo, este tipo de sistemas cromatográficos presentan serios inconvenientes debido a su poca estabilidad, lo que hace necesario usar una fase móvil presaturada con la fase estacionaria, así como controlar cuidadosamente la temperatura del sistema.

Debido a los inconvenientes de las técnicas antes mencionadas, se desarrolló una técnica que ha tenido gran aceptación, reemplazando poco a poco a las otras técnicas para la separación de compuestos iónicos o ionizables: la cromatografía de pares de iones a polaridad de fases invertida sobre fases químicamente unidas; sin embargo, sus mecanismos de retención no han sido completamente elucidados, como se mostrará posteriormente.

FORMACION DE PARES DE IONES.

Los primeros trabajos que publican la formación de pares de iones se deben a Bjerrum en 1926 (5), en su afán por, explicar algunas desviaciones a la teoría de Debye - Huckel - Onsayer, para ciertos electrólitos. Sostiene esta teoría que para que dos iones con cargas opuestas, en disolución, se unan para formar un par de iones, es necesario que lleguen a estar lo suficientemente próximos para que la energía atractiva coulombica supere a la energía térmica que trata de separarlos.

Bjerrum sugirió la posibilidad de que cada ion quedara "atrapado" en el campo coulombico del ion de carga contraria formando el "par de iones". Los iones del par forman en conjunto un dipolo iónico sobre el que la carga resultante es cero.

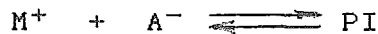
Basándose en las Teorías de la Disociación de Arrhenius, Bjerrum propone que las partículas neutras de un electrólito AB se disocian según A^+ y B^- . Aplicando la Ley de Acción de las Masas, la constante de disociación es:

$$K_{dis} = \frac{a_{A^+} a_{B^-}}{a_{AB}} \quad (1.1)$$

donde:

a_{A^+} , a_{B^-} y a_{AB} son las actividades de las especies indicadas.

Define por analogía una constante de asociación K_{as} correspondiente al par de iones PI formado por las especies M^+ y A^- , según el equilibrio:



$$K_{as} = \frac{a_{PI}}{a_{M^+} a_{A^-}} \quad (1.2)$$

donde:

a_{PI} , a_{M^+} y a_{A^-} son las actividades de las especies indicadas.

Calcula la constante de asociación mediante la ecuación:

$$K_{as} = \frac{4\pi N a}{1000} \left[\frac{z^+ z^- e_0^2}{\epsilon k T} \right]^3 \int_2^b e^{-y} y^{-4} dy \quad (1.3)$$

donde:

Kas es la constante de asociación.

Na es el número de Avogadro (iones/mol).

z^+ es la carga del ion positivo (carga elemental/ion).

z^- es la carga del ion negativo (carga elemental/ion).

e_0 es la carga del electrón (coulombs).

ϵ es la constante dieléctrica del disolvente.

k es la constante de Boltzman.(erg/K)

T es la temperatura absoluta.(K)

El límite de la integral b, está dado por:

$$b = \frac{2q}{a}$$

siendo:

q= distancia de aproximación suficiente (nm).

a= distancia de máxima aproximación entre iones (nm), acorde al tamaño de los radios iónicos.

A partir de la ecuación (1.3) se puede deducir que los factores que producen un aumento en la constante de asociación Kas son:

1. Las constantes dieléctricas bajas.

2. Los radios iónicos pequeños, que conducen a valores pequeños del límite inferior "a" de la integral de la ecuación (1.3) y por tanto, a valores grandes del límite superior "b"; y

3. Los valores grandes de z^+ y de z^-

Estas ecuaciones obtuvieron apoyo experimental. Cuando se realizan los cálculos numéricos correspondientes a la ecuación(1.3), se observa que en medios acuosos la asociación de pares de iones es muy pequeña para los electrólitos 1:1, pero es apreciable para los electrólitos 2:2 valentes y es muy importante en las disoluciones no acuosas, que en la mayoría tienen constantes dieléctricas mucho menores que el agua ($\epsilon=80$).

El modelo de Bjerrum explica el comportamiento de iones pequeños en disolución acuosa o de electrólitos en disolventes orgánicos de baja constante dieléctrica, sin embargo, no explica el comportamiento de iones de gran talla, anfifílicos, cuya molécula está formada por una parte apolar notable, que pueden también formar pares de iones importantes en disolución acuosa, donde

las interacciones debidas a las propiedades del agua son considerables.

Fuoss (5) presentó una alterantiva al modelo de Bjerrum y obtuvo la siguiente ecuación para la constante de asociación del par de iones:

$$K_{as} = \frac{4\pi N_a}{3000} a_{3eb} \quad (1.4)$$

sin embargo, los resultados experimentales presentados no permitieron establecer una distinción clara entre las constantes de asociación de Bjerrum y de Fuoss.

Se han propuesto varios modelos para explicar las propiedades físicas del agua líquida, como el de Pople (6), en 1951, modificado por Bernal y Fowler (7) en 1964. Este modelo supone que en el agua líquida existen grandes grupos de moléculas de agua asociadas mediante enlaces de hidrógeno, en cada uno de los cuales se distingue una unidad estructural o subgrupo formado por una molécula central de agua unida tetraédricamente con otras 4 moléculas de agua mediante enlaces de hidrógeno, produciendo cavidades cerradas de volumen variable. Los solutos apolares pueden ocupar dichas cavidades sin provocar ruptura de los enlaces, pero ocasionando deformaciones en la estructura ordenada del agua.

En el caso de especies iónicas compuestas por una parte apolar, la parte hidrocarbonada se aloja en una cavidad, mientras que el grupo iónico provoca una fuerte orientación de las moléculas de agua.

Los cambios en la estructura del agua que acompañan a la disolución de moléculas parcialmente hidrocarbonadas provocan una repulsión del disolvente hacia ellas, ocasionando la formación de asociaciones de iones o de micelas. En efecto, las moléculas hidrófobas, en contacto con un disolvente polar como el agua, se rearreglan para presentar la mínima superficie de contacto con el disolvente, lo cual se logra mediante su asociación.

Los pares de iones tienen la propiedad de pasar fácilmente de un medio acuoso a un medio orgánico de baja constante dieléctrica, pero debido a su carácter ligeramente polar son extraídos más fácilmente por disolventes ligeramente polares como son algunos disolventes clorados, por ejemplo, el cloruro de metileno o el cloroformo, o bien alcoholes de cadena larga como el pentanol, que por disolventes apolares como el tetracloruro de carbono o los alcanos.

Aunque algunos autores han supuesto que la formación de pares de iones se efectúa en la fase acuosa, es probable que en el caso de asociación ion

orgánico-ion inorgánico, la formación de pares de iones se efectúa en la interfase agua-disolvente orgánico; sin embargo, no se tienen estudios detallados sobre este tema, por lo que se pretende discutirlo ampliamente durante este trabajo.

MECANISMOS DE RETENCION EN CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES.

Desde los primeros años en que se desarrolló la cromatografía de pares de iones sobre fases apolares químicamente unidas, los investigadores han tratado de explicar el mecanismo de retención de los solutos y el papel que desempeña el contraion. Para comprender mejor los mecanismos que han sido propuestos, se hará en primer lugar una breve descripción del sistema cromatográfico.

El sistema está formado por una fase estacionaria apolar: sílice modificada a la que se han unido mediante silanización cadenas hidrocarbonadas de 8 a 18 átomos de carbono; aún cuando se han publicado resultados con cadenas hidrocarbonadas de 2 átomos de carbono (8).

La fase móvil utilizada está formada por una mezcla de agua y un disolvente orgánico soluble en agua en todas las proporciones: metanol o acetonitrilo, en la que se disuelven sales, amortiguadores y el agente formador de pares de iones, al que hemos llamado contraion; no obstante, a menudo recibe otros nombres.

El contraion, en este tipo de cromatografía, es un ion voluminoso de carga contraria al soluto que se desea separar, cuya molécula está formada por una parte hidrófoba importante.

Cualquier cambio que provoque una modificación en los efectos hidrófobos sobre el soluto, sobre el contraion, o sobre el par de iones soluto-contraion, afectará a la retención; de modo que se pueden hacer variar ciertos parámetros para obtener las condiciones óptimas en cada separación.

El mecanismo de retención del soluto en este tipo de sistemas no ha sido completamente determinado. Se han propuesto varias alternativas para explicar la retención de los solutos en cromatografía de pares de iones:

- 1a. Extracción del soluto en forma de par de iones por la fase estacionaria.

2a. Fijación del contraion en la fase estacionaria, debido a su parte hidrofoba, asociado a un ion de carga contraria (co-ion). De este modo la fase estacionaria se convierte en un intercambiador de iones dinámico, donde los solutos compiten con los iones de la misma carga disueltos en la fase móvil.

3a. Mecanismos intermedios entre los 2 antes mencionados, dependiendo el predominio de uno de ellos de la fracción volúmica del disolvente orgánico, del grado de hidrofobicidad del contraion, así como de su concentración en el eluyente.

1a. EXTRACCION DEL SOLUTO EN FORMA DE PAR DE IONES POR LA FASE ESTACIONARIA.

Se supone que el par de iones se forma en el eluyente y es fijado en la fase estacionaria.

Algunos autores (9) han observado que el factor de capacidad del soluto aumenta, pero no linealmente, al aumentar la concentración de contraion en la fase móvil. La retención de los solutos se debe por una parte, al equilibrio de distribución del par de iones formado en el eluyente; y por otra parte, a la adsorción directa del soluto en la fase estacionaria.

La ecuación para la retención de un soluto aniónico es:

$$k' = \phi K = \phi \frac{[S^-]_{st}}{[S^-]_m} = \phi \frac{[S^-]_{st} + [S^{-C^+}]_{st}}{[S^-]_m + [S^{-C^+}]_m} \quad (1.5)$$

donde:

los subíndices *st* y *m* representan la fase estacionaria y la fase móvil respectivamente.

k' es el factor de capacidad del soluto.

ϕ es la relación de volúmenes de fases (V_{st}/V_m).

K es la constante de distribución del soluto.

$[S^-]$ es la concentración del soluto libre.

$[S^{-C^+}]$ es la concentración del par de iones.

Llamando:

$$K_1 = \frac{[S^-]_m [C^+]_m}{[S^{-C^+}]_m} \quad (1.6)$$

a la constante de equilibrio de formación del par de iones en la fase móvil y

$$E_{SC} = \frac{[S^{-C^+}]_{st}}{[S^-]_m [C^+]_m} \quad (1.7)$$

a la constante de extracción del par de iones y

k'_0 al factor de capacidad del soluto en ausencia de contraion, se tendrá:

$$k' = \frac{k'_0 + E_{sc}[C^+]_m}{1 + K_1[C^+]_m} \quad (1.8)$$

Cuando la tendencia a formar pares de iones en el eluyente es muy baja y/o la concentración de contraion en la fase móvil es muy pequeña, la ecuación anterior se reduce a:

$$k' = k'_0 + E_{sc}[C^+]_m \quad (1.9)$$

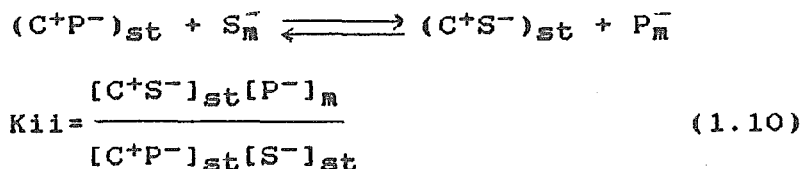
Este tipo de relación lineal ha sido observada por Tomlinson et al (10), trabajando con concentraciones de contraion de 1×10^{-5} a 6×10^{-4} M.

2a. MECANISMO DE INTERCAMBIO IONICO.

En este mecanismo se considera que el contraion, por tener una parte hidrófoba importante, se fija sobre las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria, asociado a un co-ion de la misma carga que el soluto. De esta manera, la fase estacionaria queda convertida en un intercambiador de iones dinámico, donde los solutos compiten con los iones de la misma carga disueltos en la fase móvil.

Algunos autores consideran que la retención de los solutos depende de los siguientes equilibrios (11).

Intercambio iónico:



donde:

P^- representa a los iones de la misma carga que el soluto, disueltos en la fase móvil.

(C^+P^-) representa el par de iones contraion-coion.

S^- representa el soluto aniónico.

K_{ii} es la constante de intercambio iónico.

Knox y Laird demostraron que la isoterma de adsorción de contraiones hidrófobos es del tipo Freundlich (12),

$$[C^+P^-]_{st} = A[C^+]_m^B \quad (1.11)$$

donde A y B son constantes.

La expresión para el coeficiente de distribución del soluto se debe a la combinación de 2 procesos:

el de la fijación del soluto ionizado y el del mecanismo de intercambio iónico que hemos mencionado.

$$K = K_o + K_{cs} \quad (1.12)$$

$$K_o = \frac{[S^-]_{st}}{[S^-]_m} \quad (1.13)$$

$$K_{cs} = \frac{[C^+S^-]_{st}}{[S^-]_m} \quad (1.14)$$

$$\therefore K = K_o + K_{ii} \frac{[C^+P^-]_{st}}{[P^-]_m} \quad (1.15)$$

o también:

$$K = K_o + K_{ii} A \frac{[C^+]_m^B}{[P^-]_m} \quad (1.16)$$

de donde:

$$k' - k'o = cte \frac{[C^+P^-]_{st}}{[P^-]_m} = cte \frac{[C^+]_m^B}{[P^-]_m} \quad (1.17)$$

tomando logaritmos:

$$\log(k' - k'o) = cte + B \log[C^+]_m - \log[P^-]_m \quad (1.18)$$

donde:

$$k' = \Phi K \quad k'o = \Phi K_o \quad \Phi = \frac{V_{st}}{V_m}$$

La relación (1.17) indica que el factor de capacidad del soluto aumenta al aumentar la concentración de contraion en la fase móvil y disminuye al aumentar la concentración de sales.

Algunos autores como Van de Venne (11) y Terweij Groen (13) hicieron estudios sobre la fijación de cetrimida y de hexilamina, encontrando relaciones entre los factores de capacidad de diferentes solutos y la concentración de contraion en la fase estacionaria o en

fase móvil, que obedecen a las ecuaciones (1.17) y (1.18)

Knox y Jurand (14) demostraron que para obtener separaciones reproducibles, la columna debe encontrarse previamente equilibrada con el contraion. Durante el proceso de equilibrio el contraion se va fijando sobre la fase estacionaria, dando lugar a la formación de un frente de migración de esa especie que avanza a lo largo de la columna. El tiempo requerido para alcanzar el equilibrio varía con la composición de la fase móvil y puede en ocasiones ser sumamente largo. Estos mismos autores observaron, sin embargo, en algunos casos, relaciones no lineales entre los factores de capacidad de los solutos y la concentración de los co-iones (14).

3a. MECANISMOS INTERMEDIOS (MIXTOS).

En la literatura se han reportado una gran variedad de mecanismos de retención más complejos que, debido a que involucran los dos casos extremos mencionados anteriormente, hemos llamado "mecanismos mixtos". Entre ellos hemos seleccionado 3 que consideramos los más completos e ilustrativos dentro de este tipo de proposiciones:

- el mecanismo de interacción de iones.
- el mecanismo de intercambio dinámico de complejos y
- el mecanismo de intercambio iónico-desolvatación.

A continuación se presentan detalladamente los razonamientos y equilibrios que se proponen para cada uno de ellos.

"Cromatografía por Interacción de iones".

Bidlingmeyer et al (15) encontraron que no podían interpretar los datos experimentales obtenidos por ellos mismos mediante los mecanismos propuestos por otros investigadores, por lo que presentaron un mecanismo que llamaron "Cromatografía por Interacción de Iones", en el cual se establece que en este sistema intervienen interacciones de los siguientes tipos: electrostáticas, eluofílicas (afinidad por la fase móvil), eluofóbicas, adsorbofílicas (afinidad por la fase estacionaria) y adsorbofóbicas.

Las observaciones de estos investigadores se resumen de la siguiente forma:

Las especies utilizadas como contraiones, que ellos llamaron agentes de interacción de iones, (fueron alquilsulfonatos de 5 a 8 átomos de carbono y

octilamina protonada) son adsorbidos por la fase estacionaria apolar (μ Bondapak C 18). Al inyectar estas especies en un sistema simple de fase reversa, los autores encontraron una relación lineal entre el logaritmo del factor de capacidad de estas especies y el número de átomos de carbono de su cadena hidrocarbonada (fig 1.1), que concuerda con la ecuación de Martin:

$$RT \ln K = a \Delta_{\mu} \text{CH}_3 + b \Delta_{\mu} \text{SO}_3^- + c \Delta_{\mu} \text{CH}_2^- \quad (1.19)$$

en donde:

R es la constante de los gases.

T es la temperatura absoluta.

K es la constante de partición de la especie.

a es el número de grupos metilo en la molécula.

b es el número de grupos sulfonato en la molécula.

c es el número de grupos metileno en la molécula.

Δ_{μ} es el potencial químico diferencial, es decir: es la energía libre necesaria para transportar una mol del grupo considerado (metilo, sulfónico o metileno) de la fase estacionaria a la móvil.

En el caso de la serie homóloga de alquil sulfonatos, $a = b = 1$, la ecuación de Martin se simplifica así:

$$\log k' = \beta_0' + \beta_1' b \quad (1.20)$$

donde:

β_0' es una constante y

β_1' es una medida del potencial químico diferencial del grupo metileno.

El valor del potencial químico diferencial depende de la composición de la fase móvil.

También encontraron estos autores que en mezclas agua-metanol, el logaritmo del factor de capacidad de estas especies, varía linealmente en función de la fracción volumétrica de metanol (fig 1.2), dentro de un intervalo de 20 a 60 % de metanol, por lo que la ecuación (1.20) puede escribirse:

$$\log k' = \beta_0 + \beta_1 (\% \text{MeOH} - \beta_2) (b - \beta_3) \quad (1.21)$$

donde:

β_0 es una constante = -1.2389

β_1 es la pendiente combinada respecto a porcentaje de metanol y número de grupos metileno = -0.0072956

β_2 es una constante respecto al % de metanol = 78.741
 β_3 es una constante respecto al número de grupos metileno = 1.8603

Esta ecuación presenta el efecto combinado de la composición del eluyente y de la superficie hidrófoba del contraion sobre su adsorción en la fase estacionaria. El valor de las constantes se obtuvo por regresión no lineal usando los datos experimentales de la figura 1.2

La figura 1.1 muestra que para el propil sulfonato el factor de capacidad es independiente del porcentaje de metanol en el eluyente. Esto indica que los cambios en el potencial químico diferencial del grupo SO_3^- , debidos al % de metanol en el eluyente, son compensados por los cambios en los potenciales químicos de los tres átomos de carbono (en una fase estacionaria apolar, los potenciales químicos diferenciales del grupo sulfónico y de los grupos metilenos son de signos contrarios).

La figura (1.2) muestra que para un porcentaje de metanol de 79% aproximadamente, la retención de los solutos es independiente de la longitud de la cadena alquilo, lo cual significa que el potencial químico diferencial del grupo metileno es igual a cero ($\Delta\mu=0$), es decir: que el grupo metileno es atraído y repelido con igual fuerza por las fases móvil y estacionaria. La composición de la fase móvil que corresponde a esa condición de "isopotencialidad" es una función del potencial químico de la fase estacionaria, por lo que podría servir para evaluar el grado de apolaridad de las fases estacionarias.

Estos mismos autores demostraron, mediante titulaciones conductométricas, que los pares de iones no se forman en la fase móvil; sin embargo Horváth et al (16) demostraron que cuando la constante de formación del par de iones es menor a 10^3 , no es posible observar un cambio neto en la pendiente de la recta $\Lambda=f(\text{ml de titulante})$. (Λ es la conductancia de cada especie).

También mostraron que los solutos iónicos que tienen carga de signo contrario al contraion, aumentan su retención al aumentar la concentración de contraion en fase móvil; los de la misma carga la disminuyen y las moléculas neutras son poco afectadas. Se observó que los solutos más retenidos son los que tienen mayor superficie hidrocarbonada para una misma carga, concluyendo que en la retención de los solutos no sólo

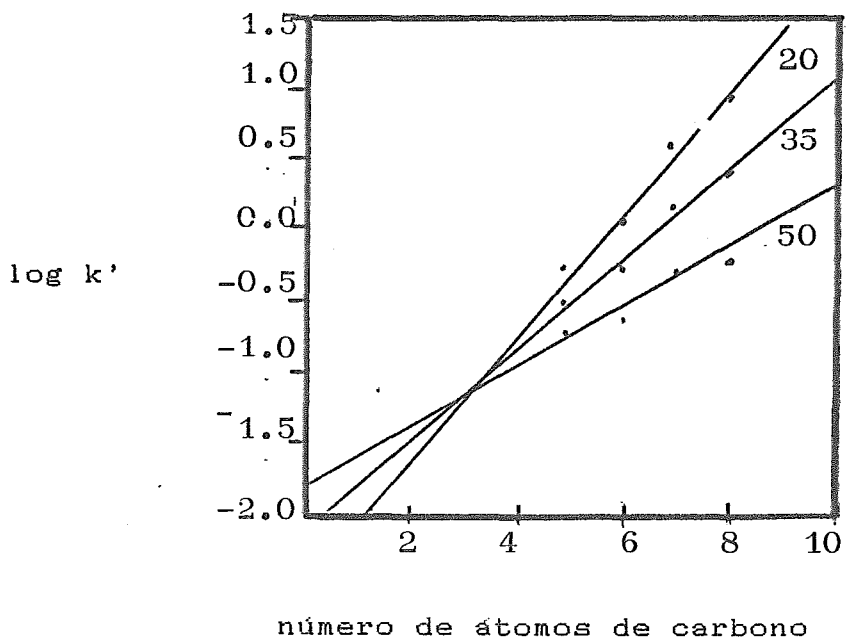


FIGURA 1.1

DEPENDENCIA DEL FACTOR DE CAPACIDAD, k' , DEL NUMERO DE ATOMOS DE CARBONO DE LA CADENA HIDROCARBONADA EN ALQUILSULFONATOS (15).

Los números junto a las rectas indican el % de metanol en el eluyente.

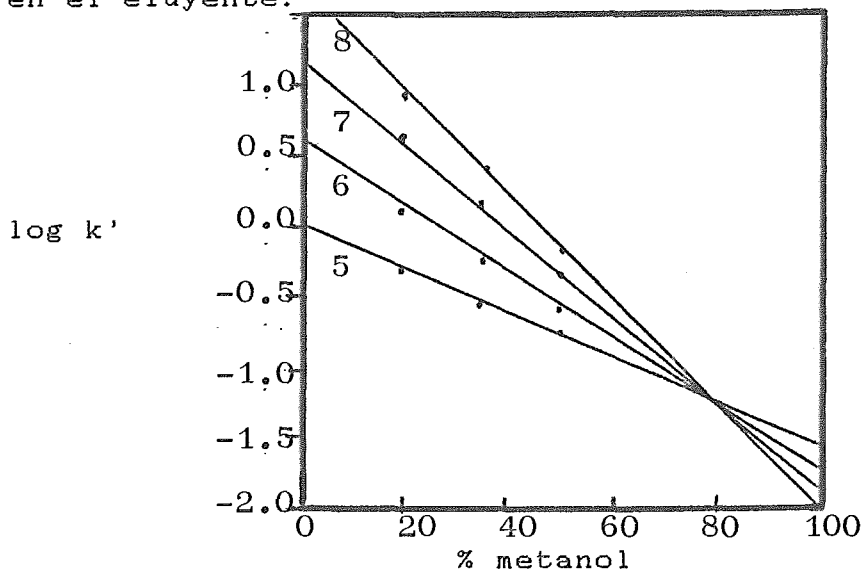


FIGURA 1.2

DEPENDENCIA DEL FACTOR DE CAPACIDAD, k' , DEL % DE METANOL EN EL ELUYENTE (15).

Los números junto a las rectas indican el número de átomos de carbono de las cadenas alquilo de los alquil-sulfonatos de sodio.

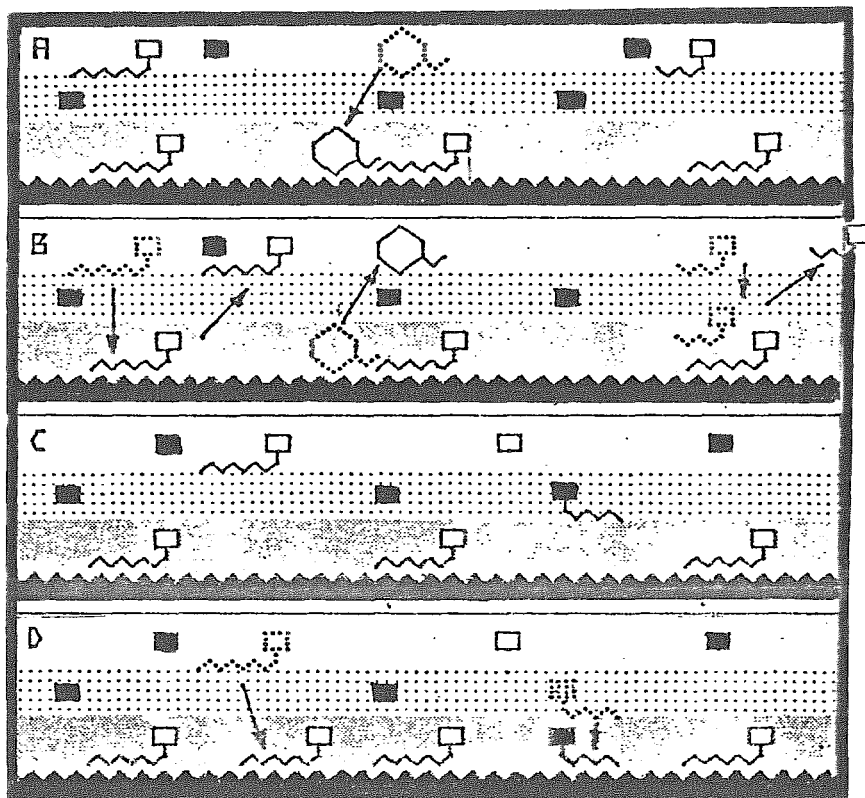





FIGURA 1.3
MECANISMO DE RETENCION PARA LA CROMATOGRAFIA DE
LIQUIDOS A POLARIDAD DE FASES INVERTIDA, CON FORMACION
DE PARES DE IONES PROPUESTO POR BIDLINGMEYER Y
COLABORADORES (15).

La región negra en la parte inferior de cada figura representa la fase estacionaria C 18, la región en gris claro es la primera capa iónica; la región blanca representa el seno del eluyente.


 contraion octil sulfonato.

 soluto aniónico pentil sulfonato.

 soluto catiónico hexilamina protonada.

 catión inorgánico (sodio).

 catión inorgánico (cloruro).

 molécula neutra.

intervienen fuerzas de interacción electrostáticas (no se trata de un intercambio iónico puro), sino también eluofóbicas y adsorbofílicas.

Esquematizaron el mecanismo propuesto como se indica en la figura (1.3), tomando como ejemplo el caso de un contraion aniónico: octil sulfonato, sobre una fase apolar C 18, en presencia de solutos aniónicos: pentil sulfonato y catiónicos: hexilamina protonada; de aniones y cationes inorgánicos y de moléculas neutras.

El contraion se adsorbe sobre la fase estacionaria y crea una primera capa cargada negativamente, por lo que de inmediato aparece una segunda capa de carga positiva, formada por cationes inorgánicos del medio.

Los solutos cargados negativamente experimentan una repulsión electrostática de la primera capa, que los mantiene lejos de la fase estacionaria y son por lo tanto eluidos rápidamente (figura 1.3 A y B a la derecha).

Como el contraion está en un equilibrio dinámico, constantemente se adsorbe y desorbe a la misma velocidad (figura 1.3 a la izquierda), por lo que los solutos de su misma carga pueden competir con él, provocando el desplazamiento neto de algunas de sus moléculas. Las moléculas neutras no experimentan ni atracciones ni repulsiones electrostáticas de la primera y segunda capa, por lo que pueden atravesarlas sin problemas; su retención varía poco con la concentración del contraion (figura 1.3 A y B en el centro).

En la segunda capa, positiva, también se tiene un equilibrio dinámico, de modo que un soluto cargado positivamente como la hexilamina protonada, compite con los cationes inorgánicos por un lugar en dicha capa (figura 1.3 C); si dicho soluto contiene un grupo adsorbofílico, será jalado de la segunda capa a la interfase fase estacionaria-fase móvil, o lo que es lo mismo, empujando por la fase móvil de la segunda capa hacia la interfase. El grupo funcional iónico de dicho soluto quedará sobre la primera capa y la cadena hidrocarbonada sobre la fase estacionaria (figura 1.3 D a la derecha). El efecto neto de este proceso es la neutralización de una carga negativa de la primera capa por la hexilamina protonada y por tanto otra molécula de contraion entra a la misma para restablecer el equilibrio electrostático (figura 1.3 D a la izquierda). El resultado final es que dos iones de carga opuesta han sido adsorbidos en la fase estacionaria (no necesariamente un par de iones).

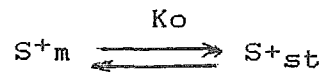
Del modelo propuesto dedujeron que el mecanismo en cromatografía de pares de iones no implica la formación de los mismos en una u otra fase y no está basada en un intercambio iónico clásico; el mecanismo supone un equilibrio dinámico que está afectado por fuerzas electrostáticas, eluófilas, eluóforas, adsorbófilas y adsorbóforas.

"Intercambio Dinámico de Complejos"

Este mecanismo fué propuesto por Melander y Horváth (16), tomando como base, a la vez, el equilibrio de formación de pares de iones en medios acuosos y a la fijación de contraiones que contienen en su molécula una parte hidrófoba importante, sobre las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria.

Estos autores propusieron una expresión para el factor de capacidad de un soluto iónico, en un sistema que contiene un contraion disuelto en una fase móvil acuosa, basada en los siguientes equilibrios:

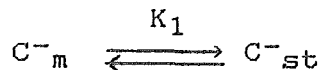
1. Retención del soluto, S^+ , en ausencia de contraion, sobre los sitios de adsorción A de la fase estacionaria:



$$[S^+]_{st} = K_0[S^+]_m[A]_{st} \quad (1.22)$$

Como la cantidad de soluto inyectada es muy pequeña, se puede suponer que los sitios totales de adsorción: $[A]_{st}^* \sim [A]_{st} \text{ libres}$

2. Fijación del contraion, C^- , sobre los sitios de adsorción de la fase estacionaria, según una isoterma de Langmuir:



$$[C^-]_{st} = \frac{K_1[C^-]_m[A]_{st}^*}{1 + K_1[C^-]_m} \quad (1.23)$$

donde:

$[A]_{st}^*$ es la concentración total de sitios de adsorción en la superficie de la fase estacionaria, que corresponde a la máxima concentración de contraion que puede ser fijada.

K_1 es la constante de equilibrio de fijación del contraion.

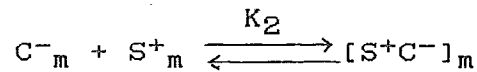
Cuando el contraion está presente en el sistema algunos sitios de adsorción están ocupados por moléculas de contraion y por lo tanto la fijación del soluto, bajo la forma S^+_{st} se ve modificada; se tendrá entonces:

$$[A]_{st}^* = [A]_{st} \text{ libre} + [C^-]_{st}$$

utilizando las ecuaciones 1.22 y 1.23 se tiene:

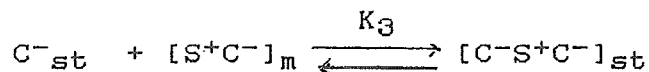
$$[S^+]_{st} = \frac{K_0[S^+]_m[A]^*_{st}}{1 + K_1[C^-]_m} \quad (1.24)$$

3. Formación de pares de iones en la fase móvil, según el equilibrio:



$$K_2 = \frac{[S^+C^-]_m}{[C^-]_m[S^+]_m} \quad (1.25)$$

4. Formación de un complejo ternario a partir del par de iones formado en la fase móvil y el contraion fijado en la fase estacionaria.



$$K_3 = \frac{[C^-S^+C^-]_{st}}{[C^-]_{st}[S^+C^-]_m} \quad (1.26)$$

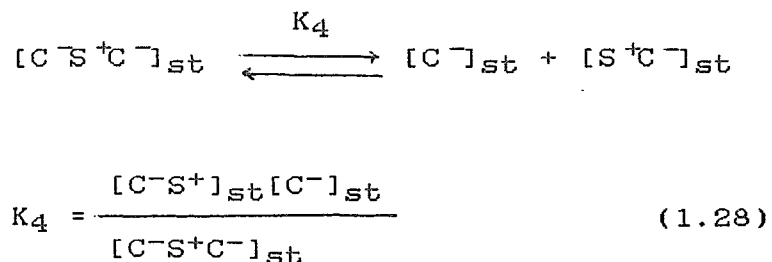
de donde:

$$[C^-S^+C^-]_{st} = K_3[C^-]_{st}[S^+C^-]_m$$

introduciendo las relaciones (1.23) y (1.25) se tiene:

$$[C^-S^+C^-]_{st} = \frac{K_1 K_2 K_3 [S^+]_m [C^-]_m^2 [A]^*_{st}}{1 + K_1 [C^-]_m} \quad (1.27)$$

5. El complejo ternario se disocia en la fase estacionaria según el equilibrio:



por lo que:

$$[S^+C^-]_{st} = K_4 \frac{[C^-S^+C^-]_{st}}{[C^-]_{st}}$$

involucrando las relaciones (1.25) y (1.26) se tiene:

$$[S^+C^-]_{st} = K_2K_3K_4[S^+]_m[C^-]_m \quad (1.29)$$

El factor de capacidad del soluto está dado por:

$$k' = \frac{V_{st}}{V_m} \left[\frac{[S^+]_{st} + [S^+C^-]_{st} + [C^-S^+C^-]_{st}}{[S^+]_m + [S^+C^-]_m} \right]$$

Mediante las relaciones (1.24), (1.25), (1.27) y (1.29), se obtiene la ecuación que relaciona el factor de capacidad del soluto con la concentración de contraion en fase móvil, como única variable.

$$k' = \frac{V_{st}}{V_m} \left[\frac{K_0[A]_{st}^* + K_2K_3K_4[C^-]_m(1+K_1[C^-]_m) + K_1K_2K_3[C^-]_m^2[A]_{st}^*}{[1 + K_1[C^-]_m][1 + K_2[C^-]_m]} \right]$$

(1.30)

Los autores compararon su modelo con las observaciones experimentales presentadas por diversos investigadores en cromatografía de pares de iones sobre fase inversa y encontraron congruencia en cuanto al efecto de fijación del contraion, dependencia de la retención de solutos en la concentración del contraion, el efecto de concentración de sales o de disolvente orgánico en la fase móvil, la superficie hidrófoba y en las cargas del contraion y del soluto.

Sin embargo, el modelo propuesto por estos autores (16) está basado en una isoterma tipo Langmuir para la fijación del contraion, lo cual no concuerda con numerosas publicaciones que informan isotermas de adsorción tipo Freundlich (17)(18)(19)(20)(21).

"Intercambio Iónico-Desolvatación"

Hung y Taylor (22)(23) propusieron un mecanismo mixto que incluye la formación in situ de una matriz de intercambio iónico por adsorción del contraion sobre la fase estacionaria y la posterior desolvatación del soluto sobre la superficie de la fase estacionaria, como lo muestra el siguiente esquema:

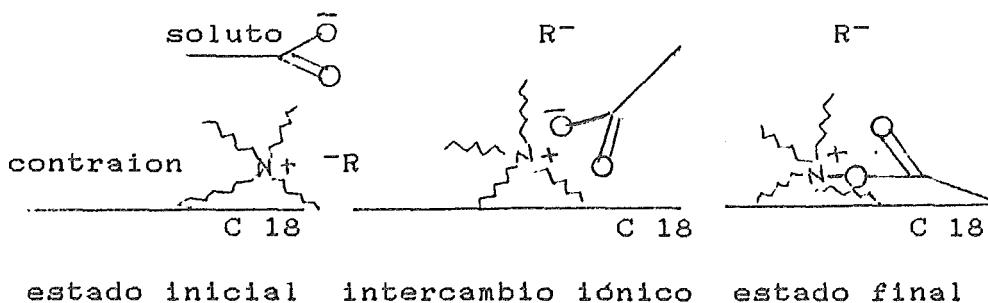


FIGURA 1.4

En ausencia del contraion, la desolvatación del soluto sobre la superficie de la fase estacionaria C 18 es mínima cuando el soluto es pequeño, pero es notable si el soluto tiene una parte hidrófoba importante. El volumen de retención del soluto, considerando este mecanismo es:

$$Vr_1 - Vm = K_1 Ast$$

donde:

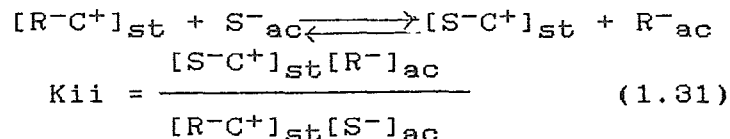
Vr_1 = volumen de retención del soluto.

Vm = volumen muerto.

K_1 = constante de desolvatación.

Ast = superficie de la fase estacionaria accesible a la desolvatación del soluto.

En presencia de contraion en el sistema, la fase estacionaria se transforma en un intercambiador de iones, según el equilibrio:



donde:

$[R^-C^+]$ es un par de iones contraion-coion, adsorbido por la fase estacionaria.

R^- es un co-ion.

S^- es el soluto en la fase móvil.

K_{ii} es la constante de intercambio iónico.

El coeficiente de partición D del soluto, según este mecanismo, está dado por:

$$D = K_{ii} \frac{[R^-C^+]_{st}}{[R^-]_{ac}} \quad (1.32)$$

Este coeficiente toma en consideración solamente efectos electrostáticos y no permite explicar las diferentes retenciones para solutos de la misma carga, por lo que se sugirió que la reacción de intercambio iónico era seguida por una desolvatación del soluto neutralizado sobre la superficie de la fase estacionaria, representada por una constante K_2 , que actúa aumentando el efecto electrostático del intercambio iónico. K_2 es análoga a K_1 ; pero puede variar en magnitud, ya que se refiere al soluto ya neutralizado por el contraion.

La retención debe también ser proporcional a la superficie accesible de la fase estacionaria, por lo que el volumen de retención es:

$$Vr_2 - V_m = K_2 A_{st} \frac{K_{ii} [R^{-C^+}]_{st}}{[R^-]_{ac}} \quad (1.33)$$

y el volumen de retención total, considerando ambos mecanismos es:

$$Vr - V_m = K_1 A_{st} + K_2 A_{st} \frac{K_{ii} [R^{-C^+}]_{st}}{[R^-]_{ac}} \quad (1.34)$$

$$k' = \frac{Vr - V_m}{V_m} = \frac{A_{st}}{V_m} \left[K_1 + K_2 \frac{K_{ii} [R^{-C^+}]_{st}}{[R^-]_{ac}} \right] \quad (1.35)$$

Como la superficie accesible al soluto, A_{st} , está relacionada con la superficie total de la fase estacionaria A^*_{st} :

$$A_{st} = A^*_{st} - [R^{-C^+}]_{st} A_c \quad (1.36)$$

donde:

A_c es el área por mol ocupada por el contraion.

Sustituyendo y reorganizando términos de tiene:

$$k' = \frac{1}{V_m} \left[A_{st} K_1 - K_1 [R^{-C^+}]_{st} A_c + K_2 K_{ii} A^*_{st} \frac{[R^{-C^+}]_{st}}{[R^-]_{ac}} - K_2 K_{ii} A_c \frac{[R^{-C^+}]^2_{st}}{[R^-]_{ac}} \right] \quad (1.37)$$

Esta ecuación relaciona el factor de capacidad del soluto con la concentración de contraion en la fase estacionaria. Al ser una función cuadrática de $[R^{-C^+}]_{st}$ presenta un máximo, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos experimentalmente por estos autores y por algunos otros investigadores, trabajando a elevadas concentraciones de contraion.

Se observó muy buena concordancia entre la forma de las curvas experimentales y la de las calculadas, lo que refuerza la validez del modelo propuesto; sin embargo, en el caso de solutos neutros, el modelo predice una variación lineal de k' en función de $[R^{-}C^{+}]_{st}$.

$$k' = \frac{K_1}{V_m} (A_{st} - [R^{-}C^{+}]_{st}A_c) \quad (1.38)$$

mientras que los resultados experimentales muestran un comportamiento hiperbólico que los autores atribuyeron a probables efectos de exclusión sobre el soluto neutro, causados por los contraiones adsorbidos, que no se consideran en el modelo.

Los autores de este modelo trabajaron sin modificador orgánico en el eluyente, lo que hace difícil alcanzar el equilibrio tratándose de una columna apolar, con una fase móvil acuosa. Por otra parte, la variación simultánea de 2 parámetros: $[R^{-}C^{+}]_{st}$ y $[R^{-}]_{ac}$, dificulta la interpretación de los resultados experimentales y el ajuste de una curva complicada como lo es la de la ecuación (1.37), por lo que no constituye una evidencia irrefutable del mecanismo propuesto.

ANTECEDENTES DIRECTOS DE ESTE TRABAJO.

Se ha realizado anteriormente un trabajo similar al que se propone dentro de esta investigación (19), en el cual la autora estudió el comportamiento de contraiones aniónicos del tipo alquil sulfatos y alquil sulfonatos, sobre fases apolares químicamente unidas (C 8) y los mecanismos de retención de los solutos.

En este trabajo se investigó la influencia de los principales parámetros que rigen la fijación del contraion sobre la fase estacionaria: concentración de disolvente orgánico en la fase móvil, concentración de contraion en la misma y la longitud de la cadena hidrocarbonada del contraion.

Por combinación de los parámetros mencionados anteriormente, se estableció una ecuación que permite

calcular para diversas condiciones de composición del eluyente, la cantidad de contraion que se puede fijar sobre la fase estacionaria y predecir de este modo el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de la columna con la fase móvil que se va a emplear.

El modelo propuesto, para alquil sulfonatos, es de la forma:

$$\log |C|_{st}^+ = -0.44 - 1.38 |CH_3CN| - 0.11 N_c + 0.84 \log |C|_m^- + 1.63 |CH_3CN| \log |C|_m^- - 0.05 N_c \log |C|_m^- \quad (1.39)$$

El estudio de la retención de los solutos cationicos en función de la concentración de contraion aniónico fijado sobre la fase estacionaria demostró que existe un mecanismo de intercambio iónico, que gobierna la retención de los solutos.

Debido a ciertas disgresiones observadas en este estudio, como son los resultados del análisis de la influencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada del contraion sobre la retención de los solutos, principalmente cuando se trabaja con un contraion fuertemente hidrofóbico y a bajas concentraciones de disolvente organico en el eluyente, se supone la existencia de algún otro fenómeno paralelo al intercambio iónico, que posiblemente se refiera a la fijación suplementaria de un par de iones soluto-contraion, formado en la interfase.

Este trabajo pretende complementar los estudios realizados anteriormente, empleando contraiones catiónicos de estructura globular, que podrían presentar un comportamiento diferente al presentado por los contraiones aniónicos de cadena lineal; investigar la influencia de los parámetros mas importantes ya ennumerados y hacer las comparaciones pertinentes con estudios previos.

En este trabajo se incluirá también un estudio del efecto de la concentración de diferentes sales añadidas al eluyente, en presencia de contraiones catiónicos, ya que no se dispone de un estudio analítico del mismo.

CAPITULO II

CONDICIONES EXPERIMENTALES

1. INSTRUMENTACION, MATERIALES Y REACTIVOS:

EQUIPO:

El equipo utilizado en los estudios básicos consistió en un cromatógrafo de líquidos marca Perkin Elmer, serie 3B, con un inyector Rheodyne modelo 7105. En todos los experimentos se controló la temperatura a 40°C mediante un horno Perkin Elmer modelo LC 100.

Como sistemas de detección se utilizaron:

- un detector UV-Visible de longitud de onda variable, marca Perkin Elmer, modelo LC-75.
- un detector de índice de refracción marca Waters, modelo R 401.

El registro de la señal enviada por los detectores se hizo mediante un registrador lineal marca Perkin Elmer, modelo 023.

Las fases móviles utilizadas fueron desgasificadas mediante ultrasonido (baño ultrasónico de Branson Instruments, modelo D-50).

La separación de sulfas fué llevada a cabo en un cromatógrafo Varian, modelo 5020 B, equipado con un bloque de calentamiento para el control de temperatura y un detector UV-Visible de longitud de onda variable, modelo UV-100 y un inyector Rheodyne modelo 920 - 3591.

COLUMNAS.

Las columnas empleadas fueron empacadas en el laboratorio por vía húmeda, según se indica en técnicas ya publicadas (24). Se utilizaron columnas de acero inoxidable (tubo Lichroma con paredes interiores

pulidas), de Alltech. Como fase estacionaria se empleo Supelcosil LC 7 (Supelco). Esta es una fase C 18 unida químicamente a sílice microparticulada de diámetro nominal de 5 μm y de superficie específica de 250 m^2/g (dato del proveedor). Por análisis elemental se determinó un contenido de 13.6 % de carbono, en la fase, que corresponde a 0.63 mmol g^{-1} de cadenas C-18 unidas a la sílice.

La cantidad de material de empaque empleado para las columnas fué de 1.24 g \pm 2% (análisis de 5 columnas).

El estudio de sales se realizó en columnas con las mismas dimensiones, empacadas con Rsil HL RP 18 (Alltech), con contenido de carbono = 16 % (dato del proveedor) y diámetro de partícula 5 μm . El contenido de empaque fué de 1.45 g.

La separaciones de las sulfas se hicieron en una columna preempacada Lichrosorb RP 8, 10 μm , de 25 cm de largo por 4.6 mm de sección (Chromapon Inc.).

El volumen muerto de la columna se determinó para cada composición de la fase móvil, en ausencia de contraion, mediante inyección de una solución de nitrato de sodio, a una velocidad de flujo baja (0.2 ml/min). Se observó que el volumen muerto variaba significativamente al cambiar la proporción de acetonitrilo en el eluyente, como se muestra en la tabla 2.1. La variación de otros parámetros de la fase móvil, como el contenido o tipo de sales presentes, no tiene efecto significativo sobre el volumen muerto.

TABLA 2.1

VARIACION DEL VOLUMEN MUERTO DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO AL CAMBIAR LA PROPORCION DE ACETONITRILO EN EL ELUYENTE.

CONDICIONES:

Columna de 15 cm x 4.6 mm d.i., empacada con Supelcosil LC 7 5 μm .

Fase móvil: agua-acetonitrilo, pH=7; NH_4AcO 0.25 M. T=40°C.

% de acetonitrilo	Volumen muerto (ml).
40	1.98
35	2.04
30	2.14
25	2.16
20	2.22
10	2.35

REACTIVOS:

El acetonitrilo y el metanol de grado analítico usados fueron de Merck; el agua fué destilada y degasificada exhaustivamente mediante vacío. Los bromuros de tetraetilamonio (TEA), tetrapropilamonio (TPA), tetrabutilamonio (TBA) y tetrahexilamonio (THA), fueron de Eastman Chemicals.

Los reactivos añadidos a la fase móvil fueron de grado analítico:

Acetato de amonio (Baker).
Sulfato de sodio (Baker).
Fosfato monobásico de sodio (Merck).
Fosfato dibásico de sodio (Merck).
Acido cítrico (Merck).
Acido crotónico (Eastman Chemicals).
Hidróxido de sodio (Reactivos Monterrey).
Las sulfas fueron muestras proporcionadas por el Laboratorio Central de la Dirección General de Aduanas.
Los compuestos grado analítico empleados como solutos de prueba fueron los siguientes:
Acido orto-toluico (Eastman Chemicals).
Acido para-toluico (Eastman Chemicals).
Acido sórbico (Eastman Chemicals).
Acido para-hidroxibenzoico (Eastman Chemicals).

PREPARACION DE FASES MOVILES:

CONTRAIONES:

Se prepararon soluciones "concentradas" de cada contraion $10^{-2}M$, pesando la cantidad requerida y aforando con agua destilada y degasificada. En el caso de THA, que es poco soluble, la solución "concentrada" fué $10^{-3}M$.

SALES Y REGULADORES DE pH.

Se prepararon soluciones concentradas de sales y amortiguadores ($1 M$ o $10^{-1}M$), disolviendo en agua el peso adecuado de la sal (sulfato de sodio o acetato de amonio), de la mezcla de sales (fosfatos mono y dibásicos de sodio), o bien de los ácidos (cítrico o crotónico); ajustando el pH de la disolución con solución de hidróxido de sodio y aforando con agua bidestilada y degasificada.

Las soluciones de acetato de amonio, en las que se requería mayor precisión respecto a su concentración, fueron valoradas por el Método del Formaldehído (25).

FASES MOVILES.

Las fases móviles son mezclas de agua y acetonitrilo en proporciones variables que contienen además sales, amortiguadores y el contraion.

Las fases móviles para las distintas experiencias se prepararon en matraces volumétricos, justamente antes de usarse, tomando las alícuotas correspondientes de las soluciones "concentradas" de contraiones y de sales, previamente preparadas en volúmenes mayores, añadiendo el volumen requerido de acetonitrilo y aforando con agua destilada y desgasificada. Las fases móviles para preequilibrar la columna se prepararon de manera semejante, pero sin el contraion.

Todas las fases móviles fueron desgasificadas por ultrasonido, antes de su uso.

SOLUTOS.

Se prepararon soluciones acuosas 10^{-3} M de los solutos:

ácido orto-toluico,
ácido para-toluico,
ácido sórbico y

5×10^{-4} M de ácido para-hidroxibenzoico; éste último se usó más diluido para ajustar el tamaño de los picos.

2. SELECCION DE SOLUTOS Y DE CONTRAIONES PARA EL ESTUDIO DESARROLLADO.

Se seleccionaron como contraiones para el desarrollo de este trabajo los iones tetralquilamonio, debido por una parte, a que en la literatura no se encuentran estudios sistemáticos de cromatografía de pares de iones empleando estos contraiones, que por su estructura globular pueden presentar comportamientos diferentes a los de otros iones más estudiados, como son los alquil sulfatos (31)(32), la octilamina ionizada (33)(37) y la cetrimida (34)(35)(36)(22). Por otra parte, el estudio de la cromatografía de pares de iones con contraiones catiónicos globulares complementa un estudio realizado anteriormente (27) con alquil sulfatos y alquil sulfonatos.

Los iones tetralquilamonio presentan además las siguientes ventajas:

-son compuestos estables en las condiciones de trabajo

usadas en cromatografía.

-Se encuentran totalmente ionizados en las mezclas agua-acetonitrilo, a cualquier pH del medio.

-Son compatibles con el sistema de detección más usado en cromatografía líquida (UV-visible).

-Se pueden adquirir fácilmente en el mercado desde el tetralquilamonio hasta el tetraheptilamonio (excepto el tetrapentilamonio), lo que permite estudiar el efecto de la cadena hidrocarbonada del contraion.

Como solutos de prueba para estos estudios se buscaron compuestos con las siguientes características:

-que sean fácilmente detectables con el sistema de detección empleado, (detector de absorción de luz ultravioleta a 254 nm)

-que no se descompongan en las condiciones de trabajo

-que se encuentren totalmente ionizados a un pH < 8.

En efecto, en medios alcalinos la sílice que contiene la fase estacionaria es atacada por los grupos OH⁻.

Los solutos finalmente escogidos fueron ácidos orgánicos del tipo HA/A⁻, que en el pH de operación (7), se encuentren totalmente bajo la forma A⁻, (carga contraria al contraion). En la tabla 2.2 se enumeran estos solutos y algunas de sus características.

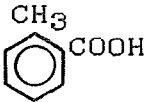
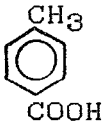
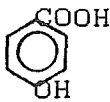
3. SELECCION DE LOS PARAMETROS CROMATOGRAFICOS A ESTUDIAR Y SU INTERVALO DE VARIACION.

DISOLVENTE ORGANICO.

Los eluyentes usados con fases no polares en cromatografía de pares de iones son mezclas de agua y disolventes orgánicos, con sales, amortiguadores y el contraion. Mientras más baja es la polaridad del disolvente orgánico es mayor su fuerza eluyente. Entre los disolventes orgánicos más usados en este tipo de cromatografía se encuentran el acetonitrilo y el metanol, porque tienen relativamente baja viscosidad,

TABLA 2.2

FORMULAS, pKas Y SOLUBILIDADES DE LOS ACIDOS CARBOXILICOS EMPLEADOS COMO SOLUTOS.

	FORMULA	pKa(1)	SOLUBILIDAD EN AGUA(2).
Acido orto-toluico		3.9	0.12
Acido para-toluico		4.3	0.03
Acido p-OH benzoico		4.6	0.65
Acido sórbico	$\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$	4.76	0.14

(1) pKa en agua a fuerza iónica nula. T=25 °C (49)

(2) Solubilidades en g/100 g de agua a 20 °C. (50)

no interfieren con el sistema de detección usual (UV-visible), son fácilmente accesibles y disponibles con un alto grado de pureza. Nosotros hemos escogido el acetonitrilo para poder hacer comparaciones y tener una base de referencia de acuerdo al estudio previo a este trabajo, desarrollado con contraiones aniónicos (27).

La tabla 2.3 muestra las propiedades físicas comparativas entre el agua y el acetonitrilo.

TABLA 2.3

PROPIEDADES DE LOS DISOLVENTES AGUA Y ACETONITRILLO (26).

	CH ₃ CN	H ₂ O
Peso molecular (g/mol)	41	18
Punto de ebullición °C	82	100
Índice de refracción $n(25^{\circ}\text{C})$	1.342	1.333
λ de no interferencia UV (nm) _{25°C}	190	170
Densidad a 20°C (g cm ⁻³)	0.783	0.998
Viscosidad a 20°C (cP)	0.358	1.0
Constante dieléctrica ϵ	38.8	78.5
Momento dipolo μ Debyes	3.37	1.84
Tensión superficial (din cm ⁻¹)	29	73
Parámetro solubilidad (38) δ (cal ^{1/2} cm ^{-3/2}).	13.14	25.52

La polaridad y la tensión superficial son muy grandes en el agua, por lo que el agua es el eluyente mas débil en cromatografía de fase inversa. Las mezclas de agua-acetonitrilo producen fases móviles de fuerzas eluyentes intermedias.

La figura 2.1 muestra los valores de la viscosidad, tensión superficial y constante dieléctrica en estas mezclas (26).

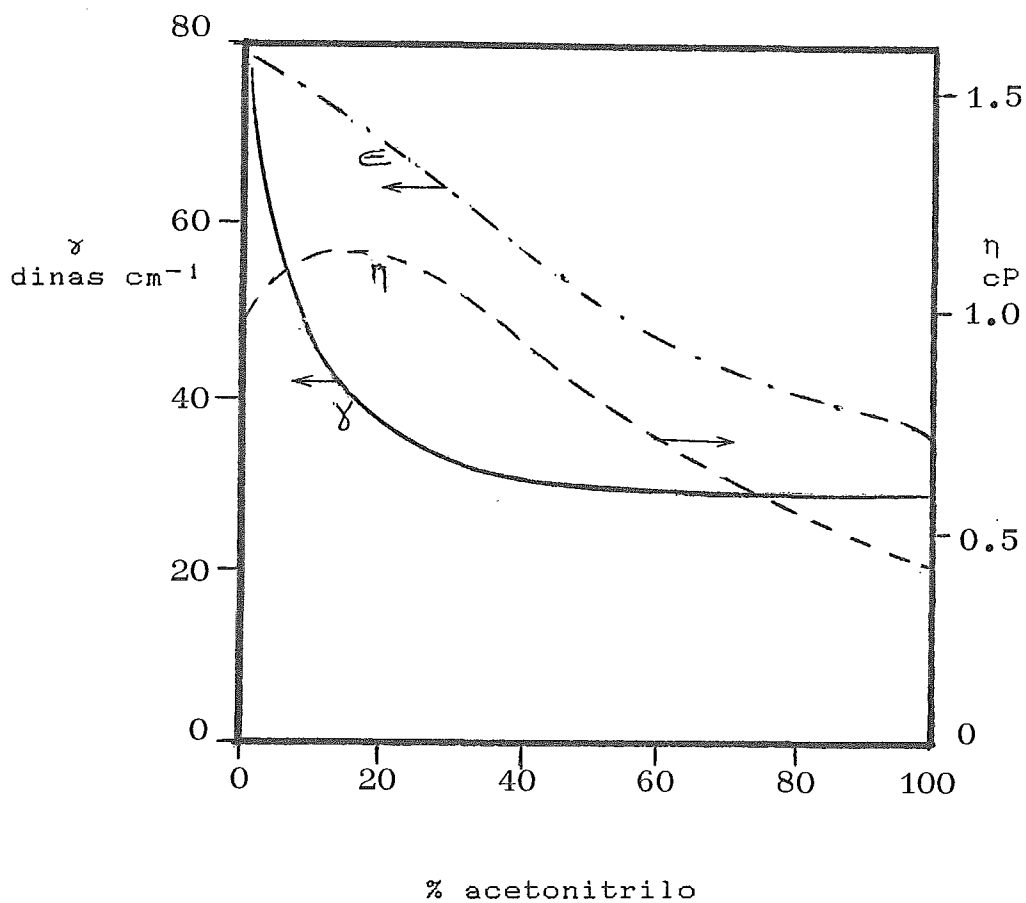


FIGURA 2.1

VARIACION DE LA TENSION SUPERFICIAL γ , DE LA CONSTANTE DIELECTRICA ϵ Y DE LA VISCOSIDAD η DE MEZCLAS AGUA-ACETONITRILLO A 25 °C (26).

Al aumentar la concentración de acetonitrilo se observa una disminución en el valor de esas propiedades, sin embargo la viscosidad aumenta hasta alcanzar un máximo en 10% de acetonitrilo y luego decrece.

En ensayos preliminares se observó que a concentraciones de acetonitrilo en el eluyente superiores a 40% , la retención de los solutos es muy débil y el efecto del contraion es prácticamente nulo; por lo cual se decidió tomar este valor como límite superior en el estudio de la proporción de acetonitrilo en fase móvil. Por otra parte, como se detalla más adelante, a concentraciones de acetonitrilo inferiores a 10%, el contraion se fija muy fuertemente sobre la fase estacionaria y provoca una degradación irreversible de la columna, lo cual se manifiesta por el desdoblamiento de picos y por un considerable ensanchamiento de bandas.

pH

El pH del medio es un parámetro importante ya que determina el grado de ionización de las especies presentes en la fase móvil; se fijó en 7 para asegurar una completa ionización de las mismas y para proteger a la fase estacionaria de hidrólisis observadas a $\text{pH} > 8$ (26).

CONCENTRACION DEL CONTRAION.

El intervalo de concentraciones bajo las cuales se determinó efectuar este estudio se fijó, en principio, de acuerdo a las solubilidades que mostraron los contraiones y además, tomando en cuenta las limitaciones prácticas e instrumentales detectadas en la fase de ensayos preliminares.

El THA presentó una solubilidad muy baja en las fases móviles, por lo que este contraion sólo se trabajó a concentración 10^{-4} M. El TBA, TPA y TEA mostraron una mayor solubilidad, por lo que pudieron trabajarse en un intervalo más amplio de concentraciones.

El límite inferior del intervalo se fijó en 10^{-4} M. , ya que a menores concentraciones es difícil observar el frente de migración del contraion con el detector de índice de refracción. El límite superior se estableció en 4×10^{-2} M. , para evitar la degradación de la columna que se presenta a concentraciones más elevadas, con los contraiones más hidrófobos.

TEMPERATURA.

El efecto de la temperatura sobre sistemas de distribución con formación de pares de iones ha sido estudiado por Terweij-Groeh et al (28) y Kraak et al (29). Al aumentar la temperatura disminuye la fijación del contraion sobre la fase estacionaria y la constante de intercambio iónico, disminuyendo por tanto la retención de los solutos; sin embargo, estos efectos son relativamente pequeños en comparación con los provocados por la variación de otros parámetros, por lo cual se decidió trabajar a temperatura constante. Escogimos 40 °C como temperatura de operación durante todo este trabajo para disminuir la viscosidad del eluyente, tener una menor caída de presión en el sistema y obtener mayor eficiencia.

LONGITUD DE LA CADENA HIDROCARBONADA DEL CONTRAION.

Al aumentar la hidrofobicidad del contraion aumenta su fijación sobre la fase estacionaria y también la retención de los solutos; sin embargo, de acuerdo con las pruebas preliminares de solubilidad en el eluyente seleccionado, sólo es posible trabajar con contraiones de 8 a 24 átomos de carbono (el bromuro de tetraheptilamonio fue insoluble en las condiciones de trabajo). Por otra parte, con el tetraetilamonio no se percibe un efecto significativo sobre la retención de los solutos.

LONGITUD DE LAS CADENAS HIDROCARBONADAS DE LA FASE ESTACIONARIA.

De acuerdo con Horváth et al (30), la retención de los contraiones y de los solutos en la fase estacionaria es mayor al aumentar el número de cadenas hidrocarbonadas y la longitud de las mismas (mayor hidrofobicidad de la fase). En este estudio, por cuestiones de disponibilidad, se trabajó con fases químicamente unidas con cadenas de 18 átomos de carbono.

CONCENTRACION Y TIPO DE SALES DISUELTAS EN FASE MOVIL.

Algunos investigadores han demostrado (39) que a mayor concentración de sales disueltas en la fase móvil, menor es la retención de los solutos; sin embargo, los resultados obtenidos no se han analizado suficientemente para poder esclarecer el mecanismo de retención de los solutos. En este trabajo se decidió efectuar un estudio de retención de los solutos haciendo variar la concentración de sales en el intervalo de 0.05 M a 0.5 M, lo cual corresponde a las condiciones usuales de trabajo en cromatografía de pares de iones. Por otra parte, se decidió estudiar el efecto que provocan sobre la retención de los solutos diferentes sales disueltas en la fase móvil, manteniendo constante la concentración total de las mismas.

En el caso en el cual los solutos sean aniónicos, es el anión de la sal el que compete con el soluto. Se seleccionaron como aniones los iones: acetato, fosfato, crotonato, citrato y sulfato.

En conclusión; los dominios de variación de los parámetros por estudiar y las condiciones de operación determinadas son:

Concentración de acetonitrilo en el eluyente: de 10 a 40 % v/v.

Longitud de la cadena hidrocarbonada del contraion: de 8 a 24 átomos de carbono.

Concentración del contraion: de 10^{-2} a 10^{-4} M.

Concentración de sales (acetato de amonio): de 0.05 a 0.5 M.

Aniones de las sales: fosfato, citrato, crotonato, sulfato y acetato.

pH = 7

Temperatura: 40 °C.

CAPITULO III

ESTUDIO DE LA FIJACION DE IONES TETRALQUILAMONIO SOBRE FASES APOLARES QUIMICAMENTE UNIDAS.

La reproducibilidad de los métodos empleados en cromatografía líquida de alta eficiencia con formación de pares de iones depende de que se trabaje con una columna perfectamente equilibrada; sin embargo, la cantidad de contraion fijado por la fase estacionaria, cuando la columna alcanza el estado de equilibrio, depende directamente de la composición de la fase móvil; por lo anterior, se ha considerado indispensable, antes de estudiar la retención de los solutos, hacer un estudio de la influencia de los principales parámetros de composición de la fase móvil sobre la adsorción de los iones tetralquilamonio. Los parámetros que se estudiaron fueron los siguientes:

- Concentración de sales y amortiguadores.
- Uso de diferentes sales.
- Proporción de acetonitrilo en el eluyente.
- Concentración de contraion en la fase móvil.
- Longitud de la cadena hidrocarbonada del contraion.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

La cantidad de contraion fijado en la fase estacionaria se determinó por detección refractométrica del frente de migración del contraion a la salida de la columna. En efecto, durante el proceso de equilibrio de

la columna, el contraion disuelto en la fase móvil es adsorbido por la fase estacionaria dando lugar a un frente móvil de contraion que migra a lo largo de la columna y es detectado por un refractómetro diferencial colocado a la salida de la misma. El procedimiento experimental empleado es el siguiente:

La columna previamente se equilibra con la fase móvil seleccionada. Con esta misma fase se llena la celda de referencia del refractómetro. Posteriormente se hace pasar por la columna el eluyente que contiene al contraion y la salida de la columna se conecta directamente a la celda de medida del refractómetro; en este preciso momento se empiezan a registrar las variaciones en el índice de refracción en líquido que sale de la columna.

Durante la primera fase del proceso todo el contraion es adsorbido por la fase estacionaria por lo que el índice de refracción se mantiene constante, salvo algunas perturbaciones que se producen al finalizar la elución del volumen muerto de la columna. Después de un cierto tiempo se observa un cambio, en forma de frente, en el índice de refracción (fig 3.1). Este frente es tanto más grande cuanto mayor es la concentración del contraion disuelto en la fase móvil; su detección indica el momento en que la columna ha quedado equilibrada con la fase móvil y consecuentemente el contraion empieza a aparecer en el efluente.

Para calcular la cantidad de contraion fijado por la fase estacionaria se mide el tiempo transcurrido desde el inicio del proceso hasta el punto de inflexión de la curva, correspondiente al frente del contraion. Este frente es muy agudo, lo que parece indicar que la cinética de fijación del contraion es rápida.

La concentración de contraion en fase estacionaria se determina mediante la siguiente fórmula:

$$[C^+]_{st} = \frac{(V-V_0)[C^+]_m}{W_{st}} \quad (3.1)$$

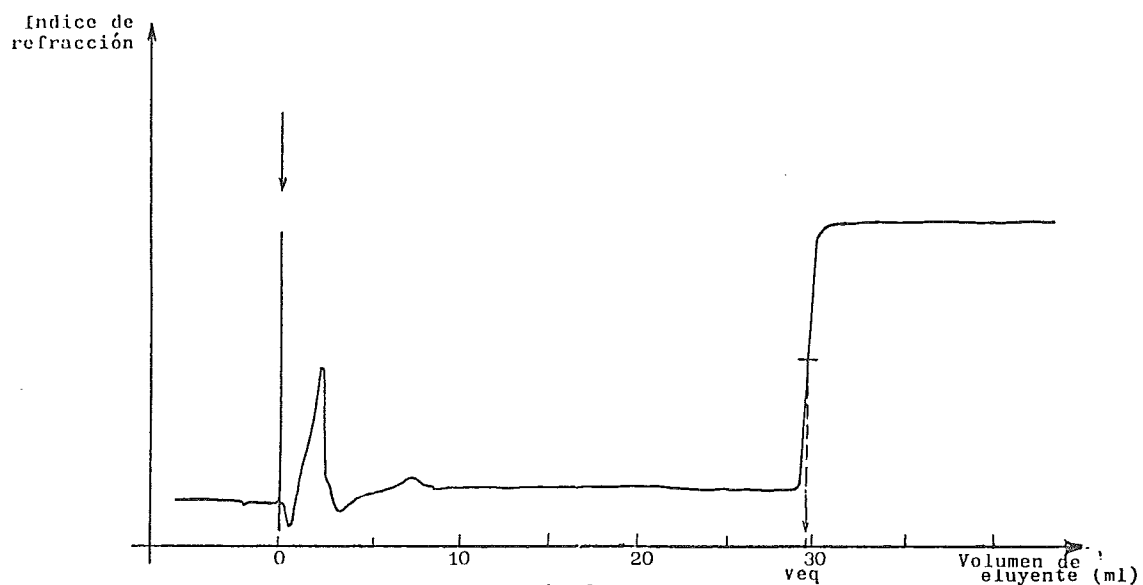


FIGURA 3.1

DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE CONTRAION FIJADO EN UNA COLUMNA.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d. i.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 5 μ m.

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); Φ_{org} = 0.2;
acetato de amonio 0.1 m.

TBA $2 \times 10^{-3}M$.

T = 40°C.

F = 1 ml min⁻¹

V_{o.i.r.} = 1.89 ml.

Detector: refractómetro diferencial.

donde:

V= volumen de fase móvil eluido de la columna hasta la aparición del frente de migración del contraion (ml).

V_o= volumen muerto (ml).

[C⁺]_m= concentración de contraion en la fase móvil (mnoles ml⁻¹)

W_{st}= peso de la fase estacionaria (g).

[C⁺]_{st}= concentración de contraion en la fase estacionaria (mnoles g⁻¹)

En la tabla (3.1) se muestran los resultados experimentales de los estudios de fijación de tetrabutylamonio bajo diversas condiciones de composición del eluyente.

En la tabla (3.2) se muestran los resultados obtenidos con otros contraiones.

RESULTADOS Y DISCUSION.

a) Determinación de la isoterma de adsorción del contraion.

La figura 3.2 muestra la isoterma de adsorción de los contraiones TBA y TPA a 40 °C, obtenidos a partir de las tablas 3.1 y 3.2. Su forma linealizada aparece en la figura 7. Ambas curvas corresponden a isotermás de adsorción tipo Freundlich:

$$[C^+]_{st} = h [C^+]_m^g$$

que se pueden linearizar bajo la forma:

$$\log[C^+]_{st} = f + g \log [C^+]_m \quad (3.2)$$

TABLA 3.1

FIJACION DE TBA EN LA COLUMNA BAJO DIFERENTES
CONDICIONES DE COMPOSICION DEL ELUYENTE.

$ S_{all} _m$	Φ_{org}	$ C^+ _m$	$\log C^+ _m$	$ C^+ _{st}$	$\log C^+ _{st}$	F.st	
0.25	0.4	10^{-4}	-4.0	1.35×10^{-3}	-2.869	1	
		6×10^{-4}	-3.22	7.22×10^{-3}	-2.141		
		4×10^{-3}	-2.39	2.33×10^{-2}	-1.632		
	0.35	6×10^{-4}	-3.22	9.10×10^{-3}	-2.041		
		6×10^{-4}	-3.22	1.25×10^{-2}	-1.904		
	0.30	4×10^{-3}	-2.39	3.72×10^{-2}	-1.430		
		6×10^{-4}	-3.22	1.79×10^{-2}	-1.747		
	0.25	0.20	6×10^{-4}	-3.22	2.52×10^{-2}		-1.598
		0.15	6×10^{-4}	-3.22	3.47×10^{-2}		-1.460
	0.10	0.10	10^{-4}	-4.0	2.07×10^{-2}		-1.684
			4×10^{-4}	-3.39	3.70×10^{-2}		-1.432
			6×10^{-4}	-3.22	4.16×10^{-2}		-1.381
1.03×10^{-3}			-3.0	6.47×10^{-2}	-1.189		
2×10^{-3}			-2.69	8.11×10^{-2}	-1.091		
4×10^{-3}			-2.39	9.65×10^{-2}	-1.015		
# 10^{-2}			-2.0	1.25×10^{-1}	-0.904		
# 4×10^{-2}	-1.39	1.76×10^{-1}	-0.755				
0.05 0.1 0.2 0.3	0.20	2×10^{-3}	-2.7	3.05×10^{-2}	-1.516		
3.36×10^{-2}				-1.473			
3.51×10^{-2}				-1.454			
3.66×10^{-2}				-1.436			
0.05 0.1 0.3 0.4 0.5	0.10	2×10^{-3}	-2.7	5.48×10^{-2}	-1.261		
5.91×10^{-2}				-1.228			
6.51×10^{-2}				-1.186			
6.77×10^{-2}				-1.170			
6.84×10^{-2}				-1.164			
0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5	0.20	2×10^{-3}	-2.7	3.83×10^{-2}	-1.416		
4.45×10^{-2}				-1.351			
4.86×10^{-2}				-1.313			
5.06×10^{-2}				-1.295			
5.24×10^{-2}				-1.280			
5.52×10^{-2}				-1.257			

En estos puntos se produjo degradación de la columna.

TABLA 3.1

Condiciones:

Columna (15 cm x 4.6 mm D.I.)

Fase estacionaria:

1 Supelcosil LC 7 5 μ

2 Rsil C18 HL, 5 μ

Fase móvil: acetonitrilo: agua (pH=7); acetato de amonio; TBA.

Flujo: 1 ml min⁻¹

Temperatura: 40°C

Detector: refractómetro diferencial.

TABLA 3.2

FIJACION DE DIVERSOS CONTRAIONES EN LA COLUMNA.

Contraion	Φ_{org}	$ C^+ _m$	$\log C^+ _m$	$ C^+ _{st}$	$\log C^+ _{st}$
	0.4(1)	10 ⁻⁴	-4.0	3.0x10 ⁻⁴	-3.512
	0.3(1)	2x10 ⁻³	-2.69	7.22x10 ⁻³	-2.141
		4x10 ⁻³	-2.39	1.19x10 ⁻²	-1.926
TPA		10 ⁻⁴	-4.0	3.48x10 ⁻³	-2.458
		4x10 ⁻⁴	-3.39	6.74x10 ⁻³	-2.171
	0.1(2)	10 ⁻³	-3.0	1.11x10 ⁻²	-1.956
		4x10 ⁻³	-2.39	2.90x10 ⁻²	-1.538
		10 ⁻²	-2.0	5.10x10 ⁻²	-1.293
		4x10 ⁻²	-1.39	9.69x10 ⁻²	-1.013
THA	0.4(1)	10 ⁻⁴	-4.0	1.71x10 ⁻²	-1.767
TEA	0.1(1)	10 ⁻⁴	-4.0	6.39x10 ⁻⁴	-3.195

Condiciones:

Columna (15 cm x 4.6 mm D.I)

Fase estacionaria: Supelcosil LC 7 5 μ m

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH=7); acetato de amonio(1) 0.25 M, (2) 0.31 M; ion tetralquilamonio.

Flujo: 1 ml min⁻¹.

Temperatura: 40°C.

Detector: refractómetro diferencial.

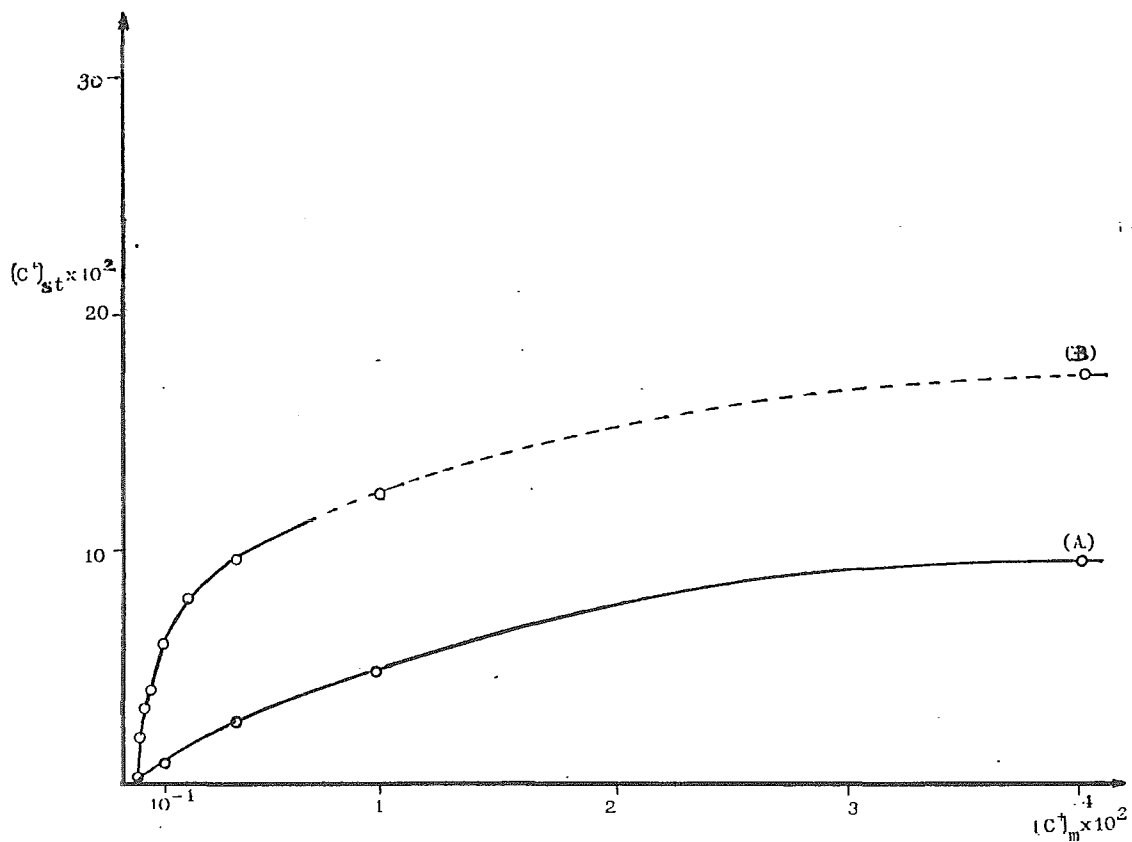


FIGURA 3.2

ISOTERMAS DE ADSORCION DE IONES TETRALQUILAMONIO.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d.i.

Fase estacionaria:

Supelcosil LC-7 RP18, 5 μ m.

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); $\Phi_{org} = 0.1$;

contraion: (A) TPA; NH_4AcO 0.31 M.

(B) TBA; NH_4AcO 0.25 M.

T = 40°C

F = 1 ml min⁻¹

---- condiciones que provocan degradación de la columna.

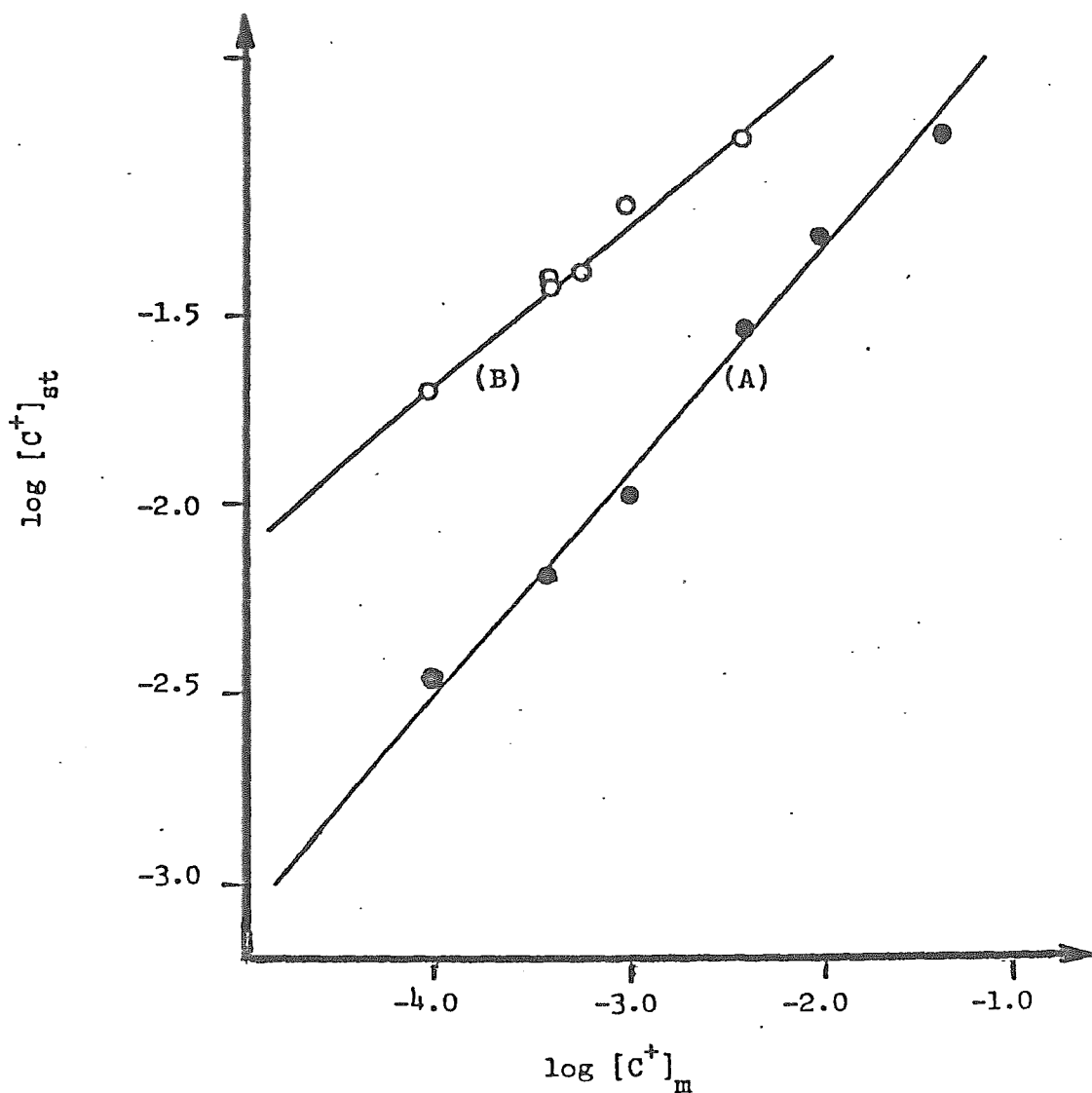


FIGURA 3.3

ISOTERMAS DE ADSORCION DE IONES TETRALQUILAMONIO.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d. i.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 5 μ m.

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); $\Phi_{org} = 0.1$;
contraion:

(A) TPA y acetato de amonio 0.31 M.

(B) TBA y acetato de amonio 0.25 M.

T = 40 $^{\circ}$ C

F = 1 ml min $^{-1}$

donde:

h, f y g son constantes cuyo valor depende de las condiciones experimentales.

$[C^+]_{st}$ es la concentración de contraion en fase estacionaria (mmoles g^{-1}).

$[C^+]_m$ es la concentración de contraion en fase móvil (mmoles l^{-1}).

Las ecuaciones de regresión correspondientes a la isoterma de Freundlich linearizada para cada uno de los contraiones son las siguientes:

TPA

$$\log [C^+]_{st} = -0.184 + 0.577 \log [C^+]_m \quad r = 0.998 \quad (3.3)$$

TBA

$$\log [C^+]_{st} = 0.082 + 0.443 \log [C^+]_m \quad r = 0.986 \quad (3.4)$$

(Para el cálculo de los coeficientes de regresión no se incluyeron los puntos experimentales en los cuales se produjo degradación de la columna).

En estos estudios se observó que para concentraciones de contraion en fase estacionaria iguales o mayores que, aproximadamente, $0.12 \text{ mmol } g^{-1}$ deja de cumplirse la relación 3.2, produciéndose una degradación rápida e irreversible de la columna. que se manifiesta mediante ensanchamiento de bandas y desdoblamiento de picos. Este valor límite de sobrecarga corresponde a una adsorción de contraion sobre 17% de las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria (aproximadamente una de cada 5).

No se pudieron trazar las isotermas de adsorción para TEA Y THA. En el primer caso, porque el TEA se adsorbe muy débilmente sobre la fase estacionaria, aún usando fases móviles muy ricas en agua, lo que dificulta la detección del frente de migración del contraion, que aparece en regiones muy cercanas al volumen muerto del sistema.

El THA presenta el problema de su solubilidad muy baja en la fase móvil y por lo tanto una adsorción muy grande sobre la fase estacionaria, que rebasa rápidamente el límite de estabilidad de la columna, anotado anteriormente.

Cabe señalar que el tipo de isoterma de adsorción que presentan los iones tetraquilamonio aquí estudiados, coincide con lo que ha sido reportado por otros investigadores al utilizar como contraiones la cetrimida (22)(36)(41)(42), las aminas primarias ionizadas (33)(37), los alquil sulfatos (31)(32)(45) y los alquil sulfonatos (43)(44)(46). La diferencia entre los diversos contraiones se presenta únicamente en los valores de los coeficientes de la ecuación de regresión.

b) Influencia de la proporción de acetonitrilo en la fase móvil sobre la fijación del contraion en fase estacionaria.

Para este estudio se determinó la concentración de contraion adsorbido en la fase estacionaria para varias proporciones de acetonitrilo en el eluyente, manteniendo constantes la concentración del contraion en la fase móvil y la fuerza iónica del eluyente.

Se efectuaron 2 series de medidas usando como contraion al TBA a concentraciones de: (A) 4×10^{-3} M y (B) 6×10^{-4} M respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.4 A y B.

En ambos casos se observa que la cantidad de contraion fijado por la fase estacionaria disminuye exponencialmente al aumentar la fracción volúmica del acetonitrilo en el eluyente. Este comportamiento se puede expresar mediante la relación lineal siguiente:

$$\log[C^+]_{st} = X - Y \Phi_{org} \quad (3.4)$$

donde:

X y Y son constantes que dependen de las condiciones experimentales.

Φ_{org} es la fracción volúmica de acetonitrilo en la fase móvil.

Este tipo de relación se cumple en el caso del contraion TBA para concentraciones de acetonitrilo entre 10% y 40% v/v. Para concentraciones de acetonitrilo menores a 10% v/v, se observó un comportamiento anormal, caracterizado por una disminución notable e irreversible de la eficiencia de la columna. Esto es debido a que en esas

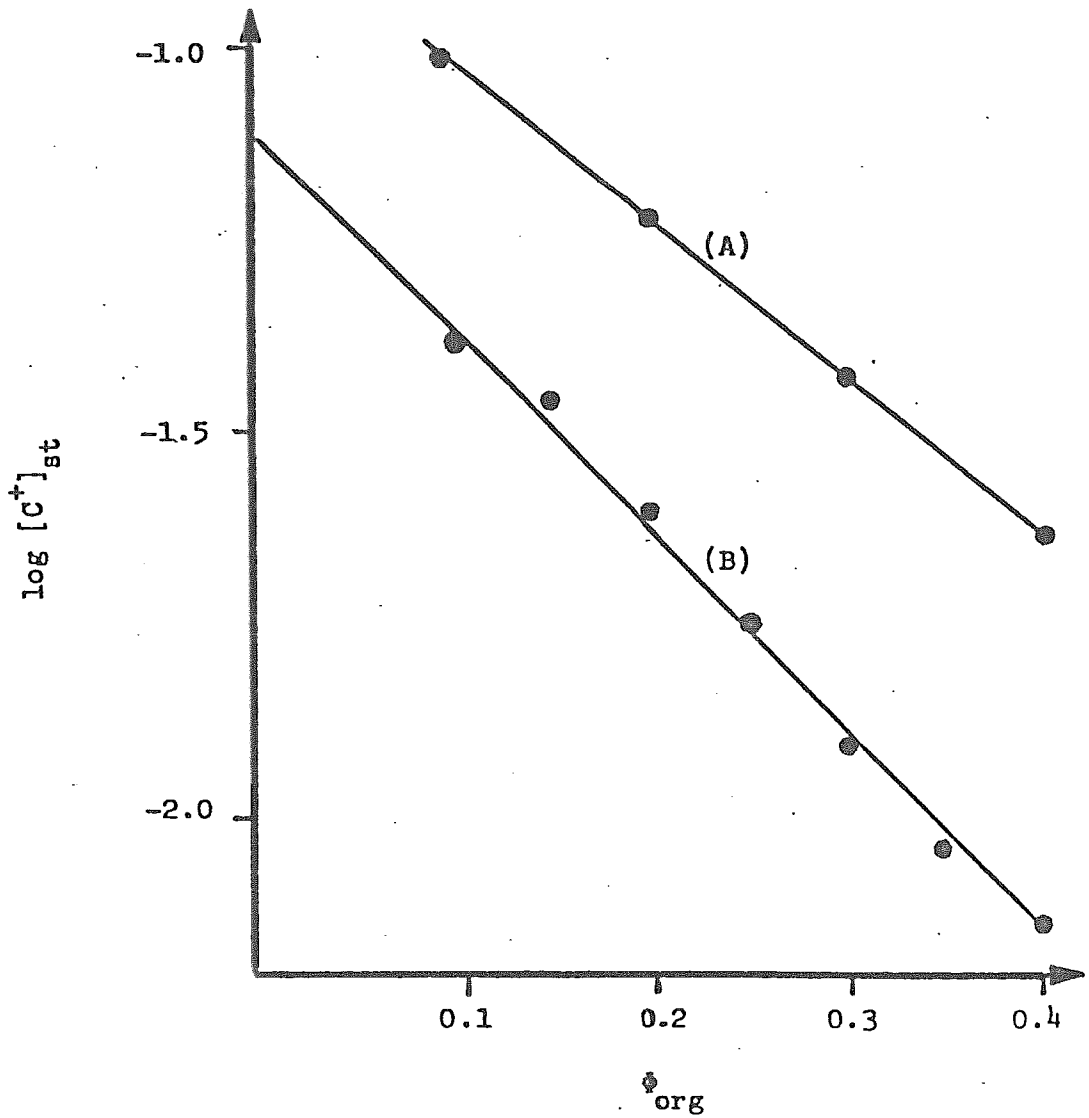


FIGURA 3.4

ADSORCION DE CONTRAION EN FUNCION DEL CONTENIDO DE ACETONITRILO EN LA FASE MOVIL.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d.i.

Fase estacionaria:

Supelcosil LC-7 5 μ m.

Fase movil:

(A) acetonitrilo-agua ; TBA 0.004 M; acetato de amonio 0.25 M

(B) acetonitrilo-agua; TBA 0.0006 M; acetato de amonio 0.25 M

T = 40 $^{\circ}$ C

F = 1 ml min $^{-1}$

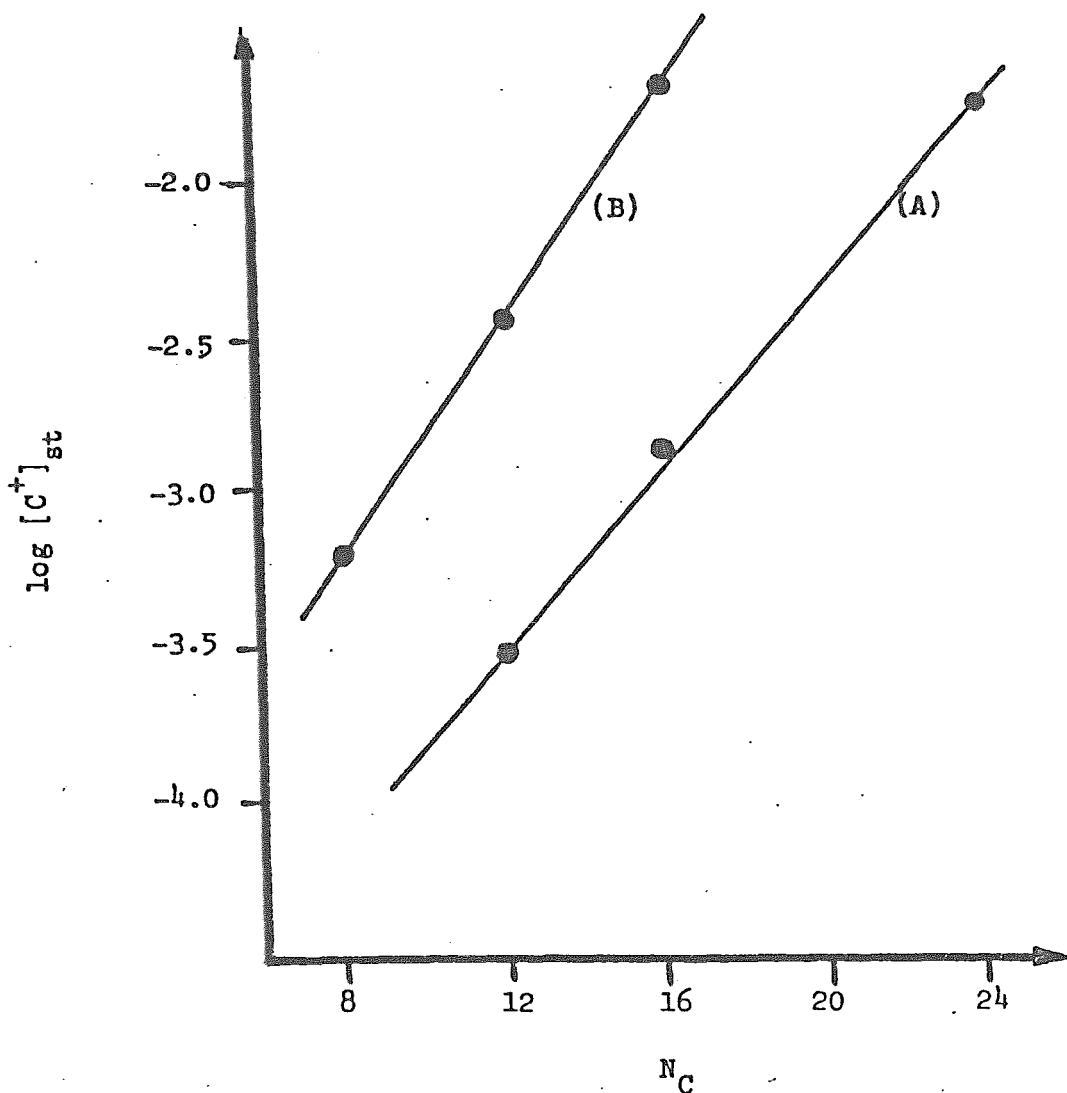


FIGURA 3.5

ADSORCION DE CONTRAION EN LA FASE ESTACIONARIA EN
FUNCION DEL NUMERO DE ATOMOS DE CARBONO DEL
CONTRAION.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d.i.

Fase estacionaria:

Supelcosil LC-7 5 μ m.

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); acetato de
amonio 0.25 M ; contraion 10⁻⁴M

(A) $\Phi_{org} = 0.4$

(B) $\Phi_{org} = 0.1$

T = 40°C

F = 1 ml min⁻¹

condiciones la concentración del TBA adsorbido sobrepasa el límite de carga de la columna mencionado anteriormente.

A concentraciones de acetato, superiores a 40% v/v la cantidad de contraion adsorbido es sumamente débil y el frente de migración del TBA aparece muy cercano al volumen muerto del sistema.

Las ecuaciones de regresión lineal, obtenidas para las 2 series de experiencias realizadas son las siguientes: (fig.3.4)

TBA 4×10^{-3} M:
 $\log[C^+]_{st} = -0.812 - 2.05 \Phi_{org} \quad r = -0.999 \quad (3.6)$

TBA 6×10^{-4} M:
 $\log[C^+]_{st} = -1.10 - 2.63 \Phi_{org} \quad r = -0.997 \quad (3.7)$

c) Influencia de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas del contraion sobre su adsorción en fase estacionaria.

Para este estudio se midió la concentración de contraion fijado por la fase estacionaria en función del número de átomos de carbono, correspondientes a TEA, TPA, TBA y THA. Se efectuaron dos series de medidas manteniendo constantes, en cada caso, la concentración de contraion en fase móvil, la fracción volumétrica del acetato, la fuerza iónica del eluyente y la temperatura.

Debido a la baja solubilidad del ion THA y a su fuerte fijación sobre la fase estacionaria, solamente fué posible efectuar el estudio de la serie TPA, TBA, y THA usando como fase móvil una mezcla rica en acetato y a baja concentración de contraion disuelto. En esas condiciones, la fijación del TEA es prácticamente nula.

El estudio de la serie TEA, TPA y TBA, por el contraion, sólo pudo hacerse usando como fase móvil una mezcla pobre en acetato y a baja concentración de contraion disuelto. Estas condiciones son necesarias para poder observar el frente de migración del ion TEA en un volumen de efluente suficientemente diferenciado del volumen

muerto del sistema, ya que este ion se adsorbe muy poco sobre la fase estacionaria. Estos medios no son adecuados para estudiar la fijación de THA, que es muy elevada y produce degradación de la columna.

Los resultados obtenidos en estas dos series de medidas se muestran en las figuras 3.5 A y B.

Se observa que la cantidad de contraion fijada en la fase estacionaria aumenta exponencialmente al aumentar el número de átomos de carbono en la molécula del ion tetralquilamonio. Este comportamiento puede expresarse en forma linealizada por la relación siguiente:

$$\log [C^+]_{st} = C + D N_c \quad (3.8)$$

donde:

C y D son constantes que dependen de las condiciones de operación en cada caso.

N_c es el número de átomos de carbono en la molécula del contraion.

La aplicación de la relación (3.8) a las 2 series de experiencias realizadas conduce a las ecuaciones de regresión siguientes:

$$\phi_{org} = 0.40$$

$$\log [C^+]_{st} = -5.21 + 0.144 N_c \quad r=0.999 \quad (3.9)$$

$$\phi_{org} = 0.10$$

$$\log [C^+]_{st} = -4.71 + 0.189 N_c \quad r=0.999 \quad (3.10)$$

d) Influencia de la concentración de sales disueltas en la fase móvil.

El estudio de la influencia de la concentración de sales sobre la adsorción del contraion se efectuó midiendo la cantidad de TBA fijado en fase estacionaria para diferentes concentraciones de acetato de amonio en el eluyente. Se llevaron a cabo 3 series de experiencias con las siguientes características:

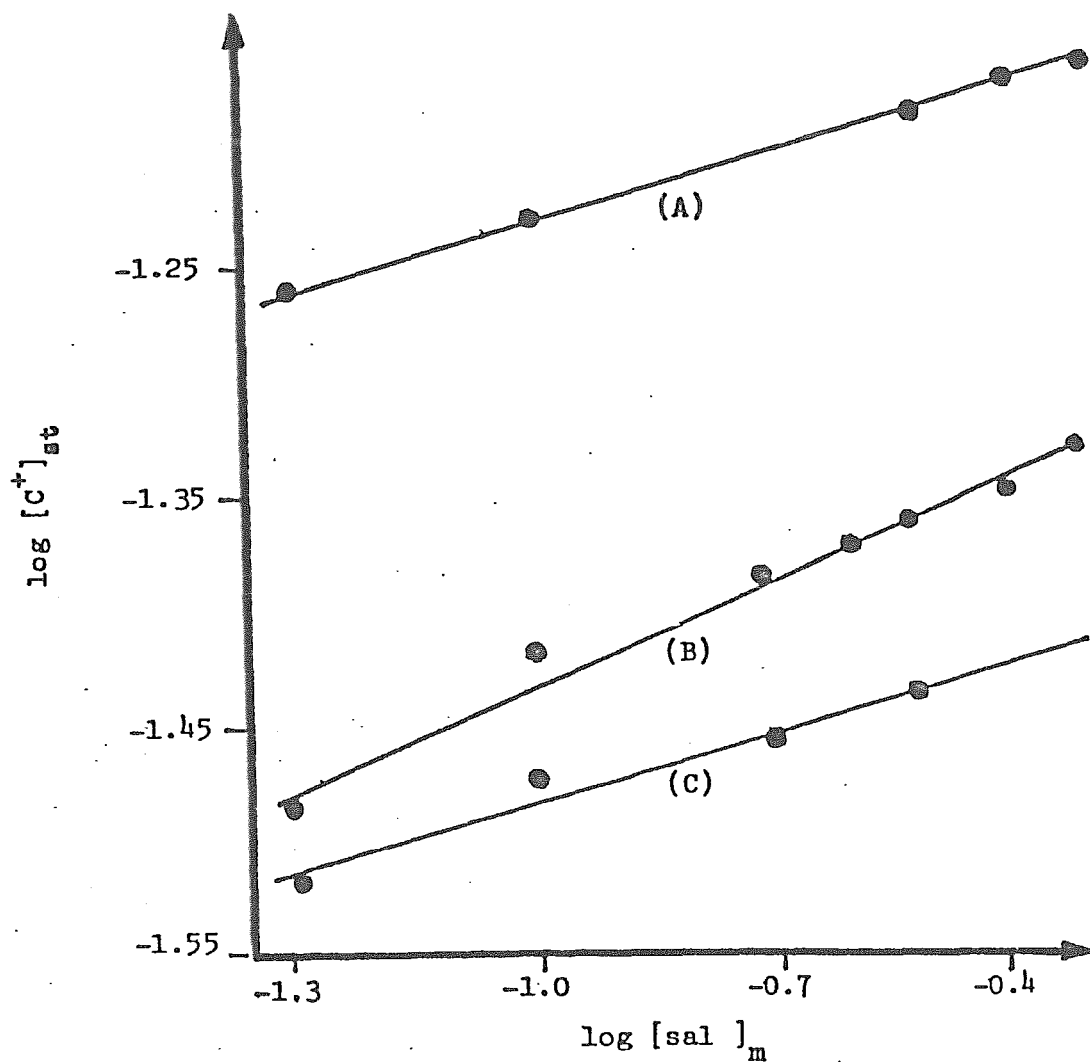


FIGURA 3.6

ADSORCION DE TBA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE SALES EN LA FASE MOVIL.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d.i.

Fase estacionaria:

(A) y (C) Supelcosil LC-7 5 μ m.

(B) Rsil C 18 HL 5 μ .

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); acetato de amonio; TBA 2x10⁻³

Φ_{org} :

(A) = 0.1

(B) y (C) = 0.2

T = 40°C

F = 1 ml min⁻¹

1a serie (A):

Contraion: TBA 2×10^{-3} M.

Acetonitrilo: 10 % v/v.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7; 5 μ m.

2a. serie (B):

Contraion: TBA 2×10^{-3} M.

Acetonitrilo: 20 % v/v.

Fase estacionaria: Rsil C18 HL 5 μ m.

3a. serie (C):

Contraion: TBA 2×10^{-3} M.

Acetonitrilo 20 % v/v.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 5 μ m.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.6 y en la tabla 3.1.

Se puede deducir de estos resultados que al variar la concentración de sales en la fase móvil, en el intervalo de 0.05 a 0.5 M, el efecto sobre la adsorción del contraion es muy débil, comparado con el que producen los parámetros estudiados anteriormente.

La adsorción del contraion aumenta exponencialmente, aunque con una pendiente pequeña, al aumentar la concentración de sales, de modo que este comportamiento se puede expresar por la relación lineal siguiente:

$$\log[C^+]_{st} = P + R \log[sall]_m \quad (3.11)$$

donde:

P y R son constantes.

$[sall]_m$ es la concentración de acetato de amonio en el eluyente.

La aplicación de esta relación a los resultados experimentales conduce a las ecuaciones de regresión siguientes (figura 3.6):

Serie 1a. (A):

$$\log[C^+]_{st} = -1.136 + 0.097 \log[sall]_m \quad r=0.998 \quad (3.12)$$

Serie 2a. (B):

$$\log[C^+]_{st} = -1.282 + 0.149 \log[sall]_m \quad r=0.990 \quad (3.13)$$

Serie 3a. (C):

$$\log[C^+]_{st} = -1.383 + 0.099 \log[sall]_m \quad r=0.986 \quad (3.14)$$

Adicionalmente se puede observar en estas experiencias que, para una composición idéntica de fase móvil, la adsorción del contraion es mayor y varía mas pronunciadamente con la concentración de sales, cuando se utiliza una fase estacionaria con mayor contenido de cadenas hidrocarbonadas. (Rsil 16 % C y Supelcosil 13.6 % C). Este efecto se ajusta bien a los postulados de la teoría hidrofóbica desarrollada por Horváth et al (26) para las fases apolares químicamente unidas.

e) Influencia de la naturaleza de las sales disueltas en la fase móvil.

Este estudio consistió en valorar el efecto que puede producir el tipo de sal presente en la fase móvil sobre la fijación del contraion en la fase estacionaria, refiriéndonos principalmente a los iones de carga contraria al contraion. En efecto, el contraion adsorbido en fase estacionaria atrae hacia ésta a los iones de carga opuesta presentes en la fase móvil formando una doble capa (superficie cargada-nube iónica asociada), eléctricamente neutra.

En estas experiencias se midió la cantidad de contraion adsorbido en la fase estacionaria usando una fase móvil que contenía, en cada caso, la sal del anión por estudiar a concentración 0.04 M y una concentración de acetato de amonio 0.01 M , para mantener fijo el pH y la fuerza iónica de la fase móvil.

Como contraion se usó TBA a una concentración 2×10^{-3} M y acetonitrilo en una fracción volúmica de 0.2

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.3

Se observó un efecto muy pequeño sobre la adsorción del contraion en la fase estacionaria al cambiar el anión de la sal disuelta en la fase móvil; sin embargo se puede deducir que la adsorción del ion TBA, en presencia de los aniones estudiados, aumenta según el orden:

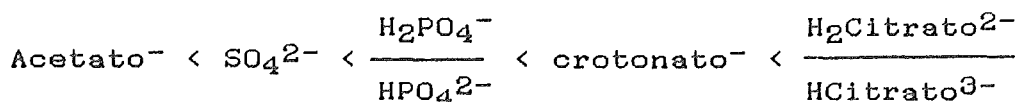


TABLA 3.3

INFLUENCIA DEL USO DE DIFERENTES SALES SOBRE LA FIJACION DEL CONTRAION EN LA FASE ESTACIONARIA.

Condiciones:

Fase estacionaria: Rsil HL C18 5 μ m.

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); Φ_{org} = 0.2; TBA 2×10^{-3} M; acetato de amonio 0.01 M + sal de anión estudiado 0.04 M.

Anión estudiado	acetato	sulfato	fosfato	crotonato	citrato
TBA adsorbido mmol g ⁻¹	3.27×10^{-2}	3.64×10^{-2}	3.91×10^{-2}	4.24×10^{-2}	4.35×10^{-2}

Este orden refleja que el efecto de los iones de carga opuesta, presentes en la fase móvil, sobre la adsorción del contraion, depende de la carga e hidrofobicidad de aquéllos, aunque dicho efecto es débil.

MODELO GENERAL DE ADSORCION DE IONES TETRALQUIL AMONIO.

a) Modelo lineal de primer grado -completo-.

Considerando los resultados obtenidos en las diferentes experiencias realizadas, se observa que, dentro de los límites usuales de variación de los parámetros estudiados, los efectos más importantes sobre la adsorción de iones globulares tipo tetralquil amonio sobre fases apolares químicamente unidas son:

- La variación de la fracción volumétrica del acetonitrilo en la fase móvil.
- La variación del número de átomos de carbono de la molécula del contraion.
- La variación de la concentración del contraion en la fase móvil.

Los demás parámetros estudiados ejercen efectos más débiles sobre la fijación del contraion y no se consideran en el tratamiento siguiente:

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestros estudios (ecuaciones 3.1 a 3.14) y por comparación con relaciones ya publicadas obtenidas para los contraiones alquil sulfatos y alquil sulfonatos (22), es posible proponer un modelo matemático lineal que permite calcular la concentración de contraion fijado por la fase estacionaria, para cualquier combinación de valores de los parámetros que rigen la adsorción de éste.

El modelo matemático es de la forma:

$$\begin{aligned} \log[C^+]_{st} = & \theta_0 + \theta_1\Phi_{org} + \theta_2 \log[C^+]_m + \theta_3Nc + \\ & + \theta_{1-2} \Phi_{org} \log[C^+]_m + \theta_{1-3}\Phi_{org} Nc + \quad (3.15) \\ & + \theta_{2-3} \log[C^+]_m Nc + \theta_{1-2-3}\Phi_{org} \log[C^+]_m Nc \end{aligned}$$

El cálculo de los coeficientes del modelo se realiza de acuerdo a la "Teoría del Plan de Experiencias" (47), que indica que para un modelo lineal de primer grado que contenga 3 variables, los coeficientes correspondientes a dichos parámetros y a todas las interacciones posibles entre ellos, pueden ser calculados a partir de 2^3 experiencias seleccionadas convenientemente a partir de los resultados obtenidos en la práctica.

El problema principal consiste en seleccionar las 8 experiencias óptimas y más representativas para formar con ellas una matriz de experiencias [Matriz (G)]. La matriz del modelo [Matriz (X)], que permite calcular los 8 coeficientes, está formada por la concatenación 1 de un vector unitario, (Y)², a la izquierda de la matriz de experiencias.

Para optimizar la matriz del modelo [Matriz (X)], son necesarias 2 condiciones:

- 1) Que la matriz del modelo sea ortogonal, es decir: que la matriz (X')³ sea igual a la matriz (X⁻¹)⁴
- 2) Que el valor del determinante de la matriz producto (X'X), sea máximo.

Cuando se cumplen estos requisitos la condición de optimización se ha alcanzado y los coeficientes calculados tendrán una varianza mínima y una covarianza nula; es decir: la matriz de varianzas-covarianzas, [Matrix (X'X)⁻¹]⁵, será diagonal.

Para poder formar una matriz de experiencias óptima es necesario, en primer lugar, poner todas las variables a un mismo nivel, esto se logra trabajando con variables reducidas, dichas variables pueden tomar únicamente valores comprendidos entre +1 y -1.

- 1 Se entiende por concatenación la extensión de la matriz de experiencias por un vector columna.
- 2 consultar pg. 64.
- 3 (X') es la matriz transpuesta de (X).
- 4 (X⁻¹) es la matriz inversa de (X).
- 5 (X'X)⁻¹ es la matriz inversa de (X'X).

La transformación de variables reales en variables reducidas se efectúa mediante la relación siguiente:

$$\text{Variable reducida} = \frac{\text{Variable real} - \text{Valor extremo que puede tomar la variable}}{\text{Valor de la variable real al centro del dominio} - \text{Valor de la variable real al centro del dominio}} \quad (3.16)$$

La tabla 3.4 muestra el dominio de variación de los parámetros estudiados y los valores central y extremo de las variables consideradas:

TABLA 3.4

DOMINIOS DE VARIACION DE LAS VARIABLES, VALOR CENTRAL Y VALOR EXTREMO DE LAS MISMAS.

Parámetro	Dominio de variación		Valor al centro del dominio	Valor extremo de la variable
	-1	+1		
$x_1 = \log[C^+]_m$	-4	-2.398	-3.199	-2.398
$x_2 = N_c$	12	16	14	16
$x_3 = \phi_V CH_3CN$	0.1	0.4	0.25	0.4

Si se usan variables reducidas, las matrices de experiencias óptimas pueden hacerse usando planes factoriales a 2 niveles; en este caso, la matriz de experiencias está formada por valores +1 y -1 para las variables reducidas. Estas matrices son ortogonales; sin embargo, en nuestro caso no es posible usar un plan factorial debido a que el dominio posible de variación de las variables no es regular; por ejemplo: no podemos medir la cantidad de THA fijado por la fase estacionaria a una concentración muy baja de acetonitrilo, ni tampoco la cantidad de TEA fijado por la fase estacionaria a un 40 % de acetonitrilo en la fase móvil. Estas limitaciones prácticas nos han llevado a tomar como intervalo de variación para el parámetro N_c los valores de 12 y 16, correspondientes a TPA y a TBA. Aún con esta restricción no es posible tener un dominio de variación totalmente regular por la baja adsorción de TPA a altas concentraciones de acetonitrilo; sin embargo, si se escoge una combinación de 8 experiencias tales que los parámetros tengan los valores más extremos posibles dentro del dominio de variación, se logra tener una matriz que si no es ortogonal, al menos es la "mejor posible".

La tabla 3.5 muestra las 8 experiencias escogidas.

TABLA 3.5
PUNTOS DEL MODELO.

Parámetro	experiencias (variables reales)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$x_1 = \log[C^+]_m$	-2.398	-4	-2.398	-4	-2.398	-4	-2.398	-4
$x_2 = N_c$	12	12	16	16	12	12	16	16
$x_3 = \phi_v CH_3CN$	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.4	0.4	0.4
$[C^+]_{st} \times 10^2$	2.878	0.346	9.577	2.058	1.132	0.0309	2.321	0.1343
$\log[C^+]_{st}$	-1.541	-2.461	-1.018	-1.687	-1.946	-3.510	-1.634	-2.872

Las figuras 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 y 3.12 muestran: la matriz de experiencias (G), la matriz del modelo con variables reducidas, matriz (X), la matriz inversa $(X)^{-1}$; la matriz producto $(X'X)$; el valor del determinante de la matriz producto $(X'X)$; la matriz de varianza-covarianza $(X'X)^{-1}$ y el vector columna (Y). Las otras combinaciones posibles de experiencias han dado valores menores para el determinante $(X'X)$.

El vector columna (Y) muestra los valores de la concentración de contraion en la fase estacionaria medida experimentalmente para cada una de las experiencias 1 a 8; tomados de las tablas 3.1 y 3.2.

La ecuación del modelo puede representarse en forma matricial según:

$$(Y) = (X)(\beta) + (\Omega) \quad (3.17)$$

donde:

(Y) es el vector columna formado con los 8 valores de $\log[C^+]_{st}$.

(X) es la matriz del modelo formado con las 8 variables reducidas, (matriz cuadrada de 8 x 8).

(β) es el vector de coeficientes a estimar (modelo de variables reducidas).

(Ω) es el vector de errores aleatorios de medida [dimensión (8x1)].

La estimación de β se hace sobre la hipótesis de que (Ω) es muy pequeña. El vector $(\hat{\beta})$, estimador de (β), se calcula mediante la fórmula:

$$(\hat{\beta}) = (X'X)^{-1}(X')(Y) \quad (3.18)$$

Cuando la matriz (X) es una matriz cuadrada, la fórmula 3.18 se simplifica en la forma:

$$(\hat{\beta}) = (X^{-1})(Y) \quad (3.19)$$

Que permite calcular los coeficientes del modelo de variables reducidas (tabla 3.6)

MATRIZ DE EXPERIENCIAS.
MATRIZ (G)
(variables reales)

Experiencias	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$
1	-2.398	12	0.1	-28.776	-0.24	1.2	- 2.88
2	-4	12	0.1	-36	-0.40	1.2	- 3.6
3	-2.398	16	0.1	-38.368	-0.24	1.6	- 3.84
4	-4	16	0.1	- 6.4	-0.40	1.6	- 6.4
5	-2.398	12	0.3	-28.776	-0.72	3.6	- 8.63
6	-4	12	0.4	-48	-1.6	4.8	-19.2
7	-2.398	16	0.4	-38.368	-0.96	6.4	-15.35
8	-4	16	0.4	-64	-1.6	6.4	-25.60

FIGURA 3.7

MATRIZ DEL MODELO.
 MATRIZ (X)
 Variables reducidas.

VECTOR
 COLUMNA

Resultados
 experimentales
 $\log[C^+]_{st}$

Exp.	x0	x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x1x2x2	Y
1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	-1.541
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-2.461
3	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	-1.018
4	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1.687
5	+1	+1	-1	+0.333	-1	+0.333	-0.333	-0.333	-1.946
6	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-3.510
7	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1.634
8	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-2.872

FIGURA 3.8

MATRIZ INVERSA (X)⁻¹

	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$
x_0	0.062	0.125	0.125	0.125	0.188	0.125	0.125	0.125
x_1	0.062	-0.125	0.125	-0.125	0.188	-0.125	0.125	-0.125
x_2	-0.062	-0.125	0.125	0.125	-0.188	-0.125	0.125	0.125
x_3	-0.188	-0.125	-0.125	-0.125	0.188	0.125	0.125	0.125
x_1x_2	-0.062	0.125	0.125	-0.125	-0.188	0.125	0.125	-0.125
x_1x_3	-0.188	0.125	-0.125	0.125	0.188	-0.125	0.125	-0.125
x_2x_3	0.188	0.125	-0.125	-0.125	-0.188	-0.125	0.125	0.125
$x_1x_2x_3$	0.188	-0.125	-0.125	0.125	-0.188	0.125	0.125	-0.125

FIGURA 3.9

MATRIZ TRANSPUESTA (X')

1	2	3	4	5	6	7	8
+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
-1	-1	-1	-1	+0.333	+1	+1	+1
-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
-1	+1	-1	+1	+0.333	-1	+1	-1
+1	+1	-1	-1	-0.333	-1	+1	+1
+1	-1	-1	+1	-0.333	+1	+1	-1

FIGURA 3.10

MATRIZ (X'X)

x0	x1	x2	x3	x1x2	x1x3	x2x3	x1x2x3
3	0	0	-0.667	0	-0.667	0.667	0.667
0	8	0	-0.667	0	-0.667	0.667	0.667
0	0	8	0.667	0	0.667	-0.667	-0.667
.667	-0.667	0.667	7.11	0.667	-0.889	0.889	0.889
0	0	0	0.667	8	0.667	-0.667	-0.667
.667	-0.667	0.667	-0.889	0.667	7.11	0.889	0.889
.667	0.667	-0.667	0.889	-0.667	0.889	7.11	-0.889
.667	0.667	-0.667	0.889	-0.667	0.889	-0.889	7.11

DETERMINANTE (X'X) = $10^{6.872}$

FIGURA 3.11

MATRIZ DE VARIANZA-COVARIANZA $(X'X)^{-1}$

	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$x_1x_2x_3$
x_0	0.133	0.008	-0.008	0.023	-0.008	0.023	-0.023	+0.023
x_1	0.0078	0.133	-0.008	0.023	-0.008	0.023	-0.023	-0.023
x_2	-0.0078	-0.008	0.133	-0.023	0.008	-0.023	0.023	0.023
x_1x_2	-0.008	-0.008	0.008	-0.023	0.133	-0.023	0.023	0.023
x_1x_3	0.023	0.023	-0.023	0.039	-0.023	0.164	-0.039	-0.039
x_2x_3	-0.023	-0.023	0.023	-0.039	0.023	-0.039	0.164	0.039
$x_1x_2x_3$	-0.023	-0.023	0.023	-0.039	0.023	-0.039	0.039	0.164

FIGURA 3.12

MODELO DE VARIABLES REDUCIDAS PARA LA FIJACION DE IONES TETRALQUIL AMONIO.

$\hat{\beta}$	$(X^{-1})(Y)$
β_0	= -2.109
β_1	= +0.523
β_2	= +0.306
β_3	= -0.432
β_{1-2}	= -0.047
β_{1-3}	= +0.126
β_{2-3}	= -0.018
β_{1-2-3}	= +0.016

TABLA 3.6

VECTOR DE COEFICIENTES A ESTIMAR (β).
Modelo de variables reducidas.

β_0 es el valor que tomará el $\log[C^+]_{st}$ si todos los parámetros se encuentran a nivel cero, es decir:
 $\Phi_{v\ org} = 0.25$; $N_c = 14$ y $\log[C^+]_m = -3.199$ (tabla 3.4).

El valor negativo del coeficiente β_3 indica que la concentración de contraion fijado disminuye al aumentar la fracción volúmica de acetonitrilo en el eluyente, según se ha demostrado experimentalmente.

El modelo de variables reducidas (variables adimensionales), permite comparar el valor absoluto de los coeficientes β , por lo que es posible hacer la consideración de que β_{2-3} , que representa la interacción entre los parámetros fracción volúmica de acetonitrilo y longitud de la cadena hidrocarbonada del contraion; y β_{1-2-3} , que representa la interacción entre todos los parámetros, son despreciables, cometiendo un error relativo menor del 1 % sobre el valor de β_0 . Por el contrario, el coeficiente β_{1-2} , que representa la interacción entre la concentración de contraion en el eluyente y la longitud de la cadena hidrocarbonada del contraion, no se despreció. El valor de este coeficiente representa 2.23 % del valor de β_0 .

Eliminando los términos despreciables se puede formar una nueva matriz del modelo, matriz (X_1) , de dimensión (8,6); y recalcular los valores de acuerdo con la ecuación 3.18.

MATRIZ DEL MODELO SIMPLIFICADA (X_1)
(con 6 parámetros, variables reducidas)

Exp.	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3
1	+1	+1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1
3	+1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	-1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+0.333	-1	+0.333
6	+1	-1	-1	+1	+1	-1
7	+1	+1	+1	+1	+1	+1
8	+1	-1	+1	+1	-1	-1

FIGURA 3.13

MATRIZ $(X_1'X_1)$

1	2	3	4	5	6	7
0	8	0	-0.887	0	-0.887	
0	8	0	-0.887	0	-0.887	
-0.887	-0.887	0.887	7.11	0.887	-0.887	
0	0	0	0.887	8	-0.887	
-0.887	-0.887	0.887	-0.887	0.887	7.11	

FIGURA 0.14

VALOR NUMÉRICO DEL DETERMINANTE $(X_1'X_1) = 10^4 \cdot 377$

MATRIZ TRANSPUESTA $(X_1)'$
(con 6 parámetros, variables reducidas).

x_0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
x_1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
x_2	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1
x_3	-1	-1	-1	-1	+0.333	+1	+1	+1
$x_1 \times x_2$	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1
$x_1 \times x_3$	-1	+1	-1	+1	+0.333	-1	+1	-1

FIGURA 3.15

MATRIZ $(X_1'X_1)^{-1}(X_1')$

0.1058	0.125	0.0962	0.125	0.144	0.125	0.1538	0.125
0.1058	-0.125	0.0962	-0.125	0.144	-0.125	0.1538	-0.125
-0.1058	-0.125	0.1538	0.125	-0.144	-0.125	0.0962	0.125
-0.1156	-0.125	-0.1732	-0.125	0.115	0.125	0.1732	0.125
-0.1058	0.125	0.1538	-0.125	-0.144	0.125	0.0962	-0.125
-0.1156	0.125	-0.1732	0.125	0.115	-0.125	0.1732	-0.125

FIGURA 3.16

MATRIZ DE VARIANZA-COVARIANZA $(X_1'X_1)^{-1}$

x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3
0.1274	0.0024	-0.0024	0.0144	-0.0024	0.0144
0.0024	0.1274	-0.0024	0.0144	-0.0024	0.0144
-0.0024	-0.0024	0.1274	-0.0144	0.0024	-0.0144
0.0144	0.0144	-0.0144	0.1490	-0.0144	0.0241
-0.0024	-0.0024	0.0024	-0.0144	0.1274	-0.0144
0.0144	0.0144	-0.0144	0.0241	-0.0144	0.1491

FIGURA 3.17

$\hat{\beta}$	$(X_1'X_1)^{-1}(X_1')(Y)$
β_0	-2.109
β_1	+0.524
β_2	+0.306
β_3	-0.432
β_{1-2}	-0.046
β_{1-3}	+0.127

FIGURA 3.18

b) Modelo lineal de primer grado simplificado.
Variables reducidas.

Las figuras 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 y 3.18 representan: la nueva matriz (X_1) con 6 parámetros y variables reducidas; la matriz ($X_1'X_1$), el valor del determinante ($X_1'X_1$), la matriz transpuesta (X_1)', el producto de matrices $(X_1'X_1)^{-1}(X_1)'$, la matriz de varianza - covarianza $(X_1'X_1)^{-1}$ y el vector (β), estimador de (β).

El modelo de variables reducidas utilizando los coeficientes β es la siguiente:

$$\begin{aligned} \log [C^+]_{st} = & -2.109 + 0.524\log[C^+]_{mred} + 0.306 N_{cred} \\ & - 0.432 \Phi_{org} - 0.046\log[C^+]_{mred}N_{cred} + \\ & + 0.127\log[C^+]_{mred}\Phi_{orgred} \quad (3.20) \end{aligned}$$

La ecuación del modelo (3.20) se aplicó a todos los valores experimentales presentados en las tablas 3.1 y 3.2. La comparación de resultados se muestra en la tabla 3.6. La varianza residual por error experimental fue de 0.11×10^{-3} ; el coeficiente de correlación encontrado fue de 0.984 y el coeficiente de variación sobre $\log[C^+]_{st}$ para las 26 experiencias probadas fue de 3.1 %. Las estimaciones anteriores nos permitieron considerar que queda confirmada la validez del modelo.

Cabe anotar que dos de las experiencias probadas, con TPA a concentración 10^{-2} M y 4×10^{-2} M, en presencia de acetonitrilo al 10 %, caen fuera del dominio de variación con el que se elaboró el modelo; sin embargo la diferencia entre los valores calculado y observado para los $[C^+]_{st}$ es del mismo orden que para los otros puntos probados. Esto parece indicar que el modelo propuesto puede emplearse para calcular la concentración de contraion que se fija en la columna aún en condiciones que quedan fuera del dominio de variación estudiado. La única limitante sería para aquellas condiciones en donde el contraion fijado sobrepasa la concentración de aproximadamente 0.12 mmol g^{-1} , en cuyo caso, como se ha mencionado anteriormente, se degrada irreversiblemente la columna y su comportamiento no obedece a las relaciones matemáticas aquí propuestas.

$(C^+)_m$	N_c	ϕ_v	$x_1 \times 2$	$x_1 \times 3$	Yobs Yi	Ycalc Yic	ΔY	$(Yi - Yic)^2$	$(Yi - \bar{y})^2$	$(Yic - \bar{y})^2$
-1	-3	-1	+3	+1	-3.195	-3.130	0.0625	4.225x10 ⁻³	1.9645	1.7865
-1	+1	-1	-1	+1	-1.6242	-1.7220	0.0378	1.429x10 ⁻³	0.0119	0.0061
-0.248	+1	-1	-0.248	+0.248	-1.4317	-1.458	0.0263	0.694x10 ⁻³	0.1308	0.1125
-0.235	+1	-1	-0.235	+0.235	-1.41	-1.4534	0.0373	1.39 x10 ⁻³	0.1423	0.1156
-0.029	+1	-1	-0.029	+0.029	-1.3825	-1.3812	0.0013	2 x10 ⁻⁶	0.1648	0.1699
-0.029	+1	-1	-0.029	+0.029	-1.3818	-1.3812	0.0004	1.77 x10 ⁻⁷	0.1696	0.1699
+0.264	+1	-1	+0.264	-0.264	-1.1891	-1.2783	0.0892	7.963x10 ⁻³	0.3652	0.2653
+0.248	+1	-1	+0.248	-0.248	-1.2055	-1.2839	0.0784	6.147x10 ⁻³	0.3456	0.2595
+1	+1	-1	+1	-1	-1.0163	-1.020	0.0037	1.4 x10 ⁻⁵	0.6038	0.598
-0.029	+1	-0.67	-0.029	0.0193	-1.4587	-1.5267	0.0680	4.624x10 ⁻³	0.1120	0.0711
-0.029	+1	-0.33	-0.029	9.7E-3	-1.5979	-1.6718	0.6738	5.458x10 ⁻³	0.03822	0.0148
-0.029	+1	0	-0.029	0	-1.7484	-1.8168	0.0684	4.687x10 ⁻³	0.00202	0.00059
+1	+1	-0.33	+1	+0.333	-1.4299	-1.4266	0.0033	1.1 x10 ⁻⁵	0.001321	0.1345
-0.029	+1	0.33	-0.29	-9.7E-3	-1.9050	-1.9619	0.0569	3.243x10 ⁻³	0.01248	0.0284
-0.029	+1	-0.67	-0.029	-0.019	-2.0408	-2.074	0.0336	1.129x10 ⁻³	0.0612	0.0787
+1	+1	+1	+1	+1	-1.6319	-1.630	0.0019	4 x10 ⁻⁸	0.0280	0.0263
-1	+1	+1	-1	-1	-2.8695	-2.840	0.0295	8.7 x10 ⁻⁴	1.1579	1.09537
-1	-1	-1	+1	+1	-2.4585	-2.4260	0.0325	1.056x10 ⁻³	0.4423	0.4
-0.248	-1	-1	+0.248	+0.248	-2.1715	-2.0929	0.0786	6.186x10 ⁻³	0.1429	0.0897
+0.259	-1	-1	-0.259	-0.259	-1.9550	-1.8386	0.0867	7.52 x10 ⁻³	0.026	0.0056
+1	-1	-1	+1	-1	-1.5385	-1.5400	0.0002	2.8 x10 ⁻⁸	0.0649	0.0622
+1.497	-1	-1	-1.497	-1.497	-1.2923	-1.3198	0.0275	7.58 x10 ⁻⁴	0.2509	0.2242
+2.247	-1	-1	-2.247	-2.247	-1.034	-0.9875	0.0464	2.155x10 ⁻³	0.5787	0.6495
+0.624	-1	0.33	-0.624	+0.208	-2.141	-2.1768	0.0357	1.281x10 ⁻³	0.1208	0.147
+1	-1	0.33	-1	+0.333	-1.946	-1.8466	0.0006	3.192x10 ⁻⁷	0.0233	0.0234
-1	-1	+1	+1	-1	-3.5074	-3.5461	0.0366	1.340x10 ⁻³	2.9378	3.0615
					$\bar{y} = -1.7934$			$\Sigma(Yi - Yic)^2$	$\Sigma(Yi - \bar{y})^2$	$\Sigma(Yic - \bar{y})^2$
					$\Sigma Y = -46.6224$			6.2186x10 ⁻²	9.8984	9.5958

TABLA 3.6

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA APLICACION DEL MODELO DE VARIABLES REDUCIDAS (Ec. 3.20), A LOS VALORES EXPERIMENTALES PRESENTADOS EN LAS TABLAS 3.1 y 3.2.

La varianza residual por el error experimental se calculó mediante la fórmula:

$$\sigma^2 = \frac{\Sigma(Yi - Yic)^2}{n - (k + 1)} = 3.109 \times 10^{-3}$$

para n=26 experiencias y
k+1 = 6 coeficientes estimados con el modelo.
por lo que la desviación tipo fué: $\sigma = 0.056$

El coeficiente de determinación se calculó mediante la fórmula:

$$r^2 = \frac{\Sigma(Yic - \bar{y})^2}{\Sigma(Yi - \bar{y})^2} = 0.97$$

obteniendo para el coeficiente de correlación un valor r=0.98

El error relativo promedio dió:

$$C.V. = \frac{\sigma}{\bar{y}} = 0.031 = 3.1 \%$$

El intervalo de confianza para las β se estimó con un margen de seguridad de 95 % mediante la siguiente fórmula:

$$\beta_{ij} \pm t_{\alpha/2} \frac{\hat{\sigma}_{\beta j}}{(n-6) \text{ g.l.}} \quad (3.21)$$

donde:

$$\hat{\sigma}_{\beta j}^2 = \hat{\sigma}_{a_{jj}}^2 \quad (3.22)$$

a_{jj} son los valores de la diagonal de la matriz varianza-covarianza (figura 3.17)
 t es la variable reducida de Student.
 α es el umbral de confianza = 5 %
 σ es la varianza residual por el error experimental = 3.109×10^{-3} (tabla 3.6)

$$t_{\alpha=0.025} = 2.086 \quad (26-6) \text{ g.l.} \quad (48)$$

a_{ij}	β_{ij}	$\hat{\sigma}_{\beta j}$	β
$a_{11}=0.1274$	$\beta_0 = -2.109$	1.99×10^{-2}	$\beta_0 = -2.109 \pm 0.041$
$a_{22}=0.1274$	$\beta_1 = 0.524$	1.99×10^{-2}	$\beta_1 = 0.524 \pm 0.041$
$a_{33}=0.1274$	$\beta_2 = 0.306$	1.99×10^{-2}	$\beta_2 = 0.306 \pm 0.041$
$a_{44}=0.1491$	$\beta_3 = -0.432$	2.153×10^{-2}	$\beta_3 = -0.432 \pm 0.045$
$a_{55}=0.1274$	$\beta_{12} = -0.046$	1.99×10^{-2}	$\beta_{12} = -0.046 \pm 0.041$
$a_{66}=0.1491$	$\beta_{13} = 0.127$	2.153×10^{-2}	$\beta_{13} = 0.127 \pm 0.45$

TABLA 3.7

DETERMINACION DE LOS INTERVALOS DE CONFIANZA DE LOS COEFICIENTES β

c) Modelo de variables reales.

El cálculo de los coeficientes del modelo de variables reales se efectúa sustituyendo en la ecuación 3.20 cada una de las variables reducidas por su expresión en función de las variables reales (ecuación 3.16), es decir:

$$\phi_{vCH_3CNred} = \frac{\phi_{CH_3CN} - 0.25}{0.15} \quad (3.21)$$

$$N_{cred} = \frac{N_c - 14}{2} \quad (3.22)$$

$$\log[C^+]_{mred} = \frac{\log[C^+]_m + 3.199}{0.801} \quad (3.23)$$

Se obtuvieron los siguientes coeficientes θ :

$$\begin{aligned} \theta_0 &= -0.95 \\ \theta_1 &= 0.82 \\ \theta_2 &= 0.06 \\ \theta_3 &= 0.59 \\ \theta_{1-2} &= -0.03 \\ \theta_{1-3} &= 1.08 \end{aligned}$$



QUINTANA
D. E. P. O.

Los cuales conducen a la ecuación de variables reales:

$$\begin{aligned} \log[C^+]_{st} &= -0.95 + 0.82 \log[C^+]_m + 0.06 N_c + \\ &+ 0.59\phi_{org} + \log[C^+]_m (1.08 \phi_{org} - 0.03 N_c) \end{aligned} \quad (3.24)$$

Este modelo permite calcular la concentración de iones tetralquilamonio adsorbidos, a 40 °C, sobre una fase reversa (Supelcosil LC-7 C 18) con 13.6 % de carbono y superficie específica 250 m² g⁻¹, empleando como fase móvil mezclas agua-acetonitrilo con contraion y sales o buffers disueltos.

El modelo puede utilizarse para cualquier conjunto de condiciones experimentales que quede incluido dentro del dominio de variación de los parámetros estudiados e incluso para puntos fuera de este dominio, siempre y cuando la fase estacionaria no quede sobrecargada (menos de 0.12 mmol g^{-1} de contraion adsorbido).

Es importante hacer notar que las variables independientes del modelo de variables reales no tienen las mismas unidades y sus intervalos de variación no son tampoco comparables; por lo que los coeficientes obtenidos para cada término no pueden ser comparados entre si; de la misma manera (y sobre todo por la existencia de términos mixtos), no es posible tomar un término por separado para obtener deducciones sobre el comportamiento del sistema con respecto a una sola variable. En cualquier caso, el modelo matemático debe ser tomado en conjunto.

CONCLUSIONES.

En este trabajo se ha demostrado que la adsorción de iones tetralquilamonio sobre las fases estacionarias hidrocarbonadas, está determinada por los siguientes parámetros:

- concentración del disolvente orgánico en el eluyente.
- hidrofobicidad del ion tetralquilamonio.
- concentración del ion tetralquilamonio en la fase móvil.

El efecto provocado por los 2 primeros parámetros corresponde bien a los postulados de la teoría hidrofóbica, que explica la retención de los solutos en las fases estacionarias reversas. De hecho, varios investigadores han observado relaciones lineales entre el logaritmo del factor de capacidad y el número de átomos de carbono en las moléculas de los solutos (15). También se han observado relaciones lineales entre $\log k'$ y la fracción volumétrica del disolvente orgánico en la fase móvil (15).

En lo que se refiere a las isotermas de adsorción de los contraiones ($[C^+]_{st} = f[C^+]_m$), en la literatura se han publicado isotermas del tipo Freudlich para aniones de cadena lineal como los alquilsulfatos y los alquilsulfonatos (21) y para cationes de cadena lineal como las alquilaminas

ionizadas y la cetrimida (12). Nuestros resultados muestran que este tipo de isoterma se obtiene también con iones de estructura globular como los tetralquilamonios.

De lo anterior se podría concluir que, independientemente de su estructura, todos los iones voluminosos se adsorben sobre las fases reversas según una isoterma tipo Freundlich. El comportamiento de los sistemas estudiados es similar al observado por J.T. Davies (42) en sus estudios sobre la adsorción de surfactantes en la interfase agua-aceite.

Según el modelo de Davies, al adsorberse los iones en la interfase atraen hacia ésta a iones de carga opuesta presentes en la solución acuosa, generándose una doble capa eléctrica. Considerando el potencial eléctrico de esta doble capa, Davies dedujo una expresión general para la adsorción de cualquier surfactante iónico en este tipo de interfase según:

$$\log n = A + B N_c + C \log[S]_{H_2O} + D \log[Sal]_{H_2O} \quad (3.25)$$

donde:

A es una función lineal del número de átomos de carbono en la molécula del surfactante.

B, C y D son constantes.

$[S]_{H_2O}$ es la concentración molar de surfactante iónico en agua.

$[Sal]_{H_2O}$ es la concentración molar total de electrólito monovalente en agua.

n es el número de moléculas de surfactante iónico adsorbidas por unidad de superficie.

La similitud que existe entre esta ecuación y nuestros propios resultados (ecuaciones 3.2, 3.8 y 3.11) indica que, como en el caso de un sistema agua-aceite, al adsorberse los contraiones en la superficie de la fase estacionaria, se genera una doble capa eléctrica, misma que juega un papel importante en la retención de los solutos, como se verá posteriormente.

Por otra parte, se ha desarrollado un modelo matemático que permite calcular la concentración de ion tetralquilamonio adsorbido sobre la fase

estacionaria para cualquier composición (fracción volúmica de acetonitrilo y concentración de contraion) de la fase móvil y por lo tanto permite preveer a priori el volumen de fase móvil que debe pasar a través de la columna (o el tiempo requerido) para alcanzar un estado de equilibrio. Esto es de suma importancia para obtener resultados reproducibles cuando se efectúan separaciones de iones empleando la técnica de cromatografía de pares de iones.

Los coeficientes del modelo matemático desarrollado son válidos únicamente en las condiciones aquí empleadas (fase Supelcosil LC-7, iones tetralquilamonio simétricos, acetonitrilo como modificador orgánico, acetato de amonio de 0.25 a 0.30 M y temperatura de 40 °C); sin embargo se demostró que es posible calcular los coeficientes del modelo para diferentes condiciones con sólo 8 medidas de fijación de contraion, seleccionadas adecuadamente. Esto quiere decir, en los valores extremos del dominio de variación de los parámetros.

Es importante hacer notar que el modelo aquí deducido tiene exactamente la misma forma (aunque diferentes coeficientes) que otros modelos que han sido deducidos para contraiones del tipo alquil sulfato y alquil sulfonato (27); por lo tanto se puede suponer que para cualquier tipo de contraiones (series homólogas) que se desee utilizar, se podrá establecer un modelo similar; y con sólo 8 experiencias se podrán calcular, con una precisión que es suficiente para la mayoría de los casos prácticos, los coeficientes del modelo.

Se ha observado, tanto en este trabajo como en otros ya publicados, que existe un límite de sobrecarga de la fase estacionaria con el contraion adsorbido, arriba del cual la columna se degrada irreversiblemente. En las condiciones empleadas en este trabajo, dicho límite se sitúa aproximadamente para 0.12 mmol de ion tetralquilamonio por gramo de fase estacionaria, es decir, alrededor de una molécula de contraion por cada cinco cadenas hidrocarbonadas.

CAPITULO IV

ESTUDIO DE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Como ya se ha indicado en capítulos anteriores, desde los primeros años del desarrollo de la cromatografía por pares de iones, los investigadores han tratado de explicar los fenómenos que intervienen en el proceso de retención de los solutos y el papel que desempeña el contraion. Entre los modelos de retención que se han propuesto se distinguen 2 principales corrientes:

La primera considera que el soluto y el contraion forman en la fase móvil o en la interfase un par de iones que se adsorbe reversiblemente sobre la fase estacionaria apolar, debido a su gran superficie hidrocarbonada y a su carga neta nula.

En el segundo grupo se encuentran las proposiciones que consideran que durante el proceso de equilibrio de la columna con la fase móvil, el contraion disuelto en ésta se adsorbe reversiblemente sobre la fase estacionaria apolar, asociado a un ion de carga opuesta presente en el medio (co-ion). De esta manera la fase estacionaria queda convertida en un intercambiador de iones dinámico, donde los solutos compiten con los iones de su misma carga, presentes en la fase móvil, por asociarse al contraion adsorbido.

Hasta ahora ninguno de los modelos propuestos permite explicar completamente todas las observaciones experimentales que se han reportado en las separaciones realizadas por cromatografía de pares de iones. De hecho, el problema parece ser más complicado cuando los contraiones disueltos en la fase móvil poseen un fuerte carácter hidrofóbico y se adsorben apreciablemente sobre la fase estacionaria.

Con el fin de contribuir a elucidar el mecanismo de retención de los solutos en presencia de contraiones de alta hidrofobicidad, en este trabajo hemos realizado un estudio secuencial del efecto provocado por variaciones en los principales parámetros de composición de la fase móvil sobre los factores de capacidad de algunos solutos de prueba. Los contraiones utilizados son los iones tetrapropil y tetrabutil amonio. Los solutos de prueba son los aniones de los ácidos aromáticos para hidroxibenzoico, orto-toluico, sórbico y para-toluico. Los parámetros estudiados son:

- Concentración de acetonitrilo en el eluyente.
- Concentración de contraion en la fase móvil.
- Concentración de sales en el eluyente.
- Uso de diferentes sales en la fase móvil.

Como se ha demostrado en el capítulo anterior, cualquier cambio en alguno de estos parámetros (y especialmente en los dos primeros) ocasiona una modificación en la concentración de contraion en la fase estacionaria; por lo cual, en varios de los incisos reportados a continuación, presentaremos los resultados normalizando el factor de capacidad por la concentración de contraion adsorbido. De esta manera será posible observar exclusivamente el efecto del parámetro estudiado sobre la retención y llegar a conclusiones más claras sobre los mecanismos que intervienen en estos sistemas.

RESULTADOS.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ACETONITRILLO EN EL ELUYENTE SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Este estudio se efectuó determinando el factor de capacidad de los solutos de prueba a diferentes valores de la fracción volúmica de acetonitrilo en el eluyente. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.1 y en la figura 4.1 a. La figura 4.1 b presenta la variación de la retención normalizada, (función $(k' - k'_0)/[C^+]_{st}$), con el contenido de acetonitrilo en la fase móvil.

La composición de la fase móvil utilizada fué la siguiente:

acetonitrilo-agua en proporción variable.
contraion TBA 8×10^{-4} M
acetato de amonio 0.25 M

TABLA 4.1

EFFECTO DE LA PROPORCION DE ACETONITRILLO EN EL ELUYENTE SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Condiciones:

Columna (15 cm x 4.6 mm d.i.).

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7, 5 μ m.

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH=7); TBA 6×10^{-4} M; acetato de amonio 0.25 M.

Temperatura: 40 $^{\circ}$ C.

Flujo: 1ml min⁻¹.

ϕ_{org}	$[C^+]_{st} \times 10^2$ mmol g ⁻¹	k'(a)			(k'-k' ₀)/[C ⁺] _{st} (b)		
		SOLUTOS(+)					
		1	2	4	1	2	4
0.4	0.72	0.01	0.18	0.20	0	0.02	0.03
0.3	1.25	0	0.18	0.29	0	0.08	0.08
0.25	1.79	---	0.28	0.41	---	0.09	0.12
0.20	2.52	0.09	---	0.74	0.02	---	0.19
0.15	3.47	0.14	0.71	1.34	0.07	0.23	0.48
0.10	4.16	0.23	1.06	2.25	0.177	0.37	0.9

ϕ_{org} = fracción volúmica de acetonitrilo.

Solutos (+).

1 p OH benzoato.

2 sorbato.

4 para toluato.

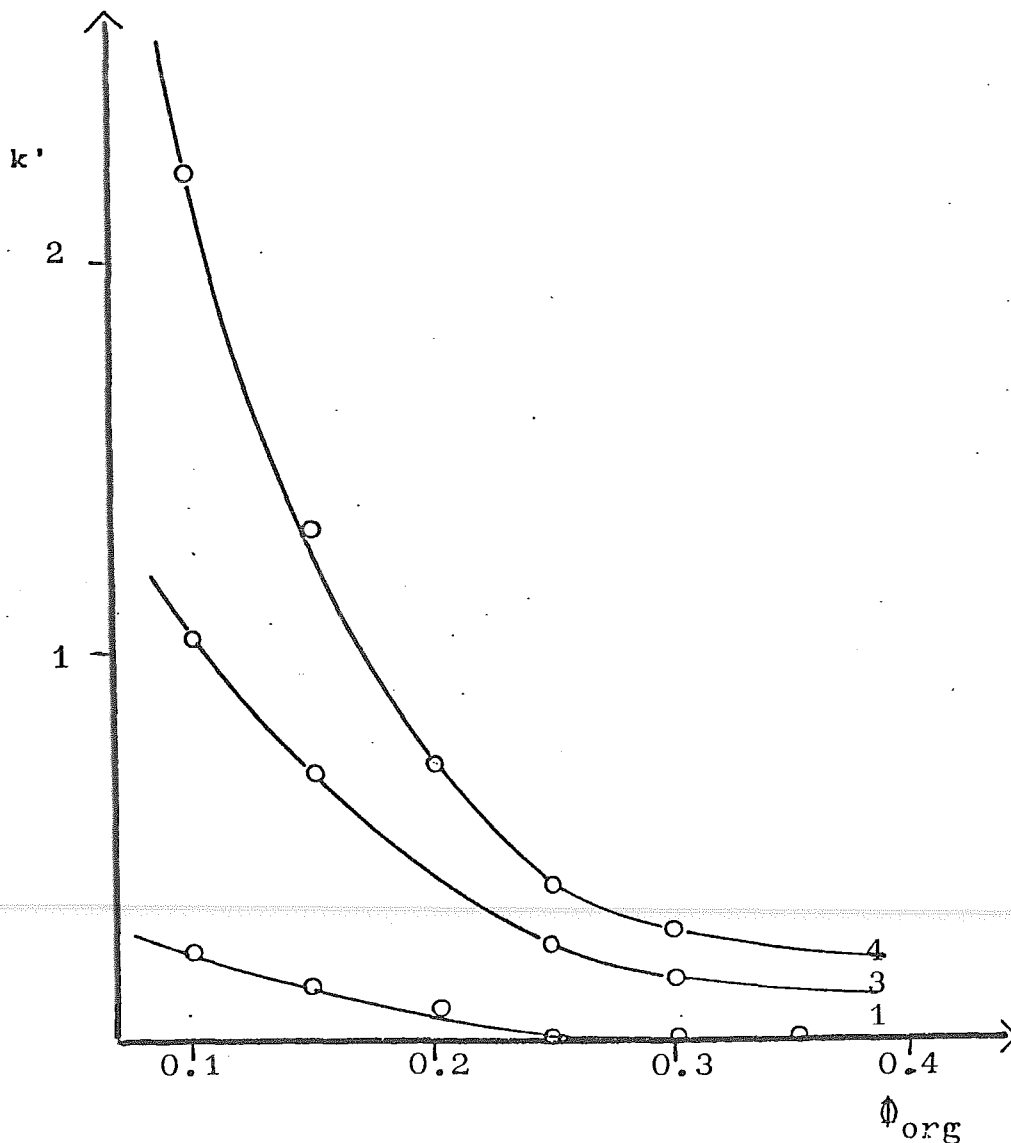


FIGURA 4.1 a

VARIACION DEL FACTOR DE CAPACIDAD EN FUNCION DE LA FRACCION VOLUMICA DE ACETONITRILLO EN LA FASE MOVIL.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d. i.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 5 μ .

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); $\phi_{org} = 0.1$; TBA 0.002 M.; acetato de amonio 0.25 M.; TBA 6×10^{-4} M.

T = 40°C.

Solutos:

1 p OH benzoato..

3 orto toluato.

4 para toluato.

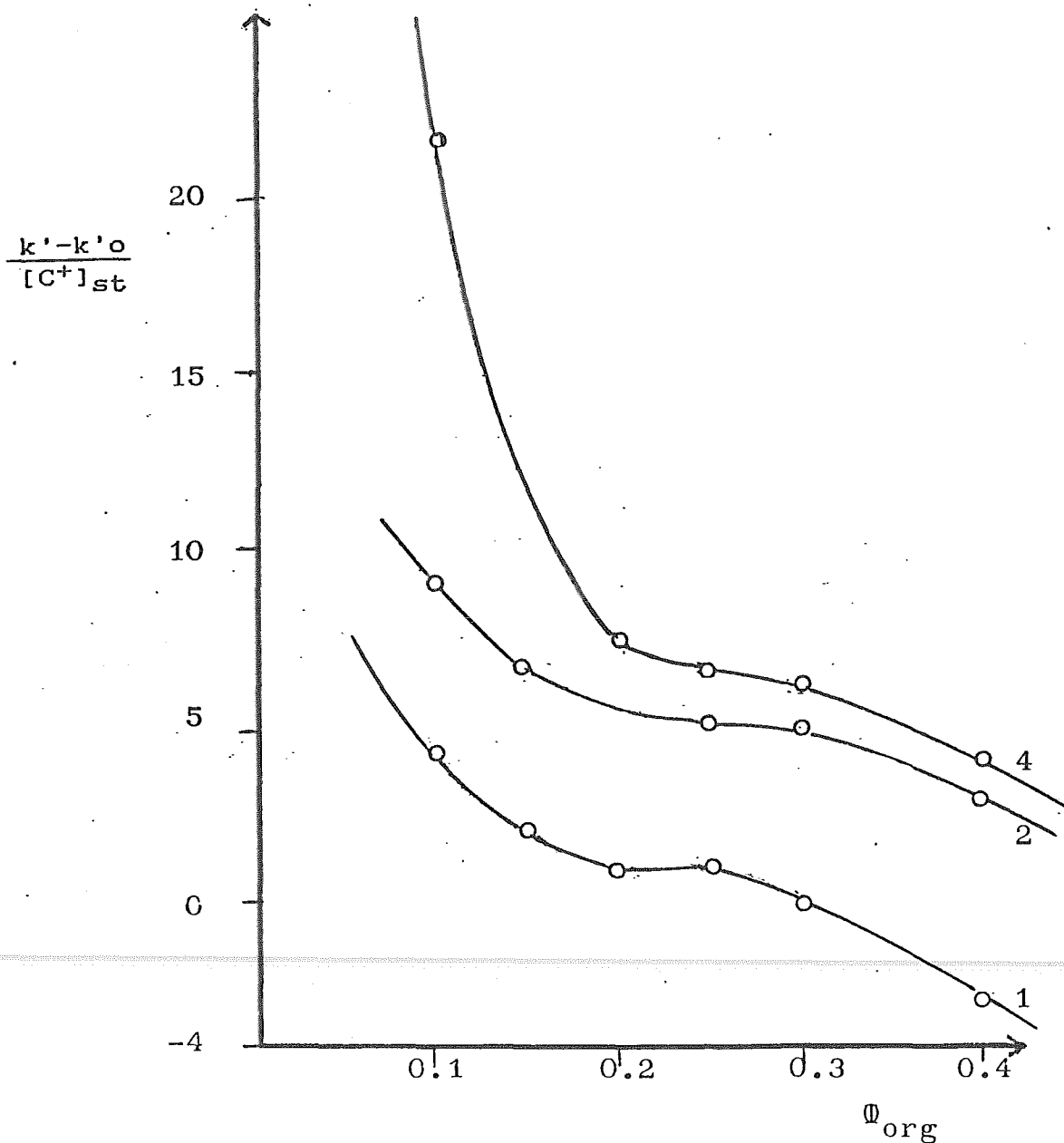


FIGURA 4.1 b

VARIACION DEL FACTOR DE CAPACIDAD NORMALIZADO EN FUNCION DE LA FRACCION VOLUMICA DE ACETONITRILLO EN LA FASE MOVIL.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d. 1.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 5 μ .

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); $\phi_{org} = 0.1$; TBA 0.002 M.; acetato de amonio 0.25 M.; TBA 6×10^{-4} M.

T = 40°C.

Solutos;

1 p OH benzoato.

2 Sorbato.

4 para toluato.

La figura 4.1 a muestra una disminución considerable del factor de capacidad de los solutos al aumentar la proporción de acetonitrilo en el eluyente. Este resultado se ajusta bien a los postulados de la teoría hidrofóbica, que rige el comportamiento de las fases hidrocarbonadas químicamente unidas; sin embargo, la relación entre el factor de capacidad y la fracción volúmica de acetonitrilo no es logarítmica a diferencia de lo que se ha reportado (58) respecto al comportamiento de los solutos en la cromatografía en fase reversa simple. Esto es de esperarse ya que esta figura ilustra el efecto del disolvente orgánico no sólo sobre la retención de los solutos, sino también sobre la adsorción del contraion.

La figura 4.1 b permite observar el efecto del modificador orgánico exclusivamente sobre la retención de los solutos (factor de capacidad normalizado). Las gráficas obtenidas muestran una disminución en la retención al aumentar la fracción volúmica de acetonitrilo en la fase móvil; sin embargo, la relación entre la retención y la proporción de acetonitrilo es muy compleja. Este comportamiento refleja el efecto del disolvente orgánico sobre las constantes de los equilibrios que intervienen en la retención en estos sistemas.

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CONTRAION SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Este estudio se efectuó determinando los factores de capacidad de los solutos de prueba para diferentes concentraciones de contraion en la fase móvil y por lo tanto a diferente concentración de contraion en la fase estacionaria; la concentración de sales y la fracción volúmica de acetonitrilo en el eluyente se mantuvieron constantes. Se hicieron 2 series de experiencias: una con TBA y otra con TPA. Los solutos de prueba fueron inyectados después de haber equilibrado la columna con la fase móvil. El intervalo de concentración de contraion estudiado se escogió de acuerdo con el dominio de variación válido en el modelo para la fijación de iones tipo tetralquilamonio, propuesto en el capítulo anterior. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 4.2 y 4.3.

Las figuras 4.2 y 4.3 muestran la relación entre los valores de los factores de capacidad de los solutos y la concentración de contraion en la fase móvil y en la fase estacionaria respectivamente.

En este último caso, la relación entre el factor de capacidad y concentración de contraion en la fase

TABLA 4.2
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TPA SOBRE LA RETENCION DE
LOS SOLUTOS.

Condiciones experimentales:
Columna: 15 cm x 4.6 mm d.i.
Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 RP 18 5 μ m.
Fase móvil: Acetonitrilo-agua (pH=7); ϕ_{org} = 0.1; TPA;
acetato de amonio 0.31 M.
T = 40°C.

[TPA] _m x10 ² (mmol/ml)	[TPA] _{st} x10 ² (mmol/g)	k' (solutos de prueba)			
		1	2	3	4
0.00	0.00	0.05 ⁺	0.69 ⁺	0.58 ⁺	1.35 ⁺
0.01	0.35	0.03	0.69	0.58	1.35
0.10	1.11	0.07	0.79	0.69	1.65
0.40	2.89	0.09	0.88	0.79	1.88
1.00	5.10	0.14	1.11	1.02	2.58
4.00	9.70	0.26	1.43	1.42	3.31

TABLA 4.3

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE TBA SOBRE LA RETENCION DE
LOS SOLUTOS.

Condiciones experimentales:
Columna: 15 cm x 4.6 mm d.i.
Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 RP 18 5 μ m.
Fase móvil: Acetonitrilo-agua (pH=7) ϕ_{org} = 0.1; TBA;
acetato de amonio 0.25 M.
T = 40°C.

[TBA] _m x10 ² (mmol/ml)	[TBA] _{st} x10 ² (mmol/g)	k' (solutos de prueba)			
		1	2	3	4
0.00	0.00	0.05 ⁺	0.69 ⁺	0.58 ⁺	1.35 ⁺
0.01	2.07	0.14	0.84	0.73	1.65
0.04	3.70	0.19	0.99	0.90	2.13
0.06	4.15	0.23	1.06	0.97	2.25
0.10	6.47	0.28	1.46	1.39	3.30
0.20	8.11	0.34	1.73	1.74	4.04
0.40	9.63	0.44	1.92	1.97	4.75

+ valores experimentales de k'o.

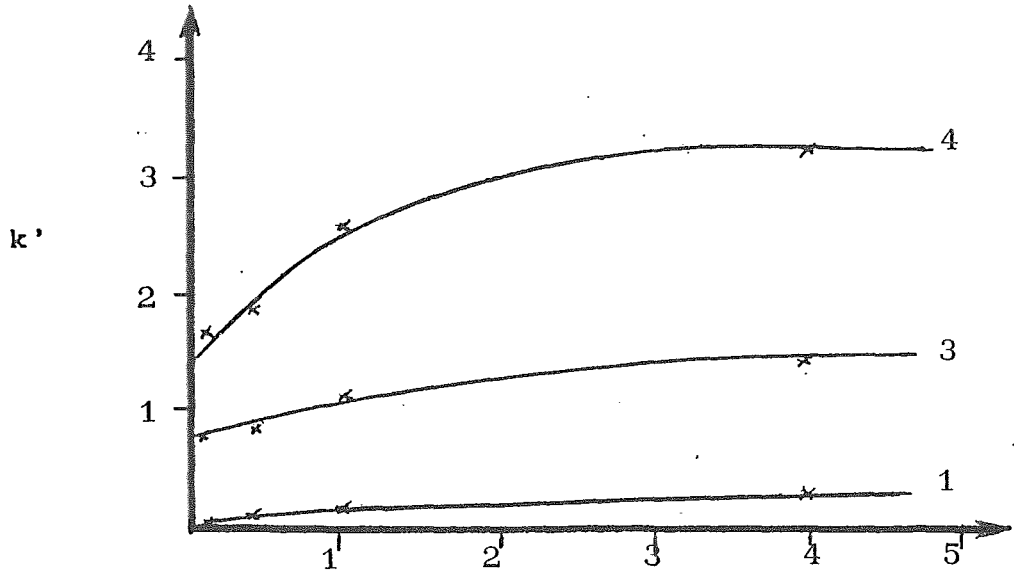
Solutos de prueba:

1 p OH benzoato.

2 sorbato.

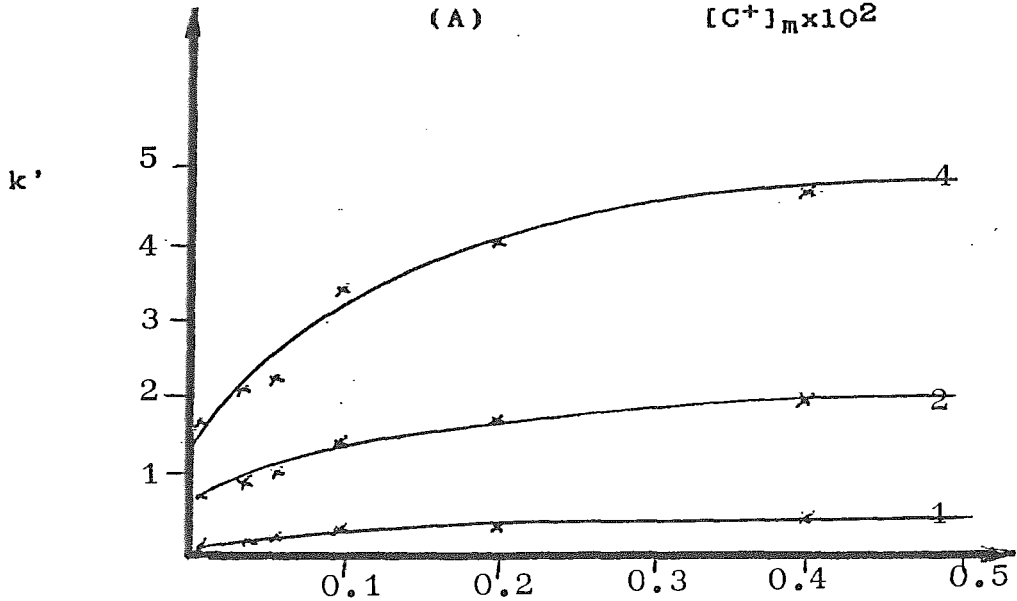
3 orto toluato.

4 para toluato.



(A)

$[C^+]_m \times 10^2$



(B)

$[C^+]_m \times 10^2$

FIGURA 4.2

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE CONTRAION EN FASE MOVIL
SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d. i.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 5 μ .

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); Φ_{org} = 0.1;
acetato de amonio (A) 0.31 M.; (B) 0.25 M.; contraion
(A) TPA, (B) TBA.

T = 40°C.

Solutos:

1 p OH benzoato.

2 Sorbato.

3 orto toluato.

4 para toluato.

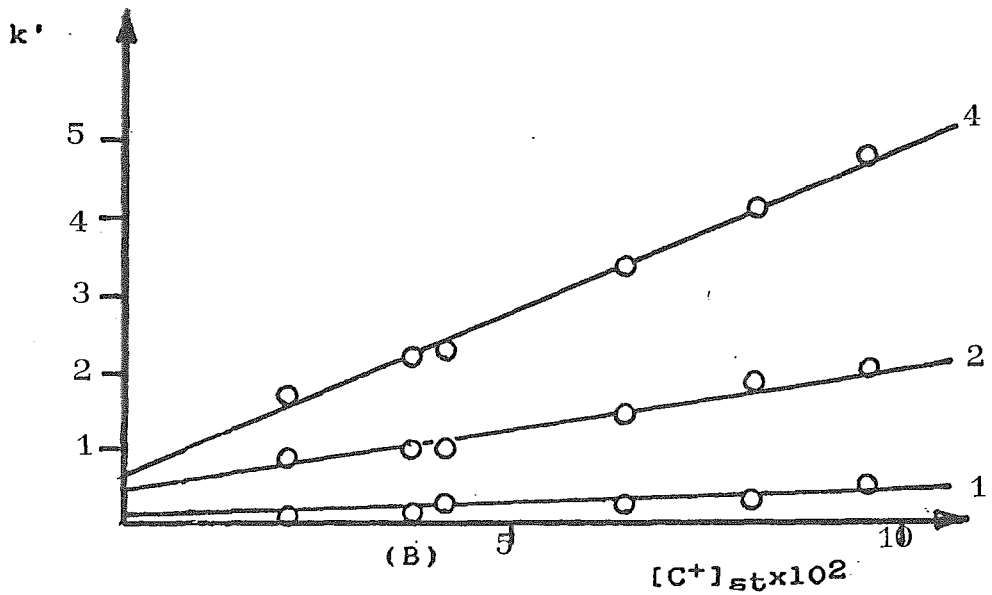
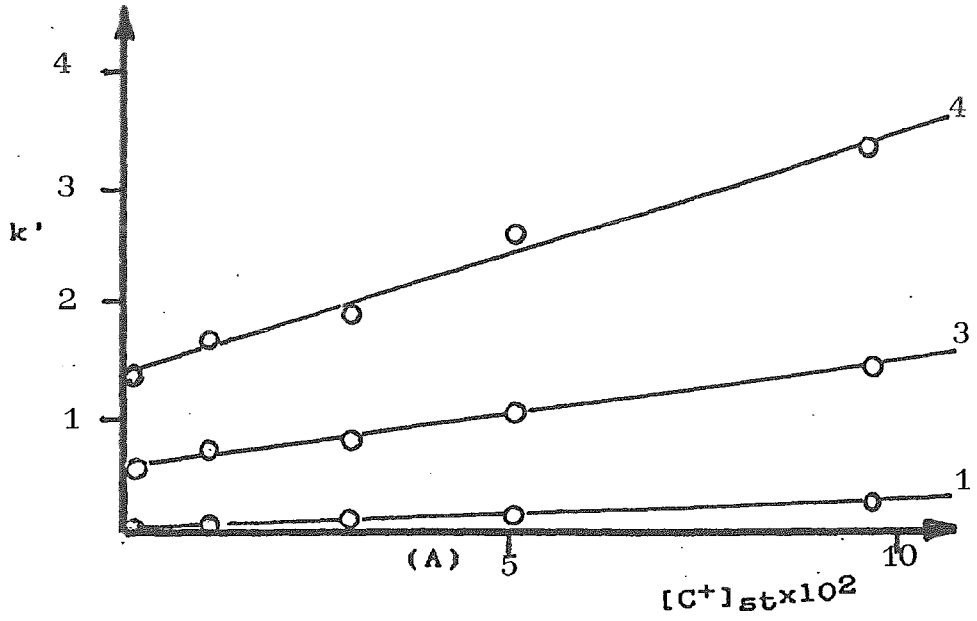


FIGURA 4.3

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE CONTRAION EN FASE ESTACIONARIA SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d. i.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 5 μ m.

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); $\phi_{org} = 0.1$; acetato de amonio (A) 0.31 M.; (B) 0.25 M.; contraion

(A) TPA, (B) TBA.

T = 40°C.

Solutos: 1 p OH benzoato; 2 sorbato, 3 o toluato, 4 para toluato.

estacionaria es lineal y se puede representar por la ecuación:

$$k' = A + B[C^+]_{st} \quad (4.1)$$

Para todos los solutos estudiados se observa un aumento en la retención de los solutos al aumentar la concentración de contraion, ya sea en la fase móvil, (fig. 4.2) ó adsorbido (fig. 4.3).

En la tabla 4.4 se muestran los parámetros de regresión derivados de la aplicación de la ecuación 4.1 a los valores de retención mostrados en las tablas 4.2 y 4.3.

TABLA 4.4

PARAMETROS DE REGRESION OBTENIDOS AL APLICAR LA RELACION $k' = A + B[C^+]_{st}$ A LOS VALORES DE k' DE LAS TABLAS 4.2 y 4.3.

Solute	Ordenada al origen		Pendiente		Coeficientes de correlación	
	TPA	TBA	TPA	TBA	TPA	TBA
p OH benzoato	0.03	0.06	2.30	3.71	0.995	0.988
Sorbato	0.68	0.47	7.84	15.1	0.996	0.996
Orto toluato	0.56	0.30	8.84	17.2	0.998	0.995
Para toluato	1.36	0.63	20.8	42.1	0.991	0.997

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALES EN LA FASE MOVIL
SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

En este estudio se midió la retención de los solutos de prueba a diferentes concentraciones de acetato de amonio en el eluyente; primero sin contraion y después con una concentración constante, 2×10^{-3} M., de TBA. La proporción de acetonitrilo en la fase móvil fué de 10% en todos los casos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.5 y en la figura 4.4. En ambos casos se presenta el valor de la retención normalizada, (función $(k' - k'_o) / [C^+]_{st}$), para cada concentración del ion acetato en la fase móvil, $(P^-)_m$.

TABLA 4.5

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALES DISUELTAS EN LA
FASE MOVIL SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d.i.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7, 5 μ m.

Fase móvil: Acetonitrilo-agua (pH=7); $\phi_{org} = 0.1$; TBA 2×10^{-3} M.; acetato de amonio.

T = 40°C.

$(P^-)_m$ $[CH_3COO^-]_m$ (mmol/ml)	$((k' - k'_o) / [C^+]_{st})$			
	Solutos de prueba			
	1	2	3	4
0.05	15.6	58.8	61.6	199.0
0.10	8.61	32.1	33.5	77.0
0.30	3.13	12.1	13.7	31.9
0.40	3.69	10.4	12.1	27.5
0.50	2.19	6.72	7.99	21.0

Solutos:

1 p OH benzoato.

2 sorbato.

3 orto toluato.

4 para toluato.

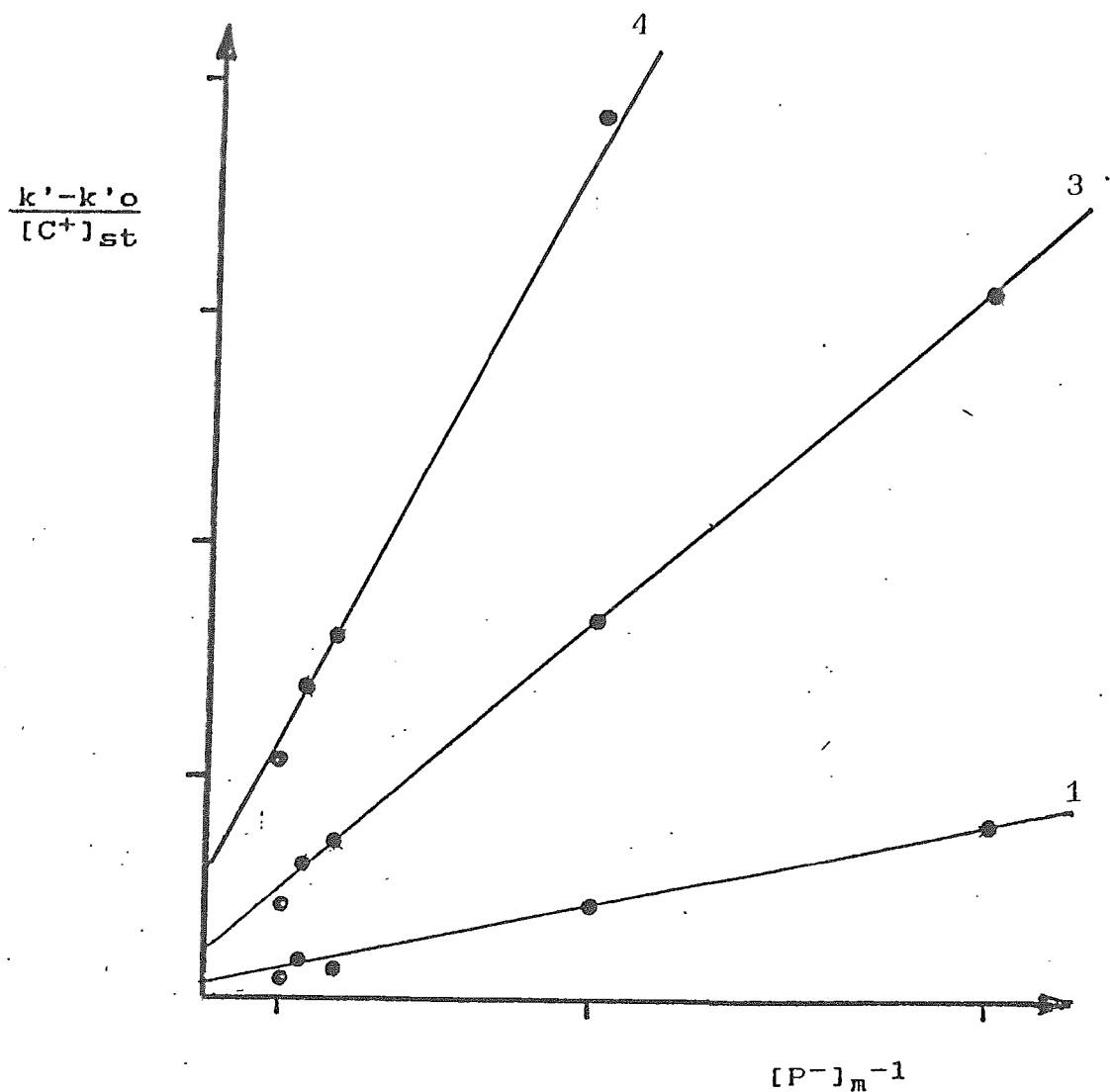


FIGURA 4.4

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE SALES EN FASE MOVIL SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d. i.

Fase estacionaria: Supelcosil LC-7 5 μ .

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); $\Phi_{org} = 0.1$; TBA 0.002 M.; acetato de amonio

T = 40°C.

Solutos:

1 p OH benzoato.

3 orto toluato.

4 para toluato.

El comportamiento de los solutos en estos experimentos puede expresarse mediante la relación:

$$\frac{k'-k'_o}{[C^+]_{st}} = C + D[P^-]_m^{-1} \quad (4.2)$$

donde:

C y D son constantes que dependen de las condiciones de operación en cada caso.

$[P^-]_m$ es la concentración de ion acetato en la fase móvil.

Esta dependencia de la retención de los solutos en la concentración de sales en la fase móvil puede deberse a que los iones de la misma carga que el soluto, (co-iones), disueltos en la fase móvil, entran en competencia con los solutos para asociarse al contraion fijado.

La tabla 4.6 muestra los parámetros de regresión derivados de la aplicación de la relación 4.2 a los datos de la tabla 4.5

TABLA 4.6

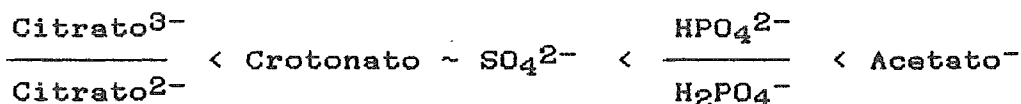
PARAMETROS DE REGRESION DERIVADOS DE APLICAR LA RELACION $((k'-k'_o)/[C^+]_{st}) = C + D[P^-]_m^{-1}$, A LOS DATOS DE LA TABLA 4.5.

Soluto	Ordenada al origen	Pendiente	Coefficientes de correlación
p OH benzoato	1.15	0.726	0.996
Sorbato	2.53	2.84	0.999
Orto toluato	3.77	2.91	0.999
Para toluato	10.2	6.48	0.9995

EFFECTO DE LA NATURALEZA DEL CO-ION SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Para examinar la influencia del tipo de co-ion disuelto sobre la retención, se determinaron los factores de capacidad de los solutos de prueba en presencia de diferentes sales disueltas en la fase móvil. En todos los experimentos se usó una fase móvil que contenía acetato de amonio 0.01 M. para fijar el pH; una sal del anión por estudiar a una concentración 0,04 M.; TBA a concentración 2×10^{-3} M. y una fracción volúmica de acetonitrilo de 0.2. La temperatura se fijó a 40°C. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.7 y en la figura 4.5.

La figura 4.5 muestra que para todos los solutos, la retención aumenta en el orden siguiente:



Estos resultados permiten deducir que el efecto competitivo del co-ion aumenta con su carga y su hidrofobicidad.

TABLA 4.7

EFFECTO DEL USO DE DIFERENTES SALES SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Co-ion	$(k' - k'_0) / [C^+]_{st}$			
	Solutos*			
	1	2	3	4
Acetato	16.7	46.9	46.8	84.4
Fosfato	10.7	32.1	32.7	59.7
Sulfato	9.94	29.1	28.8	52.6
Crotonato	--	29.4	28.7	51.4
Citrato	6.99	21.1	23.0	42.1

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d.i.

Fase estacionaria: Rsil RP 8 5µm.

Fase móvil: Acetonitrilo-agua (pH=7); TBA 2×10^{-3} M.; $\phi_{org} = 0.2$; sal por estudiar 0.04 M.; acetato de amonio 0.01 M.

T = 40°C.

*Solutos:

1 p OH benzoato.

2 sorbato.

3 orto toluato.

4 para toluato.

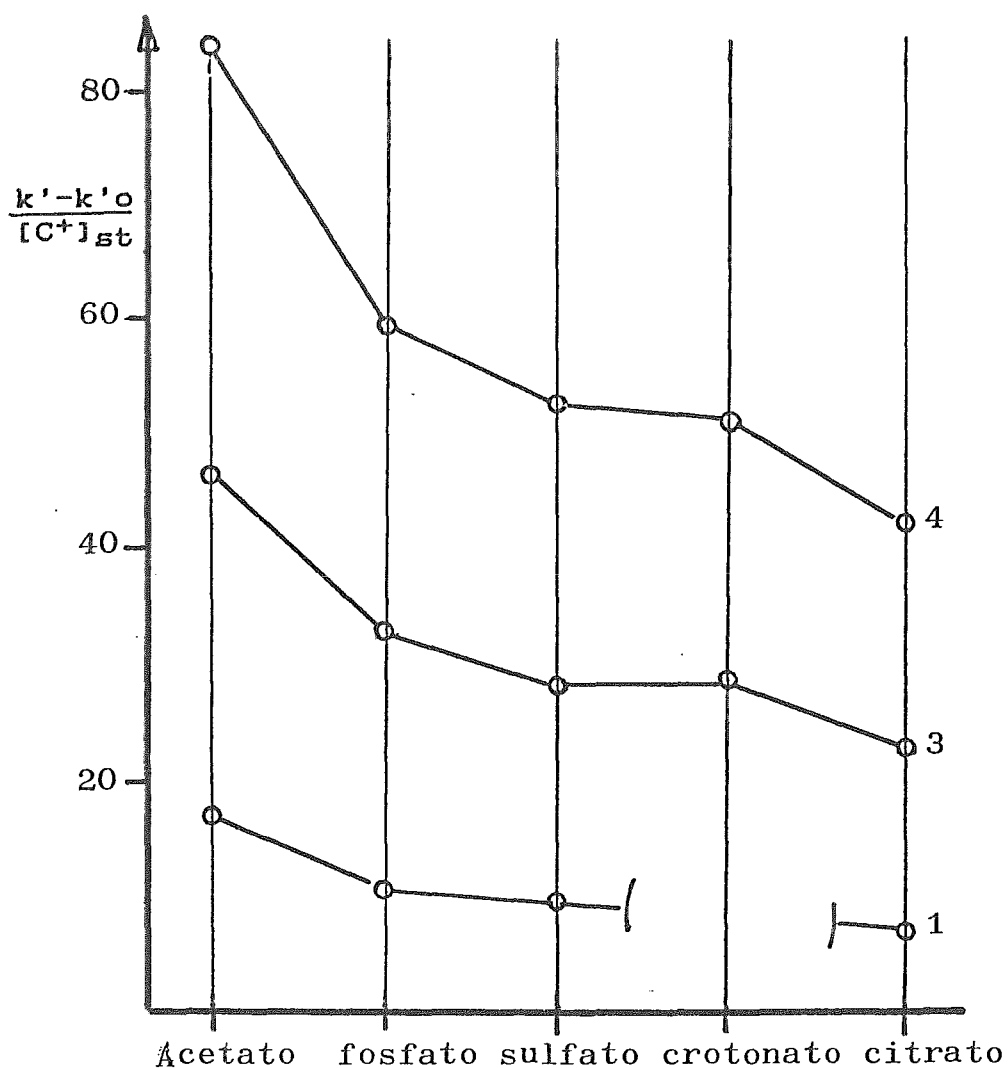


FIGURA 4.5

EFFECTO DEL USO DE DIFERENTES SALES DISUELTAS EN LA FASE MOVIL SOBRE LA RETENCION DE LOS SOLUTOS.

Condiciones:

Columna: 15 cm x 4.6 mm d. i.

Fase estacionaria: Rsil RP 18-7 5µm.

Fase móvil: acetonitrilo-agua (pH = 7); $\phi_{org} = 0.1$; TBA 0.002 M.; acetato de amonio 0.01 M; sal por estudiar 0.04 M.

T = 40°C.

Solutos;

1 p OH benzoato.

3 orto toluato.

4 para toluato.

DISCUSION.

Para deducir el mecanismo responsable de la retención de los solutos en cromatografía por pares de iones con contraiones hidrófobos de forma globular, como los iones tetralquil-amonio, se hará un examen, en primer lugar, de las relaciones que se derivan de los 2 principales mecanismos propuestos; y se hará posteriormente una comparación con nuestros resultados experimentales.

1. Formación de pares de iones en la fase móvil o en la interfase, previamente a su adsorción sobre la fase estacionaria.

En este mecanismo se considera que el par de iones soluto-contraion se forma en la fase móvil o en la interfase y es adsorbido reversiblemente sobre la fase estacionaria apolar.

Sea C^+ un contraion catiónico y S^- un soluto aniónico inicialmente presentes en la fase móvil, la cual contiene además otros cationes y aniones provenientes del buffer o de otras sales disueltas. Se supone que en el sistema tienen lugar los siguientes equilibrios:

- Adsorción del soluto independiente del contraion:



$$K_o = \frac{[S^-]_{st}}{[S^-]_m} \quad (4.4)$$

$$k'o = \phi K_o = \phi \frac{[S^-]_{st}}{[S^-]_m} \quad (4.5)$$

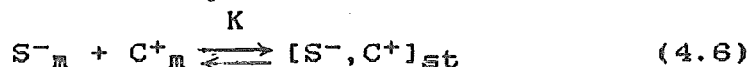
donde:

K_o es la constante de equilibrio de retención del soluto en ausencia de contraion.

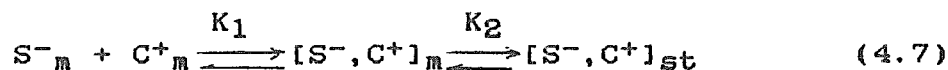
$k'o$ es el factor de capacidad del soluto en ausencia del contraion y

ϕ es la relación de fases.

- Retención del soluto en presencia de contraion.



o bien:



Globalmente, el coeficiente de distribución del soluto en presencia de contraion, es en el primer caso, (ec. 4.6) :

$$K_s = \frac{[S^-']_{st}}{[S^-']_m} = \frac{[S^-]_{st} + [C^+, S^-]_{st}}{[S^-]_m} \quad (4.8)$$

y el factor de capacidad queda expresado por:

$$k' = \Phi K_s = k'o + \Phi K [C^+]_m \quad (4.9)$$

En el segundo caso (ec. 4.7):

$$K_s = \frac{[S^-']_{st}}{[S^-']_m} = \frac{K_o + K_1 K_2 [C^+]_m}{1 + K_1 [C^+]_m} \quad (4.10)$$

y el factor de capacidad es:

$$k' = \frac{k'o + \Phi K_1 K_2 [C^+]_m}{1 + K_1 [C^+]_m} \quad (4.11)$$

donde:

Φ es la relación de fases.

$[S^-']_{st}$ representa la concentración total de soluto en fase estacionaria.

$[S^-']_m$ es la concentración total de soluto en la fase móvil.

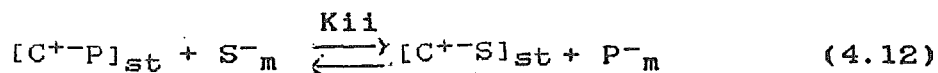
Nuestros resultados experimentales, presentados en la figura 4.2, muestran que la relación 4.9 no se cumple. En efecto, la relación entre factor de capacidad y concentración de contraion en fase móvil no es lineal. Por otra parte, la figura 4.4 muestra una dependencia muy marcada de la retención de los solutos en la concentración de las sales disueltas en la fase móvil, $[P^-]_m$, no obstante que se trabajó con una concentración de contraion en el eluyente, constante.

El efecto que ejercen las sales disueltas en la fase móvil sobre la retención de los solutos, no puede ser atribuido a cambios en los valores de $k'o$, que son muy pequeños, de modo que concluimos que la ecuación 4.11, no representa el mecanismo de retención en nuestro caso.

2. Intercambio de iones dinámico.

Este modelo propone que previamente a la inyección del soluto, el contraion se ha fijado sobre las fase estacionaria, debido al efecto hidrófobo que experimenta por su gran superficie hidrocarbonada; este contraion adsorbido está asociado a iones pequeños, de carga opuesta, provenientes de las sales disueltas en la fase móvil (co-iones). De este modo, la fase estacionaria queda convertida en un intercambiador de iones dinámico, donde los solutos compiten con los iones de la misma carga, disueltos en la fase móvil, para asociarse al contraion fijado. Este mecanismo conduce a los siguientes equilibrios:

- Equilibrio de intercambio iónico:



$$K_{ii} = \frac{[C^{+-}S]_{st} [P^-]_m}{[S^-]_m [C^{+-}P]_{st}} \quad (4.13)$$

donde:

K_{ii} es la constante de intercambio iónico.

El coeficiente global de distribución del soluto, K_s , considerando la retención del soluto independiente del contraion está dado por:

$$K_s = \frac{[S^-]_{st} + [C^{+-}S]_{st}}{[S^-]_m} = K_o + K_{ii} \frac{[C^{+-}P]_{st}}{[P^-]_m} \quad (4.14)$$

De donde el factor de capacidad del soluto se expresa:

$$k' = k'o + \phi K_{ii} \frac{[C^{+-}P]_{st}}{[P^-]_m} \quad (4.15)$$

La ecuación 4.15 indica que, si la concentración de sales en la fase móvil se mantiene constante, la relación $k' = f([C^+]_{st})$ deberá corresponder a una recta con $k'o$ como ordenada al origen y:

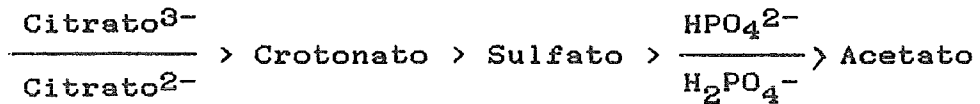
$$\phi \times K_{ii} = \text{pendiente} \times [P^-]_m \quad (4.16)$$

Por otra parte, si la concentración de contraion en la fase estacionaria y la concentración de sales en la fase móvil, cambian, la función:

$$\frac{k' - k'o}{[C^+]_{st}} = f([P^-]_m^{-1}) \quad (4.17)$$

debería dar lugar a una línea recta que pasa por el origen y con pendiente igual a ϕK_{ii} .

Las figuras 4.3 y 4.4 representan estos 2 tipos de experimentos y muestran que nuestros resultados siguen los comportamientos lineales predichos por la ecuación 4.15, para todos los solutos estudiados. Además, a través del estudio de diferentes co-iones, se encontró que el orden de afinidad de la fase estacionaria para los aniones analizados es el mismo que se ha establecido para las resinas de intercambio de aniones fuertes, es decir:



Por lo tanto, debemos concluir que en cromatografía de pares de iones usando contraiones hidrófobos, el mecanismo de intercambio iónico participa definitivamente en la retención de los solutos; sin embargo, el análisis de las ordenadas al origen y de las pendientes, (tablas 4.8 y 4.9), sugiere que el intercambio iónico no es el único mecanismo involucrado en la retención de los solutos. Otro fenómeno, -cuya importancia aumenta cuando aumentan la hidrofobicidad del soluto y del contraion-, contribuye también apreciablemente a la retención.

En los experimentos ilustrados en la figura 4.3, se trabajó a concentración constante de sales en el eluyente, variando la concentración de contraion en la fase móvil y consecuentemente, en la fase estacionaria.

En la tabla 4.8 se comparan los valores experimentales de k'_{o} para los 4 solutos, con las ordenadas al origen de las rectas de regresión presentadas en esta figura. Se puede observar que con el contraion TPA, los 2 juegos de valores son similares, pero con el contraion TBA, las ordenadas al origen son significativamente menores que los valores de k'_{o} ; y esta diferencia es mas marcada para los solutos mas hidrófobos.

En la tabla 4.9 se reportan los valores del producto (pendiente x $[P^-]_m$) para cada soluto, con los contraiones TPA y TBA, tomados de la figura 4.3. Este producto representa, según la ecuación 4.15, la estimación de la constante de intercambio iónico. Tomando en consideración que el intercambio iónico es un fenómeno fundamentalmente eléctrico, K_{ii} debiera ser independiente del área hidrocarbonada del contraion

TABLA 4.8

ANALISIS DE LA ORDENADA AL ORIGEN EN LA FUNCION
 $k' = f([C^+]_{st})$

Solutos	k'o	*ordenada al origen con TPA	**ordenada al origen con TBA
1. p OH benzoato	0.05	0.03	0.08
2. sorbato	0.69	0.68	0.47
3. orto toluato	0.58	0.56	0.30
4. para toluato	1.35	1.36	0.63

* Concentración de acetato de amonio 0.31 M.

** Concentración de acetato de amonio 0.25 M.

TABLA 4.9

ANALISIS DE LAS PENDIENTES DE LAS FIGURAS 4.3 y 4.4

A: producto (pendiente x $[P^-]_m$) para TPA y TBA.

Fase móvil: $[P^-]_m$ constante; $[C^+]$ variable.

Fase estacionaria: $[C^+]$ variable.

B: pendiente usando TBA como contraion.

Fase móvil: $[P^-]_m$ variable; [TBA] constante.

Fase estacionaria: [TBA] ligeramente variable.

Solutos	"A" (figura 4.3)		"B" (figura 4.4)
	TPA	TBA	
1. p OH benzoato	0.713	0.93	0.726
2. Sorbato	2.43	3.78	2.84
3. Orto toluato	2.74	4.30	2.91
4. Para toluato	6.45	10.5	6.48

previamente adsorbido; sin embargo, se observa que el contraion más voluminoso conduce a valores mayores de ΦK_{ii} ; y la diferencia entre ambos juegos de valores aumenta con la hidrofobicidad del soluto.

La figura 4.4 corresponde al segundo tipo de experimentos. La retención de los solutos se determinó usando TBA como contraion a concentración constante en el eluyente y ligeramente variable en la fase estacionaria, haciendo variar la concentración de sales en la fase móvil. Se puede observar en esta figura, así como en la tabla 4.6 que las rectas correspondientes a cada uno de los solutos no pasan por el origen. Esto parece indicar que existe un segundo mecanismo de retención, independiente de la concentración de sales en el eluyente, que se superpone al mecanismo de intercambio iónico.

Una evidencia más de la coexistencia de un segundo mecanismo de retención, se tiene al comparar las pendientes de las rectas de la figura 4.4, con los valores obtenidos para el producto (pendiente $\times [P^-]_m$) de la figura 4.3 B, como se muestra en la tabla 4.9.

Estos juegos de valores se refieren al contraion TBA y a los mismos solutos; y deberían representar, ambos, el valor de la constante de intercambio iónico, si el mecanismo de retención fuera intercambio iónico puro; sin embargo, estos valores difieren marcadamente entre sí y la diferencia relativa es tanto más grande cuanto mayor es la hidrofobicidad del soluto.

Por otra parte, en la tabla 4.9 se puede apreciar que el conjunto de valores derivados de la figura 4.4 es sorprendentemente similar a los valores del producto (pendiente $\times [P^-]_m$) derivados de la figura 4.3 A para el contraion TPA.

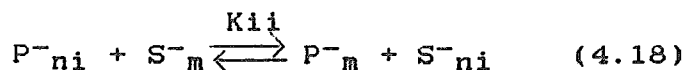
PROPOSICION DE UN MODELO DE RETENCION.

De acuerdo con la discusión anterior, no puede rechazarse la existencia de un mecanismo de intercambio iónico, el cual, bajo ciertas condiciones, va acompañado por un segundo mecanismo de retención. Para poder explicar estos fenómenos se propone que la fase estacionaria sea considerada como una doble capa formada por una superficie iónica y una nube iónica difusa asociada (figura 4.6).

La superficie iónica está constituida por las cadenas hidrocarbonadas y por el contraion adsorbido. La nube iónica difusa está formada principalmente por co-iones.

El soluto puede entrar a la fase estacionaria por 2 caminos diferentes:

1o. Atraído por la superficie iónica, el soluto puede entrar a la nube iónica difusa desplazando a un co-ion (intercambio iónico). Este mecanismo se representa por el equilibrio:



la constante de intercambio iónico se expresa por:

$$K_{ii} = \frac{[P^{-}]_m [S^{-}]_{ni}}{[P^{-}]_{ni} [S^{-}]_m} \quad (4.19)$$

donde el subíndice ni representa a la nube iónica difusa.

Dado que la inyección del soluto es analítica, se cumple que:

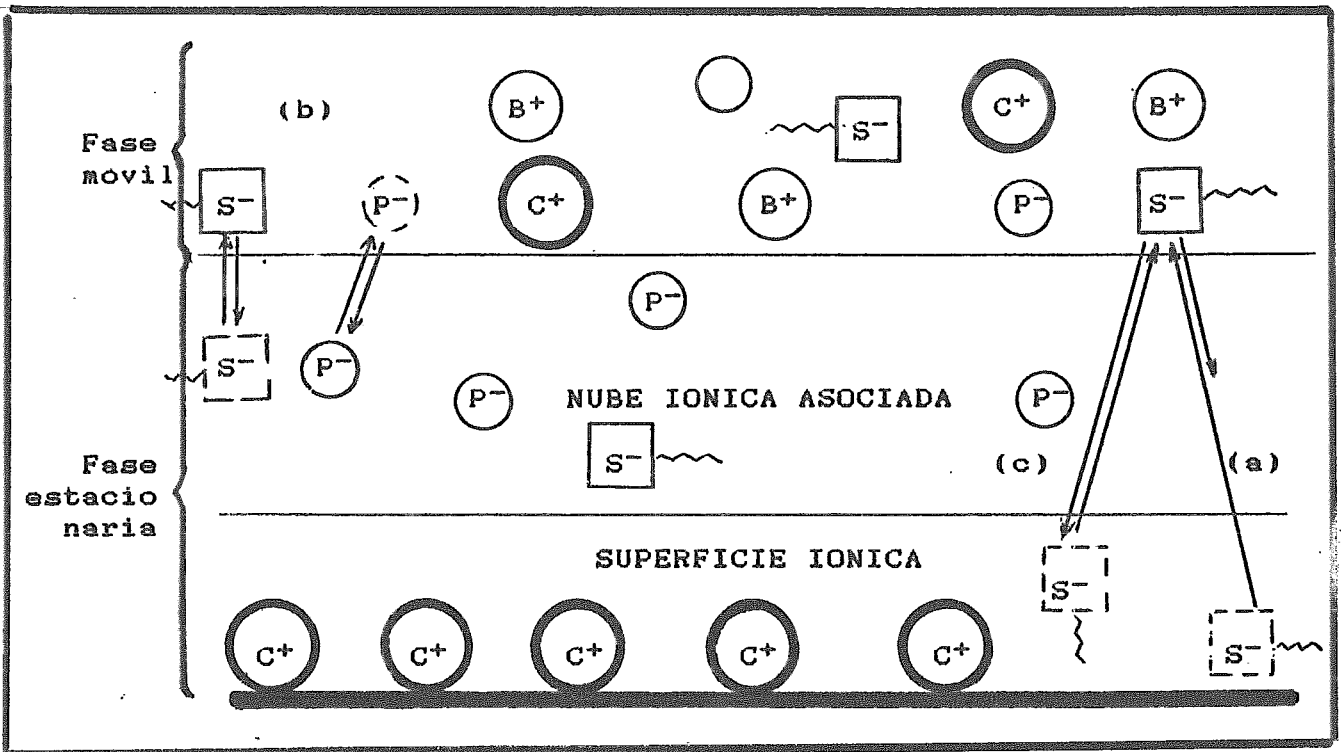
$$[S^{-}]_{ni} \ll [P^{-}]_{ni} \quad (4.20)$$

como la doble capa es eléctricamente neutra, se puede establecer que:

$$[P^{-}]_{ni} \sim [C^{+}]_{st} \quad (4.21)$$

de donde el coeficiente de distribución del soluto se expresa por:

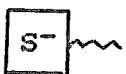
$$K_s = \frac{[S^{-}]_{ni}}{[S^{-}]_m} = K_{ii} \frac{[C^{+}]_{st}}{[P^{-}]_m} \quad (4.22)$$



(a) Adsorción directa del soluto sobre la superficie de la fase estacionaria (poco probable con solutos de pequeña superficie hidrocarbonada).

(b) Intercambio Iónico (depende de la concentración de sales en la fase móvil y de la carga de la superficie iónica).

(c) Formación de par iónico sobre la superficie de la fase estacionaria (depende de la hidrofobicidad del soluto y del contraion).



Soluto aniónico.



Contraion catiónico voluminoso.



Anión del buffer.



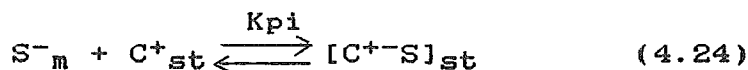
Catión del buffer.

FIGURA 4.6
MODELO SUPERFICIE IÓNICA-DOBLE CAPA.

De acuerdo con nuestros resultados, cuando el contraion no es fuertemente hidrófobo, el mecanismo de intercambio iónico es el único que interviene en la retención de los solutos. En este caso, el factor de capacidad para el soluto se expresa por la relación típica para un intercambiador de iones puro:

$$k'(1) = k'o + \phi K_{ii} \frac{[C^+]_{st}}{[P^-]_m} \quad (4.23)$$

2o. Cuando el contraion presente en la superficie de la fase estacionaria posee una área hidrocarbonada mayor, los efectos hidrófobos que experimentan tanto el contraion adsorbido como el soluto que se encuentra en la fase móvil, promueven el paso de este último directamente hasta la superficie iónica, dando lugar a la formación de pares de iones. El equilibrio que expresa este proceso es el siguiente:



$$K_{pi} = \frac{[C^+S^-]_{st}}{[S^-]_m [C^+]_{st}} \quad (4.25)$$

donde el subíndice pi se refiere a la formación del par de iones.

La estabilidad del par de iones formado depende fundamentalmente de la estructura del soluto y de la hidrofobicidad de soluto y contraion. Nuestros resultados experimentales indican que la contribución de este mecanismo a la retención de los solutos queda representada por una relación del tipo:

$$k'(2) = -Z + \phi K_{pi} [C^+]_{st} \quad (4.26)$$

donde Z es una constante que depende de la naturaleza del soluto y del contraion. Los estudios realizados no nos permiten dar una interpretación física del término negativo en esta ecuación, pero experimentalmente se ha observado que, en cromatografía de pares de iones con contraiones de alta hidrofobicidad; y en presencia de fases móviles pobres en disolvente orgánico, la retención se ve afectada por ese factor.

En una investigación anterior (52) con alquilsulfonatos como contraiones, se encontró una relación lineal entre k' y $[C^+]_{st}$. Las ordenadas al origen para algunos solutos con octil sulfonatos como contraiones, corresponden a los valores de $k'o$, pero con contraiones altamente hidrófobos como el dodecil sulfonato, las ordenadas al origen son francamente negativas.

Cuando existe formación de pares de iones en la superficie de la fase estacionaria, los 2 mecanismos mencionados contribuyen a la retención de los solutos, es decir:

$$k' = k'(1) + k'(2) \quad (4.27)$$

por lo que:

$$k' = F + \left[\phi K_{pi} + \phi K_{ii} [P^-]_m^{-1} \right] [C^+]_{st} \quad (4.28)$$

ó bien:

$$\frac{k' - F}{[C^+]_{st}} = \phi K_{pi} + \phi K_{ii} [P^-]_m^{-1} \quad (4.29)$$

donde:

$$F = k'o - Z \quad (4.30)$$

PRUEBA DEL MODELO.

Los valores del término "F" del modelo propuesto fueron obtenidos para cada soluto a partir de las ordenadas al origen de las rectas de regresión mostradas en la figura 4.3 B, (tabla 4.8 para TBA). Estos valores se usaron junto con los datos de los experimentos a diferentes concentraciones de sal, (tabla 4.5), para calcular la función $[(k' - F) / [C^+]_{st}]$.

Aplicando la ecuación del modelo propuesto (ec. 4.29), se obtuvieron las siguientes ecuaciones de regresión para cada soluto:

p OH benzoato	$\frac{k'-0.06}{[C^+]_{st}} = 1.34 + 0.65 \frac{1}{[P^-]_m}$	r=0.996
Sorbato	$\frac{k'-0.48}{[C^+]_{st}} = 4.88 + 2.7 \frac{1}{[P^-]_m}$	r=0.999
orto toluato	$\frac{k'-0.31}{[C^+]_{st}} = 7.03 + 2.81 \frac{1}{[P^-]_m}$	r=0.999
para toluato	$\frac{k'-0.64}{[C^+]_{st}} = 19.1 + 6.39 \frac{1}{[P^-]_m}$	r=0.999

En estas ecuaciones, el primer término numérico representa a la constante de equilibrio de formación de pares de iones, (ϕK_{pi}), y el segundo se refiere a la constante de equilibrio de intercambio iónico, (ϕK_{ii}). Con estos valores se calculó la función ($\phi K_{pi} + \phi K_{ii}[P^-]_m^{-1}$), (para $[P^-]_m=0.25$ M.), que representa la pendiente en la ecuación 4.28. Cabe hacer énfasis en el hecho de que estas constantes fueron obtenidas de una serie de experimentos con TBA como contraion, donde:

$[C^+]_m$ se mantuvo constante y
 $[P^-]_m$ variable.

Estos valores, reportados en la tabla 4.10, pueden compararse con los de las rectas de regresión mostradas en la figura 4.3 B y en la tabla 4.4, que provienen de experimentos realizados bajo las condiciones siguientes;

$[TBA]_m$ variable y
 $[P^-]_m$ constante.

(Por claridad, los valores de las pendientes de estas rectas se reportan de nuevo en la tabla 4.10)

La similitud en estas 2 series de valores indica que el modelo propuesto es coherente con todos los resultados experimentales obtenidos en este estudio.

TABLA 4.10

Solutos	Valores deducidos en la ecuación $k'-k'o = f \frac{1}{[C]_{st} [P]_m}$		Pendiente calculada a $[P^-]_m = 0.25$ según ec. 4.28	Pendiente observada a $[P^-]_m = 0.25$ en $k' = f[C^+]_{st}$ (figura 4.3)
	ϕK_{pi}	ϕK_{ii}	$\phi K_{pi} + \frac{\phi K_{ii}}{[P]_m}$	
p OH benzoato	1.34	0.65	3.94	3.71
Sorbato	4.88	2.70	15.67	15.1
Orto toluato	7.03	2.81	18.30	17.2
Para toluato	19.10	6.39	44.70	42.1

TABLA 4.11

COMPARACION DEL VALOR DE LA CONSTANTE DE INTERCAMBIO IONICO, K_{ii} , DETERMINADA PARA TPA MEDIANTE EL PRODUCTO (PENDIENTE $\times [P^-]_m$), CON EL VALOR DE ϕK_{ii} , DEDUCIDO MEDIANTE EL MODELO, USANDO EL CONTRAION TBA.

Solutos	(Pendiente $\times [P^-]_m$ (tabla 4.9) TPA	ϕK_{ii} (tabla 4.10) TBA
p OH benzoato	0.713	0.65
Sorbato	2.43	2.70
Orto toluato	2.74	2.81
Para toluato	6.45	6.39

La tabla 4.11 muestra la comparación del valor de la constante de intercambio iónico (ϕK_{ii}), determinada mediante el producto Pendiente $\times [P^-]_m$, obtenido experimentalmente con el contraion TPA, (tabla 4.9), y el valor de ϕK_{ii} , deducido mediante el modelo con el contraion TBA, (tabla 4.10). Ambos conjuntos de valores son muy semejantes, lo que nos indica que la tendencia de los solutos estudiados a formar pares de iones con TPA, en la superficie de la fase estacionaria, es insignificante; es decir, que en presencia del contraion TPA, cuya molécula no es suficientemente hidrófoba, los solutos estudiados son retenidos exclusivamente por un mecanismo de intercambio iónico "puro". Este hecho no excluye la posibilidad de que, con solutos más hidrófobos, pueda presentarse también el mecanismo de formación de pares de iones en la superficie de la fase estacionaria, ya que este segundo mecanismo depende de la hidrofobicidad de ambas entidades: soluto y contraion.

CONCLUSIONES.

En cromatografía por pares de iones, usando contraiones hidrófobos, la retención de los solutos iónicos se lleva a cabo por 2 diferentes mecanismos, dependiendo de la naturaleza del soluto y del contraion.

El primero es el de intercambio iónico, en el cual el soluto desplaza a los co-iones de la nube iónica difusa que se encuentra asociada eléctricamente a la superficie de la fase estacionaria; la cual a su vez está formada por las cadenas hidrocarbonadas y los contraiones adsorbidos.

El segundo está basado en la formación de pares de iones entre el soluto y el contraion adsorbido, en la superficie del empaque.

El primer mecanismo se efectúa a cualquier composición de la fase móvil y en presencia de cualquier contraion, siempre y cuando se cumpla la condición de que este último se adsorba apreciablemente en la fase estacionaria. Los parámetros determinantes en este mecanismo son:

- La cantidad de contraion adsorbido (capacidad de intercambio).
- La concentración de sales disueltas en la fase móvil (cantidad de co-iones competitivos).
- La carga y estructura de las moléculas de soluto y del co-ion (valor de la constante de intercambio iónico).

Cabe hacer notar que la proporción del disolvente orgánico en el eluyente interviene también en este mecanismo, aunque en forma indirecta. En efecto, la adsorción del contraion y la constante de intercambio iónico dependen de este factor.

El segundo mecanismo, que se superpone al primero, se efectúa solamente bajo condiciones en las cuales el par de iones resultante, soluto - contraion, es fuertemente hidrófobo. De aquí se deriva que los factores determinantes en este caso son:

- El área hidrocarbonada de las moléculas de soluto y del contraion.
- La proporción de disolvente orgánico en el eluyente (efectos hidrofóbicos).
- La cantidad de contraion adsorbido (concentración del agente formador de pares de iones).

CAPITULO V

EJEMPLO DE APLICACION: SEPARACION DE SULFAS.

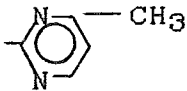
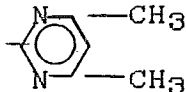
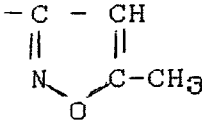
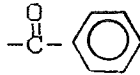
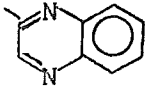
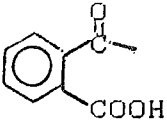
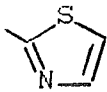
Las "sulfas" constituyen un problema analítico muy importante en algunas determinaciones bioquímicas o farmacológicas como son las trazas de dichos fármacos en tejidos animales (0.1 ppm) o en leche (0.01 ppm)(51). Los métodos comunes para determinar estos compuestos generalmente involucran cromatografía en capa fina o en papel, seguida de detección colorimétrica (52)(53)(54). Se han propuesto métodos alternos por cromatografía en fase gaseosa (55)(56) y en columna (57); sin embargo, la cromatografía líquida de alta eficiencia ofrece ventajas sobre los métodos anteriores debido a que se puede alcanzar con una sola columna una mayor selectividad, eficiencia y rapidez de análisis; es más, con un detector UV (254 nm) se pueden detectar niveles muy bajos de sulfas.

Las sulfas son ácidos débiles, con valores de pKa comprendidos entre 6 y 8, son poco solubles en agua, pero solubles en metanol o en las fases móviles comunmente usadas en cromatografía de fase reversa. A valores adecuados de pH, estos compuestos se encuentran ionizados en forma de aniones A⁻, por lo que pueden formar pares de iones con contraiones catiónicos como TBA o cetrimida. Estas características indican que este importante grupo de fármacos puede ser separado y analizado mediante los sistemas descritos en este trabajo, por lo que hemos escogido una mezcla de sulfonamidas como ejemplo de aplicación de nuestro estudio.

La tabla 5.1 muestra las sulfonamidas que hemos seleccionado para esta separación, sus valores de pKa y sus fórmulas.

TABLA 5.1

SULFONAMIDAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.

$R_1-NH-\text{C}_6\text{H}_4-SO_2-NH-R_2$				
No.	NOMBRE	R ₁	R ₂	pKa
1	Sulfamerazina	H		6.9 (1)
2	Sulfametazina	H		7.6 (1)
3	Sulfametoxasol	H		4.2 (1)
4	Sulfabenzamida	H		4.6 (1)
5	Sulfaquinoxalina	H		6.5 (2)
6	Ftalil sulfatiazol			---

(1) Media de los valores reportados en la literatura (58).
 (2) Estimada en base a la retención (58).

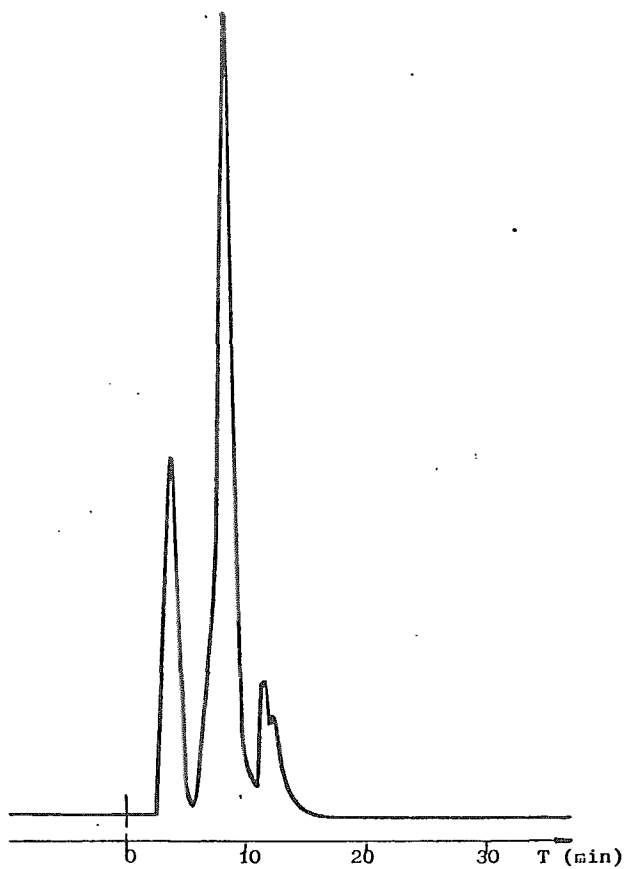


FIGURA 5.1
SEPARACION DE SULFONAMIDAS.

Condiciones:

Columna: 25 cm x 46 mm d.i.

Fase estacionaria: Lichrosorb RP 8.

Fase móvil: Acetonitrilo-agua (pH=7) $\Phi_{org} = 0.2$; NH_4AcO
0.05 M.

Flujo: 1 ml min⁻¹

Temperatura = 40°C.

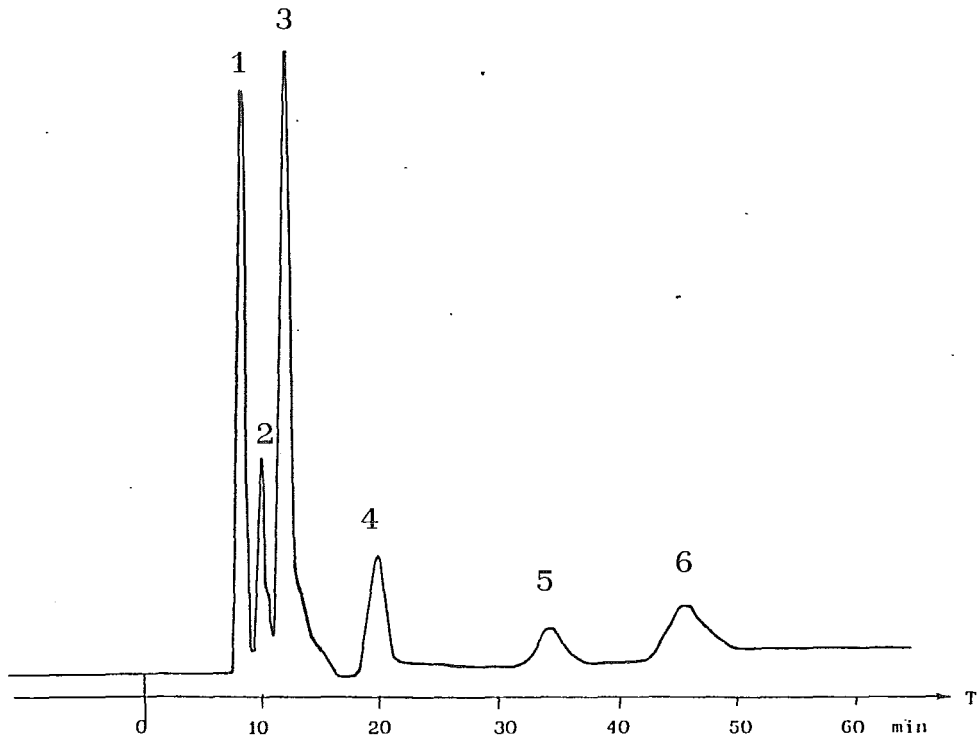


FIGURA 5.2
SEPARACION DE SULFONAMIDAS.

Condiciones:

Columna: 25 cm x 46 mm d.i.

Fase estacionaria: Lichrosorb RP 8

Fase móvil: Acetonitrilo-agua (pH=7) $\Phi_{org} = 0.2$; NH_4AcO
0.05 M.; TBA 5×10^{-3} M.

Flujo: 1 ml min⁻¹

Temperatura = 40°C.

- 1 Sulfamerazina.
- 2 Sulfametazina.
- 3 Sulfametoxasol.
- 4 Sulfabenzamida.
- 5 Sulfaquinoxalina.
- 6 Ftalil sulfatiazol.

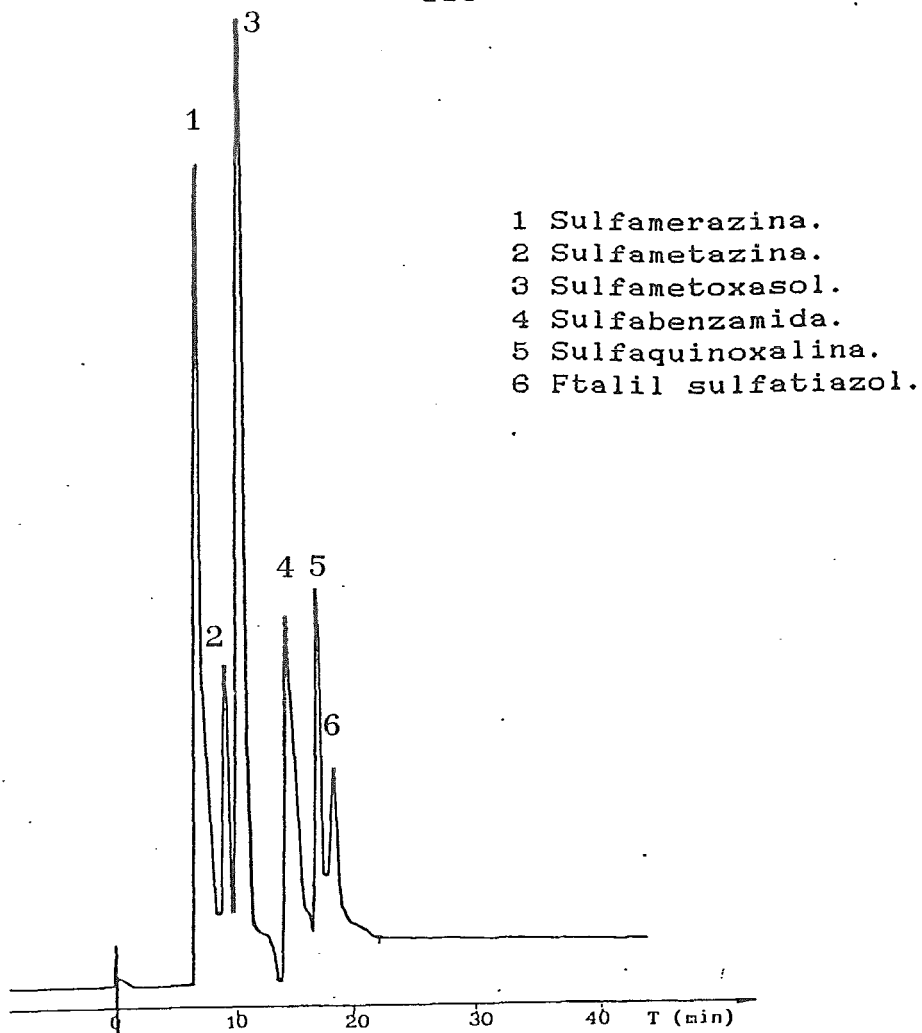


FIGURA 5.3
SEPARACION DE SULFONAMIDAS

Condiciones:

Columna: 25 cm x 46 mm d.i.

Fase estacionaria: Lichrosorb RP 8

Fase móvil: Disolvente "A": acetonitrilo-agua (pH=7);

Φ_{org} 0.2; TBA 0.005 M.; NH_4AcO 0.05 M.

Disolvente "B": acetonitrilo-agua (pH=7)

Φ_{org} 0.2; TBA 0.005 M.; NH_4AcO 0.7 M.

Flujo: 1 ml min^{-1} ; T = 30°C.

Gradiente:

Tiempo	0	9	10	40
% "A"	100	100	0	0

La figura 5.1 muestra el cromatograma obtenido de la mezcla de sulfonamidas en una columna de fase reversa sin contraion, con fase móvil acetonitrilo-agua, a fracción volúmica de acetonitrilo 0.2, en presencia de acetato de amonio 0.05 M. En estas condiciones las sulfas están ionizadas, son poco retenidas por la fase estacionaria apolar y no se observa separación entre sus componentes.

La figura 5.2 muestra el cromatograma obtenido de la separación de la misma mezcla de sulfonamidas en la misma columna, pero equilibrada con TBA a una concentración 5×10^{-3} M y con las mismas proporciones de acetato de amonio y de acetonitrilo. El efecto del contraion en este caso es notable, la retención aumenta considerablemente para algunos compuestos lográndose la separación deseada; sin embargo, el tiempo de análisis es excesivamente largo.

OPTIMIZACION DE LA SEPARACION.

Como se ha mostrado en capítulos anteriores, en cromatografía de pares de iones en fase inversa, la retención de los solutos disminuye proporcionalmente a la concentración de sales en la fase móvil, debido a un efecto de competencia. (Ver capítulo IV). Se pensó entonces que un gradiente de elución basado en un aumento en la concentración de acetato de amonio en la fase móvil debería permitir optimizar el tiempo de análisis, además de dar lugar a resultados muy reproducibles. En efecto, la composición de la fase estacionaria varía muy poco durante un gradiente de sales y como consecuencia se requiere un tiempo mínimo para reequilibrar la columna y regresar a las condiciones iniciales. Por el contrario, si se efectuara un gradiente de elución basado en la proporción del disolvente orgánico, se tendría no solo una variación en la composición de la fase móvil, sino también un cambio en la concentración de contraion en la fase estacionaria y, consecuentemente, el tiempo requerido para reequilibrar la columna a las condiciones iniciales sería mayor.

La figura 5.3 muestra los resultados obtenidos en la separación de la misma mezcla de sulfas, usando un gradiente de elución de acetato de amonio, por cromatografía de pares de iones, en fase reversa y con TBA como contraion. La separación se efectuó con un disolvente "A", conteniendo acetato de amonio 0.05 M.; acetonitrilo - agua, a una fracción volúmica de

acetonitrilo de 0.2 y TBA 0.005 M. y un disolvente "B", que contenía acetato de amonio 0.7 M. y las mismas proporciones de acetonitrilo y de contraion. El flujo se fijó a 1 ml/min y la temperatura a 30°C.

El programa empleado para el gradiente de elución fué el siguiente:

Tiempo (min)	0	9	10	40
% A	100	100	0	0
% B	0	0	100	100

REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCION.

Para probar la reproducibilidad de los tiempos de retención empleando un gradiente de elución de sales, se efectuó la separación de una mezcla de sulfas y se repitió varias veces la misma operación. Al final de cada separación, la columna se reequilibró con sólomente 5 ml de la disolución "A", (aproximadamente 2 veces el volumen muerto del sistema), antes de efectuar la inyección siguiente. La tabla 5.2 muestra los resultados obtenidos, que denotan la reproducibilidad de los tiempos de retención.

La variación en el tiempo de retención para cada soluto fué menor del 2%, lo cual es aceptable teniendo en cuenta los cambios tan bruscos efectuados en la concentración de sales en la fase móvil durante la elución.

TABLA 5.2

REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCION PARA UNA MEZCLA DE SULFONAMIDAS POR CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES EN COLUMNA DE FASE REVERSA USANDO GRADIENTE DE CONCENTRACION DE SALES (1).

SOLUTOS	tiempo retención en prueba #					tr (2)	cx10 ² (3)	%CV (4)
	1	2	3	4	5			
Sulfamerazina	7.0	7.1	7.0	7.1	6.9	7.0	8.4	1.2
Sulfametazina	8.8	9.0	8.8	9.0	8.9	8.9	13	1.5
Sulfametoxasol	9.7	10.0	10.0	10.0	9.7	9.9	16	1.7
Sulfabenzamida	13.9	14.3	14.3	14.3	13.8	14.1	24.9	1.76
Ftalil sulfa- tiazol	19.6	20.3	20.3	20.3	19.9	20.1	31.9	1.59

CONDICIONES:

Columna: 25 cm x 46 mm d.i.

Fase estacionaria: Lichrosorb RP 8

Fase móvil:

Disolvente "A": acetonitrilo-agua (pH=7); $\phi_{org}=0.2$;
TBA $5 \times 10^{-3}M.$; NH_4AcO 0.05 M.

Disolvente "B": acetonitrilo-agua (pH=7); $\phi_{org}=0.2$;
TBA $5 \times 10^{-3}M.$; NH_4AcO 0.5 M.

Flujo: 1 ml min⁻¹

Temperatura: 30°C.

Gradiente:

TIEMPO (min)	0	10	13	15	30
% B	0	10	30	100	100

(1) Al terminar cada prueba se pasaron 5 ml de disolvente "A", antes de la siguiente inyección.

(2) Tiempos de retención en minutos.

(3) Desviación estándar en unidades de tiempo.

(4) % de coeficiente de variación: $\%CV = \sigma / tr \times 100$

CONCLUSIONES GENERALES.

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido definir de manera bastante clara la influencia de los principales parámetros de composición de la fase móvil sobre el comportamiento de los sistemas de Cromatografía de Pares de Iones.

Los estudios sobre la adsorción de contraiones catiónicos (iones tetraquilamonio simétricos) en columnas de fase reversa químicamente unida muestran que ésta está controlada principalmente por:

- la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil
- la concentración del propio contraion en esa fase
- la longitud de las cadenas hidrocarbonadas (hidrofobicidad) del contraion.

En menor medida también intervienen en este proceso la concentración y el tipo de sales disueltas en el eluyente.

Considerando únicamente los parámetros de mayor influencia se estableció una ecuación empírica que permite predecir la concentración de contraion adsorbido en la fase estacionaria para diferentes composiciones de la fase móvil. Esta ecuación tiene la misma estructura, aunque diferentes coeficientes, que otras reportadas en la literatura para la adsorción de contraiones aniónicos de cadena lineal. Este hecho demuestra que independientemente de su carga o estructura (globular o lineal) todos los iones voluminosos se adsorben en las columnas de fase reversa siguiendo las mismas leyes de comportamiento.

La utilidad práctica de la ecuación de adsorción del contraion es considerable como se demuestra a continuación:

10. Permite calcular a priori el tiempo que se requerirá para equilibrar la columna con una fase móvil de composición dada.

20. En el caso de ciertas composiciones de fase móvil para las cuales el tiempo de equilibrio es sumamente largo, la ecuación permite deducir alguna otra composición del eluyente que dé lugar a la misma concentración de contraion adsorbido (fase isoactivante en contraion); para la cual el tiempo de equilibrio sea corto. De esta manera, una vez equilibrada la columna con el segundo eluyente, se podrá pasar a la fase móvil deseada inicialmente lográndose el equilibrio con esta fase es un tiempo mínimo.

30. Para las separaciones que requieren gradiente de elución se pueden preveer los disolventes "débil" y "fuerte", de modo que sean isoactivantes en contraion; así, durante la separación, la fase estacionaria no cambia, lográndose métodos sumamente reproducibles.

40. Para el estudio de los mecanismos de retención en cromatografía de pares de iones es absolutamente indispensable conocer la composición de la fase estacionaria bajo cualquier condición de composición de fase móvil. La ecuación aquí presentada facilita este conocimiento.

En lo que se refiere a la retención de los solutos se ha demostrado que está gobernada por dos tipos de mecanismos principales, cuya predominancia depende de la fuerza de los efectos hidrófobos que ejerce la fase móvil sobre el soluto y sobre el contraion.

El origen de estos dos mecanismos se basa en la propia estructura de la fase estacionaria en presencia de contraiones hidrófobos. En efecto, los resultados obtenidos muestran que la fase estacionaria en estos sistemas está constituida por dos capas capaces de participar ambas en la retención. La primera capa está formada por las cadenas hidrocarbonadas del soporte y los contraiones en ellas adsorbidos, constituyéndose así una superficie iónica. A esta superficie está asociada la segunda capa formada principalmente por una nube de iones de carga opuesta a la del contraion (co-iones). Los iones de la segunda capa a diferencia de los contraiones adsorbidos poseen una mayor libertad de movimiento.

Cuando los solutos iónicos poseen una superficie hidrocarbonada pequeña o los contraiones son relativamente poco hidrófobos, el mecanismo de retención predominante es el intercambio iónico; en este caso el soluto desplaza a un co-ion de la nube iónica y se coloca en la fase estacionaria al nivel de la segunda capa.

En el caso de solutos y de contraiones con mayor superficie hidrocarbonada, los efectos hidrófobos que ambas especies experimentan hacen posible la formación de un par de iones soluto-contraion en la superficie del soporte (1a. capa). Este mecanismo, aunado al intercambio iónico, incrementa considerablemente la retención de los solutos.

En los sistemas de cromatografía de pares de iones el efecto de la proporción de disolvente orgánico en el eluyente es sumamente complejo, ya que este factor actúa a la vez sobre la cantidad de contraion que se adsorbe en la fase estacionaria y sobre el valor de la constante de intercambio iónico y, en su caso, sobre el valor de la constante de equilibrio de formación del par iónico en la superficie del soporte. El trabajo que hemos efectuado no permite profundizar en estas diversas influencias, sin embargo establece una base firme para continuar con estos estudios.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Howard G.A. & Martin A.J.P.
J.Biochem., 46(1950)532.
- (2) Horwitz E.P. & Bloomquist C.A.
J. Inorg. Nucl. Chem., 34(1972)3851.
- (3) Wahlund K.G. & Gröningsson K.
Acta Pharm.Suecica, 7(1970)615.
- (4) Eksborg S., Lagerström P., Modin R. &
Schill G.
J. Chrom. 83(1973)99.
- (5) Bockris J. O'M. & Reddy A.K.
Electroquímica Moderna, Vol. I , Reverté.
(1978)249-293.
- (6) Pople J.A.
Proc. Royal Soc.A 205(1951)163.
- (7) Bernal J.D.
Proc. Royal Soc., A 280(1964)299.
- (8) Fransson B., Wahlund K.G., Johansson I.M.&
Schill G.
J. of Chrom., 125(1976)327-334.
- (9) Westerlund D. & Theodorsen A.
J. of Chrom., 144(1977)34.
- (10) Tomlinson E., Riley C.M. & Jefferies T.M.,
J. of Chrom., 173(1979)89
- (11) Van de Venne J.L.: , Hendrikkx J.H.L. &
Deedler R.S.,
J. of Chrom., 167(1978)4.
- (12) Knox J.H. & Laird G.R.
J. of Chrom., 122(1976)17-34.
- (13) Terweij-Groen, C.P. & Kraak J.C.
J. of Chrom., 138(1977)250.

- (14) Knox J.H. & Jurand J.,
J. of Chrom., 203(1981)85-92
- (15) Bidlingmeyer B.A., Deming S.N., Price W.P.,
Sachok B. & Petrusek M.,
J. of Chrom., 186(1979)419-434.
- (16) Melander W.R., Horváth C.,
J. of Chrom., 201(1980)211-224.
- (17) Van de Venne J.L., Hendrikx J.H.L. &
Deedler R.S.
J. of Chrom., 167(1978)1-16
- (18) Knox J.H., & Laird G.R.,
J. of Chrom., 122(1976)17
- (19) Vera A.L.E.
Tesis de Doctorado de 3er. Ciclo.
Universidad Pierre et Marie Curie. Paris 1979.
- (20) Deedler R.S., Linssen H.A.J., Konijnendijk A.
& Van de Venne J.L.M.,
J. of Chrom., 185(1979)241.
- (21) Knox J.L. & Hartwick R.H.
J. of Chrom., 204(1981)3-21.
- (22) Hung C.T. & Taylor R.B.,
J. of Chrom., 202(1980)333-345.
- (23) Hung C.T. & Taylor R.B.,
J. of Chrom., 209(1981)175-190.
- (24) Johnson E.L., Stevenson R.,
Basic Liquid Chromatography; Varian, S.A., 1977
- (25) Charlot G.,
Chimie Analytique Cuantitative II.
Masson, 6th. edition, Paris, 1974, p.342.
- (26) Horváth C. & Melander W.
J. of Chrom. Sci., 15(1977)395-397.
- (27) Vera A.L.E.
Tesis de Doctorado de 3er. Ciclo.
Univ. Pierre et Marie Curie. Paris 1979.
- (28) Terweij-Gröen C.P., Heemstra S. & Kraak J.C.
J. of Chrom., 161(1978)69.
- (29) Kraak J.C., Jonker K.M. & Huber J.F.K..
J. of Chrom., 142(1977)671

- (30) Horváth C., Melander W., Molnár I.
J. of Chrom., 125(1978)129.
- (31) Melander W.R., Kalghalgi K. & Horváth C.
J. of Chrom., 201(1980)201-209.
- (32) Melander W.R. & Horváth C.
J. of Chrom., 201(1980)221-224.
- (33) Kraak J.C. & Huber J.F.K.
J. of Chrom., 102(1974)333-351.
- (34) Terweij G., Heemstra S. & Kraak J.C.
J. of Chrom., 161(1978)69-82.
- (35) Van de Venne J.L.M., Hendrikx J.L.H.M. &
Deedler R.S.,
J. of Chrom., 167(1978)1-16.
- (36) Knox J.H. & Laird G.R.,
J. of Chrom., 122(1976)17-34.
- (37) Kong R.C., Sachok B. & Deming S.A.,
J. of Chrom., 199(1980)307-316.
- (38) Shoenmakers P.J., Biliet H.A.H.d & Galan L. de
Chromatographia 15(1982)206.
- (39) Kraak J.C. & Huber J.F.K.
J. of Chrom., 102(1974)342.
- (40) Perkin Elmer.
Catálogo del Cromatógrafo. Apéndice 1.
- (41) Hung C.T. & Taylor R.B.,
J. of Chrom., 209(1981)175-190.
- (42) Davies J.L. & Laird G.R.
Proc. Royal Soc., A 245(1958)417-428.
- (43) Bidlingmeyer B.A. & Deming S.N.,
J. of Chrom., 186(1979)419-434.
- (44) Bidlingmeyer B.A.
J. of Chrom. Sci., 18(1980)525-539.
- (45) Knox J.H. & Hartwick R.A.,
J. of Chrom., 204(1981)3-21.
- (46) Deedler R.S., Linsen H.A.J. & Konijndijk
A.P. & Van de Venne J.L.M.,
J. of Chrom., 185(1979)241-257.

- (47) Phan-Tan-Luu R., Feneuille D. & Mathieu D.,
Cours de Metodologie de la Recherche
Experimentale.
Labortoire de Prospective Réactionnelle et
d'Analyse de l'Information.
Universite de Aix-Marseille.

- (48) Miller I. & Freund J.,
Probabilidad y Estadística para Ingenieros.
Reverté, Mex., 1973, p.373.

- (49) Dawson, Elliot & Jones.,
Data of Biochemical Research, 2a. Edición.
Oxford University Press, N.Y.

- (50) Windholz Budavari et al.
The Merck Index., 1a. Ed.
Merck & Co., Rabivan N.J., U.S.A.,1983.

- (51) Code of Federal Regulations, Section 21,
National Archives and Records Service,
General Services Administration, U.S.
Government Printing Office
Washington, D.C.,1975.

- (52) Tishler F., Sutter J.L., Bathish J.N. &
Jagman H.E.,
J. Agr. Food Chem., 16(1968)50.

- (53) Felling J. & Wesstheimer J.,
J. Agr. Food Chem.,19(1968)738.

- (54) de Zeeuw R.A.,
J. of Chrom., 48(1970)27.

- (55) Fravolini A. & Brgliomini A. ,
J. Ass. Offic. Anal. Chem., 52(1969)767.

- (56) Gyllenhaal O. & Ehrsson H.,
J. of Chrom., 107(1975)327.

- (57) Miller H.M.,
J. Ass. Offic. Anal. Chem., 53(1970)1100.

- (58) Su Stephen C., Hartkopf A.V. & Karger B.L.
J. of Chrom., 119(1976)523-538.