

Efecto de la solución amortiguadora de pH en la selectividad cromatográfica de compuestos ácido-base.

Xavier Subirats, Martí Rosés y Elisabeth Bosch

Departament de Química Analítica – Universitat de Barcelona

C/Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona

1. INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que el pH de la fase móvil es una variable fundamental en la separación de sustancias ionizables en cromatografía de líquidos, ya que de él depende el grado de ionización de los analitos presentes en la mezcla problema. En el desarrollo de métodos analíticos se requiere pues, ejercer un control eficiente sobre el pH mediante la elección de un tampón adecuado. En cromatografía de líquidos en fase inversa, suelen usarse soluciones hidro-orgánicas tamponadas como fases móviles. Habitualmente éstas suelen prepararse añadiendo el volumen adecuado de un disolvente orgánico, típicamente acetonitrilo o metanol, sobre una solución acuosa tamponada. Sin embargo, fases móviles del mismo contenido en modificador orgánico y preparadas a partir de soluciones acuosas del mismo pH pero que contienen ácidos distintos como reguladores del pH, pueden presentar valores de pH significativamente diferentes. Consideremos el ejemplo mostrado en la Figura 1. Se inyectó una mezcla de sustancias con propiedades ácido-base, de pK_a cercano a 8, en dos fases móviles distintas que contenían un 60% de acetonitrilo. Ambas fases móviles se prepararon añadiendo el volumen adecuado de acetonitrilo a soluciones acuosas tamponadas del mismo pH (8,00), pero preparadas a partir de distintas especies reguladoras del pH: $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ y NH_4^+ / NH_3 . Podemos observar en la Figura 1 que los tiempos de retención para dos de los cuatro analitos son significativamente distintos y, en función del tampón utilizado, se obtienen diferentes perfiles de elución. Este fenómeno también se produce en fases móviles que contengan metanol como modificador orgánico, tal y como se desprende de los cromatogramas mostrados en la Figura 2. ¿Cuál es el motivo del cambio de selectividad en los ejemplos descritos? La respuesta la encontraremos al final del artículo, pero antes de llegar a ella deberemos hacer algunas consideraciones prácticas sobre la medida del pH en fases móviles hidro-orgánicas y sobre las variaciones del pK_a de ácidos y bases con la adición de modificador orgánico.

Estos ejemplos no son gratuitos, sino que responden a cambios de selectividad comúnmente observados cuando se modifican las condiciones experimentales de un determinado procedimiento analítico en el que estén involu-

crados analitos ácidos o básicos y fases móviles tamponadas. Los casos seleccionados aquí son ejemplos académicos y algo extremos, pero ilustrativos. La consideración detenida de las causas de los cambios de selectividad descritos ha de permitir la interpretación correcta de las variaciones de retención observadas en el trabajo cotidiano al modificar, en ocasiones incluso muy ligeramente, las condiciones de elución cromatográfica.

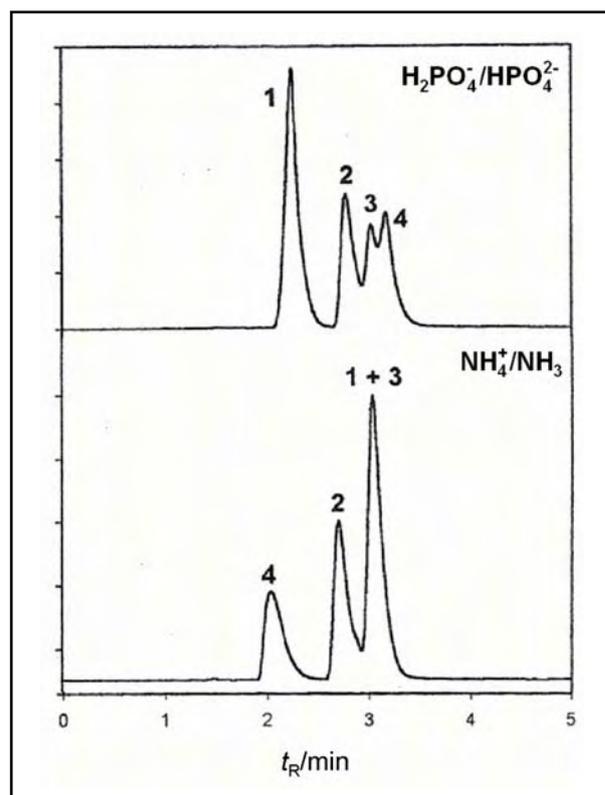


Figura 1. Elución de una mezcla de compuestos ionizables en dos fases móviles preparadas a partir de soluciones reguladoras acuosas de $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ o NH_4^+ / NH_3 , ambas de pH 8,00 y concentración $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Analitos: (1) 2-nitrofenol, (2) 2,4,6-trimetilpiridina, (3) 3-bromofenol y (4) *N,N*-dimetilbencilamina. Condiciones cromatográficas: 1 mL/min, 60% de acetonitrilo en volumen, XTerra MS C_{18} $5\text{-}\mu\text{m}$ (15 cm x 4,6 mm).

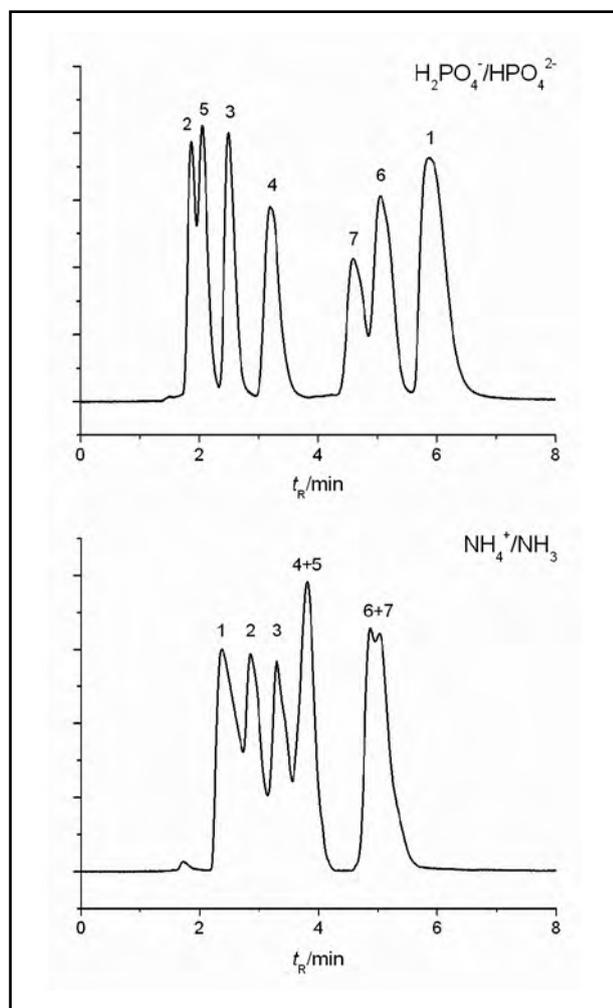


Figura 2. Elución de una mezcla de compuestos ionizables en fases móviles metanol/tampón acuoso al 60/40 (v/v), en las mismas condiciones de la Figura 1. Analitos: (1) *N,N*-dimetilbencilamina, (2) 4-nitrofenol, (3) 3-nitrofenol, (4) 2-clorofenol, (5) 2-nitrofenol, (6) 2,4,6-trimetilpiridina y (7) 3-bromofenol.

2. LA MEDIDA DEL pH EN FASES MÓVILES HIDRO-ORGÁNICAS

La medida del pH en cromatografía de líquidos es un aspecto delicado y un tanto controvertido. Algunos cromatografistas miden el pH de la solución amortiguadora en medio acuoso, antes de la adición del modificador orgánico, mientras que otros lo miden directamente en la fase móvil hidro-orgánica. Estos dos valores de pH no son coincidentes, pudiendo llevar a equívoco si el autor no indica con claridad cual es el procedimiento seguido [1]. La información obtenida al medir el pH en la solu-

ción acuosa es *a priori* incompleta debido a que al adicionar un modificador orgánico el pH varía en función del volumen y propiedades del solvente añadido, y de la concentración y naturaleza del tampón utilizado. A menudo no se concede la importancia debida a la correcta medida del pH en mezclas hidro-orgánicas, pese a los numerosos estudios publicados al respecto [2-8] y la propuesta de la IUPAC sobre procedimientos de medida y soluciones estándar de referencia [9-15]. Sin embargo, parece ser que en los últimos años la medida cuidadosa del pH ha ido ganando terreno. Sirva como ejemplo la publicación de artículos en revistas de amplia difusión que tratan la cromatografía desde un punto de vista generalista, sobre la interpretación del pH en fases móviles hidro-orgánicas [16], la selección del tampón y de la capacidad reguladora [17] y la correcta preparación de los tampones [18].

Existen tres procedimientos distintos para medir el pH de una fase móvil [19-26]. El primero de ellos consiste en medir el pH del tampón acuoso, previamente a la incorporación del modificador orgánico, usando para calibrar el sistema potenciométrico las habituales soluciones acuosas estándar de pH 4 y 7, y, menos frecuentemente, de pH 2 y 9. Conforme a las recomendaciones de la IUPAC [27], el valor de pH obtenido por este procedimiento debería notarse como ^wpH . Según esta nomenclatura el subíndice corresponde al medio del estado estándar, es decir, al medio en que el coeficiente de actividad del ión hidrógeno a dilución infinita tiene valor unitario. Desde un punto de vista práctico, hace referencia al solvente en el cual se ha llevado a cabo la calibración, en este caso los tampones estándar acuosos (w). El superíndice informa sobre el solvente en el cual se ha llevado a cabo la medida, que en este caso también es un medio acuoso (w). El valor de pH obtenido mediante este procedimiento no proporciona información exacta sobre el pH final que tendrá la fase móvil tras adicionar el solvente orgánico (en los ejemplos mostrados en las Figuras 1 y 2 todas las fases móviles tenían un $^w\text{pH} = 8,00$, pero los cromatogramas obtenidos eran significativamente distintos). Los dos procedimientos siguientes tienen en común que el pH se mide directamente en la fase móvil, con lo que obtenemos un valor real de la acidez de la mezcla hidro-orgánica, pero difieren en el procedimiento usado para la calibración del sistema potenciométrico. En un caso se emplean los mismos tampones estándar acuosos que ya hemos comentado, y en el otro se usan tampones estándar preparados en una mezcla hidro-orgánica de la misma composición que la fase móvil. Según la nomenclatura propuesta por la IUPAC el valor de pH obtenido en el primer caso se expresará en la escala ^spH , donde s se refiere a la mezcla hidro-orgánica, y el segundo en la escala ^spH . El uso de soluciones estándar no acuosas presenta evi-

dentes inconvenientes de tipo práctico, debido a la necesidad de preparar un nuevo estándar y proceder a una nueva calibración para cada composición de fase móvil a estudiar y, además, no puede aplicarse en el caso de elución en modo gradiente.

Existen en la literatura numerosos artículos que ponen de manifiesto la conveniencia de medir el pH en la fase móvil, en lugar de hacerlo en el tampón acuoso [19,21,22,26,28-34]. En base a estas experiencias, se desaconseja el uso de la escala ^wpH en la medida del pH de fases móviles hidro-orgánicas. En cuanto a las escalas ^spH y ^wpH , se recomienda el uso de la segunda, debido a la simplicidad de calibración ya que se requiere tampones estándar acuosos. Además, el valor obtenido en la escala ^wpH puede ser convertido, si es preciso, a la escala ^spH mediante la siguiente relación [3,5]:

$$^s\text{pH} = ^w\text{pH} + \delta \quad (1)$$

donde el parámetro δ presenta un valor constante para cada composición hidro-orgánica. Desde un punto de vista práctico, la relación propuesta en la Ec. (1) es aplicable cuando el potencial de unión líquida que se establece entre el electrodo combinado de vidrio y la solución a medir, bien sea los tampones estándar o la fase móvil, sea despreciable o, cuanto menos, constante. Esta condición se suele satisfacer al usar un electrodo combinado que contenga un puente salino de una solución concentrada de un electrolito equitransferente, típicamente KCl (3M), es decir, un electrodo de vidrio combinado estándar. Los valores de δ se conocen para los dos modificadores orgánicos más comúnmente utilizados, metanol [21,23,35,36] y acetonitrilo [37,38]. Algunos valores representativos se muestran en la Tabla 1. Estos valores de δ también son

útiles para la interconversión entre las distintas expresiones de la constante de acidez de sustancias ionizables:

$$^s\text{p}K_a = ^w\text{p}K_a + \delta \quad (2)$$

Desde un punto de vista práctico, $^s\text{p}K_a$ es el valor de $\text{p}K_a$ de un ácido débil obtenido a partir de los valores de pH medidos en la escala ^spH . Si éstos se recopilan en la escala ^wpH , la constante de disociación debe expresarse en la escala $^w\text{p}K_a$. La diferencia entre ambas constantes radica en el estado de referencia tomado para el protón.

3. EFECTO DEL MODIFICADOR ORGÁNICO SOBRE EL $\text{p}K_a$

3.1 Generalidades

Conocer el valor de $\text{p}K_a$ de un ácido débil, bien sea de los analitos o de las sustancias a utilizar como tampones, es fundamental. En el primer caso, el $\text{p}K_a$ del analito y el pH de la fase móvil condicionarán el grado de ionización del analito y, en función de éste, la retención cromatográfica en la columna. En el segundo caso, el valor de $\text{p}K_a$ del tampón condiciona el intervalo de pH en el cual el tampón desarrolla correctamente su función reguladora. Se suele decir que la capacidad reguladora del tampón es máxima cuando el valor de pH de la fase móvil coincide con el $\text{p}K_a$. Esta afirmación, de innegable utilidad práctica, debe ser ligeramente matizada. El valor de $\text{p}K_a$ mencionado no es el que podemos encontrar en la bibliografía ya que éste suele estar referido a condiciones de fuerza iónica cero, sino el valor de $\text{p}K_a$ en la solución de interés ($\text{p}K'_a$). Las consecuencias observables de la diferencia entre ambos valores de $\text{p}K_a$ pueden llegar a ser remarca-

Tabla 1. Valores del parámetro δ en función del contenido en volumen de modificador orgánico, en mezclas hidro-orgánicas que contengan metanol [23] o acetonitrilo [22,38].

% modificador orgánico	Valor del parámetro δ	
	Metanol	Acetonitrilo
0	0,00	0,00
10	0,01	-0,01
20	0,02	-0,03
30	0,04	-0,04
40	0,08	-0,14
50	0,13	-0,22
60	0,19	-0,46
70	0,22	-0,62
80	0,10	-0,97
90	-0,28	-1,75
100	-2,24	-

bles, especialmente si tenemos en cuenta que, como norma general, el intervalo de pH en que un tampón cumple su función amortiguadora es $pK_a' - 1 \leq \text{pH} \leq pK_a' + 1$. Veamos los ejemplos mostrados en la Tabla 2, donde se comparan los valores acuosos de pK_a para distintos tampones obtenidos en la bibliografía [39] con los valores calculados de pH correspondientes a la máxima capacidad reguladora en función de la concentración del tampón y, por consiguiente, de la fuerza iónica del medio. Cuando la especie ácida o la base conjugada presentan una sola carga (acetato, amonio...), la fuerza iónica del medio es relativamente baja, y las diferencias entre los valores de pK_a bibliográficos y el pH óptimo son poco relevantes. Pero cuando existen en el medio especies cargadas que generan una fuerza iónica importante, la situación cambia sustancialmente. En el caso del hidrogenocitrato-citrato, por citar un ejemplo, de acuerdo con el valor de pK_a bibliográfico podríamos concluir que para una solución de concentración $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ la máxima capacidad reguladora se obtendría a pH 6,40. Pero en realidad el valor de pH óptimo sería 0,83 unidades menor, por lo que en el caso de preparar una solución de pH 6,40 la capacidad reguladora real sería sólo el 40% de la presupuesta. Este fenómeno es todavía más significativo cuando se añade al tampón acuoso un modificador orgánico, debido al efecto producido por el cambio de medio.

3.2 Efecto del modificador sobre el pK_a de las sustancias reguladoras del pH

La modificación de las propiedades del disolvente que implica la adición de modificador orgánico a una solución acuosa afecta muy significativamente al pK_a de

los solutos ácidos o básicos. En la Tabla 3 se muestran los valores de ${}^s pK_a$ de tampones comúnmente utilizados en la preparación de fases móviles a diferentes fracciones de acetonitrilo o metanol. Estos valores pueden trasladarse fácilmente a la escala ${}^s pK_a$ mediante la Ec. 2 y los valores de δ de la Tabla 1. En primer lugar, comparando acetonitrilo y metanol, podemos observar que la magnitud de la evolución de los valores de pK_a al aumentar el contenido de solvente orgánico es distinta en función del modificador orgánico seleccionado. En segundo lugar, observamos que en el intervalo estudiado el pK_a de los ácidos neutros ($\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$, p.ej. ácido acético) y aniónicos ($\text{HA}^{-z} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^{-z-1}$, p.ej. dihidrogenofosfato) aumenta con la fracción de modificador orgánico, mientras que para los ácidos catiónicos ($\text{BH}^{+z} \rightleftharpoons \text{B}^{+z-1} + \text{H}^+$, p.ej. piperazina) se observa una ligera disminución del pK_a . Este comportamiento está ampliamente descrito y se explica mediante la teoría establecida por Izmailov [41,42].

3.3 Efecto del modificador sobre el pK_a de los analitos ionizables

Para las familias más comunes de analitos se han desarrollado relaciones lineales que permiten estimar el pK_a de un compuesto en una determinada fase móvil (${}^s pK_a$) a partir de su valor acuoso (${}^w pK_a$). Estas ecuaciones permiten estimar, en mezclas hidro-orgánicas que contengan metanol [46-48] o acetonitrilo [49,50], valores de pK_a de piridinas, aminas, fenoles y ácidos carboxílicos alifáticos y aromáticos. Estas relaciones presentan la forma:

$${}^s pK_a = a_s \cdot {}^w pK_a + b_s \quad (3)$$

Tabla 2. Valores de pH correspondientes a la máxima capacidad reguladora para tampones acuosos a distintas concentraciones [40].

Tampón	pK_a	pH de máxima capacidad reguladora		
		$0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Ácido acético-acetato	4,76	4,73	4,69	4,67
Dihidrogenocitrato-hidrogenocitrato	4,76	4,58	4,42	4,34
Piperazina (pK_{a1})	5,33	5,51	5,67	5,75
Hidrogenocitrato-citrato	6,40	5,98	5,67	5,52
Dihidrogenofosfato-hidrogenofosfato	7,20	7,02	6,86	6,78
TrisH ⁺ -Tris ^a	8,07	8,10	8,14	8,16
Amonio-amoniaco	9,25	9,28	9,32	9,34
Hidrogenocarbonato-carbonato	10,33	10,15	9,99	9,91

^aTris(hidroximetil)aminometano

Tabla 3. Valores de pK_a de tampones en mezclas acetonitrilo-agua y metanol-agua [23,39,43-45].

Tampón	$^w pK_a$	$^s pK_a$ - acetonitrilo				$^s pK_a$ - metanol			
	0%	20%	40%	60%	20%	40%	60%	80%	
Ácido fosfórico	2,15	2,59	2,97	3,29	2,63	3,09	3,68	4,30	
Ácido cítrico	3,13	3,46	3,76	3,99	3,44	3,84	4,30	4,77	
Ácido fórmico	3,75	3,96	4,40	4,87	3,84	4,19	4,67	5,23	
Ácido acético	4,76	5,14	5,62	6,16	5,05	5,43	5,92	6,46	
Dihidrogenocitrato	4,76	5,11	5,46	5,82	5,12	5,53	6,10	6,64	
Piperazina (pK_{a1})	5,33	5,26	5,19	5,06	5,15	4,94	4,69	4,39	
Hidrogenocitrato	6,40	6,82	7,26	7,67	6,83	7,39	7,96	8,60	
Dihidrogenofosfato	7,20	7,57	7,94	8,27	7,55	8,04	8,75	9,58	
Tris	8,07	7,94	7,85	7,72	7,99	7,94	7,98	7,99	
Ácido bórico	9,24	9,85	10,43	11,00	-	-	-	-	
Amonio	9,25	9,18	9,05	8,88	9,11	8,97	8,82	8,63	
Piperazina (pK_{a2})	9,73	9,62	9,53	9,42	9,49	9,31	9,12	8,74	
Hidrogenocarbonato	10,33	10,82	11,31	11,62	-	-	-	-	

Los parámetros a_s y b_s dependen de la naturaleza y contenido de modificador orgánico y el grupo funcional del analito, según las ecuaciones:

$$a_s = \frac{1 + a_{s1} \phi_{Org} + a_{s2} \phi_{Org}^2}{1 + a_{s3} \phi_{Org} + a_{s4} \phi_{Org}^2} \quad (4)$$

$$b_s = \frac{b_{s1} \phi_{Org} + b_{s2} \phi_{Org}^2}{1 + b_{s3} \phi_{Org} + b_{s4} \phi_{Org}^2} \quad (5)$$

donde ϕ_{Org} es la fracción en volumen del modificador orgánico (acetonitrilo o metanol) y a_{si} y b_{si} son valores constantes que sólo dependen del tipo de solvente orgánico y de la familia a la que pertenece el analito. Los valores de estas constantes se muestran en las Tablas 4 y 5 para metanol y acetonitrilo, respectivamente. Estas ecuaciones son válidas en mezclas hidro-orgánicas que contengan cualquier proporción de metanol, y hasta un 60% en volumen de acetonitrilo (100% en el caso de piridinas).

Tabla 4. Valores de a_{si} y b_{si} para la estimación del $^s pK_a$ de analitos en fases móviles que contengan metanol como modificador orgánico [48].

Familia de analitos	a_{s1}	a_{s2}	a_{s3}	a_{s4}
Fenoles	-0,656	-0,030	-0,844	0,133
Ácidos carboxílicos alifáticos	-1,406	0,680	-1,551	0,827
Ácidos carboxílicos aromáticos				
con sustituyente en <i>orto</i>	-1,189	0,190	-1,424	0,425
sin sustituyente en <i>orto</i>	-1,101	0,103	-1,516	0,518
Aminas	-0,476	0,209	-0,400	0,158
Piridinas	2,617	0,000	2,809	0,000
Familia de analitos	b_{s1}	b_{s2}	b_{s3}	b_{s4}
Fenoles	-0,454	0,866	-0,017	-0,865
Ácidos carboxílicos alifáticos	1,034	-0,898	-1,250	0,277
Ácidos carboxílicos aromáticos				
con sustituyente en <i>orto</i>	0,449	-0,429	-1,674	0,677
sin sustituyente en <i>orto</i>	-0,178	0,187	-1,699	0,702
Aminas	-0,458	0,477	-1,674	0,690
Piridinas	-1,733	1,763	-1,214	0,272

Tabla 5. Valores de a_{si} y b_{si} para la estimación del ${}^s_p K_a$ de analitos en fases móviles que contengan acetonitrilo como modificador orgánico [49,50].

Familia de analitos	a_{s1}	a_{s2}	a_{s3}	a_{s4}
Ácidos carboxílicos alifáticos	9,97	-8,59	8,83	-8,72
Ácidos carboxílicos aromáticos	52,04	-10,93	49,33	-32,69
Fenoles	10,05	-10,04	7,97	-8,37
Aminas	-0,73	-0,27	-0,87	-0,12
Piridinas	-1,67	0,67	-1,66	0,67
Familia de analitos	b_{s1}	b_{s2}	b_{s3}	b_{s4}
Ácidos carboxílicos alifáticos	-0,68	9,94	8,45	-8,59
Ácidos carboxílicos aromáticos	-5,32	8,99	22,56	-23,21
Fenoles	-5,33	9,95	0,19	-0,70
Aminas	-1,82	2,25	-1,75	0,90
Piridinas	-1,78	1,89	-0,58	-0,40

Si se combina la Ec. (2) con la Ec. (3) se puede calcular el valor de pK_a del analito en la fase móvil en la escala ${}^s_p K_a$, que permite, a efectos de tener una estimación del grado de ionización, una comparación inmediata con la escala de pH anteriormente recomendada, ${}^s_p H$:

$${}^s_p K_a = a_s {}^w_p K_a + b_s + \delta \quad (6)$$

A modo de ejemplo, en las Tablas 6 y 7 se muestran los valores estimados de ${}^s_p K_a$ de distintos analitos a

varias concentraciones de acetonitrilo y metanol, respectivamente, a partir de distintos valores de pK_a en agua. En ambos casos se observa que la variación del pK_a con la adición del solvente orgánico puede ser notable, llegando incluso a superar las dos unidades de pK_a . Como era de esperar el pK_a de los ácidos neutros (fenoles y ácidos carboxílicos) aumenta con la adición del modificador orgánico mientras que para los ácidos catiónicos (aminas y piridinas) se observa el comportamiento contrario.

Tabla 6. Valores de ${}^s_p K_a$ de analitos en fases móviles en función de la fracción en volumen de acetonitrilo (10 \leftrightarrow 60%) [51].

Familia de analitos	${}^w_p K_a$	${}^s_p K_a$ - contenido en acetonitrilo					
		10%	20%	30%	40%	50%	60%
Ácidos carboxílicos alifáticos	3,00	3,21	3,38	3,56	3,76	4,01	4,32
	4,00	4,27	4,47	4,68	4,92	5,19	5,55
	5,00	5,33	5,57	5,81	6,07	6,38	6,78
Ácidos carboxílicos aromáticos	3,00	3,11	3,27	3,45	3,64	3,85	4,08
	4,00	4,20	4,41	4,66	4,94	5,24	5,58
	5,00	5,28	5,56	5,88	6,23	6,63	7,08
Fenoles	8,00	8,46	8,55	8,67	8,89	9,28	9,88
	9,00	9,57	9,71	9,85	10,09	10,50	11,11
	10,00	10,68	10,86	11,03	11,29	11,71	12,34
Aminas	8,00	7,91	7,79	7,63	7,44	7,25	7,08
	9,00	8,93	8,82	8,67	8,49	8,31	8,15
	10,00	9,94	9,84	9,71	9,55	9,37	9,22
Piridinas	5,00	4,82	4,64	4,45	4,24	3,99	3,68
	6,00	5,82	5,64	5,45	5,23	4,98	4,65
	7,00	6,82	6,63	6,44	6,22	5,96	5,63

Tabla 7. Valores de ${}^s_w pK_a$ de analitos en fases móviles en función de la fracción en volumen de metanol (10 ↔ 80%) [51].

Familia de analitos	${}^w pK_a$	${}^s_w pK_a$ - contenido en metanol							
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%
Ácidos carboxílicos alifáticos	3,00	3,16	3,35	3,55	3,78	4,04	4,30	4,54	4,70
	4,00	4,18	4,38	4,60	4,85	5,12	5,40	5,63	5,77
	5,00	5,19	5,41	5,65	5,92	6,20	6,49	6,73	6,85
Ácidos carboxílicos aromáticos con sustituyente en <i>orto</i>	3,00	3,13	3,29	3,47	3,68	3,93	4,22	4,53	4,79
	4,00	4,16	4,34	4,55	4,79	5,08	5,41	5,76	6,08
	5,00	5,18	5,39	5,63	5,90	6,23	6,60	6,99	7,36
	3,00	3,12	3,26	3,43	3,62	3,84	4,09	4,32	4,47
	4,00	4,17	4,36	4,57	4,83	5,12	5,45	5,77	6,03
	5,00	5,21	5,45	5,72	6,04	6,40	6,81	7,22	7,59
Fenoles	8,00	8,12	8,27	8,43	8,61	8,81	9,03	9,24	9,39
	9,00	9,14	9,30	9,48	9,68	9,90	10,13	10,35	10,50
	10,00	10,16	10,34	10,54	10,75	10,99	11,23	11,45	11,61
Aminas	8,00	7,90	7,81	7,72	7,64	7,56	7,49	7,37	7,16
	9,00	8,90	8,79	8,70	8,61	8,53	8,45	8,33	8,12
	10,00	9,89	9,78	9,68	9,59	9,50	9,42	9,30	9,09
Piridinas	5,00	4,76	4,54	4,35	4,17	4,01	3,86	3,72	3,54
	6,00	5,74	5,52	5,32	5,13	4,97	4,82	4,67	4,49
	7,00	6,73	6,50	6,29	6,10	5,93	5,78	5,63	5,44

4. EFECTO DEL MODIFICADOR ORGÁNICO SOBRE EL pH

Para mezclas que contengan acetonitrilo hasta el 60% en volumen, se ha observado que la variación del pH de los tampones de la Tabla 3 es lineal con la fracción en volumen de acetonitrilo (ϕ_{MeCN}) [43]:

$${}^s_w pH = {}^w pH + m_{pH} \phi_{MeCN} \quad (7)$$

donde m_{pH} es un coeficiente de proporcionalidad que depende del tampón utilizado, de su concentración y del valor de pH de la solución acuosa (${}^w pH$) [44,50]. Cuando el modificador orgánico es metanol, la relación lineal se amplía hasta el 80%, y puede expresarse como [52]:

$${}^s_w pH = {}^w pH + m_{pH} \phi_{MeOH}^{d_{pH}} \quad (8)$$

donde d_{pH} es un exponente empírico que modifica la fracción en volumen de metanol, y es de valor unitario para ácidos catiónicos y 5/4 para ácidos neutros y aniónicos.

En la Tabla 8 se muestran distintos valores de m_{pH} para tampones comúnmente utilizados en cromatografía de líquidos en fase reversa, en función del pH inicial (${}^w pH$) y del modificador orgánico seleccionado. Estos valores de m_{pH} se han calculado para concentraciones 0,01 y 0,05 mol·L⁻¹ de la solución acuosa del tampón. Habida cuenta de que la adición del modificador orgánico conlleva la dilución del tampón, los valores de pH seleccionados se corresponden al intervalo en el cual el tampón presenta una aceptable capacidad reguladora.

Al añadir acetonitrilo o metanol a un tampón acuoso para preparar una determinada fase móvil, el pH evolucionará coherentemente con el pK_a del tampón de acuerdo con los valores de m_{pH} de la Tabla 8. Así pues, el pH disminuirá en el caso de ácidos catiónicos (amonio, piperazina, etc.) y aumentará para los neutros (acético, fórmico, etc.) y aniónicos (dihidrogenofosfato, dihidrogenocitrato, etc.). La Tabla 8 incluye valores de ${}^s_w pH$ para fases móviles con distinto contenido de modificador orgánico.

Tabla 8. Valores de m_{pH} para la estimación del $^{\text{w}}\text{pH}$ en fases móviles tamponadas que contengan acetonitrilo o metanol, y valores de $^{\text{s}}\text{pH}$ a distintos contenidos de modificador orgánico.

Tampón	$^{\text{w}}\text{pH}$	Acetonitrilo				Metanol				
		m_{pH}	$^{\text{s}}\text{pH}$			m_{pH}	$^{\text{s}}\text{pH}$			
			20%	40%	60%		20%	40%	60%	80%
Ácido fórmico										
0,01 mol·L ⁻¹	2,50	0,12	2,52	2,55	2,57	1,11	2,65	2,85	3,09	3,34
	3,00	1,12	3,22	3,45	3,67	1,50	3,20	3,48	3,79	4,13
	3,50	1,71	3,84	4,18	4,53	1,76	3,74	4,06	4,43	4,83
	4,00	1,75	4,35	4,70	5,05	1,80	4,24	4,57	4,95	5,36
	4,50	1,75	4,85	5,20	5,55	1,80	4,74	5,07	5,45	5,86
	5,00	1,75	5,35	5,70	6,05	1,80	5,24	5,57	5,95	6,36
0,05 mol·L ⁻¹	2,50	0,81	2,66	2,82	2,99	1,38	2,68	2,94	3,23	3,54
	3,00	1,72	3,34	3,69	4,03	1,77	3,24	3,56	3,93	4,34
	3,50	1,78	3,86	4,21	4,57	1,81	3,74	4,08	4,46	4,87
	4,00	1,78	4,36	4,71	5,07	1,81	4,24	4,58	4,96	5,37
	4,50	1,78	4,86	5,21	5,57	1,81	4,74	5,08	5,46	5,87
	5,00	1,78	5,36	5,71	6,07	1,81	5,24	5,58	5,96	6,37
Ácido acético										
0,01 mol·L ⁻¹	3,50	1,64	3,83	4,16	4,48	1,85	3,75	4,09	4,48	4,90
	4,00	2,26	4,45	4,90	5,36	2,22	4,30	4,71	5,17	5,68
	4,50	2,28	4,96	5,41	5,87	2,25	4,80	5,22	5,69	6,20
	5,00	2,28	5,46	5,91	6,37	2,25	5,30	5,72	6,19	6,70
	5,50	2,28	5,96	6,41	6,87	2,25	5,80	6,22	6,69	7,20
	6,00	2,28	6,46	6,91	7,37	2,25	6,30	6,72	7,19	7,70
0,05 mol·L ⁻¹	3,50	2,23	3,95	4,39	4,84	2,17	3,79	4,19	4,65	5,14
	4,00	2,28	4,46	4,91	5,37	2,22	4,30	4,71	5,17	5,68
	4,50	2,28	4,96	5,41	5,87	2,23	4,80	5,21	5,68	6,19
	5,00	2,28	5,46	5,91	6,37	2,23	5,30	5,71	6,18	6,69
	5,50	2,28	5,96	6,41	6,87	2,23	5,80	6,21	6,68	7,19
	6,00	2,28	6,46	6,91	7,37	2,23	6,30	6,71	7,18	7,69
Ácido cítrico										
0,01 mol·L ⁻¹	2,50	0,48	2,60	2,69	2,79	1,52	2,70	2,98	3,30	3,65
	3,00	1,15	3,23	3,46	3,69	1,88	3,25	3,60	3,99	4,42
	3,50	1,38	3,78	4,05	4,33	2,16	3,79	4,19	4,64	5,13
	4,00	1,56	4,31	4,62	4,94	2,35	4,31	4,75	5,24	5,78
	4,50	1,67	4,83	5,17	5,50	2,49	4,83	5,29	5,81	6,38
	5,00	1,75	5,35	5,70	6,05	2,61	5,35	5,83	6,38	6,97
	5,50	1,91	5,88	6,26	6,65	2,73	5,87	6,37	6,94	7,57
	6,00	1,98	6,40	6,79	7,19	2,81	6,38	6,89	7,48	8,13
	6,50	1,99	6,90	7,30	7,69	2,84	6,88	7,40	8,00	8,65
	7,00	1,99	7,40	7,80	8,19	2,83	7,38	7,90	8,49	9,14
7,50	1,99	7,90	8,30	8,69	2,76	7,87	8,38	8,96	9,59	

Tabla 8 (continuación)

Tampón	w pH	Acetonitrilo			Metanol					
		m_{pH}	w pH			m_{pH}	w pH			
			20%	40%	60%		20%	40%	60%	80%
Ácido cítrico										
0,05 mol·L ⁻¹	2,50	1,16	2,73	2,96	3,20	1,86	2,75	3,09	3,48	3,91
	3,00	1,43	3,29	3,57	3,86	2,15	3,29	3,68	4,14	4,63
	3,50	1,49	3,80	4,10	4,39	2,30	3,81	4,23	4,71	5,24
	4,00	1,60	4,32	4,64	4,96	2,39	4,32	4,76	5,26	5,81
	4,50	1,65	4,83	5,16	5,49	2,48	4,83	5,29	5,81	6,38
	5,00	1,75	5,35	5,70	6,05	2,58	5,35	5,82	6,36	6,95
	5,50	1,86	5,87	6,24	6,62	2,68	5,86	6,35	6,92	7,53
	6,00	1,88	6,38	6,75	7,13	2,73	6,37	6,87	7,44	8,07
	6,50	1,88	6,88	7,25	7,63	2,75	6,87	7,37	7,95	8,58
	7,00	1,88	7,38	7,75	8,13	2,74	7,37	7,87	8,45	9,07
	7,50	1,88	7,88	8,25	8,63	2,70	7,86	8,36	8,93	9,54
Ácido fosfórico										
0,01 mol·L ⁻¹	2,21	0,51	2,31	2,41	2,52	1,51	2,41	2,69	3,01	3,35
	3,00	1,29	3,26	3,52	3,77	2,36	3,32	3,75	4,25	4,79
	3,50	1,34	3,77	4,04	4,30	2,40	3,82	4,26	4,77	5,32
	6,50	1,75	6,85	7,20	7,55	2,99	6,90	7,45	8,08	8,76
	7,00	1,75	7,35	7,70	8,05	2,98	7,40	7,95	8,57	9,25
	7,50	1,75	7,85	8,20	8,55	2,94	7,89	8,44	9,05	9,72
	8,00	1,75	8,35	8,70	9,05	2,85	8,38	8,91	9,50	10,16
	8,50	1,75	8,85	9,20	9,55	2,62	8,85	9,33	9,88	10,48
0,05 mol·L ⁻¹	2,21	1,47	2,50	2,80	3,09	2,54	2,55	3,02	3,55	4,13
	3,00	1,70	3,34	3,68	4,02	2,81	3,38	3,89	4,48	5,13
	3,50	1,71	3,84	4,18	4,53	2,81	3,88	4,39	4,98	5,63
	6,50	1,71	6,84	7,18	7,53	2,96	6,90	7,44	8,06	8,74
	7,00	1,71	7,34	7,68	8,03	2,95	7,39	7,94	8,56	9,23
	7,50	1,71	7,84	8,18	8,53	2,94	7,89	8,44	9,05	9,72
	8,00	1,71	8,34	8,68	9,03	2,88	8,39	8,92	9,52	10,18
	8,50	1,71	8,84	9,18	9,53	2,73	8,87	9,37	9,94	10,57
Tris										
0,01 mol·L ⁻¹	7,00	-0,58	6,88	6,77	6,65	-0,17	6,97	6,93	6,90	6,86
	7,50	-0,58	7,38	7,27	7,15	-0,17	7,47	7,43	7,40	7,36
	8,00	-0,58	7,88	7,77	7,65	-0,17	7,97	7,93	7,90	7,86
	8,50	-0,58	8,38	8,27	8,15	-0,17	8,47	8,43	8,40	8,36
	9,00	-0,58	8,88	8,77	8,65	-0,17	8,97	8,93	8,90	8,86
0,05 mol·L ⁻¹	7,00	-0,58	6,88	6,77	6,65	-0,16	6,97	6,94	6,90	6,87
	7,50	-0,58	7,38	7,27	7,15	-0,16	7,47	7,44	7,40	7,37
	8,00	-0,58	7,88	7,77	7,65	-0,16	7,97	7,94	7,90	7,87
	8,50	-0,58	8,38	8,27	8,15	-0,16	8,47	8,44	8,40	8,37
	9,00	-0,58	8,88	8,77	8,65	-0,16	8,97	8,94	8,90	8,87

Tabla 8 (continuación)

Tampón	$w_p\text{pH}$	Acetonitrilo				Metanol					
		m_{pH}	$s_w\text{pH}$			m_{pH}	$s_w\text{pH}$				
			20%	40%	60%		20%	40%	60%	80%	
Amonio											
0,01 mol·L ⁻¹	8,00	-0,60	7,88	7,76	7,64	-0,69	7,86	7,72	7,59	7,45	
	8,50	-0,60	8,38	8,26	8,14	-0,69	8,36	8,22	8,09	7,95	
	9,00	-0,60	8,88	8,76	8,64	-0,69	8,86	8,72	8,59	8,45	
	9,50	-0,60	9,38	9,26	9,14	-0,69	9,36	9,22	9,09	8,95	
	10,00	-0,60	9,88	9,76	9,64	-0,66	9,87	9,74	9,60	9,47	
0,05 mol·L ⁻¹	8,00	-0,60	7,88	7,76	7,64	-0,68	7,86	7,73	7,59	7,46	
	8,50	-0,60	8,38	8,26	8,14	-0,68	8,36	8,23	8,09	7,96	
	9,00	-0,60	8,88	8,76	8,64	-0,68	8,86	8,73	8,59	8,46	
	9,50	-0,60	9,38	9,26	9,14	-0,68	9,36	9,23	9,09	8,96	
	10,00	-0,60	9,88	9,76	9,64	-0,68	9,86	9,73	9,59	9,46	
Ácido bórico											
0,01 mol·L ⁻¹	8,00	2,97	8,59	9,19	9,78	-	-	-	-	-	
	8,50	2,97	9,09	9,69	10,28	-	-	-	-	-	
	9,00	2,97	9,59	10,19	10,78	-	-	-	-	-	
	9,50	2,94	10,09	10,68	11,26	-	-	-	-	-	
	10,00	2,80	10,56	11,12	11,68	-	-	-	-	-	
	10,50	2,37	10,97	11,45	11,92	-	-	-	-	-	
0,05 mol·L ⁻¹	8,00	2,98	8,60	9,19	9,79	-	-	-	-	-	
	8,50	2,98	1,10	1,69	2,29	-	-	-	-	-	
	9,00	2,97	9,59	10,19	10,78	-	-	-	-	-	
	9,50	2,96	10,09	10,68	11,28	-	-	-	-	-	
	10,00	2,91	10,58	11,16	11,75	-	-	-	-	-	
	10,50	2,67	11,03	11,57	12,10	-	-	-	-	-	
Piperazina											
0,01 mol·L ⁻¹	4,50	-0,43	4,41	4,33	4,24	-0,73	4,35	4,21	4,06	3,92	
	5,00	-0,44	4,91	4,82	4,74	-1,00	4,80	4,60	4,40	4,20	
	5,50	-0,44	5,41	5,32	5,24	-1,09	5,28	5,06	4,85	4,63	
	6,00	-0,44	5,91	5,82	5,74	-1,13	5,77	5,55	5,32	5,10	
	6,50	-0,44	6,41	6,32	6,24	-1,14	6,27	6,04	5,82	5,59	
	8,50	-0,54	8,39	8,28	8,18	-1,17	8,27	8,03	7,80	7,56	
	9,00	-0,54	8,89	8,78	8,68	-1,17	8,77	8,53	8,30	8,06	
	9,50	-0,54	9,39	9,28	9,18	-1,17	9,27	9,03	8,80	8,56	
	10,00	-0,53	9,89	9,79	9,68	-1,17	9,77	9,53	9,30	9,06	
	10,50	-0,39	10,42	10,34	10,27	-1,12	10,28	10,05	9,83	9,60	

Tabla 8 (continuación)

Tampón	^wpH	m_{pH}	Acetonitrilo			Metanol				
			^spH			^spH				
			20%	40%	60%	m_{pH}	20%	40%	60%	80%
Piperazina										
0,05 mol·L ⁻¹	4,50	-0,40	4,42	4,34	4,26	-0,90	4,32	4,14	3,96	3,78
	5,00	-0,41	4,92	4,84	4,75	-1,05	4,79	4,58	4,37	4,16
	5,50	-0,41	5,42	5,34	5,25	-1,10	5,28	5,06	4,84	4,62
	6,00	-0,41	5,92	5,84	5,75	-1,12	5,78	5,55	5,33	5,10
	6,50	-0,41	6,42	6,34	6,25	-1,13	6,27	6,05	5,82	5,60
	8,50	-0,55	8,39	8,28	8,17	-1,18	8,26	8,03	7,79	7,56
	9,00	-0,55	8,89	8,78	8,67	-1,18	8,76	8,53	8,29	8,06
	9,50	-0,55	9,39	9,28	9,17	-1,18	9,26	9,03	8,79	8,56
	10,00	-0,55	9,89	9,78	9,67	-1,18	9,76	9,53	9,29	9,06
	10,50	-0,54	10,39	10,28	10,18	-1,17	10,27	10,03	9,80	9,56
Bicarbonato										
0,01 mol·L ⁻¹	9,00	2,16	9,43	9,86	10,30	-	-	-	-	-
	9,50	2,16	9,93	10,36	10,80	-	-	-	-	-
	10,00	2,15	10,43	10,86	11,29	-	-	-	-	-
	10,50	2,09	10,92	11,34	11,75	-	-	-	-	-
	11,00	1,92	11,38	11,77	12,15	-	-	-	-	-
	11,50	1,83	11,87	12,23	12,60	-	-	-	-	-
0,05 mol·L ⁻¹	9,00	2,15	9,43	9,86	10,29	-	-	-	-	-
	9,50	2,15	9,93	10,36	10,79	-	-	-	-	-
	10,00	2,15	10,43	10,86	11,29	-	-	-	-	-
	10,50	2,12	10,92	11,35	11,77	-	-	-	-	-
	11,00	2,00	11,40	11,80	12,20	-	-	-	-	-
	11,50	1,86	11,87	12,24	12,62	-	-	-	-	-

$d_{\text{pH}}=5/4$ para ácidos fórmico, acético, cítrico y fosfórico; $d_{\text{pH}}=1$ para tris, amonio y piperazina.

5. EFECTO DEL MODIFICADOR ORGÁNICO SOBRE EL GRADO DE IONIZACIÓN DEL ANALITO

El grado de ionización de un analito (α) se define como la fracción molar de especie ionizada. Si el analito es un ácido monoprótico neutro (HA), su grado de ionización (α_{A}) puede expresarse como:

$$\alpha_{\text{A}^-} = \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}] + [\text{A}^-]} = \frac{1}{1 + 10^{\text{p}K_{\text{a}} - \text{pH}}} \quad (9)$$

y si se trata de un ácido catiónico (base protonada) (α_{HA}):

$$\alpha_{\text{HA}^+} = \frac{[\text{HA}^+]}{[\text{HA}^+] + [\text{A}]} = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{\text{a}}'}} \quad (10)$$

Habida cuenta del efecto del modificador orgánico sobre el pH del medio y el $\text{p}K_{\text{a}}$ del analito, resulta evidente que el grado de ionización de un analito ionizable en una fase móvil hidro-orgánica estará muy condicionado por la naturaleza y contenido del modificador orgánico. En consecuencia, para el cálculo preciso del grado de ionización en una determinada fase móvil, será necesario utilizar los valores de ^spH y $^s\text{p}K_{\text{a}}'$ o bien de ^wpH y $^w\text{p}K_{\text{a}}'$, ya que la combinación de las Ecs. (1) y (2) muestra que $^s\text{pH} - ^s\text{p}K_{\text{a}}' = ^w\text{pH} - ^w\text{p}K_{\text{a}}'$.

6. INTERPRETACION DE LOS CROMATOGRAMAS DE LAS FIGURAS 1 Y 2

El factor de retención (k) de un analito con propiedades ácido-base a un determinado pH es un valor comprendido entre el correspondiente a la forma ácida (k_{HA}) y a la forma básica (k_A). En el caso de un ácido monoprótico neutro y elución isocrática, la expresión característica de la variación de la retención en función del pH de la fase móvil es [53-57]:

$$k = \frac{k_{HA} + k_A 10^{pH-pK'_a}}{1 + 10^{pH-pK'_a}} \quad (11)$$

y para un ácido monoprótico catiónico:

$$k = \frac{k_A + k_{HA} 10^{pK'_a-pH}}{1 + 10^{pK'_a-pH}} \quad (12)$$

siendo pK'_a la constante de disociación del analito. Las Ecs. (11) y (12) describen sigmoides con un punto de inflexión correspondiente al valor de pK'_a del analito. Para poder aplicar correctamente esta ecuación es necesario que el pH de la fase móvil esté correctamente definido y medido, y que el valor de pK'_a del analito se encuentre en la misma escala. Tal como se ha comentado con anterioridad, la escala ${}^w\text{pH}$ no da información real sobre el pH de la fase móvil, y el pK_a del analito en la mezcla hidro-orgánica no coincide con ${}^w pK_a$, por lo que estas escalas no serían adecuadas. Por el contrario, serían perfectamente válidas las combinaciones de escalas ${}^s\text{pH}-{}^s pK_a$ y ${}^w\text{pH}-{}^w pK_a$. Del examen de las Ecs. (11) y (12) concluimos que pequeñas variaciones del pH de la fase móvil en la zona próxima al pK_a del analito pueden conducir a cambios notables en la retención cromatográfica. De ahí la importancia de conocer el grado de ionización de los analitos, y expresar el pK_a y el pH en las escalas apropiadas.

Ahora ya sabemos todo lo necesario para responder a la cuestión formulada al principio de este artículo: ¿Por qué fases móviles del mismo pH acuoso pueden conducir a cromatogramas distintos? Centrémonos en el ejemplo más sencillo, el de la Figura 1. Tenemos dos fases móviles al 60% de acetonitrilo, preparadas a partir de dos tampones acuosos de la misma concentración ($0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) y del mismo pH (${}^w\text{pH} = 8,00$). Uno de los tampones es $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$, ácido catiónico, mientras que el otro es $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$, ácido aniónico. Debido a la distinta naturaleza de los tampones, ya estamos en condiciones de suponer, de manera cualitativa, que el pH de la fase móvil tamponada con $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ será menor que 8,00 ($m_{\text{pH}} = -0,60$ según Tabla 8), mientras que para el $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ será superior ($m_{\text{pH}} = 1,75$). Si recurrimos a la Ec. 7 vemos, que en efecto, los valores del ${}^s\text{pH}$ de las fases móviles serán 7,64 y 9,05. Una diferencia notable. Si centramos nuestra atención en los analitos, veremos que se trata de 2-nitrofenol, 2,4,6-trimetilpiridina, 3-bromofenol y *N,N*-dimetilbencilamina. Los valores de pK_a en agua de estos analitos (${}^w pK_a$) son, respectivamente, 7,23, 7,43, 9,03 y 8,91 [25,58]. Cualitativamente podemos decir que el pK_a de los fenoles en la fase móvil va a aumentar, debido a su carácter de ácido neutro, mientras que para la piridina y la amina, ácidos catiónicos, se va a observar el fenómeno contrario. Habitualmente la variación del pK_a de los analitos suele ser más pronunciada que la variación del pH de la fase móvil, pero es conveniente comprobarlo. Calculamos los valores del ${}^s pK_a$ al 60% de acetonitrilo usando las Ecs. (4-6) y los valores de la Tabla 6, y los resultados obtenidos son: 8,92, 6,04, 11,14 y 8,05, respectivamente. A partir de los valores de pH de la fase móvil y de pK_a de los analitos, podemos calcular fácilmente mediante las Ecs. (9) y (10) su grado de ionización. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Grado de ionización de los analitos de la Figura 1 en las fases móviles estudiadas (60% acetonitrilo).

Analito	${}^s pK_a$	Grado de ionización (α)	
		$\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ (${}^s\text{pH} = 9,05$)	$\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ (${}^s\text{pH} = 7,64$)
2-nitrofenol	8,92	57%	5%
2,4,6-trimetilpiridina	6,04	0%	2%
3-bromofenol	11,14	1%	0%
<i>N,N</i> -dimetilbencilamina	8,05	9%	72%

Podemos observar que el grado de ionización de la 2,4,6-trimetilpiridina y el 3-bromofenol es prácticamente nulo en las dos fases móviles, explicando así por qué presentan la misma retención cromatográfica independientemente del tampón utilizado. La 2,4,6-trimetilpiridina presenta un s_pK_a bastante inferior al s_pH de las dos fases móviles, por lo que siempre se encuentra en su forma básica, desprotonada y neutra. Con el 3-bromofenol sucede lo contrario, pero con el mismo resultado: el s_pK_a es claramente superior al s_pH , y el fenol se encuentra en su forma ácida, neutra. Pero para el 2-nitrofenol y la *N,N*-dimetilbencilamina sí que observamos cambios en el grado de ionización en función del tampón seleccionado, puesto que los valores de s_pK_a se encuentran entre los valores de s_pH de las dos fases móviles. El fenol, en el tampón de fosfato se encuentra más ionizado (57%) que en el de amoníaco (5%), y por este motivo su tiempo de retención en el primero es menor que en el segundo. Para la amina observamos el caso contrario.

Veamos ahora el ejemplo de la Figura 2, un poco más complejo porque introduce un mayor número de analitos, pero conceptualmente parecido al anterior. En este caso los compuestos cromatografiados son: 4-nitrofenol (${}^w_pK_a = 7,15$), 2-nitrofenol (7,23), 2,4,6-trimetilpiridina (7,43), 3-nitrofenol (8,36), 2-clorofenol (8,56), *N,N*-dimetilbencilamina (8,91) y 3-bromofenol (9,03). Al 60% de metanol, los valores calculados de s_pH para las

fases móviles de NH_4^+ / NH_3 y $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ son, respectivamente, 7,59 y 9,51. Y los valores de s_pK_a de los analitos, 8,10, 8,19, 6,19, 9,43, 9,65, 8,37 y 10,17, respectivamente. Ahora podemos calcular el grado de ionización de los compuestos en las fases móviles (Figura 3) y comprobar que los cambios observados en la retención cromatográfica responden a variaciones en el grado de ionización de los analitos. La bencilamina presenta la variación más espectacular en el tiempo de retención en función del tampón seleccionado. Este analito ocupa el primer lugar en el orden de elución en la fase móvil NH_4^+ / NH_3 , y la última posición en el tampón $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ (Figura 2). Si observamos la Figura 3, veremos que al usar fases móviles tamponadas con NH_4^+ / NH_3 el grado de ionización de este analito es elevado y permanece más o menos inalterado al variar el contenido de metanol. Esto es porque ambos, analito y tampón, son ácidos catiónicos que disminuyen su pK_a con la adición del modificador orgánico. Por lo tanto, la disminución del pH de la fase móvil se ve compensada por la disminución del pK_a del analito, manteniéndose la bencilamina mayoritariamente en su forma ácida. En cambio en la fase móvil $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ sucede el efecto contrario: el analito se vuelve más ácido mientras que la fase móvil se torna más básica, provocando una progresiva disminución del grado de disociación de la bencilamina. Este mismo efecto, aunque de signo contrario, explica las variaciones en el orden de elución de los fenoles de la Figura 2.

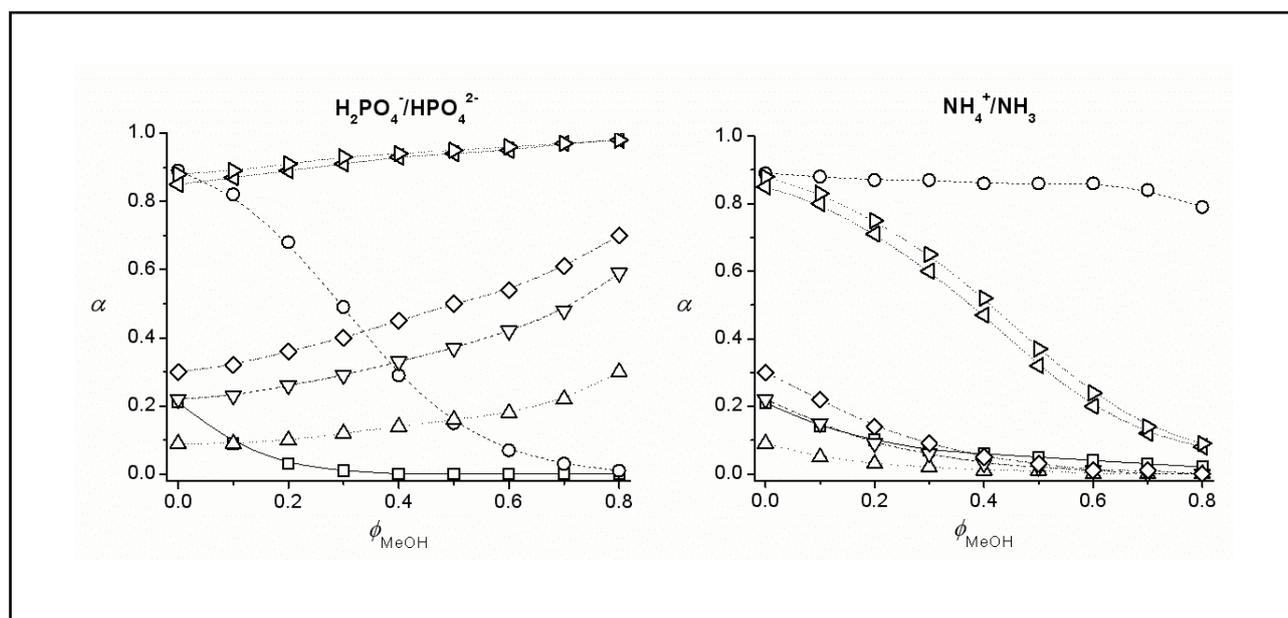


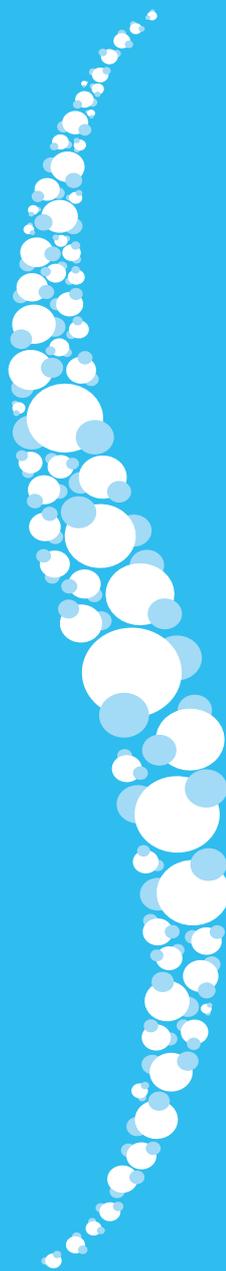
Figura 3. Variación del grado de ionización al añadir metanol a tampones acuosos de ${}^w_pH = 8$ y concentración $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ preparados a partir de $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ y NH_4^+ / NH_3 . Compuestos: (□) 2,4,6-trimetilpiridina, (○) *N,N*-dimetilbencilamina, (△) 3-bromofenol, (▽) 2-clorofenol, (◁) 2-nitrofenol, (◇) 3-nitrofenol y (▷) 4-nitrofenol.

7. CONCLUSIONES

En resumen, las Ecs. (11) y (12) ponen claramente de manifiesto que la retención cromatográfica de las sustancias ionizables depende de la diferencia entre el pH de la fase móvil y el pK_a del analito en la misma fase móvil, $pH - pK_a'$. Ambas magnitudes vienen condicionadas por el efecto del modificador orgánico sobre los valores de pK_a del analito y del compuesto utilizado para tamponar la fase móvil. Si tanto el analito como el tampón son ácidos neutros o aniónicos, sus correspondientes pK_a , y por tanto el pH de la fase móvil, crecen con la adición de modificador y la diferencia mencionada varía (la variación de ambos pK_a no tiene porque ser la misma) pero no demasiado. Lo mismo ocurre si el analito y el tampón son bases, es decir ácidos catiónicos, ya que en este caso ambos pK_a decrecen ligeramente al aumentar la proporción de modificador en la fase móvil. Las mayores variaciones en la diferencia $pH - pK_a'$ se observan cuando se combina un tampón catiónico con un analito neutro o aniónico, o viceversa, produciendo resultados espectaculares como los de los ejemplos mostrados en las Figs. 1 y 2. Hay que añadir aquí que los efectos descritos se ponen claramente de manifiesto siempre que el pH de trabajo esté próximo al pK_a del analito, es decir, en la región de pH correspondiente al salto en las curvas sigmoidales de las Ecs. (11) y (12), donde pequeños cambios de pH implican notables variaciones en la retención cromatográfica.

REFERENCIAS

- [1] B.A. Bidlingmeyer, J. Chromatogr. Sci. 31 (1993) 491.
- [2] I.M. Kolthoff, P.J. Elving, E.B. Sandell, Treatise on Analytical Chemistry, Part I, vol. 1, Interscience, New York, 1959.
- [3] L. Šucha, S. Kotrlý, Solution Equilibria in Analytical Chemistry, Van Nostrand Reinhold, London, 1972.
- [4] R.G. Bates, Determination of pH: Theory and Practice, Wiley, New York, 2nd ed., 1973.
- [5] I.M. Kolthoff, P.J. Elving, E.B. Sandell, Treatise on Analytical Chemistry, Part I, vols. 1 and 2, 2nd ed., Wiley, New York, 1979.
- [6] R.G. Bates, Crit. Rev. Anal. Chem. 10 (1981) 247.
- [7] E.P. Serjeant, Potentiometry and Potentiometric Titrations, Wiley, New York, 1984.
- [8] H. Galster, pH Measurement, Fundamentals, Methods, Applications, Instrumentation, VCH, Weinheim, 1991.
- [9] H.M.N.H. Irving, H. Freiser, T.S. West, IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Pergamon Press, Oxford, 1978.
- [10] T. Mussini, A.K. Covington, P. Longhi, S. Rondinini, Pure Appl. Chem. 57 (1985) 865.
- [11] S. Rondinini, P.R. Mussini, T. Mussini, Pure Appl. Chem. 59 (1987) 1549.
- [12] H. Freiser, G.H. Nancollas, IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1987, 2nd ed., Blackwell, Oxford, 1987.
- [13] P.R. Mussini, T. Mussini, S. Rondinini, Pure Appl. Chem. 69 (1997) 1007.
- [14] J. Inczedy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules 1997, 3rd ed., Blackwell, Oxford, 1998, http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/.
- [15] R.P. Buck, S. Rondinini, A.K. Covington, F.G.K. Baucke, C.M.A. Brett, M.F. Camões, M.J.T. Milton, T. Mussini, R. Naumann, K.W. Pratt, P. Spitzer, G.S. Wilson, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 2169.
- [16] G.W. Tindall, J.W. Dolan, LC-GC Eur. 15 (2002) 776.
- [17] G.W. Tindall, J.W. Dolan, LC-GC Eur. 16 (2003) 10.
- [18] G.W. Tindall, J.W. Dolan, LC-GC Eur. 16 (2003) 64.
- [19] E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, M. Rosés, Anal. Chem. 68 (1996) 3651.
- [20] M. Rosés, I. Canals, H. Allemann, K. Siigur, E. Bosch, Anal. Chem. 68 (1996) 4094.
- [21] I. Canals, J.A. Portal, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 72 (2000) 1802.
- [22] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 72 (2000) 5193.
- [23] I. Canals, F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 911 (2001) 191.
- [24] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 945 (2002) 83.
- [25] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 947 (2002) 47.
- [26] I. Canals, J.A. Portal, M. Rosés, E. Bosch, Chromatographia 55 (2002) 565.
- [27] IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules, 1997, Blackwell, Oxford, 1998.
- [28] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Fresenius J. Anal. Chem. 353 (1995) 148.
- [29] D. Sýkora, E. Tesarová, M. Popl, J. Chromatogr. A 758 (1997) 37.
- [30] R. Bergés, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, J. Chromatogr. A 869 (2000) 27.
- [31] J.J. Baeza-Baeza, M.C. García-Álvarez-Coque, Anal. Chim. Acta 521 (2004) 61.
- [32] N. Sanli, G. Fonrodona, J. Barbosa, G.A. Ozkan, J.L. Beltrán, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 53.
- [33] J.K. Törnblom, T.F.W. Bureyko, C.D. MacKinnon, J. Chromatogr. A 1095 (2005) 68.



EN AGUA DE LABORATORIO,

Adopte un razonamiento integral.

El nuevo sistema Milli-Q Integral de Millipore reúne en un único equipo la secuencia completa de purificación de agua para suministrar, a partir de agua de red, tanto agua purificada como agua ultrapura hasta en tres puntos distintos de uso en el laboratorio.

Al asociar la tecnología exclusiva Elix, a base de resinas autorregenerables, a la fiabilidad Milli-Q, ofrecemos una solución que le permite realizar progresos sustanciales en su labor de investigación, asegurándole la disponibilidad y la calidad de agua necesarias, con costes mínimos.

Gracias a su nuevo concepto de dispensado, ergonómico y flexible, con una selección de filtros finales adaptados a los requisitos de sus aplicaciones, la eficacia de su laboratorio se verá multiplicada.

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™

Research. Development. Production.

Manténgase informado sobre nuestros nuevos productos en: www.millipore.com/lab_water
Contacte en todo momento con un especialista de Millipore llamando al 901 516 645.

CELL BIOLOGY
CELL SIGNALING
DRUG DISCOVERY
IMMUNODETECTION
LAB WATER
PROTEIN BIOMARKERS
STEM CELL RESEARCH



Hasta tres puntos de uso

Todas las calidades
de agua

- [34] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1121 (2006) 170.
- [35] C.L. De Ligny, M. Rehbach, Rec. Trav. Chim. 79 (1960) 727.
- [36] R.G. Bates, M. Paabo, R.A. Robinson, J. Phys. Chem. 67 (1963) 1833.
- [37] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 454 (2002) 157.
- [38] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Anal. Chem. 79 (2007) 3180.
- [39] R.N. Goldberg, N. Kishore, R.M. Lennen, J. Phys. Chem. Ref. Data 31 (2002) 231.
- [40] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, LC-GC Eur. Aceptado (2009).
- [41] N.A. Izmailov, V.N. Izmailova, Zh. Fiz. Khim. 29 (1955) 1050.
- [42] N.A. Izmailov, Electrokhimiya rastvorov (Electrochemistry of Solutions), State University, Kharkov, 1959.
- [43] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 74 (2002) 3809.
- [44] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2491.
- [45] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A (enviado) (2009).
- [46] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, Anal. Chim. Acta 374 (1998) 309.
- [47] M. Rosés, F. Rived, E. Bosch, J. Chromatogr. A 867 (2000) 45.
- [48] F. Rived, I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 439 (2001) 315.
- [49] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 964 (2002) 55.
- [50] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1059 (2004) 33.
- [51] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, Sep. Purif. Rev. 36 (2007) 231.
- [52] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1138 (2007) 203.
- [53] C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Anal. Chem. 49 (1977) 142.
- [54] R.M. Lopes Marques, P.J. Schoenmakers, J. Chromatogr. 592 (1992) 157.
- [55] P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, J. Chromatogr. A 656 (1993) 577.
- [56] M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 982 (2002) 1.
- [57] M. Rosés, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 283.
- [58] CRC Handbook of Chemistry and Physics, 89th ed., Boca Raton, FL., CRC Press, LLC., 2008-2009.

* * * * *