

## *CAPÍTOL III*

---

*Retenció cromatogràfica en fases mòbils acetonitril/aigua i metanol/aigua en funció del pH de la fase mòbil i el  $pK_a$  de l'anàlit ionitzable*



### 3.1 INTRODUCCIÓ

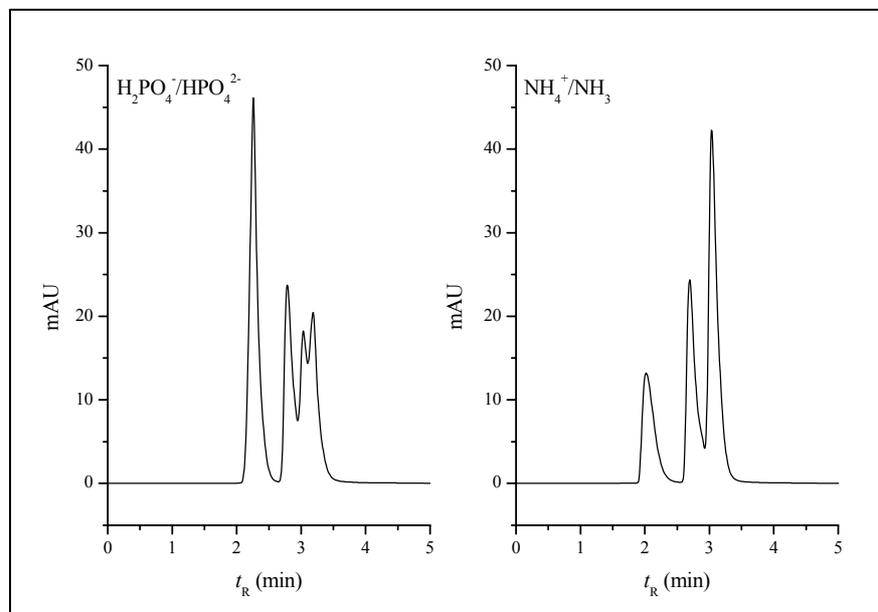
La reproductibilitat i l'èxit de les separacions cromatogràfiques d'anàlits ionitzables requereixen una mesura correcta i acurada del pH de la fase mòbil. Tal i com s'ha vist en el capítol anterior, en cromatografia de líquids el pH de la fase mòbil es pot mesurar de tres formes diferents, donant lloc a tres escales també diferents de pH:

- i. Es mesura el pH de la solució amortidora aquosa, just abans de mesclar-la amb el solvent orgànic  $\rightarrow$   $^w\text{pH}$
- ii. Es mesura el pH de la fase mòbil hidroorgànica, i el sistema d'elèctrodes es calibra amb:
  - a) solucions tampó estàndard preparades en una mescla hidroorgànica de la mateixa composició que la fase mòbil  $\rightarrow$   $^s\text{pH}$
  - b) solucions tampó aquoses, disponibles comercialment  $\rightarrow$   $^w\text{pH}$

Mesurar el pH en la solució aquosa amortidora de pH és molt poc recomanable, ja que la variació del pH en addicionar MeOH o MeCN a la solució aquosa depèn de la naturalesa del tampó, de la seva concentració, i de la fracció de solvent orgànic en la mescla [1,2]. Així, solucions del mateix  $^w\text{pH}$  i concentració però preparades a partir de diferents tampons poden donar lloc a diferents temps de retenció cromatogràfica i, conseqüentment, variar la selectivitat. Les Figures 3.1-2 exemplifiquen aquest fenomen. En ambdós casos s'han preparat fases mòbils al 60% (v/v) de MeCN i MeOH a partir de solucions amortidores aquoses de concentració  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  i  $^w\text{pH}$  8.00, però de diferent naturalesa ( $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ). Utilitzant aquestes fases mòbils, s'han injectat mescles d'anàlits de diferents propietats àcid/base i, tal i com es mostra en els cromatogrames, la selectivitat ha variat notablement. Més endavant s'interpretaran aquestes variacions en els temps de retenció en funció de les espècies amortidores escollides.

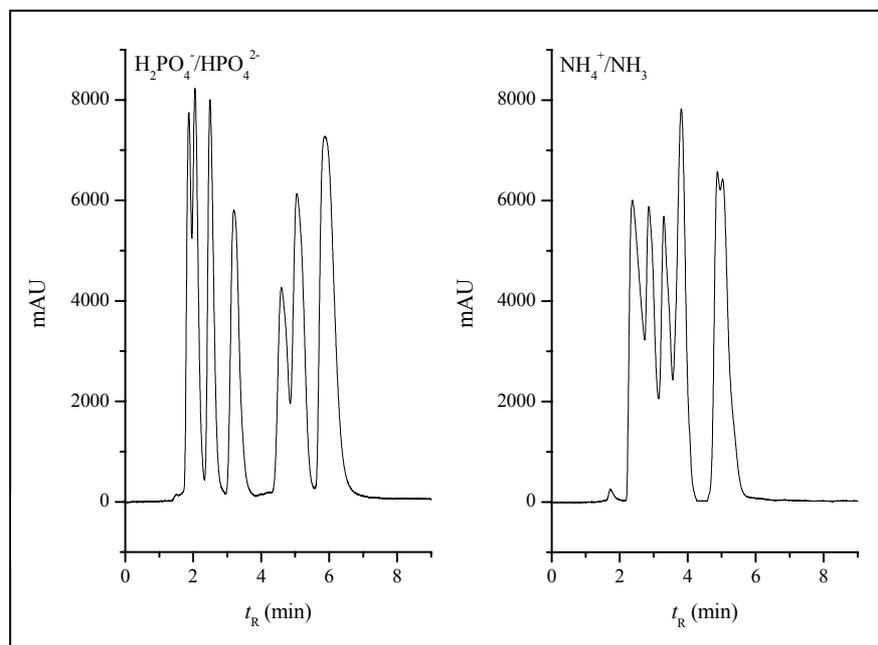
Per tant, és recomanable mesurar el pH en la fase mòbil hidroorgànica després de mesclar el solvent orgànic amb la solució amortidora aquosa, ja que aquest pH sí que dona una informació real sobre l'acidesa de la fase mòbil. De les dues escales de pH que permeten fer aquestes mesures,  $^s\text{pH}$  i  $^w\text{pH}$ , la primera és més pràctica donat que permet calibrar el sistema d'elèctrodes amb solucions amortidores de referència aquoses disponibles

comercialment. L'escala  $s_pH$ , en canvi, requereix la preparació de solucions estàndard de pH per al calibratge del sistema electròdic per a totes i cadascuna de les composicions de fase mòbil.



**Figura 3.1**

Cromatograma obtingut en injectar una mescla de 2-nitrofenol, *N,N*-dimetilbenzilamina, 3-bromofenol i 2,4,6-trimetilpiridina. Fase mòbil MeCN/tampó aquós al 60% (v/v), i concentració aquosa del tampó 0.01 M i pH 8.00.



**Figura 3.2**

Cromatograma obtingut en injectar una mescla de 2-nitrofenol, *N,N*-dimetilbenzilamina, 3-bromofenol, 2-nitrofenol, 3-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2-clorofenol i 2,4,6-trimetilpiridina. Fase mòbil MeOH/tampó aquós al 60% (v/v), i concentració aquosa del tampó 0.01 M i pH 8.00.

## **3.2 VARIACIÓ DEL $pK_a$ D'ANÀLITS IONITZABLES EN MESCLES ACETONITRIL/AIGUA I METANOL/AIGUA**

### **3.2.1 MESCLES ACETONITRIL/AIGUA**

En el cas de mescles MeCN/aigua s'han establert relacions lineals entre els valors de  ${}^s pK_a$  de la mescla i els seus corresponents valors de  ${}^w pK_a$  en aigua per cinc famílies diferents de compostos: àcids carboxílics alifàtics, àcids carboxílics aromàtics, fenols, amines i piridines [3,4]. Aquestes equacions, a partir del  $pK_a$  en aigua, permeten estimar el valor de  $pK_a$  de qualsevol anàlit que pertanyi a les famílies estudiades en mescles MeCN/aigua fins a un 60% en volum de solvent orgànic (100% en el cas de piridines). Aquestes relacions lineals també són útils per convertir els valors de  ${}^s pK_a$  obtinguts en anàlisis cromatogràfiques a qualsevol fracció de MeCN en la fase mòbil als seus corresponents valors de  ${}^w pK_a$ . Aquesta aproximació està basada en les relacions lineals proposades per Chantooni i Kolthoff [5] per mesurar la “resolució de la força d'un àcid” de famílies de compostos en un solvent  $s$  en relació a l'aigua  $w$ . En aquesta aproximació es representen gràficament els valors de  ${}^s pK_a$  d'una sèrie de compostos que comparteixen un mateix grup funcional àcid en funció dels seus corresponents valors de  ${}^w pK_a$ . S'obté així una relació lineal, el pendent de la qual ens indica la capacitat del solvent  $s$  de diferenciar les acidesses de la sèrie de compostos estudiats en el solvent  $s$  en relació a l'aigua. Com més diferent de la unitat sigui el pendent, més capacitat diferenciadora tindrà  $s$ . Així:

$${}^s pK_a = a_s {}^w pK_a + b_s \quad (3.1)$$

on  ${}^s pK_a$  és la constant de dissociació del compost en el solvent hidroorgànic referit al propi solvent com a estat estàndard,  ${}^w pK_a$  és la constant de dissociació en aigua, i  $a_s$  i  $b_s$  són els valors de pendent i ordenada a l'origen obtinguts per a cada família de compostos estudiats. Els paràmetres  $a_s$  i  $b_s$  es relacionen amb la composició de mescla a través de les següents expressions:

$$a_s = \frac{1 + a_{s1} \phi_{\text{MeCN}} + a_{s2} \phi_{\text{MeCN}}^2}{1 + a_{s3} \phi_{\text{MeCN}} + a_{s4} \phi_{\text{MeCN}}^2} \quad (3.2)$$

$$b_s = \frac{b_{s1} \phi_{\text{MeCN}} + b_{s2} \phi_{\text{MeCN}}^2}{1 + b_{s3} \phi_{\text{MeCN}} + b_{s4} \phi_{\text{MeCN}}^2} \quad (3.3)$$

on  $\phi_{\text{MeCN}}$  és la fracció en volum de MeCN en la mescla hidroorgànica, i  $a_{si}$  i  $b_{si}$  són valors constants per a tots els àcids d'una mateixa família a qualsevol composició de la mescla compresa fins al 60% (v/v) de MeCN (100% en el cas de les piridines). Aquests valors es mostren a la Taula 3.1.

**Taula 3.1** Paràmetres per a la predicció del pendent ( $a_s$ , Eq. 3.2) i l'ordenada a l'origen ( $b_s$ , Eq. 3.3) de les relacions lineals entre el  $\text{p}K_a$  d'un anàlit en MeCN/aigua i aigua (Eq. 3.1) [3,4].

Família de compostos	$a_{s1}$	$a_{s2}$	$a_{s3}$	$a_{s4}$	SD	F
Àcids carboxílics alifàtics	9.97	-8.59	8.83	-8.72	0.01	5464
Àcids carboxílics aromàtics	52.04	-10.93	49.33	-32.69	0.02	1695
Fenols	10.05	-10.04	7.97	-8.37	0.02	386
Amines	-0.73	-0.27	-0.87	-0.12	0.00	3476
Piridines	-1.67	0.67	-1.66	0.67	0.03	38
Família de compostos	$b_{s1}$	$b_{s2}$	$b_{s3}$	$b_{s4}$	SD	F
Àcids carboxílics alifàtics	-0.68	9.94	8.45	-8.59	0.08	5152
Àcids carboxílics aromàtics	-5.32	8.99	22.56	-23.21	0.05	14456
Fenols	-5.33	9.95	0.19	-0.70	0.11	2406
Amines	-1.82	2.25	-1.75	0.90	0.05	1559
Piridines	-1.78	1.89	-0.58	-0.40	0.10	1293

La conversió dels valors de  $\text{p}K_a$  entre les escales  $^s\text{p}K_a$  i  $^w\text{p}K_a$  es pot dur a terme mitjançant el paràmetre  $\delta$  (Eqs. 1.25-26).

### 3.2.2 MESCLAS METANOL/AIGUA

A la bibliografia [6,7] es proposa un model d'estimació del  $\text{p}K_a$  en mescles metanol/aigua anàleg al descrit per l'acetonitril. Les equacions descrites permeten calcular el valor de  $^s\text{p}K_a$  d'un anàlit a partir del seu corresponent  $^w\text{p}K_a$  en aigua, per fenols, àcids carboxílics alifàtics, àcids carboxílics aromàtics, amines i piridines, a qualsevol composició metanol/aigua. Les equacions descriptives es corresponen a les Eqs. 3.1-3, i els paràmetres  $a_{si}$

i  $b_{si}$  es mostren a la Taula 3.2. En aquest cas es fa una distinció entre els àcids carboxílics aromàtics que tenen substituents en posició *orto* i els que en poden tenir en altres posicions.

**Taula 3.2** Paràmetres per a la predicció del pendent ( $a_s$ ) i l'ordenada a l'origen ( $b_s$ ) de les relacions lineals entre el  $pK_a$  d'un anàlit en MeOH/aigua i aigua [6].

Família de compostos	$a_{s1}$	$a_{s2}$	$a_{s3}$	$a_{s4}$
Àcids carboxílics alifàtics	-1.406	0.680	-1.551	0.827
Àcids carboxílics aromàtics				
amb <i>orto</i> -substituents	-1.189	0.190	-1.424	0.425
sense <i>orto</i> -substituents	-1.101	0.103	-1.516	0.518
Fenols	-0.656	-0.030	-0.844	0.133
Amines	-0.476	0.209	-0.400	0.158
Piridines	2.617	0.000	2.809	0.000
Família de compostos	$b_{s1}$	$b_{s2}$	$b_{s3}$	$b_{s4}$
Àcids carboxílics alifàtics	1.034	-0.898	-1.250	0.277
Àcids carboxílics aromàtics				
amb <i>orto</i> -substituents	0.449	-0.429	-1.674	0.677
sense <i>orto</i> -substituents	-0.178	0.187	-1.699	0.702
Fenols	-0.454	0.866	-0.017	-0.865
Amines	-0.458	0.477	-1.674	0.690
Piridines	-1.733	1.763	-1.214	0.272

### 3.3 EFECTE DE L'ESCALA DE pH EN LA RETENCIÓ CROMATOGRÀFICA

#### 3.3.1 RETENCIÓ CROMATOGRÀFICA D'ANÀLITS AMB PROPIETATS ÀCID/BASE

Quan injectem un anàlit amb característiques d'àcid monopròtic feble es retenen dues espècies diferents, l'àcid (HA) i la seva base conjugada (A). La retenció cromatogràfica d'aquest anàlit és la mitjana de la retenció d'aquestes dues espècies ponderada en funció del pH de la solució i el  $pK_a$  del compost. El factor de retenció cromatogràfica de l'àcid feble ( $k$ ) ve donat per:

$$k = \frac{k_{HA} 10^{pK_a - pH} + k_A}{10^{pK_a - pH} + 1} \quad (3.4)$$

on HA és la forma àcida protonada (neutra o catiònica) i A és la forma bàsica desprotonada (aniònica o neutra, respectivament). Aplicant l'aproximació generalitzada que les dues espècies tenen el mateix temps mort, l'Eq. 3.4 esdevé:

$$t_R = \frac{t_{R(HA)} 10^{pK_a - pH} + t_{R(A)}}{10^{pK_a - pH} + 1} \quad (3.5)$$

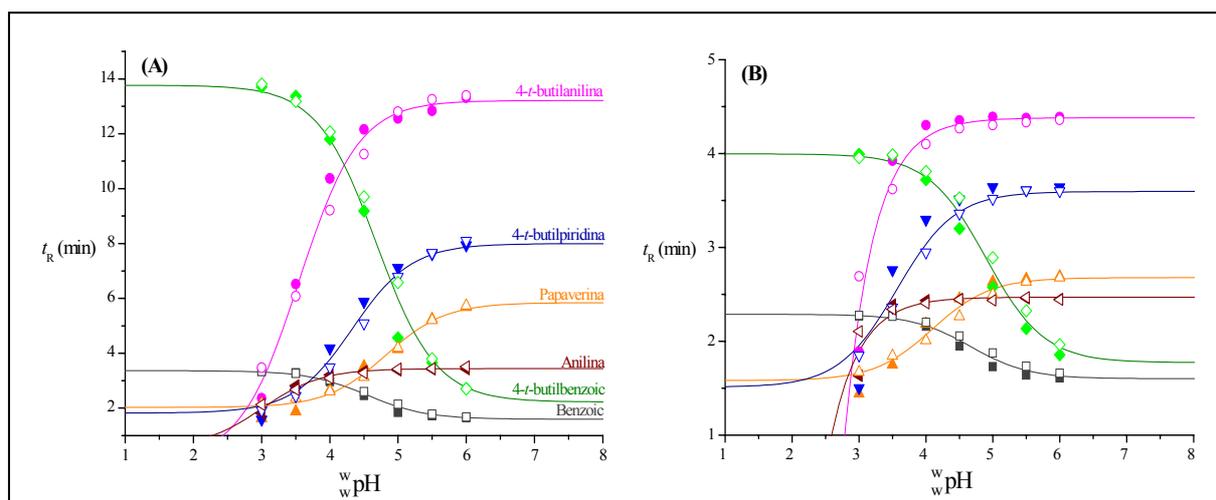
on  $t_R$  és el temps de retenció de l'àcid feble,  $t_{R(HA)}$  el temps de retenció de l'espècie protonada i  $t_{R(A)}$  el temps de retenció de l'espècie desprotonada.

Les Eqs. 3.4-5 posen de manifest que la retenció d'un àcid feble depèn de tres paràmetres que són constants en una fase mòbil de composició determinada: el  $pK_a$  de l'àcid feble, i els temps de retenció de l'espècie totalment protonada i la totalment desprotonada. L'única variable és el pH de la fase mòbil, que a més pot ser mesurat abans d'addicionar el solvent orgànic a la solució amortidora aquosa ( ${}^w\text{pH}$ ), o directament a la fase mòbil hidroorgànica havent calibrat el sistema d'elèctrodes en aigua ( ${}^s\text{pH}$ ), o en una mescla de la mateixa composició que la fase mòbil ( ${}^s\text{pH}$ ). Hi ha diferents relacions entre aquestes tres escales de pH, i els resultats obtinguts en l'ajustament a les Eqs. 3.4-5 també són diferents [8-10].

### **3.3.2 EFECTE DE L'ESCALA DE PH EN ELS AJUSTAMENTS A LA RETENCIÓ CROMATOGRÀFICA**

La mesura del pH d'una fase mòbil abans de mesclar el tampó aquós amb el modificador orgànic ens dona una informació incompleta sobre l'acidesa de la fase mòbil. Com ja s'ha comentat anteriorment en l'exemple de les Figures 3.1-2, solucions amortidores del mateix pH en fase aquosa poden donar lloc a diferències significatives en el pH en addicionar-hi un solvent orgànic. Aquests canvis del pH de la fase mòbil poden prendre una importància cabdal en el cas d'anàlits que tinguin un caràcter feblement àcid, donat que poden provocar canvis significatius en el seu grau d'ionització i, conseqüentment, en els temps de retenció cromatogràfica.

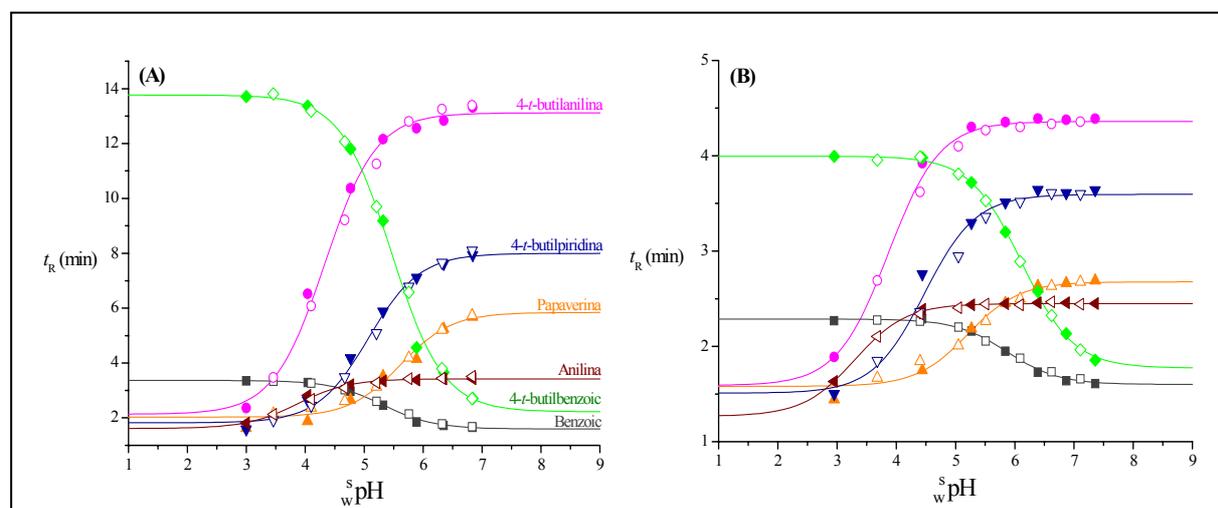
Per exemple, la Figura 3.3 mostra la representació gràfica de temps de retenció cromatogràfica d'àcids neutres (àcids benzoic i 4-*tert*-butilbenzoic) i catiònics (4-*tert*-butilanilina, papaverina, 4-*tert*-butilpiridina i anilina) en funció del pH aquós de la solució amortidora, abans de mesclar-la amb el MeCN, en dos sistemes amortidors diferents (àcid acètic i àcid cítric). Es fa evident que partint d'un mateix valor de  $w$  pH, per a un mateix anàlit i composició de la fase mòbil, tenim diferents temps de retenció depenent de la naturalesa del sistema amortidor, tot i que en l'exemple presentat els dos sistemes amortidors tenen característiques àcides similars. En canvi si representem aquests valors de retenció cromatogràfica en funció del valor mesurat de  $s$  pH de la fase mòbil hidroorgànica (Figura 3.4) observem una bona correspondència dels punts de retenció obtinguts pels dos sistemes amortidors, el de l'àcid cítric i el de l'àcid acètic. Això és degut al diferent comportament en relació al pH d'aquests sistemes amortidors en variar la fracció de MeCN en la fase mòbil.



**Figura 3.3** Representació gràfica dels temps de retenció mesurats de diferents àcids catiònics i neutres a diferents valors de pH mesurats en la solució amortidora aquosa abans d'afegir-li el MeCN. Sistemes amortidors: àcid cítric (símbols buits) i àcid acètic (símbols plens), ambdós  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en solució aquosa, al 40% (A) i 60% (B) en volum de MeCN. Llegendes: (○, ●) 4-*tert*-butilanilina, (▽, ▼) 4-*tert*-butilpiridina, (△, ▲) papaverina, (◁, ▷) anilina, (◇, ◆) àcid 4-*tert*-butilbenzoic i (□, ■) àcid benzoic. Línies: ajustaments a l'Eq. 3.5.

Per tal d'interpretar numèricament aquest fenomen, s'han ajustat conjuntament a l'Eq. 3.5 els temps de retenció cromatogràfica obtinguts pels dos sistemes amortidors en funció dels valors de  $w$  pH i  $s$  pH, al 40 i al 60% de MeCN. Els valors de retenció de les espècies totalment protonada i desprotonada i el valor de  $pK_a$  obtingut en aquest ajustament es mostren a les Taules 3.3-4. No hi ha cap dubte que els millors ajustaments s'obtenen quan s'usen els valors hidroorgànics de pH, els mesurats directament en la fase mòbil MeCN/tampó aquós. La

mitjana de l'error relatiu entre els temps de retenció obtinguts experimentalment i els calculats a partir dels ajustaments de l'Eq. 3.5 és del 2.3% en relació a  $^s_w\text{pH}$  i del 3.7% per a  $^w_w\text{pH}$  i l'error al 40% de MeCN (3.2 i 4.2%, en relació a  $^s_w\text{pH}$  i  $^w_w\text{pH}$ , respectivament) és més alt que al 60% (1.3 i 3.2%). Aquest fet no és sorprenent, donat que les fases mòbils amb una elevada fracció de modificador orgànic i elevada força eluotrópica presenten diferències menys pronunciades en la distribució dels anàlits entre la fase estacionària hidrofòbica i la fase mòbil hidroorgànica. Per aquesta raó, doncs, les diferències en els temps de retenció entre el sistema amortidor de l'àcid cítric i l'àcid acètic són inferiors al 60% que al 40%, malgrat que al 60% les variacions del pH de la fase mòbil i el  $\text{pK}_a$  dels anàlits són més importants que al 40%. Per altra banda, els paràmetres d'ajustament corresponents a l'anilina i la 4-*tert*-butilpiridina per ambdues fases mòbils en relació al  $^w_w\text{pH}$  no tenen significat físic ni químic, donat que els temps de retenció de les espècies totalment ionitzades al 40% de MeCN són inferiors al temps de retenció del marcador del temps mort (KBr,  $\sim 1.5$  min), o fins i tot negatives al 60% de MeCN. Aquests ajustaments anòmals es deuen als diferents temps de retenció obtinguts per aquests anàlits pels dos sistemes amortidors a  $^w_w\text{pH}$  3.



**Figura 3.4** Representació gràfica dels temps de retenció mesurats de diferents àcids catiónics i neutres a diferents valors de pH mesurats en la fase mòbil MeCN/tampó aquós. Sistemes amortidors: àcid cítric (símbols buits) i àcid acètic (símbols plens), ambdós  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en solució aquosa, al 40% (A) i 60% (B) en volum de MeCN. Llegenda: ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) 4-*tert*-butilanilina, ( $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ ) 4-*tert*-butilpiridina, ( $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ ) papaverina, ( $\triangleleft$ ,  $\blacktriangleleft$ ) anilina, ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ) àcid 4-*tert*-butilbenzoic i ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ) àcid benzoic. Línies: ajustaments a l'Eq. 3.5.

**Taula 3.3** Paràmetres estadístics i d'ajustament a l'Eq. 3.5 al 40 i 60% (v/v) de MeCN, considerant el valor aquós de  $w$  pH, abans d'addicionar el solvent orgànic a la fase mòbil.

Anàlit	40% MeCN					
	$t_{R(A)}$	$t_{R(HA)}$	$w$ p $K_a^{40\%}$	$r^2$	SD	F
Àcid benzoic	1.58±0.05	3.42±0.05	4.51±0.06	0.989	0.08	512
Àcid 4- <i>tert</i> -butilbenzoic	2.13±0.33	14.06±0.27	4.66±0.06	0.990	0.49	541
4- <i>tert</i> -butilanilina	13.21±0.18	0.07±0.72	3.55±0.07	0.989	0.43	502
Papaverina	5.90±0.16	1.96±0.11	4.82±0.08	0.982	0.21	303
4- <i>tert</i> -butilpiridina	8.06±0.15	1.54±0.19	4.29±0.06	0.990	0.27	531
Anilina	3.44±0.03	0.55±0.54	3.01±0.15	0.977	0.09	238
Anàlit	60% MeCN					
	$t_{R(A)}$	$t_{R(HA)}$	$w$ p $K_a^{60\%}$	$r^2$	S.D.	F
Àcid benzoic	1.60±0.03	2.31±0.03	4.62±0.10	0.973	0.05	197
Àcid 4- <i>tert</i> -butilbenzoic	1.76±0.09	4.03±0.06	4.88±0.08	0.984	0.11	342
4- <i>tert</i> -butilanilina	4.38±0.070	-285±13377	0.86±20	0.945	0.19	94
Papaverina	2.68±0.04	1.46±0.08	3.98±0.11	0.966	0.09	158
4- <i>tert</i> -butilpiridina	3.60±0.08	1.51±0.10	3.66±0.07	0.940	0.18	189
Anilina	2.47±0.04	-202±48692	0.45±104	0.807	0.11	23

(N=14)

**Taula 3.4** Paràmetres estadístics i d'ajustament a l'Eq. 3.5 al 40 i 60% (v/v) de MeCN, considerant el valor de  $w$   $s$  pH de la fase mòbil hidroorgànica.

Anàlit	40% MeCN					
	$t_{R(A)}$	$t_{R(HA)}$	$w$ $s$ p $K_a^{40\%}$	$r^2$	SD	F
Àcid benzoic	1.60±0.03	3.37±0.03	5.31±0.04	0.996	0.05	1375
Àcid 4- <i>tert</i> -butilbenzoic	2.22±0.20	13.77±0.16	5.47±0.04	0.996	0.31	1361
4- <i>tert</i> -butilanilina	13.12±0.15	2.13±0.33	4.33±0.05	0.993	0.36	731
Papaverina	5.84±0.17	2.03±0.11	5.62±0.09	0.980	0.22	269
4- <i>tert</i> -butilpiridina	8.00±0.11	1.82±0.12	5.07±0.05	0.994	0.21	901
Anilina	3.42±0.02	1.61±0.09	3.88±0.07	0.987	0.06	431
Anàlit	60% MeCN					
	$t_{R(A)}$	$t_{R(HA)}$	$w$ $s$ p $K_a^{60\%}$	$r^2$	SD	F
Àcid benzoic	1.60±0.01	2.29±0.01	5.86±0.04	0.994	0.02	982
Àcid 4- <i>tert</i> -butilbenzoic	1.77±0.02	4.00±0.01	6.11±0.02	0.999	0.03	5596
4- <i>tert</i> -butilanilina	4.36±0.02	1.59±0.10	3.86±0.05	0.993	0.07	792
Papaverina	2.68±0.03	1.58±0.04	5.21±0.08	0.981	0.06	286
4- <i>tert</i> -butilpiridina	3.59±0.04	1.51±0.10	4.47±0.08	0.979	0.11	261
Anilina	2.45±0.00	1.27±0.05	3.30±0.05	0.997	0.01	1672

(N=14)

Un altre aspecte a tenir en compte és el significat físic dels valors de  $pK_a$  obtinguts en l'ajustament a l'Eq. 3.5. Els valors de  $pK_a$  obtinguts en relació a  $w$  pH (Taula 3.3) no coincideixen ni amb els valors de  $pK_a$  dels anàlits trobats en la bibliografia, ni amb els valors

estimats de  ${}^s_pK_a$  al 40 i 60% de MeCN, que es mostren a la Taula 3.5. Aquesta manca de correspondència es fa més significativa a mesura que augmenta la fracció en volum de MeCN en la fase mòbil. Tal i com es podia esperar, les desviacions respecte els valors aquosos de  $pK_a$  són positives pels àcids neutres i negatives pels àcids catiónics. La conclusió és, doncs, que l'ús de valors aquosos de pH per caracteritzar fases mòbils condueix a ajustaments que ens donen valors de  $pK_a$  que no tenen cap interpretació física.

**Taula 3.5** Valors bibliogràfics de  ${}^w_pK_a$  [11-13] i estimats de  ${}^s_pK_a$  al 40 i 60% (v/v) dels anàlits cromatogràfics.

Anàlit	${}^w_pK_a$	${}^s_pK_a^{40\%}$	${}^s_pK_a^{60\%}$
Àcid benzoic	4.20	5.19	5.86
Àcid 4- <i>tert</i> -butilbenzoic	4.38	5.42	6.13
4- <i>tert</i> -butilanilina	4.95	4.23	3.80
Papaverina	6.40	5.62	5.02
4- <i>tert</i> -butilpiridina	5.99	5.21	4.62
Anilina	4.61	3.87	3.44

En canvi, si calculem els valors de  $pK_a$  obtinguts en l'ajustament de l'Eq. 3.5 en funció dels valors de  ${}^s_pH$  de la fase mòbil hidroorgànica, podem observar que s'ajusten molt bé amb els corresponents valors de  ${}^s_pK_a$  estimats a partir dels valors bibliogràfics de  ${}^w_pK_a$  (Taula 3.5). La mitjana de la desviació, en valors absoluts i pels dos percentatges de MeCN, és menor de 0.1 unitats de  $pK_a$ . Així, doncs, els valors ajustats de  $pK_a$  considerant el  ${}^s_pH$  de la fase mòbil hidroorgànica tenen un ple significat físic.

Els exemples presentats mostren que és convenient mesurar el pH en la fase mòbil, en lloc que en la solució amortidora aquosa. Tanmateix, pot succeir que la mesura del pH en la mescla hidroorgànica no sigui possible, com seria el cas d'un sistema cromatogràfic que tingui dipòsits independents pel tampó aquós i el solvent orgànic, i la mescla es produeixi dins del mateix equip. En aquests casos pot ser molt útil estimar els valors de pH de la fase mòbil a partir del pH de la solució amortidora aquosa.

### 3.4 ESTIMACIÓ DEL GRAU D'IONITZACIÓ

Les dues propietats principals que controlen el grau de retenció dels anàlits ionitzables en cromatografia de líquids en fase invertida són la hidrofobicitat i el grau d'ionització [9,14-23]. Sobre la hidrofobicitat no podem intervenir, donat que es tracta d'una propietat inherent a la pròpia naturalesa de l'anàlit. En canvi, el grau d'ionització depèn també d'una propietat de l'anàlit, del  $pK_a$ , però també del pH de la fase mòbil, sobre el qual podem intervenir fàcilment. Com a regla general per anàlits d'hidrofobicitat similar, podem afirmar que com més alt sigui el grau d'ionització d'un anàlit menor serà la seva retenció en RP-HPLC.

El grau d'ionització ( $\alpha$ ) és la fracció molar de les espècies ionitzades. Per a un anàlit que tingui un únic equilibri àcid/base considerat ( $HA^z \rightleftharpoons A^{z-1} + H^+$ ) i, per tant, una sola constant d'acidesa ( $K_a$ ), el grau d'ionització s'expressa com:

$$\alpha_A = \frac{[A^{z-1}]}{[HA^z] + [A^{z-1}]} = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (3.6)$$

$$\alpha_{HA} = \frac{[HA^z]}{[HA^z] + [A^{z-1}]} = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (3.7)$$

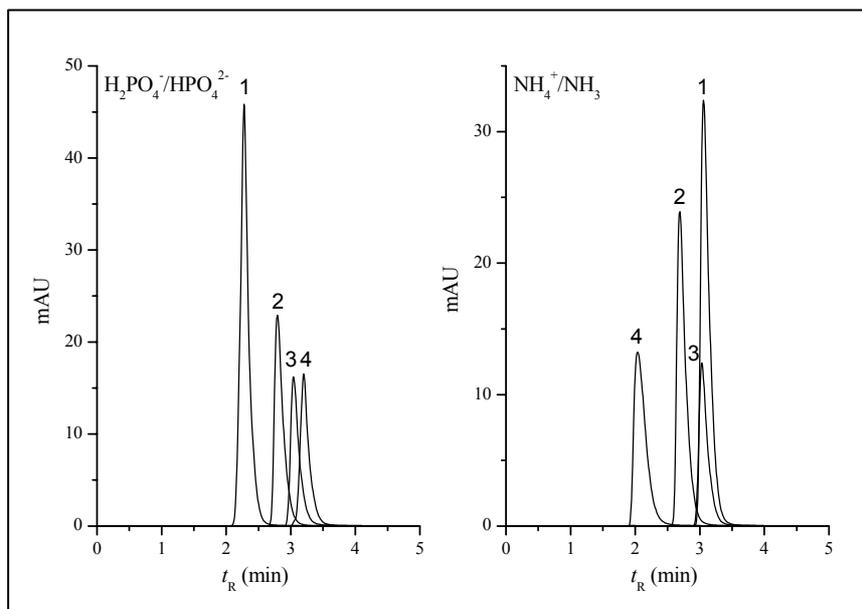
on  $\alpha_A$  és el grau d'ionització d'un àcid neutre ( $z = 0$ ) i  $\alpha_{HA}$  el d'una àcid catiónic ( $z = +1$ ). En un sentit estricte els valors de pH i  $pK_a$  en les Eqs. 3.6-7 haurien d'estar expressats en l'escala  $^s_pH$  i  $^s_pK_a$  (o  $^w_pH$  i  $^w_pK_a$  en el cas particular de l'aigua). En realitat, però, podem fer servir els valors de  $^s_pH$  i  $^s_pK_a$  donat que  $^s_pH - ^s_pK_a = ^w_pH - ^w_pK_a$  ja que els valors d'ambdues escales es troben directament relacionats mitjançant el paràmetre  $\delta$  ( $^s_pH - ^s_pH = ^s_pK_a - ^s_pK_a = \delta$ ).

Ens trobem ara, doncs, en condicions d'explicar qualitativament les diferències en l'ordre d'elució dels anàlits de les Figures 3.1-2. A la Figura 3.1 es mostrava un cromatograma obtingut en injectar una mescla de d'anàlits amb propietats àcid/base, usant dues fases mòbils al 60% (v/v) d'acetonitril de pH en aigua 8.00 però preparades a partir de dos sistemes amortidors de diferent naturalesa. Els anàlits són 2-nitrofenol, 3-bromofenol,

2,4,6-trimetilpiridina i *N,N*-dimetilbenzilamina, i tenen un  $pK_a$  aquós ( ${}^w pK_a$ ) de 7.24, 8.87, 7.49 i 8.91 [3], respectivament. Mitjançant els models proposats podem estimar el valors de  ${}^s pK_a$  dels anàlits estudiats al 60% d'acetonitril, i els valors de  ${}^s pH$  de la fases mòbils amortidores d'amoni/amoniac i dihidrogenfosfat/hidrogenfosfat preparades a partir de solucions aquoses de  ${}^w pH$  8.00 i concentració aquosa  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Coneixent aquests dos valors, es pot calcular el grau d'ionització dels anàlits en cadascuna de les fases mòbils utilitzades Eqs. 3.6-7. El resultat es mostra a la Taula 3.6, i els cromatogrames obtinguts en injectar separatament els anàlits es mostren a la Figura 3.5. El 3-bromofenol i la 2,4,6-trimetilpiridina presenten pràcticament el mateix estat d'ionització en ambdós fases mòbils hidroorgàniques. Pel primer dels anàlits, el seu valor de  ${}^s pK_a$  al 60% d'acetonitril (10.68) és superior als valors de  ${}^s pH$  de les fases mòbils que contenen dihidrogenfosfat/hidrogenfosfat com a tampó (9.06) i amoni amoniac (7.64). D'aquesta forma el fenol es trobarà en la seva forma àcida, per tant, neutra. El cas contrari, però amb idèntic resultat, s'observa per la 2,4,6-trimetilpiridina. El seu  ${}^s pK_a$  (6.14) és menor que el  ${}^s pH$  de la fase mòbil, i l'anàlit es troba en ambdós casos en la seva forma bàsica neutra. En canvi pel 2-nitrofenol i la *N,N*-dimetilbenzilamina s'observen canvis importants en el seu grau d'ionització en funció del sistema amortidor de pH utilitzat, que afecten en gran mesura els seus temps de retenció cromatogràfica. En el primer cas i per la fase mòbil de fosfats predomina la forma bàsica iònica ( ${}^s pH > {}^s pK_a$ ), mentre que per la fase mòbil amoniacal es produeix l'efecte contrari ( ${}^s pH < {}^s pK_a$ ), predominant la forma àcida neutra. En el segon cas el  ${}^s pH$  del tampó d'amoni és molt proper al  ${}^s pK_a$  de l'anàlit, i aquest es troba ionitzat pràcticament al 50%, mentre que en l'altre tampó el  ${}^s pH$  és notablement més alt que el  ${}^s pK_a$  i l'anàlit es troba majoritàriament en la seva forma bàsica neutra.

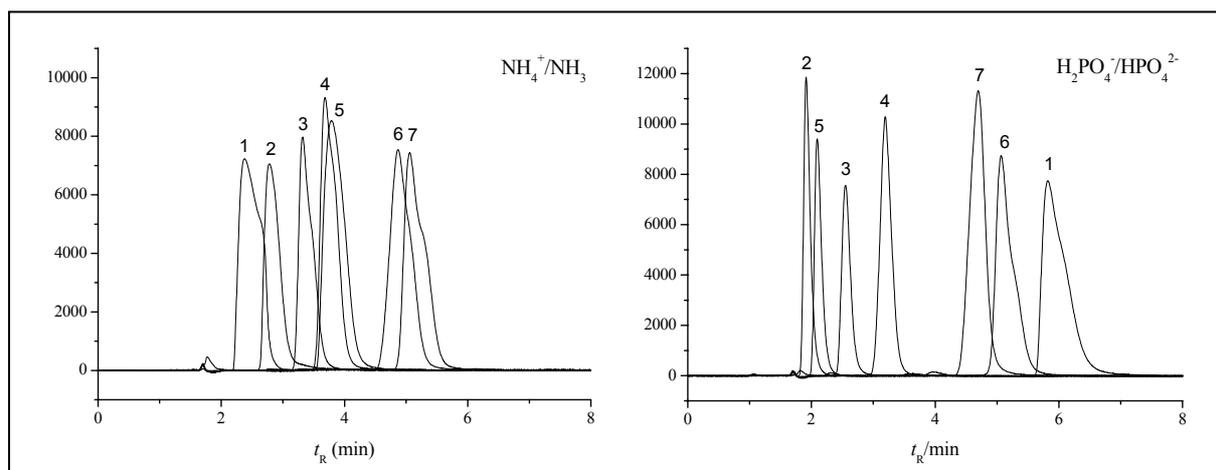
**Taula 3.6** Grau estimat d'ionització d'anàlits ionitzables al 60% d'acetonitril (v/v).

Anàlit	${}^s pK_a$	Grau d'ionització	
		$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ${}^s pH = 9.06$	$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ ${}^s pH = 7.64$
2-nitrofenol	8.72	69%	8%
3-bromofenol	10.68	2%	0%
2,4,6-trimetilpiridina	6.14	0%	3%
<i>N,N</i> -dimetilbenzilamina	7.66	4%	51%

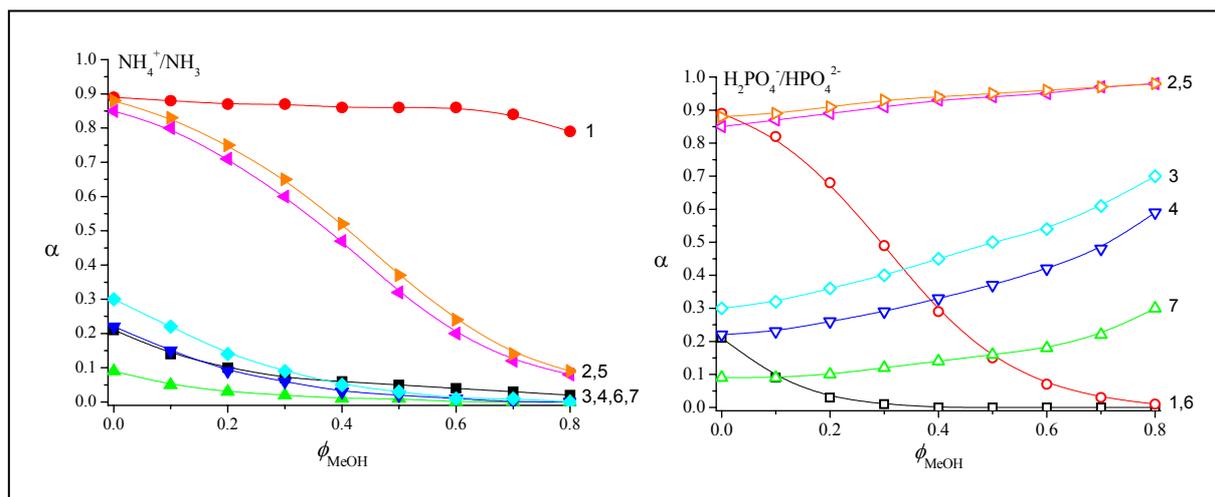
**Figura 3.5**

Cromatogrames obtinguts en injectar separatament 2-nitrofenol (1), 2,4,6-trimetilpiridina (2), 3-bromofenol (3), *N,N*-dimetilbenzilamina (4). Fase mòbil MeCN/tampó aquós al 60% (v/v), i concentració aquosa del tampó 0.01 M i pH 8.00.

El mateix criteri ens pot ser útil per explicar la variació en els temps de retenció en fases mòbils metanol/tampó aquós, tal i com s'exemplificava a la Figura 3.2. Un altre cop hem usat dues solucions amortidores aquoses de la mateixa concentració i pH en aigua, però que es comporten de diferent manera en addicionar metanol fins al 60% en volum. La Figura 3.6 mostra els cromatogrames obtinguts en injectar separatament els compostos de la Figura 3.2. Les diferències en els temps de retenció són coherents amb les variacions del grau d'ionització (Figura 3.7) i les seves hidrofobicitats.



**Figura 3.6** Cromatogrames individuals obtinguts en injectar (1) *N,N*-dimetilbenzoilamina, (2) 4-nitrofenol, (3) 3-nitrofenol, (4) 2-clorofenol, (5) 2-nitrofenol, (6) 2,4,6-trimetilpiridina, (7) 3-bromofenol. Fase mòbil MeOH/tampó aquós al 60% (v/v), i concentració aquosa del tampó 0.01 M i pH 8.00.



**Figura 3.7** Variació del grau d'ionització de compostos amb propietats àcid/base amb l'addició de metanol a solucions amortidores aquoses de pH 8.00 i concentració  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Llegendes: (1, ●, ○) *N,N*-dimetilbenzilamina, (2, ▶, ▷) 4-nitrofenol, (3, ◆, ◇) 3-nitrofenol, (4, ▼, ▽) 2-clorofenol, (5, ◀, ◁) 2-nitrofenol, (6, ■, □) 2,4,6-trimetilpiridina i (7, ▲, △) 3-bromofenol.

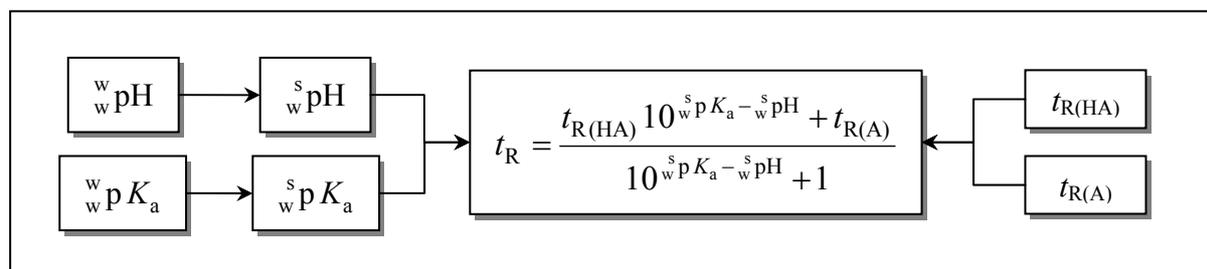
En el cas del tampó de dihidrogenfosfat/hidrogenfosfat els fenols (àcids neutres) incrementen el seu grau d'ionització a mesura que s'addiciona metanol al medi, donat que el  $^s\text{pH}$  del tampó s'incrementa en un major grau que el  $^s\text{p}K_a$  dels fenols. En el cas del tampó amoni/amoníac el grau d'ionització disminueix, donat que el pH del tampó disminueix mentre que el  $\text{p}K_a$  dels anàlits augmenta. El grau d'ionització de la *N,N*-dimetilbenzilamina (àcid catiónic o base neutra) és pràcticament constant en el tampó d'amoníac en addicionar metanol, donat que el descens en el pH del medi és similar al descens en el  $\text{p}K_a$  de l'anàlit. Pel tampó d'hidrogenfosfat el grau d'ionització disminueix, donat que el pH augmenta mentre que el  $\text{p}K_a$  de l'amina disminueix. Els perfils d'ionització de la 2,4,6-trimetilpiridina són molt semblants en els dos sistemes. En el de l'amoni el seu  $\text{p}K_a$  disminueix en major grau que el pH del tampó, i en el del dihidrogenfosfat el pH augmenta mentre que el  $\text{p}K_a$  de la piridina disminueix.

### **3.5 ESTIMACIÓ DELS TEMPS DE RETENCIÓ CROMATOGRÀFICA**

Mitjançant els models presentats en el Capítol II, per als sistemes amortidors més habituals en RP-HPLC podem estimar els valors de  $^s\text{pH}$ , a partir dels valors de  $^w\text{pH}$ , per a qualsevol fase mòbil hidroorgànica que contingui fins a un 60% en volum de MeCN o un 80% de MeOH. Per altra banda, com s'ha vist en aquest capítol, es poden estimar els valors de  $^s\text{p}K_a$  dels anàlits en aquestes mescles hidroorgàniques a partir dels valors de  $\text{p}K_a$  en medi aquós. A més, mitjançant l'Eq. 3.5, es poden estimar els temps de retenció dels anàlits en funció del pH de la fase mòbil hidroorgànica i el  $\text{p}K_a$  dels anàlits en aquesta mescla. Així, per estimar la retenció només cal conèixer el  $^w\text{pH}$  de la solució amortidora aquosa i el  $^w\text{p}K_a$  de l'anàlit, i els temps de retenció de les espècies totalment ionitzada i neutra de l'anàlit (Figura 3.8). Aquests temps de retenció poden ser mesurats injectant el compost en fases mòbils que tinguin un pH dues o tres unitats superior i inferior al  $\text{p}K_a$  de l'anàlit. Si es vol obtenir una informació només qualitativa sobre el perfil de retenció en funció del pH poden considerar-se els temps de retenció normalitzats en lloc dels mesurats, de tal forma que el temps de retenció de l'espècie iònica es considera 0 i el de l'espècie neutra, 1.

Per tal de provar aquest model d'estimació dels temps de retenció s'han estudiat nombrosos fàrmacs de diferents propietats àcides i bàsiques en fases mòbils MeCN/tampó aquós: diclofenac, ibuprofèn i naproxèn (fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals), codeïna (narcòtic analgèsic), trazodona, imipramina, nortriptilina i maprotilina (antidepressius). Per cobrir l'interval de pH necessari s'han usat diferents parelles àcid/base amortidores al 60% (v/v) de MeCN i concentració aquosa  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ :  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{H}_3\text{Cit}/\text{H}_2\text{Cit}^-/\text{HCit}^{2-}/\text{Cit}^{3-}$ . Els temps de retenció corresponents a les espècies neutres i ionitzades dels anàlits han estat mesurades a  $^w\text{pH}$  2.33 (tampó  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) i  $^w\text{pH}$  8.82 (tampó  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) per diclofenac, ibuprofèn, naproxèn i trazodona. I a  $^w\text{pH}$  4.04 ( $\text{H}_2\text{Cit}^-/\text{Cit}^{2-}$ ) i 10.48 ( $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ ) per codeïna, imipramina, nortriptilina i maprotilina. Els valors de  $^s\text{p}K_a$  han estat estimats a partir dels valors de  $^w\text{p}K_a$  obtinguts a la bibliografia, i els valors de  $^s\text{pH}$  han estat estimats a partir dels valors mesurats de  $^w\text{pH}$ . La Figura 3.9 mostra les diferències entre els temps de retenció experimentals i els estimats per diferents valors aquosos de pH. En línies generals hi ha una bona correspondència entre la retenció predita i la

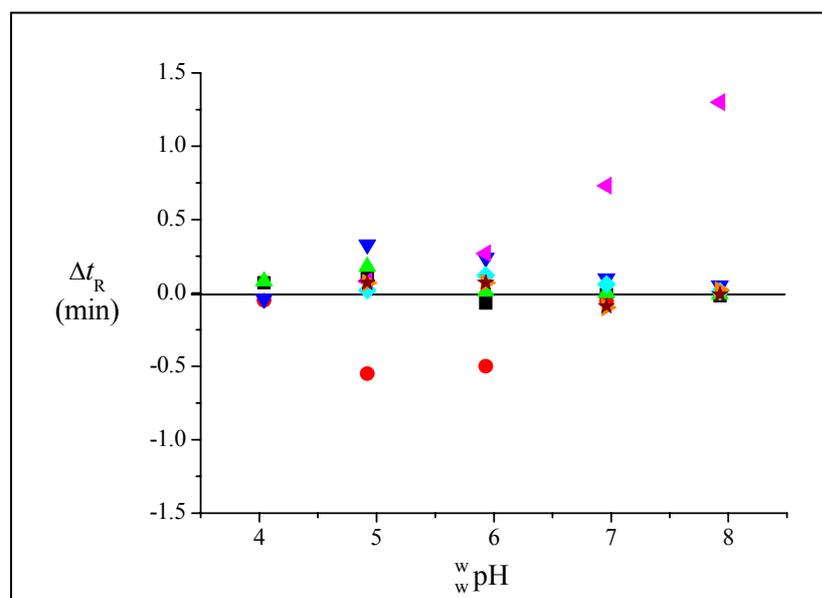
mesurada. Excepte en els casos de l'ibuprofèn i la imipramina les desviacions més grans són de +0.33 min i -0.10 min, i la mitjana de l'error absolut per tots els anàlits estudiats i valors de pH és menor al 5%. La manca d'una concordança satisfactòria per l'ibuprofèn i la imipramina s'atribueix a les diferències observades entre els valors de  ${}^s pK_a$  obtinguts en l'ajustament cromatogràfic i els estimats a partir del  ${}^w pK_a$ . Aquesta manca de correspondència entre els valors de  $pK_a$  té un efecte molt notable en l'estimació de la retenció, especialment si per a un anàlit determinat les diferències entre els temps de retenció de l'espècie neutra i la ionitzada és gran. S'ha de tenir en compte que aquests fàrmacs tenen una estructura química molt més complexa que les substàncies que van considerar-se en establir el model de variació del  $pK_a$  en mescles MeCN/aigua, i això no permet descartar la possibilitat d'un cert biaix en la predicció del  ${}^s pK_a$ . A més, cal tenir present que aquests fàrmacs són poc solubles en aigua, i les determinacions dels valors de  ${}^w pK_a$  s'han dut a terme per extrapolació de valors de  $pK_a$  obtinguts potenciomètricament en mescles MeOH/aigua. Així, per a un mateix fàrmac, podem trobar a la bibliografia diferents valors experimentals de  ${}^w pK_a$  en funció de la metodologia emprada (p.ex. imipramina: 9.19-9.66 [24], ibuprofèn: 4.40-4.76 [25]).



**Figura 3.8** Esquema del procés d'estimació dels temps de retenció cromatogràfica a partir del  ${}^w pK_a$  de la solució amortidora abans d'addicionar el solvent orgànic, el  ${}^w pK_a$  de l'anàlit i els temps de retenció de l'espècie neutra i la totalment ionitzada ( $t_{R(HA)}$  i  $t_{R(A)}$ ).

Quan no es disposa de valors experimentals de  ${}^w pK_a$  es pot recórrer a programes que en permetin el càlcul, com és el cas del SPARC [26] o l'ACD/Labs [27,28]. L'ACD/Labs és un programa àmpliament usat per companyies farmacèutiques no només per calcular constants d'acidesa, sinó també per estimar nombroses propietats fisicoquímiques d'un ampli espectre de compostos orgànics. Aquest programa consta d'una extensa base de dades que relaciona els fragments de l'estructura de la molècula amb les seves propietats, sumant la contribució de cadascun dels fragments per donar un determinat valor de  $pK_a$ . Aquest

programari és de pagament. En canvi, el SPARC és gratuït, i s'hi pot accedir lliurement a través d'Internet. Aquest programa fa servir algoritmes basats en l'estructura química de la molècula per calcular el  $pK_a$  de compostos orgànics, considerant totes les contribucions de cadascuna de les unitats estructurals amb propietats intrínseques de la molècula. Ambdós programes han estat usats per calcular els valors de  ${}^w pK_a$  dels fàrmacs estudiats anteriorment. Els valors de  $pK_a$  bibliogràfics i els calculats amb el SPARC i l'ACD/Labs es mostren a la Taula 3.7. A partir d'aquests valors calculats de  ${}^w pK_a$ , dels valors de  ${}^w pH$  mesurats en la fase mòbil i els temps de retenció experimentals  $t_{R(HA)}$  i  $t_{R(A)}$ , s'han estimat els temps de retenció a diferents valors de pH i s'han comparat amb els temps determinats cromatogràficament. En general, s'obtenen bones correspondències per ambdós programes, sent lleugerament millors les obtingudes amb el ACD/Labs. La mitjana de l'error absolut en els temps de retenció per a tots els anàlits i valors de pH estudiats és menor del 7% pel SPARC i del 5% per l'ACD/Labs.



**Figura 3.9**

Correspondència entre els temps de retenció experimentals i estimats ( $\Delta t_R = t_R^{est} - t_R$ ) a diferents valors de  ${}^w pH$ . Els temps de retenció han estat estimats mitjançant l'Eq. 3.5. Concentració del tampó, en aigua,  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Anàlits: (▼) trazodona, (■) diclofenac, (◆) codeïna, (▲) naproxèn, (●) ibuprofèn, (◄) imipramina, (★) maprotilina, (▶) nortriptiline.

**Taula 3.7** Valors aquosos de  $pK_a$ , bibliogràfics i calculats, dels fàrmacs estudiats.

Fàrmac	Bibliografia ${}^w p K_a^a$	SPARC ${}^w p K_a^b$	ACD/Labs ${}^w p K_a^c$
Diclofenac	4.23	4.09	4.18±0.20
Ibuprofèn	4.40	4.52	4.41±0.20
Naproxèn	4.72	4.46	4.40±0.20
Trazodona	6.93	5.99	6.59±0.50
Codeïna	8.21	9.18	8.92±0.20
Imipramina	9.30	9.43	9.49±0.20
Nortriptilina	10.14	10.33	10.08±0.20
Maprotilina	10.45	10.33	10.63±0.20

### **3.6 REFERÈNCIES**

- [1] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Fresenius' J. Anal. Chem. 353 (1995) 148.
- [2] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 74 (2002) 3809.
- [3] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 964 (2002) 55.
- [4] X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1059 (2004) 33.
- [5] M.K. Chantooni, I.M. Kolthoff, Anal. Chem. 51 (1979) 133.
- [6] F. Rived, I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 439 (2001) 315.
- [7] G. Garrido, C. Ràfols, E. Bosch, Eur. J. Pharm. Sci. 28 (2006) 118.
- [8] S. Espinosa, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 72 (2000) 5193.
- [9] I. Canals, F.Z. Oumada, M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 911 (2001) 191.
- [10] M. Rosés, E. Bosch, J. Chromatogr. A 982 (2002) 1.
- [11] CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th ed., Boca Raton, FL., CRC Press, LLC., 2004-2005.
- [12] G. Kortüm, W. Vogel, K. Andrussov, Dissociation constants of organic acids in aqueous solution, IUPAC, Butterworths, London, 1961.
- [13] I.M. Kolthoff, M.K. Chantooni, Jr., S. Bhowmik, J. Am. Chem. Soc. 90 (1968) 23.
- [14] E. Bosch, P. Bou, H. Allemann, M. Rosés, Anal. Chem. 68 (1996) 3651.
- [15] M. Rosés, I. Canals, H. Allemann, K. Siigur, E. Bosch, Anal. Chem. 68 (1996) 4094.
- [16] D. Sýkora, E. Tesarová, M. Popl, J. Chromatogr. A 758 (1997) 37.
- [17] I. Canals, J.A. Portal, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chem. 72 (2000) 1802.
- [18] R.M. Lopes Marques, P.J. Schoenmakers, J. Chromatogr. 592 (1992) 157.
- [19] P.J. Schoenmakers, R. Tijssen, J. Chromatogr. A 656 (1993) 577.
- [20] J.A. Lewis, D.C. Lommen, W.D. Raddatz, J.W. Dolan, L.R. Snyder, I. Molnár, J. Chromatogr. A 592 (1992) 183.
- [21] J.A. Lewis, J.W. Dolan, L.R. Snyder, I. Molnár, J. Chromatogr. A 592 (1992) 197.
- [22] C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Anal. Chem. 49 (1977) 142.
- [23] M. Rosés, D. Bolliet, C.F. Poole, J. Chromatogr. A 829 (1998) 29.
- [24] R. Ruiz, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, J. Pharm. Sci. 92 (2003) 1473.
- [25] F.Z. Oumada, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, J. Pharm. Sci. 91 (2002) 991.
- [26] SPARC On-Line Calculator, University of Georgia, USA.  
<http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/index.cfm>.

- [27] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris (©1994-2005 ACD/Labs).
- [28] Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs), Toronto, Canada.  
[www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com).