

## SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE FASES ESTACIONARIAS MESOPOROSAS MEDIANTE PRUEBAS CROMATOGRÁFICAS Y RELACIONES CUANTITATIVAS ESTRUCTURA-RETENCIÓN

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MESOPOROUS STATIONARY PHASES USING CHROMATOGRAPHIC TESTS AND QUANTITATIVE STRUCTURE-RETENTION RELATIONSHIPS

Alejandro Ramírez<sup>1</sup>, Ligia Sierra<sup>2</sup>, Betty Lucy López<sup>2</sup>

Recibido: 26/10/05 – Aceptado: 23/08/06

#### RESUMEN

En este trabajo se describe la síntesis, funcionalización y evaluación cromatográfica de tres sílicas mesoporosas con propiedades fisicoquímicas diferentes. Los materiales son preparados de acuerdo con métodos ya establecidos, que conducen a partículas isomórficas de tamaño micrométrico, y se modifican químicamente mediante un procedimiento clásico de silanización con octildimetilclorosilano seguido por silanización secundaria o *end-capping* con trimetilclorosilano. La prueba de Galushko y las relaciones cuantitativas estructura retención (RCER) son implementadas para la evaluación cromatográfica. Con el fin de realizar un estudio comparativo, los parámetros obtenidos se confrontan con los reportados en la literatura para cinco columnas comerciales. Aunque el comportamiento cromatográfico es el esperado para fases octil ligadas, los nuevos materiales presentan una mayor hidrofobicidad e inactividad química si se les com-

para con las columnas tradicionales. La asimetría observada para los picos es atribuida a irregularidades en el empaque debido a una mayor dispersión en el tamaño y la morfología de partícula.

**Palabras clave:** fases estacionarias, sílicas mesoporosas, CLAE, relaciones cuantitativas estructura-retención, hidrofobicidad.

#### ABSTRACT

In this work the synthesis, functionalization and chromatographic evaluation of three mesoporous silicas with different physical chemistry properties are described. The materials were prepared, as isomorphic micrometric particles, according to established methods and they were chemically modified by a classic procedure of silylation with octyldimethylchlorosilane followed by secondary silylation or end-capping. Galushko's test and quantitative structure-retention relationships

1 Escuela de Química, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Medellín, Colombia. aramirev@unal.edu.co

2 Instituto de Química, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

were implemented for the chromatographic evaluation. A comparative study was done by comparing the parameters obtained with those reported in literature for five commercial columns.

Although the chromatographic behavior is the expected for octyl phases, the new materials show larger hydrophobicity and chemical inactivity when compared with traditional columns. The asymmetric behavior of the peaks is attributed to packing irregularities due to a larger dispersion in particle size and morphology.

**Key words:** Stationary phases, mesoporous silica, HPLC, quantitative structure-retention relationships, hydrophobicity.

## INTRODUCCIÓN

El continuo crecimiento en el uso de la cromatografía líquida de fase reversa para separaciones en los campos farmacéuticos, biomédicos, bioquímicos y ambientales, entre otros, ha impulsado el desarrollo de nuevas generaciones de materiales que ofrezcan mayor eficiencia y menor tiempo de análisis (1-3). En la literatura se han reportado diferentes estudios que buscan caracterizar y clasificar las columnas cromatográficas, de acuerdo con su comportamiento de retención (4-17). Los métodos modernos de evaluación cromatográfica para fases reversas se pueden agrupar en dos: pruebas cromatográficas y métodos estadísticos.

### Pruebas cromatográficas

Intentando clasificar las columnas cromatográficas en términos de hidrofobicidad, actividad de grupos silanol residuales, selectividad por forma (o por tamaño) y ca-

pacidad de intercambio iónico, se han desarrollado una serie de pruebas empíricas, dentro de las cuales las más conocidas son las de Engelhardt (4, 5), Walters (6), Tanaka (7) y Galushko (8). Cada procedimiento utiliza sus propios analitos, condiciones cromatográficas y cálculos para encontrar dichos parámetros. Más aún, estudios comparativos recientes han demostrado que las diferentes pruebas cromatográficas presentan una pobre correlación entre ellas (9), por lo que la interpretación de algunos parámetros puede tornarse ambigua.

### Métodos estadísticos: relaciones cuantitativas estructura-retención (RCER)

Actualmente, el uso de las relaciones cuantitativas estructura-retención es el método más apropiado para evaluar y clasificar las fases estacionarias (10, 11, 12). Existen tres tipos de dichas relaciones: la primera correlaciona el logaritmo del factor de retención ( $K'$ ) con el logaritmo del coeficiente de partición  $P$  en el sistema n-octanol-agua (10).

$$\log K' = k_1 + k_2 \log P \quad [1]$$

El segundo tipo de RCER fue reportado en 1985 por Carr y colaboradores (13) y está basado en las relaciones lineales de energía libre. Según este modelo, cualquier término involucrado con la energía libre en un proceso de transferencia de fase (en nuestro caso  $\log K'$ ), puede ser correlacionado con diferentes propiedades moleculares que caracterizan al soluto. Carr obtuvo dichas propiedades a partir de medidas solvatócrómicas (14, 15), de manera que sus correlaciones con el  $\log K'$  fueron llamadas relaciones lineales de energía de solvatación. Nuevas propiedades moleculares, de-

rivadas de datos de cromatografía gaseosa, coeficientes de partición solvente-agua y de la estructura molecular, fueron propuestas por Abraham y cols. (16, 17). Dado su origen termodinámico, estos datos describen más apropiadamente la energía involucrada en nuestro proceso de partición cromatográfico. La forma general de esta correlación, para una composición fija de fase móvil y para una determinada fase estacionaria, es:

$$\log K' = \log K'_0 + MV_x + S\pi_2 + A \sum \alpha_2 + B \sum \beta_2 + RR_2 \quad [2]$$

donde  $M$ ,  $S$ ,  $A$  y  $B$  son coeficientes de ajuste obtenidos por regresión simultánea de mínimos cuadrados. En esta ecuación el subíndice 2 hace referencia a una propiedad del soluto.  $R_2$  es la refracción molar,  $\sum \alpha_2$  es la acidez efectiva (sumatoria de cada sitio donador en la molécula),  $\sum \beta_2$  es la basicidad efectiva (sumatoria de cada sitio aceptor),  $\pi_2$  la dipolaridad/polarizabilidad y  $V_x$  el volumen McGowan. Cada uno de estos términos tienen en cuenta las diferentes interacciones soluto-fase estacionaria y soluto-fase móvil (16, 17).

Los valores de los coeficientes de ajuste de la ecuación pueden ser usados para diferenciar, de una manera objetiva y cuantitativa, las diversas fases estacionarias usadas en CLAEFR. Estudios sobre el efecto que tiene cada término de la ecuación 2 sobre la varianza del  $\log K'$ , para columnas de fase reversa, han mostrado que más del 90% de la varianza en los datos puede ser explicada por  $V_x$  y  $\sum \beta_2$  (11). De manera que no todos los términos son estadísticamente significativos, y es común encontrar en la literatura el uso de esta ecuación en formas simplificadas (12).

El tercer tipo de RCER describe los valores de  $K'$  en términos de descriptores estructurales químico-cuánticos (10).

El logaritmo del factor de retención es un parámetro que depende de las condiciones instrumentales utilizadas para hallarlo, principalmente la composición de la fase móvil. Para hacer estudios comparativos de las columnas cromatográficas usando los RCER, R. Kaliszan y cols. (10) proponen usar el factor de retención que resultaría si la elución utilizando 100% de agua como fase móvil fuera experimentalmente posible ( $K'_w$ ). Este valor es el intercepto de la relación lineal que existe entre el logaritmo del factor de retención isocrático ( $K'$ ) y la concentración del modificador orgánico en el eluente.

En 1992 los investigadores de la Mobil reportaron por primera vez la síntesis de una nueva familia de materiales mesoporosos llamada M41S (18). Aunque estos materiales son desordenados a escala atómica, ellos exhiben una disposición espacial de poros organizada, dependiente de las condiciones de síntesis, y una gran área superficial, lo que los convierte en excelentes candidatos a fases estacionarias para cromatografía líquida. En este trabajo se presenta el estudio del comportamiento de retención de tres fases estacionarias mesoporosas con propiedades fisicoquímicas diferentes. Se escogieron los materiales SBA-3, SBA-15 y SBA-16 debido a las diferencias estructurales entre ellos. Los materiales SBA-3 están constituidos por partículas que exhiben un arreglo hexagonal de poros no interconectados, SBA-15 es el análogo estructural de SBA-3 pero con poros interconectados a través de mesoporos secundarios o microporos. Además este material po-

see diámetros y paredes de poro mayores, lo que lo hace más estable mecánicamente. Por otro lado, SBA-16 exhibe un arreglo cúbico tridimensional de poros interconectados. La prueba de Galushko y las dos primeras RCER fueron implementadas para la evaluación cromatográfica. Los resultados fueron comparados con los reportados por Claessens (9) y Kaliszan (10), quienes implementaron estas mismas pruebas para evaluar cinco columnas C8 comerciales, las cuales serán usadas como referencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de los materiales

Los procedimientos de síntesis y calcinación que originan partículas isomórficas con tamaños entre 3 y 12 nm para SBA-3, SBA-15 y SBA-16 pueden ser consultados en la literatura (19-21). Estos materiales serán identificados a través del texto como S<sub>3</sub>, S<sub>15</sub> y S<sub>16</sub> respectivamente.

### Modificación orgánica

La sílica calcinada es calentada en vacío a 150 °C por dos horas con el fin de remover toda el agua adsorbida. Posteriormente se suspende en tolueno (relación en peso material/solvente=0,1) que contiene una relación equimolar de octildimetilclorosilano (ODMCS) y trietilamina como catalizador (relación molar ODMCS/SiOH<sup>†</sup>=0,464 para S<sub>3</sub> o 0,819 para S<sub>15</sub> y S<sub>16</sub>). La suspensión se somete a reflujo bajo agitación durante veinticuatro horas. Para el "end-capping" se estabiliza la temperatura a 60 °C, se adiciona TMCS (relación molar TMCS/SiOH<sup>†</sup>=1,346) y trietilamina en relación equimo-

lar, y se permite reacción durante seis horas más. El producto se recupera por filtración, se lava exhaustivamente con tolueno, acetona, metanol y 50% metanol/agua (V/V) para remover residuos polares y no polares. Finalmente, el material se seca a 150 °C. Las muestras silanizadas son identificadas por el código C<sub>8</sub>C<sub>1</sub>.<sup>†</sup> relación molar calculada asumiendo 10 grupos silanol/nm<sup>2</sup> y un área superficial de 1000 m<sup>2</sup>/g.

### Caracterización

El ordenamiento espacial de los poros fue confirmado desde los patrones de difracción de rayos-x (19, 21). Las áreas superficiales, las distribuciones de diámetros de poro, los volúmenes de poro y la presencia de microporosidad fueron determinados a partir de las isotermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, utilizando los métodos de alta resolución, BJH y BET (19). El contenido de SiOH (antes y después de silanización) fue determinado empleando espectroscopía infrarroja de reflectancia difusa y piridina como molécula prueba, de acuerdo con la metodología propuesta por Ramírez y cols. (23). Las muestras fueron examinadas usando microscopía electrónica de barrido, a fin de determinar la forma y el tamaño de las partículas (21). Además, se determinó el porcentaje en peso de carbono ligado mediante análisis químico.

### Empaquetamiento de la columna

Las columnas de acero inoxidable (con dimensiones de 150×4,6 ó 150×1,5 mm) fueron empacadas en un equipo Haskel, suspendiendo el material seco en 20 mL de CCl<sub>4</sub> usando ultrasonido. Se utilizó meta-

nol o una mezcla 70% MeOH-30% H<sub>2</sub>O para empujar y compactar el sólido en la columna a una presión que puede estar entre 2000 (para las columnas de menor diámetro) y 4300 psi (para las columnas con diámetro mayor). En la evaluación cromatográfica las columnas de menor diámetro serán identificadas con un\*. Los datos cromatográficos se obtuvieron en un cromatógrafo líquido Waters con una bomba modelo 600, un refractómetro diferencial modelo 410 y un detector de arreglo de diodos modelo 996.

### Evaluación cromatográfica

#### Pruebas cromatográficas

A continuación se da un resumen de las condiciones experimentales, los solutos y los parámetros obtenido a partir de la prueba de Galushko:

#### Prueba de Galushko:

Fase móvil: metanol/agua 60:40  
(volumen/volumen)

Temperatura: 30 °C

Analitos: uracilo(*t*<sub>0</sub>), anilina, fenol, benceno, tolueno.

Parámetro: 1) Hidrofobicidad (HF):

$$\left( \frac{K'_{\text{tolueno}} + K'_{\text{benceno}}}{2} \right)$$

2) Selectividad hidrofóbica (SH): Calculada desde el factor de separación entre el benceno y el tolueno.

3) Actividad grupos silanol (*A*<sub>OH</sub>):

$$1 + 3 \times \left( \frac{K'_{\text{anilina}}}{K'_{\text{fenol}}} - 1 \right)$$

en donde *K'* es el factor de retención. Los cromatogramas fueron monitoreados a una  $\lambda = 254$  nm.

### Relaciones cuantitativas estructura-retención

Se usaron 18 analitos (benceno, fenol, cafeína, naftaleno, tolueno, benzonitrilo, bifenilo, terfenilo, trifenileno, ácido benzóico, antraceno, octanol, butanol, 2-propanol, cloruro de metileno, etil éter, dimetil formamida, acetona), para tener un rango amplio en los coeficientes de partición y los descriptores moleculares. Los compuestos aromáticos se detectan por UV, los alifáticos por índice de refracción. Cada analito es inyectado entre cuatro y cinco veces, dependiendo de sus propiedades de retención, y eluido con diferentes composiciones de la fase móvil. La velocidad del flujo fue ajustada de acuerdo con el diámetro interno de la columna (0,8 mL/min para las columnas de 1,5 mm y 1,0 mL/min para las columnas de 4,6 mm). El logaritmo del factor de retención ( $\log K'$ ) para cada inyección se grafica en función del porcentaje de metanol en el eluyente (%MeOH). El logaritmo del factor de retención estandarizado ( $\log K'_w$ ) se encuentra en el intercepto de la relación lineal de Soczewinski entre  $\log K'$  frente a %MeOH. Los cálculos estadísticos son realizados con el software Statgraphics plus-5.0 mediante métodos de regresión múltiple. El logaritmo del coeficiente de partición en el sistema n-octanol-agua se obtuvo usando un predictor interactivo (22), las propiedades moleculares de los solutos fueron tomadas de las referencias (10) y (11).

En la Tabla 1 se presentan las fases comerciales usadas como referencia. Para cada columna, los coeficientes de ajuste en la primer RCER y sus indicadores estadísticos fueron tomados direc-

**Tabla 1.** Columnas cromatográficas usadas como referencia<sup>a</sup>

Columna	Fabricante	Abreviación
Eclipse XDB-C8	Hewlett-Packard (USA)	XC8
Symmetry Shield RP8	Waters Assoc. (USA)	Sym8
LiChrospher RP-Select B	Merck (Alemania)	SeIB
Nucleosil 100-5 C8	Macherey-Nagel GMBH and Co (Alemania)	NuC8
Nova-Pak C8	Waters Assoc (USA)	Nova

<sup>a</sup>Datos tomados de (9) y (10).

tamente de la literatura (10) y se muestran en la Tabla 5.

Para el segundo tipo de RCER, Kaliszan y cols. utilizan la ecuación general 2. Por otro lado, y basados en estudios de porcentaje de varianza (10), la siguiente ecuación simplificada fue usada aquí como relación de energía libre:

$$\log W'_w = \log K'_0 + MV_x + S\pi_2 + A \sum \alpha_2 + B \sum \beta_2 \quad [3]$$

Los coeficientes de ajuste fueron hallados al aplicar procedimientos de regresión múltiple a los datos del  $\log K'_w$  tomados de (10), y se muestran en la Tabla 6.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización fisicoquímica

El patrón de difracción de rayos-x para S<sub>15</sub> presenta una señal intensa en 2θ~1,40 y dos

señales débiles en 2θ~2,37 y 2,80. Los espaciamientos interplanares, 93,7; 55,4; y 46,9 Å respectivamente, son indexables como reflexiones (100), (110) y (200), confirmando el arreglo hexagonal de los mesoporos y el grupo espacial de simetría *p6mm*. El material S<sub>16</sub> presenta una señal intensa en 2θ~1,23 y dos señales débiles en 2θ~1,77 y 2,30; las cuales pueden ser indexadas como una estructura cúbica con un posible grupo espacial de simetría *Im3m*. Una sola señal fue observada en 2θ~3,09 para S<sub>3</sub> debido a una estructura porosa menos organizada (19).

La Tabla 2 resume las características mesoestructurales y porosas obtenidas a partir de las isotermas (19).

El contenido total de grupos silanol es mayor para los materiales S<sub>15</sub> y S<sub>16</sub> (5,8 y 6,0 OH/nm<sup>2</sup> respectivamente), si lo comparamos con el del material S<sub>3</sub> (3,8

**Tabla 2.** Características mesoestructurales y porosas de los materiales sintetizados

Material	$\langle d \rangle_{\text{BJH}}^{\text{a}}$	$S_{\text{BET}}^{\text{b}}$	$S_{\text{t}}^{\text{c}}$	$S_{\text{ext}}^{\text{c}}$	$S_{\text{int}}^{\text{c}}$	$V_{\text{mp}}^{\text{d}}$	$V_{\text{m}}^{\text{e}}$
S <sub>3</sub>	23	1075	836	9	827	0,56	0
S <sub>15</sub>	80	901	745	33	712	1,15	0,038
S <sub>16</sub>	61	966	799	15	784	0,77	0,047

a) diámetro de poro más frecuente determinado por el método BJH, b) área superficiales BET en m<sup>2</sup>/g, c) áreas superficiales total, externa e interna en m<sup>2</sup>/g calculadas a partir de las pendientes de los gráficos  $\alpha_s$ , d) y e) volúmenes mesoporosos primario y microporoso en (cm<sup>3</sup>/g) calculados a partir de los interceptos en los gráficos  $\alpha_s$ .

OH/nm<sup>2</sup>). La cantidad de grupos silanol en S<sub>3</sub>, es menor a la que existe sobre la superficie de las sílicas precipitadas usadas comúnmente en cromatografía líquida (entre 5 y 8 OH/nm<sup>2</sup>). Esta situación originará una pobre unión química de moléculas orgánicas, por lo que S<sub>3</sub> tendrá un valor pequeño en la densidad de fase enlazada y, por tanto, una baja hidrofobicidad, afectando su comportamiento cuando sea usado como soporte en CLAEFR. Por tal razón, se implementó un proceso de rehidroxilación, en el cual la muestra calcinada fue puesta en contacto con una solución 0,05M NH<sub>4</sub>OH (sólido: líquido 1g:200mL), bajo agitación media a temperatura ambiente durante 24 horas. Este proceso de rehidroxilación incrementa el número de grupos silanol hasta 6,5 OH/nm<sup>2</sup>, valor similar al reportado para sílicas precipitadas, sin detrimento en las propiedades estructurales del sólido. La

muestra rehidroxilada posee el código R<sub>24</sub>. Después de silanización se observan bajos contenidos de silanol residuales (0,72; 0,55 y 0,29 OH/nm<sup>2</sup> para S<sub>3</sub>R<sub>24</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub>, S<sub>15</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub> y S<sub>16</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub> respectivamente) y altos porcentajes de carbono ligado (12,8; 20,7 y 19,4% para S<sub>3</sub>R<sub>24</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub>, S<sub>15</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub> y S<sub>16</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub> respectivamente). De las microscopías electrónicas de barrido se observa que los diámetros de partícula oscilan entre 3-12 μm. En general, los materiales S<sub>3</sub> presentan una morfología esférica más definida y una menor distribución de diámetros de partícula en comparación con los materiales S<sub>15</sub> y S<sub>16</sub>. Sin embargo, esta distribución de diámetro de partícula es mayor comparada con la de las sílicas usadas en CLAE. Los materiales S<sub>16</sub> presentan una morfología poliédrica bastante particular (19). La Tabla 3 resume las propiedades fisicoquímicas y dimensiones de las co-

**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas y dimensiones de las columnas mesoporosas y comerciales evaluadas

Nombre de la columna	D <sub>p</sub> Ì m	S m <sup>2</sup> /g	V cm <sup>3</sup> /g	⟨d⟩ <sub>BJH</sub> nm	End-capping	C % peso	Dimensiones de la columna(mm)
S <sub>3</sub> R <sub>24</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	3-10	1075	0,58	23	Si	12,8	150×4,6
S <sub>15</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub> *S <sub>15</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	3-12	901	1,25	80	Si	20,7	150×4,6 150×1,5
S <sub>16</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub> *S <sub>16</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	3-12	966	0,85	61	Si	19,4	150×4,6 150×1,5
XC8	5,0	180	0,40	80	doble	7,2	150×4,6
SelB	5,5	360	0,90	90	No	11,5	125×4,0
Sym8	5,1	343	0,65	89	X	14,4	150×4,6
Nova	4,0	120	0,30	75	Si	4,0	150×3,9
NuC8	5,4	340	1,15	115	No	8,0	150×4,0

D<sub>p</sub> = diámetro de partícula, S = área superficial específica calculada por el método BET, V = volumen de poro, d<sub>BJH</sub> = diámetro de poro calculado usando el modelo BJH, C = contenido de carbono en % peso/peso, X = dato no disponible.

lumnas mesoporosas y comerciales evaluadas cromatográficamente.

### Prueba de Galushko

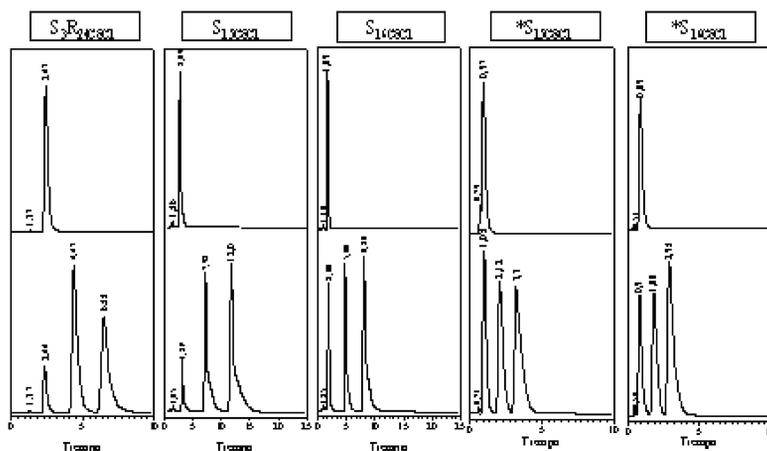
En general, cierto grado de asimetría puede ser observado en los diferentes cromatogramas (Figura 1). Este comportamiento depende tanto del tipo de material utilizado, como de las dimensiones de la columna. Los picos más simétricos fueron obtenidos con los materiales  $S_3$  (comparados con  $S_{15}$  y  $S_{16}$ ) y con las columnas más delgadas.

### Hidrofobicidad y selectividad hidrofóbica

De acuerdo con Claessens (9), la hidrofobicidad debe ser entendida como la capacidad de retención de compuestos prueba no polares. Generalmente esta propiedad es asociada con el porcentaje de carbono ligado a la sílica. Sin embargo, parámetros como el área superficial del sólido soporte, la longitud de la cadena ligada, funcionalización secundaria, entre otras, tienen un

efecto marcado sobre el comportamiento de retención, por lo que la relación entre hidrofobicidad y %C ligado no es directa (24). Lo anterior se hace evidente al comparar el %C y los resultados del cálculo para la hidrofobicidad propuesta por Galushko (Tabla 4). Las fases preparadas a partir de sólidos mesoporosos poseen un alto contenido de carbono ligado, en comparación con sus análogas comerciales. Por otro lado, el comportamiento frente a la retención de solutos no polares no muestra las diferencias que deberían obtenerse de acuerdo con las diferencias en %C. Los datos sugieren una relación inversa entre el área superficial de la sílica mesoporosa ( $S_3R_{24C8C1} > S_{16C8C1} > S_{15C8C1}$ ) y la hidrofobicidad ( $S_3R_{24C8C1} < S_{16C8C1} < S_{15C8C1}$ ).

En general, la selectividad hidrofóbica es quizás el único parámetro para el cual las diferentes pruebas cromatográficas tienen cierto grado de correspondencia. Ésta mide la diferencia en interacción entre la fase estacionaria y un par de solutos de una serie homóloga, distanciados por



**Figura 1.** Prueba de Galushko. Arriba: anilina, abajo: fenol, benceno y tolueno (el primer pico corresponde a  $t_0$ ). Velocidades de flujo: 1,0 mL/min, a excepción de  $*S_{15C8C1}$  y  $*S_{16C8C1}$  en donde fue de 0,8 mL/min. Tiempo en min.

**Tabla 4.** Parámetros cromatográficos obtenidos a partir de la prueba de Galushko para las fases mesoporosas bajo estudio y cinco columnas comerciales

Nombre columna	Factores de retención				HF	SH	A <sub>OH</sub>
	Anilina	Fenol	Benceno	Tolueno			
S <sub>3</sub> R <sub>24</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	0,80	0,78	2,26	3,78	3,02	0,59	1,08
S <sub>15</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	0,82	0,99	3,50	6,27	4,86	0,56	0,48
S <sub>16</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	0,63	0,60	3,00	5,60	4,30	0,54	1,15
*S <sub>15</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	0,31	0,48	1,99	3,65	2,82	0,54	0,06
*S <sub>16</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	0,74	0,61	2,36	4,27	3,31	0,55	1,64
XC8	-	-	-	-	5,20	1,63	0,12
SelB	-	-	-	-	3,43	1,57	0,98
Sym8	-	-	-	-	4,08	1,54	0,18
Nova	-	-	-	-	3,81	1,67	0,63
NuC8	-	-	-	-	1,95	1,52	2,02

HF = hidrofobicidad, SH = selectividad hidrofóbica, A<sub>OH</sub> = actividad grupos silanol, ST = selectividad por tamaño.

un incremento específico de grupos CH<sub>2</sub>. Una selectividad hidrofóbica constante fue reportada por Claessens y cols. (9) para fases enlazadas con la misma longitud de cadena alquílica. El mismo comportamiento fue observado para los materiales SBA evaluados (Tabla 4). Sin embargo, estas nuevas fases responden de una manera menos selectiva a incrementos de grupos metileno mostrando un tercio de selectividad, comparadas con las columnas comerciales.

#### Actividad silanol

Los grupos silanol residuales presentan diferentes tipos de interacciones con los solutos en la fase móvil. Estas interacciones, mediadas por la accesibilidad de las moléculas a los sitios activos, abarcan intercambios iónicos, puentes de hidrógeno o fuerzas de London. Es de esperar que el comportamiento cromatográfico de una

fase estacionaria, en cuanto a la actividad silanol se refiere, dependa de la concentración y naturaleza química de los SiOH residuales (enlazados o libres) y de las cadenas ligadas (longitud, tipo de grupos alquil laterales, *end-capping*), así como de las características físicas del sólido soporte (área superficial, diámetro de poro). Por esta razón no es posible establecer una relación directa entre A<sub>OH</sub> y el contenido de grupos silanol residuales. Los materiales S<sub>16</sub> mostraron una mayor actividad silanol comparados con los S<sub>15</sub> y S<sub>3</sub>, y las columnas comerciales (a excepción de NuC8). El orden de elución de los solutos (anilina < fenol) desde S<sub>15</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub> y \*S<sub>15</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub> fue el esperado para una columna químicamente inactiva, o con una actividad silanol baja.

Para cada tipo de sílica mesoporosa estudiada se toma la columna que presenta el mejor comportamiento cromatográfico en términos de simetría de picos (éstas son:

$S_3R_{24C8C1}$ ,  $*S_{15C8C1}$ ,  $*S_{16C8C1}$ ) y se evalúan utilizando los dos primeros tipos de relaciones cuantitativas estructura-retención.

### Relaciones cuantitativas estructura-retención

Para el cálculo de los factores de retención, el tiempo muerto ( $t_0$ ) de la columna fue determinado inyectando una solución de nitrato de sodio 0,05mM (25). El  $\log K'_w$  fue ajustado por regresión lineal con la variación de  $\log P$  o los descriptores moleculares de la ecuación 3. Los coeficientes de ajuste, el número de datos usados para cada regresión ( $n$ ), los coeficientes de correlación ( $R^2$ ), los errores estándar de estimación ( $es$ ) y el valor de la

prueba  $F$  para significancia estadística se muestran en las Tablas 5 y 6.

### Equilibrio de partición fase estacionaria-fase móvil (primera RCER)

Las interfases formadas entre las cadenas de la fase ligada y las moléculas que constituyen la fase móvil son fases anisotrópicas, esta anisotropía tiene consecuencias importantes, como por ejemplo el hecho de que las cadenas ligadas rodean en menor grado al soluto comparándolo con la manera como lo hace el octanol líquido.

Dill (26, 27) reportó la relación que existe entre  $d\log K'/\log P$  ( $k_2$  en la ecuación 1) y el grado en el cual el analito se encuen-

**Tabla 5.** Resultados de la regresión lineal para la ecuación  $\log K'_w = k_1 + k_2 \log P$

Nombre	$K_1$	$k_2$	$n$	$R^2$	$es$	$F$
$S_3R_{24C8C1}$	0,327 $\pm 0,103$	0,788 $\pm 0,032$	18	0,983	0,203	923
$*S_{15C8C1}$	0,134 $\pm 0,156$	1,043 $\pm 0,053$	18	0,963	0,409	394
$*S_{16C8C1}$	0,050 $\pm 0,135$	0,930 $\pm 0,045$	18	0,966	0,319	427
XC8	0,343 $\pm 0,062$	0,778 $\pm 0,022$	21	0,984	0,153	1194
SelB	0,259 $\pm 0,084$	0,727 $\pm 0,031$	21	0,966	0,209	560
Sym8	0,205 $\pm 0,044$	0,758 $\pm 0,016$	21	0,992	0,108	2268
Nova	0,324 $\pm 0,059$	0,757 $\pm 0,021$	21	0,984	0,146	1240
NuC8	0,281 $\pm 0,082$	0,627 $\pm 0,030$	21	0,958	0,204	437

Valores reportados por Kaliszan y cols. (10).

$n$  = número de datos usados,  $R^2$  = coeficiente de correlación,  $es$  = error estándar de estimación,  $F$  = valor de significancia estadística, coeficientes de correlación desviación estándar.

**Tabla 6.** Resultados de la regresión lineal para la ecuación

$$\log K'_w = \log K'_0 + MV_2 + S\pi_2 + A \sum \alpha_2 + B \sum \beta_2$$

Nombre	Log $K'_0$	$M$	$S$	$A$	$B$	$n^a$	$R^2$	$es$	$F$
S <sub>3</sub> R <sub>24</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	0,229 ±0,144	3,343 ±0,161	-0,350 ±0,142	-0,158 ±0,205	-2,933 ±0,159	16	0,986	0,168	192
*S <sub>15</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	-0,046 ±0,234	3,839 ±0,240	-0,257 ±0,244	-0,949 ±0,323	-2,965 ±0,247	15	0,980	0,248	113
*S <sub>16</sub> C <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	-0,557 ±0,228	4,299 ±0,272	-0,506 ±0,230	-0,736 ±0,303	-2,978 ±0,246	15	0,977	0,245	95
XC8	0,511 ±0,201	3,218 ±0,134	-0,762 ±0,149	-0,108 ±0,201	-2,366 ±0,181	23	0,987	0,135	330
SelB	0,151 ±0,232	3,091 ±0,154	-0,499 ±0,172	-0,262 ±0,175	-2,229 ±0,209	23	0,979	0,218	210
Sym8	0,284 ±0,203	2,987 ±0,135	-0,490 ±0,150	-0,026 ±0,153	-2,512 ±0,183	23	0,984	0,191	279
Nova	0,418 ±0,213	3,059 ±0,141	-0,561 ±0,157	-0,181 ±0,160	-2,395 ±0,191	23	0,983	0,200	264
NuC8	0,009 ±0,205	2,785 ±0,136	-0,355 ±0,151	-0,259 ±0,154	-1,952 ±0,184	23	0,979	0,192	207

<sup>a)</sup> En el cálculo de los coeficientes de ajuste no se tienen en cuenta el trifeníleno ni el terfenilo, para la columna \*S<sub>15</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub> no se tienen datos para el benzonitrilo y el etil éter, para la columna \*S<sub>16</sub>C<sub>8</sub>C<sub>1</sub> no se tienen datos para el 2-propanol y la dimetilformamida, debido a la escasa retención bajo las condiciones cromatográficas utilizadas.

$n$  = número de datos usados,  $R^2$  = coeficiente de correlación,  $es$  = error estándar de estimación,  $F$  = valor de significancia estadística, coeficientes de correlación  $\pm$  desviación estándar.

tra rodeado. Para el octanol líquido  $d\log K'/\log P$  es igual a uno. De acuerdo con lo anterior, el comportamiento de las fases estacionarias (C8) se asemeja al del octanol líquido a medida que  $k_2$  se aproxima a uno. Los datos de la Tabla 5 presentan una correlación satisfactoria entre el logaritmo del factor de retención hipotético ( $\log K'_w$ ) y  $\log P$  para todas las columnas.

De acuerdo con los resultados, durante los diferentes procesos de partición que ocurren a través de la columna, el analito estará circundado en mayor proporción por las cadenas octil, cuando el sólido soporte al cual se encuentran ligadas son las sílicas mesoporosas. Este comportamien-

to puede ser explicado si tenemos en cuenta las diferencias estructurales entre las sílicas precipitadas y los materiales mesoestructurados. En el primer caso, los poros poco profundos se encuentran distribuidos aleatoriamente sobre la superficie del material, y el área superficial total está representada principalmente por la superficie externa de la partícula. En los materiales mesoporosos el área superficial total está representada principalmente por la superficie interna formada por la pared de los poros (área superficial mesoporosa). La mayor curvatura de esta superficie origina una disminución de la distancia entre cadenas alquil ligadas, en

comparación con las cadenas que se encuentran sobre la superficie del sólido. De manera que al interior de los poros, una molécula de analito puede ser rodeada más eficientemente por las cadenas del hidrocarburo.

### **Interpretación de los coeficientes de ajuste y comparación entre las fases mesoporosas y las comerciales (segunda RCER)**

La validez de los resultados en una regresión múltiple depende de la relación entre el número de datos y las variables independientes, y la no colinealidad entre ellas. Esto significa que el número de solutos inyectados debe ser considerablemente mayor al de los descriptores moleculares utilizados en la predicción de  $\log K'_w$ . Aunque no existe un criterio unificado, la relación recomendada como el menor límite aceptable para los cálculos de regresión está entre 4-5 (28, 29). Las variables independientes en la ecuación 3 son 4, mientras que el número de datos en las tres columnas mesoporosas evaluadas no es menor que 17. De acuerdo con la Tabla 6, los valores de  $R^2$  son comparables en magnitud en todos los casos, a pesar de que se utilizaron menos datos en la regresión para las columnas aquí estudiadas. Los resultados para las columnas referencia, calculados usando la ecuación 3, son semejantes a los reportados en (10), corroborando la poca incidencia que tienen las interacciones entre electrones  $n$  y sobre el mecanismo de retención. En general, el comportamiento cromatográfico fue el esperado para fases octil ligadas, en donde la retención de un soluto se ve afectada principalmente por su volumen molecular y su basicidad efectiva. La

acidez efectiva y la dipolaridad/polarizabilidad son propiedades menos representativas. El signo positivo para  $M$  indica una alta interacción soluto-fase estacionaria y, por tanto, una retención que incrementa con  $V_x$ .  $M$ , o el coeficiente "cavidad", tiene en cuenta las interacciones dispersivas y la energía libre necesaria para separar las moléculas en cualquiera de las fases, originando un espacio en el que se pueda acomodar el soluto. Mayores  $M$  fueron encontrados para las columnas mesoporosas ( $*S_{16C8C1} > *S_{15C8C1} > S_3R_{24C8C1}$ ) en comparación con las columnas comerciales (XC8 > SelB > Nova > Sym8 > NuC8). Este comportamiento puede ser explicado con base en el contenido de carbono y en los diámetros de poro. Las fases móviles comúnmente usadas en CLAEFR, mezclas metanol-agua o acetonitrilo-agua, son lejanamente más cohesivas (presentan mayores fuerzas intermoleculares entre sí) que las fases estacionarias, comúnmente C8 o C18, debido a la presencia de las moléculas de agua ( $\delta^2 = 147$  cal/mL para el H<sub>2</sub>O y  $\sim 28$  cal/mL para el octano enlazado) (11). Como consecuencia, se necesita una gran cantidad de energía libre para crear una cavidad del tamaño del soluto en la fase móvil; análogamente, la transferencia del soluto desde la fase móvil a la fase estacionaria debe ser un proceso energéticamente favorable. Por esta razón se espera un coeficiente grande y positivo para  $V_x$ . Más aún, un incremento en el cubrimiento superficial o longitud de la cadena alquílica (lo que implica un mayor %C), conduce a mayores coeficientes  $M$  (12). Recientemente Sandi y cols. (12) utilizaron las relaciones lineales de energía libre para caracterizar una serie de columnas cromatográficas. Los sólidos

dos soporte fueron clasificados como materiales de poros estrechos si los diámetros eran menores que 150 Å, o anchos si superaban los 300 Å. Ellos encontraron mayores coeficientes  $M$  para los materiales con diámetros menores. Las sílicas mesoporosas estudiadas presentan mayores %C y menores diámetros de poro que las sílicas comerciales (ver Tabla 3) justificando así su mejor hidrofobicidad.

El coeficiente  $B$  mide la diferencia de acidez entre las fases estacionaria y móvil, vista como la capacidad para compartir protones durante la formación de puentes de hidrógeno. Mezclas metanol-agua (o acetonitrilo-agua) pueden formar con facilidad este tipo de enlaces. La acidez de las fases estacionarias es asignada a la presencia de moléculas de agua adsorbidas en la interfase o grupos silanol residuales. Un coeficiente negativo es esperado para  $B$ . Mientras menor sea este coeficiente, menor carácter ácido tendrá la fase estacionaria. Un comportamiento semejante fue observado para los coeficientes  $B$  en las columnas mesoporosas ( $*S_{16C8C1} = -2,978$ ;  $*S_{15C8C1} = -2,965$ ;  $S_3R_{24C8C1} = -2,933$ ), los cuales son menores que los de las columnas comerciales. Como ha sido reportado anteriormente (12), un incremento en el contenido de carbono o en la longitud de la cadena alquil origina una disminución de las propiedades ácidas de la fase estacionaria. Sílicas con bajos contenidos de carbono, como el de las columnas de referencia estudiadas, adsorben más moléculas de la fase móvil, incrementando su acidez.

La escasa diferencia de basicidad y polarizabilidad entre las fases estacionaria y móvil se ve reflejada por los pequeños coeficientes de ajuste  $A$  y  $S$ . El signo negativo

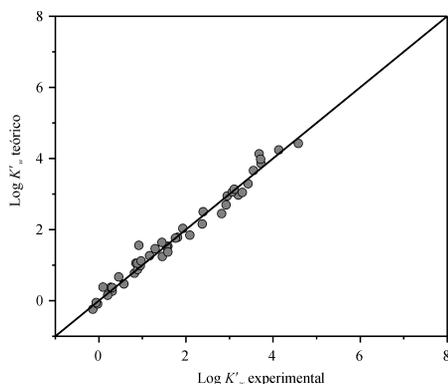
sugiere que el soluto debería tener una ligera preferencia por la fase móvil. Una afinidad incrementada por esta fase fue observada para las columnas  $*S_{15C8C1}$  y  $*S_{16C8C1}$  indicando su inactividad química. La capacidad de las fases estacionarias para interactuar con los grupos funcionales polarizables del soluto fue  $XC8 > Nova > *S_{16C8C1} > SelB > Sym8 > NuC8 > S_3R_{24C8C1} > *S_{15C8C1}$ . Estas interacciones esencialmente ocurren cuando el soluto tiene mejor acceso a la superficie de la sílica no recubierta (12).

De acuerdo con lo anterior, y teniendo en cuenta el contenido de carbono, se esperarían menores valores de  $S$  para las sílicas mesoporosas. Sin embargo, esto no ocurre con los materiales  $S_3$  y  $S_{15}$ . Este hecho quizás pueda ser atribuido a diferencias en la distribución de los grupos OH (disponibles antes de la silanización) sobre las superficies de las sílicas mesoporosas y las sílicas precipitadas.

La relación  $\log K'_w$  calculado frente a  $\log K'_w$  experimental para las tres columnas mesoporosas evaluadas se presenta en la Figura 2. La poca dispersión de los datos alrededor de la recta con pendiente unitaria, confirma la capacidad de las relaciones lineales de energía libre para predecir la retención de los diferentes solutos.

## CONCLUSIONES

De este estudio se concluye que los materiales modificados  $SBA-15$ ,  $SBA-16$  y  $SBA-3$ -rehidroxilado, poseen mayor capacidad de retención de compuestos prueba no polares y una mayor inactividad química que algunas sílicas comerciales. Esto se



**Figura 2.** Comparación entre el logaritmo de los factores de retención estandarizados para las tres columnas cromatográficas mesoporosas evaluadas.

debe, en parte, al mayor contenido de cadenas octil ligadas. Las sílicas mesoporosas evaluadas presentan una distribución de diámetros de partícula mayor que las sílicas convencionales usadas en CLAE, esta desigualdad en tamaño conlleva a irregularidades en el lecho cromatográfico de la columna y origina ensanchamiento y asimetría en los picos. Por otro lado, no pudo establecerse una relación definida en términos de hidrofobicidad entre los métodos de evaluación empíricos (pruebas cromatográficas) y estadísticos (RCER) implementados para caracterizar las columnas cromatográficas preparadas. De acuerdo con la prueba de hidrofobicidad propuesta por Galushko, los materiales  $*S_{16}$ ,  $S_3$  y  $*S_{15}$ , presentan una menor capacidad de retención de compuestos prueba no polares que los comerciales, exceptuando la columna NuC8 que no fue sometida a funcionalización secundaria. No sucede lo mismo con las primeras dos RCER, las cuales coinciden en que los materiales  $*S_{15}$ ,  $*S_{16}$  y  $S_3$  son más hidrofóbicos que los comerciales.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Colciencias y a la Universidad de Antioquia por la financiación de este proyecto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Regnier, F. E. Microfabricated Monolith Columns for Liquid Chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.* 2000; 23:19-26.
2. Cabrera, K.; Lubda, D.; Eggenweiler, H.-M.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K. A New Monolithic-Type HPLC Column For Fast Separations. *J. High Resolut. Chromatogr.* 2000; 23:93-99.
3. A Review of Waters New Hybrid Particle Technology and Its Use in High Performance Liquid Chromatography (HPLC). <http://www.waters.com>.
4. Engelhardt, H.; Muller, H. Chromatographic characterization of silica surfaces. *J. Chromatogr., A.* 1981; 218:395-407.
5. Engelhardt, H.; Low, H.; Gotzinger, W. Chromatographic characterization of silica-based reversed phases. *J. Chromatogr.* 1991; 544:371-379.
6. Walters, M. J. Characterization of Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1987; 70:465.
7. Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Jinno, K.; Eksteen, R.; Hosoya, K.; Araki, M.; Tanaka, N. Chroma-

- tographic Characterization of Silica C<sub>18</sub> Packing Materials. Correlation Between a Preparation Method and Retention Behaviour of Stationary Phase. *J. Chromatogr. Sci.* 1989; **27**:721.
8. Galushko, S. V. The calculation of retention and selectivity in RPLC. II. Methanol-Water eluents. *Chromatographia* 1993; **36**:39-41.
  9. Claessens, H. A.; Van Straten, M. A.; Cramers, C. A.; Jezierska, M.; Buszewski, B. Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A.* 1998; **826**:135-156.
  10. Kaliszan, R.; van Strate, M. A.; Markuszewski, M.; Cramers, C.A.; Claessens, H.A. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure-retention relationships. *J. Chromatogr., A.* 1999; **855**:455-486.
  11. Tan, L. C.; Carr, P. W.; Abraham, M.H. Study of retention in reversed-phases liquid chromatography using linear solvation energy relationships. 1. The stationary phase. *J. Chromatogr., A.* 1996; **752**:1-18.
  12. Sandi, A.; Szepes, L. Characterization of various reversed-phase columns using the linear free energy relationship. I. Evaluation based on retention factors. *J. Chromatogr., A.* 1998; **18**:1-17.
  13. Sadek, P. C.; Carr, P. W.; Doherty, R. M.; Kamlet, M. J.; Taft, R. W.; Abraham, M. H. Study of Retention Processes in Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography by the Use of the Solvatochromic Comparison Method. *Anal. Chem.* 1985; **57**:2971-2978.
  14. Taft, R. W.; Kamlet, M. J. The solvatochromic Comparison Method. 1. The -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities. *J. Am. Chem. Soc.* 1976; **98**:377-383.
  15. Taft, R. W.; Kamlet, M. J. The solvatochromic Comparison Method. 2. The -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities. *J. Am. Chem. Soc.* 1976; **98**:2886-2894.
  16. Abraham, M. H.; McGowan, G. S. The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia.* 1987; **23**:243.
  17. Abraham, M. H.; Whiting, G. S.; Doherty, R. M.; Shuely, W. J. A new solute solvation parameter, pH<sub>2</sub>, from gas- chromatographic data. *J. Chromatogr.* 1991; **587**:213.
  18. Beck, J. S.; Vartuli, J. C.; Roth, W. J.; Leonowicz, M. E.; Kresge, C. T.; Schmitt, K. D.; Chu, C.T-W.; Olson, D. H.; Sheppard, E. W.; McCullen, S. B.; Higgins, J. B.; Schlenker, J. L. A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templa-

- tes. *J. Am. Chem. Soc.* 1992; **114**:10834-10843.
19. Ramírez, A. Estudio de las relaciones entre las características fisicoquímicas de sílicas mesoporosas y sus cualidades como fases estacionarias. Tesis Doctoral, Instituto de Química, Universidad de Antioquia, Medellín, 2005.
20. Mesa, M.; Sierra, L.; López, B.; Ramírez, A.; Guth, J-L. Preparation of micron-sized spherical particles of mesoporous silica from a triblock copolymer surfactant, usable as a stationary phase for liquid chromatography. *Solid State Science*. 2003; **5**:1303-1308.
21. Sierra, L.; Mesa, M.; Ramírez, A.; Lopez, B.; Guth, J-L. Synthesis of Micron-Sized Particles of Mesoporous Silica from Tri-Block Surfactants in Presence of Fluoride, Usable as Stationary Phases in HPLC. *Stud. Surf. Sci. Catal.* In CD with reference 2004; pp. 562-567.
22. <http://www.logP.com>
23. Ramírez, A.; López, B.; Sierra, L. Study of the Acidic Sites and Their Modifications in Mesoporous Silica Synthesized in Acidic Medium under Quiescent Conditions. *J. Phys. Chem. B*. 2003; **107**:9275-9280.
24. Rippel, G.; Alattyani, E.; Szepesy, L. Characterization of stationary phases used in reversed-phase and hydrophobic interaction chromatography. *J. Chromatogr., A*. 1994; **668**:301-312.
25. Sandi, A.; Nagy, M.; Szepesy, L. Characterization of various reversed-phase columns using the linear free energy relationship. III. Effect of the organic modifier and the mobile phase composition. *J. Chromatogr., A*. 2000; **893**:215-234.
26. Dill, K.A. The Mechanism of Solute Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Phys. Chem.* 1987; **91**:1980-1988.
27. Marqusee, J.A.; Dill, K.A. Solute partitioning into chain molecule interphases: Monolayers, bilayer membranes, and micelles. *J. Chem. Phys.* 1986; **85**:434-444.
28. Gritti, F.; Félix, G.; Achard, M.; Hardouin, F. Laterally attached liquid crystalline polymers as stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography. V. Study of retention mechanism using linear solvation energy relationships. *J. Chromatogr., A*. 2001; **922**:51-61.
29. Norman, G.R.; Streiner, D.L. *Bio-statistics The Bare Essentials*. Decker Inc London: B. C. 2001.