

# CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

**SECYTA**

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
CROMATOGRAFÍA  
Y TÉCNICAS AFINES

**30**

BOLETIN DE LA SECYTA  
VOLUMEN 30 NÚM. 1 (2009)  
WWW.SECYTA.ORG

# IX Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines

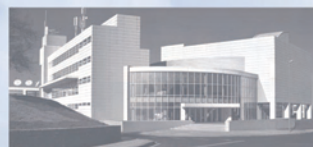
## XXXVIII-GCTA

Donostia - San Sebastián 28 - 30 Octubre 2009

[www.idaea.csic.es/secyta2009](http://www.idaea.csic.es/secyta2009)

**SECYTA**

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
CROMATOGRFÍA  
Y TÉCNICAS AFINES



Parque Tecnológico Miramón. Sede de la Reunión



Sala donde se realizarán las conferencias plenarias



# CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

Madrid, Junio de 2009 Vol.30, núm. 1

ISSN 1132-1369

Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (<http://www.secyta.org>)

## ÍNDICE

### 2 EDITORIAL

#### ARTÍCULOS

3 Técnicas cromatográficas aplicadas al análisis de la fracción lipídica de leche y productos lácteos. *L. M. Rodríguez-Alcalá y J. Fontecha.*

15 Efecto de la solución amortiguadora de pH en la selectividad cromatográfica de compuestos ácido-base. *X. Subirats, M. Rosés y E. Bosch.*

#### NOTICIAS DE LA SECyTA

31 IX Reunión Científica de la SECyTA

35 Nuevos socios

36 Entrevista a M<sup>a</sup> Josefa Molera

39 Homenaje a José Antonio García Domínguez y Luis Gascó

41 Jubilaciones: Luis Esteban

Josep Rivera Aranda

44 In Memoriam: Daniel Gómez Ventero

#### INFORMACIONES

45 Congresos celebrados

49 Calendario de Actividades

#### INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA

51 Artículos de interés

#### DE NUESTRAS EMPRESAS COLABORADORAS

57 Novedades técnicas

-----  
**Redacción:** Lourdes Ramos ([lramos@iqog.csic.es](mailto:lramos@iqog.csic.es)),  
María Luz Sanz ([milsanz@iqog.csic.es](mailto:milsanz@iqog.csic.es))  
Instituto de Química Orgánica General (CSIC).  
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid. Tel. 91 562 29 00  
Fco. Javier Moreno ([j.moreno@ifi.csic.es](mailto:j.moreno@ifi.csic.es))  
José Ángel Gómez Ruiz ([jagomez-ruiz@ifi.csic.es](mailto:jagomez-ruiz@ifi.csic.es))  
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC).  
Juan de la Cierva 3, 28006. Madrid. Tel. 91 562 29 00

**Publicidad:** Mario Fernández ([mario@iqog.csic.es](mailto:mario@iqog.csic.es))  
Instituto de Química Orgánica General (CSIC).  
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid. Tel. 91 562 29 00

**Colaboradores:** I. Martínez Castro, E. Ibáñez, A. de la Puerta

**Depósito legal:** M-1902-1975

**Diseño, preimpresión e impresión:** Helios, S.L. • Duque de Sevilla 16 • 28002 Madrid • Tel. 91 768 49 50

**Diseño de portada:** Pau de Riba

Los autores son responsables del contenido de sus artículos.

# EDITORIAL

## CROMATOGRAFÍA DE CALIDAD PARA UN PAÍS DE CALIDAD

Independientemente del cambio climático o del cambio global, es evidente que la humanidad vive en un planeta de recursos finitos. El futuro crecimiento económico debe orientarse hacia la calidad y no tanto hacia la cantidad. Esto son verdades de Perogrullo pero cuando se trata de implementarlas las cosas se complican considerablemente. No sé si los dirigentes del G20 que se reunieron ante el problema de la crisis económica consideraron este aspecto. Convendría, porque las realidades, incluso las de Perogrullo, suelen acabar imponiéndose.

Un país de calidad requiere que sus habitantes gocen de un standard mínimo de bienestar razonable y en ello hay que incluir el derecho a una alimentación segura y a un medio no contaminado. La química analítica, y dentro de ella la cromatografía, son elementos indispensables para asegurar estos condicionantes básicos del bienestar de las personas.

En el año 2008 hemos vivido la aparición de una nueva área de estudio en el que la cromatografía y la espectrometría de masas han sido protagonistas. La detección de trazas de drogas en aguas residuales, fluviales, de consumo, etc. Aunque éstas se encuentran en concentraciones bajas es obvio que es necesario implementar las medidas adecuadas para que las aguas tengan la calidad que les corresponde. Conocer cuáles son los problemas que disminuyen dicha calidad es un aspecto básico para la implementación de las medidas oportunas.

El desarrollo de las técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas para llevar a cabo estos estudios se ha producido en estos años, 2007 y 2008. Tenemos que felicitarnos porque han sido equipos de investigación cuyos miembros pertenecen a la SECyTA los pioneros en su desarrollo. Prueba de ello son los artículos aparecidos en *Analytical Chemistry* y *Environmental Science and Technology* al respecto. Tenemos, por tanto, una cromatografía de calidad. Esperemos que ello ayude a aumentar la calidad de nuestro país.

En este contexto, en la reunión científica de este año, 2009, que como sabéis se celebrará en Donostia-San Sebastián (28-30 de Octubre), hemos dedicado una sesión a la descripción de los avances en el estudio de las drogas y sus metabolitos en muestras ambientales. Dicha sesión incluirá dos conferencias invitadas de María Teresa Galcerán (Universidad de Barcelona) y Damià Barceló (IDÆA- CSIC), respectivamente, y una serie de comunicaciones orales y pósters que describirán los avances en este campo durante el presente año. Además, en la reunión contaremos con otras conferencias interesantes, como la relacionada con las estrategias analíticas para la determinación de residuos de plaguicidas mediante LC-MS por parte de Félix Hernández, de la Universidad Jaume I (Castellón), la preparación de muestra selectiva para el análisis de compuestos biológicamente activos por LC-MS(/MS) de Henk Lingeman de la Universidad Libre de Ámsterdam y la relacionada con columnas monolíticas de sílica para HPCL de Klaus K. Unger de la Universidad Johannes Gutenberg-Universität (Mainz, Alemania).

Lo dicho, una cromatografía de calidad para una ciudad de calidad, que los miembros de la SECyTA ya conocemos por la excelencia de la reunión que se organizó en 1991.

Os esperamos a todos.

**Joan O. Grimalt**  
*Presidente de la SECyTA*



# Técnicas cromatográficas aplicadas al análisis de la fracción lipídica de leche y productos lácteos.

L. M. Rodríguez-Alcalá y J. Fontecha\*

Departamento de Ciencia y Tecnología de productos lácteos. Instituto del Frío (CSIC)

José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid, Spain

\*Información de cocontacto: e-mail: [jfontecha@if.csic.es](mailto:jfontecha@if.csic.es) - Tlf.: +34 91 5445607 - Fax: +34 91 5493627

## INTRODUCCIÓN

La grasa láctea (3 a 5% en leche) es uno de los constituyentes más importantes de la leche en cuanto a su valor nutricional, la aptitud tecnológica y palatabilidad que aporta a los productos lácteos. Presenta además una enorme complejidad y diversidad de componentes lipídicos en su composición. Así, los lípidos en la leche se encuentran en forma de glóbulos, con un núcleo hidrofóbico, que consiste principalmente en triglicéridos, rodeado por una membrana compuesta mayoritariamente por fosfolípidos, colesterol y glicoproteínas. La biodisponibilidad de estos nutrientes se ve favorecida por su elevada digestibilidad. Los lípidos en la leche son además los transportadores de importantes vitaminas liposolubles como la vitamina A, D, E y K, así como carotenoides.

Aunque aproximadamente el 98% de la grasa láctea está constituida por triglicéridos (TG), durante décadas, las investigaciones realizadas en grasa láctea tienen relación principalmente con su contenido en ácidos grasos (AG), por ser estos los componentes más abundantes de la fracción lipídica, con cerca de 400 AG diferentes, de 4 a 26 átomos de carbono. No obstante, los AG son también los que presentan una mayor variabilidad, ya que como es conocido, el perfil de ácidos grasos puede sufrir importantes variaciones como consecuencia de múltiples factores entre los que destaca la dieta del ganado (Chilliard *et al.*, 2007, Jensen, 2002).

Con las herramientas de investigación disponibles actualmente, en las últimas décadas se ha documentado la presencia en grasa láctea de distintos compuestos lipídicos que ejercen una importante actividad biológica. Entre los componentes lipídicos y ácidos grasos bioactivos presentes cabe destacar el ácido butírico, el ácido linoleico conjugado (CLA), constituyentes de la membrana del glóbulo de grasa como esfingolípidos, vitaminas liposolubles, etc. Estos compuestos ofrecen una potencial aplicación comercial en el desarrollo de alimentos funcionales, encaminados a la promoción de la salud humana y/o a la prevención de enfermedades.

Dado el amplio rango de componentes presentes en la grasa de leche, su caracterización se presenta como una tarea enormemente compleja y difícil. Por tanto, para la realización de un análisis completo de la composición de la grasa láctea, se requiere de la utilización de los últimos avances en las técnicas analíticas, fundamentalmente cromatográficas.

En este trabajo se presentan las técnicas cromatográficas empleadas en nuestro laboratorio para el estudio de la fracción de los triglicéridos (TG), AG, esteroides y fosfolípidos de la grasa de leche y productos lácteos, obtenidas a partir de distintas especies (vaca, oveja y cabra) y bajo diferentes procedimientos de extracción y derivatización.

## ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN DE TRIGLICÉRIDOS DE LA GRASA LÁCTEA

La composición y estructura de los TG definen gran parte de las propiedades físicas y nutritivas de la grasa de leche. Un mejor conocimiento de tales aspectos puede ser de interés para: a) predecir el punto de fusión y cristalización, que influyen sobre la textura y sabor de los productos derivados; b) determinar el origen de la grasa, lo que permitiría detectar fraudes; c) predecir el valor nutritivo, en función del grado de accesibilidad de los enzimas lipolíticos a los distintos TG; d) profundizar en el conocimiento de los sistemas de síntesis de TG en la glándula mamaria.

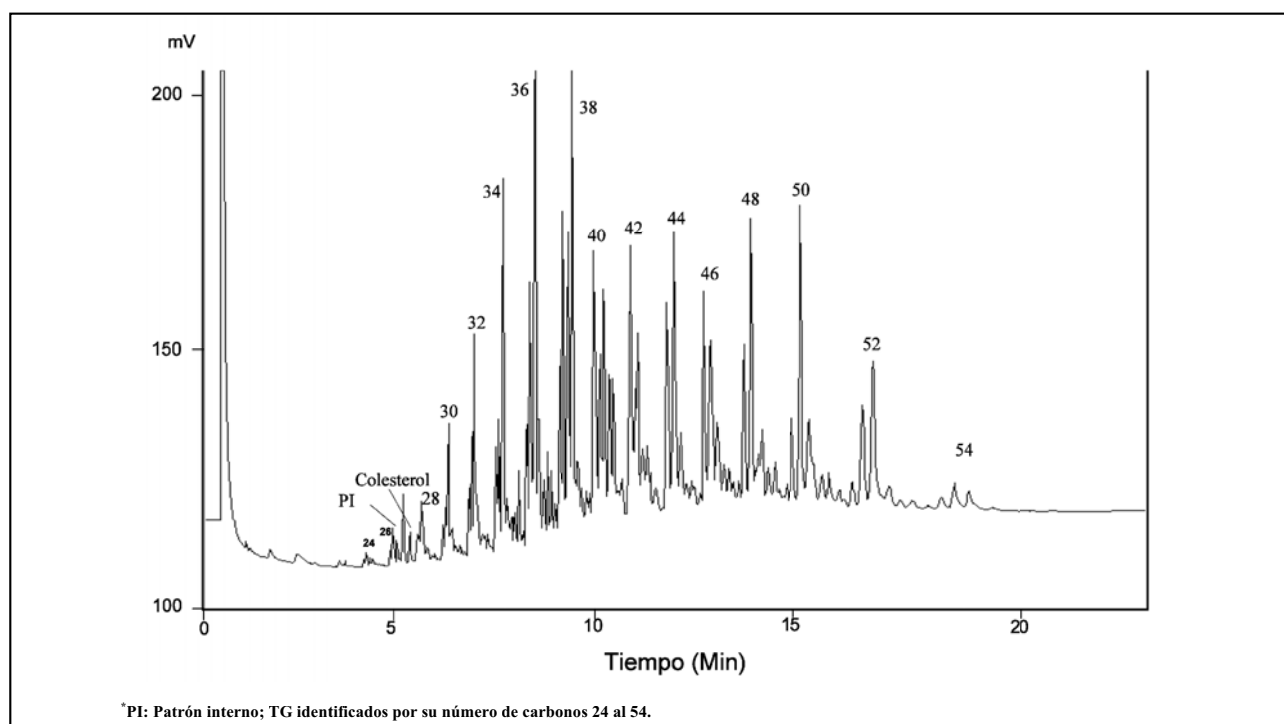
Como se ha indicado, dado el amplio rango de AG que contiene la grasa de leche, la caracterización de sus TG se presenta como una tarea enormemente compleja. Teóricamente los 400 AG diferentes presentes en la grasa láctea podrían incorporarse a la estructura del TG formando 64 millones de moléculas diferentes. Sin embargo, dado que solo 14 AG suponen el 90 % del total y que las enzimas responsables de la síntesis de TG en la glándula mamaria no actúan al azar sino que son específicas en la colocación de ciertos ácidos grasos en las distintas posiciones del TG, el número total de especies moleculares de TG en grasa láctea se calcula del orden de 3.000.

Por todo ello, previo al análisis cuantitativo es necesario agrupar TG basándose en algunas de sus características comunes, como el peso molecular, grado de insaturación, etc. Para ello se emplean técnicas de prefraccionamiento basadas en capa fina sobre gel de sílice con nitrato de plata (Ag+NO<sub>3</sub>-TLC). Este procedimiento permite separar TG como consecuencia de las interacciones débiles que se producen entre los electrones de los dobles enlaces y los iones plata. De acuerdo con ello, los TG de cada banda se diferencian por el número de dobles enlaces, aunque también intervienen en la separación otros factores, como la configuración geométrica y la longitud de cadena. Esta separación, que es previa a la utilización de cromatografía de gases y/o espectrometría de masas, ha sido ampliamente utilizada en nuestro laboratorio (Fraga *et al.*, 1998).

En el citado estudio, la grasa de leche de vaca se fraccionó en 6 bandas. El análisis conjunto de las bandas mediante GC-MS permitió resolver 113 picos diferentes de TG de los que se identificaron 81. En la actualidad, la separación de los TG ha mejorado con el empleo de columnas capilares largas (30-60 m) con fases estacionarias polares (fenilmetilsiliconas con un 65% de grupos fenilo). Estas columnas son estables térmicamente a temperaturas elevadas, lo que permite la separación de especies moleculares de TG tanto por

número de carbono (NC) como por número de insaturaciones. De esta manera, distintos TG pueden ser más fácilmente identificados y cuantificados en muestras que no han sido fraccionadas previamente (Figura 1). Sin embargo, estos análisis no son definitivos para cuantificar TG individuales ya que cada pico contiene aún diferentes componentes moleculares. Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de TG fueron similares a las descritas por Fontecha *et al.* (2000). La grasa láctea (40 mg/ml de hexano) se inyecta en un cromatógrafo de gases Autosystem Gion 4072042 (Perkin-Elmer, Beaconsfield, Reino Unido) equipado con un inyector automático (split / splitless) con control de temperatura programada. Se empleó una columna capilar (30 m x 0,22 mm i.d.), fabricada por Restek (Bellefonte, AP), RTX-65 TG (d.f.=0,10 µm). Las condiciones experimentales fueron las siguientes: la temperatura inicial 220°C se elevó hasta 320°C a una razón de 15°C/min y posteriormente hasta 355°C a 7°C/min y se mantuvo en esta temperatura durante 20 min. La temperatura del inyector y del detector fueron 355 y 370°C, respectivamente. La presión en cabeza de columna fue de 25 psig; la relación de split fue de 1: 4 y el gas portador helio (0,8 ml/min).

En otros casos, cuando el objetivo final del análisis de la grasa láctea es una caracterización rápida de los



**Figura 1.** Perfil de especies moleculares de triglicéridos de una muestra de grasa de leche obtenido mediante GC-FID.

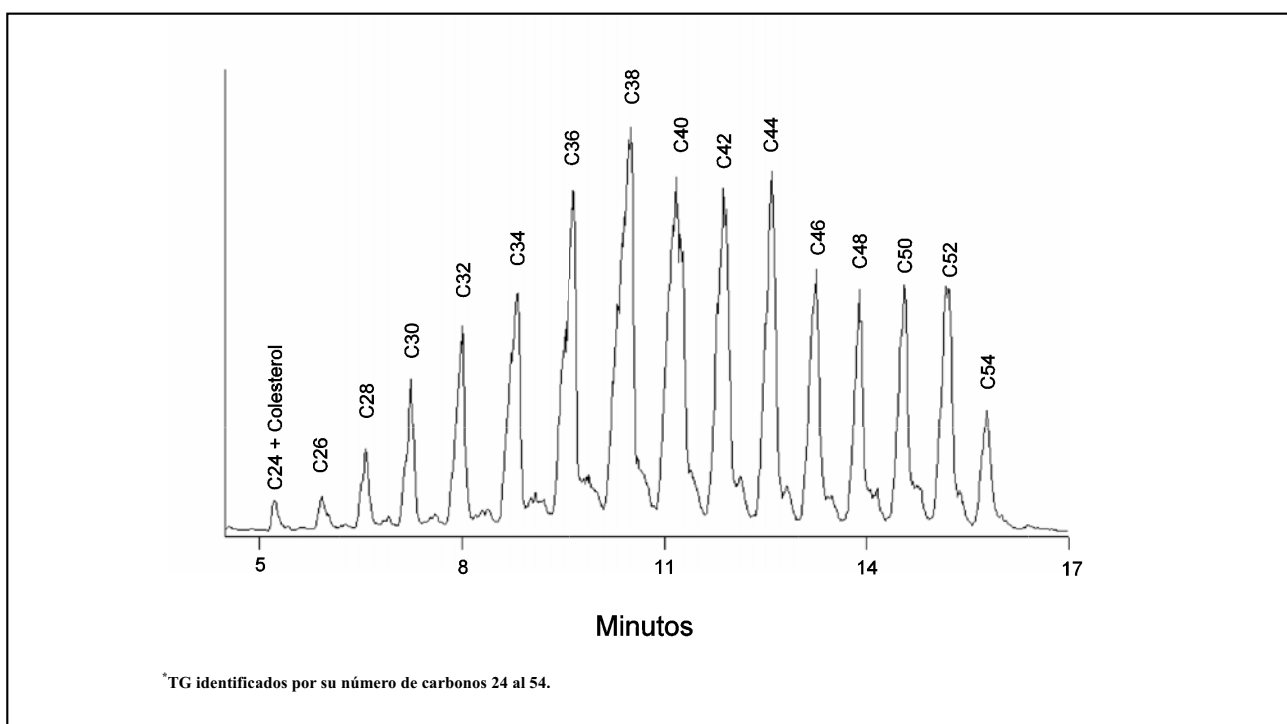
TG presentes, en nuestro laboratorio hemos confirmado la validez del empleo de columnas capilares cortas (2.5-5 m) obtenidas mediante el fraccionamiento de la columna larga empleada anteriormente (RTX-65 TG). Entre las ventajas que ofrece este procedimiento está la disminución de consumo de gas portador, tiempos de análisis más cortos (10-15 minutos) con una precisión y exactitud similar, especialmente para TG con NC altos (C54). El empleo de estas columnas cortas da lugar a perfiles con un único pico para cada grupo de TG con el mismo NC, con lo que se facilita la integración y cuantificación (Figura 2). Este análisis nos ha permitido, mediante la cuantificación de los porcentajes de los diferentes TG en grasa láctea, establecer ecuaciones de regresión específicas para grasa de leche de cabra Fontecha *et al.* (1998) y oveja (Goudjil *et al.*, 2003a) y comprobar que las ecuaciones propuestas en la normativa de la Unión Europea (2001) para leche de vaca no son válidas para el control de leche de estas especies. La aplicación de esta técnica de análisis de TG permite detectar tanto posibles mezclas con grasas extrañas en leche de estas especies como mezclas con grasa de leche de vaca, aunque en este caso, el nivel mínimo de porcentaje de mezcla detectado está por encima del 10%. Recientemente, se han ensayado con éxito estos análisis en quesos madurados con denominación de origen (Fontecha *et al.*, 2006a, 2006b).

## ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN ESTEROLES.

El contenido total en esteroides en grasa láctea es bajo (3 mg/g de grasa, equivalente a 100mg/L de leche) aunque es considerada una de las fuentes más importantes de colesterol de la dieta (2,5-2,7 mg/g de grasa), por lo que desde un punto de vista nutricional merece una particular atención. Asimismo, la determinación de la presencia esteroides vegetales en grasas animales o de colesterol en aceites vegetales, hacen del análisis de estos componentes una herramienta fundamental para controlar la ausencia de mezclas en alimentos.

En cuanto al estudio de la fracción esteróica, la eliminación de las etapas de extracción de la grasa, fraccionamiento del insaponificable y derivatización -previas al análisis por GC- representa un avance considerable que cabe atribuir en gran parte a la mejora de las técnicas cromatográficas.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado una metodología para llevar a cabo el análisis directo del contenido en colesterol libre en leche y productos lácteos a partir de la fracción lipídica total por GC. Para este procedimiento se emplea la misma columna capilar y condiciones descritas anteriormente para el análisis de TG. Se utilizó 5 colestano como patrón interno ya que posee un tiempo



**Figura 2.** Perfil de triglicéridos de una muestra de grasa de leche obtenido mediante GC-FID.

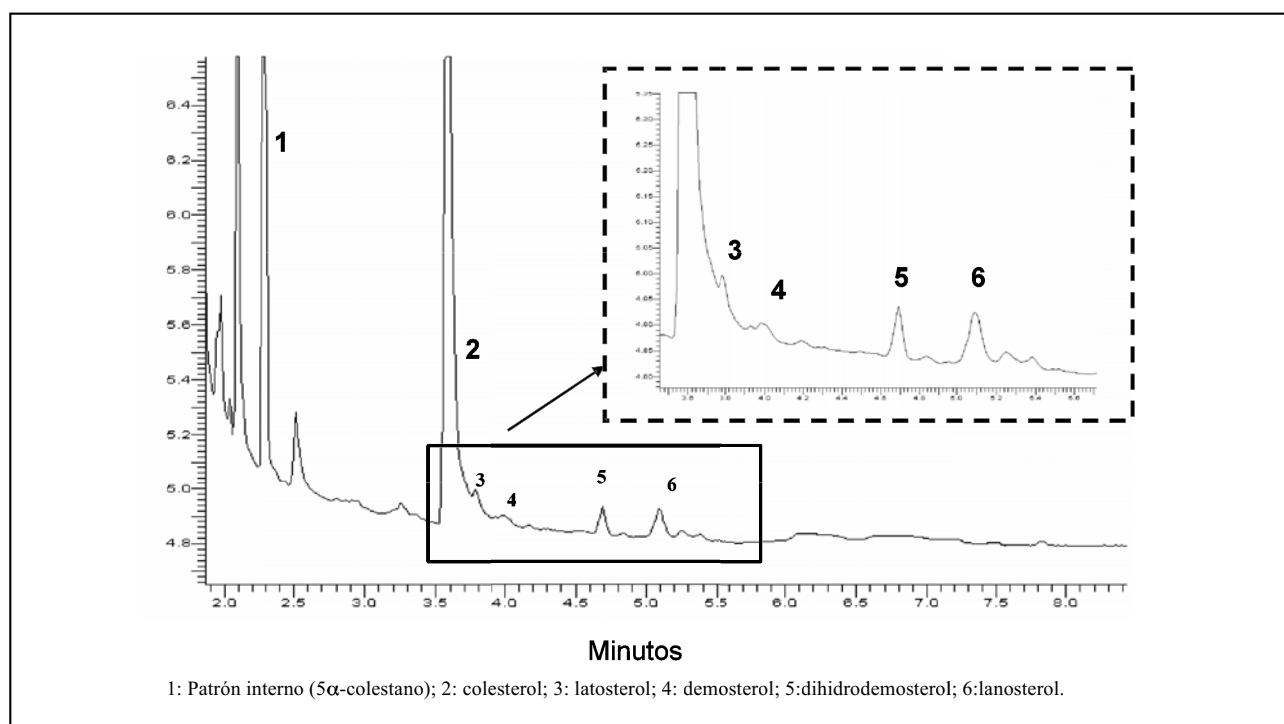
de retención próximo al colesterol eluyendo entre los TG de 26 y 28 átomos de carbono, sin interferir con otros picos (Figura 1).

Este método, sin más etapa previa que la extracción de la grasa, demostró ser muy rápido ya que permitía eliminar las etapas de saponificación, extracción y derivatización. Aunque el análisis cromatográfico precisaba de tiempos superiores a los 30 minutos con objeto de lograr una elución completa de todos los TG de la muestra, demostró una precisión y exactitud muy similar a la de métodos oficiales. Sin embargo, este procedimiento sólo permite determinar niveles de colesterol y no mezclas con grasas vegetales. Para llevar a cabo la determinación de la presencia de esteroides vegetales en grasa láctea se procedió a la transesterificación de la fracción lipídica e inyección en la columna capilar indicada anteriormente. Este procedimiento permite determinar concentraciones de esteroides minoritarios presentes en grasa láctea (latosterol, desmosterol, dihidrolanosterol y lanosterol), que constituyen del orden del 2 al 7% del total de esteroides (Goudjil *et al.*, 2003b) (Figura 3). La aplicación de este método permite la cuantificación con la máxima precisión, del contenido de  $\beta$ -sitosterol (cuantitativamente el más importante de los fitosteroles presentes en aceites vegetales) u otros esteroides vegetales en grasa láctea, por lo que se considera de gran utilidad para la detección de posibles adulteraciones.

### ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS DE LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS POR GC

Como se ha indicado anteriormente en grasa láctea se han descrito más de 400 ácidos grasos diferentes, desde 4 a 26 átomos de carbono, aunque solo un número próximo a 30 está en una proporción superior al 0,1% y el resto están presentes en cantidad de trazas. Los ácidos grasos saturados (AGS) o insaturados (AGI), son mayoritariamente de número par de átomos de carbono, aunque también se encuentran AGS con número impar, aproximadamente un 2% y una proporción similar de AGS de cadena metil ramificada de número par e impar de átomos de carbono (iso y anteiso). En la leche de las distintas especies más difundidas para consumo, hay diferencias notables en el contenido de algunos ácidos grasos, que influyen en el gusto de los productos elaborados (tal como el queso). Así, destaca el contenido en los ácidos caprílico y cáprico (C8:0 y C10:0) que puede ser 2-3 veces mayor en las leches de oveja y cabra que en la de vaca.

Durante los últimos años, la importancia del conocimiento de los ácidos grasos presentes en nuestra dieta, estriba fundamentalmente en el hecho de la relación de algunos de estos compuestos con la salud humana. Parece ampliamente probado que una dieta rica en AGS y *trans*



**Figura 3.** Cromatograma de Colesterol y esteroides minoritarios presentes en grasa de leche de oveja obtenido mediante GC-FID.



incide positivamente con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La grasa láctea, con un contenido de alrededor del 65% en AGS se ha situado entre las primeras de la lista a ser sustituida o eliminada de las recomendaciones dietéticas en las sociedades industrializadas. No obstante, recientes investigaciones concluyen que no existen evidencias científicas que relacionen un consumo moderado de leche y productos lácteos con las enfermedades coronarias (Chardigny *et al.*, 2008, Parodi, 2009).

El perfil de ácidos grasos de la grasa láctea presenta sin embargo la exclusiva presencia de ácido butírico (C4) (descrito como antitumoral), caproico (C6) y de cadena media, caprílico (C8) y cáprico (C10), que constituyen del 8 al 12 % del total. Estos ácidos no presentan incidencia sobre las citadas enfermedades y son, como se ha indicado, muy característicos en grasa láctea de cabra y oveja (Figura 4). Otros ácidos grasos ramificados (iso y anteiso de origen bacteriano) han sido probados como anticancerígenos al igual que otros insaturados como el *trans* vaceánico (C18:1 t11) y el linoleico conjugado (C18:2 c9,t11 CLA) (Parodi, 1999, 2001, Yaqoob *et al.*, 2006) (Figuras 4 y 5).

Ante esta perspectiva, numerosos productos lácteos presentan composiciones lipídicas mejoradas donde las concentraciones de estos ácidos grasos beneficiosos han

sido aumentadas. El incremento en el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en estos productos puede ser alcanzado mediante sustitución de la grasa láctea por otros aceites ricos en AGPI (ej. omega 3) (Alcalá y Fontecha, 2007, Luna *et al.*, 2004) o bien mediante la suplementación de la alimentación de los rumiantes con semillas o aceites ricos en AGPI (Fuentes *et al.*, 2008, Luna *et al.*, 2005), aunque no sin ciertos inconvenientes como el aumento del contenido en C18:1 t10 (Bauman y Griinari, 2003, Bauman *et al.*, 2006).

En este entorno, se hace necesario técnicas analíticas que permitan caracterizar los ácidos grasos presentes en estos productos lácteos. En el análisis de estas especies químicas se emplea de forma generalizada la cromatografía de gases, donde las capacidades técnicas tanto en equipos, columnas y acceso a patrones permiten una identificación muy precisa de los componentes de interés. Para llevar a cabo estos análisis es común la derivatización de los ácidos grasos unidos a la molécula de glicerol en ésteres metílicos (EM) ya que ello permite aislar los analitos, a la vez que aumenta la volatilidad. Esta derivatización puede ser en medio ácido o básico, empleando temperatura o no; pero para evitar alteraciones del perfil lipídico, la bibliografía existente recomienda metilaciones básicas que no tienden a la formación de artefactos y evita emplear calentamientos durante la reacción que

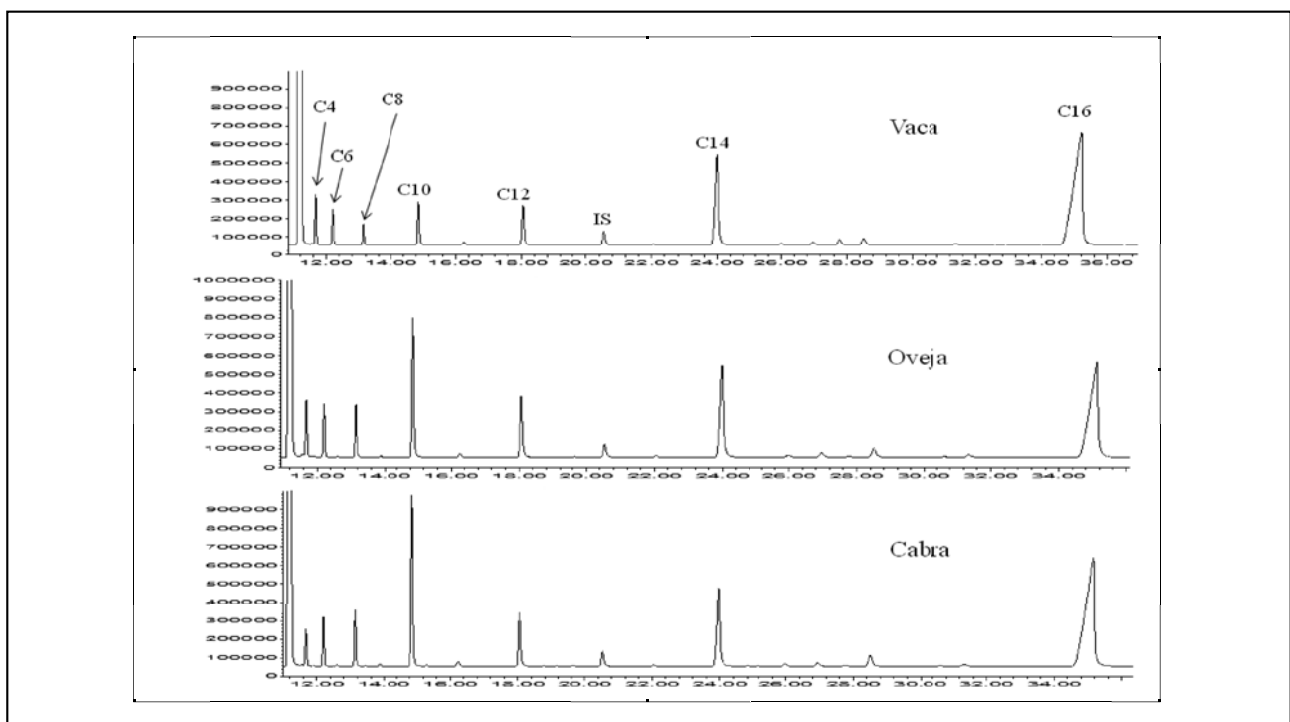
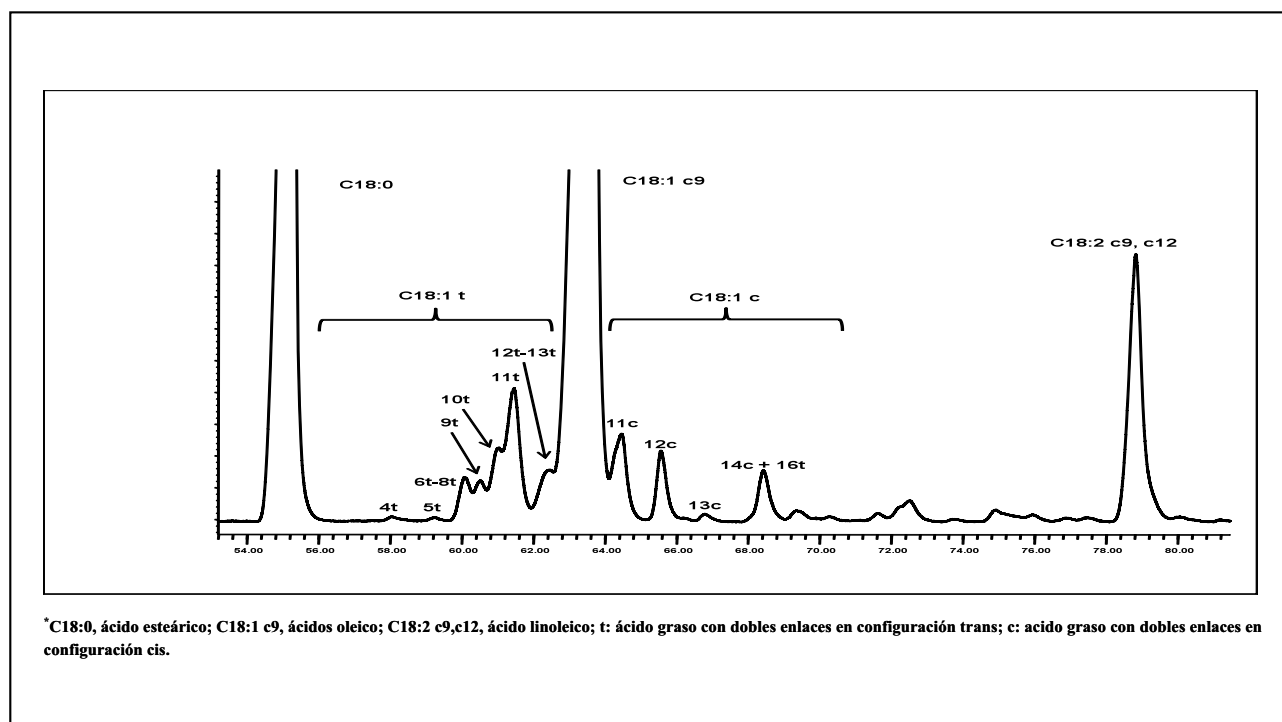


Figura 4. Perfil de ácidos grasos de leche de vaca, oveja y cabra.



**Figura 5.** Perfil de ácidos grasos de la zona cromatográfica trans y cis del C18:1 en grasa de leche de vaca obtenida mediante GC-FID.

podría dar lugar a la isomerización de determinados compuestos como los isómeros de CLA (Luna *et al.*, 2008, Nuernberg *et al.*, 2007).

Para la extracción de la fracción grasa de leche y productos lácteos se aplican los métodos oficiales ISO (2001), que mediante la desnaturalización de las proteínas y empleo de disolventes orgánicos permiten aislar los compuestos lipídicos.

En nuestro laboratorio, para la determinación de la composición en ácidos grasos de las muestras estudiadas se procedió a su derivatización en EM mediante metoxilación con una solución KOH metanólica 2N siguiendo el procedimiento de referencia de la ISO-IDF (2002).

La composición en EM de diferentes muestras de grasa láctea fue analizada según Fontecha *et al.*, (2000). Se empleó un cromatógrafo de gases PerkinElmer Autosystem/ PerkinElmer CLARUS 500, una columna CP-Sil88 100m, con un diámetro interno de 0,25 mm (Chrompack, Middelburg, Holanda), helio como gas portador (30 psig; 214 Kpa) y una relación de split de 1/20. Se empleó el siguiente programa de temperatura: 100°C, 1 minuto, rampa de 7°C/min hasta 170°C, mantenimiento de 55 minutos, rampa de 10°C/min hasta los 230°C y

mantenimiento de 33 minutos. Temperatura del inyector 250°C y detector (FID) 270°C. El volumen de inyección fue de 0,5 L.

En estas condiciones se pudieron constatar diferencias en la composición de grasa láctea de leche de cabra, vaca y oveja (Rodríguez-Alcalá *et al.*, 2009), por los contenidos en ácidos grasos de cadena corta y media, mayores, como era de esperar en la grasa de oveja y cabra, mientras que el contenido de AG de cadena larga en grasa de leche de vaca fue mayor (Figura 4).

La metodología descrita ha permitido también identificar y cuantificar diferencias asociadas a la especie, en el contenido de monoinsaturados, donde las muestras de leche vaca tuvieron concentraciones más elevadas de ácido oleico, no así en *trans* vacénico, donde cabra y oveja tuvieron contenidos mayores. En cuanto al contenido en AGPI, la cromatografía mostró diferencias en compuestos a nivel traza como el C18:2 9t,12t únicamente detectado en las muestras de leche de vaca e igualmente pudieron encontrarse diferencias en las cantidades de ácido linolénico (C18:3 9c,12c,15c), ligeramente superiores en las leches de oveja y cabra, así como del principal isómero del CLA (C18:2 9c,11t), único compuesto de este grupo detectado por la cromatografía de gases en

estas condiciones; viéndose que sus cantidades presentes en leche de oveja doblaban a las encontradas en vaca. Asimismo, esta metodología permite diferenciar el efecto de la suplementación de la dieta de rumiantes (Rodríguez-Alcalá, 2008a). En este estudio, el perfil en AG de la grasa de leche de vaca con una alimentación estándar fue comparado con el perfil obtenido, tras un periodo de normalización, al ser suplementada su alimentación con semillas de lino y maíz. Se mejoró el perfil lipídico de la leche de estas vacas suplementadas, lo que pudo constatar por presentar un contenido en AGS significativamente inferior a la leche control (66,4% vs 58,5%) y un incremento significativo en mono-insaturados (20,6% vs 21,9%) y poli-insaturados (4,4 vs 6,4) como consecuencia de una disminución en ácidos mirístico y palmítico y del aumento en ácido oleico, linoleico y CLA principalmente.

Estudios en la misma línea han sido desarrollados en nuestro laboratorio modificando la dieta de rebaños de ovejas y cabras con suplementos de semilla de lino. Para estos estudios donde el número de muestras es muy elevado, se han utilizado columnas que permiten una elución rápida de los componentes con resoluciones muy similares a las que se venían obteniendo hasta ahora. En nuestro laboratorio se han ensayado estas condiciones frente a las ya descritas; el análisis se llevó a cabo empleando una columna capilar de sílice fundida VF-23, (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm d.f., Varian, Middelburg, Netherlands) (Rodríguez-Alcalá, 2008b). Los EM fueron analizados en un cromatógrafo Clarus® 500 (Perkin Elmer, Beaconsfield, UK). La columna fue calentada inicialmente 160°C, 14 min tras la inyección, tras ello se elevó a 45°C/min hasta 210°C, manteniéndose durante 5 minutos. El gas portador fue helio a una presión de 15 psig y una relación de Split, 1:50. El volumen de inyección fue de 0,5 µl. El tiempo de análisis 20 min.

Los resultados obtenidos al comparar el análisis de la grasa láctea mediante las dos columnas capilares (CPSil-88 de 100 m, ampliamente utilizada en el análisis de ácidos grasos en nuestro laboratorio vs VF23ms 30m, de elución rápida) se presentan en este estudio. El procedimiento cromatográfico desarrollado para la utilización de la columna VF-23ms, ha permitido reducir notablemente el tiempo de análisis (110 min. vs 17 min.). Las condiciones descritas son las adecuadas para llevar a cabo la separación de los principales ácidos grasos de la grasa de la leche, lográndose resultados satisfactorios y comparables con el procedimiento convencional empleando la CP-Sil 88. No obstante, en la resolución de algunas zonas cromatográficas, como la zona *trans* C18:1, mientras que la columna CPSil-88 diferencia 7 picos (Figura 5), la

VF23m solo diferencia 3, aunque permite cuantificar de forma aislada el *trans* 11 C18:1 (precursor de CLA). Resultados similares se muestran en la zona *cis* C18:1, y *t,t*, *c,t* y *c,c* del C18:2 y del CLA, donde la columna VF23m permite diferenciar tanto cualitativa como cuantitativamente estos compuestos con diferentes configuraciones.

## ANÁLISIS DE ISÓMEROS DE CLA POR HPLC-DAD

De todos los ácidos grasos con actividad biológica en la grasa láctea, el que sin duda más atención, debates e investigaciones está generando es el ácido linoleico conjugado (CLA) y su isómero mayoritario el ácido ruménico (RA; C18:2 9c,11t) debido a sus efectos potencialmente beneficiosos para la salud humana, particularmente como agente anticarcinogénico y antiarteriosclerótico. El CLA es una mezcla de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico, que se encuentran de forma predominante en productos derivados de rumiantes. Se forman debido a los procesos de biohidrogenación bacteriana de los AGPI de la dieta por los microorganismos presentes en el rúmen. También hay que destacar el isómero C18:2 10t,12c por la importancia que numerosos estudios le conceden en la disminución de la síntesis de triglicéridos. Sin embargo, los niveles de este ácido en la grasa de leche son muy bajos (~0,1%) (Fritsche *et al.*, 1999, Schmid *et al.*, 2006).

Numerosos estudios han profundizado en los efectos biológicos del CLA, informándose además de sus capacidades antiaterogénicas (Tanaka, 2005), antioxidantes (Hur *et al.*, 2007), mejora del sistema inmunológico (O'Shea *et al.*, 2004) y de reducción de la grasa corporal (Park y Pariza, 2007).

Las únicas vías para alcanzar un consumo de CLA del orden de 3-6 g/día, nivel para el cual se describen los beneficios de salud en animales de experimentación (Ip *et al.*, 1996), son incrementar su contenido en leche mediante la incorporación a la dieta de los rumiantes de suplementos de grasas poli-insaturadas, o mediante la ingestión directa de aceites enriquecidos en CLA en forma de cápsulas o de alimentos enriquecidos. Por ello, en la actualidad hay un gran interés de la industria alimentaria en la incorporación de CLA como suplemento nutricional (obtenido por isomerización alcalina de ácido linoleico), y ya es posible encontrar productos disponibles comercialmente. En la mayoría de los casos estos productos contienen entre el 50 y 80 % de CLA (g/100 g de grasa) que corresponden a una mezcla compleja de isómeros donde el CLA 9c,11t y CLA 10t,12c son los más abundantes.

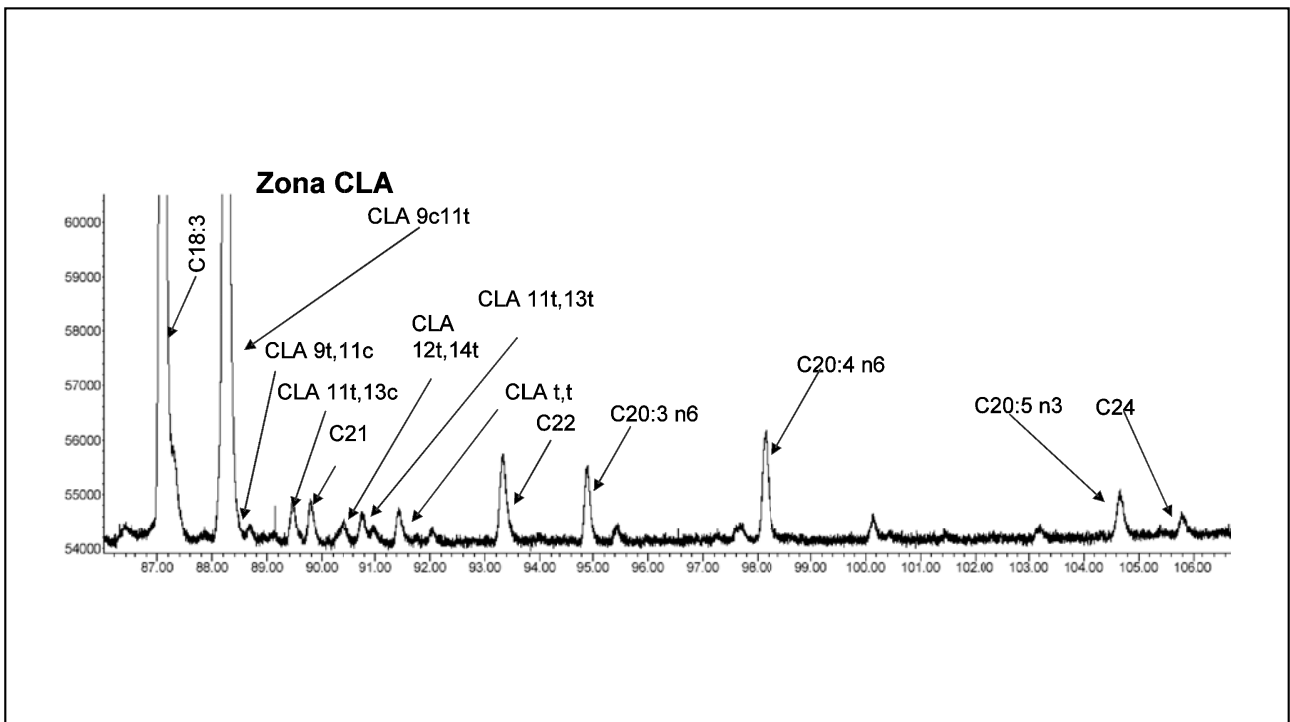


Figura 6. Perfil de isómeros de CLA en grasa láctea obtenido mediante GC-MS.

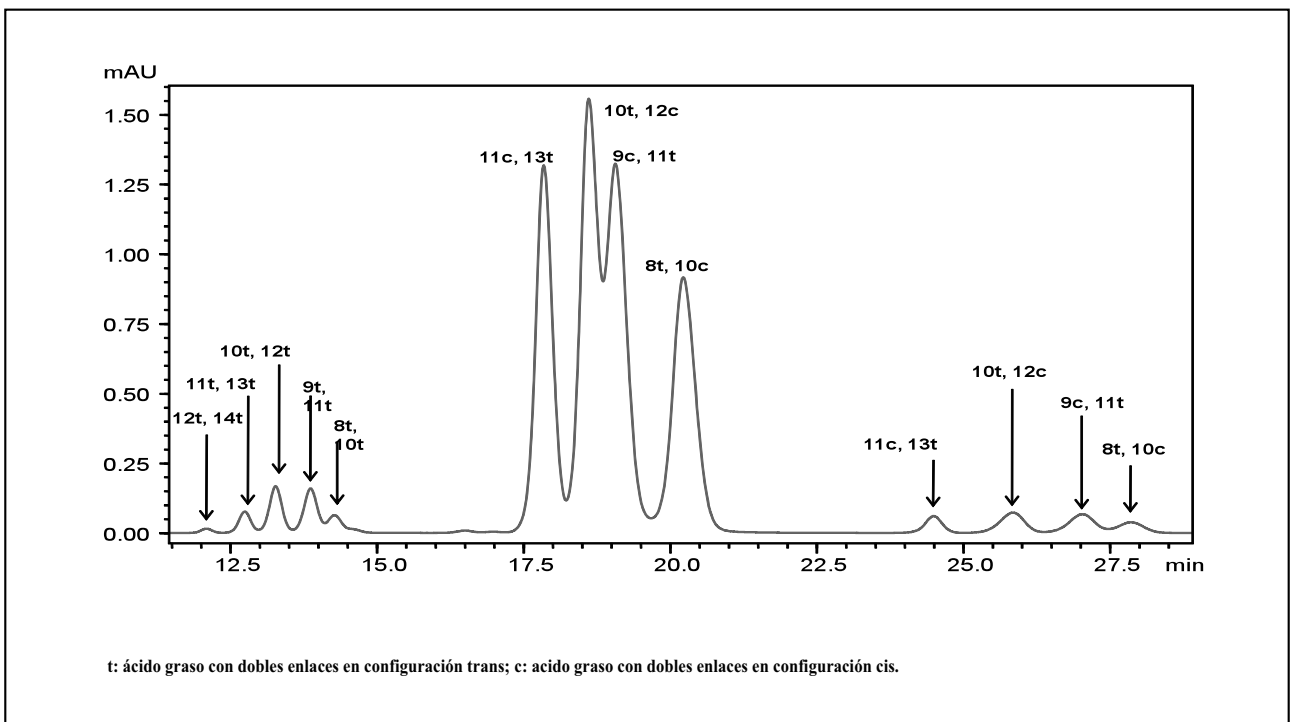


Figura 7. Perfil de isómeros de CLA en una mezcla de patrones (Nuchek®) obtenido mediante Ag<sup>+</sup>-HPLC-DAD.



La resolución cromatográfica de los isómeros de CLA por técnicas de GC solo permite la identificación y cuantificación del isómero mayoritario y grupos de otros isómeros minoritarios de CLA que coeluyen (Figura 6). Sin embargo, el uso complementario de la cromatografía Ag+-HPLC es la forma más efectiva de identificar y cuantificar los isómeros de CLA presentes en un extracto lipídico. Los EM de CLA son selectivamente detectados en UV a la longitud de onda característica de los grupos dieno conjugados (233nm) mientras que el resto de los ácidos muestran muy baja respuesta. En la Figura 7, es posible observar el perfil cromatográfico de una muestra de CLA estándar con los diferentes picos asignados a isómeros de CLA. Debido a la baja reproducibilidad de los tiempos de retención, la identificación de estos componentes esta basada tanto en estudios de co-inyección con sustancias de referencia como atendiendo al orden de elución de los diferentes componentes, de acuerdo a trabajos previos realizados en condiciones cromatográficas similares (Luna *et al.*, 2005). En este perfil es posible diferenciar tres zonas cromatográficas por la configuración geométrica y posicional de los componentes. En la primera zona eluyen los isómeros *t/t* seguidos de una zona más compleja donde eluyen los componentes con configuración *c/t-t/c* y finalmente se localiza la zona de los isómeros *c/c* de CLA.

Para la realización de estos estudios se ha utilizado un equipo de HPLC Shimadzu (Vp Series) con inyector automático y usando una columna ChromSpher 5 Lipids de sílice con ión plata (Varian- Chrompack, Middelburg, the Netherlands; 250 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno y de 5 µm de tamaño de partícula). La fase móvil estuvo compuesta por acetonitrilo en hexano al 0.1% preparado diariamente y operando a un flujo de 1 mL/min (presión: 30 bares). La fracción de los EM fue diluida 1:50 previa a la inyección de 10 µL. Se empleó un detector DAD operando en un rango de longitudes de onda de 190-300 nm. Se llevó a cabo la identificación de los isómeros de CLA mediante la segunda derivada del espectro obtenido y su cuantificación a una longitud de onda de 233 nm. Todos los análisis llevados a cabo con las muestras analizadas se realizaron como mínimo por duplicado.

Aplicando estas condiciones hemos realizado estudios en derivados lácteos enriquecidos en CLA y en leches procedentes de rebaños de rumiantes con una dieta suplementada en aceites ricos en AGPI. En derivados lácteos: leche en polvo, leche, queso fresco, mezcla de zumo y leche, leches fermentadas y yogures, suministrados por una empresa láctea, donde la grasa láctea había sido sustituida por un aceite rico en CLA denomi-

nado Tonalin®. El perfil lipídico de las distintas muestras puso de manifiesto que en todos los productos, la distribución de isómeros era muy similar a la del aceite adicionado rico en CLA y en donde los isómeros CLA 9c,11t y CLA 10t,12c representaban mas del 50% seguidos por otros isómeros minoritarios CLA 11c,13t y CLA 8t,10c. Se determinaron además las modificaciones en la concentración de algunos isómeros de CLA en leche en polvo (aumentos de las conformaciones *trans-trans*) como consecuencia del tratamiento térmico sufrido durante el procesado, mientras que en leche fermentada se detectó la disminución de los isómeros *cis-trans*, *trans-cis* minoritarios por acción microbiológica (Rodríguez-Alcalá and Fontecha, 2007).

### ANÁLISIS DE FOSFOLÍPIDOS POR HPLC-ELSD

La membrana del glóbulo graso de la leche está compuesta de los lípidos y proteínas de las células epiteliales de la glándula mamaria de la que proceden, e incluyen cantidades significativas de fosfolípidos (PLs) y colesterol. Aunque los PLs constituyen un porcentaje pequeño de los lípidos totales (~0,5% en leche de vaca) se encuentran altamente implicados en el metabolismo celular debido a su carácter lipofílico e hidrofílico. Entre los PLs presentes en el glóbulo graso, destacan la fosfatidilcolina 35%, fosfatidiletanolamina 30%, esfingomielinea 25%, fosfatidilinositol 5% y fosfatidilserina (PS) (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009a).

Entre las actividades biológicas descritas para los PLs destacan su carácter antioxidante, propiedades antimicrobianas y antivirales, así como efectos protectores frente a la úlcera gástrica y, recientemente, han demostrado ejercer importantes funciones como agentes activos frente al cáncer de colon, frente a patógenos gastrointestinales y frente a enfermedades como Alzheimer, depresión y estrés (Spitsberg, 2005). Todo ello permite considerar la membrana del glóbulo graso como un potencial nutracéutico.

Para el análisis de la fracción de PLs, el procedimiento de extracción más idóneo es el descrito por Folch *et al.* (1957) utilizando una mezcla 2:1 de cloroformo metanol. El análisis cualitativo y cuantitativo del contenido en PLs de distintas muestras de leche y productos lácteos se ha llevado a cabo en un HPLC Shimadzu (Vp Series, Duisburg, F.R. Germany) equipado con una columna Zorbax RX-SIL (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) y un detector Light Scattering SEDERE modelo SEDEX 85 (Alfortville Cedex, FRANCE). Como fase móvil se han empleado tres mezclas de disolventes de acuerdo a los trabajos previamente publicados por

Rombaut *et al* (2007) y Homann *et al.* (1998), con ligeras modificaciones: La columna fue termostatazada a 40°C, mientras que las condiciones del detector fueron: presión de aire, 3,5 bares; temperatura en la cámara de detección, 60°C; ganancia de señal, 3. El flujo inicial fue de 1 mL/mim. La ventaja de este procedimiento es que permite determinar el contenido en PLs de la grasa láctea directamente, sin necesidad de un fraccionamiento previo. Las muestras fueron disueltas en cloroformo hasta obtener una concentración de 0,5 mg/mL. El volumen de inyección fue de 50 L. El calibrado del equipo se llevó a cabo con el cálculo de rectas de calibrado para cada uno de los PLs componentes patrón (SIGMA) tras inyectar cantidades conocidas y crecientes de los mismos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y esfingomielina).

La Figura 8 muestra el perfil lipídico con el análisis de la fracción de PLs en grasa procedente de leche de vaca. Los PLs mostraron la siguiente distribución de componentes: La fosfatidiletanolamina (FE) es el componente principal (35,8 gr/100 fosfolípidos), mientras que fosfatidilcolina (FC) y esfingomielinas (ES) representaron 21,4% y 20,1%, respectivamente. Sanchez *et al.* (2009b) publicaron resultados en donde la distribución

de PLs en grasa láctea procedente de leche de vaca estuvo caracterizada por tener a la fostadilcolina como fosfolípido mayoritario (32,7%) seguido de fosfatidiletanolamina (28,5%) y esfingomielinas (23%). Otros estudios (Avalli y Contarini, 2005), muestran composiciones donde fosfatidilcolina y etanolamina son los componentes mayoritarios y están en concentraciones similares. Sin embargo otros estudios muestran composiciones de la fracción de fosfolípidos de leches cruda de vaca, en donde el compuesto mayoritario es la fosfatidiletanolamina, aunque en una concentración mayor a la aquí dada (42%); mientras que las FC tuvieron concentraciones del 19%, muy similares a las de ES (19,9%) (Rombaut *et al.*, 2007).

Jensen (2002) revisando la composición general de compuestos lipídicos en grasa láctea de leche de vaca apuntaba a contenidos y distribuciones similares a las encontradas en las presentes muestras para los compuestos mayoritarios (fosfatidiletanolamine 34,1%; fosfatidilcolina 25,41%; esfingomielina 23,57%). Las diferencias entre los resultados expuestos pudieran deberse a diferencias en la metodología de análisis e incluso al efecto de la alimentación de los animales de los que se obtuvieron las muestras (Lopez *et al.*, 2008).

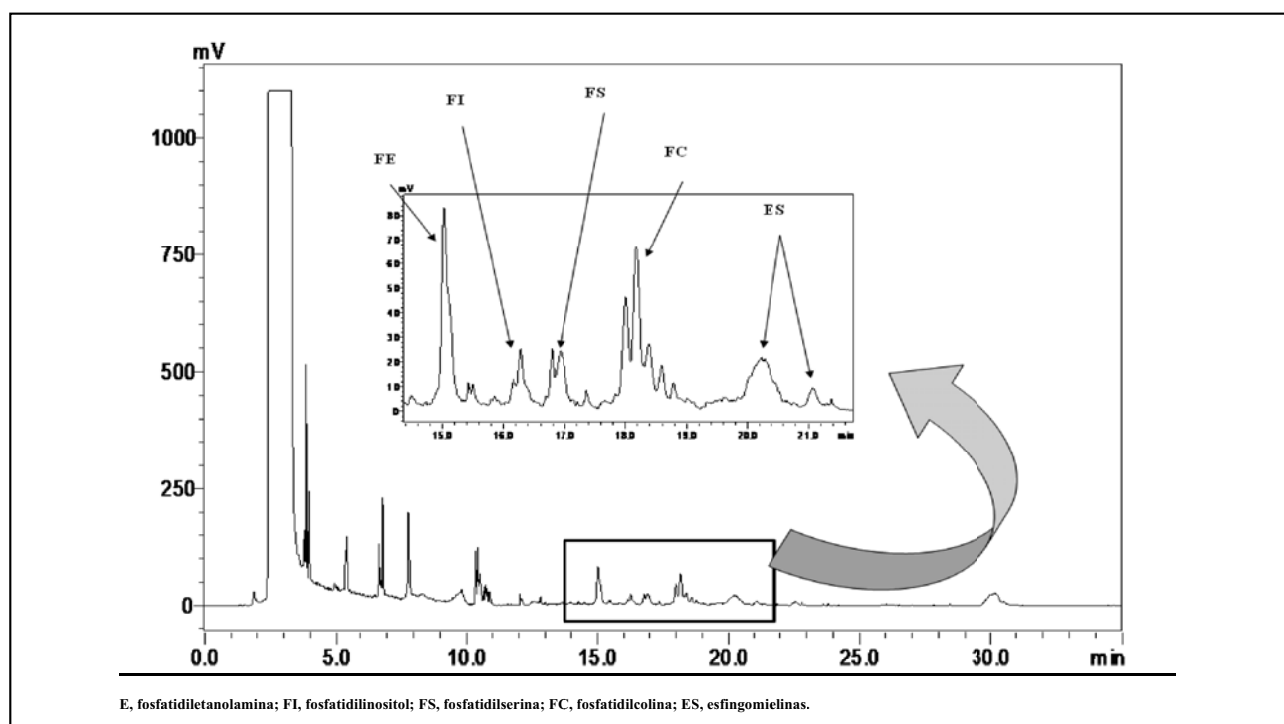


Figura 8. Perfil de fosfolípidos de grasa de leche de vaca obtenido mediante HPLC-ELSD.

## CONCLUSIÓN

El análisis global de grasa láctea representa un reto cromatográfico en virtud de la variedad de compuestos presentes y su variada naturaleza. Muchos de estos compuestos presentan un alto interés tecnológico y en la actualidad, estudios de actividad biológica han demostrado que algunos de ellos representan un beneficio para la salud del consumidor. Aunque actualmente la tecnología en los equipos cromatográficos, columnas y detectores ha avanzado extraordinariamente y nos permite abordar ciertos retos, estamos seguros que nos espera un futuro ilusionante en la investigación analítica de los componentes de la fracción lipídica de la grasa láctea.

## REFERENCIAS

- Avalli, A. and G. Contarini. 2005. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A* 1071(1-2):185-190.
- Bauman, D. E. and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition* 23:203-227.
- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock. 2006. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *Journal of Dairy Science*. 89(4):1235-1243.
- Commission, E. U. 2001. Commission Regulation No. 213/2001. Methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products. Commission Regulation (EC) No. 213/01 of 9 January. *Official Journal of the European Community* L32:42-99.
- Chardigny, J. M., F. Destaillets, C. Malpuech-Brugère, J. Moulin, D. E. Bauman, A. L. Lock, D. M. Barbano, R. P. Mensink, J. B. Bezalgues, P. Chaumont, N. Combe, I. Cristiani, F. Joffre, J. B. German, F. Dionisi, Y. Boirie, and J. L. Sébédio. 2008. Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. *American Journal of Clinical Nutrition* 87(3):558-566.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109(8):828-855.
- Folch, J., M. Lees, and G. H. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1):497-509.
- Fontecha, J., V. Díaz, M. J. Fraga, and M. Juárez. 1998. Triglyceride analysis by gas chromatography in assessment of authenticity of goat milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(12):1893-1896.
- Fontecha, J., I. Mayo, G. Toledano, and M. Juárez. 2006a. Triacylglycerol composition of protected designation of origin cheeses during ripening. Authenticity of milk fat. *Journal of Dairy Science* 89(3):882-887.
- Fontecha, J., I. Mayo, G. Toledano, and M. Juárez. 2006b. Use of changes in triacylglycerols during ripening of cheeses with high lipolysis levels for detection of milk fat authenticity. *International Dairy Journal* 16 (12):1498-1504.
- Fontecha, J., J. J. Rios, L. Lozada, M. J. Fraga, and M. Juárez. 2000. Composition of goat's milk fat triglycerides analysed by silver ion adsorption-TLC and GC-MS. *International Dairy Journal* 10(1/2):119-128.
- Fraga, M. J., J. Fontecha, L. Lozada, and M. Juárez. 1998. Silver ion adsorption thin layer chromatography and capillary gas chromatography in the study of the composition of milk fat triglycerides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(5):1836-1843.
- Fritsche, J., R. Rickert, H. Steinhart, M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, N. Sehat, J. A. G. Roach, J. K. G. Kramer, and Y. Ku. 1999. Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. *Fett/Lipid* 101(8):272-276.
- Fuentes, M. C., S. Calsamiglia, C. Sanchez, A. Gonzalez, J. R. Newbold, J. E. P. Santos, L. M. Rodriguez-Alcala, and J. Fontecha. 2008. Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. *Livestock Science* 113(2-3):144-154.
- Goudjil, H., J. Fontecha, M. J. Fraga, and M. Juárez. 2003a. TAG composition of ewe's milk fat. Detection of foreign fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80(3):219-222.
- Goudjil, H., S. Torrado, J. Fontecha, I. Martínez-Castro, M. J. Fraga, and M. Juárez. 2003b. Composition of cholesterol and its precursors in ovine milk. *Lait* 83(2):153-160.
- Homan, R. and M. K. Anderson. 1998. Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* 708(1-2):21-26.
- Hur, S. J., G. B. Park, and S. T. Joo. 2007. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Science* 110(3):221-229.
- Ip, C., S. P. Briggs, A. D. Haegele, H. J. Thompson, J. Storkson, and J. A. Scimeca. 1996. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 17(5):1045-1050.

- ISO, I. S. 2001. Milk and milk products-Extraction methods for lipids and liposoluble compounds. ISO 14156-IDF 172:2001.
- ISO, I. S. 2002. Milk fat-Preparation of fatty acid methyl esters. ISO 15884-IDF:182:2002.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science* 85(2):295-350.
- Lopez, C., V. Briard-Bion, O. Menard, F. Rousseau, P. Pradel, and J.-M. Besle. 2008. Phospholipid, Sphingolipid, and Fatty Acid Compositions of the Milk Fat Globule Membrane are Modified by Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(13):5226-5236.
- Luna, P., A. B. Belén Martín-Diana, L. Alonso, J. Fontecha, M. A. de la Fuente, T. Requena, and M. Juárez. 2004. Effects of milk fat replacement by PUFA enriched fats on n-3 fatty acids, conjugated dienes and volatile compounds of fermented milks. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106(7):417-423.
- Luna, P., J. Fontecha, M. Juárez, and M. A. de la Fuente. 2005. Changes in the milk and cheese fat composition of ewes fed commercial supplements containing linseed with special reference to the CLA content and isomer composition. *Lipids* 40(5):445-454.
- Luna, P., M. Juárez, and M. A. de la Fuente. 2008. Gas chromatography and silver-ion high-performance liquid chromatography analysis of conjugated linoleic acid isomers in free fatty acid form using sulphuric acid in methanol as catalyst. *Journal of Chromatography A* 1204(1):110-113.
- Nuernberg, K., D. Dannenberger, K. Ender, and G. Nuernberg. 2007. Comparison of Different Methylation Methods for the Analysis of Conjugated Linoleic Acid Isomers by Silver Ion HPLC in Beef Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(3):598-602.
- O'Shea, M., J. Bassaganya-Riera, and I. C. M. Mohede. 2004. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *American Journal Clinical Nutrition* 79(6):1199S-1206.
- Park, Y. and M. W. Pariza. 2007. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). *Food Research International* 40(3):311-323.
- Parodi, P. W. 1999. Conjugated Linoleic Acid and Other Anticarcinogenic Agents of Bovine Milk Fat. *Journal of Dairy Science*. 82(6):1339-1349.
- Parodi, P. W. 2001. Cow's milk components with anti-cancer potential. *Australian Journal of Dairy Technology* 56(2, Farm to Fork 2001):65-73.
- Parodi, P. W. 2009. Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized? *International Dairy Journal*.
- Rodríguez-Alcalá, L. M., Alonso L. y Fontecha J. 2008a. Modificaciones en la composición de ácidos grasos por tratamiento de leche de vaca rica en poliinsaturados. *Alimentaria: revista de tecnología e higiene de los alimentos (congresos)* 1:44-45.
- Rodríguez-Alcalá, L. M. and J. Fontecha. 2007. Hot Topic: Fatty Acid and Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomer Composition of Commercial CLA-Fortified Dairy Products: Evaluation After Processing and Storage. *Journal of Dairy Science*. 90(5):2083-2090.
- Rodríguez-Alcalá, L. M., F. Harte, and J. Fontecha. 2009. Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(1):32-36.
- Rodríguez-Alcalá, L. M., M. V. Calvo, J. Fontecha. 2008b. Desarrollo de un método cromatográfico para el análisis rápido de isómeros cis/trans y CLA en grasa láctea. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos (Congresos)* 1:5.
- Rombaut, R., K. Dewettinck, and J. Van Camp. 2007. Phospho- and sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). *Journal of Food Composition and Analysis* 20(3-4):308-312.
- Sánchez-Juanes, F., J. M. Alonso, L. Zancada, and P. Hueso. 2009a. Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. *International Dairy Journal In Press, Accepted Manuscript*.
- Sánchez-Juanes, F., J. M. Alonso, L. Zancada, and P. Hueso. 2009b. Distribution and fatty acid content of phospholipids from bovine milk and bovine milk fat globule membranes. *International Dairy Journal* 19(5):273-278.
- Schmid, A., M. Collomb, R. Sieber, and G. Bee. 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. *Meat Science* 73(1):29-41.
- Spitsberg, V. L. 2005. Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science* 88(7):2289-2294.
- Tanaka, K. 2005. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Animal Science Journal* 76(4):291-303.
- Yaqoob, P., S. Tricon, C. M. Williams, R. F. Grimble, G. C. Burdge, and P. C. Calder. 2006. Conjugated linoleic acid and human health-related outcomes. *Nutrition Bulletin* 31(2):93-99.



# 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

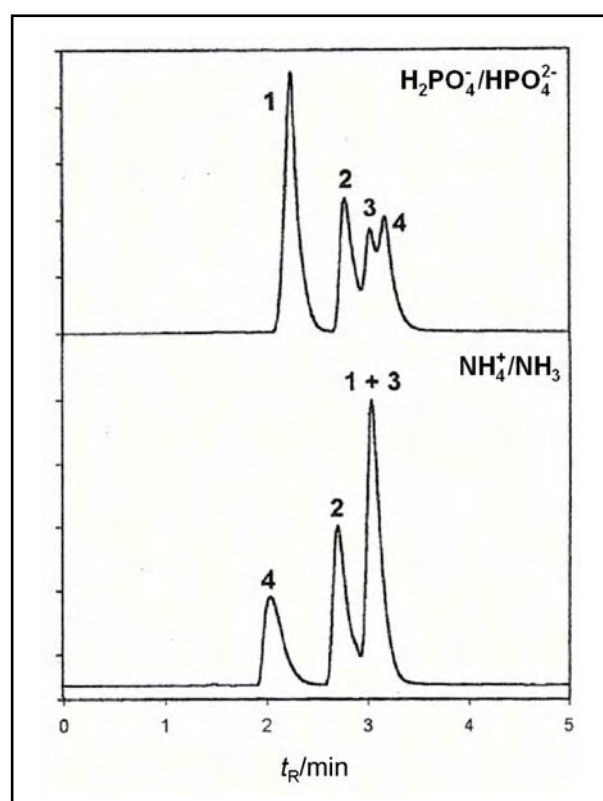
C/Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona

## 1. INTRODUCCIÓN

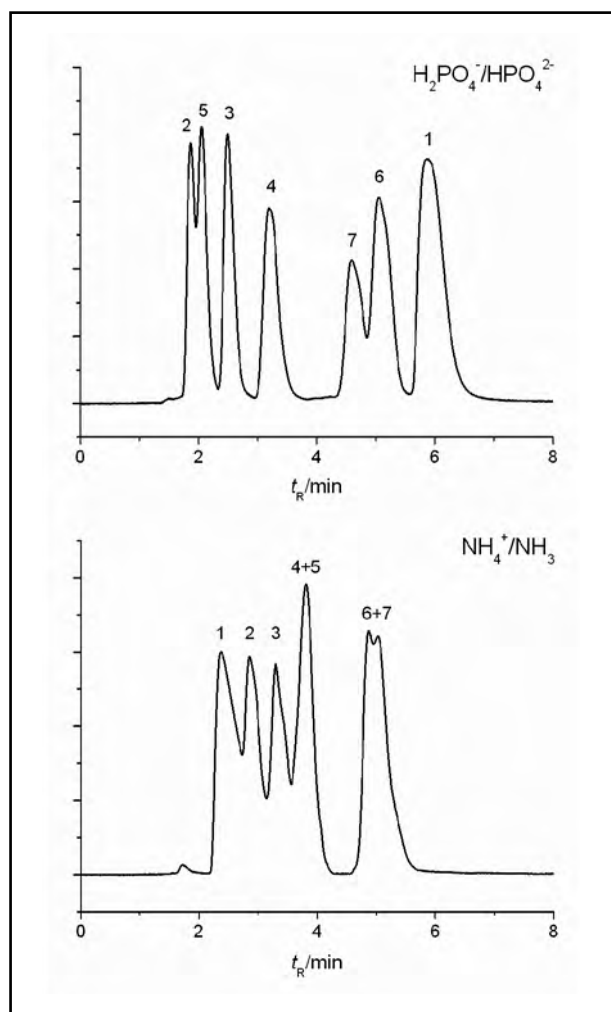
Es bien sabido que el pH de la fase móvil es una variable fundamental en la separación de sustancias ionizables en cromatografía de líquidos, ya que de él depende el grado de ionización de los analitos presentes en la mezcla problema. En el desarrollo de métodos analíticos se requiere pues, ejercer un 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- $\mu\text{m}$  (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  $^w\text{pH}$ . 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  $^s\text{pH}$ , donde s se refiere a la mezcla hidro-orgánica, y el segundo en la escala  $^s\text{pH}$ . El uso de soluciones estándar no acuosas presenta evi-

dentados 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  $^w\text{pH}$  en la medida del pH de fases móviles hidro-orgánicas. En cuanto a las escalas  $^s\text{pH}$  y  $^w\text{pH}$ , 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  $^w\text{pH}$  puede ser convertido, si es preciso, a la escala  $^s\text{pH}$  mediante la siguiente relación [3,5]:

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

donde el parámetro  $\delta$  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  $\delta$  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  $\delta$  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  $^s\text{pH}$ . Si éstos se recopilan en la escala  $^w\text{pH}$ , 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  $\delta$  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 $\delta$	
	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  $\delta$  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 <sup>+</sup> -Tris <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup>Tris(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  $\phi_{Org}$  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 ( $\phi_{MeCN}$ ) [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<sup>-1</sup> 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  $^w_w pH$  en fases móviles tamponadas que contengan acetonitrilo o metanol, y valores de  $^s_w pH$  a distintos contenidos de modificador orgánico.

Tampón	$^w_w pH$	Acetonitrilo				Metanol				
		$m_{pH}$	$^s_w pH$			$m_{pH}$	$^s_w pH$			
			20%	40%	60%		20%	40%	60%	80%
Ácido fórmico										
0,01 mol·L <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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					
		$m_{\text{pH}}$	$s_w\text{pH}$			$m_{\text{pH}}$	$s_w\text{pH}$				
			20%	40%	60%		20%	40%	60%	80%	
Amonio											
0,01 mol·L <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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	$^w\text{pH}$	$m_{\text{pH}}$	Acetonitrilo			Metanol				
			$^s\text{pH}$			$^s\text{pH}$				
			20%	40%	60%	$m_{\text{pH}}$	20%	40%	60%	80%
Piperazina										
0,05 mol·L <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 ( $\alpha$ ) se define como la fracción molar de especie ionizada. Si el analito es un ácido monoprótico neutro (HA), su grado de ionización ( $\alpha_{\text{A}}$ ) 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) ( $\alpha_{\text{HA}}$ ):

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

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  $^s\text{pH}$  y  $^s\text{p}K_{\text{a}}'$  o bien de  $^w\text{pH}$  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  ${}^w\text{p}K_a$ , por lo que estas escalas no serían adecuadas. Por el contrario, serían perfectamente válidas las combinaciones de escalas  ${}^s\text{pH}-{}^s\text{p}K_a$  y  ${}^w\text{pH}-{}^w\text{p}K_a$ . 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 ( ${}^w\text{p}K_a$ ) 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  ${}^s\text{p}K_a$  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).

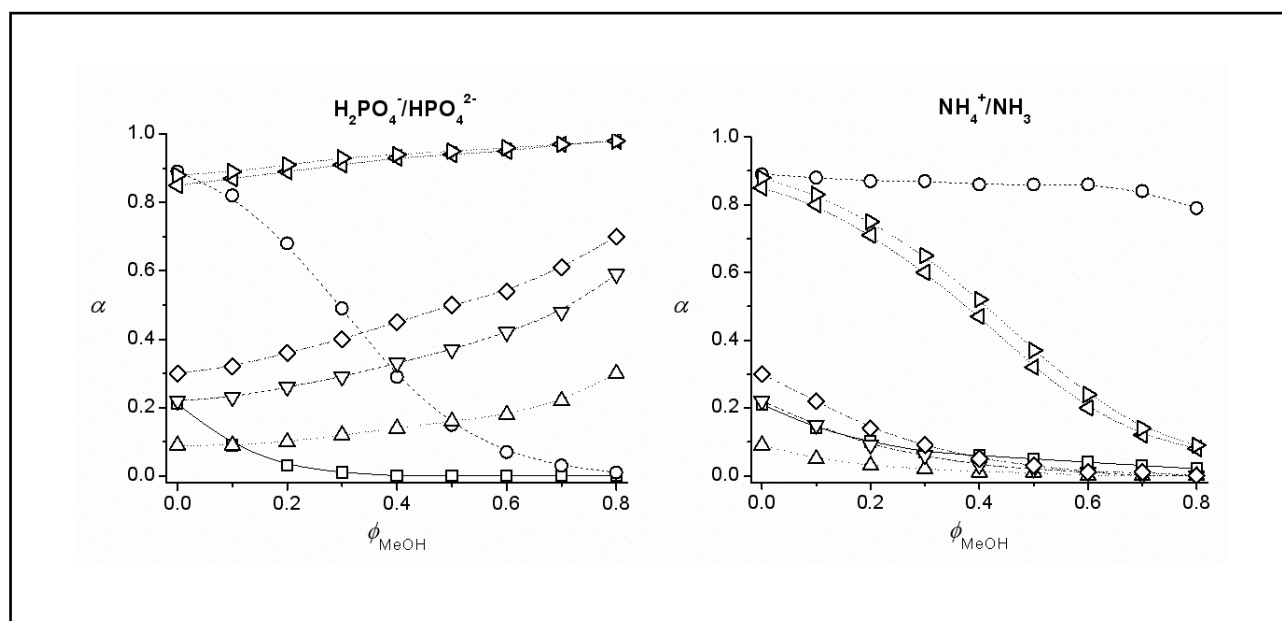
Analito	${}^s\text{p}K_a$	Grado de ionización ( $\alpha$ )	
		$\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ ( ${}^s\text{pH} = 9,05$ )	$\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ ( ${}^s\text{pH} = 7,64$ )
2-nitrofenol	8,92	57%	5%
2,4,6-trimetilpiridina	6,04	0%	2%
3-bromofenol	11,14	1%	0%
<i>N,N</i> -dimetilbencilamina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



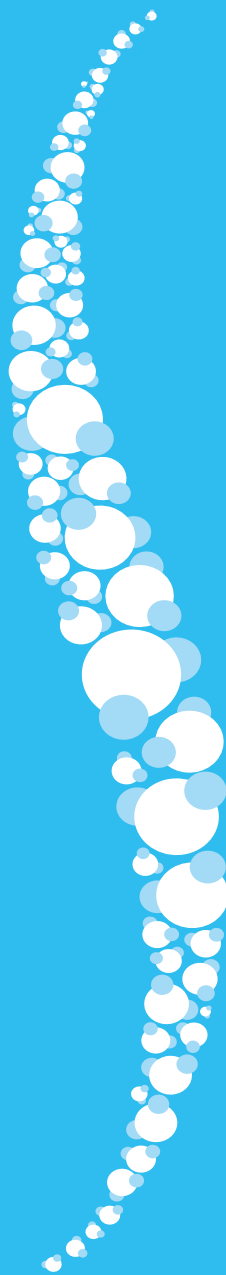
**Figura 3.** Variación del grado de ionización al añadir metanol a tampones acuosos de  ${}^w_pH = 8$  y concentración  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  preparados a partir de  $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$  y  $NH_4^+ / NH_3$ . Compuestos: (□) 2,4,6-trimetilpiridina, (○) *N,N*-dimetilbencilamina, (△) 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, 2<sup>nd</sup> ed., 1973.
- [5] I.M. Kolthoff, P.J. Elving, E.B. Sandell, Treatise on Analytical Chemistry, Part I, vols. 1 and 2, 2<sup>nd</sup> 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, 2<sup>nd</sup> 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, 3<sup>rd</sup> ed., Blackwell, Oxford, 1998, [http://www.iupac.org/publications/analytical\\_compendium/](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.

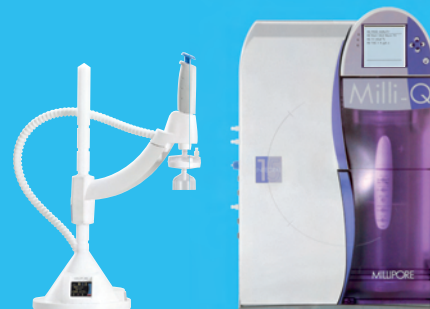
Gracias a su nuevo concepto de dispensado, ergonómico y flexible, con una selección de filtros finales adaptados a los requisitos de sus aplicaciones, la eficacia de su laboratorio se verá multiplicada.

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER™

Research. Development. Production.

Manténgase informado sobre nuestros nuevos productos en: [www.millipore.com/lab\\_water](http://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.

\* \* \* \* \*

# NOTICIAS DE LA SECyTA

## IX REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA SECyTA (37ª REUNIÓN CIENTÍFICA DEL GCTA)

La IX Reunión de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (XXXVIII Reunión del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines) tendrá lugar en Donostia-San Sebastián, en el Parque Tecnológico Miramón, del 28 al 30 de octubre de 2009.

Constituirá una excelente ocasión para discutir e intercambiar información y experiencias, desde un punto de vista interdisciplinar, sobre el desarrollo de los avances metodológicos que contribuyen al desarrollo de las Técnicas Cromatográficas y sus metodologías asociadas como la espectrometría de masas, métodos de detección espectroscópicos y electroquímicos y otros. Se dedicará atención especial a la descripción de las aplicaciones dedicadas a la resolución de los problemas que actualmente plantean la ciencia y la tecnología. La Reunión se acompañará de una exposición comercial, donde se presentarán novedades en instrumentación analítica y modernas metodologías de ensayo utilizadas en Química y Bioquímica, y se facilitará el contacto personal usuario-proveedor.

### PROGRAMA CIENTÍFICO

Durante la reunión habrá presentaciones orales distribuidas en dos sesiones paralelas y presentación de pósters. Además, habrá una sesión especial dedicada al análisis de drogas de abuso con dos conferencias invitadas por parte de María Teresa Galcerán y Damiá Barceló así como diversas comunicaciones orales y una sesión de pósters especialmente dedicada al tema.

### METODOLOGÍA

La reunión pretende recoger las contribuciones al desarrollo de las ciencias de separación, así como sus aplicaciones en las diversas especialidades de la ciencia y tecnología, con énfasis especial en:

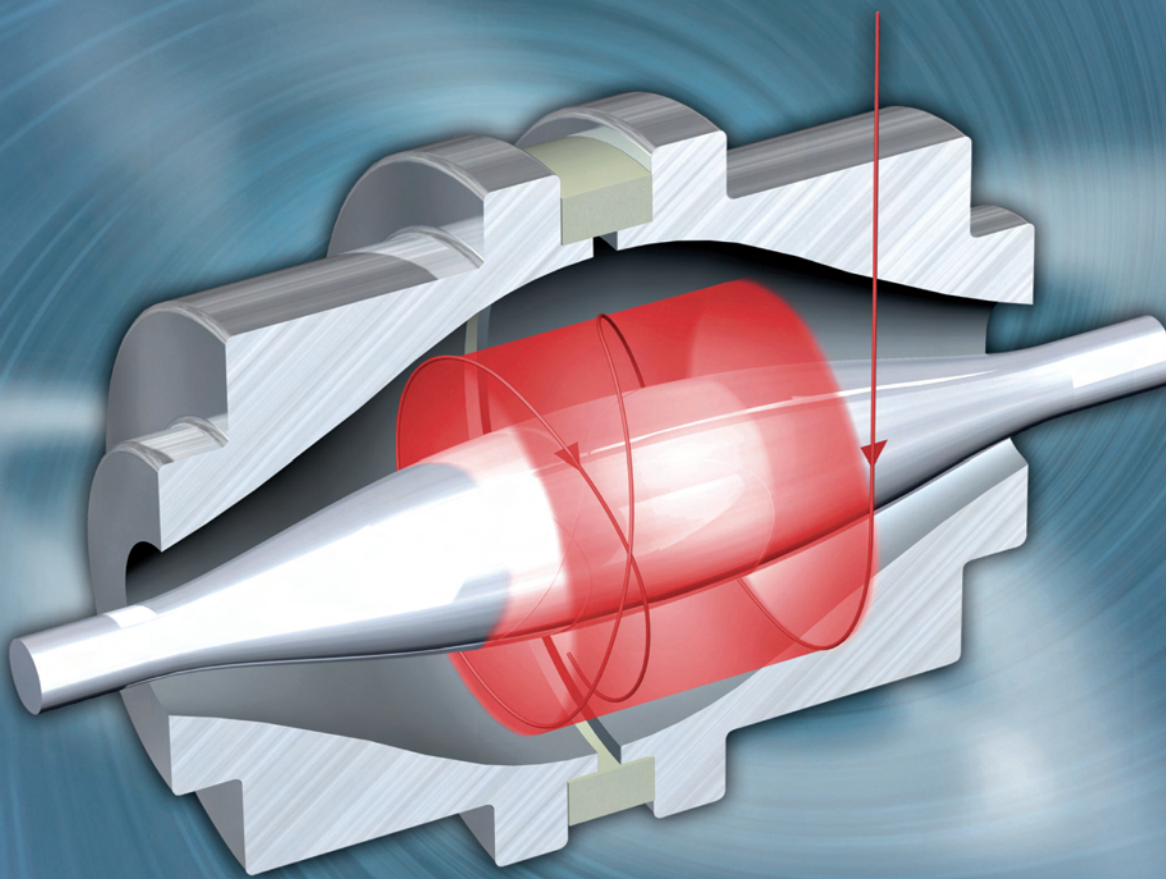
- Medio Ambiente
- Alimentos y seguridad alimentaria
- Bioanálisis
- Proteómica
- Nuevos Desarrollos en Instrumentación Analítica
- Nanotecnología
- Miniaturización en Análisis Químico
- Análisis en Procesos y Productos Industriales
- Análisis Clínico

### COMITÉ ORGANIZADOR

- Carmen Dorronsoro (Chairman), *Universidad del País Vasco*.
- Joan O. Grimalt, *Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC)*.
- Elena Ibañez, *Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)*.
- Jesús Ibarluzea, *Servicio de Sanidad Ambiental de la Subdirección de Salud Pública de Guipúzcoa*.
- Begoña Jiménez, *Instituto de Química Orgánica General (CSIC)*.
- Juan Manuel Madariaga, *Universidad del País Vasco*.
- Miguel Ángel Pérez, *Varian Ibérica, S.A.*
- Yolanda Picó, *Universidad del Valencia*.
- Virginia San Nacienceno, *Universidad del País Vasco*.
- Josep María Sangenís, *Thermo Fisher Scientific*.
- Francisco Javier Santos, *Universidad de Barcelona*.

### COMITÉ CIENTÍFICO

- Joan O. Grimalt, *Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC)*.
- Ana Agüera, *Universidad de Almería*.
- Lourdes Cantón, *Universidad del País Vasco*.
- Carmen Dorronsoro, *Universidad del País Vasco*.
- Pilar Fernández, *Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC)*.
- Ana García Campaña, *Universidad de Granada*.
- Emilio Gelpí, *Instituto de Investigación Biomédicas de Barcelona (IIBB-CSIC)*.
- Fernando Goñi, *Laboratorio de la Subdirección de Salud Pública de Guipúzcoa*.
- Georges Guiochon, *The University of Tennessee. Knoxville. USA*.
- Elena Ibañez, *Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)*.
- Jesús Ibarluzea, *Servicio de Sanidad Ambiental de la Subdirección de Salud Pública de Guipúzcoa*.
- Begoña Jiménez, *Instituto de Química Orgánica General (CSIC)*.
- Henk Lingeman, *Free University of Amsterdam. Holanda*.
- Juan Manuel Madariaga, *Universidad del País Vasco*.
- Rosa María Marcé, *Universidad Rovira i Virgili*.
- Yolanda Picó, *Universidad del Valencia*.
- Klaus K. Unger, *Institut fuer Anorganische Chemie und Analytische Chemie. Alemania*.
- Francisco Javier Santos, *Universidad de Barcelona*.



## Resolución, masa exacta y rango dinámico excepcionales con tecnología Orbitrap.

El analizador de masas Thermo Scientific Orbitrap es el primer gran avance en espectrometría de masas en los últimos 25 años. De inmediato ha sido aceptado por su resolución, capacidad de masa exacta, rango dinámico, y sensibilidad excepcionales.

La tecnología Orbitrap™ forma parte de una gama de instrumentos tanto para investigación como para rutina, desde la identificación de compuestos de gran productividad a análisis difíciles de niveles bajos de componentes en mezclas complejas:

- LTQ Orbitrap XL: Masa exacta y rango dinámico excepcionales.
- LTQ Orbitrap XL ETD: El instrumento más poderoso para análisis en proteómica.
- MALDI LTQ Orbitrap: MS<sup>n</sup> combinada con la simplicidad del MALDI.
- Exactive™: LC-MS de sobremesa de altas prestaciones para screening de gran productividad y cuantificación.



Para más información visite [www.thermo.com/orbitrap](http://www.thermo.com/orbitrap)





## Confianza extrema, sin límite de velocidad. Pruebe los nuevos LTQ Velos y LTQ Orbitrap Velos.

Presentamos las tecnologías de trampa de iones más rápidas y sensibles. El Thermo Scientific LTQ Velos combina dos innovaciones que permiten la identificación y cuantificación de compuestos de baja abundancia en la mitad de tiempo:

- Nueva fuente API con tecnología de lentes-S que aumenta la transmisión de iones y la sensibilidad
- Unica trampa de iones de doble presión que aumenta tanto velocidad de escaneado como la resolución

El espectrómetro de masas Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos ofrece ultra-alta resolución y masa exacta insuperables, a velocidades sin precedentes para confianza absoluta en la identificación.

Si está buscando proteínas o quiere identificar metabolitos a nivel de trazas, el LTQ Velos™ y el LTQ Orbitrap Velos™ están diseñados para acelerar sus descubrimientos.

Descubra más en [www.thermo.com/velos](http://www.thermo.com/velos)



**Amplíe fácilmente el LTQ Velos  
con tecnología Orbitrap**

*Moving science forward*

**Thermo**  
SCIENTIFIC  
Part of Thermo Fisher Scientific

## CONFERENCIAS INVITADAS

### María Teresa Galcerán

Facultad de Química. Universidad de Barcelona.

*“Illicit drugs in water resources: From wastewater to tap water”*

### Damiá Barceló

Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA-CSIC)

*“Tracing drugs of abuse in waste waters, natural waters and airborne particles at the Ebro River Basin, Barcelona and Madrid metropolitan areas”*

### Félix Hernández

Facultad de Ciencias. Universidad Jaume I. Castelló de la Plana.

*“Estrategias analíticas basadas en el uso de LC-MS (triple cuadrupolo y tiempo de vuelo) en análisis de residuos de plaguicidas”*

### Henk Lingeman

Free University of Amsterdam. Amsterdam. Holanda.

*“Selective sample preparation for LC-MS/MS analysis of biologically active compounds combining chemical and biological information”*

### Klaus K. Unger

Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie. Alemania

*“Monolithic silicas in High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) - where is the added value as compared to particle packed columns?”*

## PREMIOS

V Edición de los Premios José Antonio García Domínguez, patrocinado por VARIAN. Los premios tienen por objeto reconocer el mérito científico de las comunicaciones, tanto orales como en póster, presentadas por jóvenes investigadores en el marco de la IX Reunión Científica de la SECyTA. Estos premios quieren honrar la memoria de uno de los fundadores del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines (GCTA, actualmente SECyTA): José Antonio García Domínguez, Investigador del Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC) y uno de los pioneros de la cromatografía de gases en España.

El premio en esta edición estará compuesto por los siguientes galardones:

- Premio a la mejor comunicación oral (1.000 €)
- Premio a la segunda mejor comunicación oral (500 €).
- Premio al mejor póster (400 €).
- Premio al segundo mejor póster (200 €).

Las bases para los premios se pueden encontrar en la página web: [www.idaea.csic.es/secyta2009/index.htm/](http://www.idaea.csic.es/secyta2009/index.htm/)

## INSCRIPCIÓN Y ALOJAMIENTO

Información y reservas desde la página web. Rellenar el formulario y enviar a:

[www.idaea.csic.es/secyta2009/index.htm/](http://www.idaea.csic.es/secyta2009/index.htm/)

	Antes del 20 de Septiembre	Después del 20 de Septiembre
<b>Miembros de la SECyTA</b> <sup>(1)</sup>	375 €	445 €
<b>Participantes No Miembros de la SECyTA</b> <sup>(1)</sup>	500 €	565 €
<b>Estudiantes</b> <sup>(1,2)</sup>	170 €	200 €
<b>Inscripción por un día</b>	175 €	190 €

<sup>(1)</sup> Libro de resúmenes, cafés, almuerzos y cena de la reunión incluidos.

<sup>(2)</sup> Será necesario acreditar la condición de estudiante.

<sup>(3)</sup> Libro de resúmenes, cafés y almuerzo incluidos.

IVA INCLUIDO

Los congresistas harán directamente sus reservas de hoteles. Información y precios en la página web.

## BECAS

Se aceptarán solicitudes de becarios hasta el 20 de Septiembre respetando las tasas. La resolución de las becas se comunicará de manera personal, con suficiente antelación al comienzo del congreso. Para solicitar la beca, descargar el formulario de la página web, rellenarlo y enviarlo, juntos con los informes que se piden, al correo electrónico: [vsannaciance001@ikasle.ehu.es](mailto:vsannaciance001@ikasle.ehu.es)

### • Requisitos de los becarios:

- Ser miembros de la SECyTA.
- Ser estudiantes en fase de desarrollo de proyecto de Tesis Doctoral o trabajos de investigación en universidad o centros de investigación.
- Presentar alguna comunicación al congreso.
- Al menos uno de los investigadores senior firmantes de la comunicación debe estar inscrito en el congreso.



Las Becas cubrirán todos los gastos de inscripción al congreso más 200 euros para estudiantes no residentes en Donostia-San Sebastián.

NOTA: Los estudiantes que soliciten beca deberán hacerlo constar en el formulario de inscripción.

#### SECRETARÍA TÉCNICA DE LA REUNIÓN

Virginia San Nacienceno Fernández.  
Facultad de Química. Universidad del País Vasco.  
Apartado de Correos 1072.  
20080 Donostia-San Sebastián.  
Tel.:943 018 214. Fax: 943 015 270  
vsannaciance001@ikasle.ehu.es

#### PROGRAMA SOCIAL

28 Octubre 2009, Inauguración Congreso  
29 Octubre 2009, Cena Congreso  
30 Octubre 2009, Clausura Congreso

#### FECHAS CLAVES

**13 Junio 2009:** Fecha límite para el envío de resúmenes.  
**14 Julio 2009:** Comunicación de trabajos aceptados.  
**20 Sept. 2009:** Fecha límite de inscripción de cuota reducida. Fecha límite para el envío de la solicitud de Beca.  
**14 Oct. 2009:** Fecha límite de envío de resúmenes extendidos y pósters para el Premio José Antonio García Domínguez.

### NUEVOS SOCIOS (18-11-2008 A 29-05-2009)

Socio 1509. Rodríguez Sánchez, Sonia  
Instituto de Química Orgánica General (CSIC)  
C/Juan de la Cierva, 3.  
28006-MADRID

Socio 1510. Pino Estévez, Verónica  
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología  
Universidad de La Laguna  
Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n  
38206-La Laguna (SANTA CRUZ DE TENERIFE)

Socio 1511. Subirats Vila, Xavier  
Departamento de Química Analítica  
Universidad de Barcelona  
C/Martí i Franquès 1-11  
08028-BARCELONA

Socio 1512. Sanz Landaluce, Jon  
Facultad de Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
Avda. Complutense s/n  
28040-MADRID

Socio 1513. Kortabitarte Lardizabal, Marisa  
C/Plazaola, 25, 1ºD  
20230-Legazpi (GIPUZKOA)

Socio 1514. Villegas Domínguez, Luisa  
Pº Ulía, 38, 3º  
20013-Donostia (GIPUZKOA)

Socio 1515. Guart Torres, Albert  
Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA)-CSIC  
C/Jordi Girona, 18-26  
08034-BARCELONA

Socio 1516. Sánchez Ávila, Juan Ignacio  
Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA)-CSIC  
C/Jordi Girona, 18-26  
08034-BARCELONA

Socio 1517. Fernández Sanjuán, María  
Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA)-CSIC  
C/Jordi Girona, 18-26  
08034-BARCELONA

Socio 1518. Barrios Romero, Mª del Mar  
Instituto de Química Orgánica General (CSIC)  
Juan de la Cierva, 3  
28006-MADRID

Socio 1519. Mocholí Castelló, Francisco  
Soluciones Analíticas Instrumentales, S.L. (SAILab)  
C/Argenters, 5 Ed. I, Db, Parc Tecnològic del Vallès  
08290-Cerdanyola del Vallès (BARCELONA)

## ENTREVISTA A M<sup>a</sup> JOSEFA MOLERA

*En el marco de las 12<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental celebradas en Barcelona del 21 al 23 de Octubre de 2008 se organizó un homenaje a algunos socios destacados de la SECyTA, como reconocimiento a su contribución al desarrollo de las técnicas de separación en España. Entre los homenajeados, que no pudieron estar presentes en el acto, destaca M<sup>a</sup> Josefa Molera, socio número 1 y primera Presidenta del GCTA (1972-76). M<sup>a</sup> Josefa Molera fue pionera de la cromatografía de gases en España construyendo, junto con José Antonio García Domínguez, uno de los primeros cromatógrafos de gases que existieron en España. Ha recibido numerosas distinciones, entre ellas, los premios Alfonso X el Sabio del CSIC y la medalla de Química de la RSEQ. El día 23 de febrero de 2009, recibió, de manos del Presidente de la SECyTA, Joan Grimalt, la medalla conmemorativa. Al acto asistieron Begoña Jiménez (tesorera de la SECyTA), uno de los hijos de M<sup>a</sup> Josefa Molera y yo misma (Elena Ibáñez, Vicepresidenta de la SECyTA).*

*Lo que viene a continuación no pretende ser una entrevista al uso sino un resumen de algunos de los temas que se trataron durante el tiempo que estuvimos en su casa.*

*M<sup>a</sup> Josefa recuerda sus orígenes en la cromatografía: “en un principio trabajé en reacciones de combustión... en la guerra la gente trabajó en reacciones rápidas (osciloscopios, todo física). Tratamos de montar unos sistemas aquí pero resultó muy difícil porque nos faltaba la base de física. Entonces me pase a la cromatografía. Eso le paso también a Ette, que se pasó a la cromatografía porque dijo que la cinética se había hecho imposible. Había que volver a hacer una carrera de física. En realidad tengo sólo 20 trabajos de cromatografía, los demás son de cinética”*

**Pero fuiste una de las primeras mujeres trabajando en cromatografía, fuiste además la primera presidenta del GCTA y socio número 1.**

“Yo no quería ser. Recuerdo que Martín Municio me vino diciendo que si quería firmar para formar el grupo de cromatografía... y yo dije, “yo firmo pero a mí no me deis ningún cargo”. En ese momento mi marido era Secretario de la Real Sociedad Española de Química, y cuando llegó esa noche a casa me dijo “no ha habido más remedio, te han nombrado presidenta”.



**Cuando empezaste tu carrera investigadora, ¿cómo era para una mujer investigar en España?**

Yo terminé la carrera en el año 42, en realidad me apunté, junto con otra compañera, a 4 y 5º en el mismo año, como éramos 2 para hacer las prácticas, una subía a un laboratorio, una estaba en el otro y nos turnábamos. Lo de los laboratorios fue terrible, estábamos en un laboratorio abajo y otro en el otro piso, e íbamos subiendo y bajando y así parecía que estábamos las dos. Y así hicimos. Después D. Antonio Rius, profesor de Química Técnica, nos dijo si queríamos hacer un proyecto final de carrera, ésa era una asignatura que me gustaba y además saqué buena nota. La postguerra para nosotros fue durísima, no tenía más remedio que espabilar y así, buscabas ayuda de amigos ingenieros, trabajabas dando clases particulares... D. Antonio Rius me dijo que si quería quedarme como ayudante (no cobrabas nada, pero te podías sacar clases particulares, que es a lo que me dediqué), con él se estableció una relación muy buena porque le ayudé a revisar un libro que estaba escribiendo en el que detecté algunos errores.....me pidió que le diera clase a su hijo que estudiaba Químicas, me hice amiga de la familia, y él me dijo que si quería hacer la tesis. La tesis consistía en hacerla en el pabellón de San Bernardo que no tenía calefacción y sola... pero yo no era Madame Curie... así que me horrorizaba pensar en hacer la tesis sola todos los días y helada de frío. En realidad yo quería trabajar en el Rockefeller (actualmente el Instituto Rocasolano), pero el presidente en esos momentos era Casares y en

el centro no admitían a mujeres, esa era la situación. Yo me puse a dar clases, un par de años, para ayudar a mi madre en la economía. En ese momento estaba de ministro de la guerra Juan Vigón y ese tenía 3 hijas, una mayor que yo (M<sup>a</sup> Teresa), éramos amigas, en esos momentos el que mandaba en el Rockefeller era Palacios, y admitió a M<sup>a</sup> Teresa a hacer la tesis con él y M<sup>a</sup> Teresa me llamó y me dijo M<sup>a</sup> Josefa, ya puedes venir al Rockefeller porque ya hay una mujer.

Amelia, mujer de Lora Tamayo y yo éramos muy amigas y vivíamos cerca, una vez me encontró y me preguntó que tal estaba y yo le dije que aburrida... entonces me dijo, tú me hiciste hacer la tesis a mí (de la tesis resultó la boda con Lora), ahora soy yo la que no te voy a dejar mientras no lo hagas... hablé con D. Antonio, y le dije que si podía hacer la tesis ahora que me admitían en el Rockefeller, y le pregunté cuando podía empezar... "Pues venga usted mañana"... "pero si tengo clases"... "bueno, pues te doy una semana". Me deshice de las clases y allá me fui a hacer la tesis y nada más empezar a hacer la tesis vienen 8-10 chicas que querían que les diese clase de Química Técnica 3 días por semana a la hora que yo quisiera y al precio que yo quisiera.

#### ¿Cobrabas algo?

D. Antonio me puso la primera para las becas, pero era una beca miserable, eran malas y en las clases particulares me pagaban 125 pesetas cada una y con eso y alguna clase que daba en un colegio, hice la tesis. D. Antonio fue tan formidable que me dió un tema que todo lo que hacía tenía resultados, y no porque yo fuera maravillosa... la tesis era en electroquímica, como realmente no la había estudiado durante la carrera, lo primero que hice fue hundir los codos.

#### ¿Estuviste en el extranjero?

Estuve en Oxford. Cuando llevaba cierto tiempo decidieron que tenía que ir a especializarme, en el año 51, estuve trabajando con Hinshelwood, al que luego dieron el premio Nobel (en el año 56). Cuando trabajé yo con él todavía no era premio Nobel. Cuando yo fui no quería mujeres en el laboratorio, le escribió Rius y le contestó que no tenía sitio y me dijo Rius que le escribiera una carta en español (era políglota, ocupaba una de las cátedras mas prestigiosas de Inglaterra, sabía francés, italiano, ruso, había trabajado con Semjonow, que tenía quizás mas mérito que él, tenía

un libro con todas la teorías de las reacciones en cadena que desarrolló para la combustión pero la importancia de ese libro fue que después, cuando llegó la bomba atómica, todas las reacciones en cadena de la bomba atómica, siguen las mismas reglas que las de la combustión y claro, les dieron el premio Nobel a los dos)...

#### Le escribiste una carta en español...

Le escribí una carta y le decía lo que había hecho y que me gustaría trabajar con él... y me contestó que sí... y me fui un año allí. A los colaboradores les llamó mucho la atención que hubiera aceptado una mujer.

#### Luego volviste y ¿cómo era aquí?

Aquí horrible, cuando volví no había dinero para que montase el laboratorio y me dijeron que me fuera a casa a descansar que vendría muy cansada de Inglaterra y que ya me llamarían, llevaba un mes en casa aburrida y un día fui y me presenté, me dijeron que no había dinero y me puse a trabajar en otra cosa y ya vino el dinero... pero montar el primer aparato, como no teníamos ni llaves de vacío, no había nada (las llaves de vacío me las tenían que traer los becarios que iban fuera de España metidas en los bolsillos) y costó año y pico montar el aparato.

#### ¿Qué futuro teníais para continuar en la investigación?

Nosotros teníamos futuro pero no podíamos ofrecérselo de manera regular a la gente que venía, luego sacaban no se cuantas plazas, era muy irregular... ahora se puede conseguir razonablemente con esfuerzo...

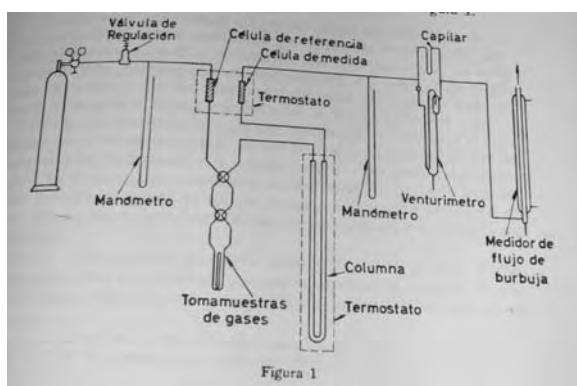
#### ¿Montásteis el primer cromatógrafo de gases?

... Montamos uno, el primero era muy malo. De hecho, el padre de la cromatografía de gases (Martín), montó el primer detector con una lata de cerveza.

*M<sup>a</sup> Josefa había señalado en su archivo de trabajos, los relacionados con cromatografía.*

Tengo señalados los trabajos mejores, los de las columnas mixtas, con los ordenadores. Esos fueron los que nos premiaron, hicimos un cromatógrafo muy chapucero, porque no teníamos medios, era poco más que la lata de cerveza.

*M.J. Molera, A. Herrera, J.A. García-Domínguez, Construcción de un cromatógrafo de gases, 1963, Anales de la Real Sociedad Española de Física y Química, LIX, 59, 687.*



## ¿Cuál ha sido tu mayor hito en las técnicas de separación?

Mi mayor contribución han sido las columnas mixtas, y pienso que ahora o los cromatógrafos tienen incluidos procedimientos con columnas con fases mezcladas o si no con lo rápidos que son, podrían mez-

clar las fases que quisieran, nosotros sólo pudimos mezclar 4. Entonces, en el 60-70, el ordenador ocupaba una casa entera que estaba enfrente del Rockefeller en lo que había sido una casa abandonada, unos armarios tremendos.

## Y cuando te jubilaste...

Cuando me jubilé decidí dejarlo todo, no sabía si ir a aprender cocina o pintar y probé a hacer cocina, es como el laboratorio, me gustaba. Pero fui a una academia de pintura y me gustó, he pintado unos 80 cuadros.

Yo es que cuando me jubilé decidí vivir otra vida, la gente que se jubila y sigue trabajando para mí están chiflados... ¿es que no han tenido bastante tiempo durante toda la vida que todavía no saben vivir sin eso?... hay gente que no, bueno, si hacen una cosa muy importante, como por ejemplo, el padre Ferrer, lo entiendo, pero gente como nosotros, normales, me parece mal...

**Elena Ibáñez**

*Instituto de Fermentaciones Industriales  
CSIC*

## HOMENAJE A LOS DRES. JOSÉ ANTONIO GARCÍA DOMÍNGUEZ Y LUIS GASCÓ

*Acto celebrado el 23 de Marzo de 2009 en el Instituto de Química-Física "Rocasolano"*



*La viuda de José Antonio García Domínguez mostrando la medalla homenaje de la SECyTA*

Un acto como éste es efectivamente un acontecimiento muy grato y merecido y tiene rasgos de admiración, de agradecimiento, y de recuerdo a copiar. Tuve la suerte de tratar profesionalmente a Luis Gascó y a José Antonio García Domínguez y os puedo asegurar que fueron dos científicos excepcionales.

Tengo que agradecer a la actual Junta Directiva de la SECyTA, y especialmente a su Presidente Joan Grimalt, que me hayáis hecho el encargo de hablar de ellos hoy. Es un honor para mí, pero también me ha suscitado algunos interrogantes que me contesto a mí misma ante vosotros. ¿Por qué os habéis acordado de mí cuando recuerdo que Luis Gascó tuvo del orden de 400 alumnos y becarios y José Antonio García Domínguez también muchos? Y he llegado a una conclusión que me ha satisfecho "seguramente ha sido porque soy un buen detector", un buen detector específico de la inteligencia, del tesón, de la generosidad para compartir la ciencia ajena y la propia, y de la amistad. Y nuestros dos amigos han poseído las más valiosas cualidades esperables en los científicos y en la gente de bien y yo las he captado.

Son dos investigadores cuyas biografías debéis conocer los jóvenes porque os pueden interesar. Decía Julio Caro Baroja que *había gente joven dispuesta a interesarse por el pasado aunque a veces nos chocan; nos choca por ejemplo su lenguaje para hablar de él y los argumentos que emplean para explicárselo y explicárnoslo; y la tabla de valores que emplean.*<sup>1</sup> Pensaba

deciros que tengo la costumbre de no repetir las cosas que ya he dicho en alguna ocasión y recomendaros encarecidamente que leyeráis mi entrevista a Gascó, que apareció en un boletín del GCTA<sup>2</sup>, y mi homenaje posterior a García Domínguez<sup>3</sup> también en nuestro boletín. Pero voy a rescatar algunos comentarios de entonces para que me sirvan de soporte a lo que quiero resaltar.

Los dos tienen rasgos comunes y observo que son características algo distintas a las que se observan en las nuevas generaciones.

Los dos han vivido en Madrid pero profundamente arraigados en sus respectivas patrias chicas: Levante la de Luis, y Asturias la de José Antonio. Y los dos han sido químicos analíticos "artesanos" que si no fueron los que diseñaron los equipos que necesitaron, los dominaron de tal modo, pieza por pieza, que probablemente los llegaron a conocer y a perfeccionar mejor que sus diseñadores.

Y los dos siguieron unas pautas profesionales paralelas que quiero poner de relieve.

Empezaré hablando del interés permanente y universal y no tenéis sino que echar una ojeada a las publicaciones de ambos para comprobar que es cierto, que abarcaron diversos campos, y sobre todo que cuando entraron en cada uno fueron pioneros a tenor de los conocimientos de la época; y sobre todo en el caso de Luis, a pesar de las restricciones que se derivaban del régimen franquista.

Seguiré con la curiosidad independiente de Gascó, para llamaros la atención de lo de independiente, porque para abordar determinados temas no gratos al régimen hacía falta valor y saber mucha química para defenderse uno mismo si fuera necesario. Los de Erandio no se acordarán de que fue él quien demostró a la policía que cuando una fábrica expulsa cloro y otra próxima amoníaco se forma cloramina y que las protestas ciudadanas por aquellos gases tóxicos no se resolvían con cargas policiales, sino cortando las emisiones. Y eso que la ETA ya había empezado a hacer de las suyas, pero la cloramina no era cosa de la ETA. Otra decisión arriesgada fue también que la Tesis Doctoral de Catalina Gascó, becaria de su padre, tratara de otra fechoría como la caída de las dos bombas de plutonio en la costa de Palomares; hecho disimulado por los políticos franquistas y sin consecuencias para la Armada Estadounidense, pero sobre el cual desarrollaron, padre e hija, una investigación de solvencia.

El tercer rasgo, igual o más valioso que los anteriores, es el de la generosidad intelectual de nuestros dos amigos. Generosidad para transmitir todo lo que sabían, y generosidad para valorar el trabajo de los demás, incluidos los becarios. Los becarios de José Antonio también fueron muchos y comentaron en su momento que no se sentían como estudiantes con tutor, sino como estudiantes adoptados. Aquí estamos muchos directores de becarios actuales o pretéritos ¿hemos recibido comentarios tan halagadores? ¿o quizá es que los becarios de hoy en día son mucho más parcos en sus comentarios?

Un cuarto rasgo común es el recurso a la estadística para depurar el significado de los datos, o para seleccionar el campo experimental más valioso de todos los campos asequibles. Es cierto que no han sido los únicos, pero contribuyeron pronto a hermanar las técnicas analíticas con la estadística. Lo que antes revelaba una gran visión y esfuerzo (sin medios informáticos o muy precarios) hoy se ha convertido casi en una rutina. Hace muy pocos días un investigador americano (John Powers), próximo a los 90 años con quien me une una buena amistad, me decía “¿Ha visto Vd. con qué facilidad los jóvenes aplican las técnicas multivariantes? ¿Cree Vd. que entienden bien lo que hacen y para qué? porque yo pienso como Bunge<sup>4</sup> que sólo con eso no se descubre la verdad aunque se descubran los errores”.

Decía Kuhn<sup>5</sup> que cuando la ciencia al uso no contesta a las cuestiones intrigantes, es cuando surge la investigación extraordinaria; que rechaza las creencias y los métodos aceptados y los sustituye por paradigmas nuevos. Y esto es una revolución más que un mero avance y consecuentemente es mucho más atractivo. Si comparamos las publicaciones de nuestros dos fundadores, con la ciencia de su momento, veremos que aportan efectivamente importantes conclusiones que no se conocían. Este comentario nos debería servir de filtro para no abusar tanto de los “Avances”, y “Nuevos Avances” como hemos hecho muchos de nosotros.

Yo tuve curiosidad por saber en sus últimos años de vida activa qué cosas les gustaría haber hecho y no lo habían conseguido. Y coincidieron ambos en resaltar que no dejaban una escuela que continuara su labor, cuando habían trabajado tanto para conseguirlo, aunque estaban seguros de dejar una escuela indirecta a través de sus muchos contactos profesionales, y de sus muchos “admiradores”, añadido yo.

Luis Gascó echaba en falta todos los medios informáticos de que disponía en la Junta de Energía Nuclear y que le permitían estar al tanto de toda la ciencia del mundo, lo cual era impensable poderlo hacer desde su casa. No estaría de más que los jóvenes



*El presidente de la SECyTA Joan Grimalt haciendo entrega de la medalla homenaje de la SECyTA a la viuda de Luis Gascó.*

de hoy que lo tenéis tan fácil, no os conforméis con consultar corre que te corre la bibliografía de los tres últimos años.

La aspiración no conseguida de José Antonio era irrealizable. Deseaba plantear una Tesis Doctoral negativa, es decir una tesis sobre una hipótesis aparentemente lógica, pero errónea, y que todo consistiera en demostrar científicamente por qué no se podía llegar a buen puerto. Él me contaba con humor que no creía que ningún aspirante a doctor se atreviera a ello.

Seguiría diciéndoos más cosas, porque a los dos los admiré como para haber captado muchas más cuestiones útiles, pero he de terminar.

Y lo hago -en el aniversario de Darwin- con una frase aparecida en el Boletín de la Institución Libre de Enseñanza<sup>6</sup> con motivo de su fallecimiento, que decía: “Darwin ha honrado con su talento creador a nuestro siglo” frase que modifiqué para decir “Luis Gascó y José Antonio García Domínguez han honrado y mucho con su talento creador, a todos los químicos analíticos españoles, especialmente a los cromatografistas y a los dedicados a las técnicas afines.

<sup>1</sup> Julio Caro Baroja “El miedo al mono...” Boletín de la Institución Libre de Enseñanza, núm. 70-71, pag. 191 (Octubre 2008)

<sup>2</sup> Boletín del GCTA, 11 (2) 80 (1990)

<sup>3</sup> SECyTA 25 (2) 86 (2004)

<sup>4</sup> Mario Bunge “La ciencia, su método y su filosofía”. Ed. Siglo Veinte, Buenos Aires, pag. 18 (1981)

<sup>5</sup> Thomas S. Kuhn “Estructura de las revoluciones científicas” Ed. Fomento de Cultura Económica, 10ª edición (1986)

<sup>6</sup> Boletín de la Institución Libre de Enseñanza, núm. 125, año VI aparecido el 30 de Abril de 1882.

**María Dolores Cabezado,**  
*Catedrática de Tecnología de los Alimentos  
de la Universidad de Castilla La Mancha (jubilada)*

## JUBILACIÓN DE LUIS IGNACIO ESTEBAN BERMÚDEZ



### *Luis Ignacio Esteban Bermúdez, se nos ha jubilado*

Luis ha dedicado toda su vida profesional, desde que acabó con brillantez su formación con la licenciatura en Ciencias Químicas en la Universidad Complutense, al mundo de la Cromatografía, inicialmente como técnica independiente y, más tarde, asociada a la Espectrometría de Masas, su otra gran pasión a la que incluso dedicó un delicioso libro, muy apreciado por sus magníficos gráficos y claridad de conceptos: “La Espectrometría de Masas en Imágenes”.

Su paso por diferentes empresas dedicadas al suministro de instrumentación científica: C.R. Marés, Konik y Thermo Fisher Scientific, le permitió también conocer y profundizar en otras técnicas analíticas, llegando a ser la persona de referencia, en estas empresas, como soporte científico/técnico y ejerciendo la labor de educador y formador de los grupos que dirigía y de sus compañeros de otros departamentos. Fue siempre una referencia. Somos muchos los que seguimos en este excitante mundo de la Cromatografía que debemos, y tenemos, que agradecer a Luis una buena parte de nuestros actuales conocimientos.

Otra habilidad, quizás no tan conocida de Luis, es su vena artística. Es un excelente e intuitivo dibujante. Siempre he pensado que podría haberse ganado muy bien la vida en el mundo del arte. Esta capacidad, complementada con sus vastos conocimientos y sus dotes de docente, le sirvieron para realizar unos deliciosos cuadernos de prácticas de laboratorio de química, en su época de Director Técnico en C.R. Marés, con los que se formaron los alumnos de los institutos de secundaria, cuando esta enseñanza dependía del Ministerio de Educación y Ciencia.

Con el paso del tiempo y el establecimiento directo de las empresas de instrumentación más importantes en España, fue contratado por Thermo, en sus principios Fisons, como responsable de su línea de Espectrometría de Masas, especializándose en el campo de las Relaciones Isotópicas, IRMS, campo en el que probablemente Luis es uno de nuestros grandes expertos. Luis ha sido el máximo responsable de la introducción en España de los equipos de Thermo para esta aplicación. El Dr. Clemente Recio de la Universidad de Salamanca dice: “Luis Esteban es, por su capacidad profesional, su talante personal y sus amplios conocimientos, el responsable directo de la excelente situación de mercado de Thermo en el campo de IRMS en España”. Esta frase tiene más valor, si cabe, dicha por un reconocido experto, que no es usuario directo de los equipos de los que Luis era responsable, en este campo. Luis ha dejado una profunda huella, tanto en sus clientes como en aquellos que no lo eran, pero reconocen su valía.

Luis no solo ha dejado esta profunda huella en sus clientes, que en muchos casos acababan siendo amigos, sino también entre los compañeros que le hemos acompañado en su andadura profesional. El mundo de la Cromatografía y de la Espectrometría de Masas espera ahora que desde su retiro, por la merecida e inevitable jubilación, retome su viejo proyecto de escribir el Volumen II de la Espectrometría de Masas en Imágenes en España que sin duda todos celebraremos.

**Bernabé Bodas**  
Thermo Fisher Scientific

## JUBILACIÓN DE JOSEP RIVERA ARANDA



### *Una vida científica dedicada a la Espectrometría de Masas*

Un Profesor, un Compañero y un Amigo. Con toda seguridad éstas son las tres palabras que resumen lo que ha significado para mí la convivencia laboral y científica con Josep Rivera. Hablar de 'Rivera' (nombre con el que comúnmente se le conoce en nuestro círculo de trabajo) es hablar de la Espectrometría de Masas y, más concretamente, es hablar de la introducción de la Espectrometría de Masas de Alta Resolución en España.

Licenciado en Ciencias Físicas por la Universidad de Barcelona en el año 1962, se traslada a París para iniciar su Tesis Doctoral, con el objetivo principal de construir un espectrómetro de masas de alta resolución. En el año 1969 obtiene el título de Doctor en Física por la Universidad de París y posteriormente, el mismo año, obtiene el título de Doctor en Física por la Universidad de Barcelona, con la defensa de la memoria que llevaba por título 'Proyecto y realización de un espectrómetro de masas a doble focalización completa de segundo orden en un punto. Aplicaciones'.

Tras su periplo en Francia, en 1970 regresa a España definitivamente y se incorpora como Colaborador Científico en el Instituto de Química Orgánica Aplicada del CSIC, en Barcelona. Su tarea principal, la creación de lo que se vino a conocer como el 'Servicio Nacional de Espectrometría de Masas'. En estos primeros estadios, Rivera contó con la colaboración inestimable del Dr. Albert Figueres, quién tras varios 'guiños' a la espectrometría de masas, viró su carrera y hoy en día ejerce como Co-Director del Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología del CSIC en Bellaterra (Barcelona).

La puesta en funcionamiento del 'Servicio' no fue una tarea sencilla, pero sin duda alguna significó un punto de inflexión importante en nuestro país en lo referente al uso de técnicas de espectroscopía de masas en muchos ámbitos de la química orgánica, y dando cobertura de un servicio, prácticamente inexistente hasta el momento, a un gran número de centros de investigación y universidades. Sin duda, la adquisición de un aparato AEI MS-9 marca un hito en las prestaciones de la Espectrometría de Masas del momento (1970).

La evolución científica de Josep Rivera durante los años 70 y 80 le llevó a centrarse en el estudio de los contaminantes orgánicos en problemáticas medioambientales, mediante la aplicación y uso de la Espectrometría de Masas. Su dominio instrumental y su visión del potencial y las prestaciones de la Espectrometría de Masas posibilitaron la consolidación de metodologías analíticas "punteras", dotadas además de una elevada fiabilidad y robustez.

En un primer momento, trabajó muy intensamente en temas relacionados con la problemática ambiental generada por la gestión de las aguas. La fructífera colaboración con Aguas de Barcelona (cabría citar en este punto el apoyo personal al proyecto del Sr. Joaquín Guardiola de Agbar) y la optimización del Espectrómetro de Masas MS-9 VG en 1983, posibilitan la realización de los primeros acoplamientos GC/MS y GC/HRMS. Para el desarrollo de este proyecto contó con la aportación incondicional de dos colaboradores que trabajaron estrechamente con él en esa temática, el Dr. Josep Caixach y el Dr. Francesc Ventura. Ambos contribuyeron de forma importante a



la consolidación del ‘Laboratori de Contaminants Orgànics en Medi Aquàtic’, hoy liderado por el Dr. Caixach. Por su parte, la trayectoria del Dr. Ventura se consolidó en la mencionada compañía de Aguas y en la actualidad ejerce como Jefe de Área de Química Orgánica en Agbar.

La colaboración con el Dr. Daniel Fraisse del ‘Centro de Espectrometría de Masas del CNRS’ en Lyon, a partir del año 1985, abrió las puertas al uso de una instrumentación que entonces no se disponía: Ionización FAB, espectrómetros tipo ZAB con posibilidad de HRMS, MS/MS, CID/MIKES y los primeros instrumentos de LC/MS. Todo ello redundó en la calidad del trabajo científico en Espectrometría de Masas aplicada al análisis de contaminantes orgánicos.

Toda esta línea se consolidó con la adquisición en el año 1991 de un instrumento de altas prestaciones, el AutoSpec Q, (triselector de doble enfoque, con geometría EBE qQ) y que, aparte de las prestaciones inherentes de las que hemos hablado, abrió las puertas al análisis por HRGC/HRMS de POPs.

Hacia finales de los 80 y principios de los 90, la trayectoria científica de Rivera da un nuevo giro y es entonces cuando se introduce en otra línea de investigación en la cual vuelve a ser un referente: las dioxinas. Ciertamente, la adquisición en un primer momento de un Espectrómetro de Masas AutoSpec Ultima (1994), un instrumento concebido para el análisis de dioxinas y furanos, y posteriormente, la construcción de un Laboratorio ‘ad hoc’ para el análisis de estos compuestos (tras la ‘Crisis de los pollos belgas’ en 1999), permiten consolidar esta línea de trabajo.

A la puesta en funcionamiento del Laboratorio de Dioxinas, le siguieron la ejecución de un gran número de proyectos de investigación relacionados con el medioambiente y la alimentación, así como la participación en Comisiones Nacionales y en Comités Internacionales. De hecho, su trabajo científico no ha flaqueado ni un instante, y uno de sus últimos retos ha sido perseguir la implementación de un sistema de calidad en el Laboratorio de Dioxinas. Como era de esperar, el objetivo se consiguió y en estos momentos el Laboratorio de Dioxinas del IDÆA del CSIC en Barcelona está acreditado por ENAC. Se acerca el final de este escrito y a bien seguro que me dejo atrás muchos detalles y nombres importantes que han marcado y compartido la trayectoria científica de Rivera, como por ejemplo el Sr. González Nicolás (en aquel momento perteneciente al MOPTMA), el Dr. de la Fuente de la Universidad de la Laguna, la Dra. Galcerán de la Facultat de Químicas de la Universitat de Barcelona o la Dra. M<sup>a</sup> José González del IQOG del CSIC en Madrid.

Por mi parte, poco más que añadir, mi andadura con Rivera en el tema de las dioxinas se inició un lunes, 9 de enero de 1995, y en estos momentos tengo la enorme responsabilidad de recoger su testigo. ¡Aunque soy consciente de lo alto que está el listón, lo cierto es que probablemente pocos podrán presumir de haber tenido un ‘Padre Científico’ como el que he tenido yo!

**Esteban Abad**  
IDÆA - CSIC

## IN MEMORIAM



*Daniel Gómez Ventero trabajó en la compañía Perkin-Elmer Hispania desde 1966 hasta su jubilación en 2000, primero como Ingeniero de Servicio durante unos 6 años, luego en el Departamento de Ventas, donde fue Jefe de la línea de cromatografía de gases para toda España. Daba apoyo al resto de los comerciales, hacía las presentaciones de producto en Seminarios y Congresos, asistía a las reuniones internacionales de PerkinElmer relacionadas, ponía en marcha aplicaciones, en fin, que era el motor de la Cromatografía de gases en la Compañía. Su inmensa paciencia - como buen cromatografista - su increíble abnegación y dedicación en el trabajo y su contagioso entusiasmo ha sido un ejemplo para todos como persona, compañero y amigo. En ambos puestos y durante tantos años, su simpatía, su buen carácter y sus muchas cualidades le granjearon una gran popularidad entre los cromatografistas que le recordamos como una de las personas más entrañables del Grupo.*

### **DANIEL GÓMEZ VENTERO, se ha ido pero su espíritu permanece**

Con gratitud a quienes me lo han pedido, fidelidad a su recuerdo y con profundo pesar os comunico que Daniel Gómez nos ha dejado.

Su trayectoria humana y profesional fue espejo de una generosa gama de valores: nobleza, esfuerzo, compromiso, sinceridad y profesionalidad, que deberían ser ejemplo de comportamiento para los que vienen y también para los que estamos.

Daniel falleció el 29 de enero de 2009, a los 68 años, de una dolencia relacionada con el amianto, partículas no ajenas a los primeros equipos de cromatografía de gases (1960-1970). Lo conocí en noviembre de 1966 en un curso de cromatografía de gases en la Universidad de Deusto. En aquel entonces había iniciado conversaciones con vistas a mi inserción profesional en Perkin Elmer, empresa muy implicada en el campo de la instrumentación analítica, y fui invitado a dar una conferencia. Cuando me percaté de la profesionalidad de Daniel mis titubeos iniciales se desvanecieron y en julio de 1967 empecé con él una historia compartida de 35 años.

Daniel nació en La Torre de Esteban Hambrán, Toledo. Hizo sus estudios de ingeniero técnico de Telecomunicación en la Escuela Politécnica de Madrid y desde los 26 a los 60 años ejerció profesionalmente en el campo de la instrumentación analítica, focalizada en cromatografía de gases. Conocía la técnica y los equipos al dedillo, solventaba todas las incidencias cromatográficas que se le presentaban, que en muchos casos no eran debidas a razones estrictamente instrumentales. Los cromatógrafos en sus primeros años eran un verdadero acontecimiento y sólo se enfrentaban a ellos los atrevidos o los que tenían una necesidad imperiosa. En los años 60 había escasos laboratorios que tuvieran un conocimiento teórico experimental de esta técnica; entre CSIC y la Universidad se podrían contar con los dedos de una mano.

Nuestro compañero contribuyó a suavizar la puesta a punto de muchos cromatógrafos y a desmitificar su uso. No en balde participó en más de 500 puestas en marcha y por sus cursos de usuarios pasaron alrededor de 400 personas. Era hombre de valores como ya he mencionado y también de actitudes e ideas. Recuerdo una anécdota que resume lo ante-

riormente dicho. En 1968, en la Universidad Complutense de Madrid, el profesor Morcillo, máxima autoridad en el campo de la Espectroscopía, compartida con el profesor Antonio Hidalgo del Instituto de Óptica Daza Valdés (CSIC) adquirió un espectrómetro de infrarrojo fabricado en Alemania, montado artesanalmente. El equipo tenía las máximas especificaciones del momento y su instalación fue un acontecimiento muy señalado. A las dos semanas, el equipo en una región del espectro, no cumplía con la resolución esperada. Al cabo de unas semanas se hizo una reunión finalísima, en la que estaban presentes el grupo del Profesor Morcillo, el Director del Departamento de IR venido de Alemania con sus ayudantes, el director de Perkin-Elmer en España y Daniel. Aunque la espectroscopía no fuera su especialidad, gozaba de una gran estima y consideración en la fábrica alemana. No se encontraba ninguna solución al problema, la actitud de Daniel era de prudencia y respeto a los especialistas pero en un momento dado se le pidió su colaboración. El instrumento (2,5 m) había sido cambiado de mesa y era posible que algún transistor se hubiese movido de su asentamiento; Daniel cogió un destornillador, ajustó el que le pareció más idóneo y en 5 segundos el problema había desaparecido. Estupor y reconocimiento general. El hecho motivó una nota que circuló por todo el mundo y una revisión de los protocolos. Los investigadores deben mirar y al mismo tiempo ver, y Daniel era de ese fuste.

Daniel fue vocal de la Junta Directiva del GCTA desde el 1988 al 1996, bajo la presidencia del profesor Emilio Gelpí. Su desaparición deja un profundo hueco, entre los que hicimos de la cromatografía nuestra profesión. Personalmente me satisface enormemente haber compartido esta historia de 35 años.

A Pili, esposa y madre ejemplar, a sus hijos M<sup>a</sup> Ángeles, licenciada en Ciencias Químicas, José Daniel, ingeniero de Telecomunicación y Francisco Javier, ingeniero Informático, desde aquí les quisiera hacer partícipes de mi afecto y el de todos los cromatografistas.

**Francesc Farré i Rius**  
Cromatografista



## CONGRESOS CELEBRADOS

### 33<sup>rd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques

Kyoto, Japón, 2-5 de Diciembre de 2008

La trigésimo tercera edición del International Symposium on High Performance Liquid Separations and Related Techniques tuvo lugar el pasado mes de diciembre entre los días 2 y 5 en Kyoto (Japón) y fue organizada por la Society for Chromatographic Sciences y respaldada por otras cinco organizaciones científicas. Como ya ocurrió en el 2001, año en que Japón albergó por primera vez el congreso, ésta era la segunda ocasión que se celebraba dicho congreso durante el 2008 (la 32<sup>a</sup> edición se celebró en Baltimore (USA) en el mes de mayo). En esta ocasión el comité organizador estuvo formado por diversos investigadores de reconocido prestigio y fue presidido por los Profesores Koji Otsuka, de la Universidad de Kyoto, y Nobuo Tanaka, del Instituto de Tecnología de Kyoto.

Como ya es habitual, esta edición del HPLC congregó a científicos del campo de la cromatografía líquida así como de otras técnicas de separación como la electroforesis, la electrocromatografía y las técnicas acopladas de más de 30 países, siendo mayoritaria la presencia de participantes de países asiáticos dada la ubicación del congreso. No obstante, la representación europea y americana fue también notable.

La inauguración oficial del congreso tuvo lugar el 2 de diciembre de 2008 por la tarde en el Funai Auditorium del campus de Katsura de la Universidad de Kyoto, con la ceremonia de apertura dirigida por el Profesor Koji Otsuka y la recepción de bienvenida esponsorizada por la empresa Shimadzu.

El programa científico estuvo compuesto por un total de 91 comunicaciones orales, que abarcaron diferentes temáticas relacionadas con las separaciones en fase líquida y técnicas afines, entre las que destacan el desarrollo de nuevas fases estacionarias y las aplicaciones del UPLC que cada vez son más habituales dejando en un segundo plano a la cromatografía de líquidos convencional. También cabe resaltar los numerosos trabajos basados en la miniaturización de sistemas de separación que se plantearon como tendencias de futuro con aplicaciones en su mayoría en el campo de la neurociencia.

La exposición de pósteres se distribuyó en 7 temáticas

diferentes con un total de 244 presentaciones, consistiendo en 41 pósteres de electroforesis capilar, electrocromatografía capilar y aplicaciones, 11 de tecnología de microchips, 16 de separaciones quirales, 54 de nuevas fases estacionarias y columnas cromatográficas, 21 de instrumentación, detección y sistemas multi-dimensionales, 81 de aplicaciones de cromatografía de líquidos y 20 de tratamiento de muestra.

La noche del miércoles tuvo lugar la sesión dedicada a los estudiantes y jóvenes investigadores. En tres sesiones paralelas y al tiempo que se servía la cena, los salones del Kyoto Royal Hotel & Spa albergaron las presentaciones orales de dichos participantes entre los cuales se encontraba la representación española. Cada una de las sesiones fue precedida por la correspondiente presentación de los patrocinadores a cargo de los cuales estaban los premios que al finalizar la sesión se otorgaron. Los premiados fueron: Koshi Imami por el trabajo "Quantitative phosphoproteome analysis using a calcined titania/C18 biphasic column and a novel stable isotope labeling approach" (sesión 1), Zeming Wu por el trabajo "Global metabolic profiling studies on severe protein-energy malnutrition in rat with rapid resolution liquid chromatography coupled to quadrupole-time of flight mass spectrometry" (sesión 2) y Noel S. Quiming por "Development of retention prediction models for adrenoceptor agonists and antagonists on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography" (sesión 3).

A lo largo del congreso pudimos asistir también a diversos seminarios ofrecidos por distintas casas comerciales (Shimadzu Corporation, GL Sciences Inc., Agilent Technologies, Merck Ltd., Shiseido Co., Sigma-Aldrich) en los que se mostraron los últimos avances instrumentales.

El congreso se desarrolló en su totalidad en el campus de Katsura de la Universidad de Kyoto situado a las afueras de la ciudad con la excepción de las sesiones para estudiantes y jóvenes investigadores mencionadas antes. Además del programa científico, un gran número de eventos sociales tales como visitas a templos y santuarios fueron organizados para los participantes del congreso con el fin de poder disfrutar de los impresionantes paisajes que ofrece Japón durante el tardío otoño. La víspera de la clausura del congreso tuvo lugar la cena de gala nuevamente en el Kyoto Royal Hotel & Spa, donde ya en un ambiente más distendido fue posible el intercambio de impresiones entre viejos y nuevos conocidos del mundo de las técnicas de separación.



El "HPLC2008 Kyoto" fue clausurado el viernes 5 de diciembre con una ceremonia en la que se entregaron los premios a los mejores pósteres a cargo de Agilent Technologies y Springer, el primer premio de los cuales recayó sobre Sara Van Overmeire por el póster titulado "Integrated micro-optical detection unit for fluorescence and absorbance measurements in capillaries for chromatographic applications". Finalmente se emplazó a los asistentes a las siguientes ediciones del congreso que tendrán lugar en Dresden (Alemania) en junio del 2009 y en Boston (USA) en el 2010.

### **33<sup>rd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques**

Kyoto, Japan, December 2-5, 2008

The thirty third edition of the International Symposium on High Performance Liquid Separations and Related Techniques took place the past month of December between the days 2 and 5 in Kyoto (Japan) and was organized by the Society for Chromatographic Sciences and backed by other five scientific organizations. As it happened in 2001 when Japan hosted for the first time the conference, this was the second occasion that the conference was celebrated during the 2008 (the 32<sup>nd</sup> edition was celebrated in Baltimore (USA) in May). In this occasion the organizing committee was composed by several scientists of renowned prestige and it was chaired by Professors Koji Otsuka, from Kyoto University, and Nobuo Tanaka, from the Technology Institute of Kyoto.

This edition of the HPLC congregated scientists of the chromatographic field as well as other separation techniques such as electrophoresis, electrochromatography and coupled techniques from more than 30 countries, being massive the presence of Asian countries attendants due to the hosting country. However, the European and American attendance were also important.

The official inauguration of the conference took place the 2<sup>nd</sup> December 2008 in the afternoon at the Funai Auditorium in the Katsura campus from Kyoto University, with the opening ceremony chaired by Professor Koji Otsuka and the welcome reception sponsored by Shimadzu Corporation.

The scientific program was composed by a total of 91 oral communications that covered different topics related to the liquid phase separation science and related techniques, among them it must be highlighted the developing of new stationary phases as well as the numerous applications of the UPLC that is quickly becoming popular put-

ting conventional chromatography aside. It is also worth pointing out all the works based on miniaturization of separation systems that were set out as future trends with applications mainly in the neuroscience field.

The poster exhibition was divided into 7 subject matters with a total of 244 presentations, consisting on 41 posters of capillary electrophoresis, electrochromatography and applications, 11 of microchip technologies, 16 of chiral separations, 54 of novel chromatographic phases and columns, 21 of instrumentation, detection and multi-dimensional operation, 81 of liquid chromatography applications and finally 20 of sample preparation.

On the Wednesday evening took place the students and young researchers' session. In three parallel sessions and while dinner was served, the Kyoto Royal Hotel & Spa halls hosted the oral communications of the participants among whom there were the Spanish representatives. Each one of the sessions was preceded by the corresponding sponsor presentation since they were in charge of the award presentation. The awarded were: Koshi Imami for the work "Quantitative phosphoproteome analysis using a calcined titania/C18 biphasic column and a novel stable isotope labeling approach" (session 1), Zeming Wu for the work "Global metabolic profiling studies on severe protein-energy malnutrition in rat with rapid resolution liquid chromatography coupled to quadrupole-time of flight mass spectrometry" (session 2) and Noel S. Quiming for "Development of retention prediction models for adrenoreceptor agonists and antagonists on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography"(session 3).

During the conference we could attend to a variety of seminars offered by different companies (Shimadzu Corporation, GL Sciences Inc., Agilent Technologies, Merck Ltd., Shiseido Co., Sigma-Aldrich) in which they showed the latest instrumental advances.

The whole conference was developed in the Katsura campus of the Kyoto University located in the outskirts of the city with the exception of the evening sessions for students and young researchers before mentioned. In addition to the scientific program, many social events such as visits to temples and shrines were organized for the participants to enjoy the breathtaking landscapes that Japan offers at the late autumn. The day before the closing took place the Banquet, again in the Kyoto Royal Hotel & Spa, where in a more relaxed environment we could exchange ideas among old and new acquaintances from the separation techniques world.

The "HPLC2008 Kyoto" was closed on Friday the 5<sup>th</sup>

with a ceremony in which the prizes to the best posters were awarded; these were sponsored by Agilent Technologies and Springer. The first prize was for Sara Van Overmeire for the poster entitled "Integrated micro-optical detection unit for fluorescence and absorbance measurements in capillaries for chromatographic applications". Finally all the attendants were invited to the following editions of the conference in Dresden (Germany) in June of 2009 and in Boston (USA) in 2010.

**Anna Martínez Villalba**

Departamento de Química Analítica,  
Facultad de Química,  
Universidad de Barcelona

**28<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs)**  
Birmingham, England, August 17-22, 2008

El simposio DIOXIN 2008 (28<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants) tuvo lugar en el "International Convention Centre" (ICC) de Birmingham del 17 al 22 de agosto. El Comité organizador estuvo presidido por el Dr. Stuart Harrad de la Universidad de Birmingham, y co-presidido por la Prof. Tanja Pless-Mulloli de la Universidad de Newcastle, el Dr. Chris Wright de Unilever.

Todos los días las sesiones comenzaron con conferencias plenarias. El primer día, lunes 18, el Dr. Kevin Jones expuso el ciclo global de los contaminantes orgánicos persistentes (COPs); el martes 19, la Dra. Linda Birnbaum, de la USEPA, trató del impacto en la salud humana de los COPs; el miércoles 20, la Dra. Miriam Diamond habló de los COPs y su gestión; el jueves 21, el Dr. Jef Focant expuso nuevas técnicas de análisis de COPs, destacando los sistema de extracción y 'clean-up' automáticos (SPME automático), de los que se obtiene un extracto listo para inyectar y resaltando las posibilidades que permite la cromatografía de gases multidimensional (GCxGC) acoplada a espectrometría de masas. La información que finalmente se obtendría sería en 4 dimensiones: además de las dos de la separación en GCxGC y la de la intensidad de la señal, la información estructural que aporta el análisis de los espectros de masas para cada punto del cromatograma. La plenaria del último día, el viernes 22, fue expuesta por la Dra. Heather Stapleton que habló sobre la debromación del BDE 209 (difencil éter decabromado) y su impacto medioambiental.

Cada día hubo cinco sesiones, donde las charlas se agruparon en distintos temas. Del mismo modo, los pósters fueron también agrupados según los mismos temas

que las sesiones, comprendiendo Analítica, Fuentes y Control de los compuestos orgánicos persistentes (COPs), Medio Ambiente, Exposición, Toxicología y, por último, Sesiones especiales: 1) COPs en ambientes cerrados: fuentes, exposición y medidas de remediación, 2) Lugares contaminados: casos y remediación, 3) COPs emergentes, 4) Xenobióticos quirales y compuestos halogenados naturales, 5) COPs: amenazas, desafíos y soluciones para países en vías de desarrollo, 6) Vietnam, 7) Estudio de exposición a dioxinas de la Universidad de Michigan, y 8) Actualización de los niveles de ingesta admisibles para dioxinas.

Entre los trabajos presentados se encuentran algunos estudios que, a nuestro parecer, destacaron por su interés o novedad. La importancia de determinados ambientes, como el interior de edificios (Dr. Chernyak) o de coches (Dra. de Wit) de reciente construcción como una fuente importante de exposición humana a elevadas concentraciones de ciertos COPs: PBDEs (difencil éteres polibromados), TBBPA (tetrabromo bisfenol A) y BDE 209; o las altas concentraciones de HBCD (Dr. Abdallah) y de dos nuevos retardantes de llama (2-ethylhexyltetrabromobenzoate (TBB) y el bis(2-ethylhexyl) tetrabromophthalate (TBPH)) (Dra. Stapleton) detectados en polvo doméstico. Destacar también el empleo de muestreadores pasivos de aire con dos filtros, uno para recoger las muestras del aire (PUF) y otro para el material particulado, empleado para el estudio de HBCD en ambientes cerrados (Dr. Abdallah) o el uso de la desorción térmica para el análisis de tetrabromobisfenol A-bis(2,3-dibromopropiléter) (TBBPA-DBPE), PBDEs y DBDPE en plásticos mediante cromatografía de gases (TD-GC-MS) (Dr. Puype).

Por otro lado, la creciente importancia y repercusión de un importante grupo de COPs emergentes, como son los compuestos perfluorados, se hizo notar tanto por la elevada presencia de trabajos realizados en este campo, dos sesiones fueron íntegramente dedicadas a ellos, como en la calidad de los mismos, reflejado en los premios otorgados. La gran problemática, aún no resuelta, que presentan estos compuestos, hace destacables los avances metodológicos de toma de muestras de aire en lugares de difícil acceso y empleando patrones marcados (Dr. Tomy), así como el análisis de dichos compuestos combinando la digestión enzimática con la extracción en fase sólida (Dr. Wang). Nos parece, además, de gran trascendencia la posibilidad analítica de identificar y cuantificar los distintos homólogos (lineales y ramificados) de estos compuestos (Jonathan Benskin).

Durante el acto de clausura se resumieron los resultados más relevantes de cada sección y el Comité de selección Internacional entregó los premios Otto Hutzinger



Student Awards a seis jóvenes investigadores. Cabe destacar que la mayoría de trabajos premiados corresponden a estudios de compuestos emergentes, y más concretamente a compuestos perfluorados. El acto de clausura terminó con la presentación del próximo simposio, DIOXIN 2009, en Pekín (China) a cargo del Dr. Guibin Jiang, que invitó a todos los participantes a asistir.

## **28<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs)**

Birmingham, England, August 17-22, 2008

The "International Convention Centre" (ICC), of Birmingham held the Dioxin 2008 (28<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants) between 17<sup>th</sup> and 22<sup>nd</sup> August. Dr. Stuart Harrad, from the University of Birmingham, was the Chairman of the Organising Committee, with Prof. Tanja Pless-Mulloi from Newcastle University and Dr. Chris Wright from Unilever, as co-chairs.

Everyday sessions began with plenary lectures. On the first day, Monday 18<sup>th</sup>, the plenary lecture was given by Dr. Kevin Jones, who exposed the persistent organic pollutants (POPs) global cycle; on Tuesday 19<sup>th</sup>, Dr. Linda Birnbaum from the USEPA talked about the impact of POPs in human health; on Wednesday 20<sup>th</sup>, Dr. Miriam Diamond talked about the POPs and their management; on Thursday 21<sup>th</sup>, Dr. Jef Focant exposed new POPs analysis techniques, focusing on the use of automatic extraction and clean-up systems (automatic SPME), which give extracts ready to inject; and standing out the multidimensional gas chromatography (GCxGC) coupled to mass spectrometry, which provide information in 4 dimensions: two obtained from the GCxGC separation, one from the peak intensity, and the fourth the structural information given by the analysis of the spectra obtained for each point of the chromatogram. The last plenary lecture, on Friday 22<sup>nd</sup>, was given by Dr. Heather Stapleton who talked about the debromination of BDE 209 (deca-bromodiphenyl ether) and its environmental impact.

There were five sessions each day. Lectures, as well as posters, were grouped by themes: Analytical, Sources, Fate and Control measures, Environment, Exposure, Toxicology and Special sessions: 1) POPs in indoor atmospheres: sources, exposures and remediation measures, 2) Contaminated sites: cases and remediation, 3) Emerging POPs, 4) Chiral xenobiotics and natural halogenated compounds, 5) POPs: threats, challenges and solutions for developing countries, 6) Vietnam, 7) University of Michigan dioxin exposure study, and 8) Updating the tolerable intake values for dioxin.

Among the studies presented at the Dioxin 2008, there are some that, in our opinion, stand out by their interest or innovation. Some environments, as the inside of new buildings or cars, act as relevant sources of exposure to PBDEs (polybromo diphenyl ethers), TBBPA (tetrabromo bisphenol A) and BDE 209 for humans: the important concentrations of HBCD (Dr. Abdallah) and two new flame retardants, the 2-ethylhexyl-tetrabromobenzoate (TBB) and the (2-ethylhexyl) tetrabromo-phthalate (TBPH) (Dr. Stapleton), found in dust samples. Noteworthy was also the use of passive air samplers with two filters, one for the air sampling (PUF) and another for particulated material, used when studying the HBCD in closed environments (Dr. Abdallah); or the use of thermal desorption for analysis of tetrabromobisphenol A-bis(2,3-dibromopropyl ether) (TBBPA-DBPE), PBDEs and DBDPE in plastics by gas chromatography (TD-GC-MS) (Dr. Puype).

It is difficult not to mention the increasing importance and repercussion of a significant group of emerging POPs, the perfluorinated compounds, and how it was reflected in the high presence of related studies, with two sessions about perfluorinated compounds; and also by their high quality. The analytical problems presented by these compounds, still not solved, make in our opinion relevant the methodological improvements in air sampling at places with difficult access using labelled standards (Dr. Tomy), as well as their analysis combining enzymatic digestion and solid phase extraction (Dr. Wang). In our opinion was also of importance the analytical possibility to identify and quantify their different homologues (lineal and branched) (Jonathan Benskin).

During the closing ceremony, the most relevant results of each session were summarized, and the Otto Hutzinger Student Awards were given by the International Advisory Board to six young researchers. It is worth pointing out that most prize-winning works were studies concerning emerging compounds, and more specifically the perfluorinated compounds. The closing ceremony finished with a presentation to the next symposium, DIOXIN 2009, to be held in Beijing (China), presented by the chairman Dr. Guibin Jiang, inviting the assistance of the audience.

**Mónica Sáez Ribas**

*Departamento de Análisis Instrumental  
y Química Ambiental,*

*Instituto de Química Orgánica General (CSIC)*

**Sara María Losada Ribas**

*Departamento de Química Analítica,  
Universidad de Barcelona*

## CALENDARIO DE ACTIVIDADES

## PATROCINADOS POR LA SECyTA

**15º Simposio Latinoamericano sobre Biotecnología, Aplicaciones Biomédicas, Biofarmacéuticas e Industriales de la Electroforesis Capilar y Tecnología Microchip.**

2-6 octubre de 2009. Sevilla, España.

## Contacto

Dr. Javier Rupérez.  
Univ. San Pablo-CEU.  
ruperez@ceu.es

**IX Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines.**

28-30 octubre 2009. San Sebastián-Donostia, Guipúzcoa (España)

## Contacto:

## Secretaría Técnica:

Virginia San Nacienceno Fernández  
Facultad de Química. Universidad del País Vasco.  
Apartado 1072. 20080 - Donostia-San Sebastián.  
Tel. 943018214  
Fax 943015270  
vsannaciance001@ikasle.ehu.es  
<http://www.idaea.csic.es/secyta2009>

## NO PATROCINADOS POR LA SECyTA

**9th Workshop on (Bio)sensors and Bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis**

14 - 17 junio. 2009. Montreal, Canadá.

## Contacto:

Kevin Wilkinson  
kj.wilkinson@umontreal.ca

Jean-Francois Masson  
jf.masson@umontreal.ca

Dept. of Chemistry, Université de Montréal  
bbmec\_2009@umontreal.ca  
[http://www.chimie.umontreal.ca/bbmec\\_2009/index-en.html](http://www.chimie.umontreal.ca/bbmec_2009/index-en.html)

**HPLC 2009: 34<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques.**

28 junio - 2 julio. 2009. Dresde, Alemania.

## Contacto:

Prof. Dr. Christian Huber  
Paris-Lodron University Salzburg  
Department of Moleculare Biology  
Hellbrunnerstraße 34  
5020 Salzburg, Austria  
christian.huber3@sbg.ac.at

## Secretariat:

Christiane Doerr  
Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.  
(German Chemical Society, GDCh)  
P. O. Box 90 04 40  
60444 Frankfurt am Main, Germany  
tg@gdch.de  
<http://www.hplc2009.com/>

**Separation Science Singapore.**

26-28 agosto 2009. Biopolis Science Parl, Singapur.

## Contacto:

Peter Myers, Chairman.  
David Hills, Secretary  
dhills@eclipsebm.com  
<http://www.sepscience.com/Reports.aspx>

**Euroanalysis 2009.**

6 - 10 septiembre. 2009 Innsbruck, Austria.

## Contacto:

Chairs  
Wolfgang Buchberger (Linz) and Wolfgang Lindner (Vienna)  
Euroanalysis 2009 Symposium Office  
PCO Tyrol Congress, c/o Ina Kaehler  
Rennweg 3,  
6020 Innsbruck, Austria  
T:+43-512-575600  
F:+43-512-575607  
euroanalysis09@come-innsbruck.at  
<http://www.euroanalysis2009.at/>





**The 8<sup>th</sup> Latinamerican Congress on Environmental Analytical and Sanitary Chemistry**

16 - 20 septiembre. 2009. San José, Costa Rica.

Contacto:

Symposium Chair  
Dr. Rigoberto Blanco  
Director, CELEQ, Ciudad de la Investigación,  
San Pedro 2060, Costa Rica.

Co-Chair

Lic. Olga Marta Rodríguez  
President, RACAL  
P.O. Box 1510-2100 Guadalupe,  
San José, Costa Rica.  
8simposio.racal@gmail.com  
[http://www.iaec.ch/iaec\\_meetings/latinamerican\\_cong.html](http://www.iaec.ch/iaec_meetings/latinamerican_cong.html)

**IV RSEEM: IV Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas.**

30 septiembre - 2 de octubre de 2009. Castellón, España.

Contacto:

Secretaría Técnica  
Juan V. Sancho Llopis  
Avda. Sos Baynat s/n, 12071 Castellón  
Tel. +34 96 438 73 66 fax +34 96 438 73 68  
4rseem@uji.es  
<http://www.4rseem.uji.es/index.html>

**PBA 2009: 21<sup>st</sup> International Symposium on Pharmaceutical & Biomedical Analysis**

11 - 14 octubre 2009 Hilton Walt Disney, Orlando, FL, USA.

Contacto:

Amy Hill  
Secretaria de la reunión  
PBA 2009 USA Conference Secretariat  
tel: +44 1865 843051  
fax: +44 1865 843958  
a.hill@elsevier.com  
<http://www.pba2009usa.com/>

**RAFA 2009: 4<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Food Analysis.**

4 - 6 noviembre. 2009. Praga, República Checa.

Contacto:

Prof. Dr. Jana Hajšlová (ICT Prague), Co-Chairwoman  
Prof. Dr. Michel Nielen (RIKILT, Wageningen),  
Co-Chairman  
Food\_Analysis\_2009@vscht.cz  
<http://www.rafa2009.eu/Default.aspx>

## NOTA DE LA REDACCIÓN



*A partir de este número, el Boletín aumentará su plantilla en el Comité Editorial. Damos la bienvenida a José Ángel Gómez Ruiz, socio de la SECyTA y perteneciente al Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) de Madrid.*





# INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA

## ARTÍCULOS DE INTERÉS

*El uso de la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) ha ido en aumento en los últimos años. El principio de separación es similar a una cromatografía en fase normal, pero con eluyentes similares a los usados en fase inversa (RP), tales como acetonitrilo, metanol, agua o ciertas soluciones tampón. El principal mecanismo de separación se basa en la existencia de una capa acuosa entre la fase móvil y la estacionaria, creándose a su vez una partición del soluto entre el eluyente orgánico y dicha capa acuosa, que depende de la polaridad del mismo. Sin embargo, existen diferentes fases estacionarias, en las que aunque se cumple con este principio de separación, pueden tener lugar otros mecanismos de retención y selectividad.*

*HILIC puede acoplarse a espectrometría de masas debido a su compatibilidad con los solventes orgánicos y acuosos, utilizados para la inyección y elución de las muestras, siendo este tipo de cromatografía una técnica de gran poder para la identificación de compuestos polares como: carbohidratos de bajo peso molecular, (glico) péptidos, aminoácidos, nucleótidos, drogas de interés farmacéutico, etc. A continuación se comentan dos artículos de investigación y una revisión, donde utilizan HILIC como técnica de purificación y/o de análisis.*

### **Simple separation of isomeric sialylated N-glycopeptides by a zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography.**

*Y. Takegawa, K. Deguchi, H. Ito, T. Keira, H. Nakagawa & S.I. Nishimura.*

*Journal of Separation Science, 29 (2006) 2533-2540*

En este trabajo se abordó la separación de N-sialoglicopéptidos obtenidos por hidrólisis tróptica de -1-glicoproteína ácida, usando una columna de HILIC tipo zwitteriónica con grupos sulfobetaína (ZIC®-HILIC), acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica con fuente de ionización por electrospray. Esta columna mostró poseer selectividad para dos grandes grupos de péptidos, los no glicosilados y los glicosilados con N-glicanos sialilados. Además, fue posible separar glicopéptidos con estructuras isoméricas en función del tipo de enlace del ácido siálico (2-3 ó 2-6). La diferencia de tiempos de retención entre N-glicopéptidos con longitud de cadena peptídica similar, es difícil de explicar, aunque los autores recomiendan tener en cuenta no solo la hidrofobicidad

del péptido, sino también la estructura del glicano y sus cambios conformacionales en la fase móvil y estacionaria. Además, los O-glicopéptidos eluyeron antes que los N-glicopéptidos, aunque la diferencia de retención entre estos dos tipos de glicopéptidos no es discutida.

Por otro lado, los N-glicanos neutros y sialilados (disialilados y trisialilados triantenarios), liberados de la cadena peptídica y derivatizados con 2-aminopiridina fueron separados usando un gradiente conteniendo acetato de amonio. En el estudio se utilizaron dos concentraciones de dicha sal, 20 y 5 mM, con cambios drásticos en los tiempos de retención de los di- y trisialilados N-glicanos. De este modo, la retención de estos carbohidratos en la columna aumentó con la concentración de acetato de amonio, indicando que la interacción entre los grupos funcionales de la fase estacionaria (sulfobetaína) y los N-glicanos sialilados, se debe, no solo a la partición entre la fase móvil y estacionaria, sino también a fenómenos electroestáticos. De igual forma, los N-glicanos neutros también presentaron una mayor retención cuando la concentración de acetato de amonio aumentó, aunque en menor medida que la experimentada por los N-glicanos sialilados. Este hecho podría explicarse por el aumento de la capa acuosa formada en la superficie de la fase estacionaria, permitiendo un aumento de la interacción hidrofílica entre estos glicanos y la fase acuosa.

### **Development and validation of a high-throughput zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of the anti-influenza drug peramivir in plasma**

*N. Lindegardh, W. Hanpithakpong, A. Phakdeeraj, P. Singhasivanon, J. Farrar, T.T. Hien, N.J. White & N.P.J. Day.*

*Journal of Chromatography A, 1215 (2008) 145-151*

En este trabajo se describe un método de extracción en fase sólida (SPE) usando cromatografía de interacción hidrofílica zwitteriónica (ZIC®-HILIC) para el análisis cuantitativo robusto, selectivo y sensible de Peramivir (droga anti-influenza) en plasma. El procedimiento analítico se basa en el uso de soluciones de Peramivir de concentración conocida, usando dos



métodos, uno con baja carga de la droga (0,952 – 500 ng/mL) y otro con alta carga (48,8 – 50000 ng/mL), mezcladas a su vez con plasma, para luego promover la precipitación de proteínas, con el uso de una solución de porcentaje variable de acetonitrilo (ACN) y acetato de amonio 10 mM, pH 3,5. A continuación, dicho sobrenadante se añade a microplacas de ZIC®-HILIC SPE debidamente activadas y la elución de los compuestos retenidos, se lleva a cabo con una solución de metanol y ácido fórmico. Los mejores resultados en cuanto a capacidad de carga y recuperación del Peramivir se obtuvieron con una concentración final de 85% de ACN. Con este procedimiento, los dos métodos ideados de alta y baja carga de Peramivir fueron probados, encontrando una recuperación de 95% y 85-90%, respectivamente.

Finalmente, dada la ortogonalidad entre ZIC®-HILIC SPE y la cromatografía líquida en fase inversa (RPLC), los eluatos fueron inyectados en LC-MS/MS, usando una columna C18 para su análisis cuantitativo. Con el fin de eliminar interferencias con otros compuestos, la elución del Peramivir retenido en el ZIC®-HILIC SPE fue optimizada, usando metanol como eluyente. El uso de una solución de metanol-ácido fórmico 0,1% (20:80 v/v) fue adecuada para eluir sólo el Peramivir y los fosfolípidos no lipofílicos, evitando la elución de los lipofílicos, así como para disminuir el tiempo de análisis total (2,5 min) en RPLC. Por último, los autores validaron el método, determinando que el límite de detección del Peramivir en plasma fue de 0,238 ng/mL.

### **Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics.**

*Paul J. Boersema, Shabaz Mohammed & Albert J. R. Heck.*

*Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391 (2008) 151-159.*

Este trabajo de revisión se centra en las aplicaciones de HILIC en proteómica, con especial énfasis en el potencial de dicha técnica en la separación de péptidos usando sistemas multidimensionales. Según estos autores, la diferencia de solventes entre RP y HILIC, hace realmente difícil un acoplamiento *online* de ambas técnicas pero no en modo *offline*. Se ha demostrado que HILIC es más ortogonal con RP, que la cromatografía de intercambio catiónica (SCX). La ortogonalidad entre ambas técnicas (HILIC y RP) puede variar dependiendo del pH de las soluciones tampón

empleadas, observándose una mayor ortogonalidad a pH 3 que a pH 6,8 y 8. Si bien la mayoría de los trabajos de separación de péptidos usando 2D LC-MS, se han basado en el uso de RP y HILIC, otras combinaciones pueden llevarse a cabo, como por ejemplo, SCX y HILIC. Sin embargo, la alta concentración de solventes orgánicos presentes en los eluyentes de RP y HILIC, supone una ventaja para el uso de MS, incrementando la sensibilidad si se usa ESI-MS.

Actualmente, en el mercado existen una amplia variedad de fases estacionarias, hechas especialmente para cumplir las especificaciones físico-químicas de HILIC. Las más populares son: i) sílica no derivatizada con grupos funcionales como siloxanos y silanoles, que en algunos casos puede contener trazas de metales; y ii) sílica derivatizada, tales como: intercambiadores catiónicos (polisulfoetil A o Polycat A), aniónicos (PolyWAX, TSK gel Amida-80) o zwitteriónica (ZIC®-HILIC). Si bien el principio de separación es similar, otras interacciones físicas varían entre una fase y otra, lo que indica que la optimización del método de elución debe realizarse para cada una de dichas fases. Para ello, el solvente orgánico más utilizado es el acetonitrilo, aunque también se han realizado pruebas con eluyentes con un mayor poder de elución en HILIC como el metanol o isopropanol.

El empleo de HILIC supone una interesante alternativa para el estudio de péptidos con modificaciones post-traduccionales. De este modo, la fase estacionaria TSK gel Amida-80, permite la separación entre fosfopéptidos y péptidos sin fosforilar. Este enriquecimiento de fosfopéptidos fue también observado para las fases PHEA y PolyWAX, aunque no para las ZIC®-HILIC, debido probablemente a la naturaleza zwitteriónica de esta fase. Otra modificación post-traducciona, de alto interés por su frecuencia e importancia biológica es la glicosilación. La heterogeneidad de los glicopéptidos, normalmente, es muy alta, dificultando su identificación. Otro problema añadido es la baja cantidad de glicopéptidos que pueden presentar algunas muestras, siendo HILIC una alternativa para el enriquecimiento de glicopéptidos. De este modo, se han empleado microcartuchos de ZIC®-HILIC para el enriquecimiento de glicopéptidos y posterior análisis tanto por MALDI como por LC-ESI-MS. Además, algunos estudios de sialoglicopéptidos se han llevado a cabo realizando una separación previa en RP, para luego ser separados en HILIC, debido a la ortogonalidad existente entre ambas técnicas.

Por otro lado, péptidos N-acetilados pueden ser enriquecidos con ZIC®-HILIC, por su baja capacidad de retención en dicha fase estacionaria, separándolos de los péptidos más hidrofílicos. De igual forma, este mismo comportamiento se observó en los péptidos que presentan ácido piroglutámico en el extremo amino-terminal, que eluyeron en las primeras fracciones de ZIC®-HILIC. Las histonas, son otro grupo de proteínas, con modificaciones post-transcripcionales de alta importancia. Estas proteínas, han sido estudiadas a nivel peptídico, generalmente combinando RP y HILIC para su caracterización estructural, usando como detección MS. También, se ha procedido a la separación bidimensional mediante RP y HILIC de histonas intactas, siendo el grado de acetilación determinante para su separación por HILIC. Sin embargo, dada la complejidad de la muestra, es necesario realizar una serie de pasos adicionales de separación, para obtener fracciones de histonas con las modificaciones más importantes.

Finalmente, los autores concluyen que el aumento de las aplicaciones de HILIC en proteómica y peptidómica producido en los últimos años es debido, principalmente, a la disponibilidad y versatilidad de las fases estacionarias actuales, así como a su ortogonalidad con RP. Además, auguran tanto un importante aumento del uso de esta cromatografía en los años venideros como la aparición de nuevas fases estacionarias y aplicaciones.

**Oswaldo Hernández**

*Departamento de Análisis Instrumental  
y Química Ambiental  
Instituto de Química Orgánica General, CSIC*

*Debido a los ataques que el mundo occidental está sufriendo por parte de terroristas existe una necesidad urgente de poder detectar explosivos escondidos en personas, paquetes, equipajes o vehículos y así poder asegurar la seguridad de los ciudadanos a nivel mundial.*

*Desde los atentados del 11 de septiembre de 2001 en Estados Unidos, del 11 de marzo de 2004 en España y de julio de 2005 en Inglaterra, la necesidad de desarrollar métodos de detección e identificación de explosivos tanto a nivel de traza como a distancia, es urgente. La demanda de métodos de monitorización rápidos y fiables está aumentando, a medida que la amenaza terrorista se hace cada vez más importante.*

*La nueva forma de actuación de los terroristas, a la hora de utilizar explosivos es la doctrina de “fácil fabricación, fácil obtención de las sustancias de partida”. Por esta razón, dos explosivos utilizados recientemente por los terroristas son el TATP (triperóxido de triacetona) y HMTD (triperóxido de hexametildiamina), ambos pertenecientes a la familia de los peróxidos. Las propiedades físicas y químicas de estas sustancias, impiden su utilización en ingeniería civil o en el campo militar. Sin embargo, los terroristas sí los utilizan ya que tienen un elevado poder explosivo y se sintetizan fácilmente a partir de productos comerciales fáciles de obtener.*

*A continuación se comentan 3 revisiones sobre el análisis de explosivos. El primero describe un método para la detección de los explosivos de la familia de los peróxidos, el segundo trata sobre la detección electroquímica de explosivos y el tercero describe las nuevas tendencias en la tecnología “lab-on-a-chip” aplicada a este tipo de compuestos.*

**“Recent method for the determination of peroxide-based explosives”, por Rasmus Schulte-Ladbeck, Martin Vogel and Uwe Karst. Anal Bioanal Chem (2006) 386: 559–565.**

En este artículo, se revisan los métodos de análisis más recientes para detectar explosivos de tipo peróxido, el triperóxido de triacetona (TATP) y el triperóxido de hexametildiamina (HMTD) en distintos tipos de matrices.

Se describen los antecedentes en este campo y se discuten los nuevos métodos analíticos desarrollados, ya sean métodos espectroscópicos o métodos de espectrometría de masas al igual que técnicas cromatográficas de separación con detectores selectivos.

El HMTD fue sintetizado por primera vez por Legler en 1991; la estructura fue propuesta por Bayer y Villiger y determinada por difracción de rayos X.

El TATP, fue sintetizado por primera vez por Wolffenstein en 1895; la estructura propuesta por él mismo fue más tarde confirmada por Groth. En muestras de TATP, se observa su dímero y su tetramero. Investigaciones recientes han demostrado que el TATP está formado por 2 conformeros separables a temperatura ambiente.

Las propiedades físicas y químicas de estas sustancias



hacen que no tengan aplicación en ingeniería civil o militar ya que son muy inestables. Sin embargo, al ser fáciles de sintetizar, sus precursores fáciles de obtener y su elevado poder explosivo les convierten en explosivos muy utilizados por los terroristas.

Como estos compuestos no tienen grupos nitro o grupos funcionales aromáticos, no pueden ser detectados por los métodos convencionales de detección de explosivos.

En la década de los 80, las técnicas descritas en bibliografía para detectar el TATP, han sido la espectroscopia IR, la espectroscopia UV-vis, la espectrometría de masas (EI, CI) y RMN.

Algunas agencias estatales utilizan Raman e IR-ATR. Sin embargo, la sensibilidad de estos métodos no es buena si no hay preparación de muestra previa al análisis.

La espectrometría de movilidad iónica (IMS) es una herramienta analítica muy versátil para la detección *in-situ* de vapores de explosivos debido a su fácil manejo, la robustez de la técnica, su elevada sensibilidad y rapidez del análisis.

El HMTD es muy difícil de detectar mediante esta técnica debido a su baja presión de vapor, en cambio el TATP y sus productos de degradación como el peróxido de hidrógeno y la acetona se separan fácilmente. Actualmente existe un método *in-situ* para analizar ambos compuestos presentes en muestras de tipo pulverulento, aunque no es posible diferenciar entre ambos.

A modo de conclusión, cabe reseñar que los explosivos de la familia de los peróxidos son un reto para la química analítica y forense. Ambos compuestos son extremadamente sensibles al choque, fricción e impacto, por lo que es necesario desarrollar métodos de análisis en los que no sea necesario el contacto directo con este tipo de explosivos.

**Electrochemical Sensing of Explosives** por Joseph Wang. *Electroanalysis* 19, 2007, No. 4, 415 – 423

Este artículo revisa los avances más recientes en la detección de explosivos mediante métodos electroquímicos. Se hace especial hincapié en la detección de campo, “*on-site*”. Este tipo de detección debe ser rápi-

da, sensible, reproducible y fácil. Además, necesita poder acoplar la técnica de detección con instrumentación miniaturizada de bajo coste.

Las ventajas de utilizar la detección electroquímica para este tipo de sustancias son entre otras, su elevada sensibilidad y selectividad, velocidad, amplio intervalo de respuesta lineal, compatibilidad con los equipos miniaturizados, mínimo espacio requerido y bajo coste de los equipos.

La electroactividad inherente de los compuestos explosivos que contienen grupos nitroaromáticos, nitroaminas y nitroésteres les convierte en candidatos ideales para la detección electroquímica. Actualmente, se están desarrollando sensores desechables, sensores remotos sumergibles y detectores electroquímicos en la tecnología “lab-on-a-chip” para la detección electroquímica *in-situ* de sustancias explosivas.

En los sensores voltamperométricos, se hace un barrido del potencial del electrodo de trabajo en función de la reacción de transferencia de electrones, normalmente una reducción, para el explosivo objeto de estudio, midiéndose la corriente resultante.

El grupo nitro es un excelente aceptor de electrones. En función de las condiciones de reacción, la reducción puede darse en dos o tres pasos para formar una amina o un grupo nitroso via hidroxilamina.

La detección de explosivos de la familia de los peróxidos mediante métodos electroquímicos es bastante compleja, ya que este tipo de compuestos químicos no tienen grupos nitro, no tienen fluorescencia y muestran una absorción en UV mínima. Estos explosivos pueden detectarse amperométricamente siguiendo su conversión fotoquímica a peróxido de hidrógeno electroactivo.

La mejora en las técnicas de microfabricación ha permitido sustituir las celdas electroquímicas convencionales por unas tiras de sensores, sobre las que se coloca una gota de la muestra para su estudio electroquímico. Se están desarrollando electrodos en serie colocados sobre dichas tiras de tal forma que puedan convertirse en “narices electrónicas”, para la detección en fase gaseosa de este tipo de compuestos.

Se puede realizar una monitorización de explosivos en continuo. Esta posibilidad es muy ventajosa ya que

se obtiene información analítica en tiempos muy cortos, se reducen los costes de los análisis, se pueden caracterizar zonas contaminadas y se minimizan los errores asociados con el proceso de toma de muestra. Se han desarrollado equipos para análisis de explosivos *on-line* y sensores desechables y sumergibles para el seguimiento de estos compuestos por control remoto.

El desarrollo de la detección electroquímica de explosivos mediante tecnologías de microchips permite realizar el pretratamiento de la muestra, reacciones de derivatización, separaciones y detecciones electroforéticas en un único microchip. A esta tecnología se la conoce como “lab-on-a-chip” ya que combina todos estos procesos en un mismo soporte.

**Trends in analysis of explosives by microchip electrophoresis and conventional CE** by Martin Pumera. *Electrophoresis* 2008, 29, 269–273.

En esta revisión se evalúan tanto métodos de análisis basados en la electroforesis en microchip y electroforesis capilar (CE) convencional para la detección rápida e *in-situ* de explosivos como la creación de un laboratorio móvil electroforético y la aplicación de la instrumentación “lab-on-a-chip” portátil para su identificación remota.

Se describe un método de separación de explosivos nitroaromáticos mediante electroforesis en microchip en el que la selectividad de la separación se ve mejorada por la presencia en el tampón de una solución coloidal de alta hidratación molecular de partículas de sílice orgánicamente modificadas (coloide silica sol).

Wang y colaboradores han desarrollado una interfase para la monitorización en continuo de explosivos en soluciones acuosas con chips fabricados a escala micro basados en CE. El sistema de detección es amperométrico.

Mientras que el número y tamaño de muestras procedentes de una zona donde ha habido una explosión suele ser elevado, en el análisis de muestras previo a que ocurra una explosión, la cantidad de muestra disponible es mínima, de ahí la necesidad de desarrollar métodos altamente sensibles con límites de detección muy bajos.

Se han descrito métodos de análisis por CE-MS con límites de detección del orden de ppb. Este acopla-

miento se ha utilizado para la detección de explosivos nitroaromáticos presentes en muestras reales procedentes de sedimentos marinos.

Para el análisis de explosivos inorgánicos se están desarrollando métodos de seguimiento de los iones característicos de estos compuestos presentes en las muestras basados en CE.

En cambio no se ha descrito hasta la fecha ningún método de detección de explosivos tipo peróxido basados en la tecnología CE y/o lab-on-a-chip.

*Durante los últimos años, se distinguen dos tendencias fundamentales en las técnicas electroforéticas. Por una parte hay un importante movimiento desde la electroforesis convencional hacia los sistemas microfluídicos, base del desarrollo de los detectores portátiles. Sin embargo, debe mencionarse que para una identificación inequívoca, el laboratorio móvil forense sigue utilizando métodos electroforéticos convencionales, aunque la mayoría de los investigadores prefieran desarrollar sistemas lab-on-chip.*

*Debido a las amenazas que suponen los atentados con coches bomba, trampas explosivas (minas anti-persona) o suicidas con explosivos escondidos bajo su ropa, existe una necesidad urgente de disponer de detectores de explosivos in-situ (portátiles) y a distancia (“stand-off”) que permitan detectarlos a una prudente distancia de seguridad y así evitar el mayor número de bajas posibles.*

*Los esfuerzos de los gobiernos y de las industrias tienden a mejorar la tecnología existente, aunque hasta la fecha, ninguno de los métodos de análisis in situ investigados cumplen simultáneamente las características de rapidez de análisis, sensibilidad y selectividad. Así por ejemplo, la tecnología IMS (Ion Mobility Spectrometry) permite separar y detectar explosivos a temperatura ambiente y presión atmosférica, aunque el principal problema de esta técnica es su elevado límite de detección junto con el alto número de falsos positivos y tiempo de respuesta, por lo que solamente puede utilizarse como método de alarma.*

*Se espera un gran avance en el desarrollo de la tecnología para el análisis in-situ de muestras sospechosas de contener este tipo de compuestos, incluidos los explosivos de la familia de los peróxidos.*

**Esther Gómez Caballero**

LAVEMA (Laboratorio Verificación Marañoso)  
ITM - Ministerio de Defensa



# EMPRESAS colaboradoras

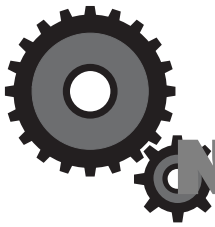
## PROTECTORAS

- **AGILENT TECHNOLOGIES SPAIN, S.L.**  
Ctra. A-6, km 18,200  
28230 LAS ROZAS (Madrid)
- **KONIXBERT HI-TECH S.A.**  
Avda. Cerdanyola, 73  
08190 SANT CUGAT DEL VALLÉS (Barcelona)
- **PERKIN ELMER ESPAÑA, S.L.**  
Avda. de los Encuartes, 19  
28760 TRES CANTOS (Madrid)
- **SIGMA-ALDRICH QUÍMICA, S.A.**  
Ronda de Poniente, 3; 2ª Planta  
28760 TRES CANTOS (Madrid)
- **THERMO FISHER SCIENTIFIC**  
Valportillo I, 22; 1ª Planta  
28108 ALCOBENDAS (Madrid)
- **WATERS CROMATOGRAFÍA, S.A.**  
Ronda Can Fatjo, 7-A  
Parc Tecnologic del Vallés  
08290 CERDANYOLA DEL VALLES (Barcelona)

## ASOCIADAS

- **BRUKER ESPAÑOLA, S.A.**  
Marie Curie, 5, Edificio Alfa - Pta. Baja  
Parque Empresarial Rivas Futura  
28529 RIVAS-VACIAMADRID (Madrid)
- **GILSON INTERNATIONAL B.V.**  
Avda. de Castilla, 1 (N II Km 17)  
Polígono Empresarial San Fernando  
28830 SAN FERNANDO DE HENARES (Madrid)
- **GOMENSORO, S.A.**  
Aguacate, 15  
28044 MADRID
- **INGENIERÍA ANALÍTICA, S.L.**  
Aveda. Cerdanyola, 73, ° Izq  
08172 SANT CUGAT DEL VALLÉS (Barcelona)
- **IZASA, S.A.**  
Aragoneses, 13  
Polígono Industrial Alcobendas  
28100 ALCOBENDAS (Madrid)
- **MILLIPORE IBÉRICA, S.A.**  
Avda. de Burgos, 33  
28050 MADRID
- **SCHARLAB, S.L.**  
Gato Pérez, 33  
Polígono Industrial Mas D'en Cisa  
08181 SENTMENAT (Barcelona)
- Servicio y Mantenimiento de Técnicas Analíticas, S.A.L. (SYMTA, S.A.L.)  
San Máximo, 31  
28041 MADRID
- S.I.A. Enginyers, S.A.  
Monturiol, 16, baixos  
08018 BARCELONA
- **SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CARBUROS METÁLICOS**  
Plaza de Cronos, 5  
28037 MADRID
- **SUGELABOR**  
Sicilia, 36  
28038 MADRID
- **TEKNOKROMA**  
Camí de Can Calders, 14  
08190 SANT CUGAT DEL VALLÉS (Barcelona)
- **VARIAN-IBÉRICA, S.L.**  
Avda. Pedro Díez, 25, 3º  
28019 MADRID
- **VERTEX TECHNICS, S.L.**  
Comercio, 12-14 bajos  
08902 HOSPITALET DE LLOBREGAT (Barcelona)
- **VWR INTERNATIONAL - EUROLAB, S.L.**  
Ronda Can Fatjo, 11 - Edificio Tecnopark, 3  
Parc Tecnològic del Vallés  
08290 CERDANYOLA DEL VALLÉS (Barcelona)





# NOVEDADES TÉCNICAS

## SIGMA-ALDRICH®

**SUPELCO INTRODUCE NUEVAS FASES ESTACIONARIAS PARA CG BASADAS EN LÍQUIDOS IÓNICOS.**

¿Se imagina disponer de una columna capilar con fase altamente polar (más polar que SupelcoWax y ciano) que trabaja a alta temperatura, no sangra y puede conectar a su detector MS? Supelco lanza la primera columna capilar que usa la tecnología de líquidos iónicos como fase estacionaria con resultados realmente sorprendentes.

La nueva columna SLB-IL100 (polaridad equivalente a la mayor polaridad en CG, TCEP) puede trabajar a temperaturas desde sub-ambiente hasta 230 °C (240 °C en gradientes) sin sangrado y válidas para MSD. Pruebe la sorprendente selectividad que aportan las columnas SLB-IL100 a sus análisis. Disponemos de un gran número de aplicaciones que podemos enviárselas. Información más amplia de estas nuevas columnas en:

Tel. 91 657 20 65

pedro.gutierrez@sial.com

www.sigma-aldrich.com/analytical

**Supel™-Select HLB.**

**PREPARACIÓN DE MUESTRAS A UN PRECIO INVENCIBLE.**

Supel™-Select HLB SPE es un polímero de estireno modificado para darle hidrofobicidad, desarrollado por Supelco para la extracción en fase sólida de un amplio rango de compuestos desde muestras acuosas. El mecanismo de retención es predominantemente el de las interacciones dadas en fase reversa. Sin embargo, como la fase se modifica hidrofílicamente, es también selectiva para compuestos polares:

**Química de la fase:** Estireno modificado hidrofílicamente

**Compatibilidad a pH:** 0-14

**Tamaño partícula:** 55-60 µm

**Válido para MS:** Sí

**Área superficial:** 400-410 m<sup>2</sup>/g

**Volumen de poro:** 0.88 mL/g

**Tamaño de poro:** 87 Å



Se puede obtener una completa información en:

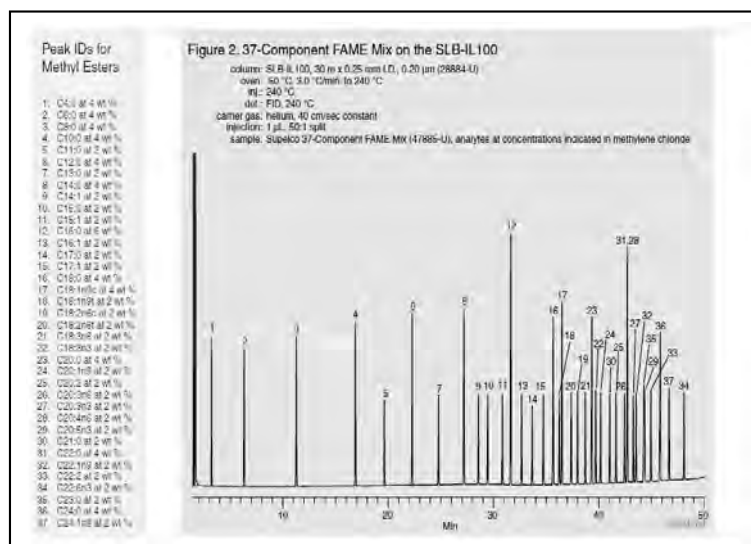
[www.sigma-aldrich.com/supel-select](http://www.sigma-aldrich.com/supel-select)

O contactando con nuestro servicio técnico.

Tel. 900 10 13 76

Fax: 900 10 20 28

serviciotecnico@sial.com





# Thermo SCIENTIFIC

**THERMO FISHER SCIENTIFIC LANZA LA PRÓXIMA GENERACIÓN DE ESPECTRÓMETROS DE MASAS DE TRAMPA DE IONES EN LA ASMS 2009: EL LTQ VELOS™ Y EL LTQ ORBITRAP VELOS™.**

Thermo Fisher Scientific, el líder mundial al servicio de la ciencia, ha lanzado dos nuevos Espectrómetros de Masas en la AMS 2009, los Thermo Scientific LTQ Velos™ y LTQ Orbitrap Velos™.

El LTQ Velos™ cuenta con una nueva trampa de doble presión y óptica de iones avanzada que lo convierten en el espectrómetro de masas de trampa de iones más rápido y sensible. La tecnología única de trampa de doble presión cuenta con dos regiones diferenciadas para la disociación, la manipulación y la detección de iones. Esto permite el uso óptimo de la presión durante el análisis, aumentando la velocidad de barrido y la resolución.

El LTQ Orbitrap Velos™ combina el analizador de masas líder, Orbitrap™, con una nueva celda de colisión de alta energía (HCD) y la tecnología de trampa de doble presión para ofrecer de forma rutinaria ultra-alta resolución y masa exacta.

La velocidad de los espectrómetros de masas LTQ Velos™ es ideal para el acoplamiento con sistemas U-HPLC, ofreciendo a los investigadores identificar más compuestos en menos tiempo.

“La combinación de la nueva trampa de doble presión con la óptica de iones avanzada ofrece un aumento de la sensibilidad, mejor transmisión de iones, y captura y fragmentación de iones más eficiente”, dijo Iain Mylchreest, Vicepresidente de Espectrometría de Masas de Thermo Fisher Scientific. “Estas importantes mejoras dan como resultado los espectrómetros de masas de trampa de iones y Orbitrap™ más rápidos y sensibles, ideales para cualquier aplicación con mezclas complejas”.

El LTQ Velos™ - La reinención de la tecnología de trampa de iones. La calidad de los datos y la sensibilidad del LTQ Velos™ lo hacen ideal para el análisis de mezclas complejas, como la identificación de niveles bajos de proteínas y la elucidación estructural de metabolitos en matrices biológicas.

Para aplicaciones en proteómica, las mejoras en velocidad y sensibilidad proporcionan mayor cobertura en el análisis de mezclas complejas de péptidos, aumentando la confianza en la identificación de proteínas en muestras, a niveles más bajos. Las múltiples técnicas de fragmentación disponibles en el LTQ Velos™ ofrecen asignación de secuencias y modificaciones post-traduccionales (PTM)



de más confianza. La mayor velocidad de barrido reduce los tiempos de medida hasta en un 50 por ciento, duplicando el número de proteínas y péptidos identificados.

### LTQ Orbitrap Velos™

Para aplicaciones de metabolismo, la tecnología de doble trampa aumenta la eficiencia de la fragmentación dando como resultado elucidaciones estructurales más rápidas y seguras. La mejora en la velocidad y la sensibilidad se combinan con la capacidad de MS<sup>n</sup>, maximizando el rendimiento y manteniendo al mismo tiempo la calidad superior de los datos requeridos para la identificación y la cuantificación de varios compuestos que eluyan conjuntamente.

El LTQ Velos™ puede actualizarse al LTQ Orbitrap Velos™, permitiendo a los laboratorios ampliar su inversión inicial para incluir masa exacta y resolución ultra-alta sin comprometer la sensibilidad y la velocidad de análisis.

El LTQ Orbitrap Velos™, potenciado por la tecnología Orbitrap™, combina la capacidad demostrada de masa exacta y la resolución ultra-alta del analizador de masas Orbitrap™, con la sensibilidad y el tiempo de ciclo mejorados del LTQ Velos™ para ofrecer Espectrometría de Masas híbrida de alto rendimiento.

La alta capacidad de masa exacta del LTQ Orbitrap Velos™ aumenta la velocidad y la confianza de la identificación de proteínas en muestras complejas, minimizando los falsos positivos. La resolución ultra-alta ofrece la certeza en los resultados analíticos al permitir la determinación de peso molecular de proteínas intactas y análisis en profundidad de las especies isobáricas. Para investigadores en proteómica, estas capacidades permiten la identifi-



cación de más proteínas, mayor cobertura de secuencia y mayor confianza.

La nueva celda HCD del LTQ Orbitrap Velos™, es más eficiente, proporcionando una mejor cuantificación de los péptidos con marcaje isotópico, como en aplicaciones que requieren marcadores para masas en tándem (TMT). La disociación por transferencia de electrones (ETD) genera información complementaria para el análisis altamente sensible de PTM y para la secuenciación de novo.

Para aplicaciones de metabolismo, el LTQ Orbitrap Velos™ ofrece a los investigadores alta resolución y masa exacta para elucidación estructural de más confianza.

Con estas nuevas características, la tecnología de Espectrometría de Masas de Thermo Scientific LTQ Orbitrap™ sigue siendo la más completa para identificación estructural y la plataforma de elección para identificación, caracterización y cuantificación con confianza de proteínas y metabolitos.

Para obtener más información del LTQ Velos™ o el LTQ Orbitrap Velos™, contacte con nosotros a través de:

los teléfonos 914 845 965 ó 932 230 918,  
el email [analyze.es@thermofisher.com](mailto:analyze.es@thermofisher.com)  
o visite nuestra web: [www.thermo.com/velos](http://www.thermo.com/velos)

Thermo Scientific es parte de Thermo Fisher Scientific, el líder mundial al servicio de la ciencia.

*Acerca de Thermo Fisher Scientific.*

*Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE: TMO) es el líder mundial al servicio de la ciencia y hacemos posible que nuestros clientes construyan un mundo más saludable, limpio y seguro. El volumen de ventas anual supera los 10.000 millones de dólares y el grupo cuenta con 30.000 empleados y más de 350.000 clientes entre compañías farmacéuticas y biomédicas, laboratorios de hospitales y centros de diagnóstico clínico, universidades, instituciones de investigación y organismos públicos, además de entidades de control de procesos industriales y medioambientales. A través de dos marcas de primera línea, Thermo Scientific y Fisher Scientific, contribuimos a la resolución de retos analíticos, desde pruebas rutinarias a complejas investigaciones y hallazgos. Thermo Scientific ofrece a sus clientes toda una variedad de instrumentos analíticos de gama alta, además de equipos de laboratorio, software, servicios, consumibles y reactivos para soluciones de flujo de trabajo integrado en laboratorios. Fisher Scientific cuenta con una completa cartera de equipos de laboratorio, productos químicos, suministros y servicios empleados en sanidad, investigación científica, seguridad y educación. Juntos ofrecemos las opciones de adquisición más convenientes a nuestros clientes y mejoramos de forma continua nuestra tecnología para acelerar el ritmo de los descubrimientos científicos, incrementar el valor para los clientes y alimentar el crecimiento para accionistas y empleados. Visite [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).*

**Gomensoro**®  
instrumentación científica

## ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE MERCURIO Y ARSÉNICO MEDIANTE IC-ICP/MS

El uso de la cromatografía iónica en combinación con un plasma ICP / espectrómetro de masas (IC-ICP/MS) constituye un medio excelente para determinar con certeza y en una sola operación diferentes especies de arsénico y mercurio. Sin embargo, durante la preparación de las muestras, algunas de estas especies sufren interconversiones. Éstas se pueden detectar de forma segura empleando la espectrometría de masas con dilución de isótopos (SIDMS = speciated isotope dilution mass spectrometry), un método descrito recientemente en el método 6800 EPA. La vigilancia de la interconversión permite obtener la verdadera concentración de especies.

Dependiendo del pH y del potencial redox, el cromo, por ejemplo, puede interconvertirse en dos direcciones entre Cr<sup>3+</sup> y Cr<sup>6+</sup>, este último siendo una especie altamente tóxica y cancerígena. De forma similar, el mercurio tiende a sufrir varias transformaciones en el medio ambiente. Se encuentra en diversas formas, sobre todo como mercurio elemental (Hg<sup>0</sup>), mercurio inorgánico (Hg<sup>2+</sup>) y mercurio orgánico biológicamente activo (metilmercurio CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>).

Mediante la adición de especies isotópicas enriquecidas al proceso de análisis es posible corregir y medir estas interconversiones para obtener concentraciones verdaderas de especies. Mientras que los compuestos de arsénico se pueden analizar sin el uso de la SIDMS, muchas técnicas de extracción usadas habitualmente para la especiación del mercurio en muestras biológicas (por ejemplo, tejidos de atún, EPA 6800) se evalúan empleando la SIDMS y la calibración externa.



Instrumentación utilizada:  
IC Profesional 850 + Sample Processor 858 + ICP/MS Agilent + Equipo de extracción por microondas Milestone.



## DETERMINACIÓN DE HALÓGENOS POR CROMATOGRFÍA IÓNICA CON COMBUSTIÓN.

Metrohm ha creado un sistema de cromatografía iónica con combustión (Combustion IC = CIC) totalmente automático. El nuevo instrumento combina un sistema de combustión de elevada eficiencia con el poder de separación de la cromatografía iónica. La CIC permite analizar simultáneamente trazas de compuestos de halógenos (F, Cl, Br e I) y sulfuro (como sulfatos) en cualquier matriz de muestras no acuosas.

La normativa RoHS (Restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment) exige una tecnología adecuada para la rápida supervisión de compuestos de halógenos orgánicos en matrices tales como carbón, petróleo crudo, nafta, gas de petróleo licuado, etc. ICP-MS e ISE son aptas para esta tarea, y también la CI. Sin embargo, a menudo resulta difícil disolver las muestras y se requieren, por tanto, complejos y largos procedimientos de preparación de muestras. El sistema Combustion IC de Metrohm es la respuesta a estas necesidades.



### Fácil determinación de halógenos

Después de una digestión térmica oxidante que tiene lugar en el sistema de combustión, los gases liberados son atrapados por un absorbente acuoso oxidante. Este se inyecta después en el loop de muestra de un Cromatógrafo Iónico Metrohm 881 Compact IC pro. El software MagIC Net controla de forma segura los análisis y calcula automáticamente la fracción de peso de halógeno y sulfuro para cada muestra.

METROHM AG está representado en España (excepto Cataluña y Baleares) por:  
GOMENSORO, S.A.  
C/Aguacate, 15  
28044 MADRID  
Tf. 91 508 65 86  
Fax 91 508 65 11  
Email: ventas@gomensoro.net  
www.gomensoro.net



## LA NUEVA INTERFAZ TLC-MS DE CAMAG PERMITE UNA EXTRACCIÓN RÁPIDA Y CÓMODA DE SUBSTANCIAS DIRECTAMENTE EN MS

La nueva interfaz TLC-MS de Camag es un instrumento versátil para la extracción de compuestos desde una placa TLC/HPTLC y su alimentación directa a un espectrómetro de masa para la identificación de sustancias o la elucidación de estructuras.

No todas las muestras pueden ser analizadas por sistemas HPLC-MS o HPLC-DAD, debido, por ejemplo, a baja sensibilidad para algunos compuestos en el rango UV, a la presencia de una matriz compleja, o a la falta de compatibilidad del MS con los disolventes necesarios para la separación HPLC. En estos casos, la separación previa en capa fina puede ser la solución ideal. En el pasado, las sustancias separadas en la placa eran extraídas mediante rascado y elución, antes de ser transferidas al espectrómetro de masa. Ahora está disponible una interfaz TLC-MS sencilla y universal que permite, de forma semiautomática, la extracción de zonas de interés de la placa y su transferencia directa al sistema MS.

El dispositivo se puede conectar a cualquier espectrómetro de masa acoplado a LC, de cualquier fabricante. La interfaz TLC-MS se conecta fácilmente mediante dos conexiones, entre la bomba HPLC y el MS. Las sustancias de interés se extraen directamente de la placa empleando el disolvente impulsado por la bomba, y se introducen en el MS, produciendo en menos de un minuto un espectro de masa de la zona de interés. Se extrae en profundidad la zona completa de la placa en la que está la sustancia, lo que permite sensibilidades comparables a HPLC, dentro del rango pg/zona.



Para más información,  
contactar con  
IZASA, S.A.  
Tel.: 902 20 30 80  
E-mail: dac2@izasa.es



## CROMATÓGRAFO DE GASES PORTÁTIL DPS, ÚNICO EN SU CLASE

Sugelabor se complace en presentar el nuevo Cromatógrafo de Gases "Companion GC", fabricado por DPS Instruments Inc. Este cromatógrafo es único en el mercado por su reducido tamaño y peso. En un maletín dispondrá de toda la capacidad de separación de un gran cromatógrafo. Es el primer cromatógrafo realmente portátil, con la posibilidad de seleccionar entre 7 detectores distintos, que le permitirán realizar trabajos de campo impensables hasta ahora, aplicaciones medioambientales, forenses, agrícolas, forestales, control de fronteras, militares, etc.

El sistema inteligente de los equipos de GC de DPS se fundamenta en un microprocesador digital de rutinas que controla los parámetros analíticos con una precisión hasta ahora no lograda, consiguiendo gran estabilidad y resultados excelentes.

### Características Generales

- Diseño modular.
- Horno compacto de gran estabilidad.
- Pantalla táctil de control.
- Funcionamiento independiente con memoria para métodos GC.
- Procesador Digital de Señales Patentado.
- Diagnóstico de funcionamiento incorporado.
- Control de presión de hasta 0,001 KPa.
- Control de temperatura de hasta 0,001 °C.
- Temperatura de la columna en el horno hasta 225 °C.
- Incremento de temperatura en el horno hasta 80 °C.
- Enfriamiento rápido, de 225 °C hasta 50 °C en menos de 4 minutos.
- Maletín de transporte hermético (52 x 40 x 21 cm).
- Peso aproximado de 10 kg.

### Módulos de Horno e Inyectores

- Espacio de 12,5 x 10,5 x 12,5 cm para columnas capilares.
- 1 ó 2 inyectores instalados.
- Split/Splitless y sin calentamiento para muestras gaseosas.
- Inyector On-Column.
- Hasta dos solenoides de control.

### Módulo Electrónico

- Entrada y almacenamiento de métodos vía pantalla táctil.
- Temperatura y presión programables con múltiples opciones.



- Hasta dos controladores electrónicos de presión.
- Recogida digital de señales para cada detector.
- Puerto USB de salida de datos de 24 bits.

### Detectores Disponibles

- FID: Ionización de llama (Lím Det. 100 pg).
- PID: Fotoionización (Lím. Det. 10 pg).
- TCD: Conduct. térmica (Lim. Det. 1 ppm).
- HID: Helio Ionizado (Lím. Det. 100 pg).
- NPD: Nitrógeno fósforo (Lím. Det. 20 pg).
- TID: Termoiónico (Lím. Det. 20 pg).
- ECD: Captura electrónica (Lím. Det. 0,1 pg).
- BCD: Detector de Bromo-Cloro.

### NUEVO GENERADOR DE HIDRÓGENO ESPECIALMENTE DISEÑADO PARA CROMATOGRAFÍA.

Sugelabor, en colaboración con HydrogenWorks, ha desarrollado el primer generador de hidrógeno en España, con la novedosa tecnología PEM (electrolito polimérico en estado sólido), especialmente diseñados para adaptarse a las necesidades de los cromatógrafos de gases.

Esta tecnología permite incrementar la seguridad operacional en el laboratorio, eliminando los riesgos asociados al almacenamiento de hidrógeno y su distribución. Al producirse el hidrógeno en el propio laboratorio se evita su almacenamiento. La presión y el volumen de hidrógeno son en todo momento bajos, reduciéndose drásticamente el peligro de los escapes de hidrógeno. El precio del metro cúbico de hidrógeno se reduce en un factor de 10, menos de 1 euro/ m<sup>3</sup>. La pureza del hidrógeno es superior al 99,9999%, pudiendo dar una presión de hasta 6 bares de forma continua y segura.

La instalación se simplifica reduciéndose al mínimo. Al fabricarse el generador en España, en caso de avería, se puede resolver en menos de 24 horas, disponiendo, si fuera necesario de equipos de sustitución. La garantía de los equipos es de 2 años, pudiéndose contratar extensiones de la misma. La sencillez del proceso de generación del hidrógeno permite que el mantenimiento requerido sea mínimo, cambio de la resina desionizante del depósito de agua cada seis meses y la regeneración o sustitución del cartucho desecante cuando el indicador así lo indique.



Pureza del Agua	Desionizada ASTM tipo II
Producción de Hidrógeno	250 cm <sup>3</sup>
Pureza del Hidrógeno	>99,9999 %
Alimentación	120-220 V, 50-60 Hz
Consumo eléctrico	< 180 W
Consumo agua	25 cm <sup>3</sup> /h
Capacidad de Depósito	1 l
Dimensiones	24 x 36 x 44 (cm)
Peso	17 kg
Controles de Seguridad sobre voltaje	Nivel agua, presión, T <sup>a</sup> , Intensidad, ventilación forzada
Garantía	2 años

### DPS 600 Series GC, adaptables a cualquier requerimiento analítico

Los Sistemas DPS 600 Series GC son el resultado de una década de investigación y desarrollo para conseguir los cromatógrafos más versátiles. Gracias a su configuración modular puede elegir entre nueve detectores, entre horno sencillo o doble, concentradores de muestras incorporados, etc., que le permiten adaptarse a cualquier necesidad analítica.

El novedoso diseño permite ahorrar espacio, con la capacidad de ampliación en su interior. El sistema inteligente de los equipos DPS Series GC reside en su microprocesador con cierres de seguridad que controlan la temperatura y la presión con una precisión no conseguida por otro fabricante.

### Características Generales

- Diseño modular ampliable.
- Configuraciones personalizadas.
- Control mediante pantalla táctil.
- Funcionamiento independiente con memoria para métodos GC.
- Procesador digital de señales patentado.
- Control de temperatura de hasta 0,001 °C.
- Control de presión ECP hasta 0,001 KPa.
- Temperatura de la columna en el horno hasta 450 °C.
- Incremento de temperatura en el horno hasta 100 °C/min.

### Módulos de Horno e Inyectores

- Espacio de 12,5 x 10,5 x 12,5 cm para columnas capilares
- 1 ó 2 inyectores instalados
- Split/Splitless y sin calentamiento para muestras gaseosas.
- Inyector On-Column.
- Hasta dos solenoides de control.

### Módulo Electrónico

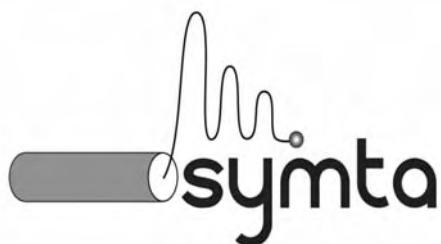
- Hasta 6 controladores electrónicos de presión (ECP).
- Procesador digital patentado.
- Control remoto star/stop remoto.
- Recogida digital y analógica de la señal de cada detector.
- Automuestreadores Líquido y Headspace
- Puerto USB de salida de datos de 24 bits.

### Detectores Disponibles

- FID: Ionización de llama (Lím Det. 100 pg).
- PID: Fotoionización (Lím. Det. 10 pg).
- TCD: Conduct. térmica (Lim. Det. 1 ppm).
- HID: Helio Ionizado (Lím. Det. 100 pg).
- NPD: Nitrógeno fósforo (Lím. Det. 20 pg).
- TID: Termiónico (Lím. Det. 20 pg).
- ECD: Captura electrónica (Lím. Det. 0,1 pg).
- BCD: Detector de Bromo-Cloro (Lím. Det. 10 pg).



Sugelabor S.A  
 c/Sicilia, 36. 28038 MADRID  
 www.sugelabor.com  
 info@sugelabor.com  
 Tel.: 91 501 39 36  
 Fax: 91 501 39 38



## NUEVA COLUMNA ACE C18-AR: UNA SELECTIVIDAD ALTERNATIVA A LA C18 CON TODAS LAS VENTAJAS DE LOS RELLENOS DE ACE

Advanced Chromatography Technologies (ACT) lanza al mercado un nuevo relleno ACE a través de su distribuidor oficial en España, SYMTA. Se trata de una fase estacionaria C18 con una selectividad alternativa a las columnas C18 “estándar”. Esta fase es compatible con fases móviles altamente acuosas (hasta el 100%), permite trabajar a altas temperaturas (hasta 80°C) y presenta un sangrado de fase ultra-bajo.

### ¿Por qué es necesaria una nueva fase C18?

La utilización de sílices ultra-puras y ultra-inertes proporciona grandes beneficios relacionados con la reproducibilidad, la vida útil de la columna y los resultados cromatográficos (especialmente con moléculas básicas). Sin embargo, es muy probable que un problema de separación para una sílice ultra-pura no mejore al cambiar entre columnas equivalentes de distinto fabricante, ya que estas columnas presentan sílices de similares características. Por esta razón, resulta necesaria una fase que incluya las ventajas que muestran las C18 de marcas punteras y que además proporcione la selectividad requerida para sus aplicaciones más exigentes.

### ¿Cuál es la diferencia que caracteriza a la ACE C18-AR?

La nueva fase ACE C18-AR contiene un ligando C18 con una funcionalidad Fenilo integrada que consigue combinar en una sola fase los beneficios de los dos rellenos más utilizados por los cromatografistas (C18 y Fenilo). Basada en la sílice ultra-inerte, ultra-pura y ultra-reproducible de las columnas ACE, la fase única ACE C18-AR proporciona una selectividad alternativa frente al resto de columnas C18.

### ¿Cuándo debería utilizar la ACE C18-AR?

Dado que presenta unas características hidrofóbicas similares a las columnas C18 “estándar”, la ACE C18-AR debe ser utilizada en aquellas aplicaciones que requieren una fase estacionaria C18. Sin embargo, debido a su funcionalidad Fenilo integrada, la ACE C18-AR es especialmente recomendada para la separación de compuestos con estructura aromática.

Se han realizado varios estudios comparativos de columnas C18 que demuestran que la columna ACE C18-AR presenta una selectividad exclusiva que permite resolver separaciones que resultan complejas para las columnas más punteras del mercado. En la figura 1 se

muestran cromatogramas para la separación de varias vitaminas hidrosolubles obtenidos con las columnas C18 incluidas en la comparativa. Esta separación no consigue ser resuelta por ninguna de las fases C18 “estándar” mientras que con la ACE C18-AR la separación es total.

La única fase ACE C18-AR muestra un perfil cromatográfico completamente distinto al resto de columnas C18. La resolución de los dos pares críticos (2,3 y 5,6) mejora de forma significativa y la robustez del método deja de ser un problema. Es más, resulta posible modificar las dimensiones de la columna e incluso alguno de los parámetros cromatográficos para reducir el tiempo de análisis.

La fase ACE C18-AR también resulta interesante para separar compuestos que no consiguen ser resueltos con columnas C18 “estándar”. Para demostrar esto, se han comparado los resultados cromatográficos obtenidos con estas cinco columnas en distintas mezclas complejas:

#### Compuestos aromáticos nitrobenzeno:

Tras comparar el resultado cromatográfico de las columnas C18 para una mezcla de tres compuestos aromáticos nitrobenzeno (1,3,5-trinitrobenzeno, 1,3-dinitrobenzeno y nitrobenzeno) y un compuesto marcador de referencia neutro, se obtuvo que la selectividad para los compuestos nitrobenzeno es la misma en todas las columnas C18 “estándar”. En cambio la fase ACE C18-AR presenta una mayor retención para estos compuestos y además su orden de elución se ve invertido. Este resultado cromatográfico está directamente relacionado con la funcionalidad Fenilo integrada en el ligando de la fase única ACE C18-AR que ofrece la aparición de interacciones adicionales ( $\pi - \pi$ ) entre los átomos de nitrógeno de los analitos y el grupo Fenilo de la fase ACE C18-AR aumentando su retención.

#### Compuestos sulfurados:

La separación de compuestos sulfurados resulta complicada para una columna C18 “estándar”, pero esto deja de ser un problema para la fase ACE C18-AR. Después de analizar una mezcla de cuatro compuestos sulfurados (metilfenilsulfóxido, metilfenilsulfona, tolueno y tioanisol) con las columnas C18 “estándar”, se obtuvieron cromatogramas muy similares entre sí dando lugar a dos coeluciones. Sin embargo, la columna ACE C18-AR proporciona una separación completamente distinta a éstas debido, una vez más, a las interacciones adicionales ( $\pi - \pi$ ).

#### Separación de analgésicos:

Para la separación de analgésicos con columnas C18 “estándar” el resultado cromatográfico para distintas marcas punteras es muy similar, ya que la retención en estas columnas es predominantemente hidrofóbica. En estas separaciones surgen problemas de resolución que sólo consiguen resolverse con la fase ACE C18-AR gracias a su selectividad alternativa. Por tanto, las mismas condiciones de análisis que eran inadecuadas para esta separación con una columna C18 “estándar” resultaron adecuadas para la única fase ACE C18-AR sin necesidad de prolongar la optimización del método por más tiempo.



### Otras ventajas de trabajar con la fase ACE C18-AR

#### *Compatible con Fases Móviles de elevado contenido acuoso.*

Además de ser una columna diseñada para mostrar una selectividad alternativa a las C18 “estándar”, la ACE C18-AR es capaz de soportar una fase móvil con alto contenido acuoso (hasta el 100%) sin perder capacidad de retención, ya que el grupo fenilo integrado protege a la sílice de la pérdida de humectabilidad ocasionada por fases móviles muy acuosas.

#### *Estable a altas temperaturas y valores de pH extremos.*

Se ha estudiado el efecto de trabajar a altas temperaturas y a valores de pH ácidos sobre la columna ACE C18-AR y su pérdida de eficacia es muy leve en comparación con columnas como la Zorbax SB-C18, la Waters Spherisorb ODS2 y las columnas Fenilo con base de sílice ultra-pura. De esta manera, la fase ACE C18-AR se postula como una buena alternativa para aquellas aplicaciones que requieren una fase C18 o una fase Fenilo bajo condiciones cromatográficas extremas.

#### *Columnas con muy bajo sangrado compatibles con UV y LC-MS.*

Cuando se trata de columnas C18 con base de sílice ultra-pura es de esperar un bajo sangrado de fase. En cambio esta cualidad la pierden aquellas fases que habi-

tualmente se proponen para obtener una selectividad alternativa (columnas con grupo polar embebido, PFP, AQ o Fenilo). Sin embargo, y después de comprobar el sangrado de la fase ACE C18-AR, se ha demostrado que a pesar de contener la funcionalidad Fenilo integrada en la cadena C18, los niveles de sangrado de las columnas ACE C18-AR se encuentran en el mismo rango que las fases C18 “estándar” más punteras del mercado, lo que la convierte en una fase adecuada para trabajar a bajas longitudes de onda y para el análisis con LC-MS.

### CONCLUSIONES:

- Las columnas ACE C18-AR contienen una fase C18 con una selectividad diferente al resto de columnas C18 del mercado.
- La fase ACE C18-AR debe ser utilizada para aplicaciones en las que se requiere una fase C18 y, especialmente, en aquellas separaciones que resultan complicadas para las columnas C18 “estándar”.
- Son columnas diseñadas para soportar las condiciones de análisis más exigentes, son compatibles para trabajar a bajas longitudes de onda y con LC-MS y garantizan una reproducibilidad excelente.

Para más información:

SYMTA, S.A.L.

Tel.: 91 500 20 60 • e-mail: info@symta.com

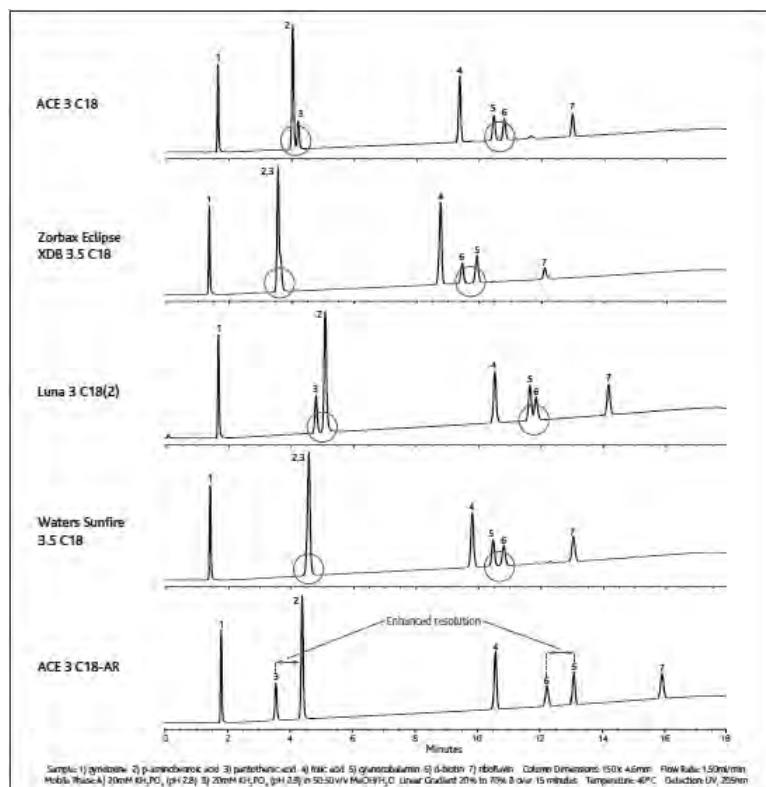


Figura 1. Separación de vitaminas hidrosolubles con distintas columnas C18.

# Productos Analítica Sigma-Aldrich

Diseñados especialmente para sus Aplicaciones Analíticas

**SIGMA-ALDRICH™**



**Fluka™**  
Analytical

**SUPELCO™**  
Analytical

## Soluciones a sus Análisis y Purificaciones

- Columnas/Accesorios HPLC
- Tubos/Cartuchos/Manifolds SPE
- Columnas/Rellenos Cromatografía Flash
- Reactivos Analítica
- Columnas/Liners/Purificadores en GC
- Fibras/Soportes SPME
- Estándares Químicos
- Productos para Valoraciones

Más información, llamando al **900 101 376 / 91 657 20 65**  
o visitando [sigma-aldrich.com/analytical](http://sigma-aldrich.com/analytical)

**Sigma-Aldrich Química**  
Ronda de Poniente, 3  
28760 TRES CANTOS





## [ O B J E T I V O S ]

FACILITAR A LOS CIENTÍFICOS  
DEL LABORATORIO EL  
ACCESO A MS/MS.

Y ELEVAR LA PRODUCTIVIDAD  
DEL LABORATORIO A  
NIVELES SIN PRECEDENTE.



Con mejores prestaciones y velocidades mayores, el detector ACQUITY® TQD de Waters® proporciona a los cromatografistas todos los beneficios de la MS con cuadrupolos en tándem en un sistema fácil de manejar. Equipado con la tecnología patentada T-Wave™, el ACQUITY TQD obtiene el máximo beneficio de los picos estrechos y el aumento de sensibilidad que proporciona la UPLC®. Esta combinación se traduce en excelentes resultados cuantitativos,

elevado rendimiento y la posibilidad de elevar los análisis del laboratorio a un nivel superior sin comprometer la calidad de los datos. Si desea saber más, visite [www.waters.com/tq](http://www.waters.com/tq).

©2007 Waters Corporation. Waters, The Science of What's Possible, ACQUITY, T-Wave y UPLC son marcas comerciales de Waters Corporation.

**Waters**  
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™