

COMPARACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS Y LA ELECTROFORESIS CAPILAR EN ESTUDIOS DE QUÍMICA DE RADIACIONES: SEPARACION DE PRODUCTOS RADIOLITICOS

COMPARISON OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN STUDIES ON RADIATION CHEMISTRY: SEPARATION OF RADIOLYTIC PRODUCTS

Guadalupe Albarrán¹, Edith Mendoza¹, Maribel Esparza¹

(1) Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias Nucleares, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Cd. de México, 04510 México
(e-mail: albarran@nucleares.unam.mx)

Recibido: 22/09/2016 - Evaluado: 20/10/2016 - Aceptado: 05/11/2016

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es comparar los resultados obtenidos de dos métodos para la identificación y cuantificación de los productos radiolíticos de soluciones diluidas de ácidos hidroxibenzoicos. Soluciones acuosas de cada ácido fueron irradiadas y analizadas utilizando una columna Alltima C18 (50x4.6 mm), fase móvil una mezcla de metanol, una solución 5 mmol/L de ácido 1-hexansulfónico y 1% de ácido acético para cromatografía de líquidos y para electroforesis capilar se utilizó una columna capilar de 72cmx75µm, celda de alta sensibilidad, voltaje de 25kV y una solución amortiguadora de boratos 10 mmol/L, pH 9.3 y 50 mmol/L de SDS. En la cinética de formación de los productos radiolíticos se obtuvieron concentraciones aproximadas. Los resultados obtenidos proporcionan amplia información a la Química de Radiaciones en determinar la distribución de carga en el anillo aromático.

ABSTRACT

The aim of this study is to compare the results obtained from two methods for the identification and quantification of the radiolytic products of dilute solutions of hydroxybenzoic acids. Aqueous solutions of each acid were irradiated and analyzed using a Alltima C18 column (50x4.6 mm), of mobile phase a mixture of methanol, 5 mmol/L 1-hexanesulfonic acid and 1% acetic acid solution for liquid chromatography and for capillary electrophoresis 72cmx75µm capillary column, high sensitivity cell, voltage 25 kV and borate buffer solution 10 mmol/L, pH 9.3 and 50 mmol/L SDS were used. On the kinetics of formation of the radiolytic products approximate concentrations were obtained. The results obtained provide extensive information to radiation chemistry in determining the distribution of load in the aromatic ring.

Palabras clave: cromatografía de líquidos, electroforesis capilar, ácidos hidroxibenzoicos, radiólisis
Keywords: Liquid chromatography, capillary electrophoresis, hydroxybenzoic acids, radiolysis

INTRODUCCIÓN

Tanto la electroforesis capilar (EC) como la cromatografía de líquidos (CL) son herramientas muy poderosas para separar todo tipo de compuestos, moléculas orgánicas e inorgánicas, pequeñas y grandes, ionizadas o no, (Bonato & Jabor 2005; Wang *et al.*, 2008; Wasielewska *et al.*, 2014). Estas técnicas son alternativas y complementarias como lo que aquí se presenta. La potencialidad de estos métodos analíticos permite separar, identificar y cuantificar los componentes de una muestra (Molnár-Perl & Füzfaïy, 2005; Hilz *et al.*, 2006). En química de Radiaciones apoyan a determinar la distribución de carga en la radiólisis de compuestos aromáticos, la cinética de reacción de los radicales libres con los solutos (Albarrán & Munguia 2014; Szabo *et al.*, 2014) y procesos de oxidación avanzados (Torun *et al.*, 2014).

Por otro lado, la Química de Radiaciones estudia los cambios químicos inducidos por la interacción de la radiación ionizante con la materia (Spinks & Woods, 1990). En soluciones acuosas la radiación interacciona principalmente con el agua generando especies ionizadas y excitadas, como consecuencia se forman los productos radiolíticos del agua, entre los cuales se producen los radicales libres H^* y $\cdot OH$, así como el electrón acuoso y especies moleculares como el H_2O_2 y H_2 (Draganić & Draganić, 1971). Los radicales libres atacan a los solutos para formar diversos compuestos (Mozumder, 2011), en el caso específico de que el radical $\cdot OH$ ataque al anillo aromático, se obtendrán diferentes isómeros oxidados, los cuales tienen propiedades tanto físicas como químicas similares y como consecuencia son difíciles de separar.

El objetivo de este estudio es comparar los resultados analíticos obtenidos usando los dos métodos, sobre la formación de los productos radiolíticos en solución acuosa de los tres ácidos hidroxibenzoicos, en especial el ataque del radical $\cdot OH$ hacia las diferentes posiciones libres del anillo aromático, cuantificar cada uno de los compuestos formados en función de la dosis y conocer la densidad de carga en el anillo aromático.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. Los ácidos 2-, 3- y 4-hidroxibenzoicos (AHB), los ácidos dihidroxibenzoicos (ADHB), catecol (CAT), resorcinol (RES), hidroquinona (HQ), $K_3Fe(CN)_6$, dodecil sulfato de sodio (SDS), ácido 1-hexansulfónico, todos de la más alta pureza, metanol (Chromasolv). Los reactivos y solventes fueron adquiridos en Aldrich con excepción del ácido acético (Merck), N_2O fue grado absorción atómica de Praxair. La solución amortiguadora de boratos 50 mmol/L fue de Agilent Technologies. El agua utilizada, en todos los experimentos de irradiación y en las disoluciones patrón fue obtenida de un purificador compacto Milli-Q Plus (Millipore), Water System.

Preparación de las muestras. Se prepararon disoluciones 1 mmol/L de los 2-, 3- y 4-AHB con 2.5 mmol/L de $K_3Fe(CN)_6$ el cual sirve para oxidar los radicales libres formados durante la radiólisis. De cada disolución se tomaron alícuotas de 3 mL, se colocaron en viales especiales donde se eliminó el aire, saturando ésta con N_2O que sirve para convertir los electrones acuosos a radicales hidroxilo.

Irradiación y análisis.- Las muestras fueron irradiadas en una fuente de rayos gamma provenientes de Cobalto-60, tipo Gamma-beam PT 651, a una razón de dosis de 37.2 Gy/min, ésta fue determinada mediante el dosímetro de Fricke (Weiss *et al.*, 1955).

Inmediatamente después de la irradiación, las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, modelo 1100 LC y un equipo de electroforesis capilar de alta resolución, modelo 1600-3D, ambos de la marca Agilent Technology, equipados con un detector de UV-visible de arreglo de diodos. Para la separación cromatográfica de los productos radiolíticos obtenidos en la radiólisis de los tres AHB, se utilizó una columna Alltima C18 de $3\mu m$ y 50 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno. Para el 2- y 4-AHB se utilizó como fase móvil 5% de metanol, 20% de una solución 5 mmol/L de ácido hexansulfónico y 75% de una solución acuosa al 1% de ácido acético, usando un flujo de 0.5 mL/min. En el caso del 3-AHB se empleó como fase móvil 20% de una solución 5 mmol/L de ácido hexansulfónico y 80% de una solución acuosa al 1% de ácido acético.

En el análisis por EC se utilizó una columna capilar de 72 cm de longitud, 8.5 cm de la salida del detector y 75 μm de diámetro interno con celda de alta sensibilidad, se le aplicó un voltaje de 25 kV y se utilizó una solución amortiguadora de boratos 10 mmol/L pH 9.3 con 50 mmol/L de SDS.

Para la identificación de cada uno de los productos radiolíticos primarios se adquirieron compuestos de la más alta pureza y comparando su espectro de absorción en la región UV y su tiempo de retención y de migración en los dos métodos analíticos. En el caso de la cuantificación fue necesario preparar disoluciones patrón entre 50 y 350 $\mu\text{mol/L}$, dependiendo de los productos radiolíticos esperados. Los picos obtenidos tanto en los cromatogramas como en los electroferogramas se integraron y elaboraron las gráficas de las áreas bajo la curva en función de la concentración. Con las muestras de referencia de cada compuesto se determinaron las sensibilidades de estos usando la ecuación $S_{\lambda} = A_{\lambda} / [Q]$, donde A corresponde al área bajo la curva de los picos integrados a una longitud de onda determinada y concentración conocida [Q].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la radiólisis de disoluciones acuosas se producen especies como el electrón acuoso (e^{-}_{ac}), el radical hidrogeno ($\cdot\text{H}$) y el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). Estas especies interacciona con los compuestos aromáticos mediante reacciones de adición y sustitución, en especial, el radical $\cdot\text{OH}$ produce compuestos oxidados, los cuales son isómeros, estos compuestos formados llamados productos radiolíticos, presentan características tanto físicas como químicas muy similares, por lo que son difíciles de separar.

Selección de las columnas.-Para realizar la separación de estos isómeros, primero se seleccionó la columna, siendo necesario probar varias columnas utilizadas en análisis, del tipo fase reversa, de diferentes marcas, C8 y C18, varias longitudes (50, 150 y 250 mm) y de 5 y 3 μm de tamaño de partícula, se hizo una comparación entre ellas, hasta que con la columna Alltima C18 (150 x 4.6mm, 5 μm) se consiguió una buena separación de los productos radiolíticos primarios de cada uno de los tres ácidos. Para el caso de la EC fue simple ya que se probó una columna capilar de alta sensibilidad inicialmente y esta funcionó adecuadamente para separar los productos oxidados producidos en la radiólisis de los tres ácidos.

Elección de la fase móvil.- La siguiente comparación fue la fase móvil. En CL fue necesario probar diferentes solventes, con cada uno de ellos se realizaron mezclas con soluciones acuosas en diferentes proporciones y a diferentes pH. Finalmente el análisis se realizó con una mezcla entre metanol y disoluciones acuosas de ácido acético y la sal sódica del ácido hexensulfónico, a diferentes proporciones para cada ácido estudiado, de esta forma se llegó al método de par iónico, con lo cual se consiguió una buena separación de los productos oxidados. Así que para obtener el método para separar los productos radiolíticos de cada ácido hidroxibenzoico fue muy laborioso. En el caso de la EC únicamente se probó un voltaje de 25 kV, una solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.0 y otra de boratos con pH 9.3 en concentraciones de 10, 25 y 50 mmol/L, usando esta última solución con concentración 10 mmol/L, mediante el modo de separación por zona se obtuvieron resultados buenos. Posteriormente, se probó el modo de separación de cromatografía capilar micelar electrocinética usando diferentes concentraciones de SDS y se encontró que con 50 mmol/L se obtenían excelentes separaciones de los compuestos oxidados presentes.

Ácido 2-hidroxibenzoico

En el estudio de este ácido se esperaban cinco productos radiolíticos como se muestra en la Figura 1. Sin embargo, la separación cromatografica de la solución irradiada a una dosis de 2.22 kGy presentó siete picos, de los cuales cuatro fueron los ADHBs que se formaron por la reacción de adición al anillo aromático y el quinto fue el CAT que se formó por una reacción de sustitución del grupo ácido, a los cuales se le denomina compuestos radiolíticos primarios esperados.

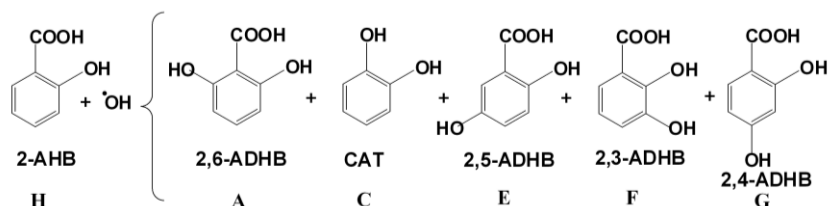


Fig. 1: Productos esperados en la oxidación radiolítica del ácido 2-hidroxi benzoico en solución acuosa.

Cada uno de estos compuestos fueron identificados por sus tiempos de retención y sus espectros en la región ultra-violeta comparados con nuestras originales. Los otros dos picos fueron identificados como carboxi-2,5-benzoquinona, ya que la solución irradiada contiene el oxidante ferricianuro de potasio, así que el ácido 2,5-dihidroxi benzoico fue oxidado y se formó esta quinona. El otro pico correspondió a un producto secundario, el ácido 2,3,4-trihidroxi benzoico (ATHB), el cual se formó por una reacción de adición del radical $\cdot\text{OH}$ al ácido 2,3- y 2,4-DHB. La Figura 2a muestra un cromatograma de la separación de estos siete productos formados. En el caso del análisis de la muestra irradiada mediante EC (Fig. 2b), únicamente se observaron seis picos, que corresponden a cuatro de los productos esperados, siendo que el ácido 2,6-DHB se forma en muy pequeña concentración, así como también el ácido 2,3,4-THB y haciendo hincapié que para este análisis se inyectan únicamente unos pocos nL, por lo que no se detecta las cantidades formadas de estos ácidos en las condiciones de la irradiación realizada. Sin embargo, el tiempo de análisis es mucho menor usando la EC que CL, además se obtiene el pico que corresponde al ácido 2-HB.

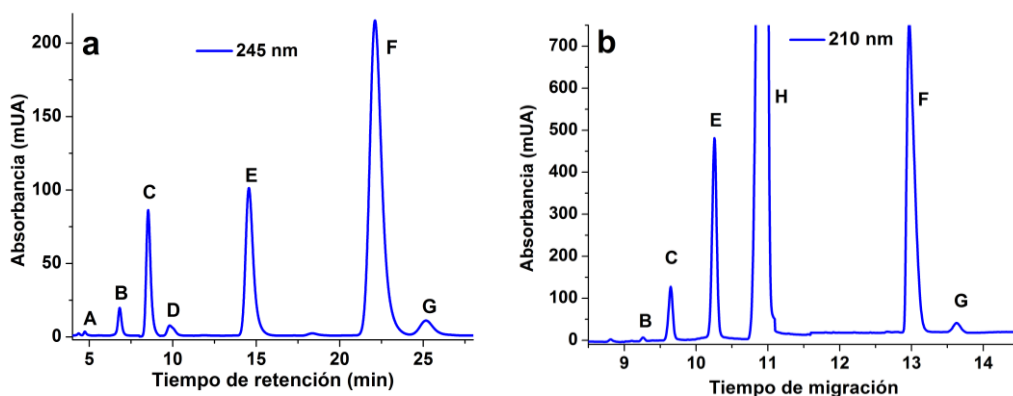


Fig. 2: a) Cromatograma y b) electroferograma de la separación de los productos obtenidos en la radiólisis de una disolución 1 mmol/L del ácido 2-HB, conteniendo 2.5 mmol/L de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y saturada con N_2O e irradiada a una dosis de 2.22 kGy. A) 2,6-DHB, B) carboxi-2,5-benzoquinona, C) CAT, D) 2,3,4-THB, E) 2,5-DHB, F) 2,3-DHB, G) 2,4-DHB y H) 2-HB.

Ácido 3-hidroxi benzoico

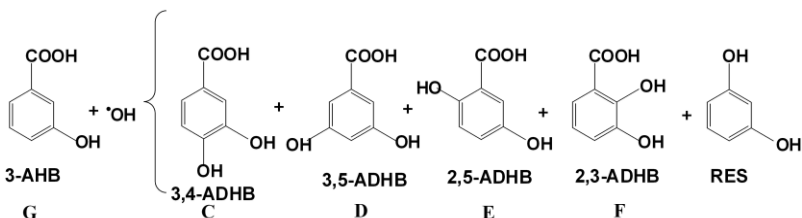


Fig. 3: Productos esperados en la oxidación radiolítica del ácido 3-hidroxi benzoico en solución acuosa.

Al analizar por CL (Fig. 4a) una solución irradiada del ácido 3-HB se encontraron 6 picos que correspondían a los cuatro dihidroxiácidos esperados (Fig. 3), los cuales fueron formados por el ataque del radical $\cdot\text{OH}$ a las posiciones http://www.exedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/

libres del anillo aromático del ácido. Estos ácidos fueron confirmados mediante sus espectros en la región UV y sus tiempos de retención y migración en los dos métodos analíticos utilizados, usando muestras originales. También se encontraron otros picos que se identificaron como un producto radiolítico secundario que fue el ácido 3,4,5-THB, el cual se formó por el ataque del radical $\cdot\text{OH}$ a la posición 5 del 3,4-DHB que fue el compuesto formado en mayor cantidad y la carboxi-2,5-benzoquinona que proviene, como ya se mencionó, de la oxidación del ácido 2,5-DHB. Sin embargo, en el análisis por EC (Fig. 4b) únicamente se obtuvieron 5 picos, los 4 ácidos esperados y el compuesto padre (ácido 3-HB), en este análisis no se observa la carboxi-2,5-benzoquinona ya que se forma en muy pequeña cantidad. De la Figura 3, el resorcinol no se produjo en cantidades detectables, ya que el grupo $-\text{OH}$ es un director fuerte orto - para, así que la posición ipso al grupo $-\text{COOH}$ no fue favorecida para su eliminación.

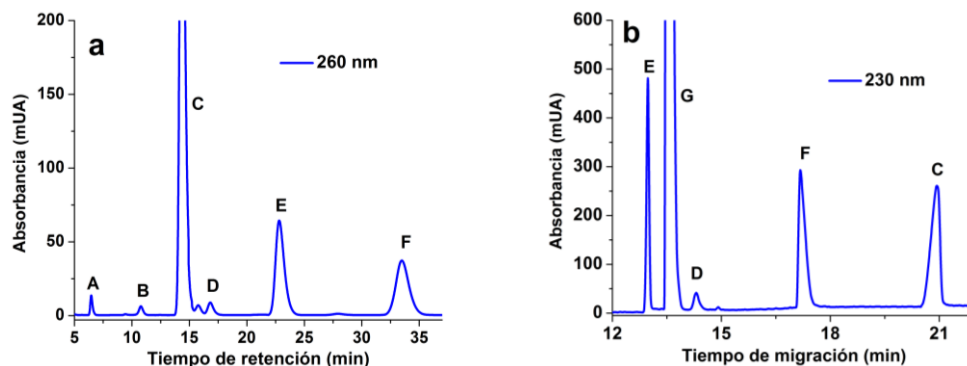


Fig. 4: a) Cromatograma y b) electroferograma de la separación de los productos obtenidos en la radiólisis del ácido 3-HB, la muestra se irradió en las mismas condiciones que el ácido 2-HB. A) 3,4,5-TDHB, B) carboxi-2,5-benzoquinona, C) 3,4-DHB, D) 3,5-DHB, E) 2,5-DHB, F) 2,3-DHB y G) 3-HB.

Ácido 4-hidroxibenzoico

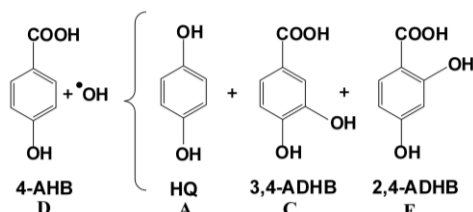


Fig. 5: Productos esperados en la oxidación radiolítica del ácido 4-hidroxibenzoico en solución acuosa.

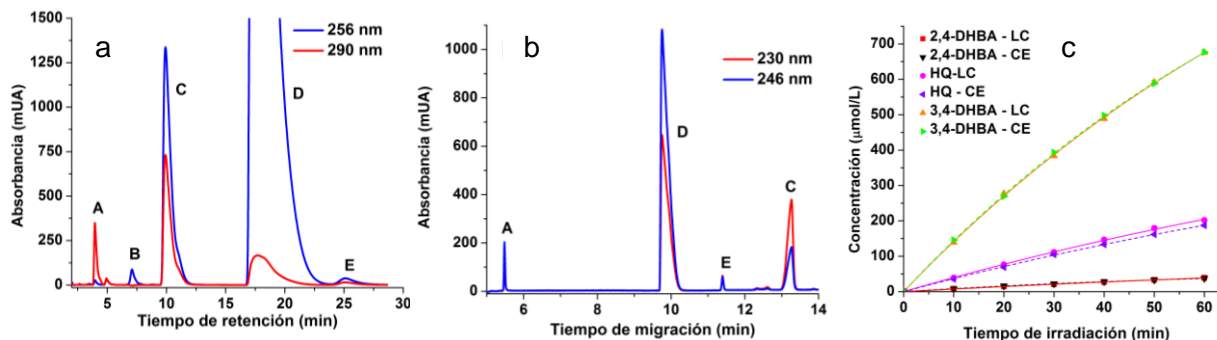


Fig. 6: a) Cromatograma, b) electroferograma de la separación de los productos obtenidos en la radiólisis del ácido 4-HB, la muestra se irradió en las mismas condiciones que el ácido 2-HB. A) HQ, B) 3,4,5-THB, C) 3,4-DHB, D) 4-HB y E) 2,4-DHB y c) comparación de la dependencia de los productos formados en función del tiempo de irradiación.

En el cromatograma (Fig. 6a) de este compuesto irradiado en las mismas condiciones que los otros 2 ácidos, ya que este ácido es simétrico, únicamente se obtuvieron los dos ADHBs esperados (Fig. 5) producidos por una reacción de adición del radical $\cdot\text{OH}$ al anillo aromático y la HQ por una reacción de sustitución del grupo $-\text{COOH}$. Además, de un compuesto secundario, el ácido 3,4,5-THB. En el electroferograma (Fig. 6b) el producto secundario no se observó, ya que se forma en cantidades muy pequeñas, los otros tres productos esperados se pudieron identificar y cuantificar muy bien. La cinética de formación (Fig. 6c) de los productos radiolíticos muestra que los métodos analíticos usados producen resultados cuantitativos muy similares del orden de los nmol/L (ver Fig. 8). Diferencias relevantes entre los dos métodos de separación son el tiempo de análisis, siendo mayor en la CL, así como la cantidad de muestra para el análisis por EC que es de unos pocos nL y en cambio en CL es de μL .

Identificación. La identificación de cada uno de los productos radiolíticos fue mediante tiempos de retención y de migración usando muestras originales. Sin embargo, los espectros en la región ultra-violeta obtenidos en los dos métodos son diferentes aunque se utilizó el mismo tipo de detector que fue el de arreglo de diodos UV. En este caso el pH influye ampliamente en la ionización de los compuestos como se muestra en la Fig. 7, ya que la solución amortiguadora usada en la EC es básica y la fase móvil en CL es ácida.

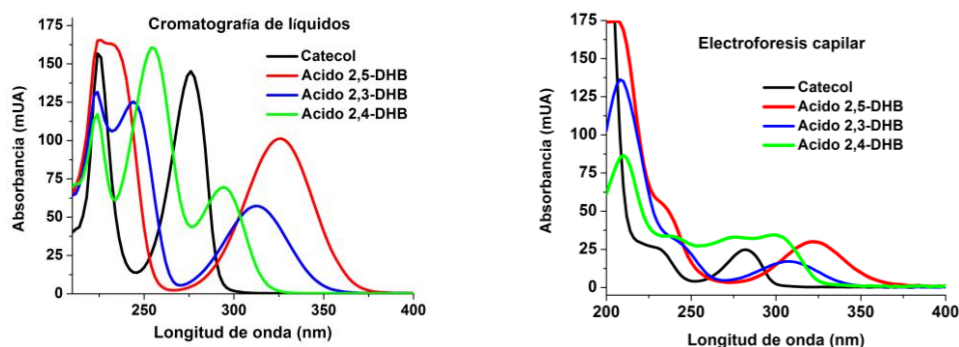


Fig. 7: Diferencias en los espectros UV obtenidos al analizar mediante CL y EC los productos radiolíticos del 2-AHB en solución acuosa.

Cuantificación. A pesar de varias diferencias encontradas entre los dos sistemas de análisis la cuantificación de los productos formados muestran mucha similitud, los resultados se exponen en la Fig. 8, donde los datos están dados en nmol/L.

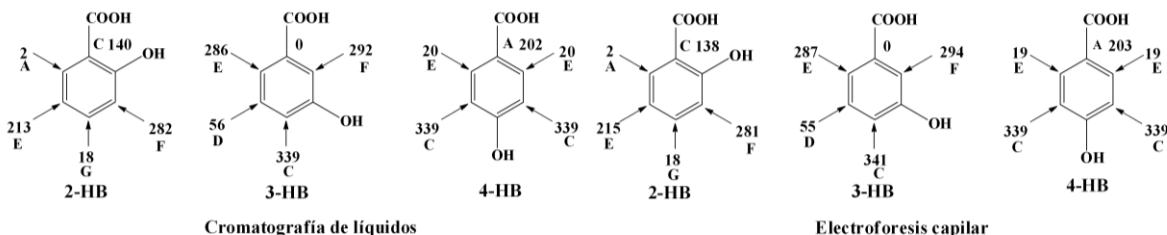


Fig. 8: Cantidad en nmol/L formados de los productos radiolíticos primarios al irradiar soluciones acuosas 1 mmol/L conteniendo 2.5 mmol/L de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y saturada con N_2O e irradiada a 2.2 kGy.

CONCLUSIONES

La CL y la EC utilizados como métodos de separación en este estudio produjeron resultados muy similares, los cuales proporcionan información sobre la distribución de carga en el anillo aromático. Los dos métodos de separación permitieron discernir sobre el ataque del radical $\cdot\text{OH}$ a estos ácidos y distinguir las reacciones de adición y sustitución.

Las ventajas encontradas en la EC son que las disoluciones usadas para la separación no son contaminantes, además de su bajo costo, ya que se usan cantidades menores a 5 mL de solución amortiguadora para unas cinco separaciones. Otra ventaja es que los análisis se realizan en menor tiempo y los picos obtenidos son regularmente estrechos, también la cantidad de muestra inyectada es del orden de nL. Las ventajas que tiene la CL en este estudio es que al ser inyectada una cantidad mayor de muestra, implica que se pueden observar compuestos primarios y secundarios, ya que algunos de estos se producen en concentraciones muy bajas como fue el caso del ácido 2,6-DHB en la disolución irradiada del ácido 2-HB.

AGRADECIMIENTOS

A PAPIIT-UNAM - IN 202916 por el apoyo económico, al Físico Fco. García por la irradiación de las muestras.

REFERENCIAS

1. Albarrán, G. & Munguia, J.S. (2014). Radiolytic oxidation of xylenes by $\cdot\text{OH}$ radicals. *Radiat. Phys. Chem.*, *97*, 90-94.
2. Bonato, P.S. & Jabor, V.A.P. (2005). Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Quim. Nova*, *28*, 683-691.
3. Draganić, I.G. & Draganić, Z.D. (1971). *The radiation chemistry of water*, Academic Press. N.Y. pp 29-42.
4. Hilz, H., Jong, L.E., Kabel, M.A, Schols, H.A. & Voragen A.G.J. (2006) A comparison of liquid chromatography, capillary electrophoresis, and mass spectrometry methods to determine xyloglucan structures in black currants. *J. Chromatogr. A.*, *1133*, 275-286.
5. Molnár-Perl, I. & Füzfa, Zs. (2005) Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *J. Chromatogr. A.*, *1073*, 201-227.
6. Mozumder, A. (2011). Radiation Chemistry: Background, Current Status and Outlook. *J. Phys. Chem. Lett.*, *2*, 2994-2995.
7. Spinks, J.W.T. & Woods, R.J. (1990). *An Introduction to Radiation Chemistry*, 3th ed. Wiley, N.Y., pp. 314-363.
8. Szabo, L., Toth, T., Homlok, R., Racz, G., Takacs, E. & Wojnarovits, L. (2014). Hydroxyl radical induced degradation of salicylates in aerated aqueous solution. *Radiat. Phys. Chem.*, *97*, 239-245.
9. Torun, M., Gültekin, Ö., Şolpan, D. & Güven, O. (2014). Mineralization of paracetamol in aqueous solution with advanced oxidation processes. *Environ. Technol.*, *36*, 970-982.
10. Wang, Z., Ouyanga, J. & Baeyens, W.R.G. (2008). Recent developments of enantioseparation techniques for adrenergic drugs using liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B.*, *862*, 1-14.
11. Wasielewska, M., Banel, A. & Zygmunt, B. (2014). Capillary Electrophoresis in Determination of Low Molecular Mass Organic Acids. *Int. J. Environ. Sci. Develop.*, *5*, 414-425.
12. Weiss, J., Allen, A.O. & Schwarz, H.A. (1955). *Use of the Fricke ferrous sulfate dosimeter for gamma-ray doses in the range 4 to 40 kr.* Proc. Int. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy. 14, 179. Geneva, Swiss.

