

**Autor invitado: Seyed Sadjadi, Científico Sénior**

Vamos a explorar las razones por las que la fase estacionaria C18 es la más usada en fase reversa y cómo funciona.

Probablemente sea más adecuado referirse a la [fase estacionaria C18](#) como una de las composiciones químicas más prolíficas. Ciertamente, cada vez son más las variedades de esta fase entre los proveedores de columnas cromatográficas. Sin embargo, antes de adentrarnos en el tema que nos ocupa, aquí se envía un pequeño repaso de cómo surgió [la fase estacionaria C18](#).

Al principio, Mikhail Tsvet, un botánico ruso, intentó aislar y separar los pigmentos naturales (carotenoides, clorofila, etc.) en tejidos vegetales. Como podemos imaginar, lo que Tsvet usó para su experimento de separación ¡NO eran partículas de sílica súper refinadas, totalmente porosas, perfectamente esféricas y uniformes unidas con un ligando de C18 y empacadas estrechamente dentro de un tubo de acero inoxidable de alta calidad! Usó materiales que la naturaleza le brindó —minerales y sales (sales de calcio — como fase estacionaria y una mezcla de etanol como fase móvil. Tsvet llamó esta técnica de separación “cromatografía”, que actualmente representa una rama significativa de la química analítica.

**[Cromatografía en fase reversa](#)**

En los primeros experimentos cromatográficos (el diseño de Tsvet), los analitos hidrófobos eran los primeros en eluir de la columna, seguidos por los compuestos polares y altamente hidrófilos. A este orden de elución se lo llamó [cromatografía en fase normal \(NP\)](#). Varias décadas después y con muchos otros científicos involucrados en este campo, se introdujeron

modos de separación adicionales a la cromatografía para resolver y purificar diversas clases de compuestos en muchas matrices diferentes. Aunque parezca emocionante cubrir todos estos tipos de análisis, solo nos concentraremos en uno, la cromatografía en fase reversa (RP).

En un sistema cromatográfico, los analitos iónicos y altamente polares eluyen primero de la columna, seguidos por analitos más hidrófobos. Los compuestos eluyen en el orden opuesto al de los experimentos de Tsvet. Por consiguiente, este sistema se llama cromatografía en “fase reversa”.

El objetivo máximo de la técnica de RP es separar analitos con diferentes grados de hidrofobicidad. En resumen, esta tarea se logra:

1. Usando una fase estacionaria hidrófoba para retener los analitos.
2. Modificando y optimizando un sistema de solventes con múltiples componentes con la habilidad diferencial de actuar como un buen solvente para los analitos diana. Esto incluye tanto los solventes orgánicos como las soluciones buffer, si corresponde. No todos los compuestos son ácidos o bases fuertes, pero en cambio muchos pueden tener grupos polares que requieren de un rango de pH estrecho para controlar su comportamiento.

## 1. Fase estacionaria hidrófoba

Los hidrocarburos representan un ejemplo perfecto de hidrofobicidad y son, en efecto,

¿Por qué C18 es la fase estacionaria más popular para fase reversa?

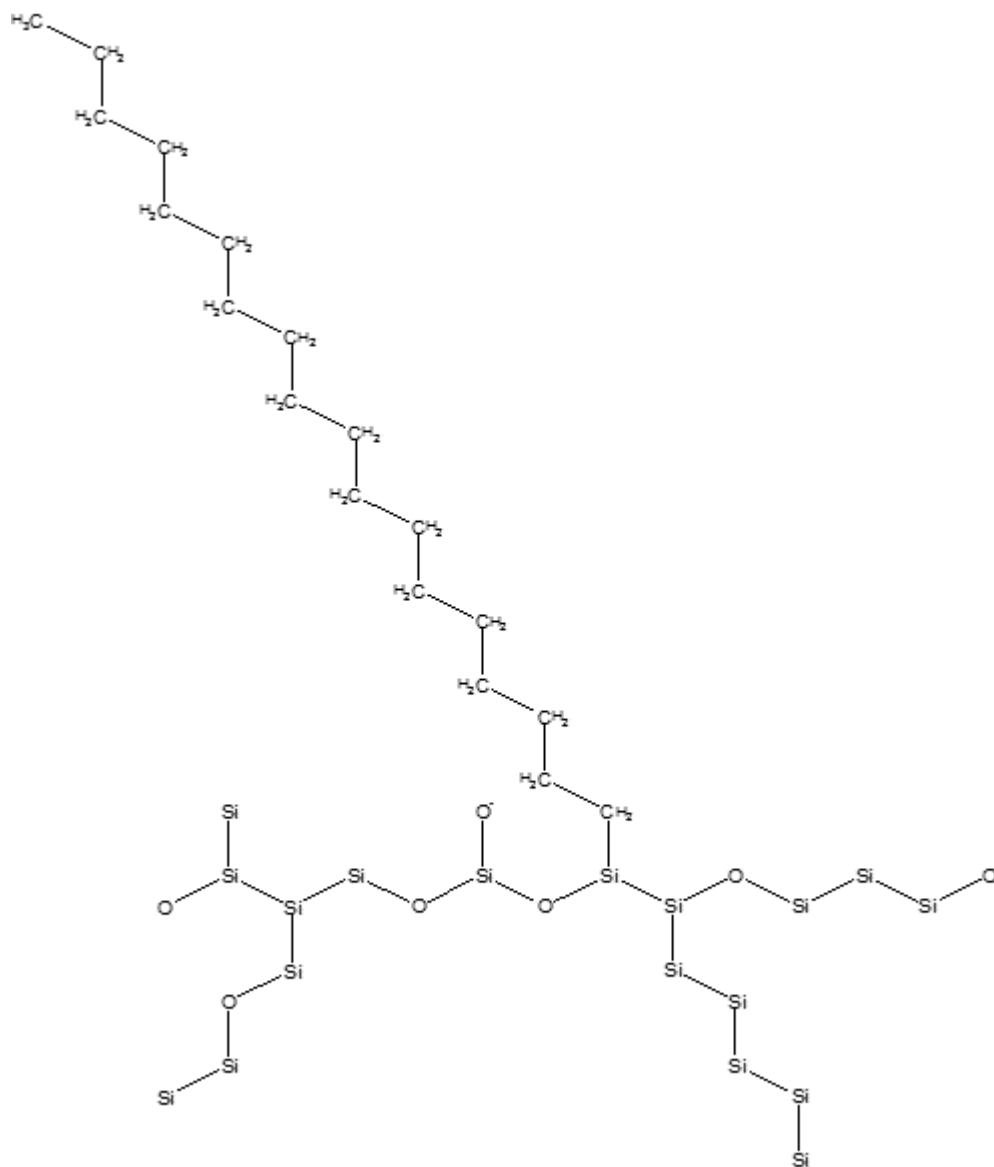
sustancias aceitosas. Más específicamente, los alcanos lineales están bien preparados para funcionar como una buena fase estacionaria. Deberíamos destacar que a medida que aumentan los átomos de carbono en la cadena, las propiedades físicas de los hidrocarburos también cambian: C1 a C4 son gaseosos; C5-C17 son líquidos, C18 y mayores son sólidos. Además de los alcanos, existen otros candidatos, como los alcanos cíclicos y aromáticos, que igualmente pueden funcionar como fase estacionaria. Estas otras fases estacionarias serán analizadas en otros artículos. La popularidad de las C18 puede deberse a la disponibilidad temprana del material de origen para el proceso de unión. Esta feliz coincidencia llevó al descubrimiento siguiente de cuán adecuado era el C18 en el proceso cromatográfico. De cualquier forma, ambos factores ayudaron a convertir las C18 en el campeón indiscutido de las fases estacionarias de RP.

El siguiente paso es agregar el grupo alcano, específicamente C18 u octadecilo, a una superficie adecuada. La sílica ha superado a cualquier otro relleno jamás considerado, y las partículas de sílica se encuentran en varias formas (esferas regulares o irregulares), tamaños (0,9 o 10  $\mu\text{m}$  y más grandes), porosidades (tan grandes como hasta 1000 Å), y puede ser totalmente porosa o tener un núcleo sólido por diseño.

Después de completarse el proceso de unión (varios detalles de este procedimiento son confidenciales), un ligando C18 se une a la sílica a nivel molecular y en un lugar físico más genérico dentro del poro de la partícula de sílica, como muestran las imágenes a continuación.

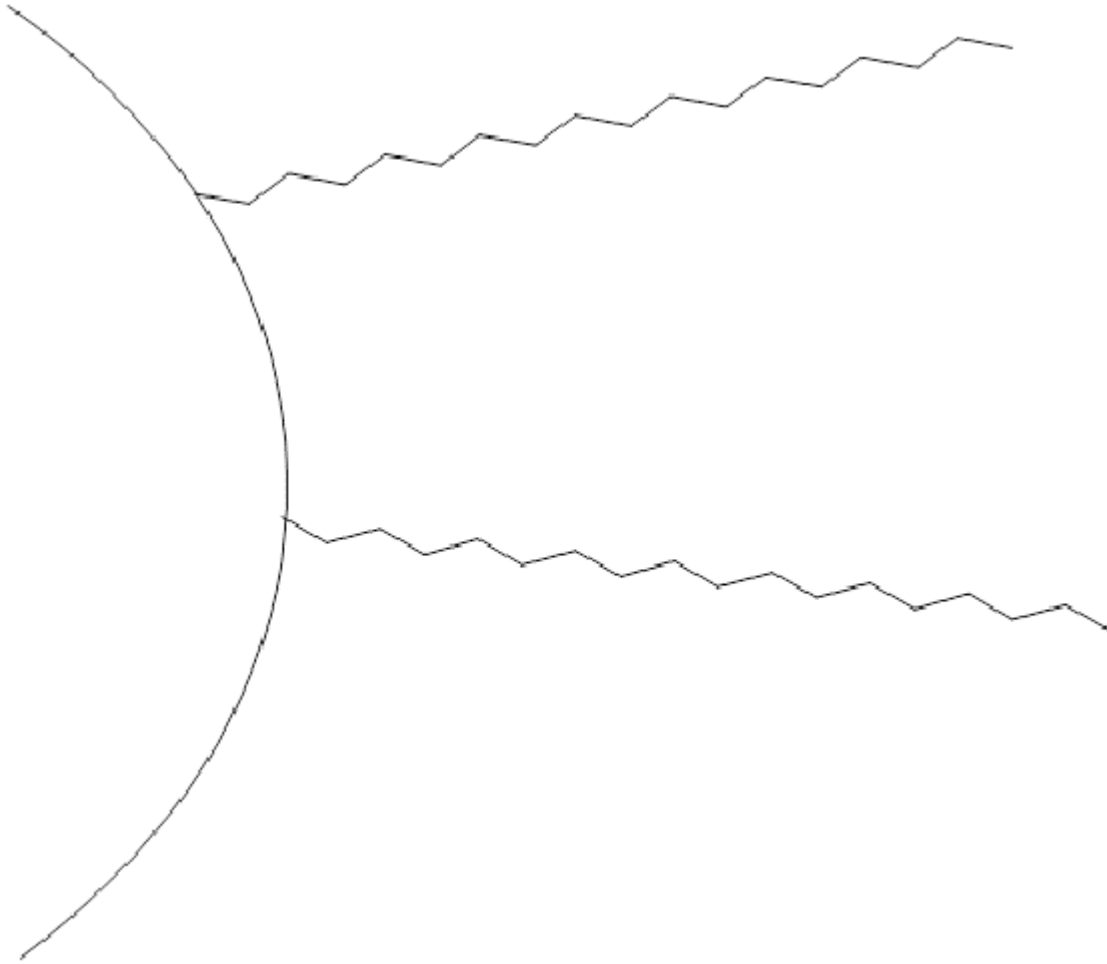
**Figura 1.** Ligando C18 unido a dióxido de silicio

¿Por qué C18 es la fase estacionaria más popular para fase reversa?



**Figura 2.** Representación genérica de dos moléculas de ligando C18 en la superficie de los poros de sílica

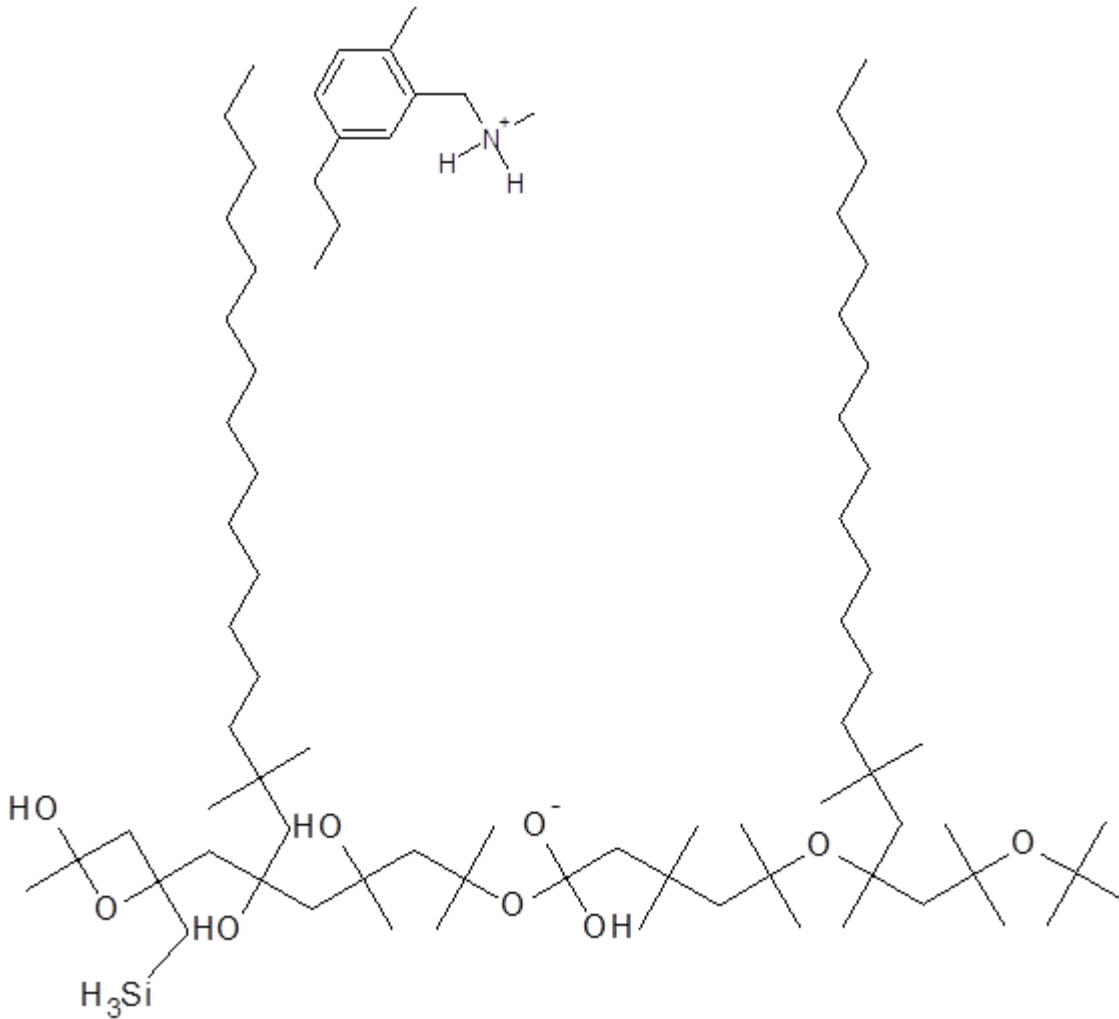
¿Por qué C18 es la fase estacionaria más popular para fase reversa?



## 2. Mecanismos de retención de cromatografía RP

La belleza y simplicidad de una **fase estacionaria C18** es que ofrece una interacción hidrofóbica muy simple. A medida que los solutos en la fase móvil viajan por los poros de sílica, pueden ser atraídos y retenidos por el hidrocarburo mediante una interacción hidrofóbica (y fuerza de Van der Waal) relativamente débil. La **Figura 3** es una representación de dicha interacción.

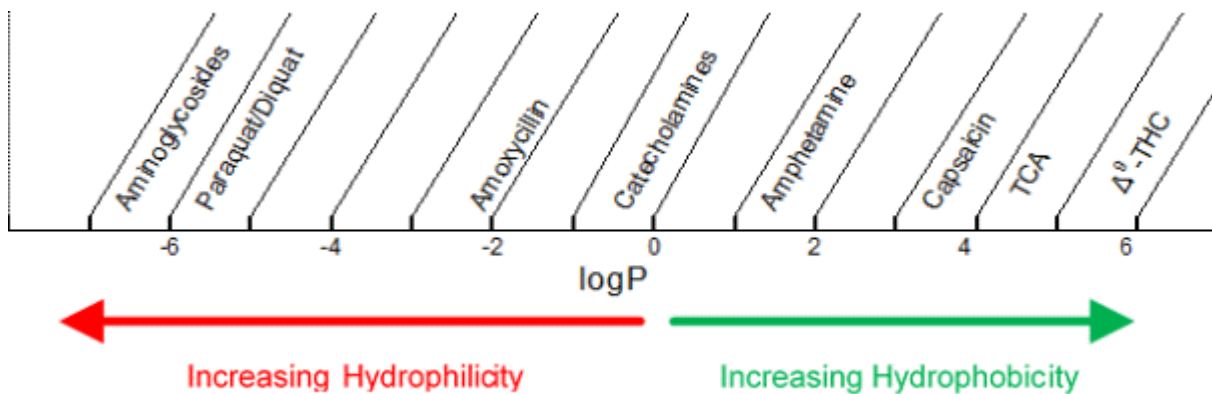
**Figura 3.** Una simple interacción hidrofóbica entre un ligando C18 y un compuesto.



La **Figura 4** muestra que hay una interacción hidrofóbica entre el ligando C18, el anillo de benceno del compuesto y su fracción del grupo propilo. La atracción entre el ligando C18 y la fracción de aminas del otro lado de la molécula es mínima debido a la presencia de una carga positiva en el nitrógeno.

Un parámetro que indica el grado de hidrofobicidad de un compuesto se llama log P (coeficiente de reparto). Este valor es la constante de equilibrio de un compuesto después de ser introducido en una mezcla de agua y n octanol. Un valor log P positivo indica que el compuesto diana es más soluble en n-octanos y, por lo tanto, posee mayor naturaleza hidrófoba. Un valor log P negativo indica una molécula soluble en agua y, por consiguiente, con mayor naturaleza hidrófila. La **Figura 4** muestra una lista de varias clases de compuestos con rangos de log P aproximados.

**Figura 4.** Escala de log P para diversos tipos de compuestos

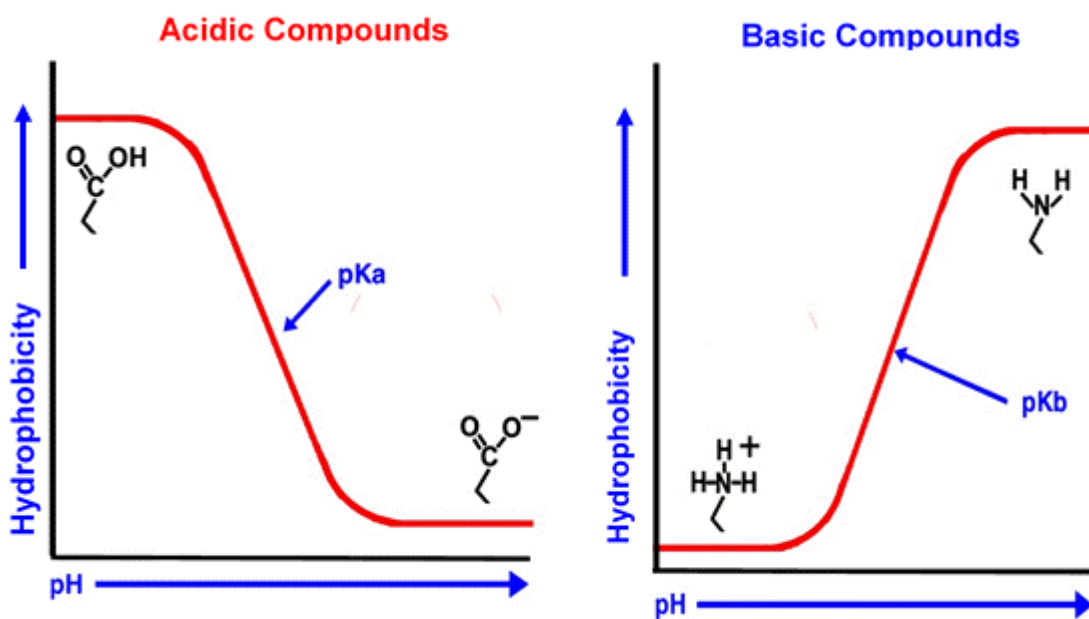


Con esta información a mano, la tarea se vuelve bastante sencilla: para retener un compuesto en una columna C18, el compuesto debe volverse tan neutro o tan hidrófobo como sea posible. Obviamente, no se puede hacer nada a los analitos que ya son neutros o que no tienen posibilidades de cargarse. Sin embargo, para los compuestos ácidos y bases débiles, podemos usar un buffer para controlar el estado de su carga. Otra propiedad química que se usa aquí es pK<sub>a</sub> (y pK<sub>b</sub>). Los ácidos y bases débiles en solución existen en dos formas: su forma neutra y aquella en la que están desprotonadas (ácidos) y protonadas (bases). A un valor de pH específico, estas dos formas conjugadas están en iguales concentraciones. Este

¿Por qué C18 es la fase estacionaria más popular para fase reversa?

valor de pH se llama  $pK_a$  y  $pK_b$ . La representación gráfica de abajo (**Figura 5**) ilustra los valores de  $pK$  y su relación con la mayor o menor hidrofobicidad de los compuestos como una función del pH.

**Figura 5.** Representación gráfica de conjugados ácidos y básicos débiles como una función del pH.



En la práctica general, se recomienda que el pH de la fase móvil se establezca 2 unidades por encima o por debajo del  $pK_b$  o  $pK_a$ , respectivamente, para asegurar que el compuesto exista en una forma con la mayor posibilidad de retención en la columna. Por supuesto, existen excepciones para todas y cada una de las reglas.



Hasta este punto, solo hemos cubierto un componente de la fase móvil, específicamente, la porción acuosa. Esto nos llevó a usar diversas propiedades químicas que ayudan a aumentar la retención del analito en una fase estacionaria C18. Ahora, lo natural es analizar cómo se eluyen los analitos de una fase estacionaria C18.

Para superar la interacción hidrofóbica en condiciones de fase reversa, el metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) y tetrahidrofurano (THF) son las principales opciones de solventes. En cuanto a fuerza, MeOH es considerado el solvente más débil y THF, el más fuerte. La fuerza se traslada a cuán rápidamente eluirán los analitos con cada solvente. Con idéntica proporción de fase móvil (MP), un solo analito eluirá mucho más rápido, con THF como solvente, que los otros. Sin embargo, la fuerza del solvente no brinda selectividad proporcional cuando se tienen en cuenta más de un analito. En el próximo artículo, abordaremos la diferencia de selectividad de los solventes en cromatografía en fase reversa.

En conclusión, C18 es una de las fases móviles más simples y convenientes para cromatografía en fase reversa.

---

Artículos Similares:

- <https://phenomenex.blog/2019/04/25/pat/>

¿Por qué C18 es la fase estacionaria más popular para fase reversa?

- <https://phenomenex.blog/2018/06/20/cromatografia-de-interaccion-hidrofílica/>
- <https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/>

Share with friends and coworkers:

- [Click to share on LinkedIn \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on Facebook \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on Twitter \(Opens in new window\)](#)
- [Click to share on WhatsApp \(Opens in new window\)](#)
- [Click to email a link to a friend \(Opens in new window\)](#)