

## **Separación de ácidos húmicos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).**

Silvia Nieto Velázquez, Fidel Pérez Moreno, Ma de Lourdes Pacheco Hernández\*

Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carr. Pachuca-Tulancingo, Km. 4.5 Hidalgo, México, Tel. 01 (771) 717 2000, ext 6785. E-mail: nieto\_velaz@yahoo.com.mx, fpmoreno@uaeh.reduaeh.mx, mpacheco@uaeh.reduaeh.mx

### **Introducción**

La materia orgánica encontrada en el suelo incluye una clase de compuestos conocidos como HUMUS o SUSTANCIAS HÚMICAS, las cuales son moléculas altamente funcionalizadas, ricas en carbón y con una fuerte tendencia a agregarse. Esto significa que pueden unirse a casi todo y son demasiado reactivas. La familia de las sustancias húmicas está formada por los ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas<sup>1</sup>.

Los Ácidos Húmicos (AHs) son polímeros naturales (extraídos principalmente de varias fuentes: suelo, carbón, turba y leonardita) altamente reactivos de los cuales, en términos generales, se postula que pueden retener agua en una proporción de veinte veces su peso, lo cual es muy importante si se considera su posible uso en el enriquecimiento de desiertos. Por otra parte, debido a su gran polifuncionalidad, durante largo tiempo se ha buscado su composición y estructura, lo cual ha sido una de las tareas más importantes de la química de los suelos y de muchos científicos que han estado trabajando en ella. Sin embargo, hasta nuestros días es aún desconocida, pero independientemente del desconocimiento de su estructura y el gran esfuerzo por tratar de esclarecerla, únicamente se tienen muy bien identificados sus principales y más abundantes grupos funcionales, los cuales son principalmente carboxílicos, fenólicos, hidroxilos, carbonilos, aminas, amidas y cadenas alifáticas, entre otros.

Sin embargo, para conocer más detalladamente las fuentes de su capacidad intercambiadora, así como el tipo de interacciones llevadas a cabo, se hace necesario el estudio analítico y sistemático de las soluciones acuosas de AHs con el fin de conocer o al menos describir más precisa y detalladamente sus propiedades termodinámicas y fisicoquímicas. Por lo tanto, en este estudio se pretende fraccionar a los AHs (provenientes de leonardita) obtenidos de una compañía mexicana (GBM Co., México) utilizando la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con la finalidad de comparar los resultados con otros AHs de diferentes orígenes (suelo, turba y carbón) y países (México, EU, etc) ya que como es bien sabido, la formación y cantidad de AHs en cada suelo es diferente, debido a que dependen del clima, temperatura, topografía, pH, luz del sol, entre otros factores.

### **Experimentación**

**Preparación de la solución acuosa de ácido húmico:** Una solución madre de AH se preparó disolviendo 10 mg de AH sólido en 360 µl de NaOH 1 M y se aforó con agua desionizada hasta 10 ml (1000 ppm)<sup>2</sup>.

**Columnas y condiciones para el estudio de HPLC:** Para estos estudios se filtraron las soluciones, solventes y la muestra con filtros de membrana millipore de 0.45 µm, las soluciones y solventes se desgasificaron durante 5 s con gas Helio grado cromatográfico.

Las columnas y las condiciones estudiadas en este trabajo se resumen en la Tabla 1.

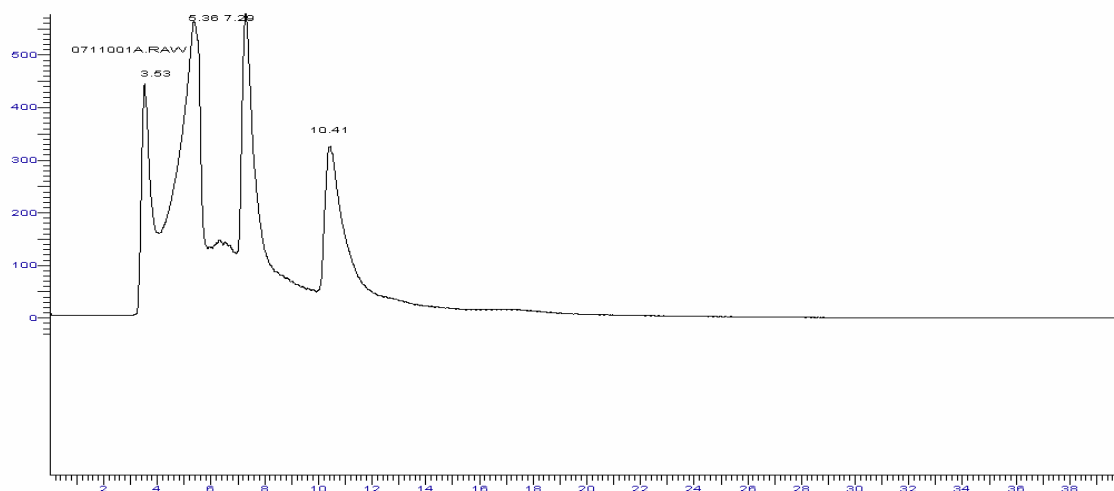
Columna	Condiciones
Columna SAX de 50 X 4.6 mm, Diámetro de partícula de 8 µm.	Detector: UV a 234 nm, Índice de Refracción a 230 nm y Fluorescencia con una $\lambda$ excitación = 330 nm y $\lambda$ emisión = 430 nm. Elusión: isocrática. Flujo: 0.5 mL min <sup>-1</sup> Inyecciones de 20 µm. Tiempo total de corrida: 15 minutos. Fases móviles: - Buffer (Ác. Bórico/Tris/ EDTA) pH = 8.5, - Mezclas: Buffer al 80% pH 9.3 y al 60% pH 10.4 (NaOH), - Mezcla: 90% Agua con 10% MeCN pH = 11 (NaOH) - Y Agua a pH = 12 (NaOH).
Columna C8 de 250 X 4.6 mm, Diámetro de partícula de 8 µm.	Detector: UV a 200 y 210 nm. Elusión: isocrática. Flujo: 0.5 mL min <sup>-1</sup> Inyecciones de 20 µm. Tiempo total de corrida: 40 y 60 minutos. Fases móviles: - Buffer (Ác. Bórico/Tris/EDTA) pH = 8.5, - Mezcla: 50% Agua con 50% MeCN pH = 11 (NaOH), - MeCN pH= 5.1 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) - Y Agua a pH = 4.1, 7.0 y 12 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> y NaOH).
Columna C18 de 250 X 4.6 mm Diámetro de partícula de 8 µm.	Detector: UV a 200 y 210 nm. Elusión: isocrática y en gradiente. Flujo: 0.5 mL min <sup>-1</sup> Inyecciones de 20 µm. Tiempo total de corrida: 30, 40 y 50 minutos. Fases móviles: - Agua pH= 4.0, 7.0, 7.3, 7.6, 8.0 y 9.0 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> y NaOH), - Mezcla: 50% Agua con 50% MeCN pH= 9.0 (NaOH), - Mezcla: Buffer al 1% y al 10% (Ác. Bórico/Tris/EDTA) pH= 8.5, - Mezcla: 50% Agua con 50% MeCN pH= 4.4 y 7.0 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> y NaOH ) - Y Agua pH= 7.0 y Agua pH= 8.0 (NaOH) (en gradiente).

**Tabla 1.** Resumen de las condiciones llevadas a cabo por HPLC para el fraccionamiento de AHs

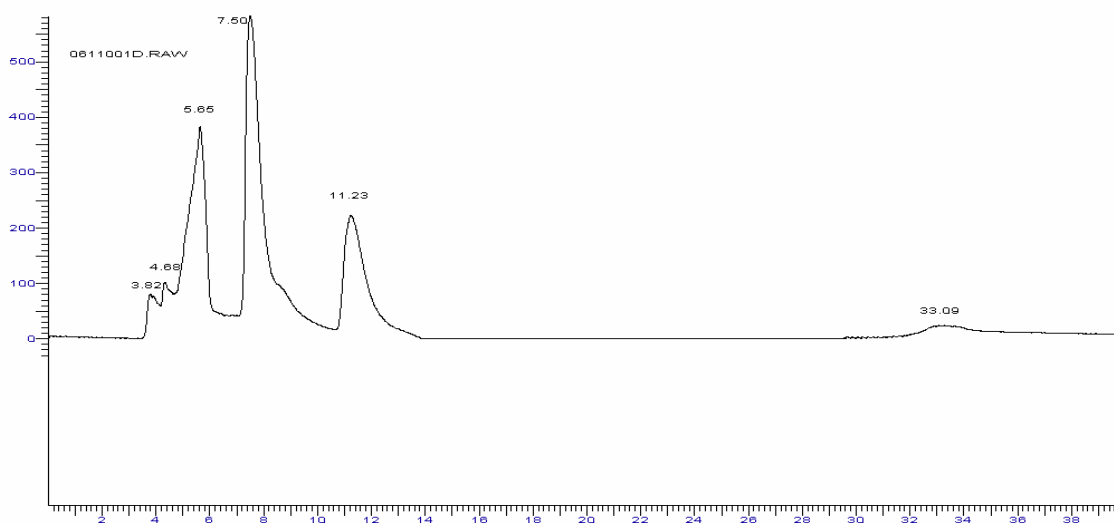
## Resultados y discusión

En primer lugar, debido a la gran reactividad de los AHs (aun con el O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> del aire), se preparó la solución de AH y se mantuvo sellada en un frasco de vidrio. Posteriormente, en el cromatógrafo de líquidos se inyectaron diferentes volúmenes de AH y se probaron también diversas columnas, fases móviles, flujos, detectores, longitud de onda de detección, etc., con la finalidad de obtener cromatogramas con el mayor número de picos resueltos lo mejor posible (mayor cantidad de fracciones de AH).

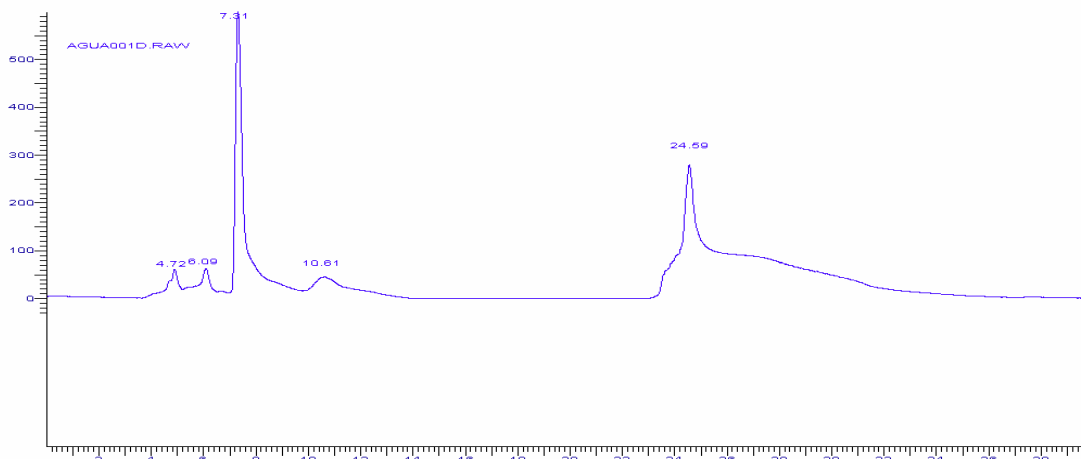
Debido a esta inestabilidad de los ácidos húmicos con el aire, se hicieron pruebas para seguir los cambios en los cromatogramas después de varios días de preparar la solución de AH bajo las mismas condiciones experimentales. En las Figuras 1, 2 y 3 se muestran los cromatogramas obtenidos los primeros días después de preparar la solución de AH (1, 3 y 30 días respectivamente).



**Figura 1.** Cromatograma de separación de HA de leonardita después de 1 día de preparado. Columna Fase Inversa C8, de 250 X 4.6 mm, diámetro de partícula de 8  $\mu$ m, detector de arreglo de diodos, fase móvil: agua acidulada a pH = 4.14, Flujo de 0.5 mL/min, tiempo de corrida de 40 min.



**Figura 2.** Cromatograma de separación de HA de leonardita después de 3 días de preparado. Columna Fase Inversa C8, de 250 X 4.6 mm, diámetro de partícula de 8  $\mu$ m, detector de arreglo de diodos, fase móvil: agua acidulada a pH = 4.14, Flujo de 0.5 mL/min, tiempo de corrida de 40 min.



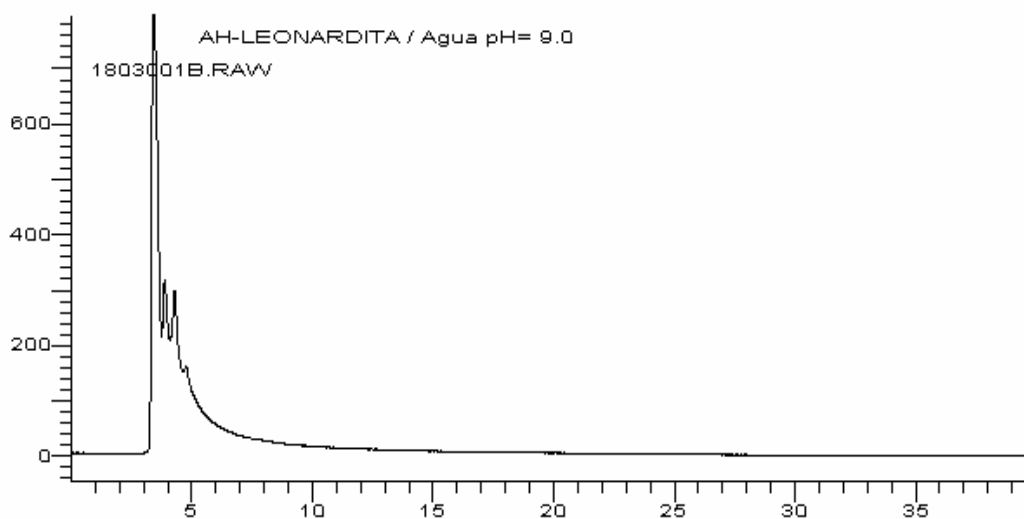
**Figura 3.** Cromatograma de separación de HA de leonardita después de 30 días de preparado. Columna Fase Inversa C8, de 250 X 4.6 mm, diámetro de partícula de 8  $\mu\text{m}$ , detector de arreglo de diodos, fase móvil: agua acidulada a pH = 4.14, Flujo de 0.5 mL/min, tiempo de corrida de 40 min.

Cabe resaltar que los cromatogramas de las Figuras anteriores (1, 2 y 3) se obtuvieron a las mismas condiciones de trabajo y lo único que varió fueron los días de “añejamiento” de la solución de AH. En estas figuras se demuestra como las soluciones de HA tienen cinética ya que al paso de los días los perfiles de los cromatogramas varían (la intensidad del pico 5 conforme pasa el tiempo va disminuyendo, mientras que los picos 1,2 y 4 van aumentando su intensidad a pesar de que la diferencia es de pocos días), es decir, se observa el cambio en las intensidades de los picos conforme pasa el tiempo.

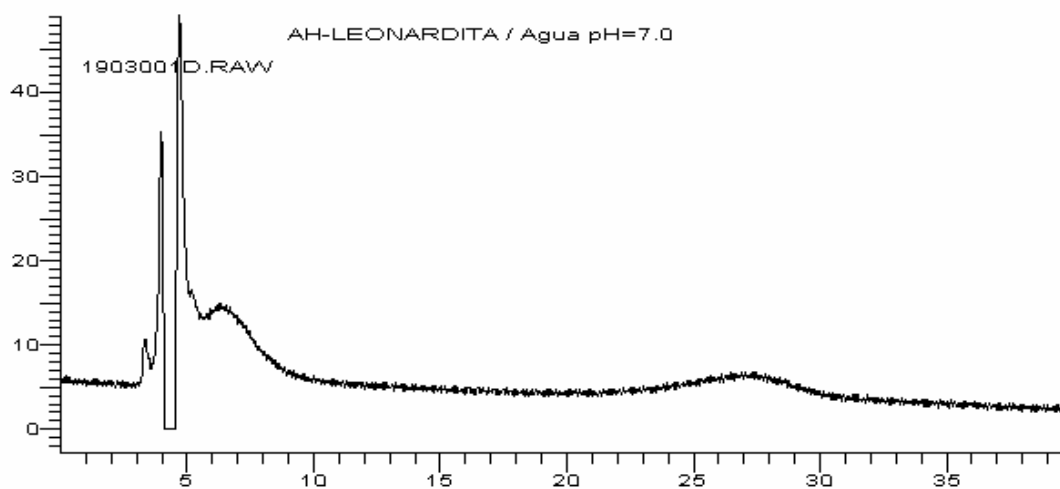
Con el objeto de realizar separaciones reproducibles se decidió utilizar para el fraccionamiento soluciones de AH preparadas con al menos 3 semanas de “añejamiento”.

Por otra parte, al intentar fraccionar los AHs utilizando una fase móvil con pH básico (Figura 4), se observó que el AH no se logró separar (unicamente 3 señales), pero debido a que la intensidad del pico era bastante alta se propone que quizá esto es debido a la solubilidad que presentan los AHs a valores de pH básicos, por lo que se puede pensar que no hay interacción de la muestra en la columna y se eluye completamente toda la solución de AH al mismo tiempo sin lograr fraccionamiento.

Mientras que con una fase móvil a pH neutro o ácido hay mayor interacción de los diferentes grupos del AH en la columna y se logra separar, pero la intensidad de los picos es muy baja por esta razón no se puede tener una buena recolección de las fracciones. Esto se debe como ya se mencionó anteriormente a la solubilidad que presentan el AH ya que a valores de pH ácidos los AHs son poco solubles y a  $\text{pH} < 2$  precipitan completamente, por lo tanto quizá gran parte del AH se retiene en la columna (Figura 5).



**Figura 4.** Columna C8 de 250 X 4.6 mm, diámetro de partícula de 8  $\mu$ m, detector UV 210 nm, Flujo de 0.5 mL/min, Fase móvil agua pH= 9.0 (NaOH), Elución isocrática, Tiempo total de corrida 40 min.



**Figura 5.** Columna C8, de 250 X 4.6 mm, diámetro de partícula de 8  $\mu$ m, Detector UV 210 nm, Flujo de 0.5 mL/min, Fase móvil agua pH= 7.0, Elución isocrática, Tiempo total de corrida 40 min.

En conclusión, se considera que la mejor separación es la presentada en la Figura 3, ya que las condiciones experimentales utilizadas permiten ver el fraccionamiento de los AHs en cinco señales principales, las cuales se pueden seguir rompiendo hasta llegar a los componentes básicos. Por otra parte, el fraccionamiento de los AHs sigue bajo estudio variando factores que puedan contribuir al rompimiento del AH.

## Conclusiones

En este trabajo se probaron tres tipos de columnas (SAX, C8 y la C18), de las cuales sólo con la C8 se ha podido fraccionar el AH de la mejor manera, en las condiciones que ya se mencionaron anteriormente ahora lo que se pretende es reproducir esta separación y también recolectar las fracciones obtenidas y analizarlas.

Para esto se ha tratado de separar en “fracciones” al AH para determinar la estructura de cada fracción, las cuales pueden ser estudiadas independientemente.

Estudios recientes se han enfocado más hacia las fracciones, ya que son las fracciones más que los AHs, en general, las que son de gran interés debido a que cada fracción brinda más información con respecto a las propiedades de estos compuestos, y puesto que cada fracción tiene mayor capacidad de interacción con metales pesados, compuestos xenobióticos, pesticidas, entre otros.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico parcial otorgado por PROMEP No. de Folio UAEHGO-PTC-202, a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en especial al Centro de Investigaciones Químicas y a la Unidad Central de Laboratorios por su apoyo en el desarrollo del trabajo.

Agradezco a la Dra. Ma. de Lourdes Pacheco Hernández, por todo el apoyo que me ha brindado, por la paciencia y dedicación. También Agradezco al Quím. Fidel Pérez Moreno, por su apoyo en la utilización del Cromatógrafo de Líquidos y a la MC. Ma Elena Páez Hernandez por todo su apoyo durante la realización de los experimentos.

## Referencias

1. F. J. Stevenson, *Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reactions*. Willey Interscience, New York, 1982.
2. M.L Pacheco H., *Tesis de Doctorado*, Brno, República Checa, 2002.
3. J. Havel, D. Fetsch, E.M. Peña- Méndez, P. Lubal, J. Havliš. In: R.S. Swift, K.M. Spark, Eds. *Understanding and managing organic matter in soils, sediments and waters*. IHSS, Australia, (2001), 77-86.
4. J. Havel, P. Prošek, K. Novotna, G. Dagmar. *J. Chromatogr. A* 1014 (2003), 117-127.
5. [www.ihss.gatech.edu](http://www.ihss.gatech.edu)