

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE
SURFACTANTES Y OTROS COMPONENTES EN
PRODUCTOS DE LIMPIEZA CON APLICACIÓN EN
CONTROL DE CALIDAD DE FORMULACIONES
INDUSTRIALES

VIRGINIA BERNABÉ ZAFÓN

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 9 de Novembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Víctor Cerdá Martín
- D. Santiago Maspoch Andrés
- D. Ángel Ríos Castro
- D. Manuel Silva Rodríguez
- D. Juan José Baeza Baeza

Va ser dirigida per:

D. Guillermo Ramis Ramos

D. Ernesto Fco. Simó Alfonso

©Copyright: Servei de Publicacions

Virginia Bernabé Zafón

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6688-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

FACULTAT DE QUÍMICA

**Caracterización y determinación
de surfactantes y otros componentes
en productos de limpieza
con aplicación en control de calidad
de formulaciones industriales**

Memoria para alcanzar
el grado de doctor presentada por:

Virginia Bernabé Zafón

Directores:

Dr. Guillermo Ramis Ramos
Dr. Ernesto Fco. Simó Alfonso

Junio 2006

D. Guillermo Ramis Ramos, catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia y D. Ernesto Fco. Simó Alfonso, profesor titular del mismo departamento,

Certifican

Que la presente memoria, que lleva por título *Caracterización y determinación de surfactantes y otros componentes en productos de limpieza con aplicación en control de calidad de formulaciones industriales* constituye la tesis doctoral de Dña. Virginia Bernabé Zafón.

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo, como su redacción.

Burjassot, Junio 2006

Guillermo Ramis Ramos

Ernesto Fco. Simó Alfonso

Esta tesis se ha realizado gracias a una beca de
Formación de Personal Universitario del MEC

A Fran y a mis padres

Agradecimientos:

Me gustaría agradecer a todos los que de forma directa o indirecta han contribuido a que haya llegado al final de la tesis, ha sido un camino largo, y a veces un poco duro, pero ha valido la pena y también me ha aportado muchas cosas positivas.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Guillermo Ramis Ramos y el Dr. Ernesto Fco. Simó Alfonso, de los cuales he aprendido todo acerca del trabajo científico. Desde el principio han confiado en mí y me han apoyado en todo momento.

Al Dr. José Ramón Torres Lapasió por su colaboración en algunos capítulos de la presente tesis.

En el trabajo de laboratorio pueden aparecer muchos problemas técnicos, por lo tanto, tengo que agradecer a D. Hugo Núñez Sánchez, técnico superior de apoyo a la investigación, por su ayuda imprescindible en esos momentos.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 10: Amparo, Anna, María Jesús, Miguel, Ana, Míriam, Mónica, José Manuel, Isabel, José María, Cristina y Araceli. Todos ellos han conseguido que lo pasara genial en el laboratorio, además de trabajar nos hemos divertido mucho.

A mis amigas, que empezaron conmigo 1º de Químicas (y algunas han llegado conmigo hasta la tesis): Consuelo, Gemma, Sonia y Sara.

A mis antiguas compañeras y amigas que también estuvieron trabajando en el Laboratorio 10: Martha, y su hija Allisson, Carla, Silvia, Patricia y Victoria.

También tengo que dar las gracias a mis padres, por animarme a empezar y por su ayuda incondicional en todos los aspectos. Y al resto de mi familia, haciendo especial mención a mis hermanos, Santi y Jose.

Y por supuesto, tengo que agradecer a Fran, por estar ahí.

ABREVIATURAS

AAPPs	Alquilaminopolifosfonatos
ABS	Alquilbenceno sulfonato
ACN	Acetonitrilo
AES	Alquil éter sulfatos
ALS	Mínimos cuadrados alternados
AMP	Adenosín monofosfato
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APPs	Alquilpolifosfonatos
AQCA	Ácido antraquinona-2-carboxílico
AS	Alquil sulfatos
ATP	Adenosín trifosfato
BGC	Cromóforo de fondo
BGE	Electrolito de fondo
CAPB	Cocamidopropil betaínas
CDEA	Dietanolamida de coco
CE	Electroforesis capilar
CSS	Trazadores de suavizado cúbico
DETA	Dietilentriamina
DOSS	Diocilsulfosuccinato
DPA	Dipentilamina
EIC	Cromatograma de ion total
EIE	Electroferograma de ion extraído
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EO	Óxido de etileno
EOF	Flujo electroosmótico
ESI	Ionización por electronebulización
FAEs	Alcoholes grasos etoxilados
GC	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPD	Detección fotométrica indirecta
ITMS	Espectrometría de masas de trampa iónica

NBDW	Ventana de detección de balance nulo
OPA	Aproximación por proyección ortogonal
SDC	Desoxicolato sódico
SDS	Dodecil sulfato sódico
TFA	Ácido trifluoroacético
TIC	Cromatograma de ion total
TIE	Electroferograma de ion total
TMBA	Ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico

ÍNDICE

Capítulo I. *Introducción general*

I.1. Electroforesis capilar	1
I.2. Detección por espectrometría de masas	10
I.3. Surfactantes.....	21
I.4. Referencias	32

Capítulo II. *Objetivos*..... 35

Capítulo III. *Caracterización y cuantificación de mezclas de alquil éter sulfatos y ácidos carboxílicos mediante electroforesis capilar con detección fotométrica indirecta*

III.1. Introducción	37
III.2. Materiales y métodos	39
III.3. Resultados y discusión	41
III.4. Conclusiones	58
III.5. Referencias	59

Capítulo IV. *Resolución de solutos absorbentes y no absorbentes solapados usando una ventana de absorción de balance nulo o deconvolución multivariante con aplicación a electroforesis capilar de surfactantes aniónicos*

IV.1. Introducción	63
IV.2. Materiales y métodos	65
IV.3. Resultados y discusión	67
IV.4. Conclusiones	91
IV.5. Referencias	93

Capítulo V. *Electroforesis capilar mejorada mediante corrección automática bidimensional del ruido de fondo usando trazadores de suavizado cúbico (cubic smoothing splines, CSS) y análisis multivariante de los datos, con aplicación a la caracterización de mezclas de surfactantes*

V.1. Introducción	95
V.2. Materiales y métodos	99
V.3. Resultados y discusión	101
V.4. Conclusiones	127
V.5. Referencias	129

Capítulo VI. *Determinación de alcoholes grasos etoxilados sin derivatizar mediante ionización por electronebulización-espectrometría de masas*

VI.1. Introducción	133
VI.2. Materiales y métodos	139
VI.3. Resultados y discusión	142
VI.4. Conclusiones	163
VI.5. Referencias	165

Capítulo VII. *Determinación de alcoholes grasos mediante espectrometría de masas previa oxidación con óxido crómico*

VII.1. Introducción	169
VII.2. Materiales y métodos	170
VII.3. Resultados y discusión	173
VII.4. Conclusiones	182
VII.5. Referencias	183

Capítulo VIII. *Caracterización de alquilpolifosfonatos industriales mediante ionización por electronebulización-espectrometría de masas, e identificación de las impurezas mediante electroforesis capilar acoplada con espectrometría de masas*

VIII.1. Introducción	185
VIII.2. Materiales y métodos	187
VIII.3. Resultados y discusión	190
VIII.4. Conclusiones	208
VIII.5. Referencias	209

Capítulo IX. *Caracterización rápida de alquilpolifosfonatos por electroforesis capilar : con detección espectrofotométrica indirecta y espectrometría de masas*

IX.1. Introducción	211
IX.2. Materiales y métodos	212
IX.3. Resultados y discusión	214
IX.4. Conclusiones	245
IX.5. Referencias	246

Capítulo X. *Conclusiones generales y perspectivas* 247

Capítulo I

Introducción general

I.1. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (*capillary electrophoresis*, CE) es una técnica de separación que se basa en la migración diferencial de especies cargadas en el seno de un tubo capilar y en presencia de un campo eléctrico. En general, se usan capilares que tienen entre 25 y 100 μm de diámetro interno. La alta resistencia eléctrica del capilar permite aplicar voltajes altos con una mínima generación de calor, reduciéndose el tiempo de análisis y aumentando la eficacia. El calor generado es disipado con rapidez debido a la gran relación superficie/volumen del capilar. La fuerza que impulsa el flujo en CE se genera en la misma pared interna del capilar mediante el efecto conocido como electroósmosis, lo que da lugar a un perfil plano del flujo. Se elimina así una de las causas del ensanchamiento del flujo cuando éste se genera externamente, como sucede en cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography*, HPLC) por lo que en CE se obtienen picos que generalmente superan los 10^5 platos teóricos [1-6].

Hjertén publicó en 1967 la primera separación electroforética en un tubo capilar de vidrio [7]. Posteriormente, Virtanen [8] y Mikkers [9] desarrollaron separaciones electroforéticas en capilares de vidrio y PTFE respectivamente, con un diámetro interno de aproximadamente 200 μm . Hacia 1981, Jorgenson y Lukacs [10] realizaron separaciones en capilares de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno. Jorgenson [11] clarificó la teoría de la CE y describió las relaciones existentes entre los parámetros operacionales y la calidad de la separación, demostrando el gran potencial de la técnica como método analítico.

1.1.1. El mecanismo de separación en electroforesis capilar

La velocidad que adquiere un soluto cargado en el seno de un campo eléctrico se puede expresar como:

$$v = \mu_e E \quad (1)$$

donde v es la velocidad del ion, μ_e la movilidad electroforética intrínseca y E el campo eléctrico aplicado. La movilidad electroforética, es una constante característica del ion en un determinado medio. La movilidad viene determinada por un balance entre la fuerza electrostática, F_e , y las fuerzas de rozamiento, F_f :

$$F_e = q E \quad (2)$$

$$F_f = 6 \pi \eta r v \quad (3)$$

donde r es el radio efectivo del ion y η es la viscosidad de la disolución. Cuando se alcanza el estado estacionario ambas fuerzas son de la misma intensidad pero de signo opuesto, por lo que:

$$\mu_e = q / (6\pi\eta r) \quad (4)$$

De esta ecuación se deduce que las partículas con mayor densidad de carga tendrán movilidades mayores. La movilidad electroforética intrínseca difiere generalmente de la observada experimentalmente. La movilidad medida en función del tiempo de migración se conoce como movilidad aparente o efectiva, siendo diferente a la intrínseca por la presencia del flujo electroosmótico.

1.1.2. El flujo electroosmótico

El flujo electroosmótico o electroendosmótico (*electroosmotic flow*, EOF) es uno de los principales factores que afectan a las separaciones electroforéticas. En contacto con un medio acuoso, la superficie del capilar tiene generalmente un exceso de carga negativa debido a la ionización de los grupos silanol. Para capilares de sílice fundida se puede

controlar el EOF reduciendo o aumentando el número de grupos silanol en forma aniónica. Así, el flujo electroosmótico es prácticamente nulo por debajo de pH 3, y aumenta con el pH. En capilares de materiales no aniónicos como el PTFE, también se presenta este fenómeno, siendo debido a la adsorción de aniones sobre la superficie.

Los iones que se encuentran en la disolución tienden a neutralizar la superficie del capilar, formando una doble capa y creando una diferencia de potencial conocida como potencial zeta. La primera capa, o capa de adsorción primaria, está fuertemente retenida, pero sobre ella se establece una capa difusa en la que predominan los iones del signo contrario al potencial de la superficie. Esta segunda capa está menos retenida, por lo que puede moverse por aplicación de una diferencia de potencial, y en su movimiento arrastra a todo el líquido. Una representación esquemática de este fenómeno se puede observar en la Fig. 1.

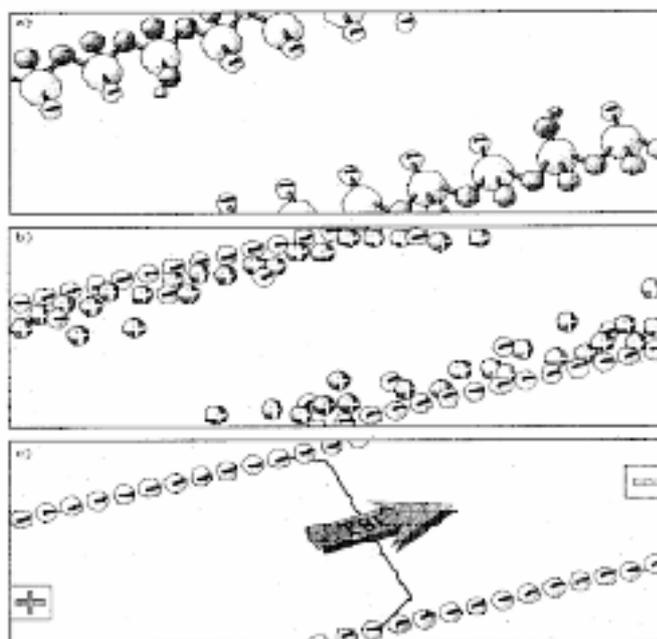


Figura 1. Flujo electroosmótico: a) carga negativa sobre la superficie; b) cationes acumulados sobre la superficie; c) flujo catódico por aplicación de campo eléctrico.

En función de los términos de velocidad o de movilidad, la magnitud del flujo electroosmótico se puede expresar como sigue:

$$v_{EOF} = (\varepsilon \zeta / \eta) E \quad (5)$$

$$\mu_{EOF} = \varepsilon \zeta / \eta \quad (6)$$

donde v_{EOF} es la velocidad del flujo electroosmótico, μ_{EOF} es la movilidad electroosmótica, ζ es el potencial zeta y ε es la constante dieléctrica del medio. La μ_{EOF} depende de la naturaleza de la pared del capilar y de la composición del medio, especialmente del pH. El potencial zeta es función de la carga por unidad de superficie, y no sólo depende del pH, sino también de la fuerza iónica del tampón. Así por ejemplo, un aumento en la misma provoca una disminución del espesor de la doble capa, una disminución del potencial zeta y, por tanto, una reducción del flujo. La velocidad total de las partículas cargadas es la suma de su velocidad electroforética y de la velocidad electroosmótica:

$$v = v_e + v_{EOF} \quad (7)$$

El flujo se toma como positivo cuando va del ánodo al cátodo. Como resultado de la suma de las dos movilidades (intrínseca y electroosmótica), los cationes avanzan más rápidamente que el flujo, las moléculas neutras avanzan a la misma velocidad del EOF, y los aniones se retrasan, tanto más cuanto mayor es su densidad de carga.

El control del EOF requiere alterar la carga de la superficie del capilar o la viscosidad del tampón. En la Tabla 1 se indican las técnicas que suelen emplearse habitualmente para control del EOF.

Tabla 1. Técnicas de control del flujo electroosmótico.

Variable	Resultado	Otros efectos
Campo eléctrico	Cambio proporcional en el EOF	-Al reducirse E pueden disminuir la eficacia y la resolución -Calentamiento por efecto Joule a campos elevados
pH del tampón	El EOF disminuye a pH bajo y aumenta a pH alto	-Efecto importante sobre el EOF -Puede alterar la carga y/o estructura del soluto
Fuerza iónica del tampón	Un aumento provoca disminución del potencial zeta y del EOF	-Elevada fuerza iónica genera corriente elevada y calentamiento -Baja fuerza iónica facilita la adsorción de la muestra -Distorsión de los picos si la movilidad de los iones del tampón difiere de la movilidad de los analitos -Si se disminuye limita el hacinamiento de la muestra
Temperatura	Cambia la viscosidad un 2-3 % por °C.	-Es útil si la temperatura se controla instrumentalmente
Modificador orgánico	Cambia el potencial zeta y la viscosidad	-Cambios complejos -Puede alterar la selectividad
Surfactante	Se adsorbe a la pared del capilar vía interacciones hidrofílicas y/o iónicas	-Alteran significativamente la selectividad -Surfactantes aniónicos aumentan el EOF -Surfactantes catiónicos pueden disminuir o invertir el EOF
Polímero hidrofílico	Se adsorbe a la pared del capilar vía interacciones hidrofóbicas	-Disminuye el EOF por apantallamiento de la carga de la superficie y aumento de la viscosidad
Polímero policationico	Se adsorbe a la pared del capilar vía interacciones hidrofóbicas y electrostáticas	-Eficaz a concentraciones muy bajas
Revestimiento covalente	Enlace químico a la pared del capilar	- Múltiples modificaciones posibles (hidrofilia o carga) - Problemas de estabilidad del recubrimiento

1.1.3. Movilidad y tiempo de migración

El tiempo que un soluto necesita para migrar desde el punto de inyección hasta el punto de detección se denomina tiempo de migración o de retención dependiendo del modo de trabajo. Éste se puede relacionar con una serie de parámetros experimentales a través de:

$$\mu_a = \frac{l}{tE} = \frac{IL}{tV} \quad (8)$$

donde μ_a es la movilidad aparente o total, que corresponde a la suma de las movilidades electroforética y electroosmótica, V es el voltaje aplicado, l es la longitud efectiva del capilar, considerada como la distancia entre el extremo donde se realiza la inyección y la ventana de detección, L es la longitud total del capilar, t es el tiempo de migración y E es el campo eléctrico.

1.1.4. Modos de operación en electroforesis capilar

Una característica importante de la electroforesis capilar es la gran versatilidad en las formas de operación. Se pueden distinguir seis modos de operación que corresponden a otros tantos mecanismos de separación: electroforesis capilar zonal (*capillary zone electrophoresis*, CZE), cromatografía micelar electrocinética (*micellar electrokinetic chromatography*, MEKC), electroforesis capilar en gel (*capillary gel electrophoresis*, CGE), isoelectroenfoco capilar (*capillary isoelectric focusin*, CIEF), isotacoforesis capilar (*capillary isotachopheresis*, CITP) y electrocromatografía capilar (*capillary electrochromatography*, CEC). A su vez, estos pueden combinarse para dar lugar a mecanismo de separación mixtos. Los modos de electroseparación más utilizados son los dos primeros:

1.1.4.1 Electroforesis capilar zonal

La electroforesis capilar zonal es la técnica más ampliamente empleada debido a su simplicidad y su versatilidad. El capilar se llena sólo con el tampón, y es en este medio donde tiene lugar la separación gracias a las diferentes movilidades electroforéticas de los solutos. En presencia de un EOF elevado, es posible la separación y detección tanto de solutos aniónicos como catiónicos en la misma inyección.

La selección del tampón que hace las veces de electrolito de fondo (*background electrolyte*, BGE) o de soporte de la corriente, es extremadamente importante. Los tampones utilizados en electroforesis capilar deben cumplir las siguientes condiciones:

- i) buena capacidad amortiguadora en el intervalo de pH requerido,
- ii) baja absorbancia a la longitud de onda de detección,
- iii) baja movilidad electroforética para minimizar la generación de corriente.

Los llamados tampones biológicos (Tris, borato, histidina, etc.) son especialmente recomendables por su baja movilidad electroforética, por lo que pueden ser utilizados en alta concentración, sin que ello implique un aumento significativo en la corriente, y por tanto un aumento de la temperatura por efecto Joule. Algunos de ellos pueden ser utilizados para formar complejos con los solutos y alterar la selectividad. Por ejemplo, el borato ha sido utilizado para aumentar la separación de catecoles y carbohidratos [12].

La selectividad en la separación puede ser fácilmente alterada mediante cambios en la naturaleza del BGE que incluyen el control del pH y de la naturaleza de los iones del tampón, así como también el uso de diversos aditivos, tales como iones dobles, polímeros lineales, disolventes orgánicos miscibles, selectores quirales, iones metálicos, agentes solubilizantes por rotura de puentes de hidrógeno, agentes formadores de pares de iones, etc. En la Tabla 2 se muestra una selección de aditivos.

Tabla 2. Algunos aditivos habituales en CZE.

Aditivo	Ejemplo	Efectos
Disolventes orgánicos	Metanol, acetonitrilo	Alteran el EOF y la hidrofobicidad
Iones dobles	Tris, CHAPS ^a	Aumentan la fuerza iónica sin aumentar significativamente la conductividad
Selectores quirales	Ciclodextrinas, éteres corona	Quiralidad y solubilización
Aminas y poliaminas	Diaminopentano, putrescina, polibreno	Pares iónicos, inversión de EOF
Formadores de puentes de hidrógeno	Urea	Solubilización

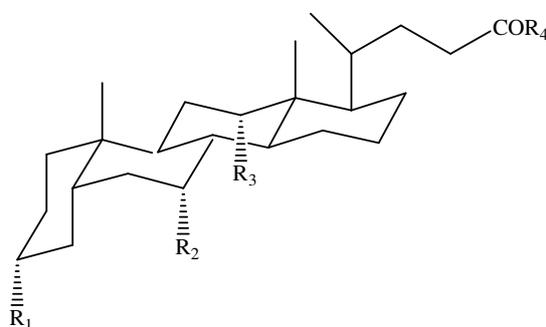
^a3-[3-(cloroamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato

1.1.4.2 Cromatografía micelar electrocinética

La cromatografía micelar electrocinética fue introducida en 1984 por Terabe y col. [13-16], y es una de las formas de electroforesis más ampliamente utilizadas. Esta técnica electroforética se puede utilizar para la separación tanto de especies cargadas como de especies sin carga eléctrica neta. Se basa en las diferencias de las constantes de asociación entre solutos y micelas. La separación de especies neutras en MEKC tiene lugar en un tampón que contiene surfactantes por encima de su concentración micelar crítica (CMC). Tanto las micelas como los iones libres del surfactante iónico pueden migrar a favor o en contra del EOF, dependiendo de su carga y del signo del potencial zeta de la pared del capilar. Durante su migración, las micelas interactúan con los solutos de una forma cromatográfica, tanto por interacciones hidrofóbicas como por interacciones electrostáticas. Las especies no cargadas que interactúan con la micela modifican su movilidad, distinguiéndose del flujo electroosmótico, y las que no interactúan se mueven con el EOF.

Los surfactantes utilizados pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos, iones dobles, o mezclas de ellos. Con flujo no invertido, los surfactantes aniónicos, como el dodecil sulfato sódico (SDS) migran hacia el ánodo, es decir, en dirección opuesta al EOF. Si la polaridad es positiva, es necesario un EOF muy elevado para que las micelas lleguen a moverse en la dirección del cátodo, alcanzando el detector. Generalmente se utilizan valores elevados del pH para mantener un valor de EOF razonable, y así asegurar la migración de los solutos asociados a las micelas de SDS hacia el detector.

Las sales biliares constituyen una familia de surfactantes con propiedades singulares. Suelen utilizarse los derivados aniónicos y bi-iónicos que se muestran en la Fig. 2. La estructura de la parte hidrofóbica es grande y rígida. Esta constituida por los cuatro ciclos alifáticos de los esteroides. Las sales biliares suelen tener números de agregación más bajos que los surfactantes alifáticos convencionales.



Sal biliar	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Colato sódico	OH	OH	OH	ONa
Desoxicolato sódico	OH	H	OH	ONa
Taurocolato sódico	OH	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ Na
Taurodesoxicolato sódico	OH	H	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ Na

Figura 2. Estructura de las sales biliares.

Las propiedades físicas de las sales biliares han sido ampliamente estudiadas, mientras que existe cierta controversia acerca de la estructura de sus micelas [17, 18, 19]. Las micelas de sal biliar pueden tolerar altas concentraciones de disolvente orgánico, como por ejemplo metanol, sin que se observe pérdida de eficacia o un aumento excesivo del tiempo de análisis en experimentos de MEKC [20]. Estas deseables características, junto con su inherente quiralidad, ha impulsado el uso de sales biliares en MEKC [20-23].

De forma análoga a como sucede en cromatografía líquida con fases móviles micelares, el uso de los aditivos citados anteriormente permite modificar la selectividad. Así por ejemplo, la adición de disolventes orgánicos tales como metanol o acetonitrilo, en concentraciones de 10-20%, modifica la selectividad al tiempo que aumenta la solubilidad de los compuestos orgánicos en la fase acuosa. Sin embargo, un modificador orgánico en concentración superior rompe la estructura micelar del surfactante, y provoca un deterioro de la separación.

I.2. Detección por espectrometría de masa

La espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) da nombre a un conjunto de técnicas utilizadas para la medida de la masa de los iones y su abundancia en la fase gaseosa. Este conjunto de técnicas es uno de los más versátiles e importantes en Química Analítica. Las técnicas de masas son capaces de suministrar información sobre la composición cualitativa y cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos en muestras complejas, la estructura molecular, las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras, y la estructura y composición de superficies. Las etapas de una medida en MS son:

- i) generación de moléculas en fase gaseosa
- ii) ionización
- iii) separación en función de su relación masa /carga, m/z

iv) detección de los picos de los iones

Las tres partes básicas de un detector de espectrometría de masas son la fuente de ionización, el analizador o filtro de masas y el transductor o detector (Fig. 3). La muestra puede introducirse tanto en fase gaseosa como en fase líquida o sólida (siempre que los líquidos se evaporen o se sublimen los sólidos). La zona donde se introducen las moléculas, se evaporan, se ionizan y se aceleran se llama fuente de ionización. La muestra gaseosa se ioniza entre dos placas cargadas, las moléculas se rompen en fragmentos, algunos de los cuales están cargados (iones) y otros no. Se aceleran los iones por aplicación de un potencial eléctrico y se enfocan utilizando campos eléctricos y rendijas. Los iones acelerados pasan desde la fuente de ionización a uno de los numerosos tipos posibles que hay de analizadores de masas. En la mayoría de los analizadores de masas se separan los iones en base a su relación m/z , de forma que llegan al detector en diferentes momentos. Esta pequeña corriente de iones se amplifica mediante el transductor, normalmente un multiplicador de electrones, que amplifica las corrientes de modo similar a un tubo fotomultiplicador [24,25].

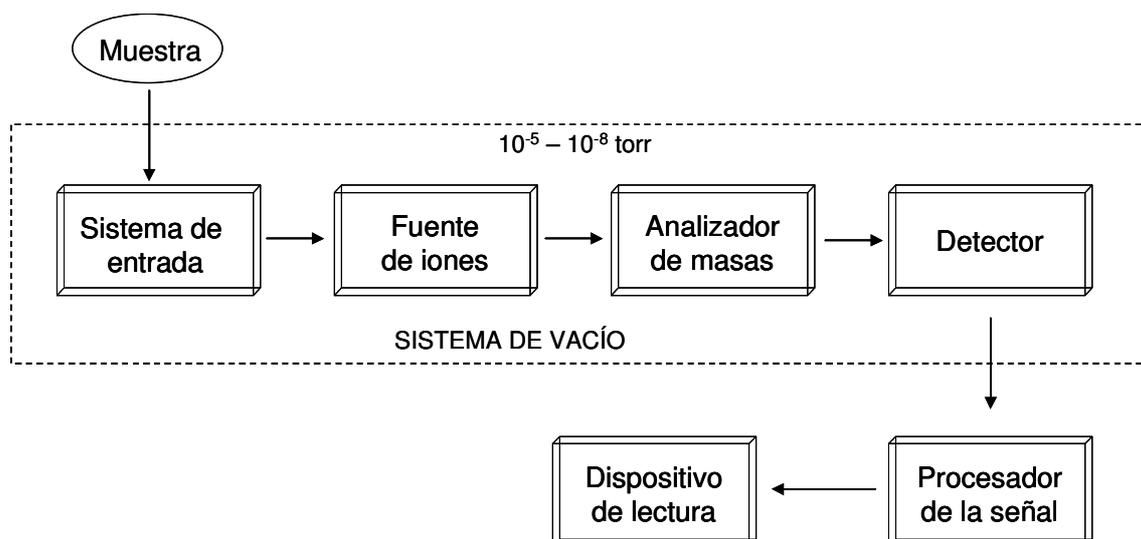


Figura 3. Componentes básicos de un espectrómetro de masas

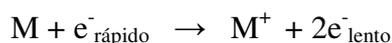
El espectro de masas muestra las cantidades de masa recogidas a valores crecientes de la relación m/z . Cada pico del espectro da información sobre la masa molecular de un determinado fragmento de la molécula que lo originó. El fragmento de mayor tamaño suele ser la molécula sin fraccionar con pérdida de un electrón, M^+ , con la adición de un protón, $[M+H]^+$, u otro fragmento. Del espectro de masas se deducen de forma inmediata el peso molecular del analito, M , y los pesos moleculares de los sustituyentes y de otras partes de la molécula.

1.2.1. Fuentes de ionización

Las fuentes de iones más habituales son las siguientes [24]:

a) Impacto electrónico (*electron ionization*, EI) y ionización química (*chemical ionization*, CI)

Los electrones requeridos para ionizar la muestra se emiten desde un filamento incandescente y se aceleran entre electrodos hasta alcanzar unos 70 eV. Las moléculas de la muestra se evaporan, y el haz de electrones pasa a través del vapor de la muestra provocando la formación de iones positivos:



Estos iones son repelidos fuera de la cámara, se enfocan y se introducen en el analizador de masas.

Las fuentes de ionización química utilizan un gas reactivo como mediador para “suavizar” las condiciones de ionización de la muestra. En la cámara de ionización se introduce el gas que va a actuar de mediador. Tradicionalmente se ha usado metano, y a veces amoníaco. Una alternativa más reciente consiste en usar metanol. La ventaja del metanol es que transfiere un único protón a los solutos sin que se produzcan reacciones secundarias. Si se utiliza metano o amoníaco, el gas se ioniza por el haz de electrones, y a través de las

subsiguientes reacciones que tienen lugar en fase gaseosa, acepta protones formando iones moleculares. Estos iones se adicionan a los solutos, dando lugar a diversos iones con más masa que las moléculas originales. En cambio el metanol produce un único ion $[M+H]^+$ para cada soluto. Este ion se acelera a través del campo eléctrico hacia el analizador de masas. Las fuentes EI y CI son habituales en cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC).

b) Ionización por electronebulización (*electrospray ionization*, ESI)

Es una técnica de ionización mucho menos agresiva que la EI y CI. En electronebulización a partir de una disolución que fluye a través de una aguja hueca sometida a un campo eléctrico de $5 - 10 \text{ kV cm}^{-1}$, se forman gotas pequeñas con carga eléctrica. La aguja tiene dos flujos concéntricos, el interior que lleva la muestra y el exterior que lleva un gas que ayuda a la formación del aerosol. Las gotas que tienen carga neta son atraídas hacia un electrodo a través del espacio abierto de la cámara de nebulización. En la cámara las gotas se mueven en contra del gas de secado (ver Fig. 4) y se evapora parte del disolvente. Como consecuencia de este proceso, el volumen de las gotas disminuye y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a acumularse entre sí. En un momento dado, la repulsión de los iones se hace mayor que la tensión superficial que mantiene unidas a las gotas y éstas se rompen. De estas gotas se generan los iones en fase gaseosa. Los iones son atraídos hacia el orificio de entrada del analizador de masas mediante un segundo campo eléctrico. Dependiendo de la polaridad de este campo, en el analizador de masas entran sólo los aniones (operación en modo negativo) o sólo los cationes (operación en modo positivo).

El proceso de generación de los iones y de evaporación del disolvente son reacciones superficiales, y cualquier cambio sobre la superficie va a influir en el proceso. La fuente de ionización por electronebulización puede producir iones con carga múltiple, lo cual permite el análisis de compuestos de elevado peso molecular. Dos características importantes de la ESI son la generación de iones en fase gas en la misma forma en que se encuentran

inicialmente en disolución, y la relativa facilidad para impedir la entrada de grandes cantidades de disolvente en el analizador de masas. Por esta última razón, esta es una fuente muy utilizada en los acoplamientos HPLC-MS.

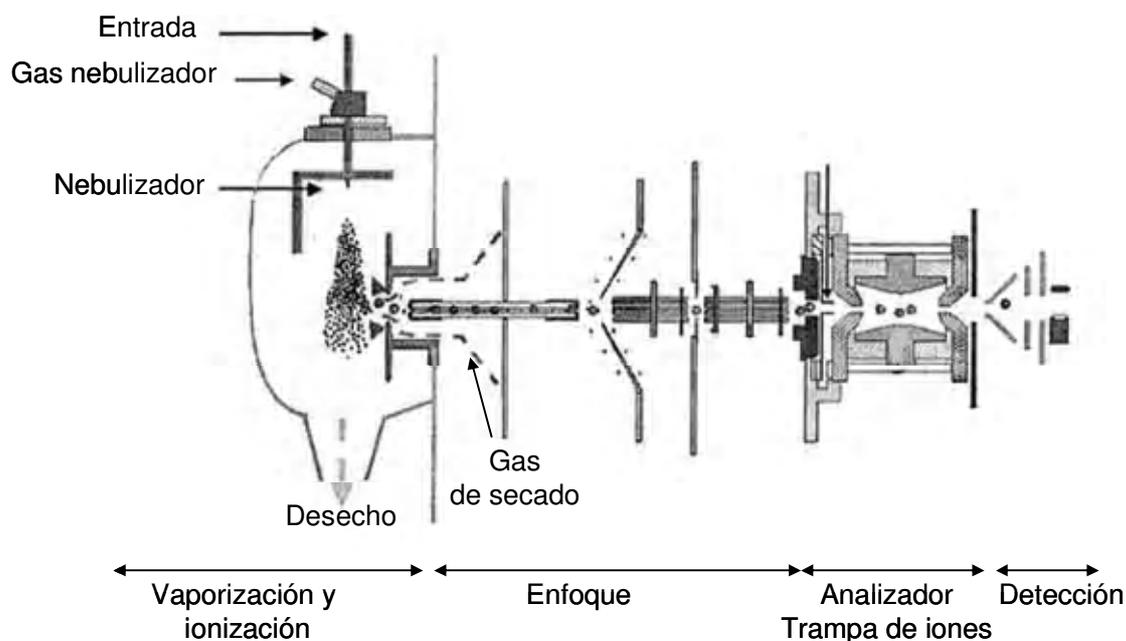


Figura 4. Esquema de un espectrómetro de masas con fuente ESI ortogonal.

c) Ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization, APCI*)

Esta fuente de ionización es una modificación de la fuente ESI, útil para detectar moléculas difíciles de ionizar. En una fuente ESI la ionización se produce por efecto de un campo eléctrico durante la ionización, mientras que en APCI la nebulización y la ionización se producen secuencialmente. La muestra, nebulizada mediante una corriente de nitrógeno, circula en torno a una aguja o electrodo que mantiene una diferencia de potencial de unos pocos miles de voltios por encima del potencial de las paredes de la cámara de ionización. Junto al electrodo se produce una descarga en corona, constituida por electrones que saltan de

la carcasa al electrodo acelerados por el intenso campo eléctrico. La corriente y la energía de los electrones crecen con su proximidad a la aguja. En esta zona, los electrones rápidos chocan con las moléculas de nitrógeno y las ionizan. Se tiene:



El nitrógeno ionizado reacciona con las moléculas vaporizadas del disolvente, dando lugar a otros iones, que a su vez reaccionan con las moléculas y iones de los solutos. El resultado es una ionización compleja de la muestra, con fragmentos que no siempre tienen una interpretación fácil.

d) Ionización por plasma acoplado inductivamente (*inductively coupled plasma*, ICP)

Se puede utilizar una antorcha de plasma acoplado inductivamente para atomizar y ionizar muestras para análisis de trazas y ultratrazas de elementos. La antorcha trabaja a temperaturas del orden de 7000 K. A estas temperaturas los compuestos de las muestras se rompen reduciéndose por completo a elementos y iones en fase gas. El uso de ICP/ MS tiene algunas limitaciones, ya que requiere un bajo contenido salino y el uso de disolventes orgánicos puede saturar la antorcha de plasma.

e) Ionización basada en láseres pulsados

Existen dos fuentes de ionización diferentes que utilizan láseres pulsados para evaporar las superficies de los sólidos. La ablación por láser se utiliza para sublimar muestras sólidas que son difíciles de digerir químicamente. Se generan partículas mediante un láser pulsante, las cuales se introducen mediante un flujo de gas inerte dentro de una antorcha de plasma acoplada inductivamente. La ablación por láser-ICP se utiliza para el análisis de elementos.

Otra fuente de ionización por láser es la ionización por desorción asistida por láser (*matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI). En este caso el láser calienta la muestra que contiene el analito y los componentes de la matriz para producir iones en fase

gaseosa. Los iones MALDI se producen en un pulso corto en el tiempo. Es muy eficaz la combinación de la fuente de ionización MALDI con un espectrómetro de tiempo de vuelo (*time of flight*, TOF). Esta técnica acoplada, denominada MALDI-TOF, ha adquirido gran importancia en el análisis de muestras sólidas complejas, incluyendo material biológico.

f) Bombardeo con átomos acelerados (*fast atom bombardment*, FAB)

Es una técnica de ionización basada en una etapa previa de evaporación por bombardeo con átomos de Xe. En la etapa de evaporación se proporciona a las moléculas la energía necesaria para romper los enlaces entre los analitos y la matriz sin destruir los analitos. En la etapa de ionización, los mismos átomos acelerados que han formado el vapor iónico o molecular provocan la formación de iones $[M+H]^+$ y diversos fragmentos de menor masa.

1.2.2. Analizadores de masas

La función de los analizadores de masas es la de separar iones con diferentes relaciones m/z [24]. Existen diferentes tipos de analizadores. El poder de resolución del espectrómetro de masas va a depender principalmente de las prestaciones del analizador de masas.

a) Analizadores de sector magnético

Utilizan un imán permanente para hacer que el haz de iones de la fuente se mueva en una trayectoria circular de 180, 90 o 60 grados. Se puede llevar a cabo un barrido de masas de los iones variando la fuerza del campo magnético. La velocidad que adquieren los iones depende de sus valores de m/z . Los iones que pasan a través de la rendija de salida se recogen en un electrodo colector y dan lugar a una corriente eléctrica que se amplifica y se registra.

b) Analizadores de doble sector magnético o doble enfoque

Los espectrómetros anteriores se conocen a menudo como de enfoque simple. En los instrumentos de doble enfoque se miden las masas atómicas y moleculares con mayor precisión. Utilizando combinaciones seleccionadas de campos magnéticos y electrostáticos se minimizan las aberraciones direccionales y de energía de los iones.

c) Filtro de masas cuadrupolar

Suelen ser más compactos y más robustos que los de sector magnético. La separación se realiza mediante un campo eléctrico variable en el tiempo. El filtro se construye a partir de cuatro barras metálicas paralelas a las que se aplica una componente de corriente alterna y otra de corriente continua de igual magnitud y signo opuesto. Esto permite que sólo los iones con m/z específicas lleguen al detector, mientras que los demás toman otras trayectorias. La trayectoria es única para cada valor de m/z . El triple cuadrupolo es una combinación de tres filtros cuadrupolares en serie. Permite realizar estudios de fragmentación y alcanzar selectividades muy elevadas.

d) Trampa de iones cuadrupolar

Una trampa de iones permite analizar cationes y aniones en un amplio rango de valores de m/z . Los iones se pueden confinar en un espacio reducido durante largos periodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y magnéticos. Se han desarrollado varios tipos de trampas de iones según su diseño. Un diseño sencillo de la trampa consiste en un electrodo en forma de anillo y un par de electrodos colectores. Al electrodo anular se le aplica un potencial de radiofrecuencia variable, mientras que los electrodos colectores están a potencial de tierra. Los iones que tienen el valor apropiado de m/z se mueven en una órbita estable dentro de la cavidad formada por el anillo. Cuando aumenta el potencial de radiofrecuencia, se estabilizan las órbitas de los iones más pesados, pero se desestabilizan las de los más ligeros.

Los iones procedentes de la fuente de ionización se introducen a través de una rejilla en el colector superior. En ese momento se hace un barrido de potencial de radiofrecuencia y los iones son atrapados. Cuando se desestabilizan dejan la cavidad del anillo, y a través del colector inferior pasan al detector. En una trampa, el proceso de transmisión de iones al detector es discontinuo. Se utiliza un gas inerte (He), para absorber la energía cinética de los iones entrantes, de modo que se desaceleren y se facilite su enfoque en un cierto radio orbital. En la Fig. 5 se muestra el esquema de funcionamiento de una trampa de iones.

La capacidad para retener iones en la trampa permite obtener grandes conjuntos de iones hijos empleados para MS^2 . Estos iones hijos pueden ser de nuevo aislados y fragmentados para MS^3 , y así sucesivamente. Las fragmentaciones en el interior de la trampa se consiguen mediante colisiones con moléculas de He.

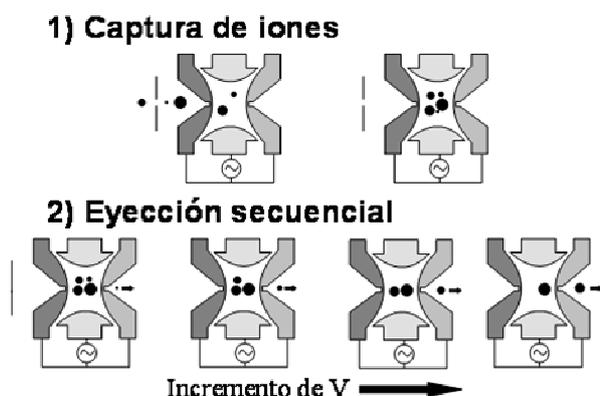


Figura 5. Esquema de funcionamiento de una trampa de iones.

e) Tiempo de vuelo (TOF)

Los iones procedentes de la fuente de ionización pasan a un tubo de desplazamiento de un metro de longitud que separa las masas sin aplicación de ningún campo. Un impulso electromagnético comunica una determinada cantidad de energía cinética a un paquete de iones para realizar el recorrido por el tubo. Debido a que todos los iones tienen idealmente la

misma energía cinética, los iones con distintas masas adquirirán distintas velocidades y por lo tanto llegarán al detector con diferentes “tiempos de vuelo”. Los iones más ligeros llegarán antes al detector. Los tiempos de vuelo típicos están 1 y 30 μs . La característica más importante de un TOF es su elevada exactitud, ya que permite establecer masas con errores del orden de pocas partes por millón.

1.2.3. Acoplamiento de una técnica de separación con un espectrómetro de masas

Los espectrómetros de masas se pueden acoplar con cromatógrafos de gases (GC/MS), de líquidos (LC/MS), de fluidos supercríticos (SFC/MS) o con sistemas de electroforesis capilar (CE/MS).

Para mostrar todos los componentes que han sido eluidos durante la separación se representa un cromatograma de iones totales (*total ion chromatogram o total ion current trace*, TIC). La intensidad en el TIC es la suma de las respuestas del detector a todos los iones presentes en cada momento. También se pueden representar cromatogramas a determinados valores de m/z , uno o varios. Estos se denominan cromatogramas de iones extraídos (*extracted ion chromatogram*, EIC).

Cuando el cromatograma se registra a un valor m/z único (o a unos pocos valores de m/z), en lugar de hacer un barrido en un intervalo de m/z , la técnica se denomina monitorización de iones seleccionados (*selected ion monitoring*, SIM). Esta monitorización proporciona un bajo límite de detección, y permite simplificar la señal en cromatogramas complejos que presenten numerosas interferencias.

Para introducir el efluente procedente de un cromatógrafo líquido o de una separación electroforética en el espectrómetro es necesario utilizar una interfaz adecuada entre la columna y el espectrómetro de masas. La misión de la interfaz es eliminar en lo posible la fase móvil sin distorsionar el perfil de concentraciones de los analitos. Actualmente, las

fuentes ESI y APCI son las interfaces más utilizadas. Una limitación para LC/MS o CZE/MS es que los modificadores o tampones deben ser volátiles, para minimizar así las interferencias en el espectrómetro.

En CZE/MS se requiere un flujo auxiliar que proporcione el contacto eléctrico necesario a la salida del capilar. Este flujo auxiliar se denomina envoltura líquida (*liquid sheath*) y es adicionado a la entrada del espectrómetro mediante una bomba. Esta operación requiere el uso de un nebulizador triconcéntrico. El caudal central es para el efluente, el intermedio para la envoltura líquida, y el más externo para el gas que forma el aerosol.

1.2.4. Espectrometría de masas secuencial: MS/MS

Empleando equipos adecuados, una vez separados en un primer analizador de masas, los iones pueden fragmentarse de nuevo, y estos fragmentos se pueden hacer pasar a otro analizador de masas. Esto se conoce como espectrometría de masas en tándem. El ion seleccionado en el primer analizador se conoce como ion progenitor. Esta espectrometría de masas en tándem se utiliza para elucidar estructuras moleculares de los iones de partida. Una vez ionizada la muestra se selecciona una masa concreta empleando MS^1 y se envía a una cámara de colisiones, donde los iones colisionan con los átomos del gas que se introduce para romperlos en fragmentos neutros y en otros iones. Estos iones “hijos” se separan en el segundo analizador, obteniéndose MS^2 .

La denominación MS/MS también se aplica a los instrumentos que pueden medir los valores de m/z de los iones que se encuentran dentro de ellos. Los espectrómetros de trampa de iones o los triples cuadrupolos pueden operar en modo MS/MS. Además, en los espectrómetros de trampa de iones un fragmento puede aislarse, fragmentarse, y volver a aislarse repetidamente, llevando a cabo de esta forma numerosos análisis. Esto es lo que se conoce como MS^n .

I.3. Surfactantes

I.3.1. Características generales

Los surfactantes son compuestos que se concentran o acumulan en la interfase entre dos medios, alterando la tensión superficial. Los surfactantes poseen una constitución molecular típica, esencialmente lineal y asimétrica, con dos zonas, una hidrófoba y otra hidrófila. La parte hidrófoba es una cadena alifática, lineal o ramificada, conteniendo en general entre 10 y 18 carbonos. En los productos naturales y en los de transformación química predominan las cadenas no ramificadas, mientras que en los derivados del petróleo y los obtenidos por síntesis (usualmente a partir del carbón) existen multitud de cadenas ramificadas. Por su parte, el resto hidrófilo, determinante de la solubilidad en agua, puede ser un grupo polar de carácter ácido tal como un grupo sulfato, sulfonato o carboxilato, o de carácter básico como una amina, una sal de amonio cuaternario o el ion piridinio, también puede ser un grupo polar no iónico. Los surfactantes presentan una estructura anfifílica que se manifiesta en la afinidad de cada parte de la molécula hacia una fase de distinta polaridad, y en la concentración del surfactante en la superficie del líquido, disminuyendo la tensión superficial del mismo. Por ello, presentan propiedades tales como la formación de emulsiones, mojabilidad, dispersión, detergencia y/o solubilización. Los surfactantes ya sean naturales o sintéticos, cambian la solubilidad y el estado de otros constituyentes presentes en el medio, y lo organizan formando micelas y otras microestructuras.

Sobre las propiedades surfactantes de un compuesto influyen, además de la propia naturaleza del grupo hidrófilo, la situación que éste ocupa en la molécula. En principio se pueden distinguir:

a) Posición terminal: la estructura molecular es polar y totalmente asimétrica. El grupo hidrófilo puede estar unido directamente al hidrófobo, o entre ambos puede existir un resto de carácter alifático o aromático que posea ya cierto carácter hidrófilo. Si la cadena

hidrófoba tiene una longitud adecuada, estas estructuras muestran básicamente carácter detergente.

b) Posición central: el grupo hidrófilo se intercala en cualquier punto de la cadena hidrófoba, aunque si en ella existen puntos reactivos (enlaces dobles, grupos hidroxilo, etc.) tiende a ocupar esos lugares. De todas formas, conforme el grupo hidrófilo está más centrado en la cadena, tanto más se ve mermada la capacidad detergente del surfactante.

c) Varios grupos hidrófilos: en una cadena pueden estar presentes varios grupos hidrófilos, lo que exalta notablemente la solubilidad del surfactante en agua. Sin embargo esta estructura proporciona propiedades dispersantes al surfactante.

1.3.2. Clasificación de los surfactantes

Atendiendo a su carga, los surfactantes se clasifican en aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfóteros. Los aniónicos tienen el grupo hidrófilo de carácter ácido formando un anión. Los catiónicos son los que tienen el grupo hidrófilo de carácter básico. Si el grupo hidrófilo no es capaz de ionizarse y formar sales, el surfactante se califica como no iónico. Un grupo hidrófilo frecuente en surfactantes no iónicos consiste en una cadena de unidades de óxido de etileno (grupos éter espaciados con grupos etileno). Finalmente las moléculas que tienen simultáneamente grupos con carácter ácido y básico son surfactantes anfóteros o iones dobles.

a) Surfactantes aniónicos

Los surfactantes aniónicos se caracterizan por tener un grupo hidrófilo cargado negativamente. Los más antiguos y conocidos son los jabones. Suelen distinguirse las siguientes familias: alquilbenceno sulfonatos (*alkylbenzenesulfonates*, ABS), alquil sulfatos (*alkyl sulfates*, AS), alquil o lauril éter sulfatos (*alkyl or lauryl ether sulfates*, AES o LES), alquil fenol éter sulfatos (*alkyl phenol ether sulfates*, APES), α -olefina sulfonatos (*α -olefin*

sulfonates, AOS), alquil sulfonatos, α -sulfonatos de ácidos grasos (iónicos y ésteres de alquilo), mono- y di-alquil sulfosuccinatos y sulfonatos derivados del petróleo (Fig. 6).

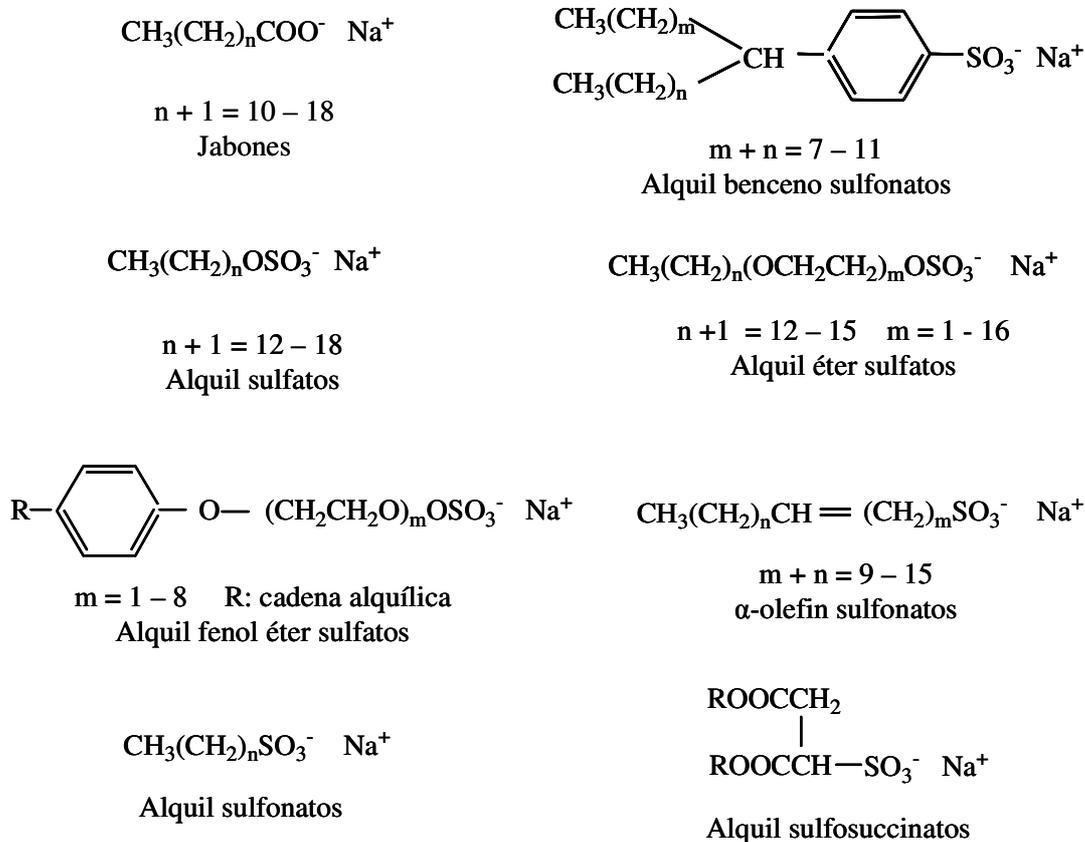


Figura 6. Estructura y nomenclatura de las principales familias de surfactantes aniónicos.

b) Surfactantes catiónicos

Los surfactantes catiónicos son los que tienen un grupo hidrófilo de carácter básico. Suelen agruparse en ácidos grasos de amida, amidoaminas, imidazolininas, derivados del petróleo, nitrilos cíclicos alifáticos, aromáticos, compuestos no nitrogenados, poliméricos catiónicos y óxidos de amina. En la Fig. 7 se muestra la estructura y nomenclatura de las principales familias de surfactantes catiónicos.

Los surfactantes catiónicos de importancia industrial [26] son compuestos grasos nitrogenados y, especialmente, compuestos con nitrógeno cuaternario. Son de poca utilidad

en procesos de limpieza, porque la mayoría de las superficies tienen carga negativa y los cationes se retienen sobre ellas en lugar de solubilizar la suciedad adherida. Sin embargo, y debido a estas mismas propiedades, poseen numerosas aplicaciones especializadas. Por ejemplo, las aminas y los compuestos cuaternarios inhiben el crecimiento de microorganismos como bacterias y algas. Además las aminas grasas primarias y las aminopropilaminas grasas se utilizan como inhibidores de la corrosión, y en la limpieza de metales, cuando se utiliza HCl para disolver el óxido. La amina se orienta en la interfase entre el metal y la solución ácida, con las colas hidrófobas comprimidas entre sí, formando una capa protectora de una o dos moléculas de espesor. Esta capa es tan cerrada que evita el ataque del metal limpio por parte del exceso de ácido.

Otra aplicación más de los compuestos grasos nitrogenados, y que depende de la actividad de superficie y orientación de los iones del surfactante, es el suavizado de textiles. El surfactante catiónico se adsorbe y orienta en la interfase formada entre el textil y el agua. También, tienen afinidad por la superficie del cabello, utilizándose como acondicionadores y suavizantes en productos que se aplican después del lavado, para contrarrestar así el efecto apelmazante de los surfactantes aniónicos.

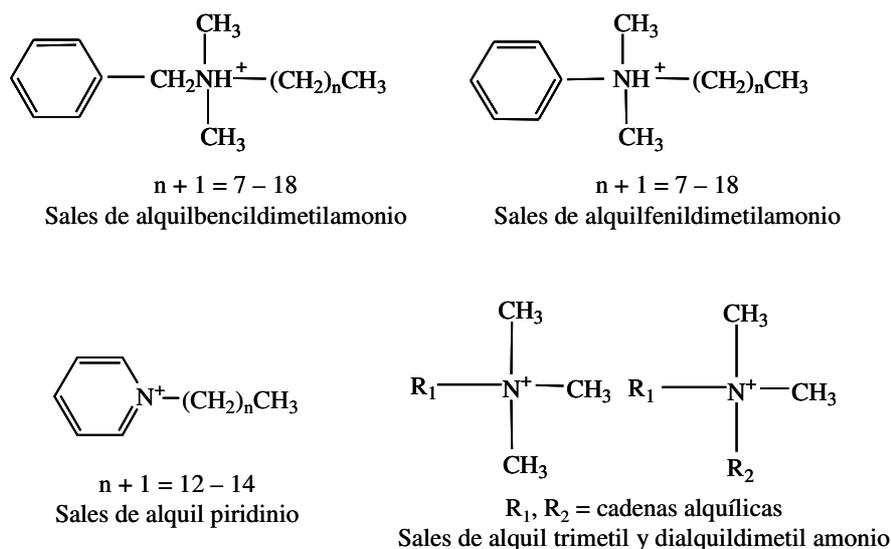


Figura 7. Estructura y nomenclatura de algunas familias de surfactantes catiónicos.

c) Surfactantes no iónicos

En los surfactantes no iónicos la parte hidrófila de la molécula es casi siempre una cadena de unidades de óxido de etileno (*ethylene oxide*, EO). Los grupos éter le proporcionan la polaridad necesaria para garantizar su solubilidad en agua por aceptación de puentes de hidrógeno. En la solubilidad también juegan un papel muy importante las conformaciones de las unidades de óxido de etileno. Si bien la cadena de polioxietileno no es tan polar como un grupo ionizado, un conjunto de 5 ó 10 unidades de óxido de etileno puede alcanzar una notable capacidad hidrófila.

Son excelentes agentes humectantes, compatibles tanto con surfactantes aniónicos como catiónicos, y no se ven afectados por los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} del agua dura. Desafortunadamente, tienden a ser líquidos o ceras de bajo punto de fusión y, por consiguiente, es difícil formularlos en forma de polvo. Así por ejemplo, los detergentes en polvo de baja espuma, que han tenido cierto éxito en lavadoras automáticas, son pegajosos al tacto. Por el contrario, los surfactantes no iónicos son ideales para formulaciones en estado líquido. Otro de sus inconvenientes es su tendencia precipitar a temperaturas elevadas o

fuerzas iónicas altas, debido a la menor solvatación de la cadena de polioxietileno. Además, a temperaturas elevadas se reduce el peso estadístico de las conformaciones polares de la cadena de polioxietileno.

Los surfactantes no iónicos más importantes son los etoxilados, los cuales se producen por condensación de óxido de etileno con alquilfenoles o alcoholes. Esta condensación da lugar a una cierta distribución de homólogos con distinto número de unidades de EO (Fig. 8). Los etoxilados de alcoholes grasos o alcoholes grasos etoxilados (*fatty alcohols ethoxylates*, FAEs) son los surfactantes no iónicos más empleados en productos de limpieza, cosméticos, herbicidas, etc. Los alquilfenol etoxilados (*alkylphenol ethoxylates*, APEs), principalmente octifenoles (*octylphenol ethoxylates*, OPEs) y nonilfenoles (*nonylphenol ethoxylates*, NPEs), también poseen una cadena de unidades de EO, pero a diferencia de los FAEs, absorben en el UV. La aplicación de los APEs en detergentes está restringida, debido a la difícil eliminación biológica (escasa biodegradabilidad) de los metabolitos más hidrófobos, concretamente, los alquilfenoles no etoxilados y monoetoxilados. Los alcoholes etoxilados lineales se biodegradan más rápidamente que los APEs. Además, tienen mejores propiedades de detergencia que los ABS sobre muchos tipos de suciedad y sobre la mayoría de las telas, y son especialmente buenos para eliminar la grasa de las fibras sintéticas. También trabajan bien en frío, actualmente son los que tienen mayor uso entre los principales componentes de los detergentes domésticos.

También se conocen derivados de aminas, amidas (alcanolamidas, *fatty acid amide ethoxylates*, FAA) y ésteres de ácidos grasos, siendo bastante empleados en productos de aseo corporal. Así por ejemplo, la dietanolamida de coco posee buenas propiedades espumantes, estabilizando la espuma de los surfactantes aniónicos. Finalmente, los surfactantes no iónicos a base de azúcares o alquilpoliglucósidos (*alkylpolyglucosides*, APGs)

tienen una biodegradabilidad sumamente rápida y baja toxicidad, y pueden elaborarse a partir de materias primas naturales.

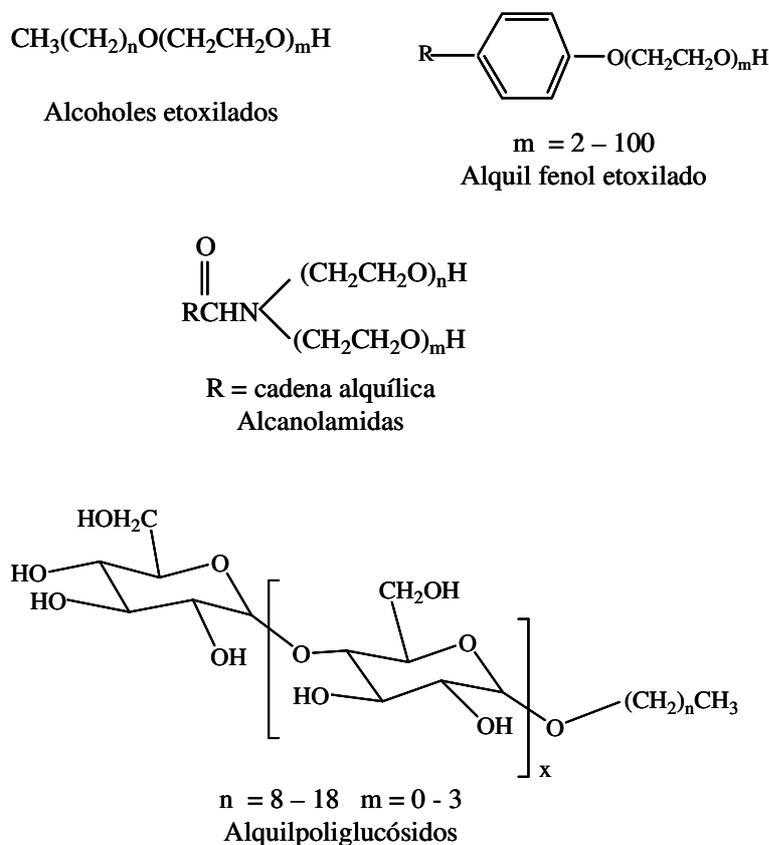


Figura 8. Estructura y nomenclatura de las principales familias de surfactantes no iónicos.

d) Surfactantes anfóteros

Son compuestos con estructura de ion doble, esto es, presentan simultáneamente una carga positiva y otra negativa sobre la misma molécula. Pueden comportarse como aniónicos o como catiónicos, dependiendo del pH. A pH cercanos a 7 son menos irritantes que los surfactantes catiónicos y aniónicos, y se utilizan en champús suaves. La formulación de estos productos es complicada por la posible precipitación del surfactante anfótero cuando el pH está próximo a su punto isoeléctrico. Pueden utilizarse, junto con NaOH, en limpiadores alcalinos para superficies grasas, y como limpiadores ácidos junto con HCl para superficies oxidadas, debido a que son estables y funcionales en un amplio intervalo de pH.

Un número importante de surfactantes anfóteros son compuestos naturales ampliamente conocidos, como por ejemplo la lecitina. Una familia adicional de surfactantes anfóteros que presentan un grupo amonio cuaternario son las alquilbetaínas (Fig. 9).

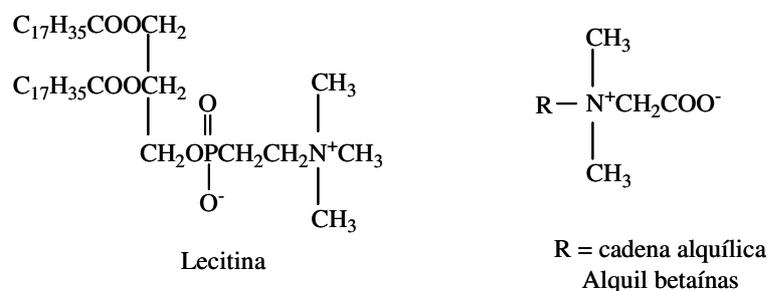


Figura 9. Estructura y nomenclatura de los principales tipos de surfactantes anfóteros.

1.3.3. Composición de productos industriales de limpieza

En la composición química de productos industriales de limpieza y detergentes, además de la presencia de surfactantes, que suelen constituir la materia activa de la formulación, nos encontramos con diversos aditivos. No todas las formulaciones los llevan, y su composición puede diferir en función del uso industrial o cosmético del producto.

a) Coadyuvantes o fortificadores

Generalmente son sales inorgánicas que mejoran o protegen la eficacia detergente del surfactante. El más utilizado de todos ellos es el tripolifosfato sódico (*sodium tripolyphosphate*, STPP). Sus funciones incluyen:

- Ablandar el agua de lavado. Los mecanismos de actuación incluyen precipitación (carbonato sódico), secuestro (polifosfatos y polifosfonatos, EDTA, ácido nitrilotriacético y citrato sódico) e intercambio iónico (zeolitas y ácidos policarboxílicos solubles en agua).

- Actuar como emulsionantes de la grasa y partículas sólidas de la suciedad, impidiendo su redeposición.

- Proporcionar la alcalinidad adecuada para el lavado (STPP, zeolitas, carbonato sódico).

Los silicatos sódicos ($\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$ en diferentes relaciones) actúan como coadyuvantes a altas concentraciones. A bajas concentraciones se comportan como inhibidores de la corrosión, formando una película protectora sobre las superficies metálicas de las máquinas de lavado. Asimismo, en el lavado automático de vajillas protegen el color y el esmalte de las cerámicas (inhiben la solubilización de sílice y silicatos por efecto de ion común).

b) Blanqueantes oxidantes

Su función es eliminar las manchas persistentes. Los principales son el perborato sódico y el percarbonato sódico. Su modo de actuación conlleva su descomposición en agua, liberando peróxido de hidrógeno, cuyo poder oxidante es el causante de la eliminación de las manchas.

c) Blanqueantes ópticos

Son compuestos fluorescentes generalmente derivados diaminoestilbencendisulfónicos. Se utilizan en formulaciones para el lavado de tejidos. Actúan absorbiendo la radiación UV, emitiendo parte de la energía absorbida en forma de luz visible correspondiente a la parte azul del espectro, enmascarando de esta forma el tono amarillento típico de los tejidos usados o mal lavados. Proporcionan un brillo y blancura aparentes.

d) Estabilizadores de los blanqueantes

Con este fin se utilizan EDTA y polifosfonatos. Secuestran los metales pesados que pueden estar presentes en las aguas de lavado

e) Agentes de antiredeposición

Impiden que la suciedad separada de los tejidos durante el lavado se redeposite sobre los mismos. Se adsorben sobre los tejidos repeliendo, gracias a su carga eléctrica negativa, la

suciedad presente en la disolución. El más común es la carboximetilcelulosa sódica, que sólo es efectiva con tejidos de algodón. La generalización de las fibras sintéticas ha exigido la búsqueda de productos alternativos, tales como los éteres de celulosa no iónicos. Las formulaciones comerciales llevan mezclas de ambos compuestos.

f) Enzimas

Catalizan la descomposición de proteínas de alto peso molecular en fracciones de bajo peso molecular, más fácilmente eliminables de las superficies a lavar. Se utilizan mezclas de enzimas, puesto que son específicas con respecto a cada tipo de suciedad. Las más usadas son las proteasas y las lipasas. Las primeras actúan sobre la suciedad proteica y manchas de huevo, grasa y sangre. Las segundas actúan sobre manchas de grasas de alto peso molecular.

g) Controladores de espuma

Pueden potenciar o disminuir la formación de espuma. En máquinas de lavado automático se busca reducir la espuma, lo que se consigue mediante la adición de una pequeña cantidad de jabón. En formulaciones para el lavado de la vajilla a mano es deseable el aumento del efecto espumante, para lo que se usan alcanolamidas de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos, betaínas, sulfobetaínas y óxidos de amina.

h) Suavizantes

En los últimos años se han desarrollado formulaciones para el lavado de tejidos que incorporan agentes suavizantes, tales como cloruros de dialquildimetilamonio y sales de imidazolinio.

i) Perfumes y colorantes.

Se emplean para proporcionar unas características más agradables a la formulación.

j) Cargas

Las cargas son generalmente sales inorgánicas, sobre todo sulfato sódico y cloruro sódico, que se utilizan en formulaciones para ajustar el nivel de ingredientes activos por dosis

recomendada, evitar el apelmazamiento de las partículas de detergente, mejorar sus propiedades de escurrido y controlar su densidad. En los últimos años su uso está disminuyendo, como consecuencia de la aparición de las formulaciones en polvo concentradas.

k) Auxiliares de formulación

Los auxiliares de formulación son compuestos que se emplean en detergentes líquidos. Son agentes hidrótrofos, cuya función es aumentar la solubilidad y miscibilidad de todos los componentes de la formulación en el agua, favoreciendo su compatibilidad. Los más utilizados son las sales sódicas de p-toluen-, xilen- y cumen-sulfonato, así como la urea, el etanol y el isopropanol. Los alcoholes permiten además reducir la viscosidad de la formulación.

I.4. Referencias

- [1] J.P. Landers, ed., Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC Press, Boca Raton, 1994.
- [2] S.F.Y. Li, Capillary Electrophoresis, principle, practice and applications, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [3] P. Camilleri, ed., Capillary Electrophoresis, theory and practice, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [4] D.N. Heiger, High performance Capillary electrophoresis, an introduction, Hewlett-Packard publ. No. 12-5091-699E, Waldbronn, Alemania, 1992.
- [5] P.R. Brown, E. Grushka, eds., Advances in Chromatography, Vol. 35, Capítulos 1-5, Marcel Dekker, Nueva York, 1995.
- [6] M.M. Rogan, K.D. Altria, Introduction to the theory and applications of capillary electrophoresis, Beckman publ. No. 726388, Fullerton, CA, 1993.
- [7] S. Hjerten, Chromatogr. Rev., 9 (1967) 122.
- [8] R. Virtanen, Acta Polytech. Scand., 123 (1974) 1.
- [9] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, 169 (1979) 11.
- [10] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Anal. Chem. 53 (1981) 1298.
- [11] J.W. Jorgenson, Trends Anal. Chem. 3 (1984) 51.
- [12] Z. El-Rassi y Y. Mechref, Electrophoresis 17 (1996) 275.
- [13] S. Terabe, Micellar Electrokinetic Chromatography, Beckman publ. nº. 266924, Fullerton, CA, 1992.
- [14] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem. 56 (1984) 111.
- [15] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, Anal. Chem. 61 (1989) 251.
- [16] K. Otsuka, S. Terabe, J. Microcol. Sep. 1 (1989) 150.
- [17] D.M. Small, M.G. Carey, J. Colloid Interface Sci. 312 (1969) 382-395.

- [18] D.M. Small, *The Bile Acids*, eds. P.P. Nair y D. Kritchevsky, Plenum Press, New York, 1971, págs 249-356.
- [19] D.M. Small, *Adv. Chem. Ser.* 84 (1968) 31.
- [20] R.O. Cole, M.J. Sepaniak, W.L. Hinze, J. Gorse, K. Oldiges, *J. Chromatogr.* 557 (1991) 113.
- [21] H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, S. Terabe, *J. Chromatogr.* 513 (1990) 279.
- [22] A.J. Ji, M.F. Nunez, D. Machacek, J.E. Ferguson, M.F. Iossi, P.C. Kao, J.P. Landers, *J. Chromatogr. B* 669 (1995) 15.
- [23] S. Terabe, H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, *J. Microcol. Sep.* 1 (1989) 234.
- [24] K. A. Rubinson, J. F. Rubinson, *Análisis Instrumental*, Pearson Education S.A., Madrid, 2001
- [25] D.A. Skoog, J.J. Leary, *Análisis Instrumental*, Mc. Graw Hill, Madrid, 1996.
- [26] H.A. Wittcoff y G. Rewben, *Productos Químicos Orgánicos Industriales*, Vol. 2: Tecnología, formulación y usos, ed. Limusa, México, 1987.
- [27] K. Holmberg, B. Jonson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and polymers in aqueous solution*, 2^a ed., Wiley and Sons, 2002.

Capítulo II

Objetivos

En los últimos años, en base a convenios de cooperación suscritos con varias empresas, el grupo de investigación (www.uv.es/~hpcehplc) ha puesto a punto y validado numerosos métodos de análisis, entre los que destacan los relacionados con el análisis de surfactantes y otros aditivos presentes en productos de limpieza, principalmente mediante electroseparación capilar con detección UV-vis y a partir de cierto momento se dispuso también de detección mediante espectrometría de masas de trampa iónica. La presente tesis se enmarca en este contexto, centrándose en el desarrollo de métodos para la caracterización y determinación de surfactantes y de otros aditivos que son habituales en la formulación de productos de limpieza.

Cuando se utiliza detección espectrofotométrica es necesario derivatizar los surfactantes no absorbentes, lo que complica los procedimientos, especialmente para muestras de matriz acuosa. Una solución alternativa es la detección UV-vis indirecta. En detección indirecta, pretendemos llegar a soluciones sencillas y eficaces mediante la adecuada optimización de las separaciones, y simultáneamente mediante la aplicación de técnicas de tratamiento de datos que permitan exaltar la resolución. En los capítulos III y IV se desarrollan métodos de caracterización y determinación de surfactantes basados en este enfoque.

Los métodos disponibles en la bibliografía contemplan familias de surfactantes aisladas, sin que se hayan descrito métodos que tengan en cuenta las interferencias causadas por surfactantes de otras familias que suelen encontrarse mezcladas en los problemas reales. En los capítulos III-V se desarrollan métodos que permiten resolver estas interferencias, ya sea por medios químicos (optimización de las condiciones de separación) o quimiométricos, o por ambos a la vez.

Los surfactantes que son a la vez no iónicos y no absorbentes (como los alcoholes alquílicos etoxilados) no pueden detectarse ni directa ni indirectamente en electroforesis, siendo necesaria su derivatización previa, tanto en UV-vis como en MS. En el capítulo VI se estudia la posibilidad de métodos directos, sin derivatización, basados en la espectrometría de masas. Además, en el capítulo VII se propone un procedimiento de derivatización, que permite la detección de alcoholes sin etoxilar y que exalta en gran medida la sensibilidad para alcoholes monoetoxilados en MS.

En los capítulos VIII y IX, se desarrollan métodos de caracterización y determinación de alquilpolifosfonatos, que son aditivos habituales en las formulaciones industriales de productos de limpieza y de otros productos.

Capítulo III

Caracterización y cuantificación de mezclas de alquil éter sulfatos y ácidos carboxílicos mediante electroforesis capilar con detección fotométrica indirecta

(*Electrophoresis* 24, 2003, 2805-2813)

III.1. Introducción

Es necesario el desarrollo de métodos de alta sensibilidad analítica para materias primas industriales y productos manufacturados, en los que se incluyen limpiadores domésticos y artículos de tocador, así como muestras ambientales. El control de calidad de materias primas y productos manufacturados en las industrias de detergentes y cosmética, y el *screening* de productos de la competencia, es una tarea difícil debido a la complejidad de las muestras, que normalmente contienen dos o más clases de surfactantes, y también a la falta de estándares.

Se han analizado varias clases de surfactantes usando cromatografía de capa fina [1-3], HPLC [4-18] y CE [12,13,19-34]. Con esta última técnica en concreto, se han caracterizado y cuantificado surfactantes iónicos absorbentes [12,13,20-22,28,30-31,34], no iónicos absorbentes [13,19,25-27,32] y iónicos no absorbentes [13,23,24,33]. Para detectar analitos no absorbentes, se requiere un electrolito de fondo que contenga un cromóforo (*background chromophore*, BGC) [35]. Se ha revisado la determinación de surfactantes por HPLC [36] y CE [36-37]. Todas las clases de surfactantes se pueden analizar por HPLC y CE con detección por espectrometría de masas [16-19, 38-39].

Grob y Steiner [33] han desarrollado la separación completa o parcial de varias clases de surfactantes en una única inyección, incluyendo AS, AES, alcano sulfonatos secundarios y ABS lineales, usando BGEs constituidos por mezclas no acuosas ACN/ MeOH que también contenían un BGC. En medio no acuoso, la movilidad de las diferentes clases de surfactantes se modifica

por la formación de homoconjugados y heteroconjugados, lo que ha sido utilizado, por ejemplo, para separar AS de alquil sulfonatos.

En el trabajo desarrollado en este capítulo, se describe un procedimiento para separar mezclas de ácidos grasos y AES, siendo también útil para la caracterización y cuantificación de AES en las mezclas. Los AES son detergentes suaves con alta actividad humectante y limpiadora, que no se ve afectada en presencia de aguas duras y tienen una elevada capacidad de mantener la espuma a bajas temperaturas. Debido a estas propiedades son usados a menudo en productos de limpieza y otras formulaciones. Los AES se mezclan frecuentemente con ácidos grasos para controlar la espuma, aumentar la viscosidad y mejorar la sensación de suavidad del producto. Las muestras de AES contienen también hasta un 0,3 % de acetato, debido a la corrección del pH con acético después de su síntesis.

La parte lipofílica de AES está constituida normalmente por una cadena alquílica lineal de 12-14 átomos de carbono, aunque también se pueden encontrar oligómeros con 15-18 átomos de carbono. Los productos de origen animal o vegetal contienen cadenas exclusivamente con un número par de átomos de carbono, de esta forma, la presencia de cadenas con un número impar de átomos de carbono denota origen total o parcialmente mineral. Atendiendo a razones medioambientales, incluyendo la mejor biodegradabilidad, son preferidos los primeros. La parte hidrofílica de AES contiene un número variable de grupos EO con un grupo sulfato al final de la molécula. La nomenclatura adoptada en este trabajo es la siguiente: C12E2 representa una molécula con una cadena de 12 átomos de carbono, más dos grupos EO y un grupo sulfato al final.

Los oligómeros de AES se han separado por HPLC con gradiente de elución y detección evaporativa de dispersión de luz (*evaporative light scattering detection*, ELSD) [8], y por CE con BGEs acuosos (40-50 % ACN) [23-24] y no acuosos (mezclas ACN/ MeOH) [23,33]. También

se han propuesto varios procedimientos de CE para ácidos grasos [40-53]. Sin embargo, no se ha descrito la separación de AES y ácidos grasos en un único electroferograma.

En este trabajo, para resolver ácidos grasos y AES se usaron BGEs que contenían una alta concentración de ACN y una pequeña cantidad de agua, lo que permitió controlar la ionización de los grupos carboxilato. Usando un BGE con un 10 % agua, los ácidos grasos saturados C10-C16 y los oligómeros de AES se pudieron resolver en una única inyección, con buena resolución dentro de cada clase de compuestos. Una reducción adicional de la cantidad de agua en el BGE condujo a un aumento de la separación entre los ácidos carboxílicos y los AES, con excelente resolución entre los oligómeros de AES, pero a costa de una pérdida de eficacia para los AES ligeros y una menor resolución entre los ácidos grasos. Usando un 5 % de agua se consiguió resolver también el acetato de los oligómeros de AES hasta 7 EOs.

La excelente regularidad de los sucesivos tiempos de migración facilitó la identificación de los oligómeros de AES; así, dentro de cada subclase de AES (o serie de oligómeros con el mismo número de átomos de carbono en la cadena alquílica), los tiempos de migración decrecieron, siguiendo una curva suave, al aumentar el número de EOs.

III. 2. Materiales y métodos

III.2.1. Instrumentación y condiciones de trabajo

Se usó un sistema de electroforesis capilar HP3D (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) provisto con un detector espectrofotométrico de fila de diodos. Las separaciones se llevaron a cabo en capilares de sílice fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) de 80,5 cm de longitud total (72 cm longitud efectiva) y 50 μm de diámetro interno (363 μm de diámetro externo) aplicando un voltaje de 20 kV con polaridad positiva a una temperatura de 45°C. Se observó la parcial precipitación de C16 dentro del capilar usando un 60 % ACN a 25°C.

Con el fin de minimizar los errores producidos por pequeños desplazamientos en los tiempos de migración, los estudios de cuantificación se hicieron usando áreas corregidas, obtenidas mediante el cociente entre el área del pico estudiado y su correspondiente tiempo de migración. Las muestras fueron inyectadas hidrodinámicamente aplicando una presión de 5 kPa durante 3 s. La detección indirecta fue llevada a cabo midiendo a una longitud de onda de 380 nm y empleando 245 nm como referencia usando una anchura de banda de 40 nm para ambas.

Para acondicionar los capilares nuevos, éstos se lavaron sucesivamente, aplicando una presión de 100 kPa durante 10 min, a 60 °C con las siguientes disoluciones: NaOH 1 M, NaOH 0,1 M y finalmente agua. Diariamente antes de su uso, el capilar se lavó con NaOH 0,1 M (20 min), agua (10 min) y el tampón de separación (10 min) a 45 °C. Entre inyecciones, se acondicionó con NaOH 0,1 M (10 min), agua (2 min) y el tampón (8 min). Después de cada sesión de trabajo, se pasó agua por el capilar durante 10 min. Todas las disoluciones se pasaron a través de un filtro de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro (Albet, Alemania).

III.2.2. Reactivos, muestras y disoluciones

Se usaron MeOH, ACN, dioxano, tetrahydrofurano (THF) y otros disolventes de grado analítico (Scharlab, Barcelona), dipentilamina (DPA), y los ácidos 3,4,5-trimetoxibenzoico (TMBA), acético (C2), cáprico (C10), láurico (C12), mirístico (C14) y palmítico (C16), dodecil sulfato sódico (SDS o C12E0), tetradecil sulfato sódico (C14E0) y hexadecil sulfato sódico (C16E0) (Fluka, Buchs, Suiza), como patrón interno se empleó decil sulfato sódico (C10E0, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Además se emplearon tres mezclas de AES de diferentes fabricantes suministradas por Químicas Oro S. A. (Sant Antoni de Benaixever). Todas las disoluciones se prepararon empleando agua desionizada (desionizador Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA).

Se prepararon una disolución de AES ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$ AES total en agua, calculada a partir de la concentración declarada por el fabricante, 27 %), y una mezcla que contenía C10-C16 ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada ácido, disuelta en 50:50 metanol/agua, v/v), ambas ajustadas a pH 10 con NaOH. A partir de las disoluciones anteriores se prepararon las siguientes mezclas: $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ AES total con $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada ácido graso, y $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ AES total con $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada ácido graso. Con el fin de minimizar los problemas de solubilidad, en todas las mezclas se mantuvo la proporción metanol-agua 1:1. Las disoluciones empleadas como electrolito de fondo estaban constituidas por: 5 mM TMBA y 7 mM DPA, preparadas en dos medios hidro-orgánicos conteniendo 85 % ACN – 5 % dioxano, y 90 % ACN – 5 % dioxano (BGEs I y II, respectivamente).

III.3. Resultados y discusión

III.3.1. Condiciones de separación

Los ácidos carboxílicos y los AES no presentan absorción en el UV-vis, por lo que en primer lugar se seleccionó el ácido 3, 4, 5- trimetoxibenzoico (TMBA) como revelador para la detección indirecta de los mismos. Empleando un BGE constituido por TMBA 5 mM, DPA 7 mM y 60 % de ACN se alcanzó una resolución satisfactoria entre los oligómeros de AES, así como entre los diversos ácidos grasos. Sin embargo, ambas clases de surfactantes presentaban tiempos de migración similares. Se puede observar en la Fig. 1 como solapan respectivamente los ácidos grasos C14 y C16 con los oligómeros C13E1 y C13E2.

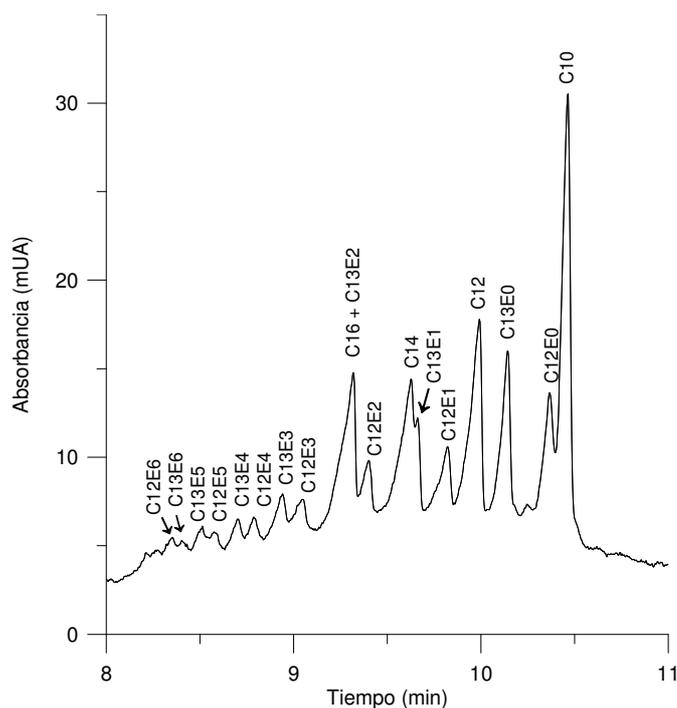


Figura 1. Electroferograma de una mezcla de AES (muestra I, $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$) y ácidos grasos C10-C16 ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ cada uno) obtenido con un BGE constituido por 5 mM TMBA, 7 mM DPA y 60% ACN. Tiempo de migración del EOF, 6,1 min.

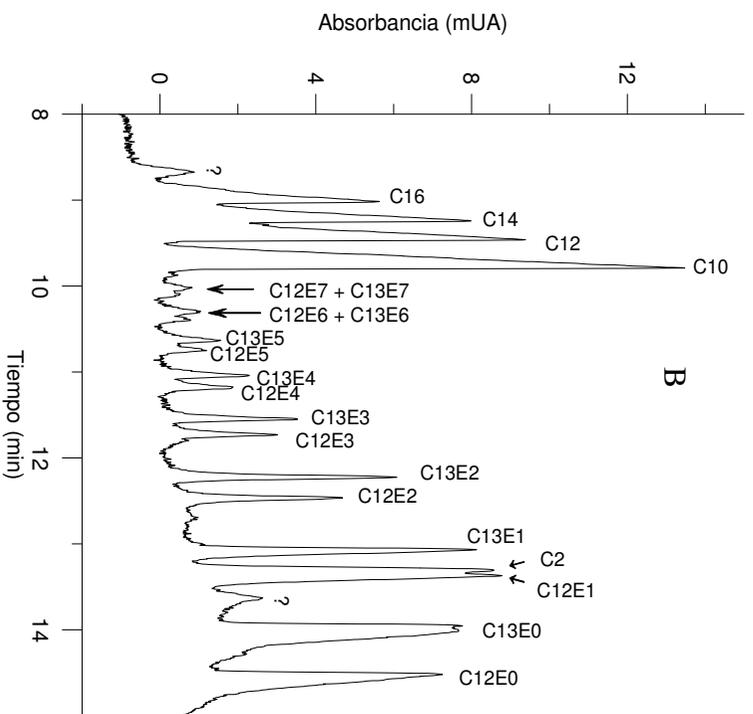
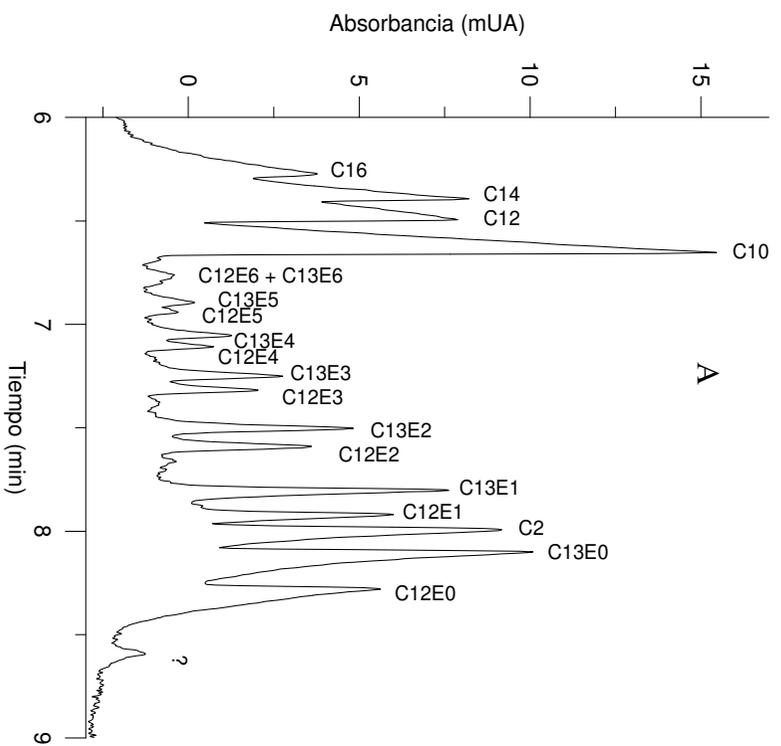
Se consiguió la reducción de los tiempos de migración de los ácidos grasos aumentando la concentración de ACN del BGE hasta el 90 % (Fig. 2, trazo A). Esta disminución en los tiempos de migración se atribuyó a la inhibición parcial de la ionización del grupo carboxilato. Empleando este BGE, también se observó la reducción, aunque menor, de los tiempos de migración de los oligómeros de AES, dando lugar a una mejor separación entre los dos tipos de surfactantes. La resolución entre los pares de ácidos grasos consecutivos disminuyó, mientras que aumentó la eficacia de los mismos y la resolución entre los diversos oligómeros de AES. Empleando este electrolito de fondo se observó la presencia del pico identificado como C2 (acetato) situado entre los picos C13E0 y C12E1, lo que se confirmó mediante el reforzamiento de la muestra con una disolución estándar de acetato sódico. En las especificaciones técnicas del producto suministradas por el fabricante se indica la presencia de acetato como aditivo utilizado en la corrección del pH final del producto.

Manteniendo constante la concentración de disolvente orgánico en un 90 %, se estudió la modificación de la naturaleza del mismo. Se realizaron pequeñas adiciones de dioxano al BGE y al mismo tiempo se redujo proporcionalmente el contenido en ACN. Se observó que la adición de hasta un 5 % de dioxano daba lugar a una reducción en el EOF y a un aumento en la resolución entre los picos sucesivos de los homólogos y oligómeros de los surfactantes estudiados, al mismo tiempo que se produjo un aumento de la separación entre las dos familias de surfactantes. La reducción del EOF se puede explicar por la fuerte interacción del dioxano con las paredes del capilar, debido a la presencia de los dos átomos de oxígeno polares, influyendo también en el mismo sentido la mayor viscosidad del dioxano respecto al ACN. Como se muestra en la Fig. 2, trazo B, usando un 5 % de dioxano los oligómeros de AES hasta C13E7 se distinguen de los ácidos grasos más pesados hasta el C10. La eficacia disminuyó cuando la concentración de dioxano fue igual o superior a un 10 %. Se observó también una disminución de la eficacia cuando el dioxano se sustituyó por MeOH o por THF. Los estudios posteriores se realizaron en presencia de una mezcla de ACN y dioxano en unas concentraciones del 85 y 5 % respectivamente (BGE I). El electroferograma de la Fig. 2, trazo C, se obtuvo con una mezcla que contenía una mayor concentración de ácidos grasos ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada uno) y una menor concentración de AES ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$). Comparando los trazos B y C de la Fig. 2, se observó que la resolución entre el C10 y los oligómeros más pesados de AES se mantuvo constante.

Partiendo del BGE I, un aumento de la concentración de ACN hasta un 90 %, manteniendo constante la concentración de dioxano en un 5 % (BGE II), da lugar a la fusión de los ácidos grasos en una única banda situada a menores tiempos de migración, si bien la resolución de los oligómeros de AES se mantuvo constante (Fig. 3). Empleando este BGE se observa también que el pico del C2 aparece a un tiempo de migración menor que el pico del C13E7. Una desventaja del BGE II es la pérdida de eficacia para los AES más ligeros, particularmente para el

C12E0. Por tanto, ambos BGEs (I y II) son recomendables para analizar completamente mezclas de AES y ácidos carboxílicos. Sería preferible un BGE con, aproximadamente, un 10 % de agua para identificar ácidos grasos y observar la distribución de oligómeros de AES, pero se debería reducir el contenido de agua, aumentando la concentración de ACN hasta un 95 %, aproximadamente, para separar los ácidos carboxílicos más ligeros que el C10 de los oligómeros de AES más pesados.

En la Fig. 4 se muestran los electroferogramas obtenidos con el BGE I para muestras de AES concentradas ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$) procedentes de tres fabricantes diferentes. Como se deduce de la ausencia de cadenas alquílicas con un número impar de átomos de carbono, la muestra III se obtuvo, exclusivamente, a partir de grasas vegetales o animales, mientras que las muestras I (que fue la empleada en los estudios de optimización realizados anteriormente) y II tienen origen mineral o mixto. Los dos picos de pequeña intensidad presentes en la Fig. 4 (trazos A y B) a tiempos de migración de 7,8 y 7,9 min, fueron identificados como C13 y C12, respectivamente, mediante la adición de estándares de ácidos carboxílicos a la muestra. Si se utiliza el BGE II se observa una gran disminución de la resolución entre los picos de los ácidos grasos. En la Fig. 5 se muestran los electroferogramas obtenidos para las muestras de la Fig. 4 pero empleando el BGE II. Los picos C13 y C12 anteriormente mencionados aparecen ahora como un pico único, con un tiempo de migración de aproximadamente 6,8 min (trazos A y B). La presencia de estos ácidos se puede atribuir a materia prima que permaneció sin reaccionar durante la síntesis del AES. En los electroferogramas de las Figs. 4 y 5 también aparece un número indeterminado de picos de baja intensidad que podrían ser asignados a isómeros ramificados (por ejemplo, derivados 2-metilalquílicos).



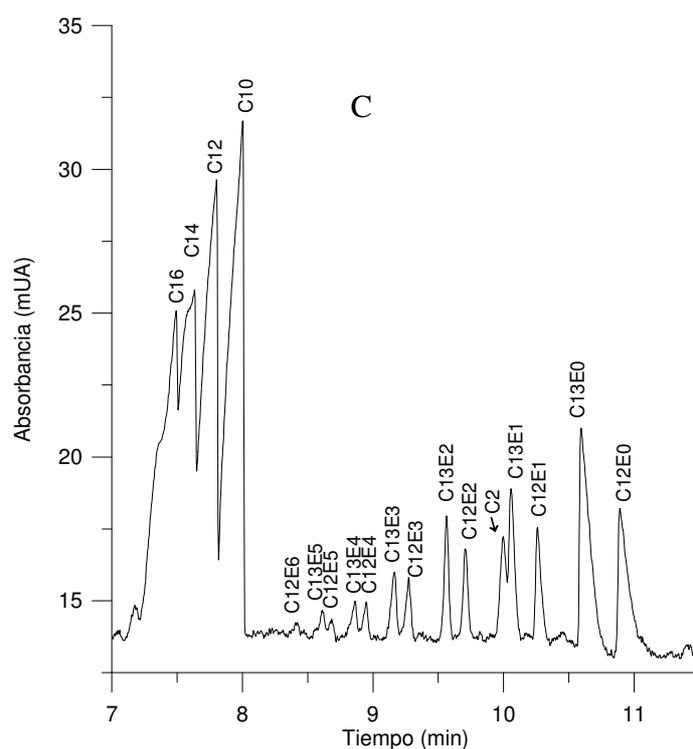


Figura 2. Electroferogramas de diversas mezclas de AES y ácidos grasos C10-C16. A) $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ AES (muestra I) y $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada ácido graso; BGE como en la Fig. 1, pero con un 90% de ACN, EOF a 4,8 min; B) $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ AES (muestra I) y $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada ácido graso; BGE como en la Fig. 1 pero con un 85% de ACN y un 5% de dioxano (BGE I), EOF a 6,4 min; C) $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ AES (muestra I) y $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada ácido graso; BGE como en la parte B, EOF a 5,6 min.

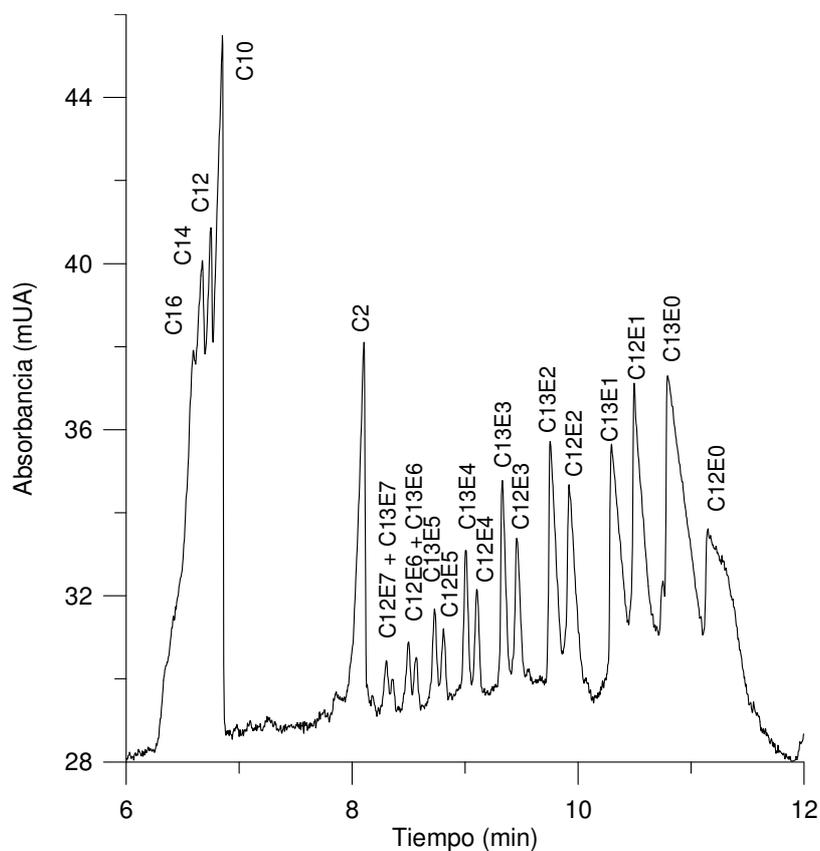
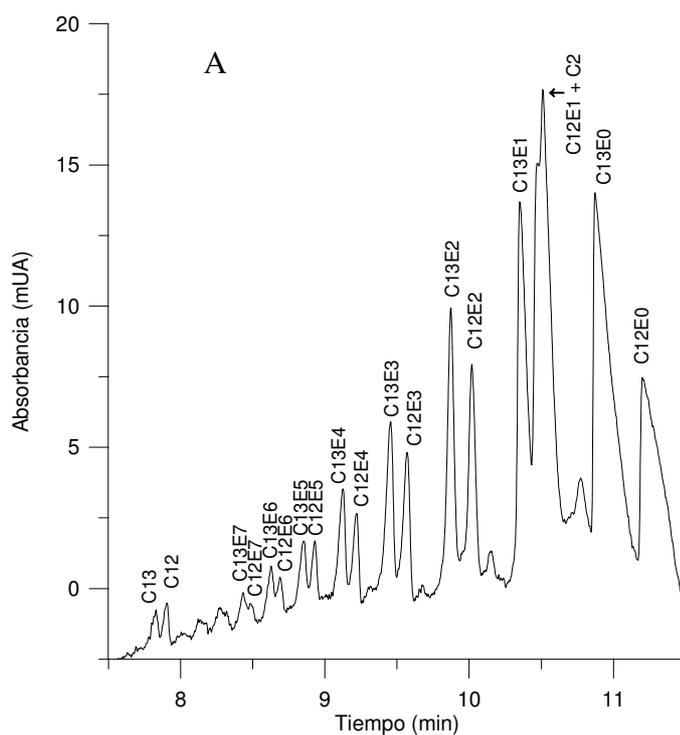


Figura 3. Electroferograma de una mezcla de AES (muestra I, $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$) y ácidos grasos C10-C16 ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada uno) obtenido con un BGE constituido por 5 mM TMBA, 7 mM DPA, 90% de ACN y 5% de dioxano (BGE II), EOF a 5,5 min.



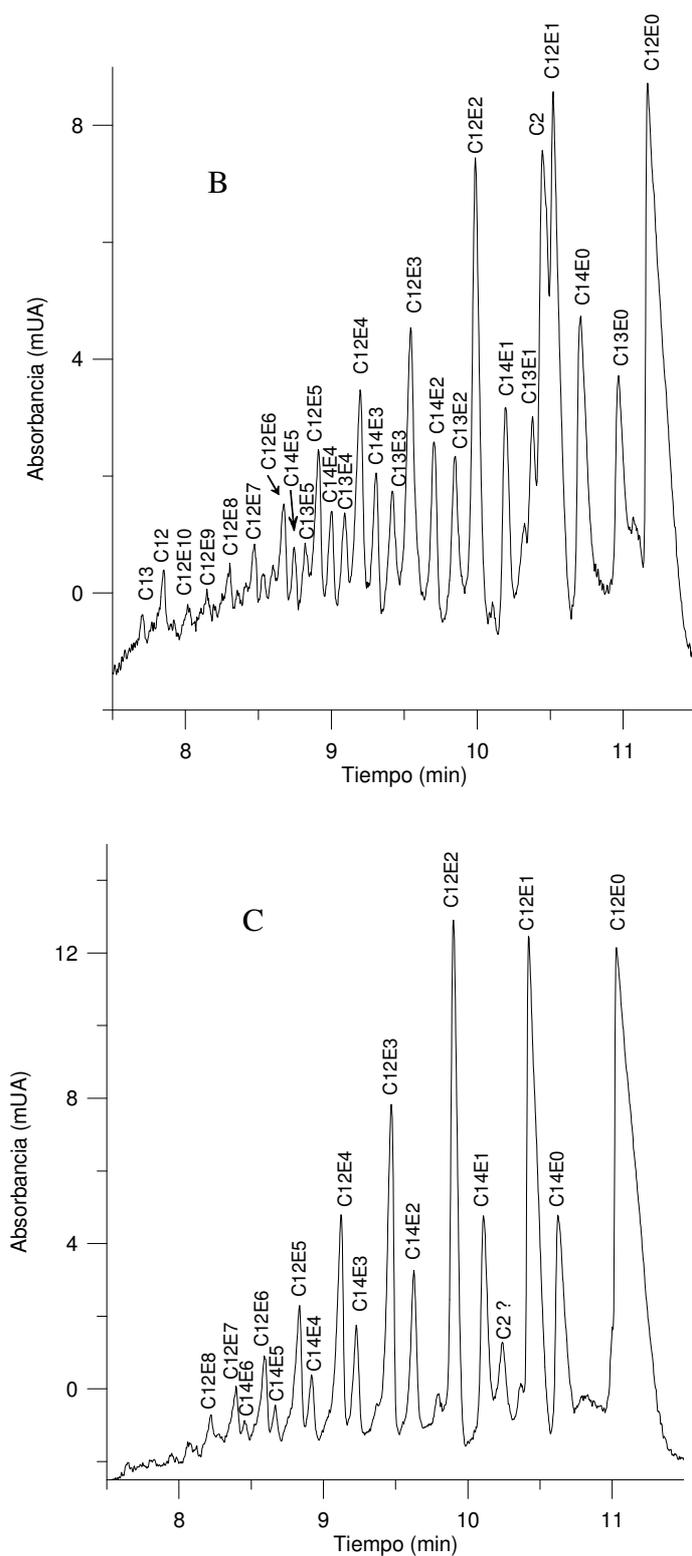
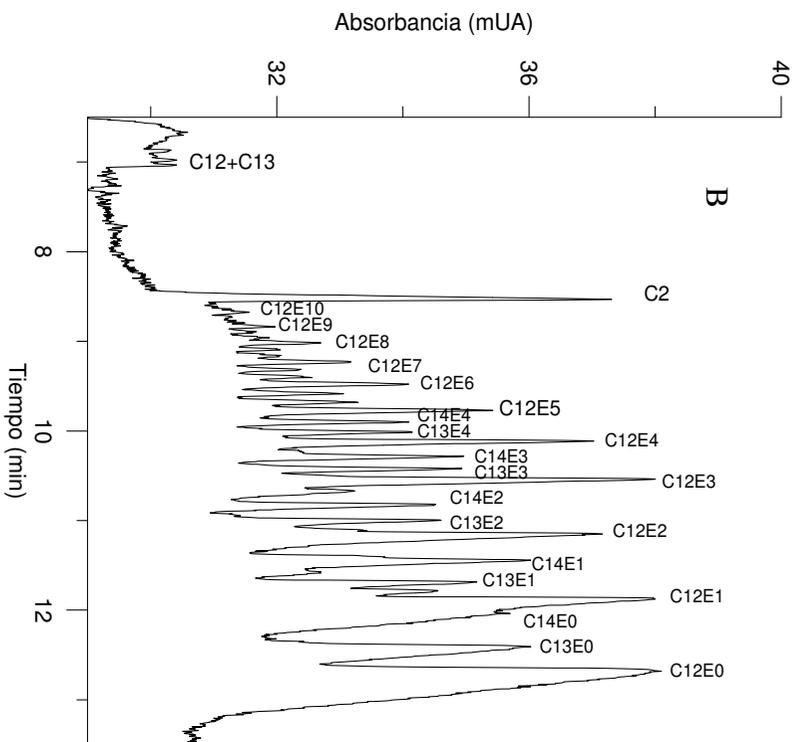
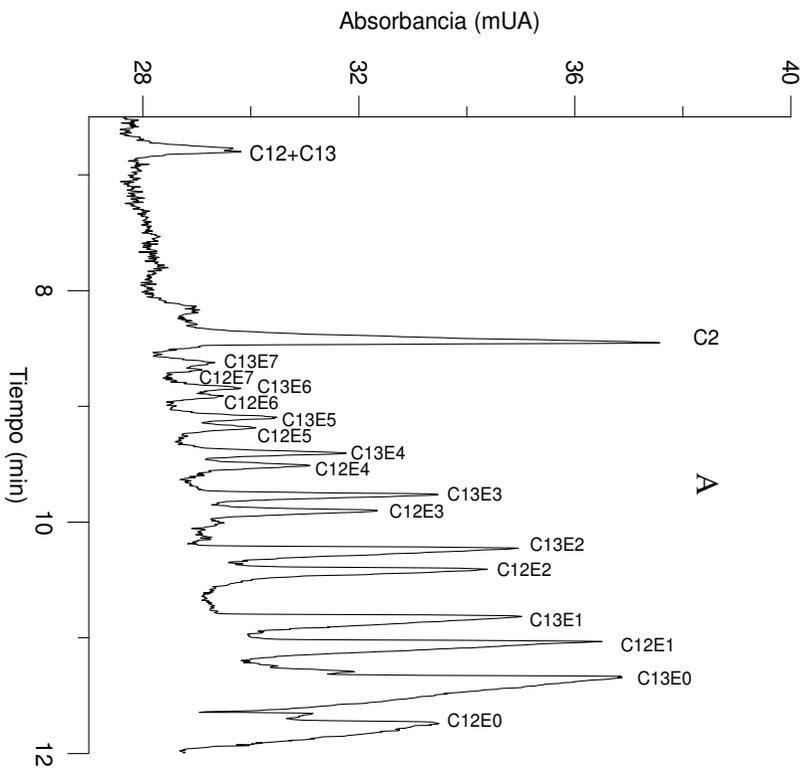


Figura 4. Electroferogramas de muestras de AES de tres fabricantes diferentes ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$) obtenidos con el BGE I (muestras I, II y III para los trazos A, B y C, respectivamente); EOF a 5,7 min para A y B, y 5,6 min para C.



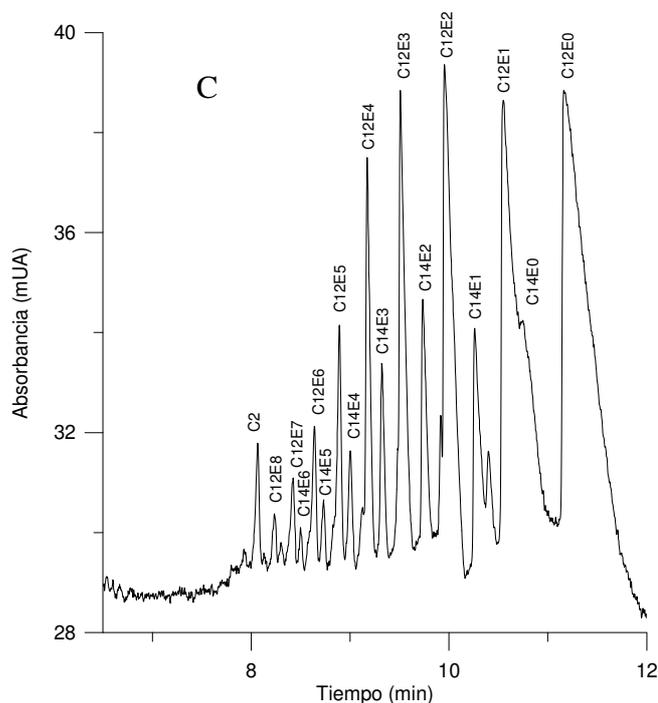


Figura 5. Electroferogramas de muestras de AES de tres fabricantes diferentes ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$) obtenidos con el BGE II (muestras I, II y III para los trazos A, B y C, respectivamente); EOF a 5,6, 5,9 y 5,5 min para A, B, y C, respectivamente.

III.3.2. Caracterización y estudios de cuantificación

Las movilidades electroforéticas se han calculado empleando la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{L' L(t_{EOF} - t)}{V t t_{EOF}} \quad (1)$$

donde L' y L son la longitud total del capilar y su longitud hasta la ventana de detección, t y t_{EOF} son los tiempos de migración para el pico y el EOF, respectivamente, y V es el voltaje aplicado.

Como se deduce de las Figs. 1-5, en todos los BGEs estudiados, la movilidad electroforética de los diferentes homólogos y oligómeros se reduce gradualmente a medida que aumentan tanto el número de átomos de carbono como el número de unidades de oxido de etileno, i . En la Fig. 6 se representan las movilidades electroforéticas de los oligómeros de AES

para los dos BGEs estudiados frente a i . Como cabría esperar, para una determinada longitud de la cadena alquímica se observa una disminución gradual de la movilidad del oligómero a medida que aumenta i . Estas gráficas fueron de gran ayuda en la identificación de los picos.

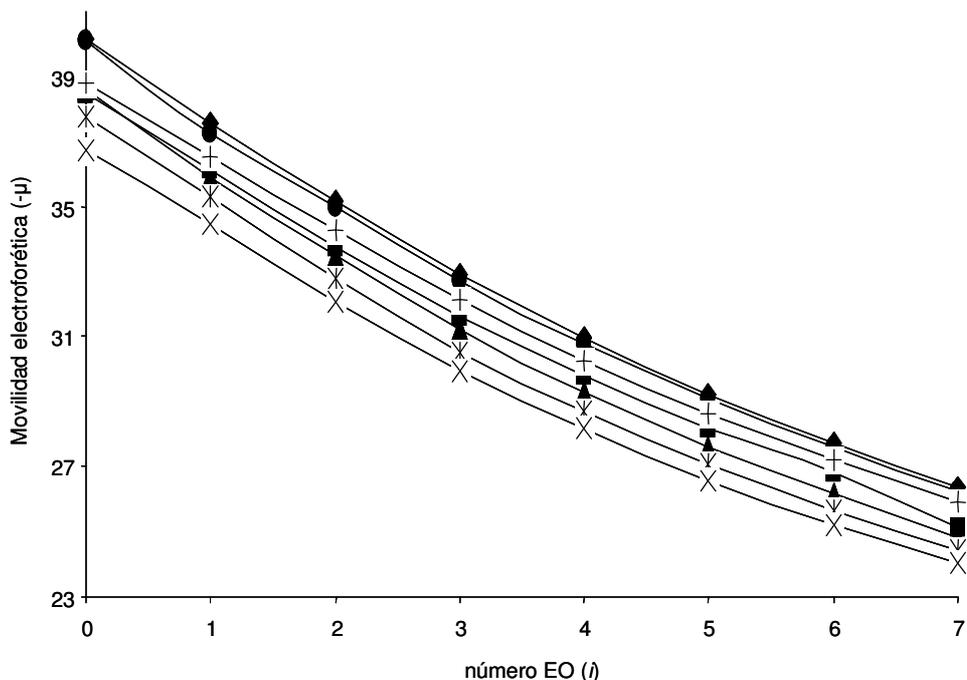


Figura 6. Movilidades electroforéticas (en $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ seg}^{-1}$) frente al número de EO obtenidas con el BGE I: muestra I, C12Ei (●), C13Ei (+); muestra II, C12Ei (▲), C13Ei (*), C14Ei (×); muestra III, C12Ei (◆) y C14Ei (■).

En detección indirecta, la sensibilidad es aproximadamente independiente de la naturaleza de los solutos monocargados, y proporcional a su concentración molar. De esta forma, la fracción molar de un soluto con un número i de óxidos de etileno dentro de la subclase j ($12 \leq j \leq 14$ átomos de carbono para los AES usados en este trabajo), se puede calcular como:

$$a_{ij} = \frac{A_{ij}}{\sum_i A_{ij}} \quad (2)$$

donde A_{ij} es el área corregida del pico ij , y la suma está extendida a todos los picos de la subclase j . La fracción molar de la subclase j es:

$$\beta_j = \frac{\sum_i A_{ij}}{\sum_{ij} A_{ij}} \quad (3)$$

donde la suma del denominador se extiende a todos los picos de AES. En realidad, las áreas de los picos están influenciadas por la diferencia entre las movilidades del revelador y de los solutos, y por ello, α_{ij} y β_j son fracciones molares "aparentes". Sin embargo, como se deduce de los efectos de la electrodispersión observados con el BGE I, la movilidad del TMBA sería similar a la de los AES de pesos moleculares intermedios. Por lo tanto, los valores reales de α_{ij} y β_j serían similares a los obtenidos a partir de las áreas de pico corregidas usando las Ecs. 2 y 3. Aceptando esta aproximación, la fracción molar del soluto ij en un AES se puede calcular aproximadamente mediante el producto $\alpha_{ij} \beta_j$, y su concentración molar se puede obtener de la forma siguiente:

$$[M_{ij}] = \frac{\alpha_{ij} \beta_j C}{\bar{M}} \quad (4)$$

donde C es la concentración total de AES en $\mu\text{g ml}^{-1}$ y \bar{M} es el peso molecular medio:

$$\bar{M} = \sum_{ij} \alpha_{ij} \beta_j M_{ij} \quad (5)$$

donde M_{ij} es el peso molecular del soluto ij . Las Ecs. 2-5 son útiles para caracterizar y cuantificar AES. Deben considerarse los siguientes casos: (i) que se puedan medir todos los picos de AES de la muestra; (ii) que debido al solapamiento con acetato, o con picos de otros solutos, no se puedan medir todos los picos de AES de la muestra, pero que la distribución oligomérica de los picos resueltos sea similar a la del AES utilizado como patrón, de forma que se pueda suponer que las áreas de los picos no resueltos de la muestra siguen la misma distribución que la de los

estándares; y (iii) que no todos los picos de AES de la muestra puedan medirse y que además la distribución oligomérica de la muestra difiera de la del AES utilizado como patrón.

En el caso (i) la caracterización está garantizada, y la calibración se puede realizar por representación de la suma de las áreas de todos los picos frente a la concentración molar media de los estándares, C/\bar{M} :

$$\sum_{ij} A_{ij} = \frac{\varepsilon b C}{\bar{M}} \quad (6)$$

donde εb es el producto de la absortividad molar del revelador usado en la detección indirecta por el camino óptico. Como se deduce de la Ec. 6, si las muestras y los estándares tienen una distribución oligomérica diferente, para calcular C deberían calcularse sus respectivos pesos moleculares medios, \bar{M} y como se deriva de la Ec. 5, para calcular \bar{M} deberían establecerse previamente las fracciones molares de todos los oligómeros. Si además las muestras y los estándares tuvieran la misma o similar distribución oligomérica, \bar{M} sería el mismo, y de esta forma no sería necesario conocer \bar{M} puesto que podría ser incorporado a la pendiente de la curva de calibración como el valor constante $\varepsilon b/\bar{M}$.

En el caso (ii), se puede elaborar un procedimiento de calibración parcial representando para ello la suma de todos los picos medidos frente a C/\bar{M} . Se tiene:

$$\sum_{ij}^p A_{ij} = \sum_{ij}^p \alpha_{ij} \beta_j \sum_{ij} A_{ij} = \frac{f \varepsilon b C}{\bar{M}} \quad (7)$$

donde p es el número de oligómeros cuyos picos han sido integrados (inferior al número total de oligómeros), y cuya fracción molar combinada es f . Un gráfico de la suma de áreas restringido a los p picos frente a C no daría un error sistemático cuando se usase para predecir C , a condición de que muestras y estándares tuviesen la misma distribución oligomérica, y que los oligómeros incluidos en la suma de las áreas fuesen también los mismos. Además en el caso (ii), ya que las

muestras y los estándares tienen los mismos valores de α_{ij} , β_j y \overline{M} , se puede usar la Ec. 4 para obtener la concentración de los oligómeros con exactitud.

La aplicación de este procedimiento de calibración parcial al caso (iii) produciría errores sistemáticos en C y $[M_{ij}]$. Sin embargo, en la mayoría de los casos sería posible evaluar exactamente el AES total y los oligómeros de AES usando exclusivamente el BGE I, si bien se podría también usar el BGE II en los casos en que fuera necesario. Debe tenerse en cuenta que los ácidos carboxílicos más ligeros que C10 no tienen poder detergente, y por esta razón no se usan en la industria. Por ello, con excepción del C2, no se tendrá solapamiento de un oligómero de AES con un pico de un ácido carboxílico cuando se examinen las muestras de detergentes con el BGE I.

Usando el BGE I, el C2 se puede encontrar solapado con C12E1 (como en la Fig. 2, trazo B) o con C13E1 (como en la Fig. 2, trazo C). Para evitar estos solapamientos, una solución, también válida para otros ácidos carboxílicos más pesados que C2, es ajustar la cantidad de agua en el BGE, aumentando la concentración de ACN, para así desplazar los picos de los ácidos grasos a un menor tiempo de migración. Usando el BGE II, se evita el solapamiento entre las dos clases de compuestos hasta el C2 para los ácidos carboxílicos, y hasta C13E7 para los oligómeros de AES. Sin embargo, la calibración con el BGE II tiene la desventaja de la baja eficacia y la menor resolución alcanzada para los oligómeros de AES más ligeros. Una solución es medir el área corregida del C2 en el electroferograma obtenido con el BGE II, y usar esta área para calcular por diferencia el área del pico del oligómero de AES que pueda solapar con el pico del C2 en el electroferograma obtenido con el BGE I.

Alternativamente, se puede predecir el área de un pico solapado de AES mediante procedimientos de interpolación/extrapolación, usando para ello información procedente de otros picos de AES del mismo electroferograma. En el diagrama de la Fig. 7, calculado a partir de los

datos obtenidos con el BGE I para las muestras I, II y III, se representan las áreas corregidas de los picos C_j , divididas por las correspondientes áreas para $j = 12$, frente a i . Como se observa en este diagrama, la mayoría de los oligómeros presentan una notable regularidad de las áreas corregidas de los picos con respecto al número de EOs, i , y también respecto al número de átomos de carbono en la cadena alquílica, j . De esta forma, las áreas de la mayoría de los picos de estas muestras, y probablemente también la mayoría de picos de otras muestras de AES, pueden ser predichas con precisión a partir de las áreas de los picos vecinos usando procedimientos gráficos (como este diagrama) o métodos de regresión. La ventaja de esta aproximación es que no se requiere de una segunda inyección con un BGE diferente del BGE I.

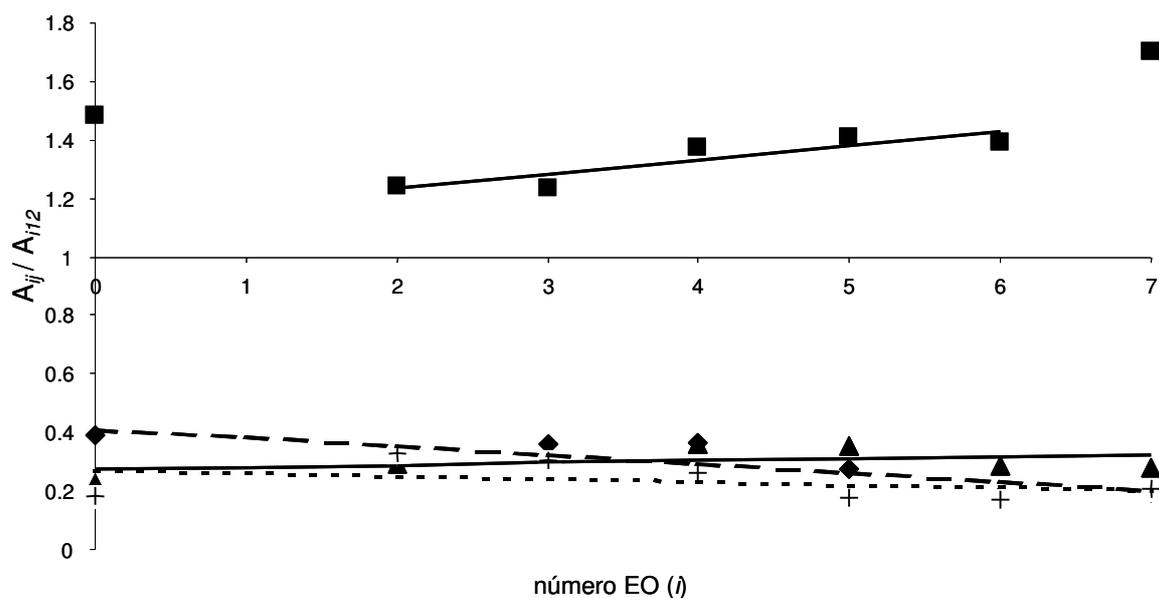


Figura 7. Áreas corregidas de los picos C_j , divididas por las áreas correspondientes para $j = 12$, representadas frente al número de EO, i . Datos obtenidos con el BGE I para las muestras I, II y III ($2000 \mu\text{g ml}^{-1}$). Símbolos: muestra I, $C_{13}E_i$ (■); muestra II, $C_{13}E_i$ (▲, línea continua), $C_{14}E_i$ (◆, línea de trazos); muestra III, $C_{14}E_i$ (+, línea de puntos)

III.3.3 Parámetros de calibrado y aplicación a muestras desconocidas

Se eligió como patrón interno el decil sulfato sódico (C10E0), que normalmente está ausente de las muestras que provienen de la industria de detergentes, y que muestra un pico aislado localizado 0,75 min después del pico del C12E0. A partir de la muestra I y empleando el BGE I, se construyeron las curvas de calibrado para varios oligómeros de AES, así como para el contenido total de AES, en el intervalo de 0 a 1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AES total ($n = 7$ puntos). La concentración de patrón interno se mantuvo constante (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de C10E0). El contenido total de AES se calculó sumando las áreas corregidas de los picos desde C12E0 hasta C13E7.

La correlación lineal entre las áreas de pico corregidas y la concentración de los estándares fue de $r^2 = 0,96$. Cuando se aplicó la corrección del patrón interno, se redujo la dispersión y la linealidad mejoró ($r^2 = 0,992$). Incluso con la corrección del patrón interno, y debido a que la sensibilidad disminuye progresivamente cuando aumenta la concentración de AES, la suma de los cuadrados de los residuales disminuyó significativamente (de 0,26 a 0,07) cuando se usó para construir las curvas de calibración la ecuación cuadrática en lugar del modelo lineal. Por lo tanto, si se desean obtener predicciones más exactas, es recomendable realizar el calibrado con la ecuación cuadrática.

Tomando la anchura de la línea base como $5s$ ($s =$ desviación estándar), el límite de detección (LOD) para cualquier soluto se calculó como $3s$ dividido por $h / [M_{ij}]$, donde h es la altura del pico ij y $[M_{ij}]$ su concentración. Los valores de $[M_{ij}]$ fueron calculados usando las Ecs. 4 y 5. Se encontraron valores de aproximadamente 2 μM para todos los LODs. Este valor corresponde a 0,6 y 1,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para los oligómeros de AES más ligero y más pesado (C12E0 y C13E7), respectivamente.

Utilizando el BGE I se evaluó el contenido en AES de diferentes productos comerciales. En la Figura 8 se muestra el electroferograma de un limpiador líquido para prendas delicadas

(dilución 1:50 con agua). Se pueden observar los picos correspondientes a los AES y a los ácidos grasos, además del pico C10E0 correspondiente al patrón interno. La integración de las áreas corregidas de los picos C12E0-C13E7, y la aplicación de la correspondiente curva de calibrado, dio como resultado una concentración total de AES de $C = 1600 \mu\text{g ml}^{-1}$, que correspondió con 80 mg ml^{-1} en la muestra sin diluir.

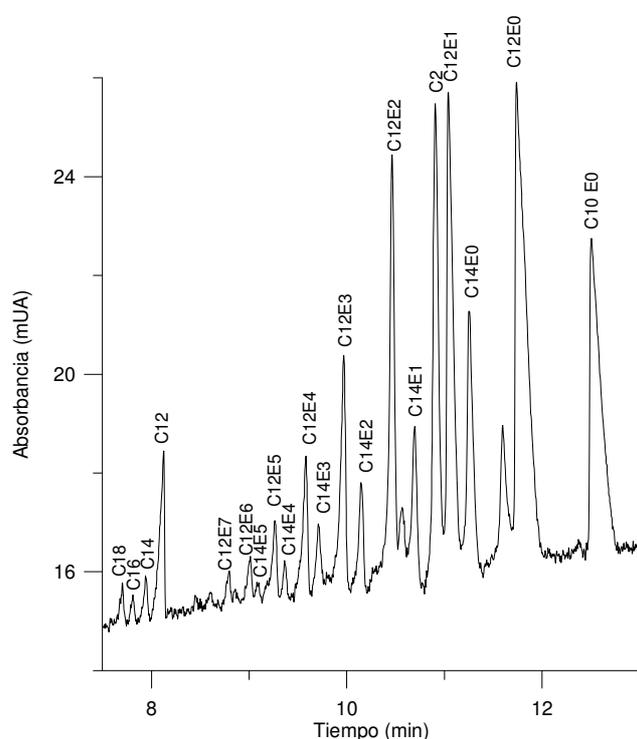


Figura 8. Electroferograma de un limpiador líquido para prendas delicadas (diluido 50 veces con agua) obtenido empleando el BGE I; patrón interno C10E0 ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$); EOF a 5,9 min.

III.4. Conclusiones

En el trabajo desarrollado en este capítulo se ha puesto a punto un método que permite la separación, caracterización y determinación de mezclas de alquil éter sulfatos y ácidos grasos (C10-C16) empleando dos BGEs que contenían mezclas ACN-agua, o mezclas ACN-agua-dioxano. Debido a la inhibición de la ionización de los grupos carboxilato de los ácidos grasos, los tiempos de migración y la resolución entre los ácidos grasos disminuyó cuando se redujo el contenido de agua del BGE, mejorando la eficacia y resolución entre los oligómeros de AES. La sustitución de un 5 % de ACN por una cantidad equivalente de dioxano provocó un aumento de los tiempos de migración y una mejora de la resolución. Utilizando un BGE que contenía 5 mM de ácido trimetoxibenzoico, 7 mM de dipentilamina, 85 % de ACN, 5 % de dioxano y 10 % de agua se alcanzó una separación completa de las dos familias de surfactantes, incluyendo la separación entre los oligómeros de AES, y la de éstos hasta con 7 EOs respecto al ácido graso saturado C10, manteniendo además una aceptable resolución entre los diferentes ácidos grasos ensayados. La reducción de la cantidad de agua en el BGE provoca un aumento de la separación entre las dos familias de surfactantes. De esta manera, usando 90 % de ACN y 5 % de dioxano, el acetato (C2) apareció resuelto respecto a los oligómeros de AES de hasta 7 EOs, mientras que empeoró la resolución de los ácidos grasos más pesados.

La gran reproducibilidad en los tiempos de migración permite una fácil identificación de los oligómeros de AES. Independientemente del origen del AES, se pueden observar como los oligómeros con el mismo número de unidades de EO, presentan tiempos de migración muy similares. Además se observó cómo los tiempos de migración disminuyeron gradualmente a medida que aumentó el número de unidades de EO dentro de cada subclase de AES o series de homólogos.

Se aplicaron los métodos desarrollados a la determinación de AES en productos comerciales. Se observó que el cociente entre las áreas corregidas de los picos de AES y el área corregida del patrón interno es proporcional a la concentración de AES.

III.5. Referencias

- [1] S. Simunic, Z. Soljic, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 19 (1996) 1139.
- [2] A. Kruse, N. Buschmann, K. Cammann, J. Planar Chromatogr. Mod. TLC 7 (1994) 22.
- [3] L. H. Heinrich, J. Planar Chromatogr. Mod. TLC 5 (1992) 103.
- [4] A. Nakae, K. Tsuji, M. Yamanaka, Anal. Chem. 53 (1981) 1818.
- [5] G. Bleau, M. Desaulniers, J. Chromatogr. 487 (1989) 221.
- [6] S.L. Abidi, J. Chromatogr. 362 (1986) 33.
- [7] A. Marcomini, W. Giger, Anal. Chem. 59 (1987) 1709.
- [8] G. R. Bear, J. Chromatogr. 459 (1988) 91.
- [9] A. Marcomini, A. Di Corcia, R. Samperi, S. Capri, J. Chromatogr. 644 (1993) 59.
- [10] L. Comellas, J. L. Portillo, M. T. Vaquero, J. Chromatogr. 657 (1993) 25.
- [11] Y. Yokoyama, M. Kondo, H. Sato, J. Chromatogr. 643 (1993) 169.
- [12] C. Vogt, K. Heinig, B. Langer, J. Mattusch, G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem. 352 (1995) 508.
- [13] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, J. Chromatogr. A 745 (1996) 281.
- [14] C. Crescenci, A. Di Corcia, E. Marchiori, R. Samperi, A. Marcomini, Water Res. 30 (1996) 722.
- [15] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, Anal. Chem. 70 (1998) 1885.
- [16] G. Deng, D. Chow, G. Sanyal, Anal. Biochem. 289 (2001) 124.
- [17] S. H. Benomar, M. R. Clench, D. W. Allen, Anal. Chem. Acta 445 (2001) 255.

-
- [18] G. Czichocki, H. Fiedler, K. Haage, H. Much, S. Weidner, *J. Chromatogr. A* 943 (2002) 241.
- [19] J. Bullock, *J. Chromatogr.* 645 (1993) 169.
- [20] S. A. Shamsi, N. D. Danielson, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3757.
- [21] H. Salimi-Moosavi, R. M. Cassidy, *Anal. Chem.* 68 (1996) 293.
- [22] G. M. McLaughlin, A. Weston, K. D. Hauffe, *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 123.
- [23] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *J. Cap. Electroph.* 3 (1996) 261.
- [24] A. Monclus, M. Rodriguez, I. Masana, *LC-GC International* 9 (1996) 79.
- [25] K. Heinig, C. Vogt, *Fresenius J. Anal. Chem.* 359 (1997) 202.
- [26] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 695.
- [27] C. Vogt, K. Heinig, *Tenside Surf. Det.* 35 (1998) 470.
- [28] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *Analyst* 123 (1998) 349.
- [29] W. H. Ding, C. H. Liu, *J. Chromatogr. A* 929 (2001) 143.
- [30] J. M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, *Electrophoresis* 22 (2001) 2017.
- [31] J. M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, C. Mongay-Fernández, G. Ramis-Ramos, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 227.
- [32] J. M. Herrero-Martínez, M. Fernández-Martí, E. F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, *Electrophoresis* 22 (2001) 526.
- [33] M. Grob, F. Steiner, *Electrophoresis* 23 (2002) 1921.
- [34] J. M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, *Electrophoresis* 24 (2003) 681.
- [35] M. W. F. Nielen, *J. Chromatogr.* 588 (1991) 321.
- [36] K. Heinig, C. Vogt, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 612.

- [37] K. Heinig, C. Vogt, *Electrophoresis* 20 (1999) 3311.
- [38] J. Riu, P. Eichhorn, J. A. Guerrero, T. P. Knepper, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 221.
- [39] M. Castillo, J. Riu, F. Ventura, R. Boleda, R. Scheduling, H. F. Schroeder, C. Nistor, J. Emneus, P. Eichhorn, T. P. Knepper, C. C. A. Jonkers, P. de Voogt, E. Gonzalez Mazo, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 195.
- [40] V. Zuriguél, E. Causse, J. D. Bounery, G. Nouadje, N. Simeon, M. Nertz, R. Salvayre, F. Couderc, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 233.
- [41] O. Schmitz, D. Melchior, W. Schuhmann, S. Gäb, *J. Chromatogr. A* 814 (1998) 261.
- [42] D. Melchior, S. Gäb, *J. Chromatogr. A* 894 (2000) 145.
- [43] I. Miksik, Z. Deyl, *J. Chromatogr. A* 807 (1998) 111.
- [44] E. Drange, E. Lundanes, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 301.
- [45] T. Wang, H. Wei, S. F. Y. Li, *Electrophoresis* 19 (1998) 2187.
- [46] M. J. Chen, H. S. Chen, C. Y. Lin, H. T. Chang, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 171.
- [47] D. L. Gallaher, M. E. Johnson, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2080.
- [48] A. Dermaux, P. Sandra, V. Ferraz, *Electrophoresis* 20 (1999) 74.
- [49] J. Collet, P. Gareil, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 165.
- [50] R. Roldan Assad, P. Gareil, *J. Chromatogr. A* 708 (1995) 339.
- [51] F. B. Erim, X. Xu, J. C. Kraak, *J. Chromatogr. A* 694 (1995) 471.
- [52] A. Desbène, C. J. Morin, N. L. Mofaddel, R. S. Groult, *J. Chromatogr. A* 716 (1995) 279.
- [53] P. L. Desbène, C. J. Morin, *Spectra Anal.* 25 (1996) 15.

Capítulo IV

Resolución de solutos absorbentes y no absorbentes solapados usando una ventana de absorción de balance nulo o deconvolución multivariante con aplicación a electroforesis capilar de surfactantes aniónicos

(*Journal of Chromatography A* 1036, 2004, 205-216)

IV.1. Introducción

En los productos manufacturados de la industria de detergencia y cosmética, se suelen encontrar mezclas de diversos tipos de surfactantes cada uno de los cuales está constituido por una serie de homólogos e isómeros. La juiciosa selección y la optimización cuidadosa de las condiciones de separación y detección han conducido a métodos de HPLC y de CE capaces de resolver familias de surfactantes en los homólogos e isómeros que las constituyen (ver referencias 4-34 del capítulo III).

Los alquil benceno sulfonatos (ABS), son una familia importante de surfactantes aniónicos absorbentes, cuyos oligómeros se han separado usando como BGEs medios acuosos [1-3] y no acuosos [4], en algunos casos con resolución tanto de homólogos como de isómeros posicionales (ver referencias 28-34 del capítulo III). Todavía supone un desafío caracterizar y evaluar familias de surfactantes en mezclas complejas que se encuentran frecuentemente en productos de limpieza y artículos de tocador. Grob y Steiner (ver referencia 33 del capítulo III) han desarrollado la separación de las siguientes mezclas: (a) AS y alcano sulfonatos secundarios, (b) AS y AES, (c) AS y ABS, y (d) AS, alcano sulfonatos secundarios, AES y ABS, pero con extenso solapamiento entre los picos de AES y ABS. Las dos familias de surfactantes AES-ABS se resolvieron parcialmente usando un 80 % de ACN y un 0,001 % de polibreno (bromuro de hexadimetrina) en presencia del ácido 2-naftalenosulfónico como BGC (referencia 33 del capítulo III).

Debido al bajo precio y al alto poder de limpieza del ABS, este surfactante se encuentra con frecuencia en las formulaciones. Las mezclas AES-ABS, AES-ABS-ácidos grasos y otras combinaciones de ABS con otros surfactantes aniónicos son muy habituales. Nosotros, en el trabajo expuesto en el capítulo anterior, desarrollamos un método para el análisis de mezclas de AES y ácidos carboxílicos. Desafortunadamente, con el BGE recomendado en dicho trabajo los homólogos de ABS aparecen justo en medio de la región de tiempos de migración de los oligómeros de AES, causando por tanto una fuerte interferencia. Los diversos intentos de modificar el BGE recomendado para las mezclas de AES y ácidos carboxílicos, para aumentar así la separación entre las familias de surfactantes AES y ABS, conducían a una disminución de la resolución entre los oligómeros de AES, así como a un mayor solapamiento entre los ácidos carboxílicos más ligeros y los oligómeros de AES más pesados. Además, la composición del BGE estuvo fuertemente condicionada por la necesidad de mantener la sensibilidad de la detección indirecta.

En este trabajo se desarrollan tres aproximaciones diferentes para eliminar la interferencia del ABS en los electroferogramas de ácidos grasos y de AES, todas ellas basadas en el uso de un detector de fila de diodos. En primer lugar, se canceló la contribución de la interferencia absorbente del ABS a la señal mediante la selección de un BGC y un rango de longitudes de onda adecuado en la ventana de detección. De este modo se obtuvieron electroferogramas selectivos para los solutos no absorbentes en ausencia de la señal del ABS. Además, se desarrollaron dos aproximaciones multivariantes, capaces de aprovechar toda la información procedente de la matriz de datos bidimensional (tiempo de migración - longitud de onda) proporcionada por el detector de fila de diodos. En análisis de datos se han desarrollado diversas aproximaciones basadas en la comparación de espectros, o en el uso de variables latentes, que se han convertido, hoy en día, en valiosas herramientas disponibles para asegurar la pureza de pico y para deconvolucionar señales

solapadas [5]. En este trabajo hemos empleado un método comparativo conocido como aproximación por proyección ortogonal (*orthogonal projection approach*, OPA) [6]. El OPA permite encontrar el espectro más disimilar contenido en la matriz de datos. A continuación este espectro se utiliza como una estimación inicial para el siguiente paso de refinado, que se basa en mínimos cuadrados alternados (*alternating least squares*, ALS) [7,8]. Ambos procedimientos, OPA y OPA-ALS, resultaron ser también útiles para localizar las ventanas de longitudes de onda capaces de cancelar las contribuciones a la señal debidas a interferencias absorbentes de naturaleza conocida o desconocida. Los tres procedimientos descritos en este trabajo pueden ser de aplicación universal para eliminar interferencias absorbentes solapadas con solutos no absorbentes, cuando estos últimos son monitorizados con detección indirecta tras una separación mediante CE o HPLC.

IV.2. Materiales y métodos

IV.2.1. Instrumentación y condiciones de trabajo

Se empleó un espectrofotómetro de fila de diodos HP 8453 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) provisto de una celda estándar de cuarzo de 1 cm. Para las separaciones electroforéticas se emplearon un sistema de CE HP^{3D} (Agilent Technologies) y capilares de sílice fundida (Composite Metal Services Ltd., Ilkley, UK) de 80,5 cm (72 cm de longitud efectiva) y 50 μm de diámetro interno (363 μm de diámetro externo). El *software* del equipo de CE permitió monitorizar simultáneamente cinco ventanas de longitudes de onda diferentes, y almacenar durante la separación un espectro completo cada 0,2 segundos. Estos espectros contenían 40 valores de absorbancia uniformemente distribuidos entre 220 y 300 nm (resolución espectral de 2 nm). Las separaciones se llevaron a cabo a 45 °C y aplicando + 20 kV.

Los capilares nuevos se trataron con disoluciones de NaOH 1 M y 0,1 M y agua a 60°C, pasando cada disolución a través del capilar durante 10 min. Diariamente, antes de ser usados, los capilares se lavaron a 45 °C con NaOH 0,1 M durante 20 min, y luego con agua y con el tampón electroforético durante 10 minutos para cada uno. Entre inyecciones sucesivas, el capilar se acondicionó durante 10 min con NaOH 0,1 M, 2 minutos con agua y 8 minutos con el tampón electroforético. Al final de cada sesión de trabajo, el capilar se lavó con agua durante 10 min. Antes de cada inyección, las disoluciones se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro (Albet, Alemania). Las muestras fueron inyectadas hidrodinámicamente (5 kPa × 3 s). En todos los casos se empleó como referencia la longitud de onda de 380 nm con un ancho de banda de 80 nm. Como el trabajo se realiza con detección indirecta, se intercambiaron las longitudes de onda de medida y de referencia, con el fin de obtener señales con picos positivos.

IV.2.2. Reactivos y disoluciones

En este trabajo, los ácidos carboxílicos y los homólogos de ABS se nombran de acuerdo con el número de átomos de carbono en la cadena alquílica, y con un símbolo Φ para identificar el grupo fenil sulfónico y distinguirlo del grupo carboxílico. Por ejemplo, C12 es el ácido dodecanoico, mientras que Φ C12 es el ácido dodecibenceno sulfónico, C12E2 representa un oligómero de AES con una cadena alquílica de 12 átomos de carbono más dos grupos óxido de etileno y un grupo sulfato al final de la molécula.

Se emplearon ACN, dioxano (Scharlab, Barcelona, España), ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico (TMBA), dipentilamina (DPA), los ácidos antraquinona-2-carboxílico (AQCA), acético (C2), cáprico (C10), laúrico (C12), mirístico (C14) y palmítico (C16). También se emplearon decil sulfato sódico (C10E0, como patrón interno en la calibración), dodecil sulfato sódico (SDS o C12E0), tetradecil sulfato sódico (C14E0) y hexadecil sulfato sódico (C16E0)

(Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania, y Fluka, Buchs, Suiza). Además se empleó una disolución acuosa de AES al 27 % p/ p (suministrada por Químicas Oro S.A., Sant Antoni de Benaixever), ácido 4-dodecibencenosulfónico (mezcla de homólogos de un 90% de pureza, Fluka) con una masa molecular media de $326,49 \text{ g mol}^{-1}$, y agua desionizada (desionizador Barnstead, Sybron, Boston, MA).

Se prepararon en agua dos disoluciones madre de ABS y AES de concentración 10 mg mL^{-1} (la dilución de AES se realizó de acuerdo con su concentración declarada). Se prepararon también una mezcla conteniendo C10-C16 (cada ácido en concentración $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, en un medio metanol/agua 50:50, v/v) y una disolución conteniendo C10E0 (patrón interno) en concentración $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en agua. Estas disoluciones se ajustaron a pH 10 con NaOH 1 y 0,1 M. El BGE recomendado contiene AQCA 5 mM, DPA 7 mM, ACN 85 %, dioxano 5 % y agua.

IV.3. Resultados y discusión

IV.3.1. Cancelación de la interferencia de ABS mediante selección del BGC y de la ventana de longitudes de onda de detección

En la Fig. 1 se muestran los electroferogramas de disoluciones de ABS y AES obtenidos mediante detección indirecta a 260 nm (picos de disminución de absorbancia que han sido invertidos). A esta longitud de onda el AQCA presenta un máximo de absorción, mientras que el ABS no absorbe, lo que implica una sensibilidad máxima para la detección indirecta de ambos, el ABS (parte A) y los solutos aniónicos no absorbentes, esto es, el AES y los ácidos grasos (parte B). Los electroferogramas de ABS muestran cuatro picos intensos, que corresponden a los homólogos $\Phi\text{C10-}\Phi\text{C13}$, aunque, con cierto solapamiento entre los isómeros de homólogos adyacentes (referencia 34 del capítulo III). Como se puede deducir al comparar los trazos A y B, los picos de ABS y AES presentan un fuerte solapamiento. Se puede obtener un electroferograma

de ABS libre de la interferencia de AES utilizando simplemente la detección directa (picos de absorbancia positivos), monitorizando a la longitud de onda donde el ABS presenta un máximo de absorción (225 nm); sin embargo, la detección de solutos no absorbentes, como AES y ácidos grasos, sólo es posible mediante detección indirecta, de forma que cualquier soluto absorbente que coemigre o coeluya con ellos producirá interferencia. Como se demuestra posteriormente en esta sección, si se emplea una ventana de detección adecuada se puede detectar AES en el modo indirecto sin que el ABS interfiera. No es necesaria la adquisición de la matriz de datos bidimensional, si bien, como se muestra después en las secciones IV.3.2 y IV.3.3, usando la información almacenada en esta matriz también es posible la detección tanto de solutos no absorbentes como de ABS en una única inyección.

En detección indirecta, las señales se producen por la sustitución de los iones del BGC por los del soluto. Por lo tanto, para el caso de aniones monocargados y usando el modo de detección indirecto, no se puede detectar un soluto que presente la misma absortividad molar que los iones del revelador. La condición general de indetectabilidad para un ion revelador con una carga z_p que es reemplazado por un soluto con una carga z_a es:

$$z_p \varepsilon_p = z_a \varepsilon_a \quad (1)$$

donde ε_p y ε_a son las absortividades molares a la longitud de onda de detección de los iones revelador y soluto respectivamente. La Fig. 2 muestra los espectros de absorción de TMBA, AQCA y ABS, en los que el eje de las Y está expresado en unidades de absortividad molar. Los espectros se obtuvieron empleando un espectrofotómetro HP 8453, evitando no superar una absorbancia de 1,5 unidades, para evitar la distorsión debida a la radiación extraviada. Las absortividades molares se obtuvieron dividiendo las absorbancias por las respectivas concentraciones molares. Para ABS, se empleó la concentración molar media dada por el fabricante. De hecho, el ABS es una mezcla de especies, pero como aproximación, se puede

considerar que todas las especies presentan el mismo espectro de absorción. Esta suposición es razonable, ya que el espectro de cada oligómero depende principalmente del grupo bencenosulfónico más que de la longitud de la cadena alquílica. Finalmente, dado que todos son aniones monovalentes, no fue necesario multiplicar el eje Y de la Fig. 2 por las respectivas cargas de los iones. La Fig. 2 muestra la presencia de dos puntos por cada revelador donde se satisface la Ec. 1, siendo 221 y 227 nm para el AQCA y 226 y 232 nm para el TMBA. A estas longitudes de onda, los espectros de absorptividad de los reveladores se cruzan con el espectro de absorptividad del ABS.

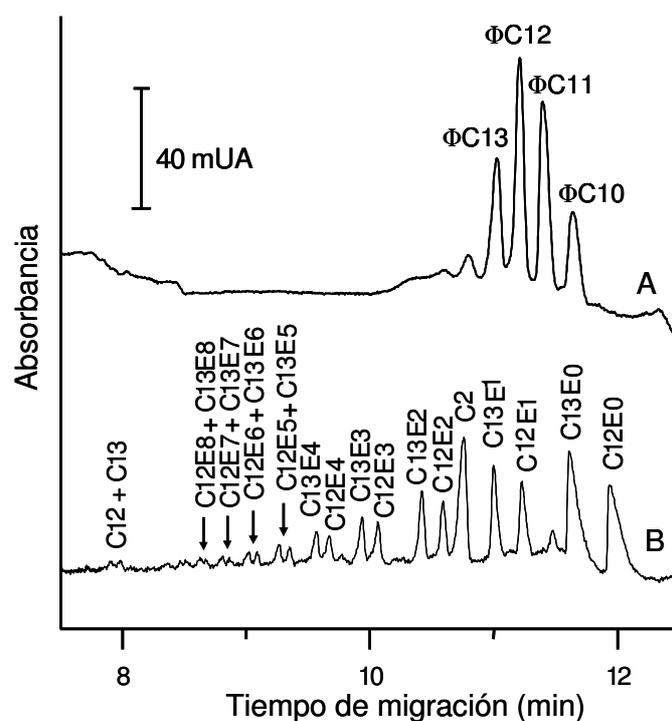


Figura 1. Electroferogramas de disoluciones de $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ABS (A) y de AES (B) obtenidos por detección indirecta, monitorizando a 260 nm con una ventana de 10 nm de anchura; EOF a aproximadamente 6,2 y 5,9 min, respectivamente.

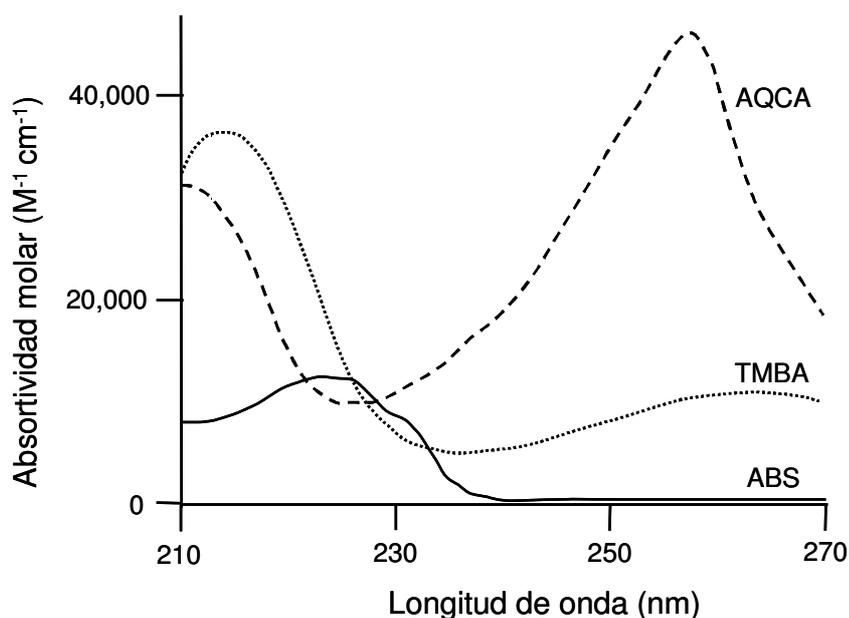


Figura 2. Espectros de absorción de TMBA, AQCA y ABS divididos por sus respectivas concentraciones molares; los espectros se registraron con disoluciones 25 μM de TMBA y de AQCA, y 130 μM de ABS.

Sin embargo, para realizar una detección adecuada es necesario usar una ventana extendida a lo largo de un intervalo de longitudes de onda, en lugar de una única longitud de onda, lo que permite mejorar la relación señal/ruido. En detección indirecta, un soluto con una absorptividad molar menor que la del revelador contribuye incrementando la señal a cualquier longitud de onda a lo largo de la ventana de detección, mientras que la señal disminuye cuando la absorptividad molar del soluto es mayor que la del revelador. Por lo tanto, para que no se detecte un soluto absorbente cuando se usa una ventana de detección de anchura $\Delta\lambda$ centrada a una longitud de onda j , se debe cumplir la siguiente condición:

$$S = z_p \sum_{j=-\Delta\lambda/2}^{j=+\Delta\lambda/2} \epsilon_{p,j} - z_a \sum_{j=-\Delta\lambda/2}^{j=+\Delta\lambda/2} \epsilon_{a,j} = 0 \quad (2)$$

De acuerdo con la Ec. 2, a lo largo de cada punto que satisface la Ec. 1 variando $\Delta\lambda$ se puede definir un conjunto de ventanas de detección de balance nulo del producto carga-suma de

absortividades molares (*null-balance detection windows*, NBDWs). En estas ventanas, las sumas de las contribuciones positivas y negativas a la señal se cancelan mutuamente. Cualquier soluto absorbente debería ser indetectable cuando se use una ventana de longitudes de onda que satisfaga la Ec. 2. Como se puede deducir de la Ec. 2, no existe una ventana de detección de balance nulo para solutos que presenten absortividades molares a todas las longitudes de onda menores que las del BGC; sin embargo, como se discutirá posteriormente en el apartado IV.3.3, en los casos en que esto suceda se puede conseguir la cancelación de la interferencia empleando modelos multivariantes.

En la Fig. 3 se representan los valores de S para las parejas AQCA-ABS y TMBA-ABS, calculados de acuerdo a la Ec. 2, frente a la longitud de onda central de una serie de ventanas que van aumentando en anchura. En esta representación, los puntos de cruce de las curvas con la línea $S = 0$ indican las longitudes de onda donde existen NBDWs de una anchura determinada. Este gráfico también muestra que para cada pareja de BGC-soluto, a medida que aumenta $\Delta\lambda$, las dos NBDWs (centradas alrededor de las dos longitudes de onda donde se cumple la Ec. 1) convergen en una única ventana de anchura máxima. Para una pareja determinada BGC-soluto, no es posible una NBDW más allá de dicha anchura máxima. La Ec. 2 predice una anchura máxima de la NBDW de 9 nm como máximo tanto para la pareja AQCA-ABS como para TMBA-ABS. La predicción teórica sobre los espectros de absortividad señala los valores 225,0 y 229,5 nm para AQCA-ABS y TMBA-ABS, respectivamente, como los centros de las NBDWs de máxima anchura posible.

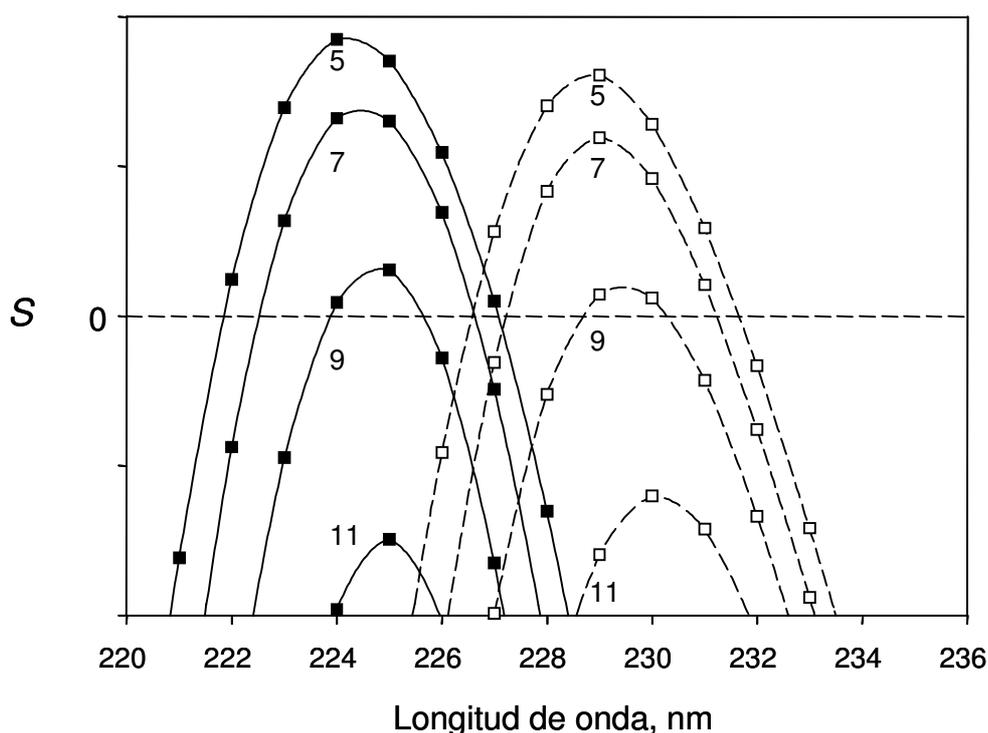


Figura 3. Valores de S de acuerdo con la Ec. (2), representados frente a la longitud de onda central de la ventana de observación; los números sobre las líneas indican las anchuras de las ventanas en nm, las líneas continuas corresponden a datos para la pareja AQCA-ABS, y las líneas a trazos corresponden a la pareja TMBA-ABS.

Debido a que las ventanas de observación que se emplean con mayor frecuencia en CE presentan un intervalo de 10-20 nm, y debido a que las ventanas más pequeñas suelen presentar menores relaciones señal/ruido, se escogió 9 nm como anchura de las NBDWs. Las NBDWs óptimas para el AQCA y el TMBA en la Fig. 3 están centradas a las longitudes de onda donde sus respectivas absorptividades molares están próximas a 10000 y $7000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; por lo tanto, usando la correspondiente ventana óptima para AQCA la sensibilidad de la detección indirecta debe ser mayor que usando la ventana óptima para TMBA. Por esta razón, se seleccionó el AQCA como BGC.

Las Figs. 2 y 3 se calcularon usando los datos obtenidos en el espectrofotómetro HP 8453, sin embargo, este instrumento puede diferir ligeramente del detector del instrumento de CE en

términos de anchura de rendija, calibración de la escala de longitudes de onda, y probablemente también en el procesado de los datos a medida que se adquieran. Más aún, las pruebas realizadas registrando espectros de ABS y AQCA con el instrumento de CE mostraron diferencias significativas de las absorptividades molares de los solutos respecto a las obtenidas con el espectrofotómetro HP 8453. Por esta razón, la anchura y la longitud de onda central de la NBDW máxima para la pareja AQCA-ABS que fueron predichas con los datos obtenidos con el espectrofotómetro, fueron también optimizadas experimentalmente usando el detector del instrumento de CE. La anchura y el valor central de longitud de onda de la NBDW máxima encontrados antes, fueron útiles como una primera aproximación, para registrar los electroferogramas de una disolución de ABS usando ventanas de detección a valores de anchura crecientes (desde 5 a 13 nm), desplazando cada vez la longitud de onda central desde 223 a 231. En la Fig. 4 se muestran las series obtenidas con una ventana de 9 nm de anchura.

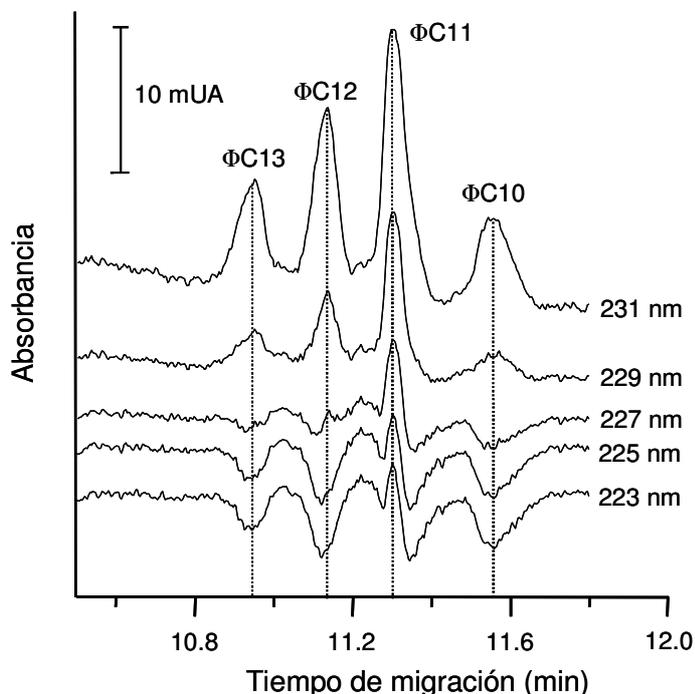


Figura 4. Electroferogramas de una disolución de ABS de concentración $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$, obtenidos midiendo con una ventana de 9 nm de anchura centrada a las longitudes de onda indicadas junto a los trazos; EOF a 6,1 min.

La mejor NBDW resultó tener una anchura de 9 nm (como se esperaba), pero la mejor posición para el centro de la ventana fue 227 nm (en lugar de los 224 nm obtenidos con el espectrofotómetro HP 8453). Como se muestra en la Fig. 4, empleando la NBDW óptima, todavía se observaron pequeños picos negativos para los homólogos $\Phi C13$, $\Phi C12$ y $\Phi C10$, y un pequeño pico positivo para el $\Phi C11$. Estos picos residuales se podrían explicar por la deriva de la sensibilidad asociada al aumento de la movilidad electroforética a tiempos de migración crecientes, aunque también podrían contribuir las pequeñas diferencias que existen entre las absorptividades molares de los homólogos de ABS (que pueden ser debidas a la diferente distribución de isómeros para cada uno de ellos).

Se estimaron los valores relativos de las señales que no se habían anulado del todo a los tiempos de migración de los cuatro homólogos. En primer lugar, se adquirió la señal del ABS en modo indirecto, utilizando una ventana de 9 nm de anchura centrada a la longitud de onda del máximo de absorción del AQCA, 260 nm, donde el ABS no absorbe. Esta señal se multiplicó por el cociente de absorptividades del AQCA a 227 y 260 nm para obtener así las alturas de pico casi iguales a las que hubieran mostrado ambos, ABS y AQCA, a 227 nm, y en los modos de detección directo e indirecto, respectivamente si no se produjera la cancelación mutua de la señal. De acuerdo con estas alturas de pico las absorbancias residuales para el trazo de 227 nm observadas en la Fig. 4 corresponden a porcentajes de la señal no cancelada de 1,2, 0,7, -4,5 y 2,6 % para los homólogos $\Phi C13$, $\Phi C12$, $\Phi C11$ y $\Phi C10$, respectivamente. Por lo tanto, si se tiene una mezcla de homólogos (como ocurre con el ABS) en lugar de un único soluto, se puede realizar una perfecta cancelación de la señal para la suma de los homólogos, si bien quedarán pequeños picos residuales para los homólogos individuales. Una cancelación perfecta de la señal a todos los tiempos de migración parece imposible de alcanzar mediante el uso de una ventana de longitudes de onda única. Es posible usar simultáneamente varias NBDWs, cada una de ellas sintonizada con

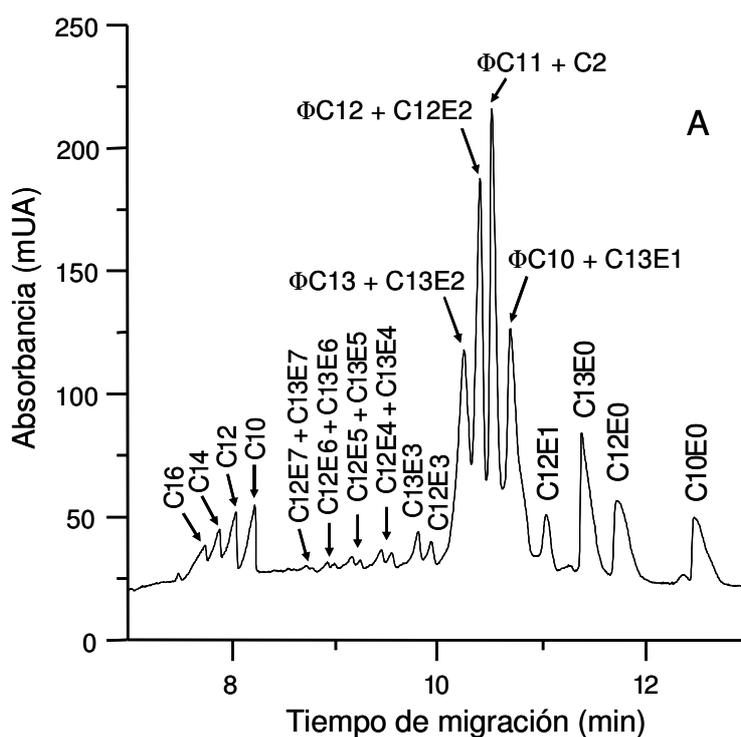
las características espectrales de un homólogo dado, pero esto no se probó en este trabajo. La evaluación de solutos no absorbentes solapados usando detección indirecta tendrá pequeños errores sistemáticos como consecuencia de haber adoptado una única NBDW común a todos los homólogos. Sin embargo, estos errores fueron pequeños (hay que tener en cuenta la expansión del eje de la Y en la Fig. 4) e independientes de la concentración de AES, de modo que resultaron ser significativos sólo a concentraciones muy bajas de AES.

En la Fig. 5 se muestran los electroferogramas de una mezcla de ABS-AES obtenida usando dos ventanas de longitudes de onda de detección distintas. Monitorizando la señal a la longitud de onda de sensibilidad máxima para detección indirecta con AQCA, 260 nm (trazo A) se observó un extenso solapamiento de las dos familias de surfactantes. Por el contrario, monitorizando la señal a la NBDW máxima (9 nm de anchura y centrada a 227 nm) los picos de AES aparecen bien resueltos y libres de la interferencia de ABS (trazo B). También se puede observar en el trazo B el pico resuelto del acetato (C2, que es una impureza habitual en AES).

La menor relación señal-ruido de la Fig. 5, trazo B, con respecto a la Fig. 1, trazo B, se debió principalmente a la reducción de la absorptividad molar del BGC a 227 nm ($10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) con respecto a su valor en el máximo, 260 nm ($45800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (por otra parte también fue algo menor la concentración AES en la Fig. 5). La relación señal-ruido que puede llegar a obtenerse mediante el uso del procedimiento de monitorización propuesto, está limitada tanto por la anchura como por la localización de la NBDW máxima, y también por la absorptividad molar media del BGC a las longitudes de onda de la NBDW. Afortunadamente, para la pareja AQCA-ABS, la NBDW máxima presenta una anchura razonable (9 nm), la longitud de onda del centro de la ventana no es demasiado corta (227 nm), y además está localizada próxima a la longitud de onda de máxima absorción del ABS. Este es un caso óptimo. Para definir una NBDW óptima, el

BGE se debe elegir considerando, además de los factores electroforéticos, el espectro del revelador y el del soluto absorbente cuya interferencia se quiere eliminar.

La recta de calibración de la Fig. 6 (línea continua) se obtuvo usando la NBDW óptima (9 nm de anchura y centrada a 227 nm), midiendo las áreas corregidas de los picos C10E0 - C13E7, y dividiendo su suma por el área corregida del pico del patrón interno. Como se muestra en la misma figura, y se puede deducir por la intersección negativa con el eje Y, si se obtiene una recta de calibrado a una ventana de balance no nulo (10 nm de anchura y centrada a 222 nm, línea de trazos), se tiene un error sistemático constante debido a la interferencia del ABS.



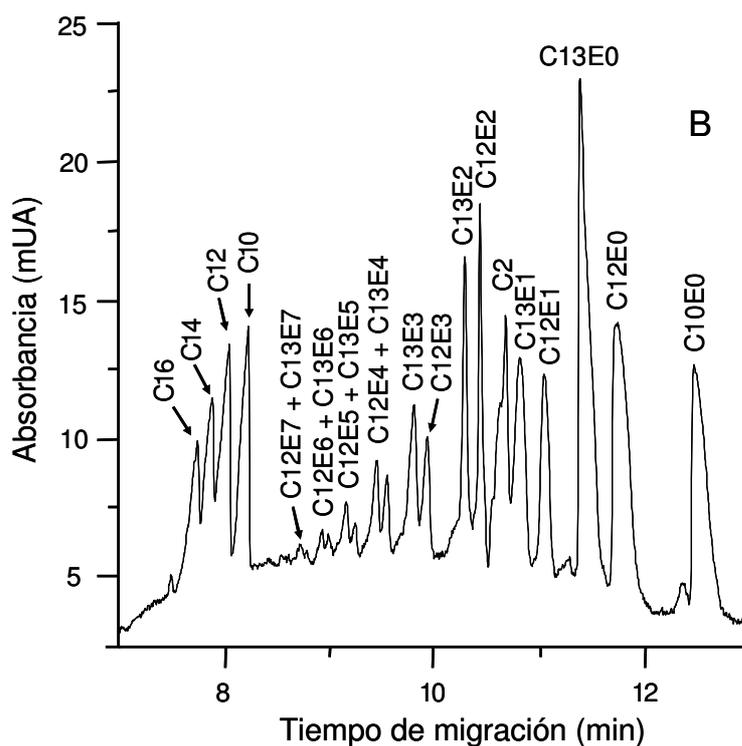


Figura 5. Electroferogramas de una mezcla que contenía $1250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ABS y de AES, los ácidos grasos C10 a C16 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uno) y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C10E0 (patrón interno), obtenidos con una única inyección y monitorizando simultáneamente a dos ventanas de longitud de onda; la monitorización se realizó con una ventana centrada a 260 nm y con 10 nm de anchura (A) y con la óptima NBDW (9 nm de anchura y 227 nm de longitud de onda central) (B); EOF a 5,9 min aproximadamente.

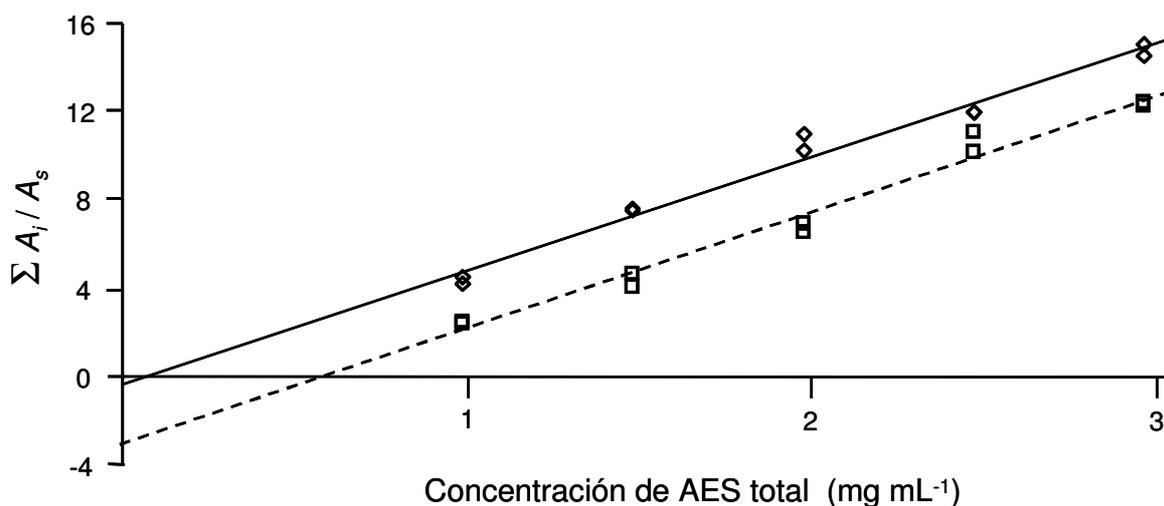


Figura 6. Rectas de regresión obtenidas con la NBDW óptima (9 nm de anchura y 227 nm de longitud de onda central) (◇) y usando una ventana de 10 nm de anchura y centrada a 222 nm (□); en el eje Y se representa la suma de las áreas corregidas de los picos C10E0 - C13E8 divididas por el área corregida del pico del patrón interno.

IV.3.2. Simulación del procedimiento de NBDW mediante software

En los experimentos de la Fig. 5 y en los usados para construir la Fig. 6, cada electroferograma se almacenó como una matriz de datos \mathbf{X} , de dimensiones $m \times n$, donde cada columna contiene un espectro completo (absorbancia a las n longitudes de onda) a un tiempo de migración concreto. Para los solutos no absorbentes, la sensibilidad a lo largo de la escala de longitudes de onda depende de la absorptividad del AQCA, pero para el ABS la sensibilidad depende de la diferencia entre su propio espectro y el del AQCA. Debido a que los espectros de ABS y AQCA son bastante diferentes, se puede esperar que los electroferogramas bidimensionales contengan suficiente información para que sea posible recuperar los electroferogramas de las especies absorbente (ABS) y no absorbente por separado. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas de deconvolución, las cuales se discutirán en la sección IV.3.3, o también de una forma más simple, mediante simulación por ordenador del procedimiento explicado anteriormente basado en la selección de una NBDW, imitando lo que se ha desarrollado en el apartado anterior con series de ventanas móviles de tamaño creciente.

En primer lugar, se usó la información almacenada en la matriz \mathbf{X} para examinar la influencia de la posición y del tamaño de la ventana de longitudes de onda para el ruido de fondo. Para ello, se usaron regiones de tiempo en las que no aparecieran picos, y se promedió la desviación estándar del fondo a lo largo de series de ventanas de longitud de onda centradas a valores crecientes y con anchuras también crecientes. Se observó que el ruido de fondo incrementaba notablemente cuando $\Delta\lambda < 3$ nm, y también cuando se usaban ventanas centradas a longitudes de onda inferiores a 220 nm, por lo tanto, estos valores se eliminaron en los estudios siguientes.

La exploración de \mathbf{X} con el fin de obtener una NBDW óptima se puede realizar de varias maneras, pero el procedimiento que se explica a continuación funcionó bastante bien. En primer

lugar, se deben localizar en \mathbf{X} los puntos de cruce de la Fig. 2 (donde se cumple la Ec. 1). Esto puede llevarse a cabo mediante deconvolución OPA-ALS (explicada en la sección IV.3.3), o de una forma más simple aplicando ensayos de pureza sobre la matriz de datos transpuesta, \mathbf{X}^T (por ejemplo, empleando OPA). Usando estos dos procedimientos, se localizaron los puntos donde se cumple la Ec. 1 a 220,5 y 228,5 nm. Se tomó como referencia el perfil a 228,5 nm, que de ahora en adelante se denominará longitud de onda de referencia. En segundo lugar, para encontrar la óptima NBDW emulada mediante *software*, se comparó el perfil de concentración a 228,5 nm con el perfil de concentración promedio dentro de la ventana de longitudes de onda que se estaba probando. Esta comparación se realizó atendiendo a una posición sobre el eje de tiempos que estaba libre de la contribución del ABS (el tiempo L), y también a las $n = 4$ posiciones de los picos de ABS, que son los tiempos de migración donde existe interferencia importante (los tiempos I). Se puede usar un ensayo de pureza para localizar tiempos L e I adecuados; para ello también se aplicó OPA (ver sección IV.3.3). Se calcularon las siguientes diferencias:

$$d_{\Delta\lambda} = n (p_{L, \Delta\lambda} - p_{L, R}) - \sum (p_{I, \Delta\lambda} - p_{I, R}) \quad (3)$$

donde $\Delta\lambda$ es la anchura de la ventana de longitudes de onda que se está probando, $p_{L, \Delta\lambda}$ y $p_{I, \Delta\lambda}$ denotan la señal media a los tiempos L e I dentro de la ventana, y $p_{L, R}$ y $p_{I, R}$ son las correspondientes señales a la longitud de onda de referencia. La suma del segundo paréntesis se extiende a los $n = 4$ picos de ABS. Dado que $d_{\Delta\lambda}$ es proporcional a la suma de los residuales de los picos de ABS, $d_{\Delta\lambda}$ debe ser cero para ventanas donde la interferencia está completamente anulada.

Se consideró inicialmente una ventana de 8 nm de anchura, centrada a 224,5 nm (el punto medio entre los dos puntos de cancelación, 220,5 y 228,5 nm, calculados mediante *software*), y se adicionaron a los extremos de la ventana incrementos de 2 nm (que es la resolución a lo largo de las columnas de \mathbf{X}). Se seleccionó la ventana centrada a 224,5 nm que presentaba un $d_{\Delta\lambda}$ menor.

El proceso se repitió usando ventanas centradas a longitudes de onda próximas, hasta que no se pudo alcanzar una reducción adicional del valor de $d_{\Delta\lambda}$. Un diagrama topológico o de contornos de $d_{\Delta\lambda}$ (valores de $d_{\Delta\lambda}$ frente a longitud de onda o valores crecientes de $\Delta\lambda$) mostró un perfil similar al calculado mediante la Ec. 2 para el AQCA (Fig. 3, línea continua). Se obtuvo una NBDW óptima centrada a 224,5 nm con una anchura de 14 nm. Las diferencias con respecto a la NBDW óptima deducida anteriormente (centrada a 227 nm con una anchura de 9 nm) pueden ser debidas a una mejor localización del óptimo a lo largo de las dos variables involucradas (anchura y posición central de la ventana). Los electroferogramas de ABS obtenidos por regresión sobre \mathbf{X} tanto de su espectro puro como del espectro del BGC, y los de los solutos no absorbentes extraídos de \mathbf{X} promediando los electroferogramas dentro de esta NBDW máxima simulada, fueron muy similares a los mostrados en la Fig. 1, trazos A y B, respectivamente. Además, los electroferogramas de AES obtenidos por los procedimientos experimental (Fig. 5, parte B) y por simulación de la NBDW, también fueron muy similares entre si.

En la sección IV.3.1 se empleó la información proporcionada por los espectros de absorción del BGC y de la interferencia, obtenidos previamente con un espectrofotómetro, para encontrar la máxima NBDW experimental. Esta NBDW fue luego optimizada usando dos series de electroferogramas adquiridos con diferentes ventanas de longitudes de onda de detección. En esta sección, el examen sistemático de \mathbf{X} usando OPA dio como resultado una NBDW máxima simulada, sin necesidad de tener conocimiento previo alguno sobre el espectro de la interferencia, y usando una única inyección, sin necesidad de una optimización adicional de las condiciones de detección. En la siguiente sección se expone un procedimiento más general, basado en el algoritmo OPA-ALS, y que también fue capaz de localizar rápidamente una NBDW usando una única matriz \mathbf{X} .

IV.3.3. Deconvolución multivariante completa mediante OPA-ALS

La pareja AQCA-ABS, es de hecho, un caso particular de un problema más general, que se puede formular como la resolución, tanto en CE como en HPLC, de señales de solutos detectados indirectamente cuando están solapados con una interferencia absorbente. En este sentido, los procedimientos descritos en las anteriores secciones dependen de dos circunstancias particularmente favorables, a saber, para el procedimiento experimental de NBDW, se debe disponer de espectros fiables, tanto del revelador como de la interferencia absorbente, y en ambos, tanto en el procedimiento experimental como en los procedimientos de simulación mediante *software*, debe existir una NBDW máxima fiable. Sin embargo, es necesario desarrollar procedimientos que no hagan uso de estas circunstancias favorables si se quiere resolver el caso general.

En el diagrama de flujo de la Fig. 7 se resumen las diferentes maneras en que se puede abordar este problema, tanto para resolver casos particulares como para el caso más general. Si se dispone de espectros fiables del revelador y de las interferencias (el espectro y la naturaleza de este último pueden ser desconocidos), y al menos existe una NBDW, se puede utilizar entonces alguno de los procedimientos anteriores de obtención de la NBDW. En caso contrario, se pueden aplicar curvas de resolución multivariante-ALS para alcanzar la completa resolución de las contribuciones de los solutos absorbentes y no absorbentes. El proceso de cálculo se desarrolla en dos etapas. La primera consiste en el uso del llamado ensayo de pureza, donde se determina el número de especies presentes en la matriz \mathbf{X} que tienen diferentes espectros (esto es, una o más especies absorbentes que interfieren, más el revelador). El ensayo de pureza también proporciona estimaciones de sus espectros. En la segunda etapa, los espectros provisionales se usan para establecer espectros con una fiabilidad mejorada y los perfiles de concentración, a partir de los

cuales se pueden finalmente calcular los electroferogramas aislados de los solutos absorbentes y no absorbentes.

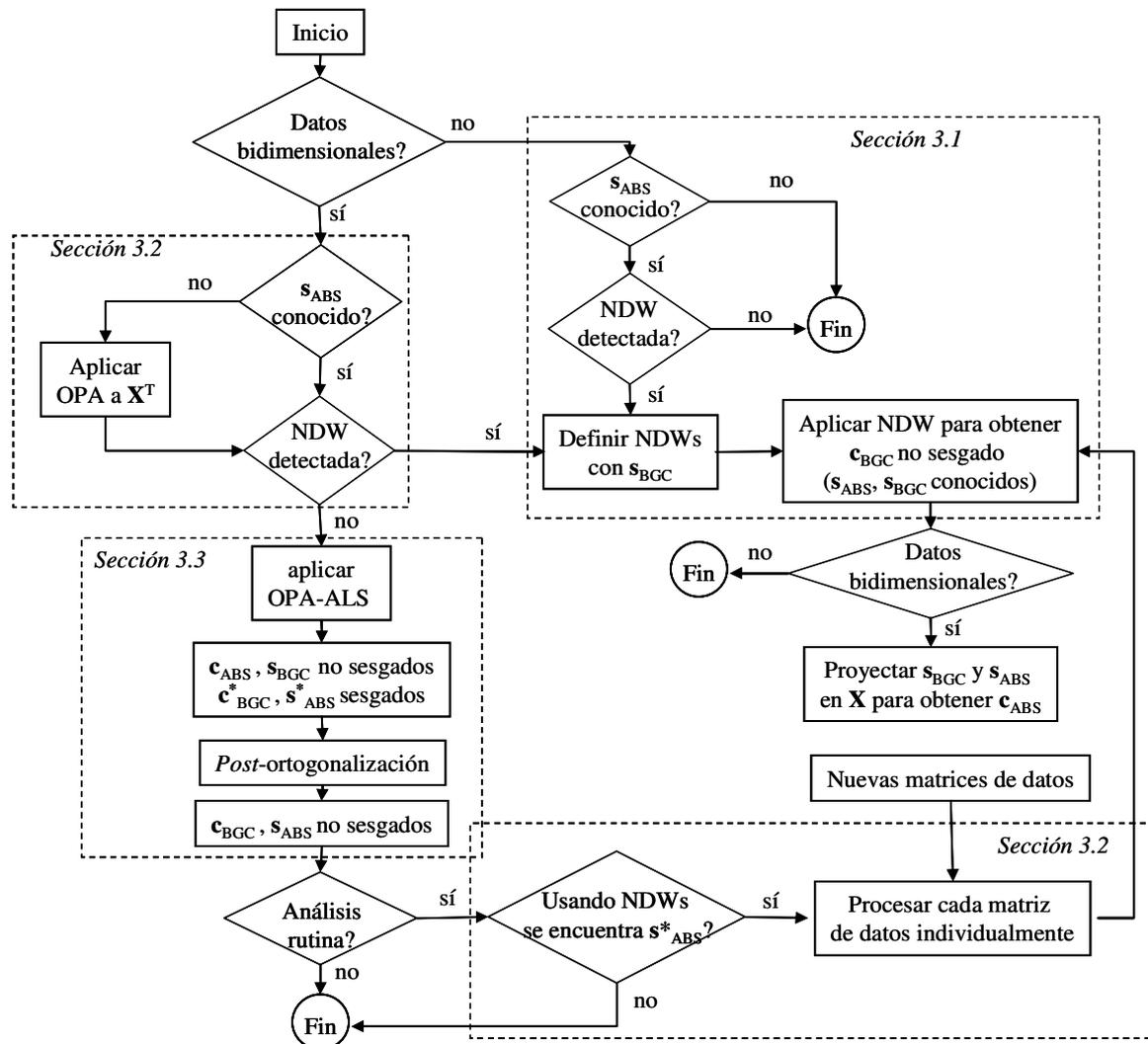


Figura 7. Diagrama de flujo de un problema general de deconvolución bidimensional de solutos no absorbentes y absorbentes, mostrando los principales puntos de división y las soluciones investigadas en este trabajo; \mathbf{X} es la matriz de datos bidimensional, \mathbf{s} y \mathbf{c} denotan, respectivamente, los vectores que contienen un espectro y un perfil de concentración, y el asterisco indica un espectro o un perfil de concentración compuestos.

Se han propuesto diferentes ensayos de pureza, basados o no en variables latentes [5]. En este trabajo se seleccionó, OPA, cuya capacidad para proporcionar estimaciones iniciales en la deconvolución de picos solapados detectados de modo directo en HPLC ha sido ampliamente demostrada [5-6]. En OPA, cada espectro contenido en la matriz de datos \mathbf{X} de dimensiones $m \times n$, se contrasta sistemáticamente con una colección de espectros de referencia normalizados, con el fin de encontrar cuál de los m espectros es menos compatible con los demás en la colección. El fundamento del método es la valoración de la disimilaridad, que es una propiedad que establece el grado de ortogonalidad en un conjunto de espectros. Así por ejemplo, si se extrae de \mathbf{X} un espectro dado, la disimilaridad puede ser calculada de la forma siguiente: el espectro es inicialmente normalizado y ordenado con los r espectros de referencia normalizados de la colección para obtener una matriz de dimensiones $(r + 1) \times n$. La disimilaridad es obtenida entonces mediante:

$$\text{dis}(\mathbf{Y}) = \text{Det}(\mathbf{Y}^T \mathbf{Y}) \quad (4)$$

Esta comparación se aplica a todos los espectros contenidos en \mathbf{X} , y los valores de $\text{dis}(\mathbf{Y})$ se representan frente al tiempo de migración (o de elución), dando lugar al llamado gráfico de disimilaridad, cuyo valor máximo denota el espectro de \mathbf{X} que es más incompatible con los de la colección. El proceso normalmente se inicia fijando como \mathbf{Y} el espectro medio de \mathbf{X} . En la siguiente iteración, se sustituye el espectro asociado al tiempo de migración (donde el gráfico de disimilaridad muestra un valor máximo), por el espectro antiguo en \mathbf{Y} . El proceso continúa adicionando sucesivamente a \mathbf{Y} el espectro más disimilar encontrado en \mathbf{X} . Cada vez se vuelven a representar las disimilaridades hasta que sólo queda ruido.

OPA encuentra el número de solutos presentes, y también una estimación de sus espectros más puros. Sin embargo, hay que tener en cuenta que usualmente los espectros encontrados con OPA son sólo unas soluciones provisionales que requieren un refinado adicional. Este refinado se

puede alcanzar convenientemente mediante ALS, una técnica multivariante que descompone matrices bilineales (o trilineales) en perfiles de concentración y de absorbancia. Para ello, alterna dos regresiones por mínimos cuadrados, a saber, la regresión de los perfiles espectrales sobre \mathbf{X} para obtener los perfiles de concentración, \mathbf{c} , y la regresión de los perfiles de concentración sobre \mathbf{X} para obtener los perfiles espectrales, \mathbf{s} . Este proceso se repite alternativamente. Esto se puede expresar como:

$$\mathbf{c} = \mathbf{X} \cdot (\mathbf{s}^T \cdot \mathbf{s})^{-1} \cdot \mathbf{s}^T \quad (5)$$

$$\mathbf{s} = (\mathbf{c}^T \cdot \mathbf{c})^{-1} \cdot \mathbf{c}^T \cdot \mathbf{X} \quad (6)$$

Si no se aplica una operación adicional, el ciclo finalizará dando lugar al mismo perfil espectral inicial (o concentración) usado para iniciar la iteración, excepto en lo que respecta al ruido, que será amplificado. Esto último puede hacer que el proceso diverja, lo que no produciría ningún resultado satisfactorio. La imposición de restricciones a las soluciones intermedias es la forma de que ALS alcance la convergencia dando lugar a unas soluciones finales satisfactorias. Por lo tanto, después de cada regresión, se aplican algunas restricciones para garantizar que el proceso converge en soluciones con significado físico-químico. Por ejemplo, la restricción de positividad no permite picos negativos, y aplicando la restricción de unimodalidad se previene la presencia de máximos secundarios por soluto. Se han empleado estas y otras restricciones en HPLC [8,9] y CE [9] para alcanzar la deconvolución de cromóforos solapados en detección directa.

En nuestro caso, después de la sustracción de la línea base, sólo se esperan señales positivas multimodales para la contribución pura del ABS. De acuerdo con esto, se debe aplicar la condición de no-negatividad a su perfil de concentración. Sin embargo, se obtendrá un espectro compuesto, que será una combinación lineal de los espectros del ABS y del revelador. Por lo tanto, no se podrán aplicar restricciones con respecto al signo de la señal sobre el espectro del

ABS. Consecuentemente, ALS dará una buena estimación del perfil de concentraciones de ABS pero un espectro falso.

Por otra parte, la señal del revelador acumula los efectos de dilución debido a ambos, los solutos absorbentes y no absorbentes. Dado que se espera que los efectos sobre el revelador proporcionen señales negativas, se debe aplicar una restricción de no-positividad al perfil de concentraciones multimodal del revelador. Hay que tener en cuenta que la verdadera señal del ABS se está considerando como dividida en dos partes, que son la contribución por dilución y la debida a la absorción.

Finalmente, al espectro del revelador se le puede aplicar la restricción de no-negatividad. Además, existen regiones de tiempos de migración selectivas donde los picos de las especies no absorbentes están libres de la interferencia del ABS. Por tanto, es posible imponer una restricción de selectividad dentro de determinadas ventanas de tiempo, donde sea cero cualquier contribución a la señal por parte de especies que no están presentes.

El algoritmo ALS usado en este trabajo, completado con estas cuatro restricciones, y usando como estimaciones iniciales los espectros proporcionados por OPA, llegaba a la convergencia después de unas pocas iteraciones. Entre la información recuperada, se consideran a continuación los espectros puros del revelador y los combinados del ABS. Como se ha indicado, el espectro del ABS así encontrado es una combinación lineal de los espectros puros del ABS y del BGC. Como se muestra en la Fig. 8, los puntos de balance nulo (si existen) se observan a aquellas longitudes de onda donde este espectro combinado del ABS es igual a cero. A estas longitudes de onda (en la figura corresponden a 220,5 y 228,5 nm), los efectos de dilución producidos por el ABS sobre la señal del revelador se igualan con su propia absorción. Si existen, la localización de estos puntos por los algoritmos OPA-ALS permite la aplicación de los procedimientos rápidos y sencillos de obtención de la NBDW explicados antes a otras muestras

que puedan estar afectadas por la interferencia del mismo soluto absorbente. Usado de esta manera, ALS se convierte en una herramienta útil para buscar las NBDWs de interferencias desconocidas. En el diagrama de flujo de la Fig. 7 se ha incluido también esta posibilidad.

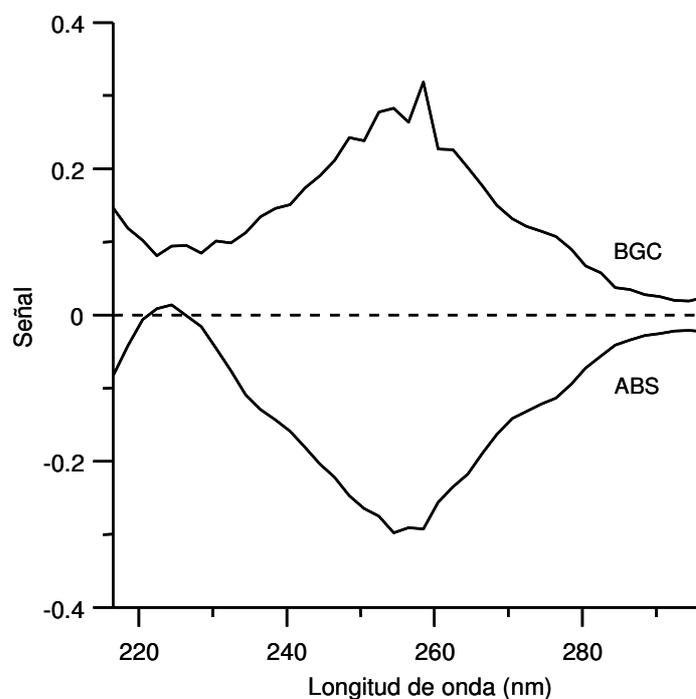


Figura 8. Perfiles espectrales sin corregir (s_{BGC} y s_{ABS}^*), obtenidos empleando ALS antes de la ortogonalización. Los espectros están normalizados, y los signos son arbitrarios. Las longitudes de onda donde s_{ABS}^* es igual a cero indican la existencia de puntos donde se cumple la Ec. (1).

Como se muestra a continuación, para deconvolucionar completamente los electroferogramas de interferencias absorbentes y de solutos no absorbentes mediante OPA-ALS, se requiere un tratamiento adicional de las soluciones originalmente proporcionadas por ALS. ALS descompone la matriz de datos de la siguiente forma:

$$\mathbf{X} = \mathbf{X}_{BGC} + \mathbf{X}_{ABS} + \mathbf{E} = \mathbf{c}_{BGC}^* \cdot \mathbf{s}_{BGC} + \mathbf{c}_{ABS} \cdot \mathbf{s}_{ABS}^* + \mathbf{E} \quad (7)$$

donde \mathbf{X}_{BGC} y \mathbf{X}_{ABS} son las contribuciones a la señal bidimensional del revelador y de la interferencia absorbente (ABS en nuestro caso), y \mathbf{E} es la matriz residual. La Ec. 7 expresa

también que la convergencia de ALS da lugar al espectro correcto para el revelador, \mathbf{s}_{BGC} , pero el perfil de concentración recuperado, $\mathbf{c}_{\text{BGC}}^*$, es compuesto (el asterisco indica que es un perfil de concentración sesgado). Para ABS la situación es la contraria, es decir, ALS proporciona una buena estimación del perfil de concentración de ABS, \mathbf{c}_{ABS} , pero da lugar a un espectro sesgado, $\mathbf{s}_{\text{ABS}}^*$.

Por tanto, se puede recuperar el verdadero perfil de concentración del revelador o el espectro puro de ABS mediante la ortogonalización de $\mathbf{c}_{\text{BGC}}^*$ o de $\mathbf{s}_{\text{ABS}}^*$, respectivamente. La ortogonalización de \mathbf{X}_{BGC} consiste en la supresión de la falsa contribución asociada al ABS en \mathbf{X}_{BGC} , que se puede realizar usando la información conocida no sesgada sobre la interferencia, que es su perfil de concentración, \mathbf{c}_{ABS} . De igual forma, la ortogonalización de \mathbf{X}_{ABS} consiste en la supresión de la contribución asociada al revelador en \mathbf{X}_{ABS} , usando su espectro puro, \mathbf{s}_{BGC} .

La ortogonalización de \mathbf{X}_{BGC} se obtiene primero mediante la proyección del perfil de concentración de ABS en \mathbf{X}_{BGC} ; el falso espectro obtenido de este modo se usa para reconstruir la contribución a la dilución del ABS en el BGC, que se resta de la matriz original \mathbf{X}_{BGC} :

$$\mathbf{X}_{\text{cBGC}} = \mathbf{X}_{\text{BGC}} - [\mathbf{c}_{\text{ABS}} \cdot (\mathbf{c}_{\text{ABS}}^T \cdot \mathbf{c}_{\text{ABS}})^{-1} \cdot \mathbf{c}_{\text{ABS}}^T] \cdot \mathbf{X}_{\text{BGC}} \quad (8)$$

donde \mathbf{X}_{cBGC} es la matriz \mathbf{X}_{BGC} corregida, y los corchetes contienen el operador ortogonal de la proyección de \mathbf{c}_{ABS} . Finalmente, el perfil de concentración corregido para AES se obtendrá mediante la proyección de su espectro sobre la matriz de datos corregida:

$$\mathbf{c}_{\text{BGC}} = \mathbf{X}_{\text{cBGC}} \cdot (\mathbf{s}_{\text{BGC}}^T \cdot \mathbf{s}_{\text{BGC}})^{-1} \cdot \mathbf{s}_{\text{BGC}}^T \quad (9)$$

De forma similar, el verdadero espectro de la interferencia absorbente se puede obtener mediante:

$$\mathbf{X}_{\text{cABS}} = \mathbf{X}_{\text{ABS}} - [\mathbf{X}_{\text{ABS}} \cdot (\mathbf{s}_{\text{BGC}}^T \cdot \mathbf{s}_{\text{BGC}})^{-1} \cdot \mathbf{s}_{\text{BGC}}^T] \cdot \mathbf{s}_{\text{BGC}} \quad (10)$$

$$\mathbf{s}_{\text{ABS}} = (\mathbf{c}_{\text{ABS}}^T \cdot \mathbf{c}_{\text{ABS}})^{-1} \cdot \mathbf{c}_{\text{ABS}}^T \cdot \mathbf{X}_{\text{cABS}} \quad (11)$$

La ortogonalización de \mathbf{X}_{BGC} y \mathbf{X}_{ABS} se puede realizar *a priori* (dentro de las iteraciones de ALS) o *a posteriori* (después de la convergencia). Nosotros hemos seleccionado la última alternativa, dado que el proceso llegaba rápidamente a la convergencia, proporcionando también las longitudes de onda que satisfacen la Ec. 1 (si estas existen). Si no existe una ventana de tiempo de migración (o espectral) selectiva para la interferencia o para el revelador se debe escoger la ortogonalización previa.

Se aplicó el procedimiento OPA-ALS a las matrices \mathbf{X} de las mezclas ABS-AES usadas para construir las rectas de calibración de la Fig. 6. Se reconstruyeron satisfactoriamente los perfiles de concentración-tiempo de ABS, pero se observaron distorsiones en los perfiles de tiempos de los solutos no absorbentes dentro de la región de tiempos donde estaba presente el ABS. Hay que tener en cuenta que, en nuestro caso, la corrección de la línea base es particularmente problemática, debido al alto número de picos de ABS que solapan con los picos de los solutos no absorbentes en una amplia región del tiempo de migración. En este caso, la línea base se debe corregir mediante la construcción de modelos dentro de subconjuntos de puntos que están muy alejados unos de otros. Esto resalta la robustez de los procedimientos de obtención de las NBDWs expuestos anteriormente frente a las fluctuaciones de la línea base, ya que no requieren correcciones de la línea base. Sin embargo, como se muestra en la sección siguiente, el desarrollo del procedimiento OPA-ALS se puede mejorar mediante la aplicación de correcciones adicionales de la línea base.

IV.3.4. Límites de detección y aplicación a muestras industriales

Los límites de detección (LODs) para los oligómeros de AES solapados o no con el ABS, se estimaron de la forma siguiente. En primer lugar, se midió la anchura de la línea base de los electroferogramas de mezclas conteniendo $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ABS y $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AES. Esta

anchura se tomó como 5s. A partir de estos valores, se calculó el LOD para oligómeros individuales como 3s dividido por $h_i / [M_i]$, donde h_i y $[M_i]$ son la altura de pico y la concentración molar del oligómero i . La concentración molar se calculó como:

$$[M_i] = (A_i / \Sigma A_i) (C / \bar{M}) \quad (12)$$

donde A_i es el área del pico del oligómero i , y donde la suma se extiende a todos los oligómeros de AES que presentan picos significativos, C es la concentración de AES (en g L⁻¹), y \bar{M} es la masa molecular media del estándar de AES, que se calculó como:

$$\bar{M} = \Sigma [(A_i / \Sigma A_i) M_i] \quad (13)$$

donde M_i es la masa molecular del oligómero i y la suma se extiende a todos los oligómeros desde C12E0 hasta C13E7.

Debido a que tanto el procedimiento experimental como simulado de NBDW dan lugar a una casi completa cancelación de las contribuciones a la señal por parte del ABS, deberían esperarse los mismos LODs para los picos afectados o no por la interferencia (como C13E2 y C13E0, respectivamente). De acuerdo con esto, los electroferogramas obtenidos mediante el procedimiento experimental de NBDW dieron lugar a LODs de aproximadamente 14 μM para ambos tipos de picos, mientras que el procedimiento de simulación de NBDW dio lugar a LODs de aproximadamente 8 μM. Usando las mismas inyecciones pero empleando una ventana de detección de 10 nm centrada a la longitud de onda óptima para la detección indirecta con AQCA, 260 nm, el límite de detección para los oligómeros de AES no solapados fue de 6 μM.

El procedimiento se aplicó a la identificación y cuantificación de surfactantes en productos de limpieza del hogar y de tocador que contenían tanto AES como ABS, y en algunos casos también estaban presentes ácidos grasos. En la Fig. 9 partes A y B se muestran, respectivamente, el electroferograma de un limpiador suave para prendas delicadas, obtenido con una única inyección midiendo a la longitud de onda óptima para la detección indirecta con AQCA, y a la

máxima NBDW obtenida experimentalmente (9 nm de anchura y centrada a 227 nm). El correspondiente electroferograma aislado de los solutos no absorbentes, obtenido mediante la simulación de la NBDW mediante *software* usando **X**, fue muy similar al de la Fig. 9, parte B; sin embargo, para el electroferograma de los solutos no absorbentes obtenidos mediante la deconvolución OPA-ALS, se observó una gran distorsión en regiones distantes de las usadas para establecer la línea base. El pre-tratamiento usual basado en la resta de la deriva diodo a diodo dio lugar a una corrección deficiente de la línea base. Por lo tanto, se ensayó una corrección adicional por sustracción, basada en el ajuste de funciones gaussianas sesgadas para cada diodo, aplicada dentro de regiones de línea base que se seleccionaron entre picos consecutivos que seguían la tendencia de la distorsión de la línea base. Las alturas de los picos reconstruidos después de la orthogonalización se correlacionaron satisfactoriamente con los medidos en la Fig. 9, parte B.

La integración de las áreas de los picos corregidos de la Fig. 9, trazo B (suma de las áreas desde C12E0 hasta C14E7), y la aplicación de la curva de calibrado de la Fig. 6 dieron lugar a una concentración de AES de $2430 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que correspondió a un 8,5 % de AES en la muestra no diluida. A partir de las desviaciones estándar de los residuales en la curva de calibrado (Fig. 6), dividiendo por la pendiente, se calculó una desviación estándar media absoluta de $\pm 110 \mu\text{g mL}^{-1}$ (la desviación estándar media relativa dentro del rango de calibración fue de un 4,5 %); esto dio lugar a un contenido estimado de AES en esta muestra de $8,5 \pm 0,4 \%$.

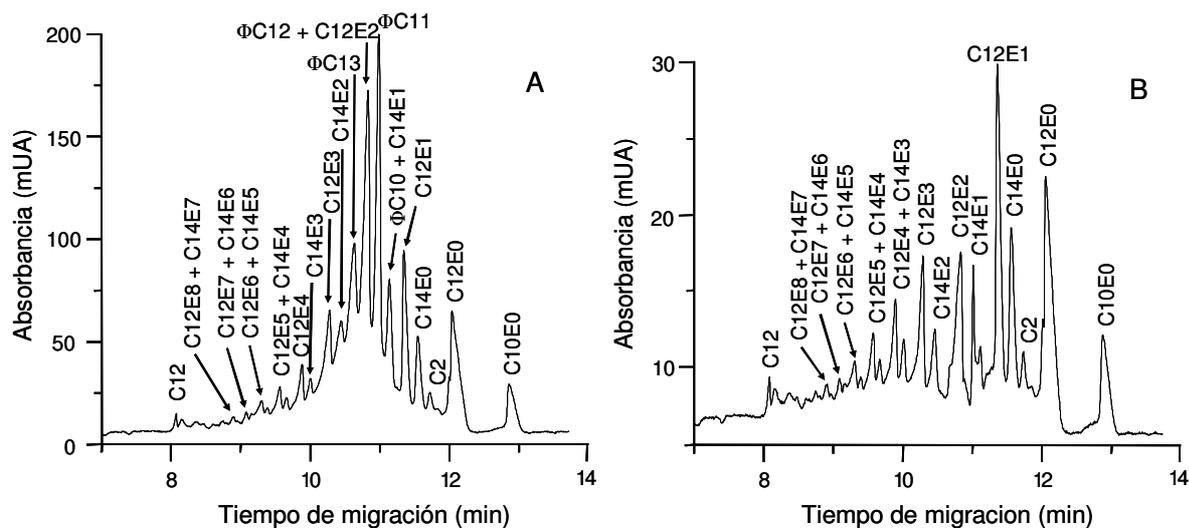


Figura 9. Electroferogramas de un limpiador suave para prendas delicadas (diluido 1/35 con agua) obtenido con una única inyección; los datos se han monitorizado a la ventana centrada en 260 nm y anchura 10 nm (A), y con la óptima NBDW experimental (9 nm de anchura y 227 nm de longitud de onda central) (B); se añadieron $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C10E0 como patrón interno; EOF a 6,2 min.

IV.4. Conclusiones

Se han descrito tanto procedimientos experimentales como quimiométricos capaces de eliminar las interferencias causadas por cualquier soluto absorbente en electroferogramas o cromatogramas obtenidos mediante detección espectrofotométrica indirecta. El procedimiento de NBDW de la sección IV.3.1 es extremadamente sencillo, no requiere adquirir la matriz de datos bidimensional completa y no necesita el soporte de herramientas quimiométricas. Además, este procedimiento se puede llevar a cabo usando un detector de longitud de onda variable, mientras que para los otros dos procedimientos descritos en este trabajo es necesario el empleo de un detector de fila de diodos. El procedimiento de NBDW simulada expuesto en la sección IV.3.2 implica procedimientos quimiométricos sencillos, y puede ser útil en análisis de rutina, cuando una muestra presenta una interferencia absorbente no esperada. También, se muestra cómo se puede encontrar la posición de la NBDW, si existe, mediante los algoritmos OPA o OPA-ALS aplicados a **X**. La posterior aplicación sistemática u ocasional del procedimiento de NBDW simulada a

muestras ya analizadas (más la búsqueda de la NBDW mediante OPA o OPA-ALS) se hace posible si se ha tenido la precaución de almacenar el espectro completo, junto con los electroferogramas o cromatogramas, mientras se mide en las condiciones óptimas de detección.

Como revelador, AQCA presenta un elevado máximo de absorción, y tiene también la ventaja de presentar una absorción mínima a la longitud de onda más corta donde el ABS tiene el máximo de absorción. Usando AQCA, los procedimientos de NBDW también pueden dar buenos resultados para eliminar interferencias debidas a otros cromóforos similares al ABS, es decir, que tengan un anillo bencénico con un sustituyente conjugado. Se pueden encontrar otros reveladores para cancelar las interferencias producidas por otros solutos absorbentes; sin embargo, dado que la sensibilidad en detección indirecta es proporcional a la absorptividad molar del revelador en la ventana de longitudes de onda de detección, se obtendrá una sensibilidad baja si se opera con una NBDW diseñada para cancelar el espectro de un soluto débilmente absorbente. En estos casos, la deconvolución OPA-ALS proporciona una solución conveniente, con la ventaja añadida de su aplicabilidad universal a cualquier pareja revelador-interferencia absorbente. La obtención de las NBDWs, la caracterización y eliminación de interferencias desconocidas, y la cuantificación de solutos solapados no absorbentes y absorbentes se pueden llevar a cabo mediante la utilización de OPA-ALS. Usando un ordenador personal estándar, el proceso de OPA-ALS se completa en unos pocos minutos, y también se puede programar para ser aplicado de forma semi-automática, con una pequeña supervisión por parte del usuario. En comparación con los procedimientos de NBDW, el uso de algoritmos OPA-ALS es más susceptible a la amplificación de los errores debidos a la incompleta corrección de la línea base. Esto último pone de relieve la robustez del procedimiento NBDW frente a las fluctuaciones de la línea base.

IV.5. Referencias

- [1] J. Zweigenbaum, *Chromatogr.* 11 (1990) 9.
- [2] P. L. Desbene, C. M. Rony, B. Desmazieres, J. C. Jacquier, *J. Chromatogr.* 608 (1992) 375.
- [3] S. Chen, D. J. Pietrzyk, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2770.
- [4] R. Loos, J. Riu, M. C. Alonso, D. Barcelo, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1197.
- [5] F. Cuesta-Sánchez, B. van den Bogaert, S. C. Rutan, D. L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 34 (1996) 139.
- [6] F. Cuesta-Sánchez, J. Toft, B. van den Bogaert, D. L. Massart, *Anal. Chem.* 68 (1996) 79.
- [7] R. Tauler, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 12 (1993) 319.
- [8] H. Li, F. Zhang, J. Havel, *Electrophoresis* 24 (2003) 3107.
- [9] C.Y. Airiau, R. G. Brereton, S. Dunkerley, *Analyst* 125 (2000) 833.
- [10] R. Bro, N. D. Sidiropoulos, *J. Chemom.* 12 (1998) 223.

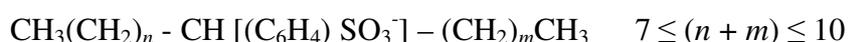
Capítulo V

Electroforesis capilar mejorada mediante corrección automática bidimensional del ruido de fondo usando trazadores de suavizado cúbico (*cubic smoothing splines*, CSS) y análisis multivariante de los datos, con aplicación a la caracterización de mezclas de surfactantes

(*Journal of Chromatography A*, 1065, 2005, 301-313)

V.1. Introducción

En artículos de tocador y limpiadores domésticos es frecuente encontrar surfactantes del tipo dietanolamida de coco (*coconut diethanolamide*, CDEA, amidas secundarias no iónicas) y cocamidopropilbetaínas (*cocamidopropyl betaines*, CAPB, amidas primarias ambivalentes o ambiónicas). CDEA y CAPB son surfactantes suaves que no irritan la piel ni las membranas mucosas, también tienen buenas características como activadores y estabilizadores de la espuma, y como agentes espesantes y humectantes. Se utilizan para reducir la basicidad y mejorar otras propiedades del producto en las industrias del textil, lubricantes, metales y pigmentos entre otras. Frecuentemente, se pueden encontrar estos surfactantes mezclados con ABS (surfactantes aniónicos) para mejorar la detergencia y reducir el coste. Las respectivas fórmulas genéricas de CDEA, CAPB y ABS son:



R son cadenas alquílicas lineales que contienen desde 7 hasta 17 átomos de carbono en CDEA y CAPB, y en ABS el grupo p-fenilsulfonato está unido a un punto intermedio de una cadena alquílica lineal que contiene entre 10 y 13 átomos de carbono. La unión del grupo p-fenilsulfonato nunca se produce sobre el carbono del extremo de la cadena. Ambas familias de surfactantes (CDEA y CAPB) presentan cadenas alquílicas con distribuciones similares a las encontradas en los aceites de coco y palma, que suelen utilizarse como materia prima para su fabricación. En el trabajo desarrollado en este capítulo de la tesis, los homólogos se nombrarán en función de la cadena alquílica de la siguiente forma: CDEA18:1 es el homólogo de CDEA con 18 átomos de carbono (los de la cadena alquílica más el carbonilo) y un doble enlace, C18:1 es el correspondiente ácido graso libre.

Se han descrito una gran variedad de procedimientos para la evaluación de ABS en muestras industriales y ambientales, mediante el uso de HPLC [1-4], GC [5] y CE con BGEs hidro-orgánicos [6-8] y no acuosos [9,10], con resolución de isómeros posicionales y homólogos en algunos casos [6,8,11]. Se han separado mezclas de surfactantes iónicos, no iónicos y ambiónicos empleando cromatografía de capa fina [12], también mediante espectrometría de infrarrojo cercano [13] y empleando HPLC con detector de índice de refracción [14] y detección por espectrometría de masas [15-18]. También ha sido descrito un método de HPLC bidimensional capaz de separar mezclas de surfactantes de varios tipos, empleando una columna diol seguida de una columna C2 o C4, con gradiente en las dos dimensiones y con ELSD [19].

El grupo amida absorbe moderadamente en el UV, aunque no se tiene una buena relación señal-ruido debido a que se usa una longitud de onda muy baja (a 210 nm las absorptividades molares de CAPB y de CDEA son 8200 y 1200 M⁻¹ cm⁻¹, respectivamente). En consonancia con estas propiedades, las alquil-etanolamidas se han separado por HPLC con una fase estacionaria en gel, con detección espectrofotométrica a 215 nm [20] y se han

evaluado alquil-betaínas y CAPB en champús mediante HPLC de intercambio catiónico, monitorizando la señal a 210 nm [21].

Se puede mejorar la selectividad de las separaciones de HPLC y CE empleando un detector UV-vis de fila de diodos para obtener el espectro completo de los solutos, y tratar posteriormente los datos sobre la matriz bidimensional tiempo-longitud de onda obtenida. Esta aproximación se ha aplicado extensamente en datos de HPLC, donde la deconvolución de señales solapadas se ha llevado a cabo mediante gran variedad de herramientas quimiométricas (ver referencias 5-7 del capítulo IV). Se ha revisado también la aplicación de procedimientos quimiométricos a los datos obtenidos por CE [22]. En CE, se aplicó un procedimiento curva de resolución multivariante – mínimos cuadrados alternados (ALS) para la deconvolución de los picos solapados de los isómeros de dinitrotolueno (referencia 8 del capítulo IV). En el trabajo del capítulo anterior, se describió la resolución de mezclas de surfactantes absorbentes (ABS) y no absorbentes utilizando aproximaciones instrumentales y quimiométricas (OPA-ALS).

En el trabajo presentado en este capítulo de la tesis se desarrolla un método de CE capaz de resolver mezclas de CDEA, CAPB y ABS. En primer lugar, se optimizó la composición del BGE que resolviera tanto las tres familias de surfactantes como los homólogos dentro de cada familia. Después, se mejoró la resolución y la fiabilidad en la asignación de los picos a cada familia (incluyendo el reconocimiento de solutos que no pertenecieran a alguna de ellas) mediante un análisis multivariante aplicado a los electroferogramas bidimensionales. La mejora en la resolución se basó en la similitud de los espectros de los homólogos dentro de la misma familia de surfactantes frente a la mayor diferencia entre los espectros de los surfactantes de distintas familias.

Sin embargo, en muchas de las muestras analizadas, las fuertes fluctuaciones y deriva mostradas por el ruido de fondo dificultaron la deconvolución. Para la corrección

multivariante del ruido de fondo en señales del detector de fila de diodos en HPLC y CE se han descrito algoritmos basados en filtros de Kalman autoadaptativos [23], transformadas de onda pequeña [24], y modelos de componentes principales [25,26]. Usando estos últimos se ha descrito también un procedimiento de corrección del ruido de fondo automático, que no requiere conocimiento *a priori* del problema, y que tampoco utiliza mezclas de estándares [26]. En el trabajo correspondiente a este capítulo, proponemos el uso de trazadores de suavizado cúbico (CSS), que es un método de regresión no paramétrico capaz de modelar perfiles irregulares con excelente precisión [27]. Usando CSS, se construyó un algoritmo capaz de establecer un modelo preciso del ruido de fondo bidimensional. Se usó este modelo para obtener, mediante resta, una señal mejorada así como para perfeccionar la fiabilidad y la sensibilidad del proceso de deconvolución. CSS es un algoritmo bastante popular en ingeniería y en ciencias computacional y ambiental, pero apenas ha sido usado en química analítica. Se han encontrado aplicaciones en métodos volumétricos [28], voltamperometría de redisolución [29] y HPLC [30].

El modelo del ruido de fondo dio lugar a una señal bidimensional corregida de calidad, lo cual hizo posible aplicar OPA sobre una amplia ventana de tiempos. Esto aumentó la probabilidad de encontrar espectros selectivos de la mejor calidad disponible para cada familia de solutos. Con estos espectros se mejoraron los electroferogramas reconstruidos de las distintas familias de surfactantes, inicialmente obtenidos por aplicación de ALS. También se demostró la aplicación del procedimiento a productos domésticos de limpieza.

V.2. Materiales y métodos

V.2.1. Aparatos, software, reactivos y muestras

Se utilizó, un espectrofotómetro de fila de diodos (modelo HP 8453, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) provisto de una celda de cuarzo estándar de 1 cm, y un sistema de electroforesis capilar (modelo G1600A, Agilent Technologies) provisto de un detector espectrofotométrico de fila de diodos y capilares de sílice fundida (Composite Metal Services, Ilkley, Reino Unido) de 48,5 cm de largo (40 cm longitud efectiva) \times 50 μ m de diámetro interno I.D. (363 μ m O.D.). Las señales, exportadas como ficheros ASCII por el *software* HPCE3D (Agilent Technologies), se trataron con una colección de subrutinas de análisis de datos de elaboración propia, que fueron escritas en MATLAB 6.5 (The Mathworks, Natick, MA, EEUU).

Se usaron los siguientes reactivos de grado analítico: metanol, ACN, *n*-propanol (PrOH), *n*-butanol (Scharlab, Barcelona, España), dipentilamina (DPA), desoxicolato sódico (SDC), dodecilsulfato sódico (SDS), dioctil sulfosuccinato (DOSS), Brij 35 y los ácidos caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) (Fluka, Buchs, Suiza), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), bórico, acético, fosfórico y 3,4,5-trimetoxibenzoico (TMBA). También se usó agua desionizada (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA, EEUU).

Las muestras (proporcionadas por Químicas Oro S. A., Sant Antoni de Benaixever) fueron: AMIDET B-112 (92,8 % CDEA, tomada de dos lotes diferentes), BETADET HR (~30 % CAPB) (Kao, Barcelona, España), y ácido 4-dodecylbencenosulfónico (mezcla técnica de homólogos de ABS, pureza ~90%, Fluka). Las disoluciones de CAPB y ABS se prepararon en agua, si bien se usó una mezcla PrOH - agua (1:4, v/v) para disolver CDEA. En los estudios de optimización se usaron mezclas preparadas a partir de disoluciones madre de 3 mg mL⁻¹ de CDEA, CAPB y ABS. Las masas moleculares medias (usadas para calcular

absortividades molares) fueron 301 y 356 g mol⁻¹ para CDEA y CAPB respectivamente, las cuales se calcularon a partir de las distribuciones de homólogos observadas en los electroferogramas de cada familia, y 326,5 g mol⁻¹ para ABS (obtenida del catálogo de Fluka).

V.2.2. Procedimientos

El BGE recomendado es 80 mM de tampón borato (obtenido a partir de ácido bórico ajustado a pH 8,5 con NaOH 0,1 M) conteniendo 40 mM SDC y 20 % PrOH. Para acondicionar los capilares nuevos, éstos se lavaron sucesivamente a 60 °C con NaOH 1M y 0,1 M y agua aplicando una presión de 100 kPa durante 10 min. Diariamente, antes de su uso y entre inyecciones consecutivas, el capilar se acondicionó con NaOH 0,1M (5 min), agua (2 min) y el BGE (3 min). Todas las disoluciones se filtraron usando un filtro de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro (Albet, Barcelona). Se usó inyección hidrodinámica (aplicando una presión de 5 kPa durante 2 s), las separaciones se llevaron a cabo a 25 °C bajo un voltaje de +15 kV (medio básico) o -15 kV (medio ácido). La señal se monitorizó a 200 nm usando 450 nm como referencia (se usaron, respectivamente, 20 y 80 nm de anchura de banda). Se almacenaron también los espectros completos proporcionados por el detector de fila de diodos para su posterior análisis. Después de cada sesión de trabajo, los capilares se lavaron con NaOH 0,1 M (5 min), agua y aire (2 min cada uno).

Como los estándares de homólogos de CDEA y CAPB no están disponibles comercialmente, las disoluciones se sometieron a ebullición durante varios minutos a pH 10, con la finalidad de liberar los ácidos grasos, los cuales fueron analizados empleando ácidos grasos puros como estándares. Debido a que el CDEA no es soluble en agua, su hidrólisis se llevó a cabo en presencia de aproximadamente un 20 % de PrOH, con reposición del alcohol evaporado para evitar la precipitación. El procedimiento de CE para separar ácidos grasos

libres se adaptó de la bibliografía [31]; las muestras hidrolizadas se inyectaron hidrodinámicamente (5 kPa x 3 s) en un capilar de 80,5 cm (50 μ m I.D.). Se utilizó un BGE constituido por TMBA 5 mM, DPA 7 mM, Brij 35 10 mM y ACN al 60 %. La separación de los ácidos grasos libres se llevó a cabo a 45 °C bajo +20 kV, usando detección indirecta a 380 nm y con una longitud de onda de 245 nm como referencia (80 y 10 nm fueron las anchuras de banda respectivas). La distribución de ácidos grasos libres encontrada en los productos de hidrólisis fue de utilidad en la identificación de los picos de los homólogos de las correspondientes familias de surfactantes.

V.3. Resultados y discusión

V.3.1. Optimización de las condiciones de separación en CE

La optimización se llevó a cabo tanto usando medio básico (80 mM de tampón borato a pH 8,5 y 50 mM de tampón de dipentilamina a pH 10) como medio ácido (10 y 20 mM de ácido fosfórico). Como se indica en la Tabla 1, en ambos casos se probaron varios disolventes orgánicos (añadidos para inhibir la formación de micelas) y varios agentes aniónicos solvofóbicos a diferentes concentraciones. Se inyectaron, en cada caso, disoluciones de CDEA, CAPB y ABS, así como mezclas de dos o de las tres familias de surfactantes.

Las mejores separaciones de los homólogos de CDEA y CAPB en medio básico se consiguieron empleando un 20 % de PrOH en presencia de SDC. En la Fig. 1 se presentan los electroferogramas de las tres familias de surfactantes, inyectados individualmente (parte superior de la figura) y en una mezcla (parte inferior), obtenidos con este BGE. La separación de los homólogos no iónicos de CDEA y ambiiónicos de CAPB se atribuyó a su asociación solvofóbica con el SDC. Estos solutos y el ABS se mueven en contra del flujo, pero el EOF positivo los arrastra a todos hacia el detector. La identificación de los picos se hizo de

acuerdo con la composición de ácidos grasos encontrada en los productos de hidrólisis (obtenidos como se indica en la Sección V.2.2), y se sustentó también en la regular y progresiva disminución de la movilidad electroforética de los homólogos al aumentar el número de átomos de carbono. Ambas familias CDEA y CAPB mostraron concentraciones altas de ácido láurico, y más bajas de los ácidos C14:0, C16:0, C18:1, C18:0 y C18:2, tal y como sucede en el aceite de coco [32]; adicionalmente, el CDEA resultó contener derivados de los ácidos grasos C10:0 y C8:0, presentes también en el aceite de coco. Sin embargo, las asignaciones definitivas de picos mostradas en la figura sólo fueron posibles después de la deconvolución de los electroferogramas de las mezclas y de las materias primas. Las muestras de CDEA también mostraron picos de impurezas desconocidas, cuyos espectros (que presentaban un máximo a 245 nm) fueron bastante diferentes que los espectros de los homólogos de CDEA. Estas impurezas podrían deberse a la formación de hidroperóxidos con el envejecimiento de la muestra. Como se observa en la Fig. 1, parte A, los picos de las impurezas aparecen en la región de tiempos entre 24 y 26 min, solapando con los últimos picos de CDEA y CAPB y los primeros picos de ABS.

Además, se observó un solapamiento total entre los picos de CDEA18:2 y CAPB16:0, y un solapamiento a veces total y a veces parcial entre los picos de CDEA16:0, CDEA18:1 y CAPB18:1. En las condiciones de trabajo utilizadas, no era de esperar que se resolvieran los 20 isómeros posicionales presentes en las muestras de ABS [6,8], pero al menos se pudieron observar varios de los grupos de homólogos e isómeros que aparecen resueltos en la mayoría de las separaciones de HPLC y CE. De hecho, en el electroferograma de la Fig. 1 se reconocen hasta un total de nueve grupos. La resolución entre los picos de CDEA y CAPB mejoró al sustituir el SDC por SDS en el BGE; sin embargo, con SDS los picos de ABS migraron con mayor rapidez, dando lugar a un fuerte solapamiento con las otras dos familias de surfactantes. En comparación con el agente solvofóbico más comúnmente utilizado, el

SDS, el SDC dio lugar a una diferente selectividad entre las familias de surfactantes, lo que proporcionó la mejor separación tanto entre las tres familias como entre los homólogos dentro de cada una de ellas.

En medio ácido, la mejor separación se obtuvo con un BGE formado por 10 mM de ácido fosfórico a pH 2, 10 mM de DOSS y 20 % de PrOH. Se resolvieron todos los picos de los homólogos de CDEA y CAPB, y los derivados de los ácidos grasos C18:0 – C12:0 se encontraron dentro de la región de tiempos entre 16 y 24 min, pero para los homólogos más ligeros se necesitaron tiempos excesivamente largos (por ejemplo, 55 min para CDEA8:0). Empleando este BGE se requirió polaridad negativa para observar los picos, ya que a este pH tan bajo el EOF se encuentra inhibido. La separación de los homólogos de CDEA en medio ácido fue exclusivamente debida a la asociación solvofóbica con el surfactante aniónico añadido al BGE. Por el contrario, la separación de los homólogos de CAPB se podría atribuir a un mecanismo mixto, ya que al pH de trabajo se debe producir la protonación de los grupos carboxilo, quedando las especies en forma catiónica; sin embargo, la carga positiva neta del amonio cuaternario no fue suficiente para retrasar a los homólogos de CAPB respecto de la mayoría de los homólogos de CDEA. Más aún, los picos de ABS aparecieron entre 15 y 20 min, lo que produjo un solapamiento con la mayoría de los picos de CDEA y CAPB. Por esta razón, así como por el excesivo tiempo de análisis que se requiere para observar los homólogos de CDEA más ligeros, se eligió el medio básico. En la Tabla 1, las separaciones obtenidas en otros medios se comparan con las obtenidas con los BGEs que resultaron óptimos en los respectivos medios ácidos y básicos.

Tabla 1. Optimización del BGE en medios ácido y básico ^a.

Composición del BGE	R_1	t	Comentarios
Tampón borato 80 mM (pH 8,5), PrOH 20 % y SDC 20, 40 o 75 mM	-	-	Óptimo en medio básico (SDC 40 mM)
Tampón borato 80 mM (pH 8,5), PrOH 20 % y SDC 100 mM	0	∩∩	Picos CDEA/ CAPB retrasados hasta 45 min
Tampón borato 80 mM (pH 8,5), PrOH 20 % y ácido graso ^b 40 mM o DOSS 30 mM	∩	∩	Disminuye la eficacia
Tampón borato 80 mM (pH 8,5), SDC 75 mM y PrOH 30 o 40 %	∩	∩	Picos de ABS retrasados
Tampón borato 80 mM (pH 8,5), SDC 75 mM y ACN o MeOH 40 o 50 %	∩	∩	Aumenta el ruido
HOAc 25 mM, DPA 50 mM (pH 10), SDC 75 mM o SDS 50 mM y ACN 50 o 70 %	∩∩	0	El borato no es soluble en ACN 50 y 70 %
Tampón borato 80 mM (pH 8,5), PrOH 15 % y SDS 40 mM	∩	∩∩	R_2 disminuye mucho
Tampón borato 80 mM (pH 8,5), SDS 40 mM y PrOH 30 o 20 %	∩	∩	R_2 disminuye mucho
Ácido fosfórico 10 mM (pH 2), PrOH 20 % y DOSS 10 mM	-	-	Óptimo en medio ácido
Ácido fosfórico 10 mM (pH 2), PrOH 20 % y DOSS 30 mM o SDS 10 mM	∩	∩	Aumenta el ruido
Ácido fosfórico 10 mM (pH 2), PrOH 20 % y SDS 40 mM	∩∩	∩	
Ácido fosfórico 10 mM (pH 2), PrOH 30 % y SDS 10 mM	∩	∩∩	
Ácido fosfórico 20 mM (pH < 2), PrOH 20 % y SDS 40 mM	∩∩	∩	R_2 disminuye

^a R_1 = resolución dentro de las familias de CDEA y CAPB; R_2 = resolución dentro de las familias para CDEA y CAPB con respecto a ABS; t = tiempo de análisis para una mezcla de las tres familias de solutos. Otros símbolos: aumenta (∩), disminuye (∩), efecto no significativo (0) con respecto al BGE óptimo; el SDC no es soluble en medio ácido.

^b También se usaron como agentes solvofóbicos los ácidos grasos láurico, mirístico y palmítico.

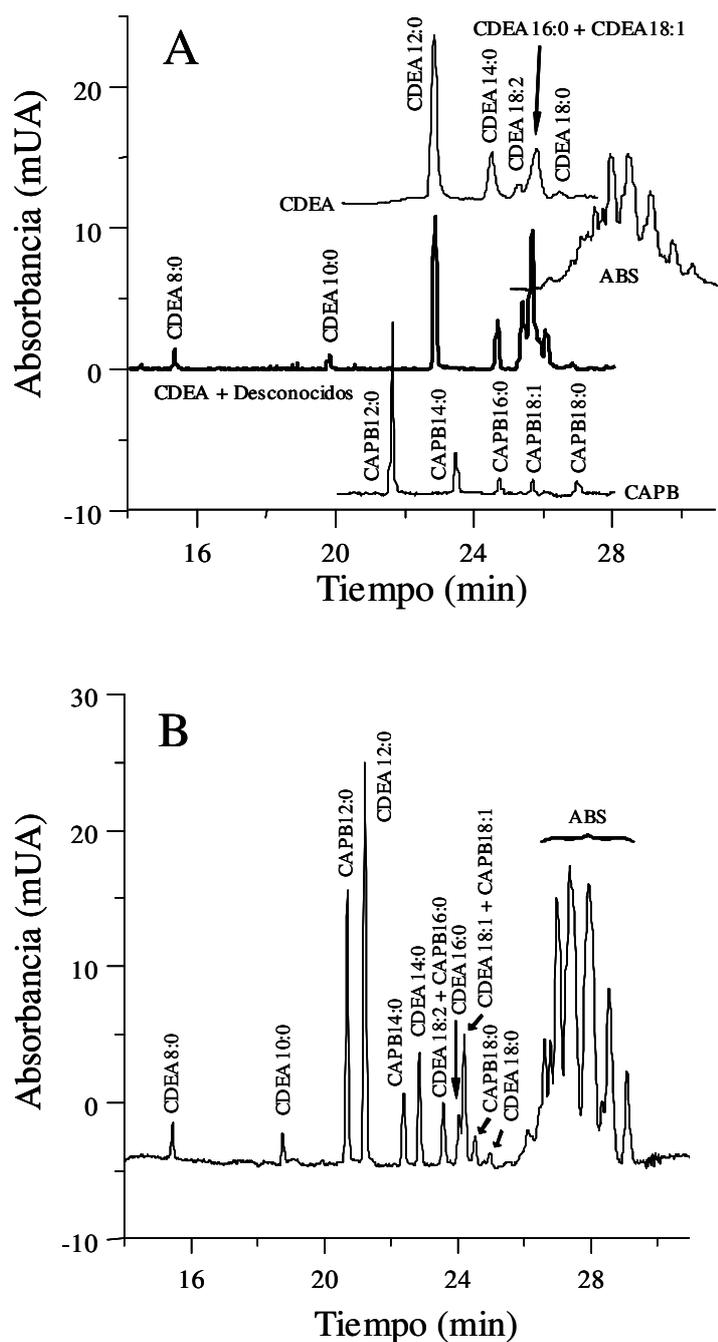


Figura 1. Electroferogramas de CDEA con y sin impurezas, CAPB y ABS (parte A), y una mezcla de las tres familias de surfactantes en ausencia de las impurezas de CDEA (parte B) ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada familia) obtenidos con el BGE óptimo en medio básico (80 mM de tampón borato a pH 8,5, 20 % de PrOH y 40 mM de SDC); EOF a 11,3 min.

V.3.2. Examen de las características espectrales de los solutos con el fin de aplicar deconvolución multivariante

Después de la optimización de las condiciones de trabajo, todavía seguían solapados varios picos de CDEA y CAPB. Además si estaban presentes las impurezas de CDEA, sus picos solapaban con picos de homólogos de CDEA o de ABS. Como se explica a continuación, aplicando técnicas multivariantes de tratamiento de datos se consiguió resolver por completo todos los picos, así como asignar los picos a cada familia de solutos (incluyendo el reconocimiento de impurezas) y mejorar la relación señal-ruido. Se procesaron electroferogramas de CDEA, CAPB, ABS y de sus mezclas. Para ello, en cada inyección se almacenó una matriz \mathbf{X} , que incluía m espectros a n longitudes de onda. Como se indica en la Fig. 2, \mathbf{X} está constituida por n vectores \mathbf{c}_j ($1 \leq j \leq n$), cada uno de ellos conteniendo un electroferograma a una longitud de onda λ_j dada (una por cada diodo del detector). También se puede considerar que \mathbf{X} está formada por m vectores \mathbf{s}_i ($1 \leq i \leq m$), cada uno de los cuales contiene un espectro a un tiempo de migración t_i dado. En los algoritmos propuestos y cálculos realizados se usaron además los siguientes vectores y escalares: (a) el espectro formado por el valor máximo de cada vector \mathbf{c}_j , \mathbf{s}_M , o espectro de los máximos; (b) los puntos seleccionados como verdaderos puntos del fondo de cada vector \mathbf{c}_j particular, los cuales constituyeron las estimaciones experimentales de los respectivos electroferogramas del fondo, \mathbf{c}_{j0} ; (c) las desviaciones estándar de los vectores \mathbf{c}_{j0} , que constituyeron el espectro de desviación estándar del fondo, \mathbf{d}_0 ; y (d) la media y desviación estándar de cada vector \mathbf{s}_i , constituyendo respectivamente los electroferogramas medios y de desviación estándar, \mathbf{c}_{n+1} (o \mathbf{c}_j donde $j = n + 1$) y \mathbf{d}_s . También se usaron la media y la desviación estándar de los elementos de \mathbf{d}_s , \bar{x}_{ds} y d_{ds} .

λ t	Electroferograma a $\lambda_1 : \mathbf{c}_1$	Electroferograma a $\lambda_j : \mathbf{c}_j$	Electroferograma a $\lambda_n : \mathbf{c}_n$	Electroferograma medio: \mathbf{c}_{n+1}	Electroferograma desv. est. : \mathbf{d}_s
Espectro a $t_1 : \mathbf{s}_1$...	x_{11} ...	x_{1j} ...	x_{1n} ...	\bar{x}_1 ...	d_{s1} ...
Espectro a $t_i : \mathbf{s}_i$...	x_{i1} ...	x_{ij} ...	x_{in} ...	\bar{x}_i ...	d_{si} ...
Espectro a $t_m : \mathbf{s}_m$	x_{m1}	x_{mj}	x_{mn}	\bar{x}_m	d_{sm}
Espectro de los máximos: \mathbf{s}_M	x_{M1}	x_{Mj}	x_{Mn}		$\bar{x}_{ds} \pm d_{ds}$
Espectro desv. est. fondo : \mathbf{d}_0	d_{01}	d_{0j}	d_{0n}		

Figura 2. Matriz de datos \mathbf{X} constituida por m espectros o n electroferogramas, y otros vectores y escalares usados.

La deconvolución de mezclas de familias de surfactantes que se propone en este trabajo se basa en suponer que se puede usar un único espectro de referencia para describir todos los picos de una misma familia de surfactantes. Esta suposición tiene su fundamento en que las diferencias espectrales entre los homólogos de una misma familia son insignificantes respecto a las diferencias espectrales entre distintas familias. La Fig. 3 muestra los espectros de las tres clases de surfactantes de interés obtenidos con un espectrofotómetro. En la figura estos espectros aparecen como líneas a puntos, y con el eje Y en unidades de absortividad molar situado a la derecha (partes A, B y C de la figura). Los espectros de las alquilamidas y de los homólogos aromáticos del ABS fueron muy diferentes unos de otros, mientras que se observaron diferencias pequeñas entre los espectros de las amidas secundarias (CDEA) y primarias (CAPB). La similitud entre parejas de espectros se puede estimar usando coeficientes de correlación lineal. Así, en el rango 200-260 nm para los espectros de las

parejas CDEA/ ABS, CAPB/ ABS y CDEA/ CAPB se tiene $r = 0,75$, $0,74$ y $0,95$, respectivamente.

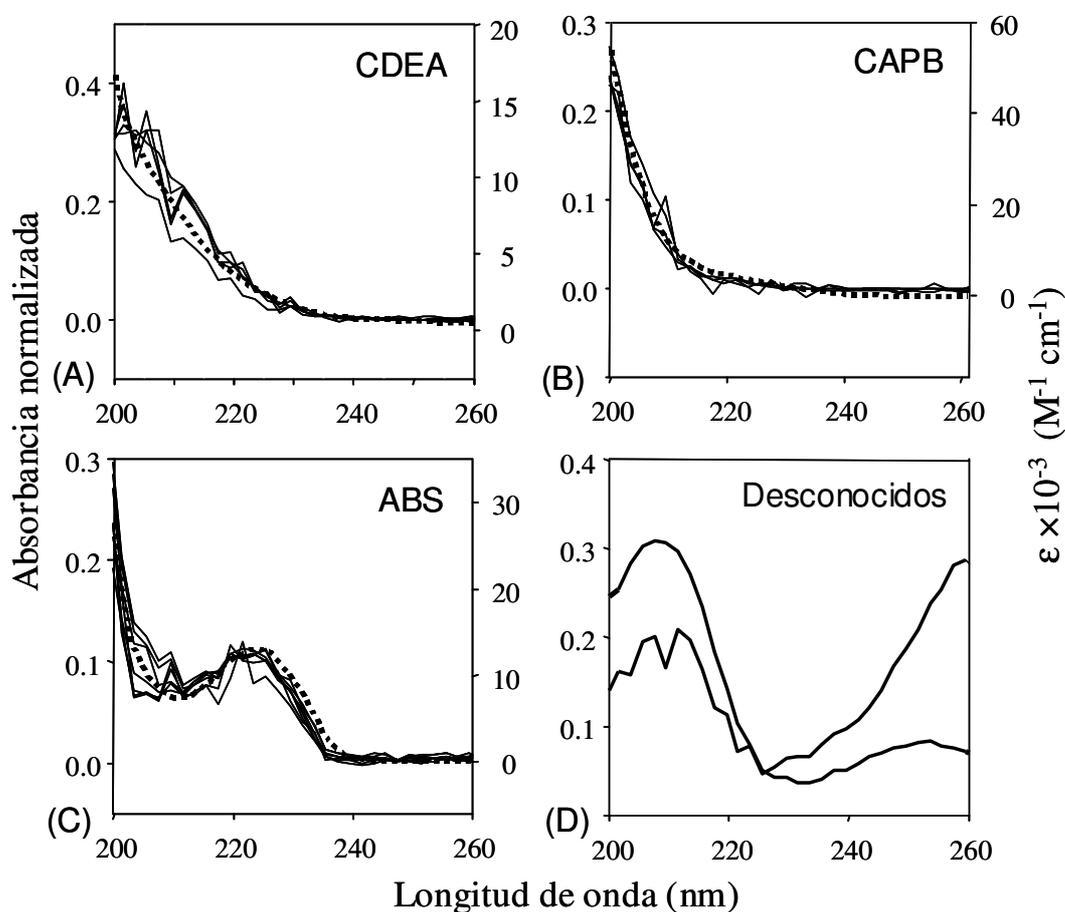


Figura 3. Superposición de espectros normalizados (divididos por sus respectivos módulos), extraídos de las matrices \mathbf{X} de las materias primas de CDEA, CAPB y ABS en las posiciones de tiempo de los respectivos picos de los homólogos, y espectros de dos solutos desconocidos encontrados en una muestra de CDEA. Las líneas de puntos corresponden a los respectivos espectros de absorción de CDEA, CAPB y ABS (obtenidos con el espectrofotómetro HP 8453 usando disoluciones preparadas con el BGE óptimo a pH 8,5) divididos por las concentraciones molares respectivas (35 , 15 y $40 \mu\text{M}$, respectivamente; los ejes de la derecha indican absorptividad molar).

Para una clase de solutos dada, el espectrofotómetro da un único espectro, que es el espectro medio de todos los homólogos, lo que no permite observar la dispersión espectral entre ellos. Con la finalidad de estudiar la relevancia de las diferencias espectrales dentro de cada familia, se extrajeron de las respectivas matrices \mathbf{X} los espectros en el máximo de todos los picos de los electroferogramas de CDEA, CAPB y ABS. Después, se normalizó cada espectro dividiendo las absorbancias por sus módulos (calculados como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las absorbancias). La normalización elimina la influencia de la concentración en solutos que tienen el mismo espectro. Si los solutos tienen un espectro diferente, la normalización atenúa las diferencias causadas tanto por la concentración como por la absorptividad molar de los máximos, lo que resulta útil para apreciar mejor las diferentes formas de los espectros. En la Fig. 3, partes A-C, se muestra una superposición de los espectros normalizados de los homólogos de CDEA, CAPB y ABS. Los espectros de los homólogos individuales y los medidos con el espectrofotómetro para cada familia de surfactantes en conjunto fueron esencialmente iguales; sin embargo, los primeros mostraron un ruido de fondo más alto, debido a que las señales que se miden en el interior del capilar son siempre mucho más pequeñas. Los espectros de los homólogos dentro de una misma familia fueron efectivamente muy similares entre sí, sin embargo, las diferencias espectrales entre las familias de CDEA y CAPB fueron mayores, y mucho mayores aún las diferencias entre estas familias respecto a los espectros de los homólogos del ABS. Las pequeñas diferencias espectrales sistemáticas observadas entre los grupos sucesivos de homólogos de ABS se podrían explicar como debidas a la diferente distribución de isómeros dentro de cada grupo.

La Fig. 3, parte D, muestra los espectros de dos impurezas absorbentes, de naturaleza desconocida, que se encontraron en muestras envejecidas de CDEA. Los experimentos se llevaron a cabo con mezclas de las tres clases de surfactantes, que se prepararon usando tanto

muestras de CDEA nuevas como envejecidas. Como se verá, estas últimas mezclas sirvieron para ilustrar la capacidad de los algoritmos empleados en el tratamiento de casos más complejos. De hecho, se requirieron por lo menos cuatro espectros de referencia extraídos de **X**, mediante el uso de OPA, para deconvolucionar las mezclas que se prepararon en presencia de las impurezas de CDEA, mientras que fue suficiente con tres espectros de referencia para las mezclas preparadas en ausencia de estas impurezas.

V.3.3. Construcción del modelo del fondo y corrección automática del mismo

Las variaciones del fondo (fluctuaciones y deriva de baja frecuencia) generadas por los diodos individuales del detector resultaron ser muy relevantes, hasta el punto de comprometer seriamente el éxito del tratamiento multivariante de las débiles señales que constituían los electroferogramas. Como se muestra en la Fig. 4, parte A, la señal del fondo de los diodos consistía en un ruido aleatorio de alta frecuencia, y en una deriva lenta con fluctuaciones ocasionales de baja frecuencia. Además, puesto que los diodos del detector son dispositivos básicamente independientes, las variaciones de diodos consecutivos estaban muy escasamente correlacionadas (véase el inserto en la Fig. 4, parte A). De hecho, se observaron comportamientos irregulares e imprevisibles en las variaciones del fondo de los electroferogramas a lo largo de ambas variables, tiempo de migración y longitud de onda. La magnitud de las variaciones de la línea base fue lo bastante grande como para requerir una corrección cuidadosa, particularmente por debajo de 220 nm, donde dichas variaciones suponían más de un 10 % de la altura de los mayores picos de los solutos. Es importante tener en cuenta que toda la información significativa acerca de los homólogos de CDEA y CAPB se obtuvo precisamente a longitudes de onda cortas. Más aún, cuando se compararon réplicas de electroferogramas de una misma familia de solutos, las diferencias entre las variaciones en

el fondo condujeron a espectros diferentes. De todo ello se deduce la necesidad de construir un modelo bidimensional del fondo para cada electroferograma particular.

Se puede construir una estimación inicial de la matriz del fondo, \mathbf{X}_0 , de dos formas, a saber, muestreando el dominio del tiempo a cada longitud de onda individual, o bien muestreando el dominio de la longitud de onda a cada valor particular del tiempo. Sin embargo, cuando se registran espectros UV-vis en disolución, las bandas anchas extendidas a lo largo de regiones espectrales grandes, el ruido intenso y la presencia generalizada de bandas de absorción a longitudes de onda cortas, impiden el muestreo adecuado del fondo a lo largo del dominio de la longitud de onda. Por el contrario, como ilustra la Fig. 4, parte A, en todos los electroferogramas existían entre los picos presentes puntos del fondo que abarcaban todas las regiones intermedias a lo largo de todo el dominio del tiempo. Por ello, para construir \mathbf{X}_0 , se establecieron primero los límites del dominio de trabajo a lo largo del dominio del tiempo. Con este fin se usó el electroferograma de desviación estándar, \mathbf{d}_s , que muestra las regiones de tiempo donde existen valores significativos de la absorbancia al menos en una región de longitud de onda. La zona de interés del dominio del tiempo se estableció desde la primera hasta la última de estas regiones (fondo entre picos), más dos pequeñas regiones adicionales en los extremos (más allá de los últimos picos significativos).

El diagrama de flujo de la Fig. 5 muestra en detalle el algoritmo utilizado para construir automáticamente y de un modo muy conveniente un modelo muy fiable del fondo. El algoritmo se basa en criterios muy conservadores a lo largo de todo el proceso de selección de puntos, con el objeto de mantener una alta probabilidad de recoger tan solo verdaderos puntos del fondo. En primer lugar, establece una línea base aproximada común para todos los diodos, incluyendo todas las regiones de tiempo exentas de picos del soluto a cualquier longitud de onda, \mathbf{c}_{j0} (siendo $j = n + 1$, seleccionándose con ello puntos del electroferograma medio). Con este objeto, se tienen en cuenta los valores mínimos de estos dos vectores: \boxtimes

que contiene las desviaciones de un punto en \mathbf{c}_{j0} con respecto a sus dos vecinos más próximos, y \mathbf{d}_s . Estos dos vectores son especialmente sensibles a la presencia de valores aberrantes, y por ello sus elementos mínimos tienen una alta probabilidad de incluir exclusivamente verdaderos puntos del fondo. Cada uno de los dos vectores \mathbf{d}_y y \mathbf{d}_s , se divide después en dos segmentos por la posición de sus respectivos elementos máximos. Los puntos que serán inicialmente incluidos en \mathbf{X}_0 se seleccionan procesando independientemente cada uno de estos cuatro segmentos. De esta forma, se asegura una mejor distribución de los puntos seleccionados a lo largo del dominio del tiempo.

A continuación, dentro de los segmentos, los puntos se ordenan por categorías. Dentro de cada segmento, esto acumula los puntos con la más alta probabilidad de pertenecer al verdadero fondo en la categoría más poblada. Sólo se incluyeron en \mathbf{c}_{j0} un conjunto pequeño de puntos, recogidos de los elementos colocados en los rangos más bajos comunes a los dos vectores, \mathbf{d}_y y \mathbf{d}_s , atendiendo sólo a su respectiva categoría más poblada. Puesto que \mathbf{d}_y y \mathbf{d}_s se basan en algoritmos muy diferentes, esta condición mejora mucho la probabilidad de seleccionar exclusivamente verdaderos puntos del fondo. Esta probabilidad también mejora reduciendo a un mínimo el número de puntos seleccionados. Decidimos seleccionar sólo 6 puntos comunes a la izquierda de los elementos máximos de \mathbf{d}_y y \mathbf{d}_s , y 6 puntos más a la derecha, lo que hace un total de 12 puntos en la muestra inicial del fondo promedio, \mathbf{c}_{j0} (lo que se indica como $g = 12$ en la Fig. 5). Más aún, se seleccionaron estos puntos con la condición de que estuvieran situados tan lejos unos de otros como fuera posible, lo cual asegura el muestreo adecuado del fondo a lo largo de todo el dominio del tiempo, incluyendo también puntos situados cerca de los extremos del dominio. Se usó el algoritmo de Kennard-Stone [33] para automatizar la selección de estos puntos dentro de cada lado de \mathbf{c}_{j0} .

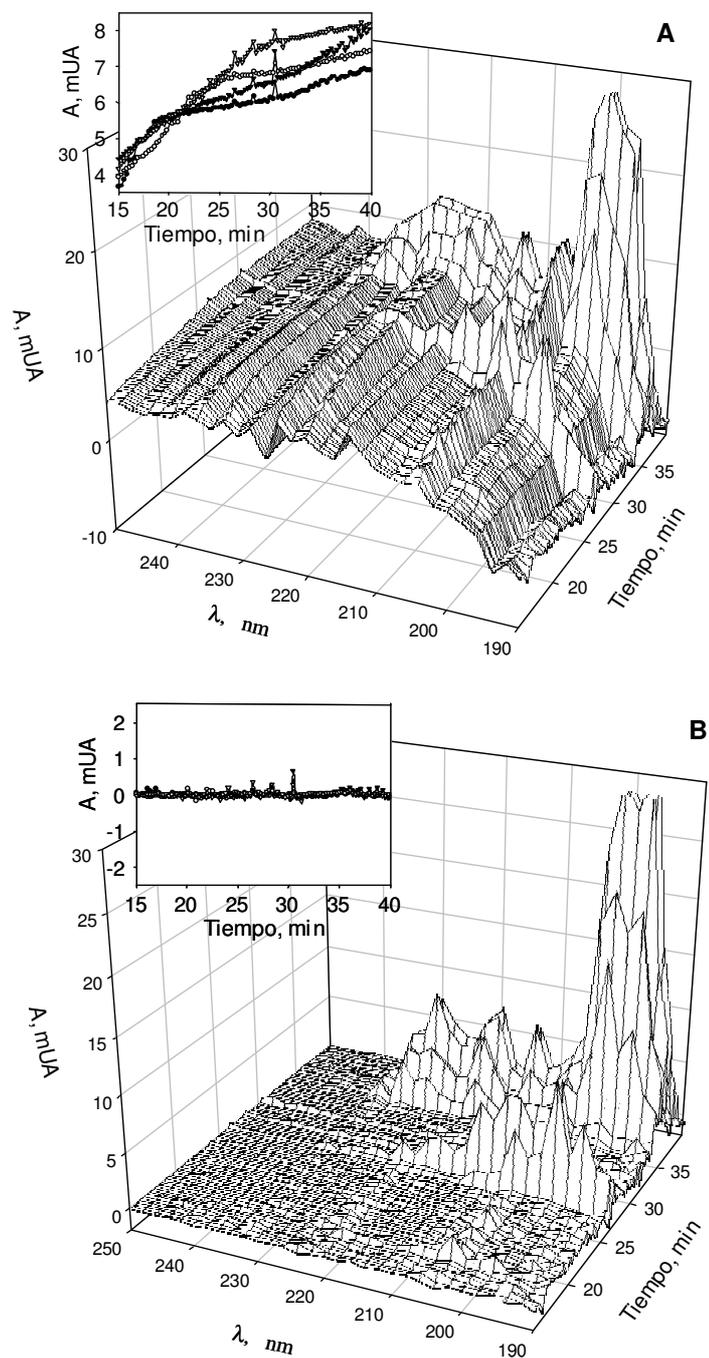


Figura 4. Vista tridimensional de la matriz \mathbf{X} para una mezcla de CDEA, CAPB ($300 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada familia) y ABS ($900 \mu\text{g ml}^{-1}$) antes (A) y después (B) de la corrección del fondo usando CSS; para mejorar la figura, sólo se representó uno de cada 20 espectros. Los insertos muestran los electroferogramas bidimensionales de los cuatro diodos situados en las longitudes de onda más largas.

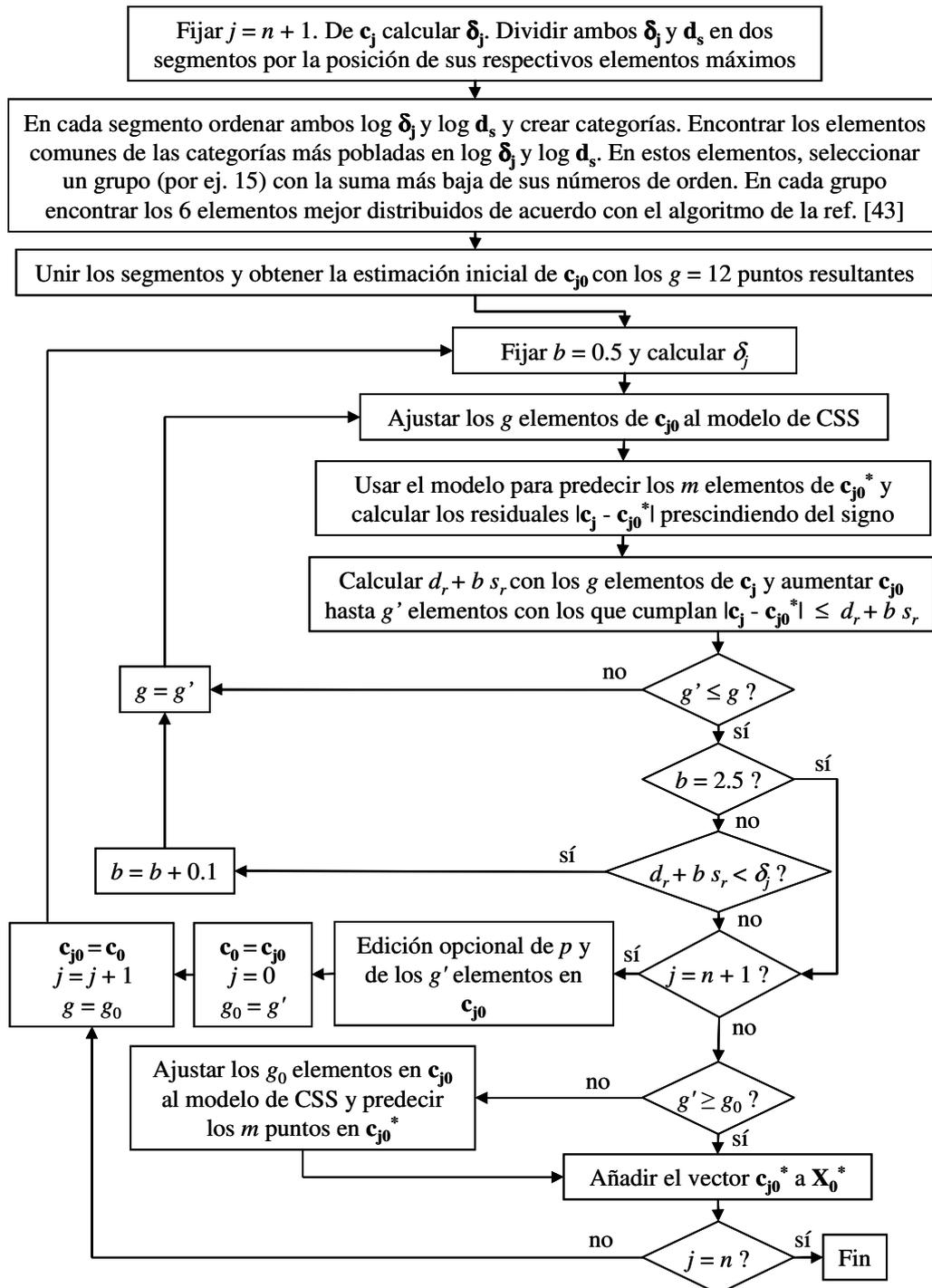


Figura 5. Diagrama de flujo que describe el algoritmo de selección del fondo. Símbolos: δ_j , vector de las desviaciones de x_{ij} con respecto a la media de $x_{(i-1)j}$ y $x_{(i+1)j}$, siendo $x_{0j} = x_{1j}$ y $x_{(m+1)j} = x_{mj}$; δ_j , mediana de los elementos de δ_j sin tener en cuenta el signo; d_r y s_r , media y desviación estándar de los residuales sin tener en cuenta el signo, $|c_j - c_{j0}^*|$; g_0 , número de elementos del electroferograma medio definitivo de la línea base, c_0 ; el subíndice 0 denota la línea base y el asterisco significa que está ajustado a un modelo. Otros símbolos: salvo para los que se explican por sí mismos, ver la Fig. 2.

A continuación, se aplica un algoritmo de regresión para obtener un modelo, \mathbf{c}_{j0}^* ($j = n + 1$), a partir de los 12 puntos incluidos inicialmente en \mathbf{c}_{j0} . Como se discute en la Sección V.3.4, CSS proporcionó los mejores modelos. Una vez se ha construido un modelo, la tendencia que establece el mismo se puede utilizar para aumentar el número de puntos en \mathbf{c}_{j0} , manteniendo a la vez alta la probabilidad de incluir sólo verdaderos puntos del fondo. Con esta finalidad, se examinan los residuos de los electroferogramas medios (sin tener en cuenta el signo) con respecto al modelo del fondo, $|c_j - \mathbf{c}_{j0}^*|$ (siendo también $j = n + 1$). Se añaden muy pocos puntos en cada iteración, para evitar así sesgar el modelo de CSS. Cuando ha terminado la optimización, pueden ser opcionalmente editados ambos, los puntos de la línea base común resultante, \mathbf{c}_{j0} , y el parámetro p de las CSS (ver Sección V.3.4). El aumento o la disminución del parámetro p da lugar, respectivamente, a un “estirado” o a un “aflojado” del trazador.

Posteriormente, \mathbf{c}_{j0} (que ahora contiene $g' > g$ puntos) queda fijado (haciendo $g_0 = g'$ y $\mathbf{c}_0 = \mathbf{c}_{j0}$) para ser usado como una estimación inicial del fondo para cada diodo particular ($\mathbf{c}_{j0} = \mathbf{c}_0$). Se varía entonces el índice j desde 1 a n , repitiendo cada vez el mismo ciclo de refinado que se utilizó antes para construir \mathbf{c}_0 . Esto da lugar a más puntos del fondo para cada diodo. Como el análisis se realiza de modo independiente para cada espectro, derivas en el dominio del tiempo no influyen en el proceso. Este proceso convierte progresivamente los g_0 puntos del fondo incluidos en el vector \mathbf{c}_0 en una matriz, \mathbf{X}_0 , que contiene los $n g_0$ puntos que se observan simultáneamente en las n longitudes de onda, más un número variable de puntos adicionales del fondo en cada longitud de onda. Este proceso de selección de puntos da lugar automáticamente a una descripción detallada y fiable del fondo bidimensional, \mathbf{X}_0 . El conjunto de los correspondientes n modelos definitivos, \mathbf{c}_{j0}^* , constituye el modelo bidimensional del fondo, \mathbf{X}_0^* .

Finalmente, se establecen los límites del dominio de longitudes de onda usando un espectro de desviación estándar restringido, \mathbf{d}_0 , en el cual sólo se incluyen regiones del fondo comunes a todos los valores de tiempo. Dividiendo elemento por elemento los vectores \mathbf{s}_M (espectro de los máximos) y \mathbf{d}_0 , se obtiene un vector que contiene las relaciones señal-ruido. La representación de este vector frente a la longitud de onda se utiliza para seleccionar el dominio de longitudes de onda. Este paso se programó para ser aplicado manualmente, lo cual es aconsejable para evitar los artefactos del cálculo y los resultados erróneos producidos por el elevado ruido que afecta a los espectros a longitudes de onda cortas. Después de la selección del dominio de longitudes de onda de trabajo, se fijaron definitivamente ambos, \mathbf{X} y \mathbf{X}_0^* , y la matriz corregida, \mathbf{X}_c , utilizada en los estudios de deconvolución posteriores, se calculó como $\mathbf{X}_c = \mathbf{X} - \mathbf{X}_0^*$. La eficacia del algoritmo para seleccionar y modelizar el fondo se puede apreciar en la Fig. 4, parte B, donde se puede comparar el gráfico tridimensional de la matriz corregida, \mathbf{X}_c , con el gráfico de la correspondiente matriz sin corregir, \mathbf{X} , que aparece en la parte A de esa misma figura.

V.3.4. CSS aplicado al modelizado del fondo y a la corrección de las señales de CE

Para construir modelos fiables del fondo, se probaron una variedad de algoritmos y estrategias de modelización, que incluyeron ajuste lineal dentro de pequeñas regiones de tiempo consecutivas, y ajustes cuadráticos, cúbicos y polinomiales usando varias funciones. Aunque la calidad de estos ajustes fue aparentemente buena, a menudo, perturbaciones residuales menores dieron lugar a deconvoluciones sesgadas, especialmente cuando se procesaron amplias ventanas de tiempo (lo cual como se indicó antes tiene mucho interés para acelerar el tratamiento de los datos). Usando CSS se alcanzaron resultados mucho mejores, que además resultaron ser de aplicabilidad universal. Esta técnica se desarrolló específicamente para modelizar tendencias de baja frecuencia ocultas en datos de diferente

naturaleza, pero caracterizados por su elevado ruido [27]. Los trazadores mimetizan funciones complejas mediante el uso de un conjunto de r aproximaciones polinomiales locales, $f_r(t)$, las cuales autodefinen una serie de segmentos de la variable separados por un conjunto de $(r + 1)$ nodos. El usuario selecciona el grado del polinomio, siendo el cúbico el más usual. En trazadores de suavizado se minimiza el siguiente estimador de probabilidad:

$$r_j = p_j \sum_{k=1}^{g'_j} [x_{kj} - f_r(t_{kj})]^2 + (1 - p_j) \int_{t_{1j}}^{t_{g'_j}} \left(\frac{d^2 f_r}{dt^2} \right)^2 dt \quad (1)$$

La Ec. (1) representa un balance entre dos tendencias extremas, a saber, la que corresponde al primer término, que tiende a ajustar una curva que pase exactamente por todos los puntos (aplicando de esta forma un trazador cúbico puro), y la que corresponde al segundo término, que tiende a realizar un ajuste lineal simple por mínimos cuadrados. El peso relativo de estas dos fuerzas está controlado por el parámetro de suavizado, p , que da lugar a trazadores puros cuando su valor es 1, y a ajustes lineales cuando es 0. Por lo tanto, cuanto más irregular es el fondo, mayor es el valor óptimo de p , mientras que a valores bajos de p se obtienen buenos ajustes de curvas suaves. En todos los casos estudiados en este trabajo, valores de p entre 10^{-4} y 10^{-7} resultaron ser adecuados. Más aún, variaciones de un orden de magnitud, o incluso mayores, dieron lugar a ajustes con calidades similares. Se comprobó también que el mismo valor de p seleccionado para ajustar de forma óptima el fondo de uno de los diodos en un electroferograma bidimensional cualquiera, producía ajustes satisfactorios para todos los otros diodos, incluyendo el electroferograma medio, \mathbf{c}_{n+1} . De acuerdo con el aspecto suave del fondo, los valores bajos de p usados en este trabajo dieron lugar más bien a trazadores basados en polinomios de grado bajo, que basados en funciones muy curvadas. Una ventaja es que los puntos nuevos que fueron añadidos con criterios conservadores durante el proceso de construcción del fondo, tendieron a consolidar los trazadores, lo cual a su vez redujo la probabilidad de introducir puntos contaminados con

señales significativas. El subíndice k hace referencia a las filas de \mathbf{X}_0 (los valores conocidos del fondo a los g' tiempos seleccionados como puntos de la línea base para el diodo considerado, siendo $g' < m$), y el índice j indica el diodo (o electroferograma medio, \mathbf{c}_{n+1} , cuando $j = n + 1$) cuya línea base esta siendo ajustada.

V.3.5. Deconvolución multivariante mediante OPA-ALS

La resolución bidimensional multivariante se desarrolla en dos pasos, a saber, un ensayo de pureza seguido de una deconvolución. En el ensayo de pureza se establece un conjunto de los espectros más puros que están contenidos en la matriz \mathbf{X}_c (en el caso ideal, uno por cada familia de solutos). Durante la deconvolución se usa la regresión de mínimos cuadrados de forma iterativa para recuperar las contribuciones puras de los compuestos presentes a partir de las estimaciones proporcionadas por el ensayo de pureza. La eficacia y fiabilidad de la deconvolución depende críticamente de: (a) la corrección adecuada de las perturbaciones del fondo; (b) la identificación de todas las familias de solutos que tienen un espectro diferente; (c) las diferencias entre los espectros; y (d) las relaciones señal-ruido de los espectros usados como estimaciones iniciales. Por lo tanto, serán de gran utilidad todas las estrategias enfocadas a mejorar la eficacia del ensayo de pureza.

Cuando se usan ensayos de pureza, la probabilidad de encontrar regiones selectivas con buenas relaciones señal-ruido, que contengan espectros no contaminados o apenas contaminados, aumenta con el intervalo del dominio del tiempo que se está procesando. Para las familias de solutos constituidas por homólogos con espectros muy similares entre sí (que pueden, por tanto, ser representadas por un único espectro de referencia), procesar mayores dominios del tiempo aumenta la probabilidad de encontrar espectros aislados de cada una de las familias con buenas relaciones señal-ruido. De esta forma, regiones de tiempo selectivas y relativamente distantes pueden proporcionar la información espectral requerida para

deconvolucionar picos solapados y situados en otras regiones de tiempo para una familia de solutos concreta. Además, la calidad de la información recuperada en regiones del tiempo alejadas entre sí mejora después de sustraer el fondo. Por ello, para mejorar la calidad de las estimaciones iniciales de los espectros, y reducir el tiempo de procesado, se recomienda tratar los datos en todo el dominio del tiempo, en lugar de dividirlo. En este trabajo, el procesado de la señal completa, extendida a lo largo de todo el dominio del tiempo, funcionó correctamente con todos los electroferogramas. En la cuantificación de señales pequeñas, una división de \mathbf{X}_c en dos secciones dio lugar a resultados más exactos, lo que es debido tanto a la reducción de la complejidad en una región local del dominio del tiempo, como también a la atenuación de la influencia de irregularidades de los diodos. En algunas ocasiones, para mejorar la resolución, también fue necesario procesar pequeñas ventanas de tiempo en las que aparecían grupos complejos de picos.

Se seleccionó la técnica OPA-ALS debido a sus excelentes características. OPA extrae de \mathbf{X}_c sus espectros más puros, los cuales se adjuntaron posteriormente para formar una matriz auxiliar. Esta matriz, completada de forma iterativa, contiene una colección de espectros de referencia, siendo todos ellos tan mutuamente ortogonales como sea posible. Se llamó disimilaridad a la propiedad monitorizada para determinar qué espectro en \mathbf{X}_c es el menos compatible con respecto a los de una colección de espectros de referencia. Este valor corresponde al determinante del producto $\mathbf{Y}^T \cdot \mathbf{Y}$, donde \mathbf{Y} es una matriz auxiliar que contiene los espectros de referencia normalizados más el espectro que está siendo objeto de análisis. El proceso se repite hasta comparar todos los espectros contenidos en \mathbf{X}_c con respecto a los de la colección. El espectro en \mathbf{X}_c más incompatible con respecto a los de la colección se indicó por el elemento mayor en el vector de disimilaridades. Entonces, este espectro se añade a la colección, y el proceso se repite hasta que el vector de disimilaridad solamente contenga ruido.

Este proceso no garantiza la pureza real de los espectros “más puros” seleccionados; por tanto, en la mayoría de los casos reales se requiere un refinado adicional. El refinado se lleva a cabo por rotación de la solución hasta satisfacer un número de restricciones físico-químicas. Esto se desarrolla normalmente usando ALS, que descompone la matriz bilineal en sus dos órdenes de datos (tiempo y longitud de onda) alternando dos regresiones por mínimos cuadrados, a saber, los perfiles espectrales en \mathbf{X}_c para obtener los perfiles de concentración, \mathbf{c}_j^* , y los perfiles de concentración en \mathbf{X}_c para obtener los perfiles espectrales, \mathbf{s}_i^* , repitiendo alternativamente este proceso:

$$\mathbf{c}_j^* = \mathbf{X}_c \cdot (\mathbf{s}_i^{*T} \cdot \mathbf{s}_i^*)^{-1} \cdot \mathbf{s}_i^{*T} \quad (2)$$

$$\mathbf{s}_i^* = (\mathbf{c}_j^{*T} \cdot \mathbf{c}_j^*)^{-1} \cdot \mathbf{c}_j^{*T} \cdot \mathbf{X}_c \quad (3)$$

Restricciones impuestas a las soluciones intermedias, tales como no-negatividad para ambos órdenes de datos, aseguran la convergencia en resultados significativos. Se pueden encontrar más detalles sobre los algoritmos OPA y ALS en las referencias 5 y 7 del capítulo IV. Una ventaja de procesar la señal total a lo largo del dominio del tiempo es la fácil obtención de la convergencia sin imponer restricciones, por ejemplo, normalmente no es necesaria selectividad en el orden del tiempo. La unimodalidad, que es la otra restricción más común, no se puede aplicar a muestras constituidas por dos o más picos que comparten el mismo espectro. No es aconsejable una proyección directa de los electroferogramas bidimensionales de los estándares. Debido a las grandes variaciones del ruido de una inyección a otra, y a la presencia ocasional de compuestos inesperados con espectros parcialmente colineales, este proceso puede conducir a soluciones fuertemente sesgadas. En las mezclas procesadas en este trabajo se probó y se descartó esta estrategia.

V.3.6. Identificación y cuantificación de mezclas

Los perfiles de concentración obtenidos aplicando OPA-ALS, c_j^* , son adecuados para estimar la distribución de homólogos dentro de cada familia de solutos; sin embargo, para acumular gráficos de calibración, deberían calcularse verdaderos electroferogramas reconstruidos. Esto se realizó multiplicando cada perfil de concentración por las respectivas absorbancias normalizadas dentro de una ventana de longitud de onda seleccionada del correspondiente perfil espectral. Finalmente, se promediaron los resultados obtenidos a diferentes longitudes de onda dentro de la ventana. Esto dio lugar a electroferogramas que pueden ser directamente comparados con los obtenidos en el trabajo de rutina. En la Fig. 6 se muestran los electroferogramas reconstruidos de las familias de solutos que aparecían en el electroferograma de la Fig. 1, parte B, pero usando ventanas de longitud de onda seleccionadas de acuerdo a las respectivas relaciones señal-ruido óptimas (204-210, 204-218 y 212-232 nm para CAPB, CDEA y ABS, respectivamente). Los electroferogramas reconstruidos describieron correctamente los picos de todos los homólogos de las tres familias de surfactantes así como las impurezas desconocidas. Tal y como se observó en el gráfico insertado en la esquina superior derecha de la Fig. 6, los espectros normalizados reconstruidos de todas las familias fueron similares a los obtenidos con el espectrofotómetro (líneas de puntos en la Fig. 3). En la Tabla 2 se comparan las áreas relativas de los picos obtenidas a partir de los electroferogramas sin y con aplicación de la deconvolución OPA-ALS. Se pueden observar relaciones similares entre las áreas de los picos resueltos de los homólogos en cada familia.

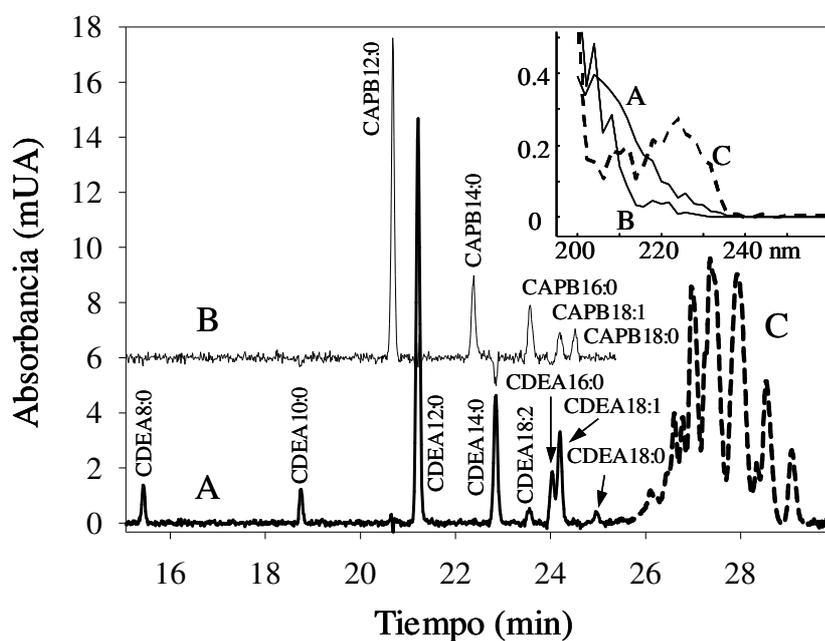


Figura 6. Electroferogramas reconstruidos, recuperados por OPA-ALS a partir de la matriz X_c (mezcla de la Fig. 1, parte B): CDEA (A, línea continua), CAPB (B, desplazado hacia arriba para mayor claridad) y ABS (C, línea discontinua). El gráfico insertado muestra los espectros normalizados de A, B y C después de la deconvolución aplicando OPA-ALS.

Tabla 2. Áreas relativas de los picos obtenidas sin y con deconvolución OPA-ALS

Soluto	Sin OPA-ALS a 200 nm ^{a, b}	Con OPA-ALS con ventanas óptimas ^{a, c}	
		Inyección por el extremo largo	Inyección por el extremo corto
CDEA8:0	(0,11)	0,044 (0,09)	0,038 (0,06)
CDEA10:0	(0,08)	0,039 (0,08)	0,028 (0,04)
CDEA12:0	(1)	0,503 (1)	0,637 (1)
CDEA14:0	(0,29)	0,172 (0,34)	0,145 (0,23)
CDEA16:0	-	0,068 (0,14)	-
CDEA18:0	(0,03)	0,016 (0,03)	0,008 (0,01)
CDEA18:1	-	0,138 (0,27)	-
CDEA18:2	-	0,020 (0,04)	-
CDEA18:2+16:0+18:1	-	0,174 (0,35)	0,144 (0,23)
CDEA área total ^d	-	4,48 (25 %)	6,22 (26 %)
CAPB12:0	(1)	0,562 (1)	0,419 (1)
CAPB14:0	(0,28)	0,190 (0,34)	0,214 (0,51)
CAPB16:0	-	0,129 (0,23)	0,123 (0,29)
CAPB18:0	(0,11)	0,060 (0,11)	-
CAPB18:1	-	0,059 (0,10)	-
CAPB18:1+18:0	-	0,119 (0,21)	0,246 (0,59)
CAPB área total ^d	-	1,58 (9 %)	1,12 (5 %)
ABS área total ^d	-	11,6 (66 %)	16,9 (70 %)

^a Fuera del paréntesis, áreas relativas referidas al área total de la familia, y entre paréntesis, áreas relativas referidas al homólogo 12:0 de la familia. Las desviaciones estándar de las áreas variaron del 10 al 16 % ($n = 4$ electroferogramas).

^b Sólo se pudieron medir áreas relativas de los picos resueltos referidas al homólogo 12:0 de la familia.

^c Ventanas espectrales óptimas para cuantificación: 204-218, 204-210 y 212-232 nm para CDEA, CAPB y ABS, respectivamente.

^d Área total de la familia y porcentaje con respecto a la suma de las áreas de las tres familias.

En la Fig. 7, se muestra un ejemplo de la mejora de la resolución por un tratamiento de datos local. En el trazo A, se representó una ampliación de la región de tiempos 25-26 min para un electroferograma de una muestra envejecida de CDEA. El trazo B de la misma figura muestra el perfil deconvolucionado de CDEA, y el trazo C los de dos impurezas con un perfil espectral diferente. En particular, se recuperó satisfactoriamente el pico del homólogo de CDEA18:2, que se encontraba completamente oculto por las señales más intensas de las impurezas.

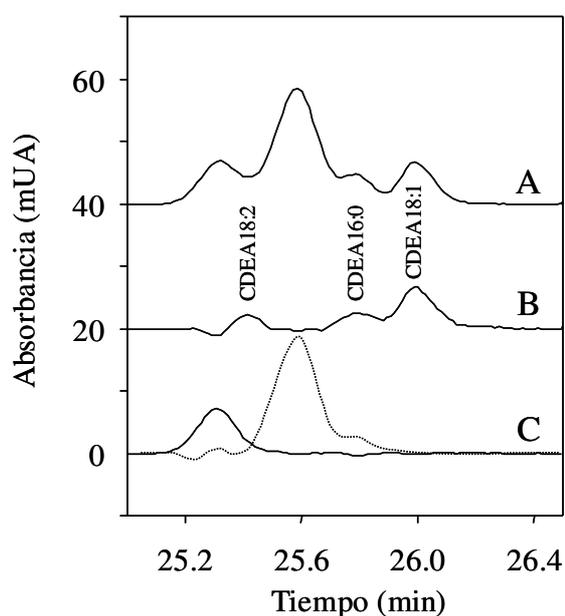


Figura 7. Ampliación de la region de tiempos de 25 a 26 min de un electroferograma de una muestra de CDEA envejecida (A), y los correspondientes perfiles de concentración deconvolucionados de CDEA (B) y de dos impurezas (C) con un perfil espectral diferente.

La reducción al mínimo del tiempo de análisis es de interés para la explotación industrial de procedimientos analíticos. Como se muestra en la Fig. 8, trazo A, el tiempo de análisis se redujo de 30 a 7 min cuando se inyectó por el extremo corto del capilar una mezcla con la misma composición que la usada en la Fig. 1, parte B. Como era de esperar, disminuyó mucho la resolución a lo largo del corto dominio del tiempo, pero mejoró la relación señal-

ruido, lo que proporcionó mejores perfiles espectrales (véase el gráfico insertado en la esquina superior izquierda de la Fig. 8). Esto ayudó en la obtención de los perfiles de concentración deconvolucionados. Los electroferogramas reconstruidos se muestran en la Fig. 8, trazos B-E, el trazo D corresponde al electroferograma de las impurezas desconocidas. Así, la inyección por el extremo corto del capilar fue completamente válida para detectar interferencias, y como se muestra posteriormente, también se usó para la cuantificación de las familias, las áreas relativas de los picos se dan en la Tabla 2. Con respecto a los resultados obtenidos inyectando por el extremo largo del capilar, la relación entre las áreas de los picos de los homólogos dentro de las familias varió de forma significativa. Sin embargo, la relación entre el área total de la familia y la suma de las áreas de todas las familias fue casi la misma para CDEA, aumentó ligeramente para ABS y se redujo de forma significativa para CAPB. Por lo tanto, para la evaluación global de las familias también se puede usar la inyección por el extremo corto del capilar, aunque, lógicamente, los errores pueden ser grandes para familias que tengan áreas totales bajas.

En otros experimentos, se inyectaron por el extremo largo del capilar y posteriormente se procesaron mezclas que contenían $900 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ABS y de una de las otras dos familias de surfactantes de tipo alquil amida en la misma concentración y en concentraciones decrecientes (de 900 a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$). El problema de deconvolución más difícil consistió en reducir la concentración de CAPB manteniendo concentraciones altas de ABS y de CDEA, debido a que los homólogos de CAPB absorben dentro de una región espectral con mayor ruido. En todos los casos, se recuperaron correctamente los electroferogramas a partir de la matriz de datos de las mezclas. Se construyeron curvas de calibrado para el contenido total de CDEA y CAPB, sumando las áreas corregidas de los picos de los respectivos homólogos. Las curvas mostraron baja dispersión y buena linealidad ($r = 0.990$, $n = 5$). También se obtuvieron curvas de calibrado de similar calidad ($r = 0.991$, n

= 9) sumando las áreas corregidas de los picos resueltos de los homólogos de CDEA y CAPB en los electroferogramas sin procesar, sin tener en cuenta los picos solapados. Sin embargo, esta última aproximación aumenta el riesgo de errores en las asignaciones de los picos a cada una de las familias, dando lugar a predicciones sesgadas cuando las muestras analizadas contengan impurezas o diferentes distribuciones de homólogos que los estándares.

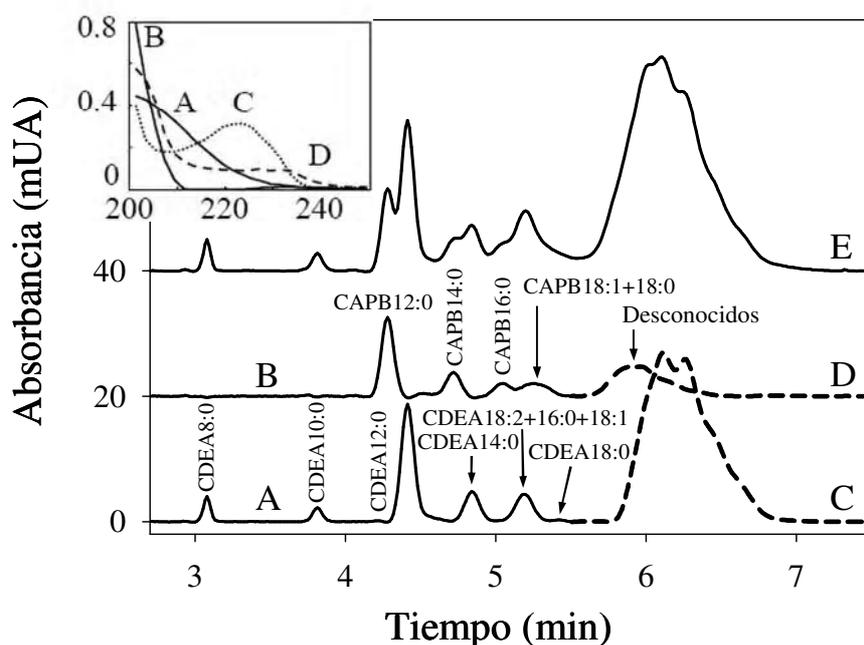


Figura 8. Electroferograma de una mezcla de CDEA, CAPB y ABS ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cada familia) inyectada por el extremo corto del capilar (E), y electroferogramas reconstruidos recuperados por OPA-ALS a partir de la correspondiente matriz \mathbf{X}_c : CDEA (A), CAPB (B), ABS (C) y solutos desconocidos (D). El gráfico insertado muestra los espectros normalizados de A-D después de la deconvolución OPA-ALS (en el inserto se representa absorbancia normalizada frente a longitud de onda en nm).

Las concentraciones que dieron lugar a alturas de pico iguales a tres veces la desviación estándar del fondo, s , correspondieron a los límites de detección de los homólogos de CDEA y CAPB. Para estimar el valor de s , se tomó como $5s$ la anchura del fondo a la longitud de onda monitorizada. Para homólogos individuales, el límite de detección se calculó dividiendo $3s$ por $h_i / [M_i]$, donde h_i y $[M_i]$ son la altura de pico y la concentración

molar del homólogo *i*. Los límites de detección fueron de 1,3 mM tanto para los picos de CAPB como para los de CDEA. En la Fig. 9, partes A y B, se muestran los electroferogramas de dos muestras de composición desconocida. Se encontró que el limpiador para prendas delicadas contenía un 9 % de ABS y un 1,5 % de CDEA, mientras que el lavavajillas tenía un 16 % de ABS y un 0,8 % de CAPB.

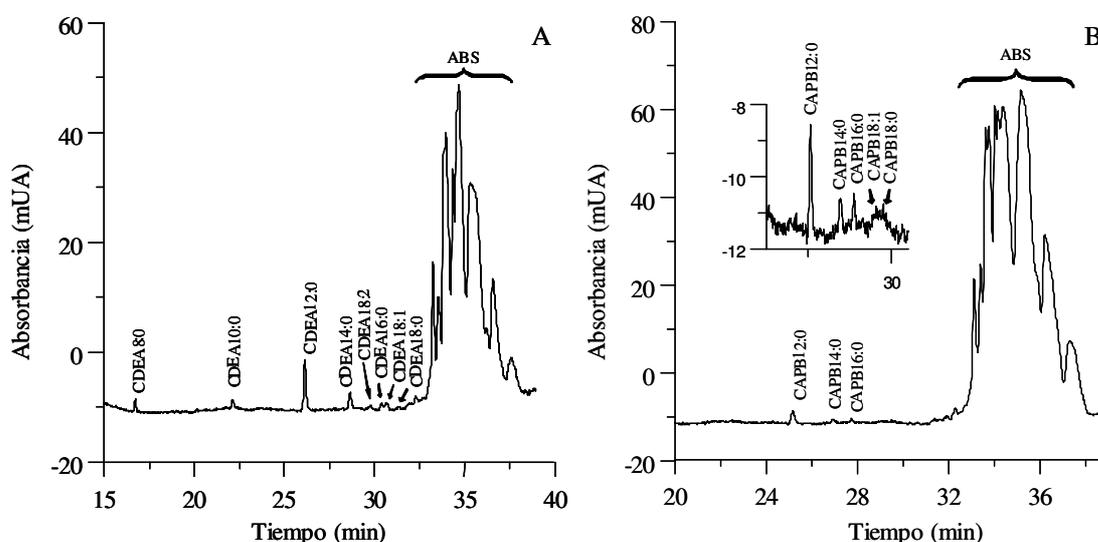


Figura 9. Electroferogramas de un limpiador para prendas delicadas (A) y un lavavajillas (B).

V.4. Conclusiones

En el trabajo correspondiente a este capítulo, se demuestra la aplicación práctica de la deconvolución multivariante OPA-ALS a los electroferogramas bidimensionales de familias de surfactantes no-iónicos, ambiónicos y aniónicos, con resolución de la mayoría de los homólogos en 30 min. Se comprobó que el procesado de los datos, incluyendo la deconvolución, estaba seriamente comprometido por fluctuaciones y deriva de la señal del fondo de los diodos individuales del detector. Se desarrolló un algoritmo capaz de construir

un modelo del fondo para restarse de la señal bidimensional neta con escasa supervisión. Con este objeto, se eligió un pequeño conjunto inicial de puntos usando dos criterios independientes. Con la ayuda de modelos de CSS, se aumentó mediante iteraciones este conjunto de puntos para regiones del fondo comunes a todos los diodos, también se mejoró el fondo común, obtenido de esta forma, por adición de nuevos puntos para todos los diodos individuales. A lo largo del proceso completo, se tuvieron algunas precauciones y se aplicaron criterios bastante conservadores para mantener una alta probabilidad de excluir puntos asociados a señales significativas. Debido a este exhaustivo proceso, se consiguió una descripción del fondo detallada y altamente fiable y un modelo asociado de CSS de calidad. Se probaron otros procedimientos de filtrado del fondo pero dieron lugar a artefactos que hicieron inviable los pasos de deconvolución siguientes; de esta forma, los mejores resultados, obtenidos en este trabajo aplicando deconvolución OPA-ALS de las señales bidimensionales corregidas, también garantizaron la reproducibilidad y la calidad de la selección del fondo y del procedimiento de modelización aquí descrito. Además, las señales corregidas mostraron una alta sensibilidad y se recuperaron incluso picos pequeños de solutos sin sesgo.

Las ventajas de usar trazadores de suavizado cúbico fueron la simplicidad, fiabilidad y robustez en presencia de perturbaciones de diferentes magnitudes y formas. Esto es importante, ya que la presencia de perturbaciones del fondo irregulares e impredecibles, del mismo orden de magnitud que los picos del soluto, probablemente ha impedido hasta ahora desarrollar procedimientos analíticos bidimensionales en datos obtenidos por electroforesis capilar. Se lograron varias ventajas al aplicar deconvolución multivariante en comparación con el uso directo de datos sin procesar. En primer lugar, se mejoró la relación señal-ruido usando información significativa generada a todas las longitudes de onda. En segundo lugar, debido al uso de espectros de calidad, también mejoró la fiabilidad en la identificación de los

picos, y se ganó información adicional acerca de especies absorbentes no esperadas. En tercer lugar, se redujo de forma considerable el riesgo de error sistemático producido tanto por despreciar picos solapados como por identificación errónea de picos. En cuarto lugar, el tiempo de análisis puede ser reducido hasta 7 min inyectando por el extremo corto del capilar. En este caso, aunque se perdió algo de resolución entre los homólogos de una familia concreta, se caracterizaron y cuantificaron las familias de forma apropiada.

Finalmente, con el *software* de elaboración propia, se puede completar en menos de dos minutos el proceso completo, desde importar archivos de datos a MATLAB hasta cuantificar las áreas de pico corregidas en los electroferogramas reconstruidos.

V.5. Referencias

- [1] A. Nakae, K. Kunihiro, J. Chromatogr. A 152 (1978) 137.
- [2] A. Marcomini, S. Capri, W. Giger, J. Chromatogr. A 403 (1987) 243.
- [3] Y. Yokoyama, H. Sato, J. Chromatogr. A 555 (1991) 155.
- [4] Y. Yokoyama, M. Kondo, H. Sato, J. Chromatogr. A 643 (1993) 169.
- [5] R. Alzaga, A. Peña, L. Ortiz, J.M. Bayona, J. Chromatogr. A 999 (2003) 51.
- [6] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, Analyst 123 (1998) 349.
- [7] W. H. Ding, C. H. Liu, J. Chromatogr. A 929 (2001) 143.
- [8] J. M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, Electrophoresis 24 (2003) 681.
- [9] H. Salimi-Moosavi, R. M. Cassidy, Anal. Chem. 68 (1996) 293.
- [10] J. M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, Electrophoresis 22 (2001) 2017.
- [11] L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1031 (2004) 17.
- [12] A. Kruse, N. Buschmann, K. Cammann, J. Planar Chromatogr. Mod. TLC 7 (1994) 22.

-
- [13] H. Grunewald, C. Kurowski, D. Timm, U. Grummisch, U. Meyhack, J. Near Infr.Spectr. 6 (1998) A215.
- [14] K. Nakamura, Y. Morikawa, J. Am. Oil Chem. Soc. 61 (1984) 1130.
- [15] Y. Miyamae, K. Yoshizawa, J. Tsuchiya, Bunseki-Kagaku 50 (2001)61.
- [16] M. Castillo, J. Riu, F. Ventura, R. Boleda, R. Scheduling, H.F. Schroeder, C. Niston, J.Emneus, P. Eichhorn, T.P. Knepper, C.C.A. Jonkers, P. de Voogt, E. Gonzalez-Mazo, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 889 (2000) 195.
- [17] M. Petrovic, D. Barcelo, Fresenius' J. Anal. Chem. 368 (2000) 676.
- [18] L. H. Levine, J. L. Garland, J. V. Johnson, Anal. Chem. 74 (2002) 2064.
- [19] O. P. Haefliger, Anal. Chem. 75 (2003) 371.
- [20] A. Nakae, K. Kunihiro, J. Chromatogr. A 156 (1978) 167.
- [21] A. Tegeler, W. Ruess, E. Gmahl, J. Chromatogr. A 715 (1995) 195.
- [22] S. Sentellas, J. Saurina, J. Sep. Sci. 26 (2003) 1395.
- [23] T. L. Cecil, S. C. Rutan, J. Chromatogr. 556 (1991) 495.
- [24] H. Shen, J. Wang, Y. Z. Liang, K. Petterson, M. Josefson, J. Gottfries, F. Lee, Chemom. Intell. Lab. Syst. 37 (1997) 261.
- [25] Y. Z. Liang, O. M. Kvalheim, A. Rahmani, R. G. Brereton, , Chemom. Intell. Lab. Syst. 18 (1993) 265.
- [26] P. J. Gemperline, J. H. Cho, B. Archer, J. Chemometrics 13 (1999) 153.
- [27] C. De Boor, Practical Guide to Splines, revised edition, Applied Mathematical Sciences series, vol. 27, Springer, New York, USA, 2001, p. 207-220.
- [28] O. Glatter, H. Greschoning, Microchimica Acta II (1986) 389.
- [29] S. V. Romanenko, E. S. Romanenko, N. A. Kalpakova, J. Anal. Chem. 56 (2001) 51.
- [30] T. Rotunno, F. Palmisano, G. Tiravanti, P.G. Zambonin, Chromatographia 29 (1990) 269.

[31] F.B. Erim, X. Xu, J.C. Kraak, *J. Chromatogr. A* 694 (1995) 471.

[32] E. Primo-Yúfera, *Química de los alimentos*, Síntesis, Madrid 1998, ch. 5, p. 169.

[33] R.W. Kennard, L.A. Stone, *Technometrics* 11 (1969) 137.

Capítulo VI

Determinación de alcoholes grasos etoxilados sin derivatizar mediante ionización por electronebulización-espectrometría de masas

(*Journal of Chromatography A*, disponible *on-line*)

VI.1. Introducción

Hoy por hoy, los FAEs son, probablemente, los surfactantes no-iónicos más importantes. En muchas aplicaciones son preferidos frente al uso de APEOs e incluso frente a muchos surfactantes aniónicos, debido a la más rápida biodegradabilidad y menor toxicidad de sus metabolitos. Son ampliamente usados en limpiadores, cosméticos, pesticidas, lubricantes textiles y otros productos industriales y de uso doméstico [1]. Los FAEs lineales se obtienen como una mezcla compleja de oligómeros con la siguiente fórmula genérica:



En muestras industriales, domésticas y ambientales, se pueden encontrar oligómeros con un corto rango de valores de n , y distribuciones de unidades de EOs desde un rango relativamente estrecho hasta uno bastante amplio. Podemos distinguir oligómeros de dos tipos dependiendo de que varíe el índice n o m , y que se conocen como hidrocarbómeros y etoxímeros, respectivamente. Normalmente, se encuentran hidrocarbómeros con longitudes de cadena alquílica dentro del rango $8 < n \leq 18$, y etoxímeros que tienen desde $m = 0$ (el alcohol no etoxilado) hasta $m = 40$. Se requieren métodos analíticos muy selectivos y precisos para caracterizar las muestras, incluyendo una descripción adecuada de las distribuciones de hidrocarbómeros y etoxímeros. Esto es

importante en control de calidad, ya que las propiedades físico-químicas y técnicas de los FAEs dependen en gran medida de estas distribuciones [2].

La determinación de todos los oligómeros de FAEs usando un único método analítico no es una cuestión sencilla, debido tanto a las dificultades de detección como a las grandes diferencias de volatilidad entre los etoxímeros. La cromatografía de gases está limitada a los oligómeros con un bajo grado de etoxilación [2-4], y la falta de un detector adecuado es la mayor dificultad en los métodos de HPLC [2,5]. En la separación de FAEs por cromatografía de fluidos supercrítica (*supercritical fluid chromatography*, SFC) se ha usado detección por ionización en llama [6] y ELSD [7,8]. Se han descrito una gran variedad de métodos de HPLC con resolución de hidrocarbómeros y etoxímeros usando detección por índice de refracción [9-12] y ELSD [8,9,13-16]. Se puede conseguir una resolución superior mediante cromatografía líquida bidimensional usando combinaciones tanto de HPLC en fase reversa (*reverse phase*, RP) como en fase normal (*normal phase*, NP) [12]. Sin embargo, los límites de detección son altos en la detección por índice de refracción, y el ELSD proporciona una menor sensibilidad para los oligómeros con un bajo grado de etoxilación, debido a su volatilización en la cámara de nebulización [17].

Se han publicado revisiones bibliográficas sobre los procedimientos de derivatización pre-columna para la separación por GC o HPLC [18], y sobre las condiciones de RP- y NP-HPLC que permiten resolver los oligómeros [18-20]. Se han descrito muchos métodos de HPLC con derivatización cromogénica o fluorogénica previa [18,21-33]. La introducción de un grupo aromático tiene la ventaja de producir derivados de los oligómeros que tienen absorptividades molares independientes de n y m [26,27,32]; sin embargo, los derivados fluorescentes obtenidos por adición de un grupo naftil dieron factores de respuesta que fueron un 20 % inferiores para los alcoholes no etoxilados que para los oligómeros etoxilados [24]. En CE con detección UV-vis, se requiere la derivatización de los FAEs para añadir un cromóforo o una carga a los oligómeros

[13,34-37]. Se ha investigado el desarrollo cromatográfico de los FAEs en columnas de sílice, octadecil-sílice y amino-sílice con diferentes fases móviles, usando detección por MS con fuente APCI [38]. Los FAEs y APEOs se han caracterizado en muestras ambientales mediante HPLC con detección mediante MS con fuente APCI [39,40] y ESI [3,41,42]. También se ha evaluado la determinación de la distribución de oligómeros de FAEs y APEOs mediante MALDI-MS [43]. Un problema común que afecta a todos los procedimientos de MS reconocido muy tempranamente, es la disminución de los factores de respuesta cuando m disminuye, dando lugar a bajas sensibilidades para los FAEs con bajo grado de etoxilación ($m < 5$), y a una sensibilidad extremadamente baja para los alcoholes no etoxilados ($m = 0$) [2,3,44-48]. El mismo problema afecta a la caracterización de APEOs usando ambas fuentes, ESI y APCI, lo que se ha atribuido a la escasa capacidad de los etoxímeros con bajo grado de etoxilación para formar aductos con protones y otros cationes en la fase gas [5]. Para superar este problema, se han descrito varios procedimientos de derivatización que adicionan un grupo con una carga permanente a los oligómeros [23,25,28,33,36,46-48]. Normalmente, se estudia la separación por HPLC de los derivados y los aspectos cualitativos de la detección, y en algunos casos se utilizan mezclas industriales certificadas para validar el método [22]. Se han utilizado también estándares de oligómeros individuales en la validación de un método basado en la adición de un grupo naftilo seguido de detección fluorescente [24], y también para validar la conversión de FAEs a alcohol-etoxi-sulfatos seguida de detección por MS [47]. Otros métodos de derivatización no se han validado con estándares de oligómeros individuales. Sin embargo, el uso de estándares de los oligómeros es obligado cuando se quiere validar completamente un método, estableciendo la cuantitatividad de la derivatización de los distintos oligómeros cuando dicho método se aplica a las muestras de interés, y también los factores de respuesta de los derivados. La derivatización puede fallar en presencia de trazas de agua o de otros componentes de la muestra [3,46], y el

rendimiento de la reacción también puede depender de n y m . Además, la introducción de una carga permanente tiende a igualar los factores de respuesta de los diferentes oligómeros en MS, pero todavía puede existir una influencia significativa de la cadena alquílica y las cadenas de polioxietileno sobre la sensibilidad. Por ejemplo, nosotros hemos observado diferencias importantes entre los factores de respuesta de ácidos carboxílicos lineales con 8-18 átomos de carbono cuando se inyectan en ESI-MS usando un tampón alcalino, lo que sugiere que la sensibilidad puede estar afectada no sólo por diferencias de densidad de carga en el grupo iónico, sino también por diferencias de volatilidad e hidrofobicidad entre los homólogos.

La relación entre el número de protones de la cadena alquílica y de los grupos metilo, obtenida por ^1H NMR, proporciona una medida fiable del número medio de EOs de una serie de etoxímeros [31,48-50]. Las discrepancias entre los rendimientos de derivatización o los factores de respuesta de los oligómeros deben producir diferencias significativas entre el número medio de EOs obtenido del espectro de masas y el obtenido por ^1H NMR. Esta técnica proporciona una manera indirecta de validar un método sin usar estándares de oligómeros individuales; sin embargo, en el cálculo del número medio de EOs, los rendimientos de reacción más bajos o los menores factores de respuesta de algunos oligómeros (por ejemplo los que tienen $m = 0$ o 1) podrían ser enmascarados por los pesos mucho mayores de todos los otros oligómeros. Esta limitación del procedimiento de validación por ^1H NMR puede conducir a conclusiones erróneas cuando se pretende determinar oligómeros individuales y no tan sólo el número medio de EOs, lo que puede ser importante, por ejemplo, en estudios ambientales. También se han llevado a cabo estudios de validación usando mezclas de estándares certificadas [4,27,46,48,51], pero este procedimiento requiere una composición de la mezcla de estándares similar a la de las muestras que son evaluadas para que no se produzca error sistemático.

Otras dificultades presentes en la derivatización de FAEs son la necesidad de un medio anhídrido [30,46,52], en algunos casos la presencia de un catalizador [33], y un mayor riesgo de interferencias debidas al exceso de reactivo y a subproductos de reacción [26,27,46]. Además, debido al alto riesgo de perder por volatilización los etoxímeros con bajos valores de m , es necesario tomar precauciones especiales para reducir el contenido de agua de las muestras, lo que puede implicar un aumento excesivo del tiempo de análisis [46]. Sin embargo, un método de derivatización para la detección en MS tiene la ventaja de hacer posible la cuantificación de los alcoholes no etoxilados, mejorar los límites de detección (LODs) de los etoxímeros, particularmente los que tienen valores bajos de m [46], y simplificar del tratamiento de los datos, debido a que se igualan (o al menos se llegan a asemejar apreciablemente) los factores de respuesta de los oligómeros. En muchos casos, las ventajas compensarán con creces el cuidado y el tiempo empleado en la preparación de la muestra y otras dificultades asociadas a la derivatización. Es particularmente recomendable la conversión de FAEs a alcohol etoxi sulfatos, que se lleva a cabo a temperatura ambiente por el complejo dimetilformamida-SO₃, y que tolera la presencia de algo de agua en las muestras, dando lugar a derivados con similares factores de respuesta [47].

Sin embargo, la infusión directa de FAEs en MS y HPLC-MS son técnicas directas, capaces de proporcionar información sobre las distribuciones de los oligómeros de forma inmediata. Además, frecuentemente se observan los espectros de MS de los FAEs sin derivatizar cuando se evalúan otros surfactantes y aditivos en muestras industriales o ambientales. Por estas razones, es de interés conocer los factores de respuesta de los FAEs sin derivatizar en los medios comúnmente usados en HPLC, y estudiar la posibilidad de establecer modelos de factores de respuesta. No se ha publicado ningún estudio cuantitativo de este tipo, capaz de servir como guía para desarrollar procedimientos para la evaluación semi-cuantitativa de FAEs con un esfuerzo

experimental mínimo. Debido al elevado número de oligómeros (63 dentro de la pequeña región definida por $10 \leq n \leq 18$ y $1 \leq m \leq 7$), y a las grandes diferencias de sensibilidad entre ellos, para la calibración se requiere seleccionar un conjunto de estándares, tan reducido, pero también tan representativo como sea posible, a lo largo de n y m . Un conjunto de estándares bien seleccionado, capaces de describir los factores de respuesta de los oligómeros de calibración dentro de los rangos de n y m de interés, se puede usar para establecer modelos de regresión capaces de hacer predicciones precisas por interpolación. Ungewiss y *col.* [53] hicieron un intento de modelizar las relaciones entre sensibilidad y estructura usando disoluciones de FAEs sin derivatizar en metanol y metil *ter*butil éter, y midiendo los picos $[M+Na]^+$ obtenidos por ESI-MS. Se encontró que los factores de respuesta crecían exponencialmente hasta $m = 5$, y disminuían para mayores grados de etoxilación; sin embargo, no se propuso ningún modelo.

En el trabajo desarrollado en este capítulo, se hace uso de un elevado número de estándares de oligómeros puros de FAEs, elegidos de forma altamente representativa abarcando desde $n = 10$ a 18, y desde $m = 0$ a 7. Este conjunto de estándares se utilizó para examinar los factores de respuesta en ESI-MS y APCI-MS en varios medios. Se encontró que los factores de respuesta dependen fuertemente de la composición del medio, lo que condiciona en gran medida la construcción de modelos y el diseño de conjuntos reducidos de estándares representativos. En todos los medios que se probaron, las sensibilidades aumentaron siguiendo perfiles irregulares tanto con n como con m , mostrando también desviaciones positivas y negativas respecto a su tendencia media según la paridad de m . Para los alcoholes no etoxilados ($m = 0$) se encontró una sensibilidad despreciable, lo cual impidió su determinación. Los espectros de ESI-MS en lugar de los de APCI-MS fueron más adecuados para establecer modelos de factores de respuesta, y también se eligieron los picos de $[M+H]^+$ en un medio metanol/ agua que contenía HCl 0,1 M, frente a los picos de $[M+Na]^+$ en medio metanol/ agua o acetonitrilo/ agua. Finalmente, usando un

nebulizador triconcéntrico (usual en CE-MS) alimentado con una envoltura líquida ácida proporcionada por una bomba isocrática auxiliar, o alternativamente, usando una simple unión capilar en T insertada entre la salida de la columna y el nebulizador biconcéntrico (comúnmente usado en HPLC-MS), y alimentada por una corriente ácida proporcionada por una bomba de jeringa, se demostró que la detección en MS usando un medio ácido es compatible con una separación previa mediante HPLC.

VI. 2. Materiales y métodos

VI.2.1. Instrumentos, reactivos y muestras

Se usó un sistema de MS de trampa iónica de la serie 1100 VL (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), equipado con una fuente ESI, que se cambió por una fuente APCI en los experimentos donde se indica. Para infusión directa de las disoluciones en el espectrómetro, se usó una bomba de jeringa (kdScientific, Holliston, MA, USA) fijada a un flujo constante de $0,3 \text{ mL hr}^{-1}$ ($5 \mu\text{L min}^{-1}$). Se usó un nebulizador biconcéntrico, excepto cuando se indique que se sustituye por uno triconcéntrico (Agilent). Por el tercer canal de este último se hizo pasar una envoltura líquida proporcionada por una bomba isocrática (Agilent), con una división 1:100 del flujo mediante una unión capilar en T. Se utilizaron varios caudales. Para los experimentos de HPLC-ELSD, se usaron un detector ELSD 2000 (Alltech, Deerfield, IL, USA), un cromatógrafo líquido de la serie 1100 provisto de una bomba cuaternaria (Agilent), que trabajó en modo isocrático a una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} , y una columna de octadecilsílice (Kromasil, $5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 250 \text{ mm}$, Análisis Vínicos, Tomelloso).

Para HPLC-MS se usó el mismo cromatógrafo, pero provisto de una columna octilsílice (Eclipse XDB-C8, $5 \mu\text{m}$, $4,6 \times 150 \text{ mm}$, Agilent). Para insertar una unión en T entre la salida de la columna de HPLC y el nebulizador biconcéntrico, se usaron dos piezas de tubo PEEK de 3 cm

de longitud. Se usó la bomba de jeringa para abastecer la unión en T (lateralmente a la conexión recta entre la columna y el nebulizador) con una disolución de HCl 0,2 M en metanol a través de un capilar de sílice a velocidades de flujo de 0,24 y 0,48 mL hr⁻¹ (4 y 8 μL min⁻¹). Se usó el *software* de Agilent LC/MSD v. 4.2 para el análisis de los datos de MS, y los modelos de regresión se construyeron con el paquete estadístico SPSS v. 12.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Los FAEs se nombran como C_nE_m , donde C_n y E_m representan la cadena alquílica lineal con n átomos de carbono y la cadena polietoxilada con m unidades de EO, respectivamente, también se usó C_nE_0 para denotar alcoholes no etoxilados, por ejemplo, C10E0 es 1-decanol. Se usaron los siguientes reactivos de grado analítico: ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), ácido acético (HAcO), MeOH, ACN, cloruro sódico, acetato sódico (Scharlab, Barcelona), C14E0, C12E1, C12E2, C12E7, C16E1, C16E7, C18E1, C18E3 (Fluka, Buchs, Suiza), ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, C10E0, C12E0, C16E0 (Sigma-Aldrich), C10E3, C10E4, C12E3, C12E4, C12E5, C12E6, C14E4, C16E2, C16E4, C16E5, C16E6, C18E2 y C18E4 (cedidos amablemente por C. Solans, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona). También se usaron agua desionizada (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA) y las muestras industriales FINDET 10/18 y FINDET 1214/16 (disoluciones acuosas con aproximadamente un 80 % de FAEs, Molins-Kao, Barcelona). FINDET 10/18 es una mezcla de etoxímeros de $C_{10}E_m$ con un valor nominal medio de 6 moles de EO, mientras que FINDET 1214/16 contiene las series $C_{12}E_m$ y $C_{14}E_m$ con un valor nominal medio de 4 moles de EO.

VI.2.2. Procedimientos

Los barridos del espectrómetro se hicieron en el rango de 50-800 m/z , el voltaje del capilar fue de 4 kV, y se aplicaron 6 V a la máscara 2; el voltaje de la máscara 1 quedó fijado automáticamente en función de la masa diana. La carga máxima de la trampa de iones fue 3×10^4

cuentas, y el tiempo máximo de acumulación fue de 300 ms. Se usó nitrógeno (obtenido del generador) como gas de nebulización (100 kPa) y gas de secado (3 L min⁻¹ a 250 °C). Para APCI la corriente corona fue de + 4 μA. Para reducir las variaciones de sensibilidad entre inyecciones, el pico [M+H]⁺ del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico a *m/z* 213 se usó para corrección de patrón interno. Para eliminar la influencia de la masa diana sobre la sensibilidad, las abundancias de los iones se midieron usando su valor de *m/z* como su respectiva masa diana; para esto, se usó la opción del *software* de escanear automáticamente una serie de masas diana preseleccionadas. El tiempo de adquisición usado en infusión directa fue de 2 minutos. Se calculó el factor de respuesta de un oligómero dado, f_i , como:

$$f_i = \frac{I_i [M]_s}{I_s [M]_i} = \frac{I_i M_i C_s}{I_s M_s C_i} \quad (1)$$

donde I_i e I_s son las alturas de los picos, $[M]_i$ y $[M]_s$ las concentraciones molares, M_i y M_s las masas moleculares, y C_i y C_s las concentraciones en μg mL⁻¹ del oligómero correspondiente y del patrón interno, respectivamente.

Se prepararon disoluciones que contenían 100 y 10 μg mL⁻¹ de los oligómeros individuales que tenían $m \leq 3$ y $m > 3$, respectivamente, en una mezcla 9:1 ACN/ agua conteniendo HCl 0,1 M, y también en una mezcla 9:1 MeOH/ agua (v/v) conteniendo 0,1 M de HCl, HAcO o TFA, en ausencia y presencia de sales de sodio. En los experimentos desarrollados en medio básico, se usó una mezcla 9:1 MeOH/ agua que contenía 0,02 M de bicarbonato sódico. Las disoluciones de las muestras de FINDET se diluyeron hasta 1 mg mL⁻¹ (lo que corresponde a una concentración de los oligómeros individuales mucho menor) con 9:1 MeOH/ agua conteniendo HCl 0,1M. Todas las disoluciones se pasaron a través de filtros de nylon de 0,45 μm de diámetro de poro (Albet, Barcelona).

VI.3. Resultados y discusión

VI.3.1. Espectros y condiciones de trabajo

Se optimizaron las condiciones de trabajo de la fuente ESI para conseguir la máxima sensibilidad del pico $[M+H]^+$. Se utilizó una disolución de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C12E6 en MeOH/ agua con HCl 0,1 M. El pico aumentó con la temperatura de secado, alcanzándose una meseta por encima de 250°C . Se observaron variaciones despreciables al modificar el flujo de gas de secado y la presión del gas de nebulización. Las condiciones finalmente seleccionadas fueron las indicadas en el apartado anterior. También se intentó la optimización de los picos $[M+H]^+$ de los alcoholes sin etoxilar, C10E0, C12E0, C14E0 y C16E0, pero siempre se observaron abundancias despreciables. Los factores de respuesta fueron del orden de $10^{3,5}$ a 10^4 veces menores respecto a C12E6. Además, el pico $[M+H]^+$ del C10E0 mostró una repetibilidad muy deficiente cuando se inyectó a concentraciones crecientes, lo que impidió la construcción de una curva de calibrado. Por estas razones, los alcoholes no etoxilados no se incluyeron en los estudios siguientes.

Se exploraron los espectros de masas en medio ácido y básico, y usando los modos ion-positivo e ion-negativo. Con este objeto se realizó la infusión de una disolución en MeOH/ agua que contenía $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada oligómero C12E3, C12E4, C12E5 y C12E6. No se observaron señales significativas en el modo ion-negativo. Usando el modo ion-positivo, se observaron los picos $[M+Na]^+$ y $[M+H]^+$. En la Fig. 1 se muestra un espectro de la mezcla obtenida en MeOH/ agua con HCl 0,1 M.

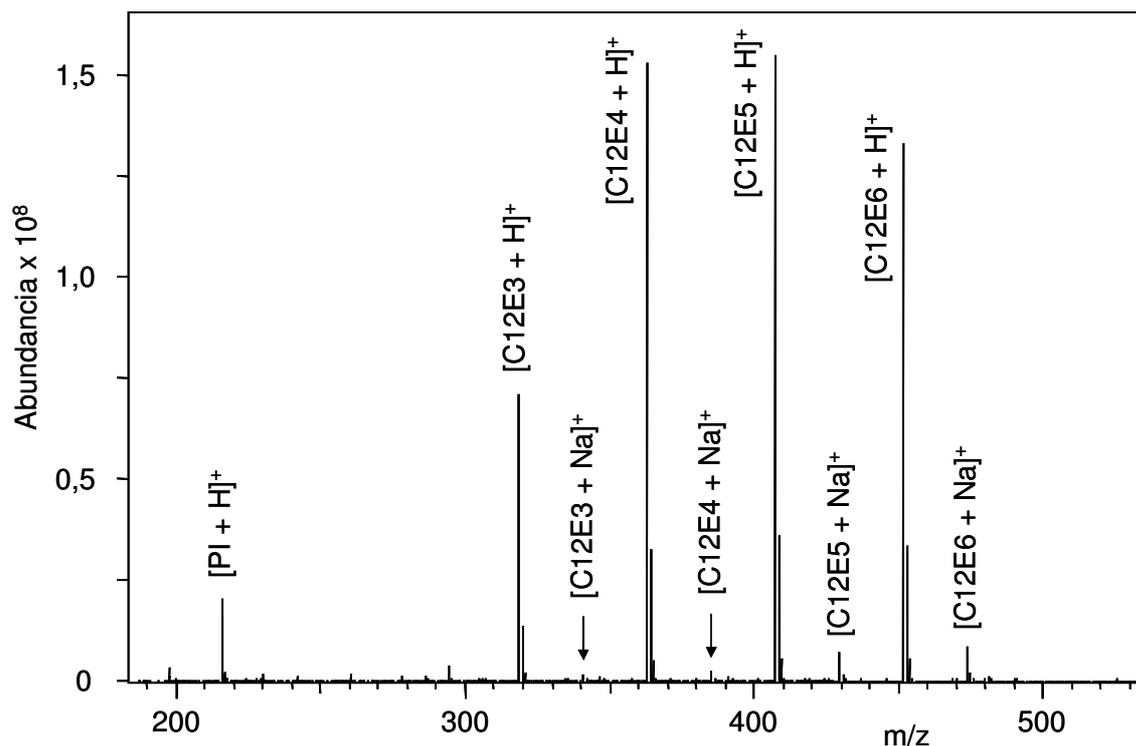


Figura 1. Espectro de masas de una mezcla de estándares ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uno) obtenido por infusión de una disolución en 9:1 MeOH/ agua conteniendo HCl 0,1 M, usando $m/z = 213$ como masa diana (PI = patrón interno).

VI.3.2. Selección de la composición del medio (disolvente y tampón) y de la fuente de ionización

Se observó que los factores de respuesta de los picos $[M+Na]^+$ y $[M+H]^+$ dependen en gran medida de la composición del disolvente y del tampón. En la Fig. 2, partes A y B, se representan los factores de respuesta de los picos $[M+H]^+$ obtenidos para las series C_nE_4 y $C_{12}E_m$ frente a n y m , respectivamente. En todos los medios probados, los factores de respuesta fueron muy bajos para $m = 1$, y aumentaron siguiendo perfiles irregulares con ambos n y m . El aumento de sensibilidad fue mayor en ACN que en MeOH, particularmente entre $m = 3$ y $m = 4$. Los experimentos desarrollados en MeOH/ agua con HAcO 0,1 M mostraron grandes aumentos y disminuciones alternantes de los factores de respuesta entre valores de m consecutivos, con valores por encima y por debajo de su tendencia media para los valores pares e impares de m (etoxímeros “pares” e “impares”), respectivamente. Usando HCl y TFA en lugar de HAcO, se

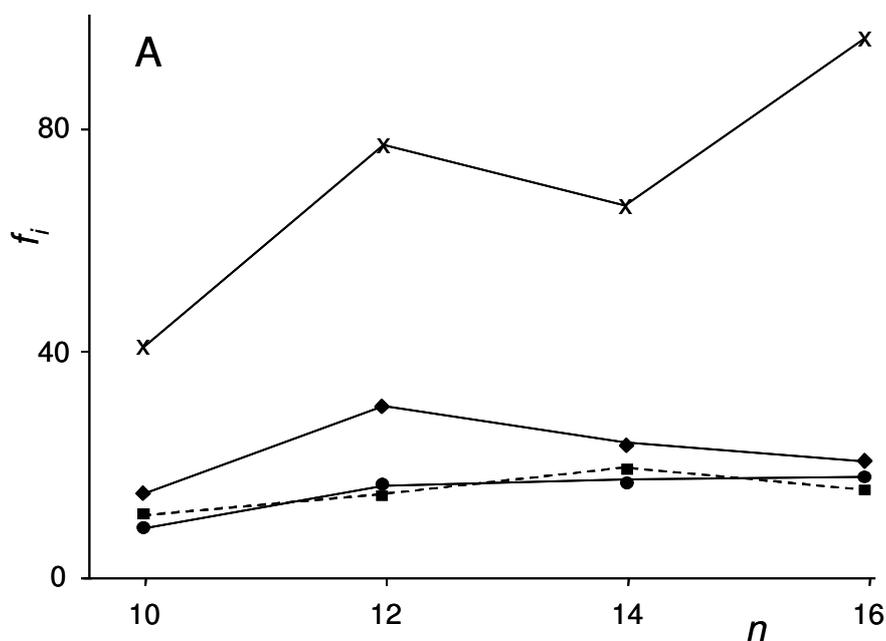
observó el mismo perfil pero con oscilaciones menos pronunciadas. La forma irregular de los trazos en la Fig. 2 indicó una dependencia compleja de la sensibilidad con más de un factor significativo. Como muestra la Fig. 2, parte C, para las series C16Em y C18Em también se observaron oscilaciones de los factores de respuesta dependientes de la paridad de m , que mostraban para los etoxímeros pares intensidades superiores a su tendencia media. El efecto de la paridad de m en los picos $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ se comenta más extensamente en el resto de este apartado y en el siguiente.

En medio ácido, los picos $[M+H]^+$ mostraron intensidades mayores que los picos $[M+Na]^+$, pero estos últimos aumentaron mucho cuando se añadieron sales de sodio a la disolución. En la Fig. 3, partes A y B, se muestran los factores de respuesta obtenidos para los picos $[M+Na]^+$ en diversos medios ácidos MeOH/ agua y en presencia de 0,02 M de una sal de sodio. Al aumentar n o m , los picos $[M+Na]^+$ mostraron variaciones de los factores de respuesta mayores que los encontrados para los picos $[M+H]^+$. Las variaciones también siguieron perfiles irregulares, y se observaron asimismo las oscilaciones entre los etoxímeros pares e impares sucesivos, de nuevo con mayores intensidades que la tendencia media para los primeros.

Como se deduce de comparar las Figs. 2 y 3, las intensidades de los picos $[M+Na]^+$ fueron menores que las de los correspondientes $[M+H]^+$ cuando $m < 4$, lo que sugiere que los oligómeros con bajo grado de etoxilación captan un protón con mayor facilidad que un ion sodio. También se deduce que se tiene una mayor sensibilidad para los etoxímeros ligeros al medir los picos $[M+H]^+$ en lugar de los $[M+Na]^+$, tanto en ausencia como en presencia de sales de sodio añadidas. Esta es una característica interesante, ya que dentro de las series de etoxímeros, los oligómeros más ligeros siempre se detectan con mucha menor intensidad que los más pesados.

En medio ácido y con sales de sodio añadidas, la intensidad de los picos $[M+Na]^+$ de los etoxímeros con $m > 3$, fue mucho mayor que la de los picos $[M+H]^+$; sin embargo, la medida de la

intensidad de los picos $[M+Na]^+$ planteó otros problemas: (i) los persistentes efectos de memoria, así por ejemplo, se observó que persistían intensidades de los picos $[M+Na]^+$ dos órdenes de magnitud más altas que las esperadas mucho tiempo después de haber eliminado las sales de sodio añadidas a las disoluciones inyectadas; y (ii) un gran aumento del ruido de fondo producido por la necesaria adición de sales de sodio, lo que empeora mucho la relación señal-ruido tanto de los picos $[M+H]^+$ como de los $[M+Na]^+$. Debido al aumento del ruido de fondo, la relación señal-ruido fue siempre mejor para los picos $[M+H]^+$ que para los $[M+Na]^+$ en el medio ácido, tanto con HCl como con TFA 0,1 M. En comparación con los picos $[M+Na]^+$, los picos $[M+H]^+$ también mostraron una variación más suave de los factores de respuesta, con menores diferencias entre los etoxímeros sucesivos, lo que facilita la construcción de modelos. Por todas estas razones, sólo los picos $[M+H]^+$ obtenidos en medio ácido, en ausencia de sales de sodio añadidas, fueron usados en los estudios siguientes. Sin embargo, primero se examinó el efecto de la adición de sales de sodio sobre las intensidades de los picos $[M+H]^+$.



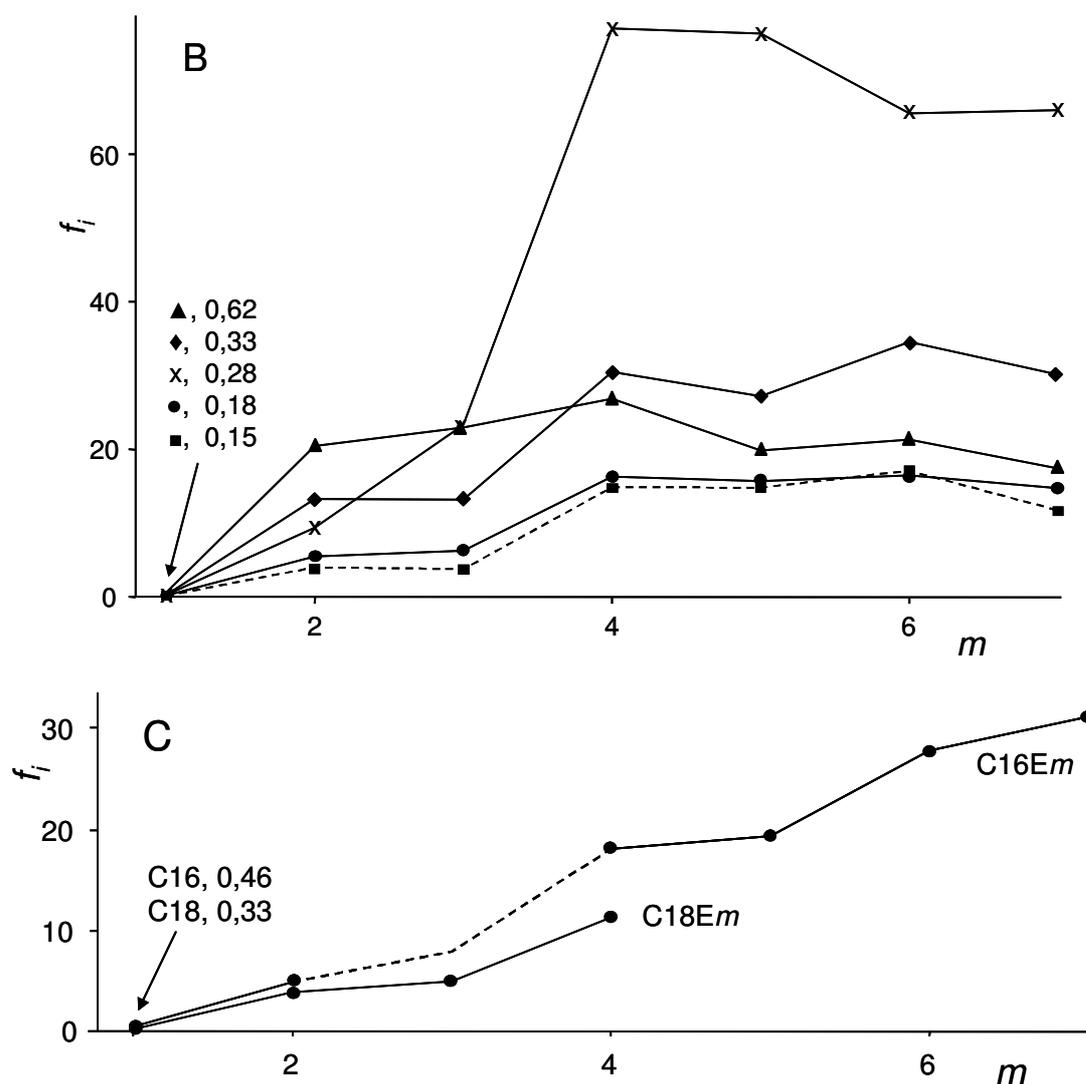


Figura 2. Valores de f_i de los picos $[M+H]^+$ de acuerdo con la Ec. (1) frente a n (A, serie C_nE4) y m (B, serie C_{12Em}) (C, series C_{16Em} y C_{18Em}), obtenidos por infusión de un único oligómero cada vez (100 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los oligómeros con $m \leq 3$ y $m > 3$, respectivamente). Los medios usados fueron 9:1 ACN/ agua con HCl $0,1 \text{ M}$ (x) y 9:1 MeOH/ agua con $0,1 \text{ M}$ de HCl (●), HAcO (◆) o TFA (▲), o $0,1 \text{ M}$ de HCl con $0,02 \text{ M}$ de NaCl (■, línea de trazos).

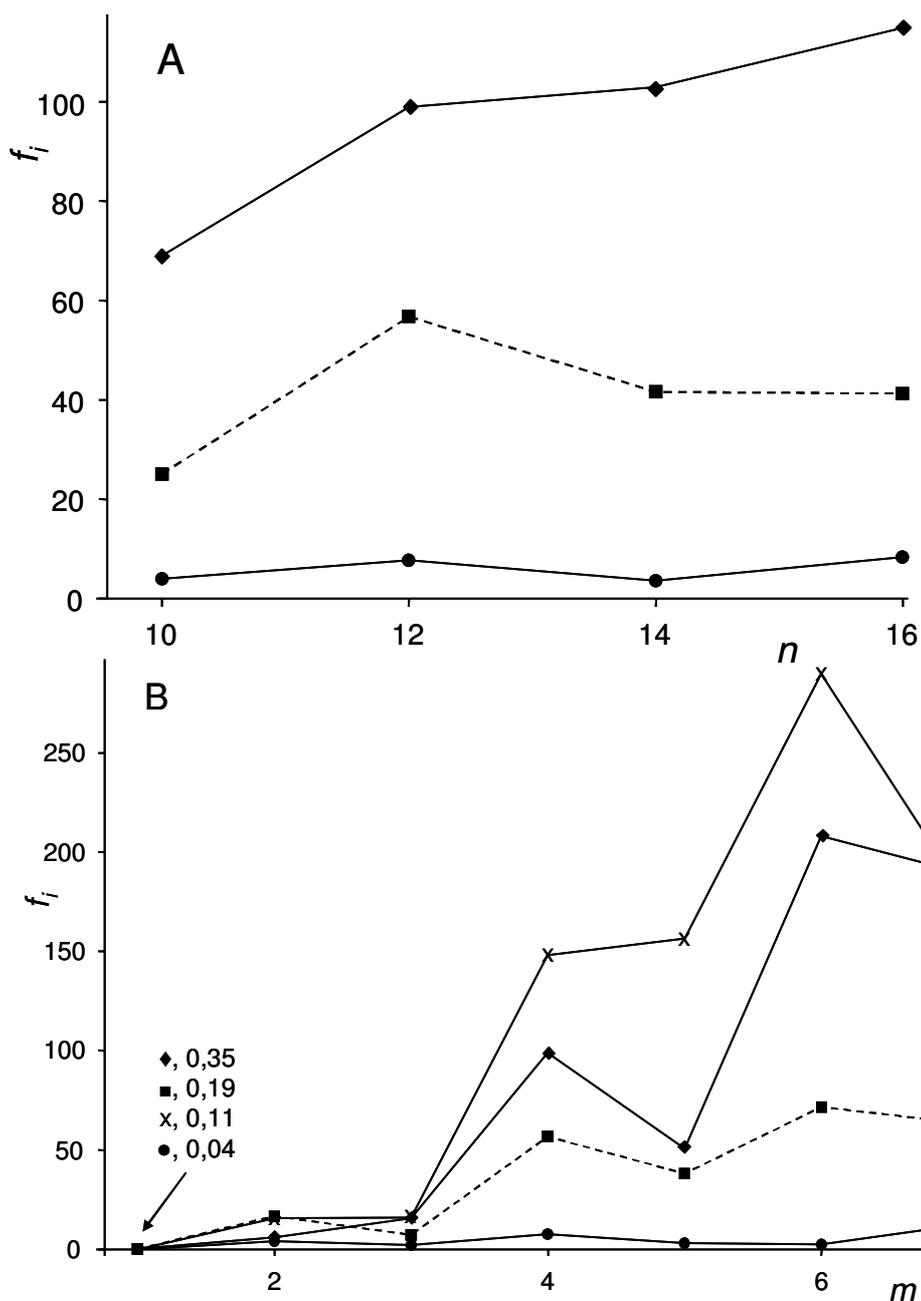


Figura 3. Valores de f_i para los picos $[M+Na]^+$ de acuerdo con la Ec. (1) frente a n (A, serie C_nE_4) y m (B, serie $C_{12}E_m$). Los solutos se inyectaron en 9:1 ACN/ agua con 0,1 M de HCl (x), y en 9:1 MeOH/ agua con 0,1 M de HCl (●) o HAcO (♦), o con 0,1 M de HCl con 0,02 M de NaCl (■, línea de trazos). Otras condiciones como en la Fig. 2.

La influencia del ion Na^+ en las intensidades de los picos $[\text{M}+\text{H}]^+$ fue baja en disoluciones fuertemente ácidas, pero importante a valores más altos de pH. Como se muestra en la Fig. 2, partes A y B, para los picos $[\text{M}+\text{H}]^+$ obtenidos en un medio 9:1 MeOH/ agua con HCl 0,1 M, las intensidades decrecieron débilmente al añadir NaCl 0,02 M (Fig. 2, líneas de puntos). En contraposición, en un medio MeOH/ agua con HAcO 0,1 M, los picos $[\text{M}+\text{H}]^+$ resultaron fuertemente inhibidos al añadir 0,002 M de NaAcO. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 4, al reducir el pH con concentraciones crecientes de HCl, los picos $[\text{M}+\text{H}]^+$ obtenidos en un medio con HAcO 0,1 M y NaAcO 0,02 M aumentaron a valores similares a los que se obtienen en ausencia de sales de sodio añadidas. La intensidad de los picos $[\text{M}+\text{H}]^+$ también aumentó por adición de TFA, pero el efecto fue menor que usando HCl.

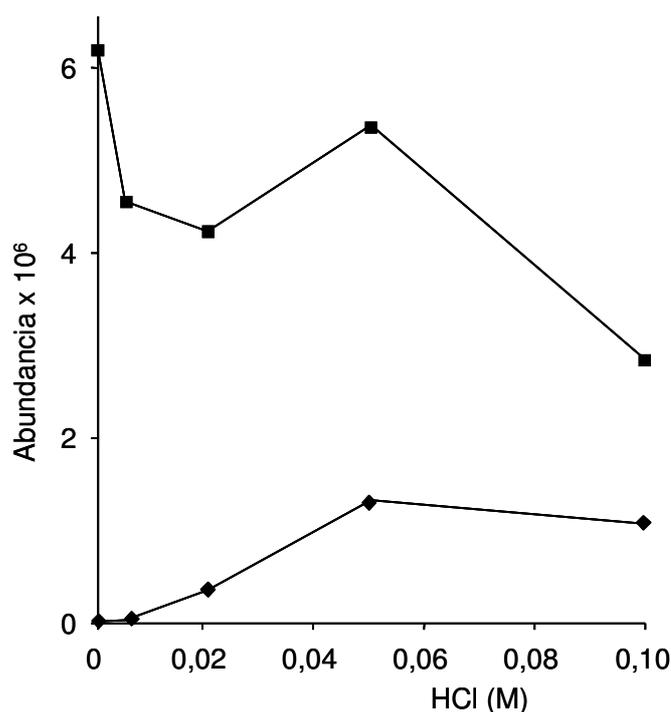


Figura 4. Abundancias de $[\text{M}+\text{H}]^+$ (◆) y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (■) en un medio 9:1 MeOH/ agua con 0,1 M de HAcO, 0,02 M de NaAcO y concentraciones crecientes de HCl; las abundancias de los picos $[\text{M}+\text{H}]^+$ están multiplicadas por 20. Se inyectó una disolución que contenía $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C12E4.

Por lo tanto, es recomendable utilizar un pH bajo en ausencia de iones sodio añadidos para monitorizar los picos $[M+H]^+$. El uso de disoluciones de HCl 0,05-0,1 M no es un problema en infusión en MS, pero no es compatible con la mayoría de columnas de HPLC, y limita la composición de la fase móvil en HPLC y la del electrolito de fondo en separaciones electroforéticas. Sin embargo, llevar a cabo una separación previa cromatográfica o electroforética a cualquier pH, puede hacerse compatible con una detección por MS en medio ácido, mediante la mezcla post-columna del eluyente con una disolución fuertemente ácida. La mezcla post-columna se puede conseguir de dos formas, usando un nebulizador tricocéntrico alimentado con una envoltura líquida ácida proporcionada por una bomba isocrática de HPLC (este nebulizador es usual para acoplar electroforesis capilar a MS), o mediante una unión capilar en T insertada entre la columna de HPLC y el nebulizador, y alimentada con una corriente ácida proporcionada por una bomba de jeringa. Por lo tanto, primero se usó como envoltura líquida una disolución metanólica de HCl 0,2 M, y se inyectó una disolución de C12E4 en MeOH/ agua con HAcO 0,1 M y NaAcO 0,02 M a través del canal central del nebulizador triconcéntrico. Como se muestra en la Fig. 5, con un caudal cero en la envoltura líquida, la intensidad del pico $[M+H]^+$ fue despreciable, pero aumentó con el incremento del caudal de la envoltura líquida. Con caudales mayores que $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ se obtuvieron intensidades más altas que las observadas en la Fig. 4. Teniendo en cuenta la división de caudal 1:100, esto correspondió a $5 \mu\text{L min}^{-1}$, esto es, a igualar el caudal de la envoltura líquida con el de la muestra.

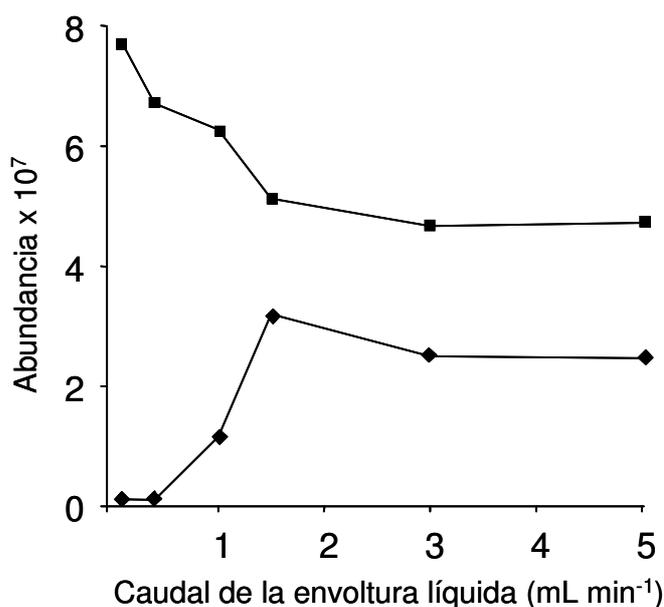


Figura 5. Abundancias de $[M+H]^+$ (◆) y $[M+Na]^+$ (■) obtenidas por infusión de una disolución de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C12E4 en un medio 9:1 MeOH/agua que contenía 0,1 M de HAcO más 0,02 M de NaAcO; se usó un nebulizador triconcéntrico alimentado con una envoltura líquida constituida por una disolución 0,2 M de HCl en MeOH; las abundancias de los picos $[M+H]^+$ están multiplicadas por 5.

Finalmente, también se observaron los picos $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ usando la fuente APCI y disoluciones de HCl 0,1 M en MeOH/ agua, en ausencia y presencia de NaCl 0,02 M. Con APCI, los iones $[M+Na]^+$ y $[M+H]^+$ mostraron abundancias relativas similares a las observadas con ESI, y como ocurrió con la fuente ESI, los alcoholes no etoxilados dieron señales despreciables, y la sensibilidad de los etoxímeros con bajos valores de m fue mucho menor que la de los etoxímeros más pesados. En comparación también con la fuente ESI, la fuente APCI dio un menor ruido de fondo, pero también menores intensidades, por lo que la relación señal-ruido alcanzó valores similares. Un inconveniente de la fuente APCI fue la fragmentación de la cadena de EO. Todos los estándares probados mostraron picos con una diferencia de $m/z -44$ con respecto a los picos $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ de los oligómeros inyectados, lo que se atribuyó a la pérdida neutra de una unidad de EO. La intensidad de los picos producidos por fragmentación alcanzó más del 10 % del respectivo pico $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$. Una fragmentación de más del 10 % puede originar una

distorsión significativa en la evaluación de las distribuciones de oligómeros. La fragmentación de los etoxímeros usando APCI también ha sido observada por otros autores [47,48]. La fragmentación con una pérdida neutra de $m/z -44$ se observó también con la fuente ESI, pero con una intensidad menor del 1 % respecto de los correspondientes picos principales en todos los experimentos desarrollados en MeOH/ agua.

VI.3.3. Una explicación del efecto de la paridad de m sobre los factores de respuesta

A partir de la geometría espacial de las conformaciones de las cadenas de polioxietileno se puede deducir una posible explicación de la influencia de la paridad de m sobre los factores de respuesta. Como se ilustra en la Fig. 6, son posibles dos tipos de conformación en cada unidad sencilla -O-CH₂-CH₂-O- [54]: (i) la anti-*gauche*-anti (a-g-a), que es *gauche* alrededor del enlace C-C y anti alrededor de los enlaces C-O, y (ii) la anti-anti-anti (a-a-a), que es anti alrededor de todos los enlaces. Las conformaciones a-g-a tienen momentos dipolares elevados en los grupos C-O-C y C-O-H, y son las responsables de la solubilidad de los FAEs y polímeros y copolímeros de etilenglicol en agua y otros disolventes polares. Por el contrario, debido a la compensación entre dipolos adyacentes apuntando en direcciones opuestas, las conformaciones a-a-a tienen momentos dipolares mucho menores. Sin embargo, los etoxímeros pares tienen un número impar de grupos C-O-C y C-O-H lo cual da lugar a uno de los dipolos sin posibilidad de ser compensado por otro. La mayor polaridad de las conformaciones a-a-a de los etoxímeros pares con respecto a los impares podría explicar su mayor capacidad para unirse a un protón o a un ion sodio. La presencia de un dipolo sin compensar es probablemente despreciable a valores altos de m , pero como se observa en las Figs. 2 y 3, es significativo a valores bajos. Este efecto podría estar más favorecido en la fuente de iones, ya que el peso estadístico de las conformaciones a-a-a aumenta con la temperatura [54].

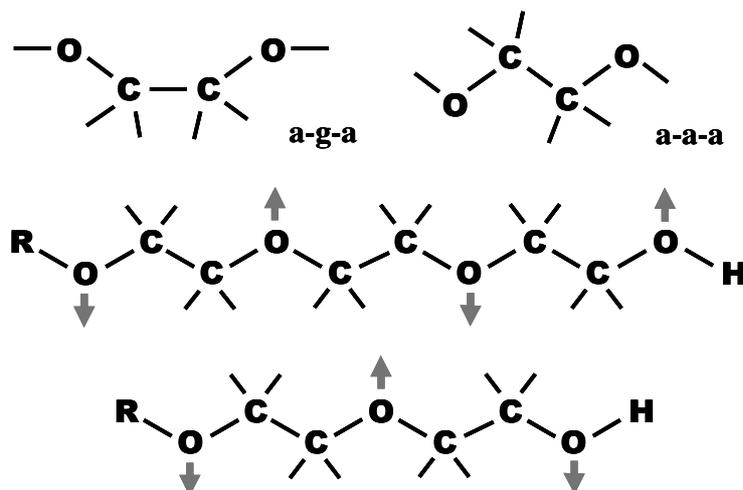


Figura 6. Conformaciones anti-*gauche*-anti (a-g-a) y anti-anti-anti (a-a-a) de una unidad -O-CH₂-CH₂-O-, de acuerdo con la ref. [54]. En todas las conformaciones a-a-a, los dipolos de una cadena con número impar de unidades de EO se cancelan unos a otros, pero con un número par de unidades de EO uno de los dipolos queda sin cancelar.

VI.3.4. Construcción de los modelos de los factores de respuesta y aplicación a muestras industriales

Para construir un modelo de los factores de respuesta se usaron los picos $[M+H]^+$ de los oligómeros, obtenidos con una fuente ESI por infusión directa de disoluciones en MeOH/ agua conteniendo HCl 0,1 M. Todos los oligómeros se inyectaron por separado. Los factores de respuesta deben establecerse y aplicarse tan sólo dentro del rango dinámico lineal de las curvas de calibrado de los analitos, que en MS son fuertemente dependientes del tipo y modelo de instrumento utilizado. Para comprobar si las intensidades de los picos estaban dentro de los respectivos rangos lineales de los oligómeros, los estándares de la serie C12Em se inyectaron a concentraciones crecientes hasta 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se obtuvieron curvas no lineales, sin embargo, las concentraciones seleccionadas 100 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para los etoxímeros con $m \leq 3$ y $m > 3$, respectivamente, estaban dentro de la región aproximadamente lineal de las curvas de calibrado.

Se construyó un modelo empírico de la forma $\log f_i = f(n, m)$, capaz de predecir los factores de respuesta de todos los oligómeros dentro de los rangos $10 \leq n \leq 18$ y $1 \leq m \leq 7$. Con

este objeto, se utilizó el algoritmo de ajuste lineal del paquete estadístico SPSS. Se introdujeron los datos experimentales de $\log f_i$ como variable dependiente, y las variables n , m , m^2 y nm como independientes. El término combinado nm no resultó significativo. Las otras variables mostraron buenas correlaciones lineales con $\log f_i$. Por lo tanto, el modelo de regresión de los factores de respuesta fue:

$$\log f_i = b_0 + b_1 m + b_2 m^2 + a_0 n \quad (2)$$

donde los coeficientes de regresión fueron: $b_0 = -1,73$, $b_1 = 0,90$, $b_2 = -0,080$ y $a_0 = 0,045$. El coeficiente de determinación múltiple fue $R^2 = 0,92$. La pendiente de n corresponde a un aumento de los factores de respuesta de aproximadamente un 12 % por átomo de carbono. De acuerdo con la Ec. (1), los valores de f_i usados para obtener los coeficientes de regresión se calcularon utilizando el patrón interno como referencia; sin embargo, puede ser más conveniente usar como referencia un oligómero tal como el C12E6 en lugar del patrón interno. Tomando $m = 6$ y $n = 12$ en la Ec. (2), resulta $\log f_i = 1,33$. Por tanto, la sensibilidad relativa puede ser utilizada de un modo más convenientemente como:

$$\log f_i' = \log f_i + 1,33 \quad (3)$$

que es equivalente a tomar $b_0 = -1,73 + 1,33 = -0,40$ como término independiente en la Ec. (2). En la Ec. (3), f_i' es la sensibilidad relativa o factor de respuesta del oligómero de interés con respecto al oligómero de referencia, C12E6. En la Tabla 1, se muestra la inversa de los factores de respuesta, $1/f_i'$, para los oligómeros con $1 \leq m < 7$ y para valores pares de n . Multiplicando la intensidad del pico de un oligómero por su correspondiente valor de $1/f_i'$, debe quedar corregida con respecto al estándar C12E6.

Tabla 1. Factores de corrección, $1/f_i'$, de acuerdo con la Ec. (2) y usando C12E6 como referencia

n	m						
	1	2	3	4	5	6	7
10	61	13	4,2	1,9	1,3	1,2	1,7
12	49	11	3,4	1,6	1,0	1,0	1,4
14	40	8,8	2,8	1,3	0,9	0,8	1,1
16	33	7,2	2,3	1,0	0,7	0,7	0,9
18	27	5,8	1,9	0,9	0,6	0,5	0,7

Estándares con altos valores de m no se encuentran fácilmente por lo que no se usaron en este trabajo; sin embargo, como primera aproximación se puede suponer que los factores de respuesta varían poco dentro de las series cuando $m > 6$. Aceptando esta aproximación, cuando $m > 6$, no se aplicarían factores de respuesta para m , y se corregiría sólo el efecto de n . A la vista de los experimentos de HPLC-ELSD llevados a cabo para etoxímeros de las series C12Em y C14Em, que se exponen más adelante (sección VI.3.7), esta aproximación resulta razonable. Sin embargo, como se deduce de la Fig. 2 C, una variación pequeña de los factores de respuesta con m , no se ha alcanzado todavía para la serie de etoxímeros C16Em cuando $m = 6$. Por lo tanto cuando $n > 14$, es probable que se requieran valores de m mayores que 6 para obtener factores de respuesta aproximadamente constantes. Otros datos publicados que también muestran una variación despreciable de los factores de respuesta para etoxímeros con $m > 6$, corresponden igualmente a series con valores bajos de n , concretamente fueron obtenidos con oligómeros de las series C11Em [18] y C12Em [3]. En la Fig. 7 se muestran las distribuciones de la serie C12Em del FINDET 1214/16 sin corregir (línea de puntos) y corregida (línea de trazos). Se obtuvieron

perfiles similares a éstos utilizando intensidades sin corregir y corregidas para las series C10Em del FINDET 10/18 y C14Em del FINDET 1214/16.

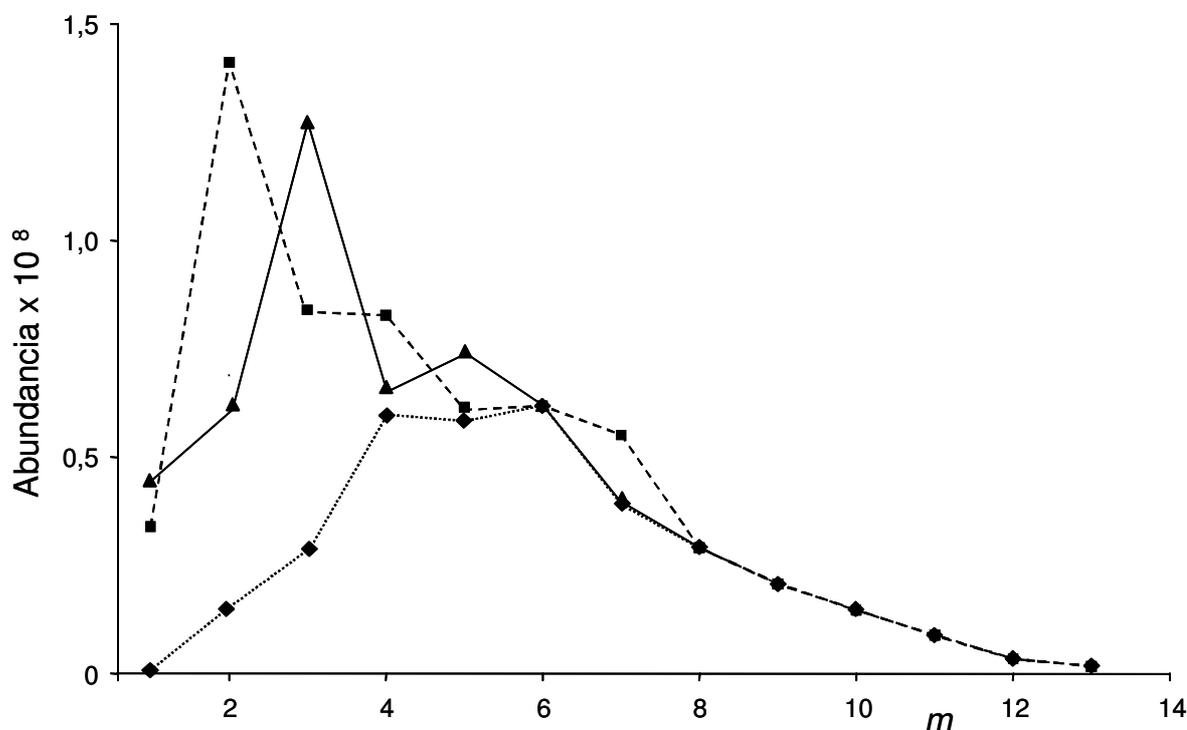


Figura 7. Distribución de oligómeros de la serie C12Em del FINDET 1214/16. Distribuciones sin corregir (línea de puntos) y corregidas después de multiplicar por los valores $1/f_i'$ de la Tabla 1 (modelo único, línea a trazos) y por los de la Tabla 2 (dos modelos, línea continua).

VI.3.5. Introducción del efecto de la paridad de m en la construcción del modelo

Como se deduce de la Fig. 7, las oscilaciones de las intensidades de los picos debidas a la paridad de m resultaron exaltadas, en lugar de corregidas, al multiplicar los datos por los valores $1/f_i'$ de la Tabla 1. Por lo tanto, si se tiene en cuenta el efecto de la paridad de m en la construcción del modelo es de esperar que se consiga una mejor descripción de las distribuciones de etoxímeros. Con este propósito, se procedió a construir dos modelos, uno para los etoxímeros pares y otro para los impares. Este enfoque se consideró más simple y más preciso que usar un único modelo del tipo de la Ec. (2) pero adicionando un término sinusoidal. Se inició el algoritmo

de ajuste lineal de SPSS con las mismas variables usadas para construir la Ec. (2). Las ecuaciones de regresión para los etoxímeros pares e impares fueron, respectivamente:

$$\log f_s = -0,88 + 0,73 m - 0,072 m^2 + 0,027 n \quad (4)$$

$$\log f_s = -1,60 + 0,77 m - 0,060 m^2 + 0,035 n \quad (5)$$

Usando estas dos ecuaciones a varios valores de n y m se representaron las rectas y curvas de la Fig. 8, partes A y B, respectivamente. Las pendientes de n en las Ecs. (4) y (5) correspondieron a aumentos de aproximadamente un 7 % por átomo de carbono para todos los etoxímeros. Tomando $m = 6$ y $n = 12$ en la Ec. (4), para obtener así los factores de respuesta con respecto a C12E6 como oligómero de referencia común, se tiene:

$$\log f_i' = \log f_i + 1,26 \quad (6)$$

que es equivalente a usar $b_0 = +0,38$ y $-0,34$ como términos independientes en las Ecs. (4) y (5), respectivamente. En la Tabla 2 se muestran los inversos de los factores de respuesta, $1/f_i'$, referidos a C12E6. Los perfiles obtenidos usando los valores $1/f_i'$ de las Tablas 1 y 2 para multiplicar las intensidades de los picos de una distribución de etoxímeros (la serie C12Em del FINDET 1214/16) se comparan en la Fig. 7 (líneas de trazos y continua, respectivamente). Se obtuvieron gráficos similares para las series C14Em del FINDET 1214/16 y C10Em del FINDET 10/18. Se calculó el número medio de EOs usando la siguiente ecuación:

$$\bar{m} = \frac{\sum_i m I_i}{\sum_i I_i} \quad (7)$$

donde I_i es la abundancia iónica y m es el número de EOs del oligómero, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 3, el número medio de EOs calculado usando los perfiles corregidos fue mucho más próximo al respectivo valor nominal que el calculado usando los perfiles sin corregir. Sin embargo, después de la corrección, las series de etoxímeros del FINDET 1214/16 todavía dieron lugar a números medios de EOs algo mayores que los valores nominales, lo cual se podría

atribuir al efecto de supresión [3,5,51]. Como se discute en la siguiente sección, el factor de respuesta de los etoxímeros con $m = 1$ y 2 se redujo por la presencia de etoxímeros más pesados en las muestras inyectadas por infusión directa. Puesto que las Tablas 1 y 2 se obtuvieron con estándares de oligómeros individuales en ausencia de otros oligómeros, el efecto de supresión se puede corregir usando estos valores tabulados. Con respecto al FINDET 10/18, la desviación positiva debida a la corrección insuficiente de la intensidad de los etoxímeros más ligeros estuvo probablemente enmascarada por sus menores concentraciones, y por las mayores concentraciones de los etoxímeros más pesados.

VI.3.6. Efectos de supresión en infusión en MS y HPLC-MS

En trabajos anteriores se ha informado acerca de los efectos de supresión de las intensidades de los picos $[M+Na]^+$ de los etoxímeros con $m = 1$ y 2 , debido a interacciones mutuas; estos efectos se han atribuido a la competencia por los iones sodio disponibles [3,5,51]. En este trabajo, se estudió el efecto de las interacciones mutuas sobre la intensidad de los picos $[M+H]^+$ de los oligómeros con valores bajos de m , inyectándolos en presencia de otros oligómeros al mismo nivel de concentración ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uno en MeOH/ agua conteniendo HCl 0,1 M). Como se muestra en la Tabla 4, los efectos de supresión fueron altos para etoxímeros con $m = 1$ y 2 cuando las especies presentes tenían valores mayores de n o m . Debido al enorme número de casos posibles y a las muchas variables involucradas, no se realizó intento alguno de construcción de modelos de los efectos de supresión mutua. Los efectos de supresión impiden el uso de procedimientos de infusión directa para cuantificar oligómeros de FAEs con $m = 1$ y 2 ; sin embargo, como se deduce de la Fig. 5, y como se muestra más adelante mediante HPLC-MS, el uso de factores de respuesta como los dados en la Tabla 2, puede dar lugar a predicciones precisas si se acopla la detección por MS a una técnica de separación previa.

Para investigar este punto, y como se describe en el apartado VI.2.1, se usó una unión en T insertada entre la columna de HPLC y el nebulizador biconcéntrico del MS, para mezclar el eluyente con una disolución de HCl 0,2 M en MeOH. Como fase móvil se usó una mezcla de ACN/ agua 70:30. Como se indica en la Tabla 4, se inyectaron mezclas que contenían un oligómero con $m = 1$ o 2 , otro con $m = 6$ o 7 , y el patrón interno ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada uno). En todos los casos, se obtuvieron picos bien resueltos sobre el cromatograma de ion total. Los cromatogramas se obtuvieron cambiando automáticamente dentro de cada región de tiempo la masa diana al valor de m/z de los sucesivos picos $[\text{M}+\text{H}]^+$. Se usaron las áreas de pico de los correspondientes cromatogramas de ion extraído para obtener los factores de respuesta de los oligómeros más ligeros, pero en las condiciones de flujo cromatográfico, y en ausencia de otros oligómeros (que aparecían a diferentes tiempos de retención).

Después, se quitó la columna, y la salida del inyector automático se conectó directamente con una unión en T. Los “cromatogramas” de ion total mostraron ahora un único pico a un corto tiempo de “retención”, con solapamiento de los oligómeros sobre el eje de tiempos. Se obtuvieron los factores de respuesta de los oligómeros a partir de los correspondientes “cromatogramas” de ion extraído. Como se muestra en la Tabla 4, los valores de $1/f_i'$ obtenidos sin columna fueron mucho mayores que los obtenidos con separación cromatográfica de los oligómeros. La disminución de sensibilidad de los oligómeros en ausencia de separación cromatográfica se debe atribuir principalmente al efecto de supresión. Sin embargo, también hemos observado grandes y complejas variaciones de los factores de respuesta al modificar la composición de la fase móvil (usando mezclas ACN-agua y MeOH-agua), o simplemente al variar el volumen de inyección y el caudal. Por lo tanto, la inyección de estándares en las mismas condiciones de trabajo que las usadas para inyectar muestras es absolutamente necesaria para calibrar FAEs no derivatizados, y para conseguir factores de respuesta reproducibles.

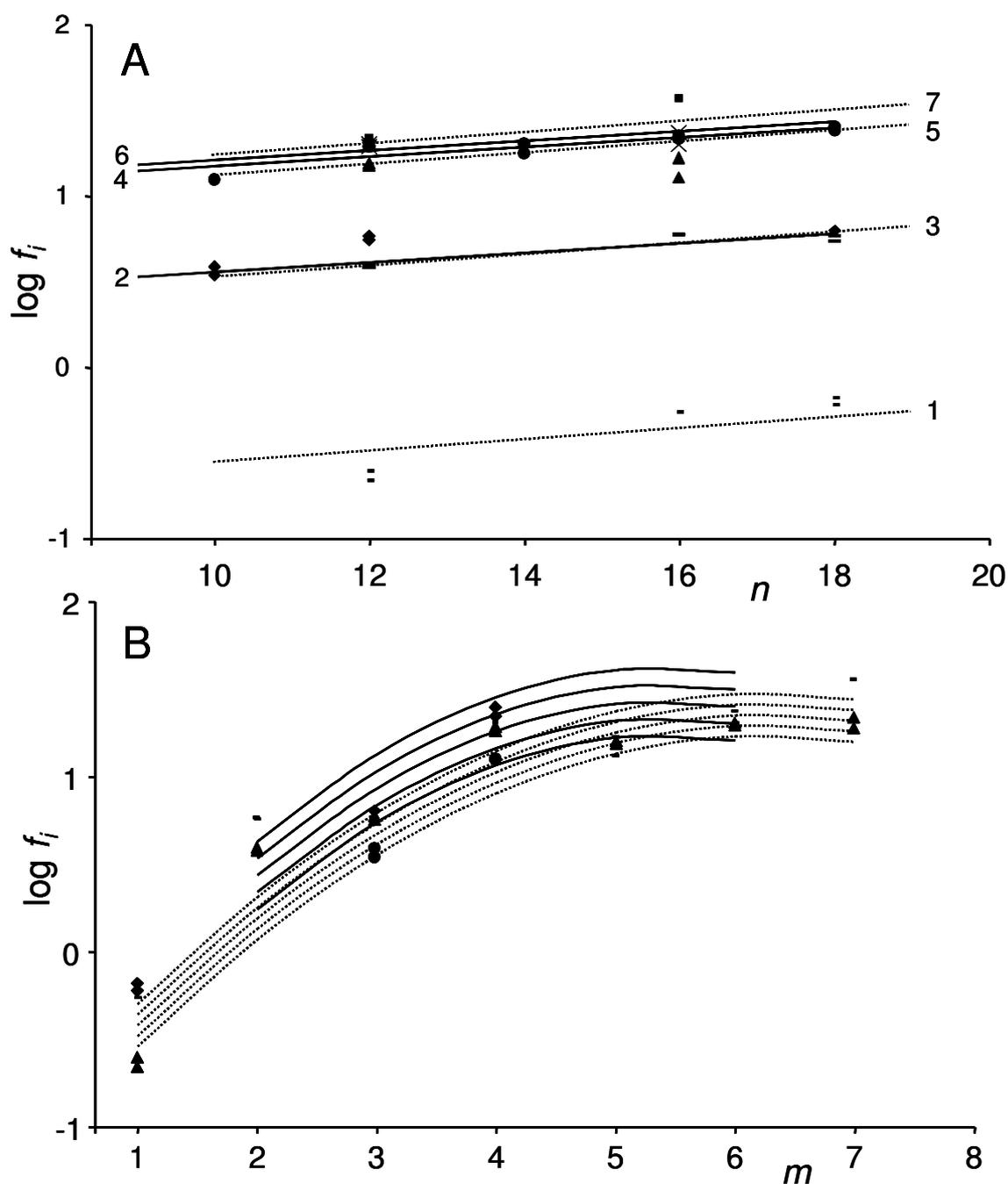


Figura 8. Valores de $\log f_i$ para los picos $[M+H]^+$ de acuerdo con la Ec. (1) frente a n (A) y m (B). Las líneas rectas y las curvas son representaciones de los factores de respuesta de acuerdo a las Ecs. (4) (líneas continuas) y (5) (líneas de puntos) a los valores indicados de m (A) y n (B). En la parte A los valores de m se indican junto a las líneas. Símbolos para la parte A: $m = 1$ (-), 2 (-), 3 (◆), 4 (•), 5 (▲), 6 (×), 7 (■); para cada una de las dos series de curvas en la parte B, y de abajo a arriba: $n = 10$ (•), 12 (▲), 14 (■), 16 (-), 18 (◆). Otros detalles como en la Fig. 2.

Tabla 2. Factores de corrección, $1/f_i'$, de acuerdo con las Ecs. (4) y (5) para los oligómeros con valores pares e impares de m , respectivamente y usando C12E6 como referencia

n	m						
	1	2	3	4	5	6	7
10	70	4,8	6,0	1,2	1,5	1,1	1,2
12	60	4,3	5,1	1,1	1,3	1,0	1,0
14	51	3,8	4,3	0,9	1,1	0,9	0,9
16	43	3,3	3,7	0,8	0,9	0,8	0,7
18	37	2,9	3,1	0,7	0,8	0,7	0,6

Tabla 3. Números medios de EO calculados a partir de las intensidades de los picos $[M+H]^+$ de muestras inyectadas por infusión directa, sin y con corrección usando los valores $1/f_i'$ de las Tablas 1 y 2

Muestra	Serie	Nominal	Sin corrección	Corr. Tabla 1	Corr. Tabla 2
FINDET 10/18	C10Em	6	6,95	5,92	5,96
FINDET 1214/16	C12Em	4	5,94	4,46	4,60
FINDET 1214/16	C14Em	4	5,75	4,14	4,31

Tabla 4. Factores de corrección, $1/f_i'$, en presencia y ausencia de otros oligómeros al mismo nivel de concentración

Oligómero	Otros oligómeros presentes	$1/f_i'$, presencia/ ausencia	Cociente
C12E1	C18E1	202/ 61	3,0
C12E1	C12E6	116/ 61	1,9
C12E1 ^a	C12E6	226/ 24	9,6
C12E2 ^a	C12E6	6,2/ 2,7	2,3
C12E2	C12E7	11/ 4,5	2,5
C12E2 ^a	C12E7	3,3/1,4	2,3
C16E2	C16E4, C16E5, C16E6	9,6/ 3,5	2,7
C18E2	C10E4, C14E4, C18E4	9,0/ 3,1	2,9
C10E3	C10E4, C14E4, C18E4	5,3/ 5,2	1,02

^a Un volumen de 20 μ L de muestra inyectado con el cromatógrafo; las otras muestras se introdujeron mediante infusión directa durante 2 min

VI.3.7. Comparación con datos de HPLC-ELSD

Después de multiplicarlos por los valores $1/f_i'$ de las Tablas 1 y 2, los perfiles de infusión directa de las muestras de FINDET se compararon con los perfiles obtenidos mediante HPLC-ELSD. Usando elución isocrática con una fase móvil constituida por ACN/ agua 70:30, conteniendo 1 % de HAcO, se consiguió una resolución casi hasta la línea base de todos los oligómeros. Eluyeron primero las series de etoxímeros con valores más bajos de n , y dentro de cada serie los etoxímeros más hidrofílicos (los que tienen mayores valores de m). En el inserto de la Fig. 9 se muestra parte de un cromatograma de FINDET 1214/16, con la separación de los etoxímeros de la serie C12E m . Para identificar los picos, las muestras se aditivaron con C12E6 y C12E4. Cuando se usaron 100 °C en la cámara de nebulización del ELSD los picos de los

etoxímeros con $m < 4$ no se llegaron a observar. La intensidad de los picos de los etoxímeros con bajos valores de m aumentó a temperaturas menores. Usando 40 °C se pudieron observar los picos de los oligómeros C12E3 y C12E2, si bien probablemente con una intensidad baja. A 30 °C no se pudo observar pico alguno, debido a la incompleta volatilización de la fase móvil.

Para los etoxímeros más ligeros, la volatilización en el ELSD y el bajo rendimiento de formación de iones en MS impiden la comparación de los perfiles de ELSD y MS. Sin embargo, para los etoxímeros más pesados, las sensibilidades relativas de los oligómeros sucesivos se pueden considerar como aproximadamente proporcionales a sus concentraciones en masa absoluta en ELSD, y a sus concentraciones molares y al rendimiento en la formación de iones, que no se conoce, en MS. En la Fig. 9, se representaron las alturas de los picos de HPLC-ELSD de la serie C12E m del FINDET 1214/16, divididas por las masas moleculares de los respectivos etoxímeros, y se compararon con las intensidades corregidas de los picos de MS (multiplicadas por los valores de $1/f_i'$). Los dos perfiles coinciden bastante bien, indicando por lo tanto que en ESI-MS la sensibilidad de los picos de la serie C12E m varía ya poco cuando $m > 6$. Sería necesario trabajo adicional para describir de forma adecuada las variaciones de los factores de respuesta a valores altos de m para series de etoxímeros que tienen diferentes valores de n ; sin embargo, hoy por hoy no se dispone con facilidad de estándares puros de etoxímeros con $m > 8$.

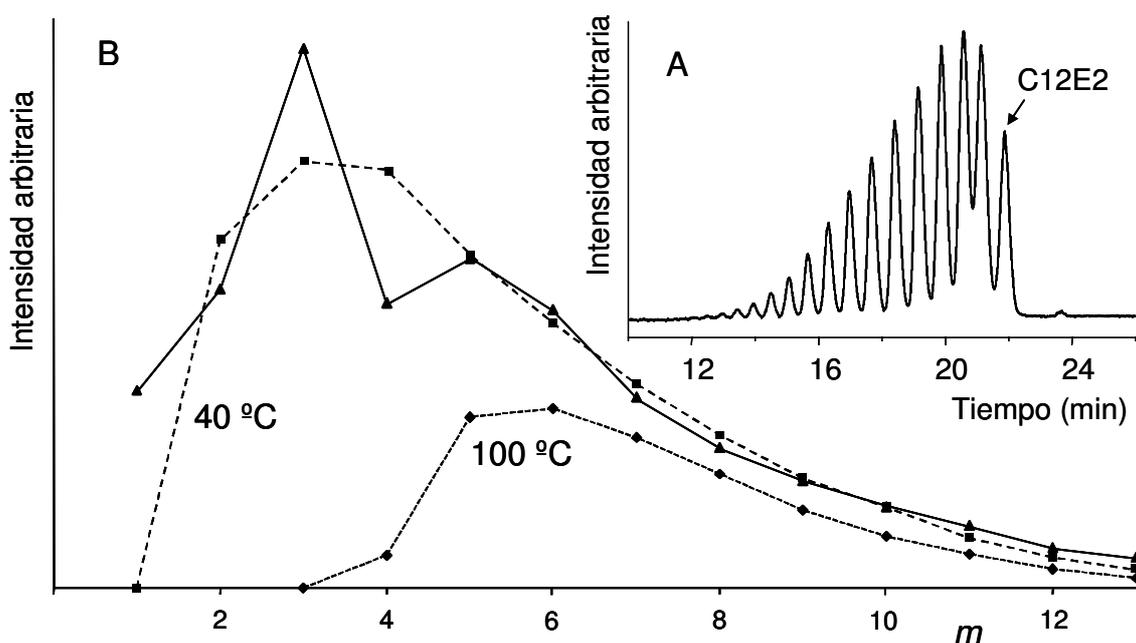


Figura 9. Cromatograma del FINDET 1214/16 detectado usando 40 °C en la cámara de nebulización de ELSD, mostrando los sucesivos etoxímeros de la serie C12Em (inserto A). En la parte B, alturas de pico divididas por las masas molares de los respectivos etoxímeros, representadas frente a m (línea de puntos, cámara de nebulización a 40 y 100 °C), y comparadas con los perfiles corregidos de ESI-MS de acuerdo con la Tabla 2 (tomado de la Fig. 7, línea continua).

VI.4. Conclusiones

En ESI-MS, los factores de respuesta de los picos $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ de los FAEs varían en gran medida con la composición del medio, mostrando también una dependencia compleja con el número de átomos de carbono en la cadena alquílica, n , y con el número de EOs, m . Uno de los factores subyacentes produce una disminución y aumento alternados de los factores de respuesta para los sucesivos oligómeros con valores pares e impares de m , respectivamente. Este fenómeno ha sido tentativamente explicado por la presencia de un dipolo no compensado C-O-C o C-O-H en las conformaciones anti-anti-anti de los etoxímeros pares.

A causa de las fuertes variaciones de los factores de respuesta con n y m se requiere un gran número de estándares de calibrado. Sin embargo, es posible reducir el esfuerzo experimental

usando modelos construidos con un conjunto de estándares tan reducido y representativo como sea posible. Para este fin, las mejores condiciones de trabajo fueron: medio ácido fuerte (conseguido con HCl), la fuente ESI en lugar de la fuente APCI, y la medida de los picos $[M+H]^+$ en lugar de los $[M+Na]^+$.

La sensibilidad de los etoxímeros con $m = 1$ y $m = 2$ disminuyó mucho en presencia de oligómeros con mayores valores de n o m , lo cual se conoce como efecto de supresión. Para evitar el efecto de supresión, es necesario acoplar la detección por MS con una técnica de separación previa, en lugar de usar infusión directa. Para exaltar la sensibilidad de los iones $[M+H]^+$, el eluyente se debe mezclar con una disolución fuertemente ácida en modo post-columna. La mezcla se puede llevar a cabo usando un nebulizador triconcéntrico o una unión en T insertada entre la salida de la columna y un nebulizador biconcéntrico. De esta forma es posible conseguir la independencia entre las condiciones de separación y de detección de modo simple y efectivo, haciendo compatible la detección por MS usando medios ácidos con un procedimiento cromatográfico o electroforético previo. En HPLC-MS, los factores de respuesta también dependen del volumen de inyección y de la velocidad de flujo, por lo tanto, es importante realizar la calibración inyectando los estándares de oligómeros sin derivatizar en las mismas condiciones de trabajo usadas con las muestras.

Los factores de respuesta son aproximadamente lineales a lo largo de n pero no lineales a lo largo de m , por lo tanto, se requieren modelos cuadráticos para predecir factores de respuesta interpolados a lo largo de una serie de etoxímeros. Para construir modelos cuadráticos se requieren al menos tres estándares a lo largo de la serie de etoxímeros. Además, es preferible modelar los factores de respuesta de los oligómeros pares e impares por separado, esto es, usando ecuaciones cuadráticas distintas, lo que aumenta el número de estándares que se deben incluir en el conjunto de calibración. Finalmente, ya que los modelos cuadráticos no son adecuados para

predecir valores extrapolados, los etoxímeros con $m = 1$ y $m = 2$, que son los valores extremos de la serie impar y par, respectivamente, tendrían que ser necesariamente incluidos en el conjunto de calibración de una serie de etoxímeros. Por lo tanto, es posible construir modelos de los factores de respuesta que cubran amplios rangos de valores de n y m , como los construidos en este trabajo por infusión directa de disoluciones ácidas en MeOH, pero para conseguir predicciones precisas es necesario usar muchos estándares. Debemos concluir que, debido al comportamiento complejo de los factores de respuesta, en muchos casos un método basado en la derivatización previa conducirá a mejores resultados que calibrar y construir modelos de los factores de respuesta de los FAEs sin derivatizar. Sin embargo, la determinación de oligómeros sin derivatizar, mediante calibración previa con los correspondientes estándares, así como la construcción de modelos de los factores de respuesta dentro de rangos de n y m seleccionados, puede ser útil para obtener una rápida visión semi-cuantitativa de la distribución de oligómeros en MS por infusión directa, y para la evaluación de los oligómeros usando MS con separación previa cromatográfica o electroforética.

VI.5. Referencias

- [1] H.P. Fiedler, *Lexicon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und Angrenzende Gebiete*, Edition Cantor, Aulendorf, 1989.
- [2] P. Rudewicz, B. Munson, *Anal. Chem.* 58 (1986) 674.
- [3] C. Crescenzi, A. Di-Corcia, R. Samperi, A. Marcomini, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1797.
- [4] N.S. Battersby, A.J. Sherren, R.N. Bumpus, R. Eagle, I.K. Molade, *Chemosphere* 45 (2001) 109.
- [5] M. Petrovic, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 1173.
- [6] A.H. Silver, H.T. Kalinoski, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69 (7) (1992) 599.

-
- [7] S. Brossard, M. Lafosse, M. Dreux, *J. Chromatogr.* 591 (1992) 149.
- [8] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4353.
- [9] Y. Mengerink, H.C.J. De Man, S. Van der Wal, *J. Chromatogr.* 552 (1991) 593.
- [10] D. Cho, J. Hong, S. Park, T. Chang, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 199.
- [11] B. Trathnigg, C. Rappel, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 149.
- [12] B. Trathnigg, A. Gorbunov, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 207.
- [13] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1885.
- [14] W. Miszkiewicz, W. Hreczuch, A. Sobczynska, J. Szymanowski, *Chromatographia* 51 (2000) 95.
- [15] W. Miszkiewicz, J. Szymanowski, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 19 (1996) 1013.
- [16] T. Kamiyuki, T. Monde, K. Omae, K. Morioka, T. Konakahara, *Chromatographia* 51 (2000) 390.
- [17] W. Miszkiewicz, J. Szymanowski, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 25 (1996) 203.
- [18] A. Marcomini, M. Zanette, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 193.
- [19] A.T. Kiewiet, P. deVoogt, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 185.
- [20] T. Cserhati, E. Forgacs, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 265.
- [21] T.M. Schmitt, M.C. Allen, D.K. Brain, K.F. Guin, D.E. Lemmez, Q.W. Osburn, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67 (1990) 103.
- [22] A.T. Kiewiet, J.M.D. Vandersteen, J.R. Parsons, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4409.
- [23] K. Lemr, M. Zanette, A. Marcomini, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 219.
- [24] M. Zanette, A. Marcomini, E. Marchiori, R. Samperi, *J. Chromatogr. A* 756 (1996) 159.
- [25] K. Lemr, *J. Chromatogr. A* 732 (1996) 299.
- [26] C. Sun, M. Baird, H.A. Anderson, D.L. Brydon, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 145.
- [27] B.J. Hoffman, L.T. Taylor, S. Rumbelow, L. Goff, J.D. Pinkston, *J. Chromatogr. A* 1034

(2004) 207.

[28] K. Lemr, J. Sevcik, J. Hlavac, J. Chromatogr. A 1021 (2003) 19.

[29] T. Okada, Anal. Chem. 63 (1991) 1043.

[30] T. Okada, J. Chromatogr. 609 (1992) 213.

[31] B.J. Hoffman, L.T. Taylor, S. Rumbelow, L. Goff, J.D. Pinkston, J. Chromatogr. A 1043 (2004) 285.

[32] H. Bachus, H.J. Stan, Tens. Surf. Det. 40 (2003) 10.

[33] A.M. Desbene, L. Geulin, C.J. Morin, P.L. Desbene, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 159.

[34] R.A. Wallingford, Anal. Chem. 68 (1996) 2541.

[35] R. Sebastiano, A. Citterio, P.G. Righetti, E. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J. Chromatogr. A 1053 (2004) 235.

[36] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, J. Chromatogr. A 745 (1996) 281.

[37] C. Vogt, K. Heinig, Fresenius' J. Anal. Chem. 363 (1999) 612.

[38] P. Jandera, M. Hol_apek, G. Theodoridis, J. Chromatogr. A 813 (1998) 299.

[39] M. Castillo, F. Ventura, D. Barceló, Waste Management 19 (1999) 101.

[40] K.A. Krogh, K.V. Vejrup, B.B. Mogensen, B. Halling-Sorensen, J. Chromatogr. A 957 (2002) 45.

[41] L.H. Levine, J.L. Garland, J.V. Johnson, Anal. Chem. 74 (2002) 2064.

[42] L.H. Levine, J.L. Garland, J.V. Johnson J. Chromatogr. A 1062 (2005) 217.

[43] G.A. Cumme, E. Blume, R. Bublitz, H. Hoppe, A. Horn, J. Chromatogr. A 791 (1997) 245.

[44] S. Chiron, E. Sauvard, R. Jeannot, Analisis 28 (2000) 535.

[45] K.B. Sherrard, P.J. Marriott, M.J. McCormick, R. Colton, G. Smith, Anal. Chem. 66 (1994) 394.

[46] J.C. Dunphy, D.G. Pessler, S.W. Morrall, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 1223.

-
- [47] G. Cassani, C. Pratesi, L. Faccetti, S. Pravettoni, G. Nucci, N. Andriollo, L. Valtorta, L. Matheson, *J. Surf. Det.* 7 (2004) 195.
- [48] C.J. Sparham, I.D. Bromilow, J.R. Dean, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 39.
- [49] C.E. Hammond, D.K. Kubik, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71 (1994) 113.
- [50] S.K. Huang, M.H. Rood, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1152.
- [51] K.A. Evans, S.T. Dubey, L. Kravetz, S.W. Evetts, I. Dzidic, C.C. Dooyema, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 765.
- [52] S.J. Barry, R.M. Carr, S.J. Lane, W.J. Leavens, C.O. Manning, S. Monté, I. Waterhouse, *Rapid Comm. Mass Spectr.* 17 (2003) 484.
- [53] J. Ungewiss, J.P. Vietzke, M. Strassner, C. Rapp, B. Feuerstein, *Chromatographia* 57 (2003) S73.
- [54] K. Holmberg, B. Jonsson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, Chichester, 2003, p. 108.

Capítulo VII

Determinación de alcoholes grasos mediante espectrometría de masas previa oxidación con óxido crómico

(Trabajo enviado para su publicación)

VII.1. Introducción

En el capítulo VI se ha introducido la química analítica de los alcoholes grasos etoxilados incluyendo procesos de derivatización (ver referencias 1-54 del capítulo VI). En dicho capítulo se estudiaron los factores de respuesta (sensibilidades relativas) de los alcoholes grasos etoxilados en diversos medios, y se establecieron modelos para predecirlos usando un conjunto de estándares bien seleccionados. Se revisó la problemática que presenta la cuantificación de alcoholes etoxilados por espectrometría de masas. En el trabajo desarrollado en el anterior capítulo no se pudieron calibrar los alcoholes grasos no etoxilados debido a la baja intensidad que presenta el pico correspondiente a los aductos $[M+H]^+$ o $[M+Na]^+$.

Para solucionar este problema, en el presente capítulo se desarrolla un procedimiento rápido de oxidación del grupo alcohol a ácido carboxílico empleando óxido crómico CrO_3 , los ácidos resultantes presentan una mayor facilidad para ser detectados por infusión directa en espectrometría de masas. Empleando patrones, se estudió la variación de la sensibilidad relativa de los ácidos carboxílicos en modo ion-negativo, y se observó su variación con la longitud de la cadena alquílica. Una variación de este tipo ya había sido observada anteriormente [1]. Los alcoholes grasos sin etoxilar se oxidaron cuantitativamente, pero se observó una disminución del rendimiento de oxidación con el número de EOs para los alcoholes grasos etoxilados, obteniendo rendimientos del orden del 60-65 %. El procedimiento de oxidación se aplicó a muestras cosméticas y de higiene que contenían alcoholes grasos en su composición.

VII.2. Materiales y métodos

VII.2.1. Aparatos, reactivos y muestras

Se usó un espectrómetro de masas provisto de una trampa iónica (1100 VL, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), equipado con una fuente de ionización ESI. Para la infusión directa de las disoluciones en el espectrómetro de masas, se usó una bomba de jeringa (kdScientific, Holliston, MA, USA) con un caudal constante de $0,3 \text{ mL hr}^{-1}$ ($5 \mu\text{L min}^{-1}$). También se usaron una centrífuga (Sigma Laboratory Centrifuges, Osterode am Harz, Alemania), un agitador de tubos (Heidolph, modelo Reax 2000, Alemania) y un baño de agua (modelo RCT Basic, IKA, Alemania) provisto de una sonda para mantener constante la temperatura (modelo ETS-D4, IKA).

Igual que en el capítulo VI, los FAEs se nombran como C_nE_m , donde C_n y E_m representan la cadena alquílica lineal con n átomos de carbono y la cadena polietoxilada con m unidades de EOs, respectivamente. Se usa C_nE_0 para denotar alcoholes no etoxilados. Se añade una H para nombrar los ácidos carboxílicos correspondientes, por ejemplo C_3E_2 y C_3E_2H es la pareja formada por el siguiente alcohol y su correspondiente ácido carboxílico:



En el caso de los alcoholes y ácidos sin etoxilar: $C_{10}E_0$ es 1-decanol, y $C_{10}E_0H$ es ácido decanoico.

También se usaron los siguientes reactivos y disolventes de grado analítico: ACN, acetona, acetato de etilo, C_3E_0 (Scharlab, Barcelona), C_8E_0 , $C_{10}E_0$, $C_{12}E_0$, $C_{14}E_0$, C_2E_1 , C_4E_2 , C_8E_1 , $C_{12}E_1$, $C_{12}E_2$, $C_{18}E_1$, los ácidos C_2E_0H , C_3E_0H , C_8E_0H , $C_{10}E_0H$, $C_{12}E_0H$, C_{1E_1H} ,

C1E2H, C1E3H y C2E1H y butilamina (Fluka, Buchs, Suiza), los ácidos 3,4,5-trimetoxibenzoico, C14E0H y C16E0H (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), sulfito sódico anhidro y CrO₃ (Panreac, Barcelona), C12E3, C12E4, C12E5 y C12E6 (cedidos amablemente por C. Solans, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona). También se usó agua desionizada (desionizador Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA, USA), y la muestra industrial FINDET 10/18 (disolución acuosa con aproximadamente un 80 % de FAEs, Molins-Kao, Barcelona).

VII.2.2. Procedimientos

Los barridos del espectrómetro se hicieron en el rango de 50-800 m/z , el voltaje del capilar fue de 4 kV, y se aplicaron 6 V a la máscara 2; el voltaje de la máscara 1 quedó fijado automáticamente en función de la masa diana. La carga máxima de la trampa de iones fue 3×10^4 cuentas, y el tiempo máximo de acumulación fue de 300 ms. Se usó nitrógeno (obtenido del generador) como gas de nebulización (100 kPa) y gas de secado (3 L min^{-1} a 250 °C). Para reducir las variaciones de sensibilidad entre inyecciones, se usó el pico [M-H]⁻ del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico a m/z 211 como patrón interno. Para eliminar la influencia de la masa diana en la sensibilidad, las abundancias de cada ion se midieron usando su valor de m/z como masa diana respectiva; para ello, se usó la opción del *software* de escanear secuencialmente una serie de masas diana preseleccionadas. El tiempo de acumulación usado en infusión directa fue de 2 minutos. Todas las disoluciones se pasaron a través de filtros de nylon de diámetro de poro de 0,45 μm (Albet, Barcelona).

Como oxidante se usó el reactivo de Jones [2], que se preparó mezclando 6,7 g de CrO₃ con 6 mL de ácido sulfúrico en 50 mL de agua. El procedimiento para la oxidación de los alcoholes se diseñó de modo que se obtuviese una disolución final libre de sales de cromo, consiguiendo una oxidación lo más completa posible. Para ello, en primer lugar, se disolvieron en

un tubo de centrífuga 50 mg del alcohol en 3 mL de acetona, y se añadió, agitando continuamente, 1 mL de reactivo de Jones gota a gota, manteniendo la temperatura del tubo a 25 °C con la ayuda de un baño de agua. Al cabo de 5 min se añadieron 0,5 mL de HCl 2M, para asegurar la disolución de las sales de cromo(III) en el medio acetona-agua, así como la protonación de los ácidos carboxílicos formados con el fin de facilitar su posterior extracción con acetato de etilo. Se eliminó el exceso de cromo (VI) (observable por la desaparición del color amarillo), añadiendo 0,15 g de Na₂SO₃ agitando. En caso de persistencia de color amarillo, se añadió un pequeño exceso de reductor. Los ácidos formados se extrajeron con 4 mL de acetato de etilo. Después de agitar y centrifugar, las dos fases aparecían perfectamente separadas. En la fase acuosa quedan las sales de cromo formadas, y en la fase orgánica (compuesta por acetato de etilo y acetona) los productos de oxidación. Se tomaron alícuotas de 0,25 mL del extracto orgánico y se llevan a 10 mL con una mezcla 9:1 ACN/ agua conteniendo 30 mM de butilamina con el fin de ionizar los ácidos, y se inyectaron en el espectrómetro de masas realizando el análisis en modo ion-negativo. En medio ácido, los alcoholes sin etoxilar no pueden observarse por ESI-MS o por APCI-MS, mientras que los alcoholes etoxilados dan lugar a los picos de los iones [M+H]⁺ y [M+Na]⁺ en el modo ion-positivo. Con este fin se sustituyó la butilamina por HCl 0,1 M realizándose el análisis en modo ion-positivo. Para la oxidación de alcoholes en muestras de higiene y cosméticas, se tomaron 2 g de muestra, se disolvieron en 10 mL de acetona, se centrifugó y sobre 2 mL de sobrenadante se realizó el proceso de oxidación descrito antes.

VII.3. Resultados y discusión

VII.3.1. Sensibilidades relativas de ácidos carboxílicos en ESI-MS

En medio básico y empleando modo ion-negativo, los ácidos carboxílicos presentan los picos $[M-H]^-$ más intensos y con una relación señal-ruido mejor que los correspondientes $[M+H]^+$ obtenidos en medio ácido y modo ion-positivo, por lo que se eligió un medio conteniendo butilamina 0,03 M.

Los factores de respuesta de los ácidos carboxílicos se calcularon como:

$$f_i = \frac{I_i}{I_s [M]_i} \quad (1)$$

donde I_i y I_s son las intensidades de los picos $[M-H]^-$ del ácido carboxílico y del patrón interno respectivamente, y $[M]_i$ es la concentración molar del ácido. Para varios ácidos inyectados, se observó que la sensibilidad relativa aumentaba con la longitud de la cadena alquílica (ver Fig. 1, parte A). Debido a la falta de estándares de ácidos carboxílicos etoxilados, sólo se pudieron inyectar ácidos con $m \leq 3$ y con $n = 1$ y 2. Con estos estándares se observó que la sensibilidad también aumentaba con el número de moles de óxido de etileno (ver Fig. 1, parte B).

VII.3.2. Estudio de las condiciones de oxidación

Para optimizar las condiciones de oxidación se empezó por realizar calibrados con ácidos carboxílicos. Se construyeron las curvas de calibrado usando TMBA como patrón interno. Los calibrados para los ácidos se ajustaron a la linealidad, obteniendo coeficientes de determinación del orden de 0,999. El rendimiento de la oxidación se calculó como la concentración molar de ácido encontrada en el extracto a partir del calibrado, dividida por el correspondiente valor esperado. En el caso de alcoholes etoxilados para los cuales no está disponible el patrón del ácido correspondiente, el rendimiento se estableció mediante otro procedimiento, que consistió en

calibrar el alcohol que quedaba sin oxidar usando los picos $[M+H]^+$ del mismo en medio ácido y medidos en modo ion-positivo.

Como procedimiento para la oxidación de los alcoholes se eligió el uso del reactivo de Jones [2], recomendado en la bibliografía para la oxidación rápida de alcoholes primarios. La oxidación se realiza en acetona, pero el reactivo está disuelto en un medio acuoso (ácido sulfúrico diluido). En el procedimiento adaptado por nosotros, después de la adición del oxidante, la proporción de acetona es del 75 %. Esta proporción de acetona en el medio de reacción resultó ser una variable importante, debido a su influencia sobre el rendimiento de la oxidación. Así por ejemplo, el rendimiento de oxidación de decanol a ácido decanoico aumentó de un 65 a un 100 %, aproximadamente, cuando el medio pasó de un 50 a un 75 % en acetona. Con esta concentración final de acetona y para C3E0, C8E0, C10E0, C12E0 y C14E0, el rendimiento de la oxidación fue siempre del orden del 100 %. Además, el hecho de recuperar cuantitativamente el ácido más hidrofílico, el C3E0H, implica que la extracción con acetato de etilo también fue cuantitativa.

En el caso de la oxidación del alcohol etoxilado C2E1, se obtuvo un rendimiento de aproximadamente un 60 %, sin que aumentase este rendimiento al aumentar el tiempo de reacción de 5 a 40 min, por lo tanto, el tiempo de contacto con el oxidante no resultó ser un factor significativo. Utilizando C2E1H se comprobó que el rendimiento de la extracción del producto de reacción era del 97 %, por lo que el bajo rendimiento del proceso global debe atribuirse únicamente a la oxidación incompleta del alcohol etoxilado.

En la Fig. 2 se muestran los espectros de masas en modo ion-positivo y medio ácido de los productos de la oxidación del C12E3 (parte A) y C12E6 (parte B). En el primer caso, se observan los picos $[M+H]^+$ del alcohol que queda sin reaccionar y del ácido correspondiente formado, así como el alcohol y el ácido que tienen una unidad menos de óxido de etileno. La presencia de estos dos últimos picos es indicativa de cierto grado de degradación de la cadena de óxidos de etileno

durante la oxidación. Igualmente, en la oxidación del C12E6 (parte B) se observan también los picos de los compuestos con uno y dos unidades de óxido de etileno menos que el compuesto inicial. Por lo tanto, el procedimiento no es recomendable para la oxidación de alcoholes etoxilados, debido a dos motivos: (i) la falta de estándares de ácidos alquil-etoxi-carboxílicos que son necesarios para establecer correctamente el rendimiento de la oxidación, y (ii) la degradación de la cadena de óxidos de etileno durante el proceso de oxidación. Sin embargo, los alcoholes no etoxilados ($n \geq 3$ y $m = 0$) fueron cuantitativamente oxidados en menos de 5 min a cualquier temperatura.

En un intento de mejorar las características de la oxidación de los alcoholes etoxilados, se estudió la influencia de la temperatura de la reacción. Utilizando C4E2, se calculó el rendimiento de la oxidación a partir del alcohol que quedaba sin reaccionar. Se probaron temperaturas de reacción de 25, 35 y 55 °C. Se observó que el rendimiento de la reacción aumentaba al aumentar la temperatura, pero también aumentaba el porcentaje de alcohol y ácido con $m-1$ moles de óxido de etileno formados por degradación de la cadena etoxilada. Por lo tanto, se concluyó que la mejor temperatura de trabajo era 25 °C, a la cual se formaba, aproximadamente un 68 % de ácido C4E2H, pero menos de un 10 % del ácido C4E1H. A mayores temperaturas, se obtenía más de un 10 % del C4E1H.

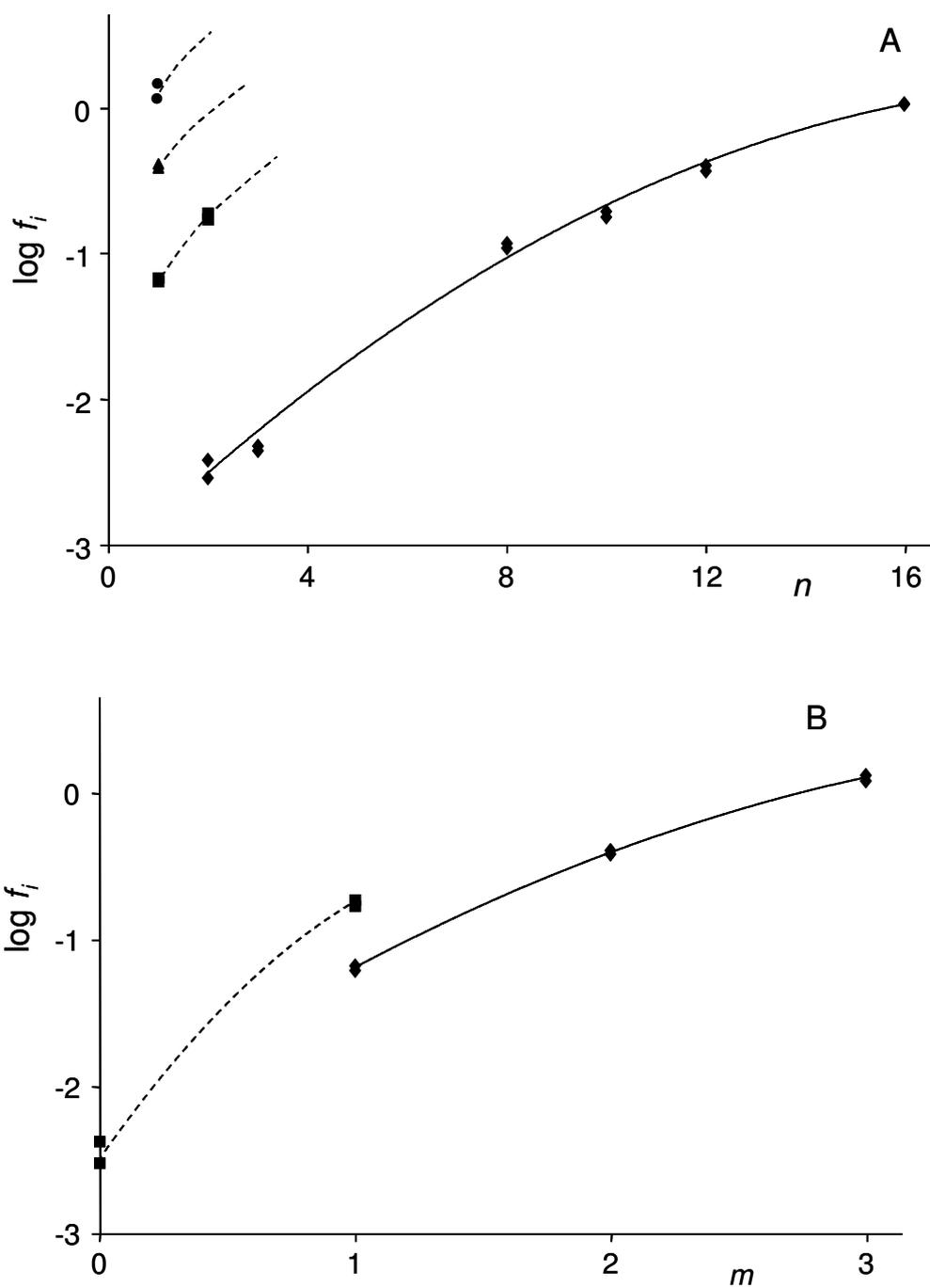


Figura 1. Factores de respuesta de ácidos carboxílicos frente a n (A) y m (B). Símbolos en la parte A: $m = 0$ (◆), $m = 1$ (■), $m = 2$ (▲) y $m = 3$ (●); y en la parte B, $n = 1$ (◆) y $n = 2$ (■).

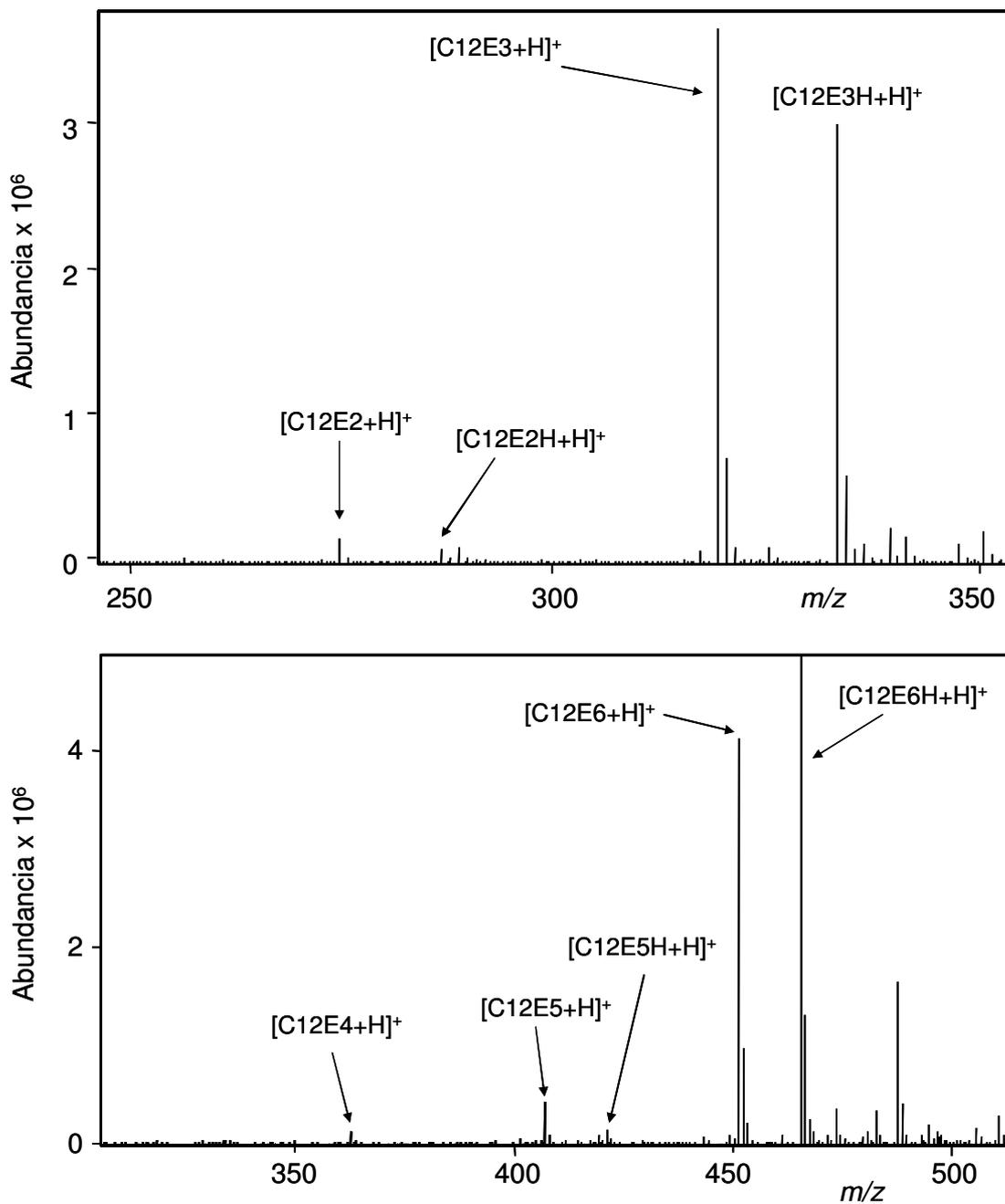


Figura 2. Espectros en modo ion-positivo y medio HCl 0,1 M de los productos de oxidación de C12E3 (A) y C12E6 (B). Masa diana a m/z 275 en la parte A y a m/z 363 en la parte B.

VII.3.3. Variación del rendimiento de la oxidación con n y m

Los rendimientos de la reacción de oxidación para alcoholes etoxilados fueron dependientes de ambos, n y m . La influencia de m se observó oxidando alcoholes de la serie $C_{12}Em$, variando m desde 0 (alcohol sin etoxilar) hasta 6, y calibrando tanto el alcohol que quedaba sin oxidar como el alcohol formado con 1, 2 o 3 unidades menos de óxido de etileno. El rendimiento en la formación de los ácidos $C_{12}EmH$ bajó al pasar de $m = 0$ (100 %) hasta $m = 4$, y a partir de este valor se mantuvo prácticamente constante siendo aproximadamente de un 60 %. Este valor es aproximado, ya que acumula los errores de estimación de los ácidos con 0, 1, 2 y 3 moles de óxido de etileno menos que el estándar inicial, para los cuales no se dispone de los correspondientes factores de respuesta. El rendimiento de cada uno de estos ácidos se estimó como inferior al 10 %, pero sin aplicar los factores de respuesta.

También se estudió la influencia de n sobre los rendimientos de oxidación. Para ello, se utilizaron alcoholes de las series C_nE_1 y C_nE_2 , donde n varió desde 2 hasta 18. En este caso, también se calibraron los alcoholes sin reaccionar. Los rendimientos fueron del orden del 60 % sin que se observase una dependencia significativa del rendimiento con n .

El procedimiento de oxidación se aplicó al FINDET 10/18, que es una mezcla de etoxímeros $C_{10}Em$. En la Fig. 3 se muestra el espectro de masas de la mezcla después de la oxidación. Se observa con suficiente sensibilidad el pico $[M-H]^-$ del ácido carboxílico formado a partir del alcohol sin etoxilar. Este resultado es importante ya que no es posible observar el alcohol sin etoxilar mediante ESI-MS y APCI-MS. Usando las intensidades de los picos que aparecen en la Fig. 3, se calculó el número medio de moles de óxido de etileno, que resultó ser 5,3. La diferencia con el valor nominal, 6, se puede explicar como debido al menor rendimiento en la oxidación de los oligómeros más pesados, y también a la rotura de la cadena en la reacción de oxidación que aumenta de un modo acumulativo las concentraciones de los ácidos etoxi-

carboxílicos más ligeros. Por otra parte, los ácidos con menor número de moles de óxido de etileno tienen sensibilidades menores. Estos dos fenómenos, unidos a los diferentes rendimientos de la oxidación, distorsionan la distribución real de moles de óxido de etileno cuando se observa la mezcla de alcoholes etoxilados después de su oxidación. Además, podrían producirse también efectos de supresión o inhibición de la sensibilidad entre distintos ácidos. Todo ello desaconseja el uso de la oxidación con óxido crómico para ser aplicado a alcoholes etoxilados con fines cuantitativos.

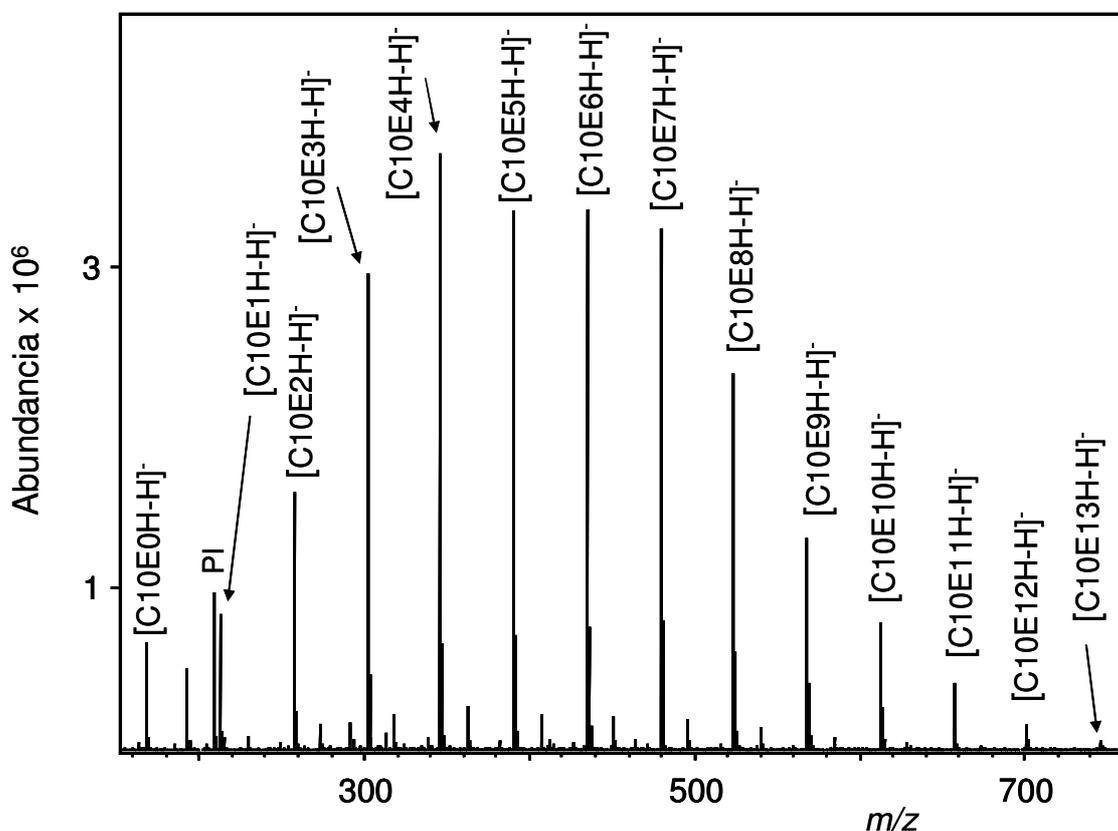


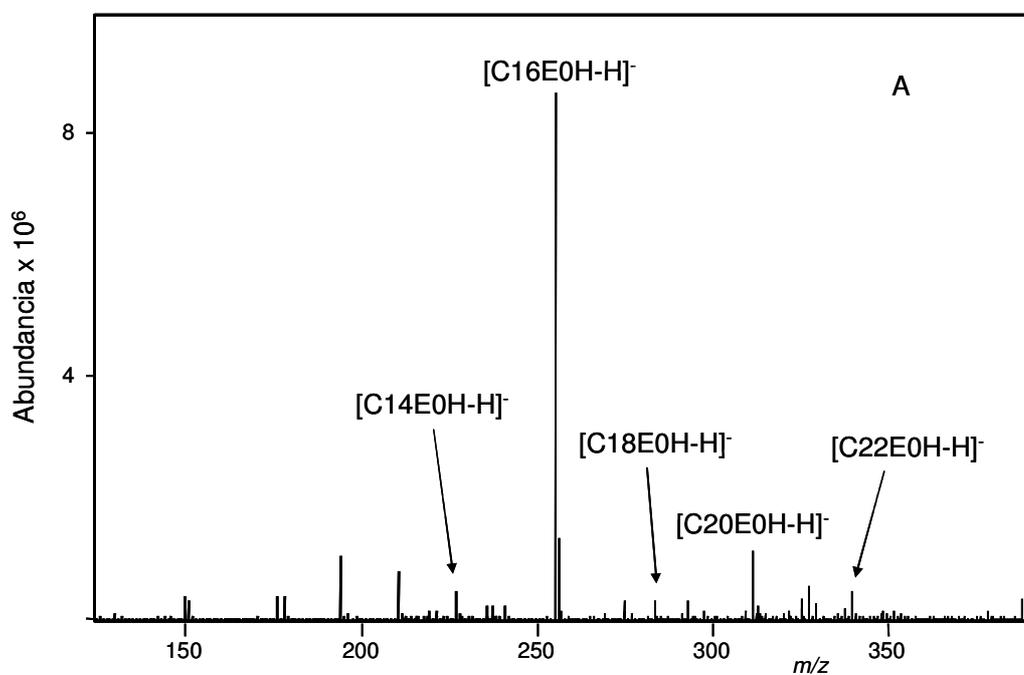
Figura 3. Espectro de masas en modo ion-negativo y en presencia de butilamina 0,03 M del extracto procedente de la oxidación del FINDET 10/18. Masa diana a m/z 435, PI = patrón interno.

VII.3.5. Oxidación de alcoholes grasos en productos de higiene y cosméticos

El procedimiento se aplicó a la oxidación de alcoholes grasos presentes en muestras cosméticas. Primero se oxidó una crema para las manos, que contenía como componentes mayoritarios: glicerina, alcohol cetílico (C16E0) y otros alcoholes no etoxilados, desde C14E0 hasta C22E0, en concentraciones menores. En la Fig. 4 A se muestra el espectro de masas de la muestra oxidada, donde el pico más intenso corresponde al ácido C16E0H, y se observan también los picos correspondientes a los ácidos C14E0H, C18E0H, C20E0H y C22E0H. Se utilizó un calibrado de adiciones de patrón, añadiendo alcohol cetílico a la muestra en concentraciones crecientes antes de la oxidación. La recta de calibrado obtenida indicó la presencia de un 3,2 % de alcohol cetílico en la muestra de crema de manos. Si se construye una recta de calibración externa a partir del ácido C16E0H, y se aplica dicha recta a la medida de la cantidad de ácido formado en la oxidación, se obtiene un porcentaje de alcohol cetílico del orden de un 1 %. Por lo tanto, se puede deducir que el método de oxidación propuesto tiene un efecto matriz importante, al menos para muestras complejas, como puede ser una crema cosmética. El efecto matriz se comprobó también de otra manera. Se procedió a la oxidación del alcohol C12E0 de dos formas, en disolución con acetona y añadido a la misma muestra de crema de manos. En el primer caso el rendimiento fue del 100 %, pero se redujo a un 40 %, aproximadamente, en el segundo caso. Para asegurar que la muestra no influía en la sensibilidad de la medida del ácido formado, se aplicó el procedimiento de oxidación sobre el ácido C12E0H en lugar de utilizar el alcohol. De nuevo se trabajó con el ácido disuelto en acetona y en la muestra. En los dos casos se obtuvo exactamente el mismo resultado. Por lo tanto, el efecto matriz se produce por un cambio en el rendimiento de la reacción, y no por alteraciones de la sensibilidad de la medida.

El procedimiento también se aplicó a la oxidación de un champú. La matriz fue en este caso muy distinta a la anterior. Además de otros surfactantes, como lauril éter sulfato (LES), la

matriz contenía alcohol cetílico, aunque en menor proporción que la crema de manos. El calibrado de adiciones de patrón dio como resultado un 0,85 % de alcohol cetílico, y el calibrado externo del ácido C16E0H indicó un 0,73 % de alcohol cetílico. Se puede deducir que en esta muestra no existe efecto matriz, o bien, es mucho menor. La Fig. 4 B corresponde al espectro de masas de esta muestra, donde además del pico correspondiente al C16E0H, se observan los picos correspondientes al surfactante LES.



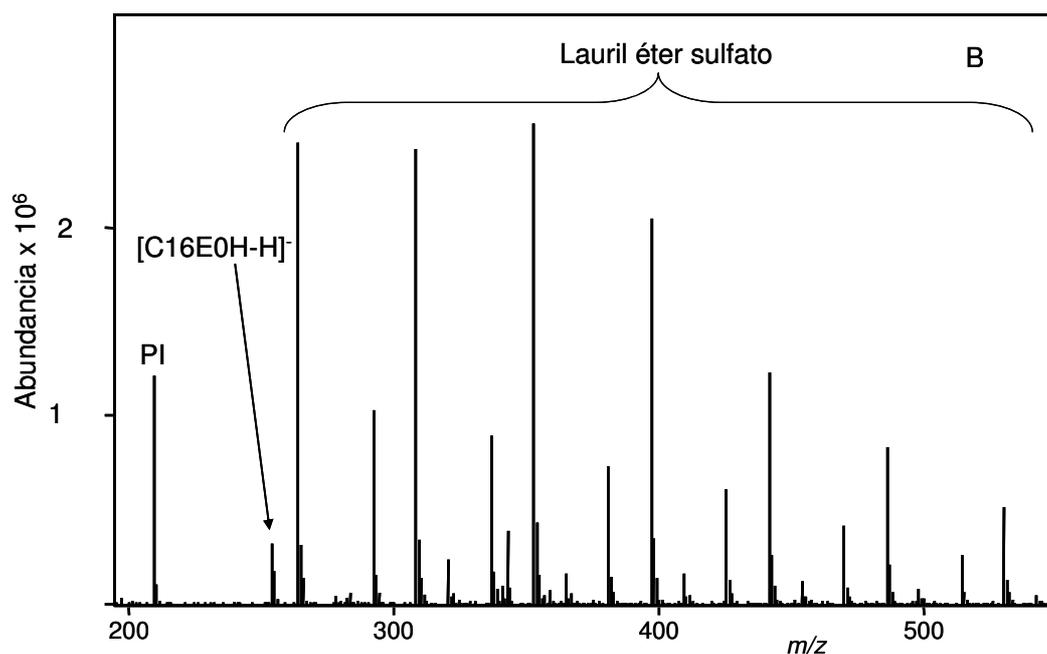


Figura 4. Espectros de masas en modo ion-negativo y en presencia de butilamina 0,03 M de una crema de manos (A) y un champú (B) después de oxidar. Masa diana a m/z 255 en las partes A y B (PI = patrón interno).

VII.4. Conclusiones

Se ha mejorado la sensibilidad de la detección de alcoholes no etoxilados y etoxilados en espectrometría de masas mediante su oxidación rápida y sencilla a ácidos carboxílicos y etoxi-carboxílicos, respectivamente. Los rendimientos son del orden del 100 % para los alcoholes no etoxilados.

Para los alcoholes etoxilados, los rendimientos resultaron inferiores al 100 % y dependieron de la longitud de la cadena alquílica n y del número de moles de óxido de etileno m . También se observó que los factores de sensibilidad de los ácidos carboxílicos con y sin etoxilación dependían de n y m . La determinación de alcoholes etoxilados previa oxidación con óxido crómico tiene también el inconveniente de la degradación significativa de la cadena de óxido de etileno. Por esta causa, y también por los numerosos factores que influyen sobre la respuesta, no es recomendable usar este procedimiento para alcoholes etoxilados. Sin embargo, sí puede

usarse para determinar alcoholes no etoxilados. En este caso será necesario comprobar la presencia de efecto matriz, que se producirá o no dependiendo de la composición de la muestra.

El procedimiento se ha aplicado a muestras de higiene y cosméticas que contenían alcoholes grasos no etoxilados en su composición. En las muestras se han podido cuantificar los alcoholes empleando el método de adiciones de patrón. El procedimiento es útil desde el punto de vista cualitativo, para permitir la observación rápida, por ESI-MS o APCI-MS, de los alcoholes primarios sin etoxilar presentes en una muestra, y para exaltar la respuesta de los alcoholes etoxilados en el modo ion-negativo, donde no se observan aductos con Na^+ y otros cationes presentes, por lo que los espectros de masas son más simples.

VII.5. Referencias

- [1] M. Holcapek, M. Lisa, P. Jandera, J. of Separation Science 28 (2005) 1315.
- [2] D. J. Pasto, C. R. Johnson, Determinación de estructuras orgánicas, Ed. Reverté, p. 409.

Capítulo VIII

Caracterización de alquilpolifosfonatos industriales mediante ionización por electronebulización-espectrometría de masas, e identificación de las impurezas mediante electroforesis capilar acoplada con espectrometría de masas

(*Journal of Mass Spectrometry*, 41, 2005, 23-33)

VIII.1. Introducción

Los alquilpolifosfonatos (*alkylpolyphosphonates*, APPs) son agentes quelantes que contienen grupos fosfonato unidos a los átomos de carbono de un esqueleto hidrocarbonado, el cual puede incluir también nitrógenos amino en su estructura. Debido a sus excelentes propiedades como secuestrantes de iones calcio y de metales pesados, los APPs tienen un amplio campo de aplicación, incluyendo tratamiento de aguas, inhibición de la corrosión, perforaciones petrolíferas, producción de papel y textil, agricultura, aditivos para productos de limpieza, y productos farmacéuticos para enfermedades de los huesos y del metabolismo del calcio. Como aditivos de productos de limpieza, evitan la deposición de carbonatos y alargan la vida y la eficacia de los blanqueadores oxidantes, por inhibir la acción de los catalizadores de óxido-reducción. Tienen baja toxicidad y son metabolizados por algunas bacterias; sin embargo, su capacidad para extraer metales pesados de los sedimentos y acuíferos resulta preocupante [1]. La química ambiental de los APPs se ha revisado recientemente [1-3]. Debido a su menor contenido en fósforo, el ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico se usa para sustituir a los APPs en numerosas aplicaciones.

Se han determinado APPs en muestras de agua mediante cromatografía iónica con adición post-columna de Fe (III) y detección espectrofotométrica de los complejos formados [4,5], y

mediante oxidación post-columna hasta fosfato, con posterior aplicación del método del azul de molibdeno [6]. Para separar bisfosfonatos en productos farmacéuticos se ha empleado cromatografía iónica, con detección fotométrica indirecta (IPD) en presencia de ácido bencenotricarboxílico como agente revelador [7]. Los APPs con nitrógenos amino en su estructura molecular se pueden detectar amperométricamente [8]. En otro método, basado en la separación de los complejos APP-Fe(III) mediante HPLC de pares iónicos, se consiguió un límite de detección muy bajo ($0.05 \mu\text{M}$). Este método tiene interés en el análisis de aguas naturales y residuales, si bien no es aplicable a la determinación de bisfosfonatos [9,10]. Los APPs también se pueden determinar mediante HPLC-MS previa formación de los correspondientes metil ésteres con diazometano para aumentar la volatilidad, e introducción del eluato en el espectrómetro de masas a través de una interfaz de chorro de partículas [11]. En un procedimiento de CZE, se usó adenosin monofosfato como revelador en la detección IPD [12]. Huikko *et al.* [13,14] han estudiado el comportamiento en MS de fármacos de la familia de los bisfosfonatos, usando una fuente ESI conectada tanto a un triple cuadrupolo como a un espectrómetro de masas de trampa iónica (ITMS). Se describieron los espectros de los fármacos y los caminos de fragmentación [13], y se desarrolló un procedimiento de CZE-ESI-MS para la identificación y cuantificación de clodronato y sus impurezas [14].

También se ha puesto especial atención en el desarrollo de métodos capaces de detectar trazas de ácidos alquilmonofosfónicos y sus ésteres como residuos de agentes de guerra química en muestras acuosas [15]. Se han usado GC-MS con formación previa de los derivados de pentafluorobencilo [16], HPLC con detección fotométrica de llama [17,18], CZE con detección IPD y conductimétrica [19,20], CZE-IPD con sorbato como agente revelador [21], cromatografía micelar electrocinética con detección fluorimétrica inducida por láser de los derivados de bromuro de panacilo [22], HPLC-MS [23] y CZE-MS [24]. También se han determinado los ácidos

alquilmonofosfónicos en productos farmacéuticos mediante CZE con detección espectrofotométrica de los ésteres fosfonato-borato [25] y mediante CZE-IPD usando ácido fenilfosfónico como agente revelador en medios neutro y básico [26].

En el trabajo expuesto en este capítulo, se obtuvieron, por infusión directa en el sistema ESI-ITMS, los espectros de los ocho APPs más comunes, incluyendo bisfosfonatos y el ácido fosfono-tricarboxílico. Los espectros mostraron aductos con iones sodio y potasio, y pérdidas de agua y grupos fosfonato, y también revelaron la presencia de impurezas con menos grupos fosfonato que las correspondientes estructuras nominales. Para asegurar una correcta interpretación de los espectros de MS, se utilizaron los espectros de MS² y MS³, y también la separación previa del compuesto principal y de sus impurezas empleando un sistema acoplado CZE-ESI-ITMS.

VIII.2. Materiales y métodos

VIII.2.1. Instrumentación y condiciones de trabajo

Se utilizó un sistema de electroforesis capilar HP3D acoplado a un sistema de ITMS de la serie VL 1100 provisto de una fuente ESI (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), a través de un capilar de sílice fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) de 56 cm de longitud (d.i. 50 μm y d.e. 363 μm). Se eliminó aproximadamente 1 cm del recubrimiento de poliimida del extremo de salida del capilar, para facilitar así el proceso de formación del aerosol. Los experimentos de infusión directa se llevaron a cabo aplicando 200 kPa en el extremo de entrada del capilar. Esta presión se consiguió empleando nitrógeno (pureza 99.5 %, generador Gaslab NG LCMS 20, Equcien, Madrid). En CZE-ESI-ITMS las muestras se inyectaron hidrodinámicamente (5 kPa x 60 s). Las separaciones en CZE se llevaron a cabo a 25 °C aplicando un voltaje de -20 kV. Se usó como BGE una disolución acuosa de ácido tricloroacético 10 mM ajustada a pH 2,2

gota a gota con amoníaco diluido. Para proporcionar el contacto eléctrico a la salida del capilar en el nebulizador triconcéntrico, se usó una envoltura líquida proporcionada por una bomba isocrática HP 1100 de Agilent (con un flujo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$), equipada con una unión en forma de T para producir una división de flujo de 1:100 (por lo tanto, el flujo de la envoltura líquida fue de $4 \mu\text{L min}^{-1}$).

El espectrómetro se escaneó dentro del rango de 50-800 m/z , el voltaje del capilar fue 4 kV, y se aplicaron 6 V a la máscara 2; el voltaje de la máscara 1 se fijó automáticamente en función de la masa diana. La carga máxima de la trampa de iones fue 3×10^4 cuentas, y el tiempo máximo de acumulación fue de 300 ms. Se usó nitrógeno (obtenido del generador) como gas de nebulización (12 psi) y gas de secado (4 L min^{-1} a $300 \text{ }^\circ\text{C}$), y He (C-50, Carbueros Metálicos, Aranjuez) como gas de colisión. Todas las medidas en infusión directa se hicieron con un tiempo de adquisición de 2 min, pero en CZE-ITMS se usaron 300 ms. Para el análisis de los datos se utilizó el *software* de Agilent LC/MSD v. 4.2.

VIII.2.2 Reactivos y procedimientos

Se usaron los siguientes fosfonatos de grado técnico: ácido dietilenti-aminopentakis(metilenfosfónico) (**I**, Briquest 543/45AS), ácido dihexametilenti-aminopentakis(metilenfosfónico) (**II**, Dequest 2090), sal sódica del ácido etilendi-aminotetrakis(metilenfosfónico) (**III**, Dequest 2046), sal potásica del ácido hexametilendi-aminotetrakis(metilenfosfónico) (**IV**, Dequest 2054), ácido amino tris(metilenfosfónico) (**V**, Briquest 301-50A), ácido hidroxietil-aminobis(metilenfosfónico) (**VI**, SPE 0101), ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico (**VII**, Briquest ADPA-60A) y ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (**VIII**, Bayhibit AM) (ver estructuras en Fig. 1). Briquest es una marca comercial de Rhodia (Cranbury, NJ, USA), Dequest y SPE son de Solutia Europe (Louvain-la-Neuve, Bélgica)

y Bayhibit es de Bayer (Wiesdorf, Alemania); los productos de Solutia Europe fueron amablemente cedidos por Quimidroga Plásticos S.A. (Barcelona), y las otras muestras por Químicas Oro S.A. (Sant Antoni de Benaixèver). En la bibliografía se han usado varios acrónimos para designar a estos compuestos; sin embargo, en este trabajo, por simplificar, se utilizaron números romanos, desde **I** hasta **VIII**; para designar los compuestos nominales y sus principales componentes e impurezas, por ejemplo, se usó **I4P** para compuestos con la estructura de **I** pero con 4 grupos fosfonato en lugar de cinco (ver Fig. 1). También se usaron metanol (Scharlab, Barcelona), ácido tricloroacético, amoníaco acuoso, hidrogenocarbonato de sodio (Panreac, Barcelona) y agua desionizada (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA, USA).

Para su acondicionamiento, los capilares nuevos se trataron con NaOH 1 y 0,1 M y agua a 60 °C (se pasó cada disolución a través del capilar durante 10 min). En los experimentos de CZE, el capilar se lavó, diariamente antes de su uso, con NaOH 0,1 M (5 min), agua (5 min) y con el tampón de separación (10 min) a 25 °C. Entre inyecciones sucesivas se acondicionó con el tampón (5 min). Después de cada sesión de trabajo se lavó con agua (10 min). Como envoltura líquida en medio ácido y básico, se usó una mezcla 60:40 (v/v) de metanol con una disolución acuosa de ácido tricloroacético 20 mM, ajustada a pH 3 con amoníaco 0,1 M. También se usó una mezcla similar en la que el ácido tricloroacético se sustituyó por hidrogenocarbonato de sodio 20 mM (pH 8,3). Antes de inyectar, todas las disoluciones se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro (Albet, Alemania). Las disoluciones madre de los compuestos **I** a **VIII** se prepararon en agua, conteniendo cada una 1000 µg mL⁻¹.

VIII.3. Resultados y discusión

VIII.3.1. Espectros de los alquilaminopolifosfonatos

Usando el modo ion-positivo se observaron los picos $[M+H]^+$ de los productos **I** a **VIII**, pero el ruido de fondo fue muy alto. Por el contrario, usando el modo ion-negativo, se obtuvo un elevado número de picos significativos, con mucha mejor relación señal-ruido. La complejidad de los espectros en el modo ion-negativo decreció desde **I** hasta **V**, pero los caminos de reacción fueron esencialmente los mismos. En todos los casos, se observó la formación de aductos con iones sodio y pérdidas de agua y de H_3PO_3 (o agua más HPO_2). En los últimos pasos de la fragmentación, también se observaron picos con valores de m/z que indicaron la formación de PO_2^- y $CH_3PHO_2^-$. Una pérdida de CO, producida quizá por la migración de dos protones de un grupo metileno, se observó exclusivamente en la fragmentación de **V** (Fig. 3).

Otra característica común encontrada fue la presencia de impurezas con menos grupos fosfonato que las correspondientes a los compuestos nominales. Por ejemplo, el espectro de **I** obtenido en medio ácido mostró tres series de picos dentro de los rangos de m/z 572-660, 492-558 y 412-456, con intensidades decrecientes entre la primera serie y las siguientes (Fig. 2 y Tabla 1). Entre las series de picos consecutivas se observaron diferencias de m/z 80, que correspondían a reemplazar el grupo ácido fosfónico, $-PO(OH)_2$, por un protón. En el texto que sigue, para designar el componente predominante de **I** (Fig. 1) y las correspondientes impurezas con 4 y 3 grupos fosfonato, se usarán los acrónimos **I5P**, **I4P** y **I3P**, respectivamente. En **I** no se observaron las series de picos correspondientes a impurezas con 2 y 1 grupos fosfonato. Asimismo, en **II** se observó un componente predominante, **II5P**, y una impureza con 4 grupos fosfonato, **II4P**. Los espectros de **II5P** y **II4P** fueron muy similares a los de **I5P** y **I4P**, pero con las dos diferencias siguientes: (1) los picos aparecieron desplazados en 112 unidades de m/z debido a la mayor masa del esqueleto hidrocarbonado, y (2) como el producto usado fue una sal de potasio, predominaron

los aductos de K^+ en lugar de los aductos de Na^+ . En los productos **III** a **V**, se observó un componente predominante y una impureza para cada uno de ellos. Estos compuestos los hemos denominado **III4P**, **III3P**, **IV4P**, **IV3P**, **V3P** y **V2P**, respectivamente.

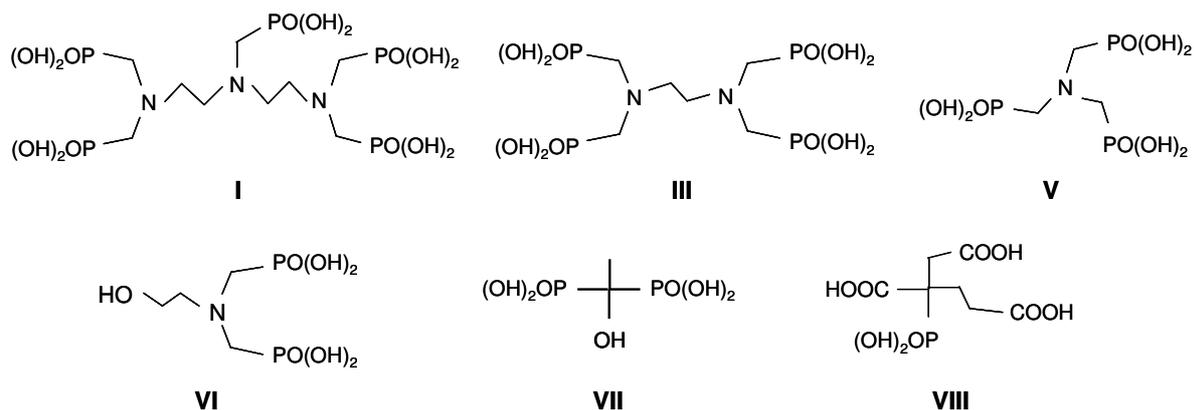
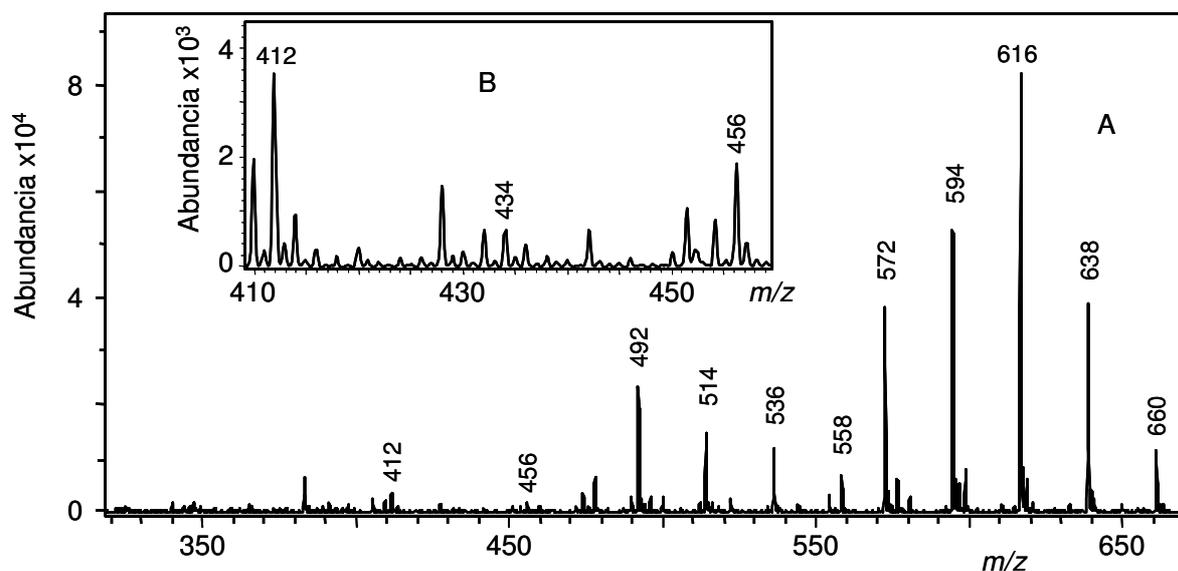


Figura 1. Estructuras moleculares de los compuestos nominales; las estructuras de **II** y **IV** son equivalentes a las de **I** y **III**, respectivamente, pero con cadenas de hexametileno en lugar de etileno.



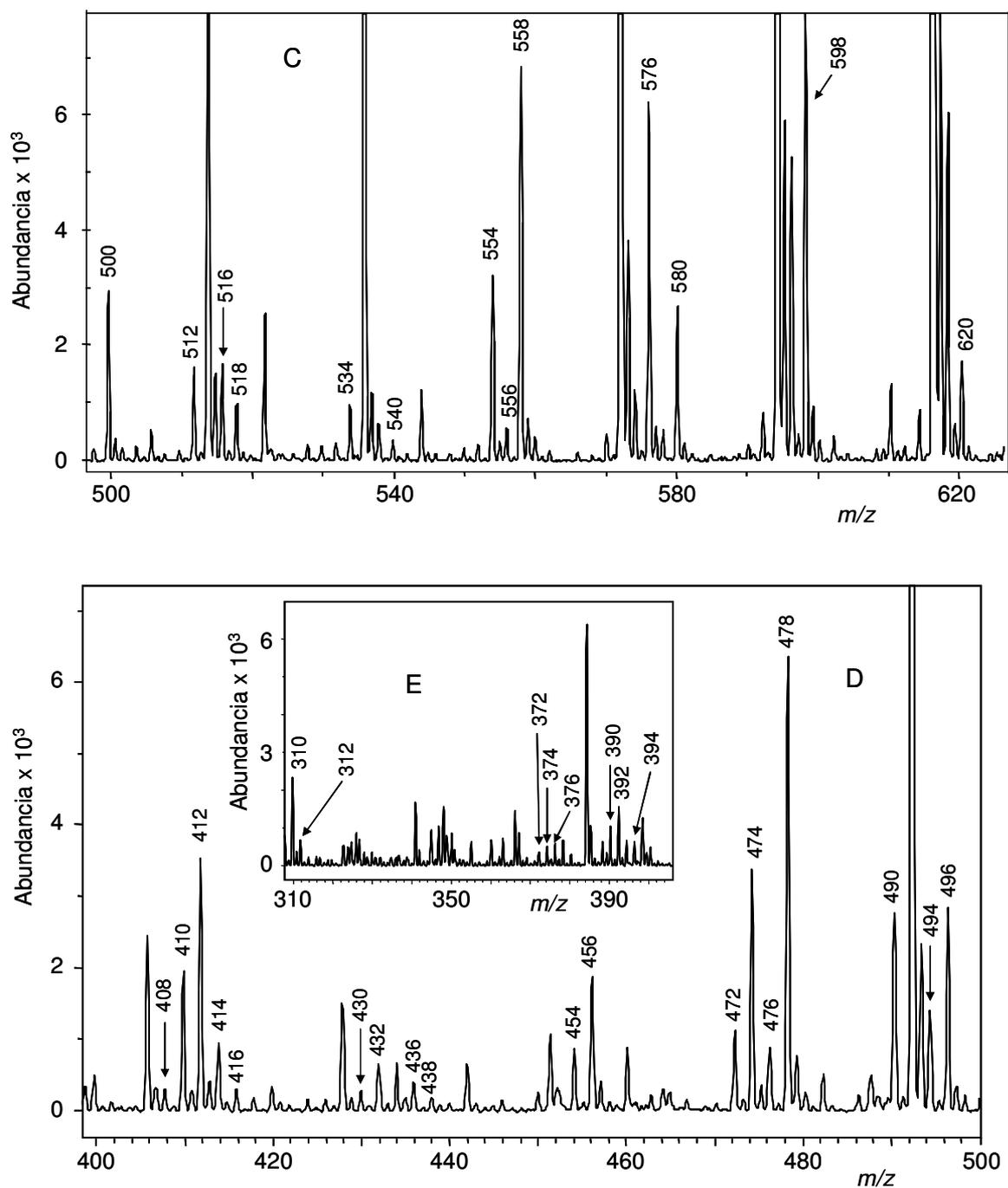


Figura 2. Espectro de **I** en modo ion-negativo obtenido por infusión directa en medio ácido. En las partes A y B se indican los valores de m/z de los iones $[M - nH + (n-1)Na]^-$, mientras que en las partes C, D y E se indican los iones producidos por pérdidas de agua y H_3PO_3 .

Tabla 1. Iones observados para varios alquilaminofosfonatos y bisfosfonato **VII**

Compuesto	<i>n</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i> después de las pérdidas de masa respecto a $[M-nH+(n-1)Na]^+$ ^a			
		$[M-nH+(n-1)Na]^+$	<i>i</i> H ₂ O	<i>i</i> H ₃ PO ₃	<i>i</i> H ₂ O + H ₃ PO ₃	<i>i</i> H ₂ O + 2H ₃ PO ₃
I5P	5	660	-	-	-	-
	4	638	620	556	-	-
	3	616	598, 580	534	516	-
	2	594	576, 558, 540	512, 430	494, 476	412
	1	572	554, 536, 518, 500	490, 408	472, 454, 436	390, 372
I4P	4	558	-	-	-	-
	3	536	518	454	-	-
	2	514	496, 478	432	414	-
	1	492	474, 456, 438	410, 328 ^b	392, 374	310
I3P	3	456	-	-	-	-
	2	434	416	352 ^b	-	-
	1	412	394, 376	330 ^b	312	-
III4P	4	501	-	-	-	-
	3	479	461	397	379 ^b	-
	2	457	439, 421	375	357	-
	1	435	417, 399, 381 ^b	353, 271	335, 317	271
III3P	3	399	-	-	-	-
	2	377	359	295	-	-
	1	355	337, 319	273 ^b	255	-
V3P	3	342 ^b	-	-	-	-
	2	320	302 ^b	238 ^b	-	-
	1	298	280, 262	216	198	-
V2P	2	240 ^b	-	-	-	-
	1	218	200	136	-	-
VII	2	227	-	-	-	-
	1	205	187, 169	123	-	-

^a El índice *i* indica pérdidas sucesivas.

^b Picos con muy baja intensidad.

Desde **I** hasta **V**, cada uno de los espectros de los componentes predominantes y de las impurezas estuvo constituido por los siguientes iones: (1) un perfil característico de iones $[M - nH + (n-1)Na]^-$, con potasio sustituyendo al sodio en el caso de **II**, y con valores de n desde 1 hasta el número de grupos fosfonato de los compuestos, por ejemplo, $n \leq 5$, $n \leq 4$ y $n \leq 3$ en **I5P**, **I4P** y **I3P**, respectivamente (véase la Tabla 1 para los valores de m/z); (2) picos de menor intensidad, producidos por la pérdida de moléculas de agua, localizados a $m/z - 18$ con respecto a los picos $[M - nH + (n-1)Na]^-$, excepto para los iones que tienen el número máximo de iones sodio, que no mostraron pérdidas de agua; (3) picos debidos a las pérdidas de H_3PO_3 , con intensidades similares a los producidos por pérdidas de agua, pero localizados a $m/z - 82$ con respecto a los picos $[M - nH + (n-1)Na]^-$; y (4) picos correspondientes a las pérdidas combinadas de agua y H_3PO_3 . Dentro de cada serie de picos, los picos $[M - nH + (n-1)Na]^-$ correspondieron a las sucesivas sustituciones de protones por iones sodio, a razón de una sustitución por cada grupo fosfonato. En medio ácido y básico se obtuvieron, esencialmente, los mismos perfiles de picos, pero en este último medio, se observó mayor abundancia de los iones que contenían más sodio. Además, en este medio, aparecieron picos adicionales con más de un ion sodio por grupo fosfonato. Midiendo la intensidad de los picos en el espectro de masas se obtuvo una estimación aproximada de la concentración de impurezas. Así, por ejemplo, en medio ácido, fijando sucesivamente la masa diana en el pico $[M - H]^-$ de **I5P**, **I4P** y **I3P** ($n = 1$ y m/z 572, 492 y 412), sus concentraciones relativas fueron 71, 26 y 3 %, respectivamente.

En todos los casos en que estaban presentes al menos dos grupos fosfonato no unidos a iones sodio en el ion padre se observaron pérdidas de agua con respecto a los iones $[M - nH + (n-1)Na]^-$. El número de pérdidas de agua con respecto al ion padre se pueden deducir de los datos de la Tabla 1. Este número fue cero para los iones padre que contenían sólo un grupo fosfonato no unido a un ion sodio, y aumentó al disminuir el número de iones sodio. Por lo tanto, para cada

ion padre, el número de pérdidas de agua coincidió con el número de grupos fosfonato no unidos a ion sodio menos uno. En los espectros de los compuestos predominantes y las impurezas desde **I** a **V**, siguiendo esta regla, se observaron todas las posibles pérdidas de agua tal y como se indica en la Tabla 1.

Se puede concluir lo siguiente: (1) los grupos fosfonatos unidos a iones sodio no participan en la deshidratación; (2) la carga negativa se localizaría en un grupo fosfonato no unido a un ion sodio; (3) no se puede observar deshidratación del grupo fosfonato que contiene la carga negativa, aunque sí podría ser posible la condensación de este grupo con otros grupos fosfonato no unidos a un ion sodio (como se ilustra en la Fig. 3 para **V3P**); (4) excluyendo los grupos fosfonato unidos a iones sodio más el grupo que contiene la carga negativa, los restantes grupos pueden dar lugar a deshidratación. Para la deshidratación son posibles dos caminos: (1) deshidratación del grupo fosfonato para dar lugar a un grupo $-\text{PO}_2$, como propone Huikko *et al.* para los bisfosfonatos [13], y (2) condensación entre los grupos fosfonato, con exclusión de los unidos a iones sodio, pero incluyendo los que contienen la carga negativa, dando lugar a enlaces P-O-P. De **I** a **V**, para los componentes predominantes y las impurezas, la condensación daría lugar a ciclos de 6 o más miembros, dependiendo de que los dos grupos $-\text{CH}_2-\text{PO}(\text{OH})_2$ que reaccionan estuvieran situados sobre el mismo o sobre diferentes átomos de nitrógeno, respectivamente. De acuerdo al mecanismo de condensación, los picos de **I5P** producidos por pérdidas de agua con valores de m/z 580, 540, 518 y 500, y muchos otros picos de la Tabla 1, podrían indicar condensaciones adicionales entre los grupos fosfonato ya condensados con otros grupos disponibles.

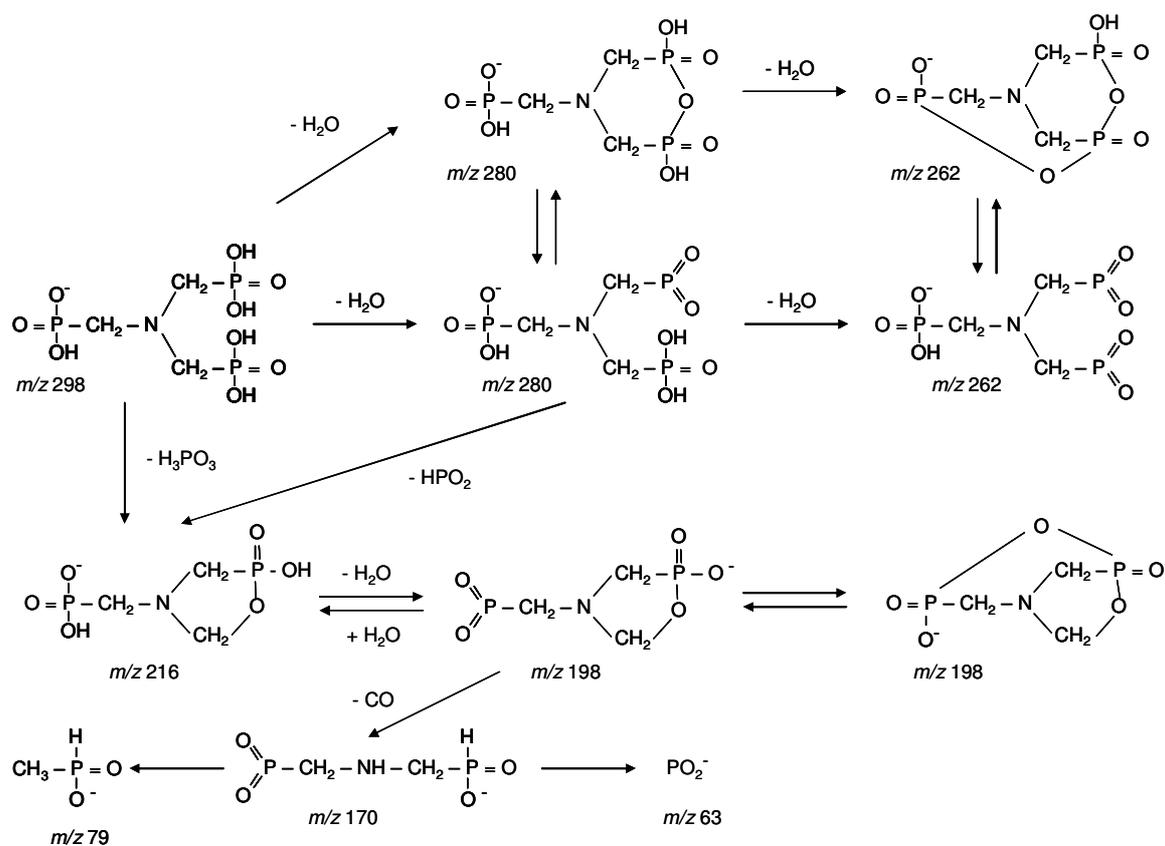


Figura 3. Esquema de las reacciones de fragmentación de V3P (no se incluyen los aductos con iones sodio).

Los espectros de MS^2 y MS^3 confirmaron estos caminos de deshidratación. Por simplicidad, los caminos de deshidratación y de otras reacciones se ilustran sólo para V3P (véase Fig. 3). Al aumentar la energía de fragmentación de los espectros de MS^2 y MS^3 , disminuyó la intensidad de los picos padre seleccionados, llegando finalmente a desaparecer, y al mismo tiempo aumentó la intensidad de los picos correspondientes a pérdidas de agua, H_3PO_3 y pérdidas combinadas con respecto al ion padre. Para cada ion padre, los picos producidos fueron siempre los descritos en las correspondientes filas de la Tabla 1, más los producidos en los últimos pasos de la degradación, como $(CH_3)HPO_2^-$ y PO_2^- (Fig. 3).

Se observó que el número de pérdidas de H_3PO_3 dependía del número de parejas de grupos fosfonato no unidos a ion sodio en el respectivo ion padre. Para que se perdiera un grupo fosfonato, deberían estar presentes al menos dos grupos fosfonato no unidos a iones sodio. Esto sugiere la formación de un enlace C-O entre el átomo de carbono del grupo $-\text{CH}_2-$ donde estaba enlazado el grupo fosfonato que se pierde, y un átomo de oxígeno del otro grupo fosfonato que reacciona (ver Fig. 3). Dependiendo de que los grupos reactivos $-\text{CH}_2-\text{PO}(\text{OH})_2$ se encuentren unidos al mismo o a diferentes átomos de nitrógeno, se formaría, respectivamente, un ciclo de 5 o más miembros.

Para los componentes predominantes y las impurezas, desde **I** a **V**, y siguiendo la regla de parejas de grupos $-\text{CH}_2-\text{PO}(\text{OH})_2$ disponibles, se observaron todos los picos posibles. Por ejemplo, si no hay iones sodio unidos a **I5P**, el número de parejas de grupos fosfonato disponibles es 2, y en consecuencia, se pueden observar hasta 2 pérdidas de H_3PO_3 . Con un ion sodio, el número de parejas de fosfonatos disponibles y las pérdidas de H_3PO_3 también son 2. Con dos y tres iones sodio, sólo se dispone de una pareja de fosfonatos, y por lo tanto, se observó una única pérdida de H_3PO_3 . Finalmente, con cuatro iones sodio en **I5P** no se pueden observar pérdidas de H_3PO_3 . Los picos observados indicaron también la capacidad de los grupos fosfonato ya condensados con otros (después de la deshidratación), o enlazados a un grupo metileno a través de un enlace P-O-C (después de perder otro grupo fosfonato), para condensar de nuevo con otros grupos fosfonato disponibles. Siguiendo esta regla, se observaron los picos correspondientes a todas las pérdidas combinadas de agua y de H_3PO_3 (ver los valores de m/z en las dos últimas columnas de la Tabla 1). Como se indicó antes para la deshidratación, los espectros de MS^2 y MS^3 también confirmaron los caminos de reacción para las pérdidas de grupos fosfonato.

VIII.3.2. Espectros de VI y VII

Los compuestos nominales de los productos VI y VII difieren de los correspondientes Ia V por la presencia de un grupo hidroxilo, y también difieren mucho entre sí. En VI y VII no se encontraron impurezas a un nivel detectable. El espectro de VI (Fig. 4) mostró principalmente iones formados por asociación según la siguiente expresión: $[pM - H \pm mH_2O]^-$, donde p varía desde 1 hasta 4, y m corresponde tanto a pérdidas como a ganancias de agua. Como se deduce del espectro, si $p = 1$ se pueden perder hasta dos moléculas de agua. Los posibles caminos de reacción son la deshidratación de un grupo fosfonato para dar lugar a un grupo $-PO_2$, la condensación entre dos grupos fosfonato y la esterificación intramolecular entre un grupo fosfonato y un hidroxilo. La segunda pérdida de agua podría deberse a la reacción entre un grupo ya condensado y el grupo hidroxilo o fosfonato que quedan sin reaccionar (Fig. 5).

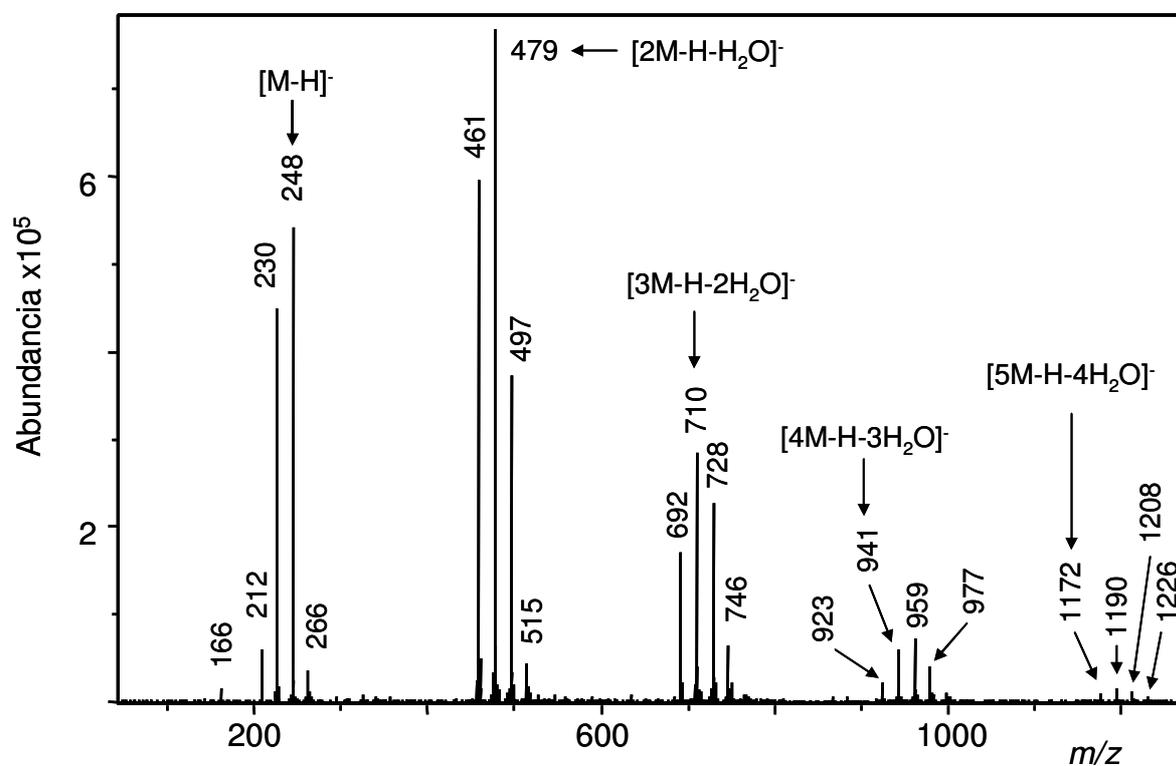


Figura 4. Espectro de VI en modo ion-negativo y medio ácido.

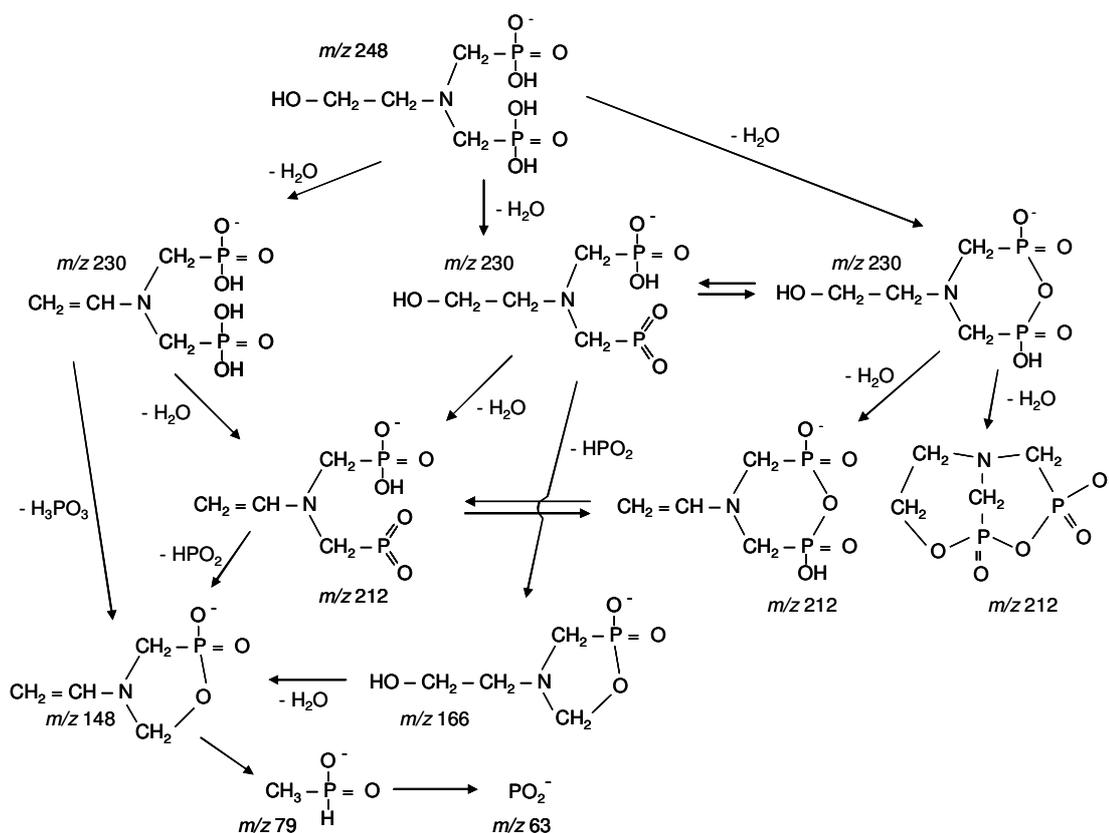


Figura 5. Esquema de las reacciones de fragmentación de **VI** (no se incluye la degradación de los ésteres intermoleculares ni de los aductos con iones sodio).

La asociación entre las moléculas del compuesto nominal de **VI** se puede atribuir a la formación de enlaces tipo éster intermoleculares (Fig. 6). En el espectro de **VI** (Fig. 4), los valores de m/z correspondientes a la formación de los ésteres sin pérdidas o ganancias de agua adicionales se indican por sus respectivas masas, cuyo valor es $[pM - H - (p - 1)H_2O]$. Estos valores se pueden usar como referencia, para estimar pérdidas o ganancias de agua adicionales. Las pérdidas adicionales de agua se explicarían por deshidratación de grupos fosfonato produciendo $-PO_2$, o por condensación entre fosfonatos, y también por formación intramolecular de un éster entre un grupo fosfonato y un hidroxilo. Por otro lado, la ganancia de una única molécula de agua por el compuesto nominal de **VI** y por los ésteres puede ser atribuida a la

formación de un aducto entre el agua y el grupo hidroxilo libre. Una evidencia de esto se encuentra en el hecho de que los componentes mayoritarios de **I** a **V**, que no tienen grupos hidroxilo, no ganan moléculas de agua. Las ganancias de más de una molécula de agua por los ésteres se podrían atribuir a la formación de aductos con hidroxilos adicionales producidos por reorganización, incluyendo condensación intramolecular entre grupos fosfonato seguida de hidrólisis de los enlaces éster (Fig. 6). Las pérdidas y ganancias de agua se enmascaran mutuamente, de modo que, la disminución del número de pérdidas de agua observables a valores crecientes de p es, probablemente, una consecuencia de las ganancias de agua, las cuales aumentan con p . La ausencia de pérdidas de H_3PO_3 en el espectro de **VI** se atribuiría a la presencia predominante de los ésteres; sin embargo, en los espectros de MS^2 y MS^3 de los picos de **VI**, a todos los valores de p , se observaron todas las pérdidas posibles, incluyendo las pérdidas combinadas de agua y H_3PO_3 . En la Fig. 5 se muestra un esquema de algunas de las reacciones observadas.

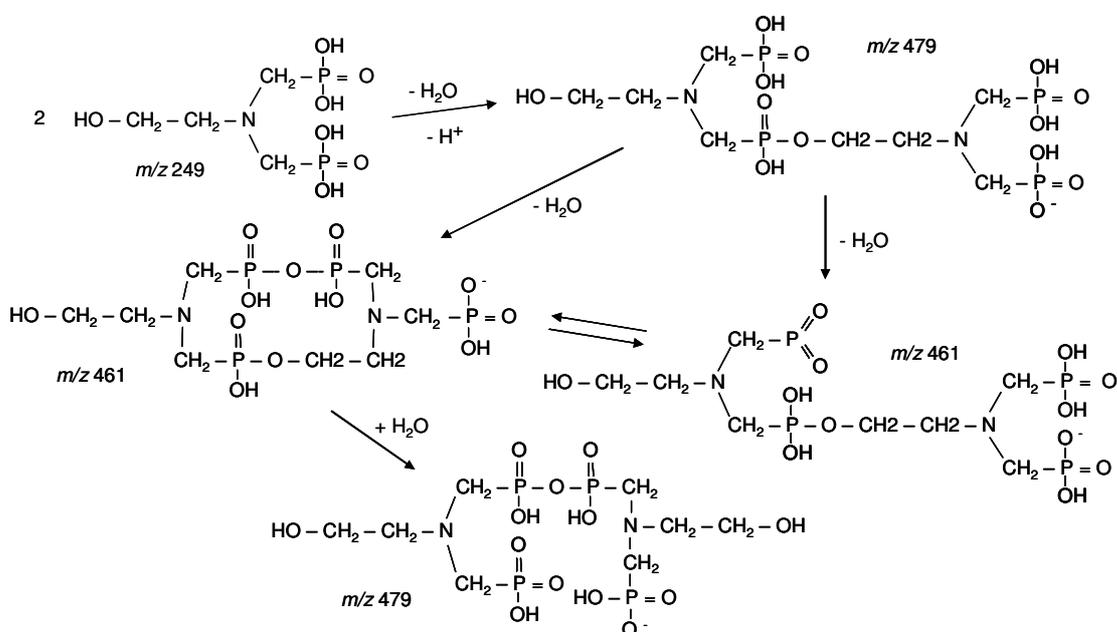


Figura 6. Esquema de la reacción de formación del éster intermolecular y posible reorganización de los ésteres en **VI**, mostrando parte de las reacciones observadas (no se incluyen los aductos con iones sodio).

Por el contrario, en el espectro de **VII** no se observó ni formación de éster ni ganancia de agua. En este compuesto, están unidos al mismo átomo de carbono los dos grupos fosfonato y el grupo hidroxilo, por lo tanto, la formación de ésteres y los aductos con agua tendrán probablemente un fuerte impedimento estérico. Se observaron el pico base, $[M-H]^-$ (m/z 205), y picos de más baja intensidad debidos a los iones $[M-2H+Na]^-$, y a las pérdidas de una y dos moléculas de agua con respecto al ion $[M-H]^-$. Una primera pérdida de agua podría deberse a la deshidratación de uno de los dos grupos fosfonato para dar lugar a $-PO_2$, o la condensación entre ellos para dar lugar a un enlace P-O-P (Fig. 7). Una segunda pérdida de agua podría deberse a la formación de un enlace P-O-C dando lugar a un ciclo de tres miembros (como se propuso para el clodronato [13]), o la reducción de un enlace C-C con pérdida del hidroxilo y protones en los dos átomos de carbono (Fig. 7). También se observó un pico a m/z 123, que correspondía a una pérdida de H_3PO_3 con respecto al ión $[M-H]^-$.

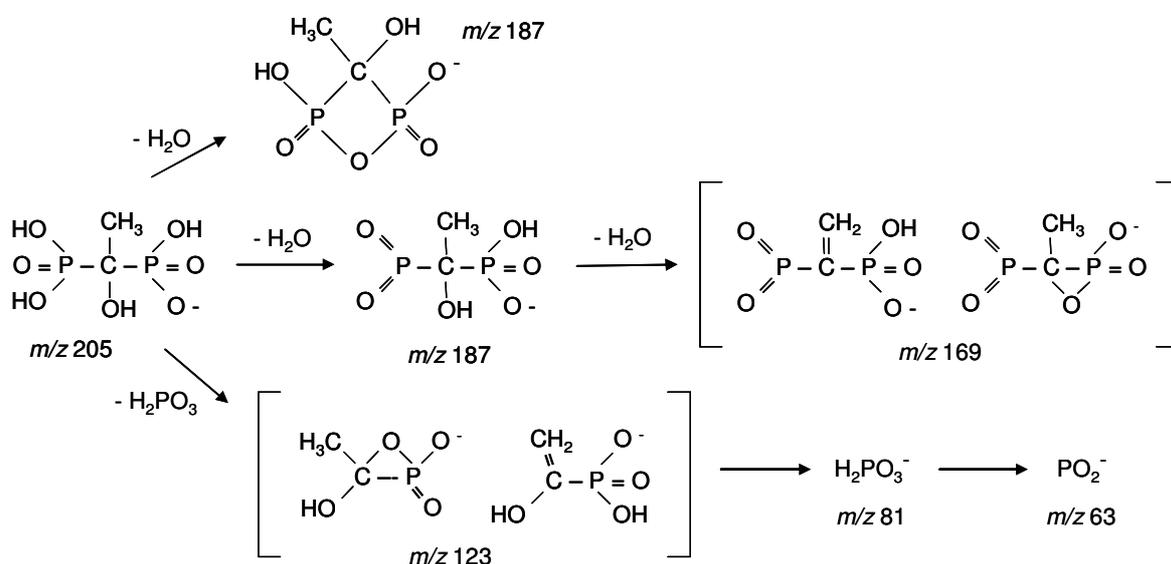


Figura 7. Esquema de las reacciones de fragmentación de **VII** (no se incluyen los aductos con iones sodio).

VIII.3.3. Espectro de VIII

A diferencia de los productos I a VII, el producto VIII tiene un único grupo fosfonato y tres grupos carboxilato. En consecuencia, su espectro de masas (véase Fig. 8 y Tabla 2) fue muy diferente de los de los otros compuestos. El pico más intenso correspondió al ión $[M-H]^-$. Este pico fue el primero de una serie de picos con valores de m/z $[M - nH + (n-1)Na]^-$, donde $4 \geq n \geq 1$ (m/z 269-335), lo cual demostró que no sólo los grupos fosfonato, sino también los grupos carboxilato, eran capaces de captar iones sodio. Se observaron picos correspondientes a las pérdidas de agua de los iones $[M - nH + (n-1)Na]^-$, excepto para $n = 4$. El aumento del número de pérdidas de agua al disminuir los valores de n se puede explicar por la deshidratación del grupo fosfonato y por la condensación del grupo fosfonato y de los grupos carboxilato (Fig. 9). Las sucesivas pérdidas de agua sugieren que grupos previamente condensados también pueden condensar con los grupos ácidos que quedan disponibles. El pico a m/z 189 puede ser debido tanto a la pérdida de un grupo fosfonato como HPO_3 , como al producto de dos pérdidas de agua y CO_2 . Sólo este segundo camino fue confirmado por los espectros de MS^2 y MS^3 . También se observaron picos debidos a otras combinaciones de pérdidas de agua y CO_2 . Como se comentará en el siguiente apartado de este capítulo, no se observaron en los electroferogramas de CZE-ESI-ITMS impurezas debidas a la falta de grupos carboxilato o fosfonato con respecto a la estructura nominal de VIII.

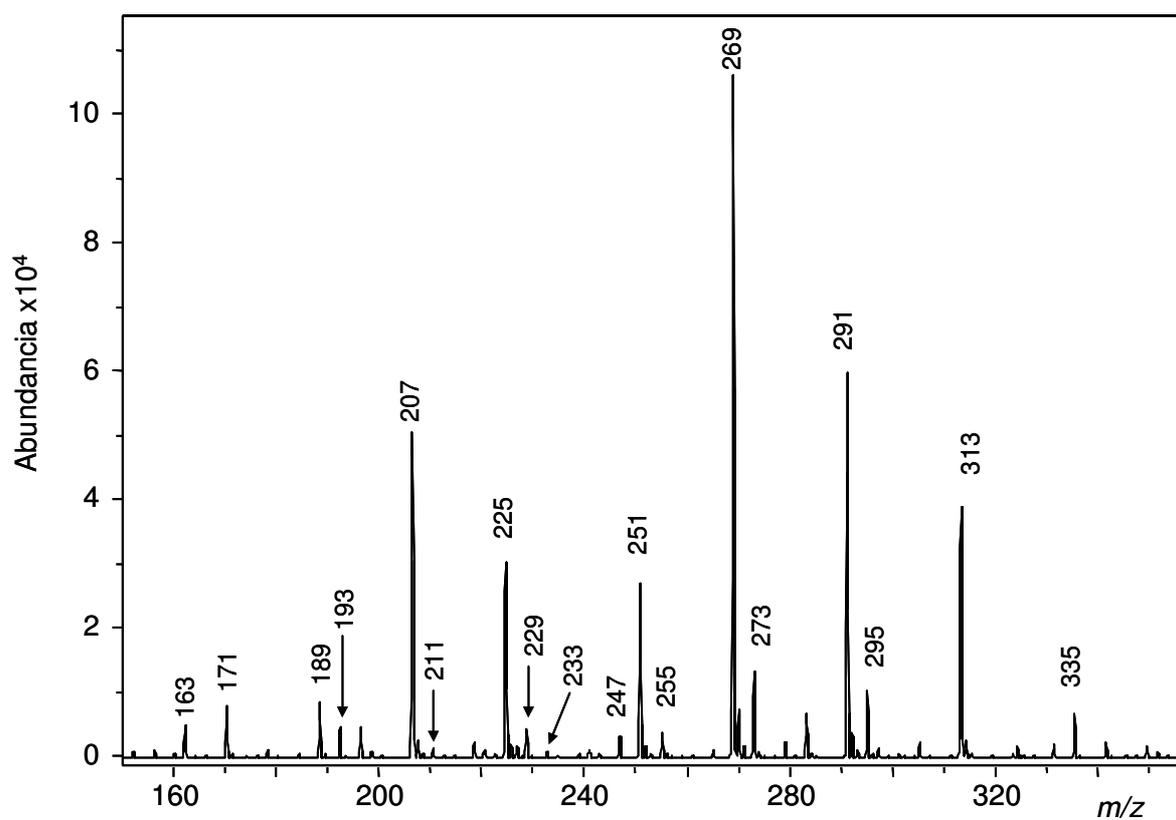


Figura 8. Espectro de **VIII** en modo ion-negativo y medio ácido.

Tabla 2. Iones observados para el ácido fosfono-tricarboxílico **VIII**

<i>n</i>	<i>m/z</i> [M- <i>n</i> H+(<i>n</i> -1)Na] ⁻	<i>m/z</i> después de las pérdidas de masa respecto a [M- <i>n</i> H+(<i>n</i> -1)Na] ⁻ ^a						
		<i>i</i> H ₂ O	<i>i</i> CO ₂	HPO ₃	<i>i</i> H ₂ O + <i>j</i> CO ₂	<i>i</i> H ₂ O + HPO ₃	<i>i</i> CO ₂ + HPO ₃	H ₂ O + CO ₂ + HPO ₃
4	335	-	-	-	-	-	-	-
3	313	295	269	233	251	215 ^b	-	-
2	291	273 255	247 203 ^b	211	229	193	167 ^b	-
1	269	251 233 215 ^b	225 181 ^b 137 ^b	189	207 189 163	171 153	145 101	127

^a Los índices *i* y *j* indican pérdidas sucesivas.

^b Picos con muy baja intensidad.

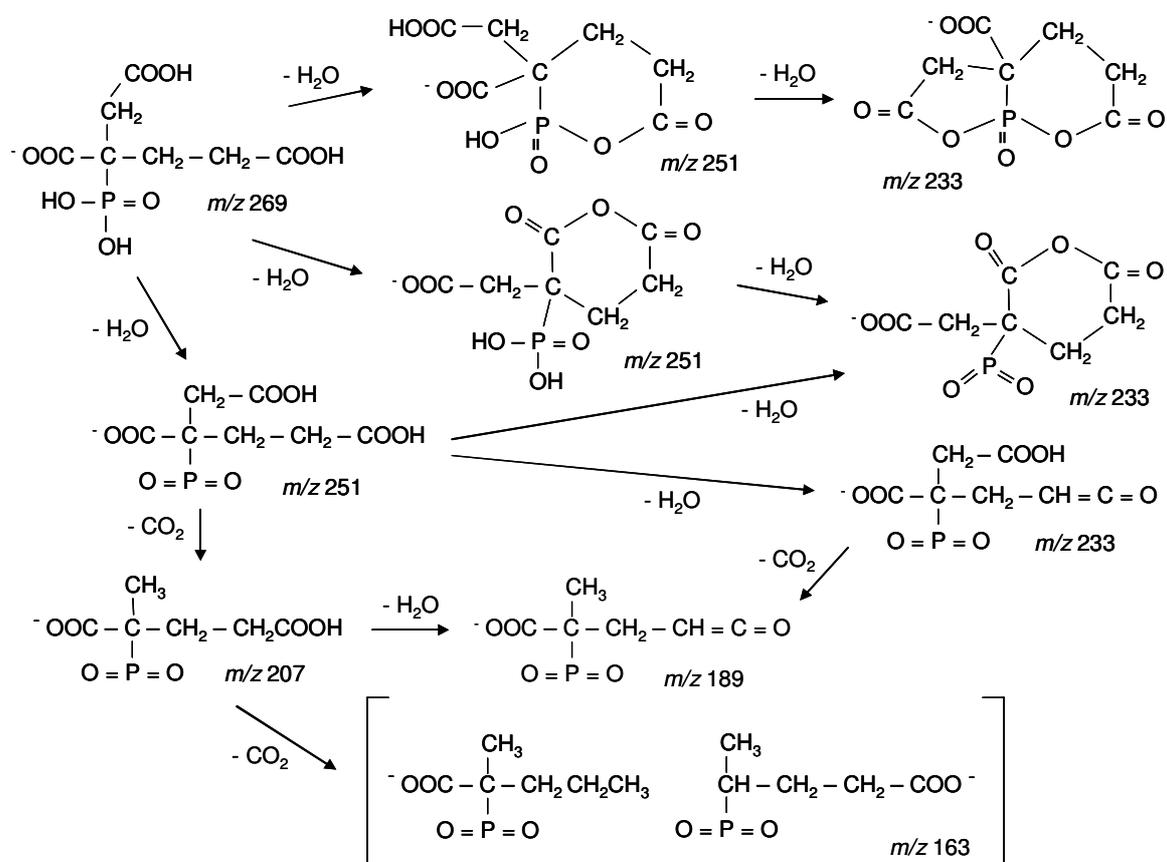


Figura 9. Esquema de las reacciones de fragmentación de **VIII** (no se incluyen los aductos con iones sodio).

VIII.3.4. Separación de los componentes predominantes y las impurezas por CZE-ESI-ITMS

La separación de los componentes predominantes y las impurezas en los productos **I – V** se llevó a cabo usando CZE-ESI-ITMS. Para suprimir el flujo electroosmótico y reducir la fuerte movilidad aniónica que tienen estos solutos multicargados, se seleccionó un BGE con un pH = 2,2. Para optimizar las condiciones de la detección en espectrometría de masas, se usó una disolución de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de **VII** (usando el rango de masas m/z 150-250 y la masa diana m/z 205). Mediante la optimización de la temperatura de secado, el flujo del gas de secado y la presión del gas de nebulizado, se mejoró la relación señal-ruido del único pico observado en los

electroferogramas. A continuación se obtuvieron los electroferogramas de los otros compuestos usando como masa diana los respectivos valores de m/z de los picos más significativos de los componentes predominantes y de las impurezas. Los electroferogramas de ion extraído (EIEs) de **I** mostraron un pico intenso a 3,5 min correspondiente a **I5P**, y otro más pequeño a aproximadamente 3,9 min que correspondió a los isómeros posicionales asimétricos y simétricos de **I4P** (Fig. 10). Los espectros de masas obtenidos en los máximos de los picos mostraron los respectivos perfiles característicos esperados para **I5P** y **I4P**. Se observaron también, a un tiempo de migración de aproximadamente 5 min, los picos m/z 412 y m/z 434, correspondientes a los isómeros posicionales de **I3P**, aunque con muy baja intensidad.

Para los compuestos **II** a **V** se obtuvieron EIEs similares, que mostraban resueltos los picos del compuesto nominal y los de la impureza correspondiente con un grupo fosfonato menos. En todos los casos, los espectros en los máximos de los picos a lo largo de la variable tiempo mostraron los perfiles esperados, incluyendo la formación de aductos con Na^+ , y las pérdidas de agua y H_3PO_3 observadas previamente en los espectros de infusión directa. Los EIEs de los productos **VI** – **VIII** mostraron picos únicos correspondientes a los respectivos compuestos nominales.

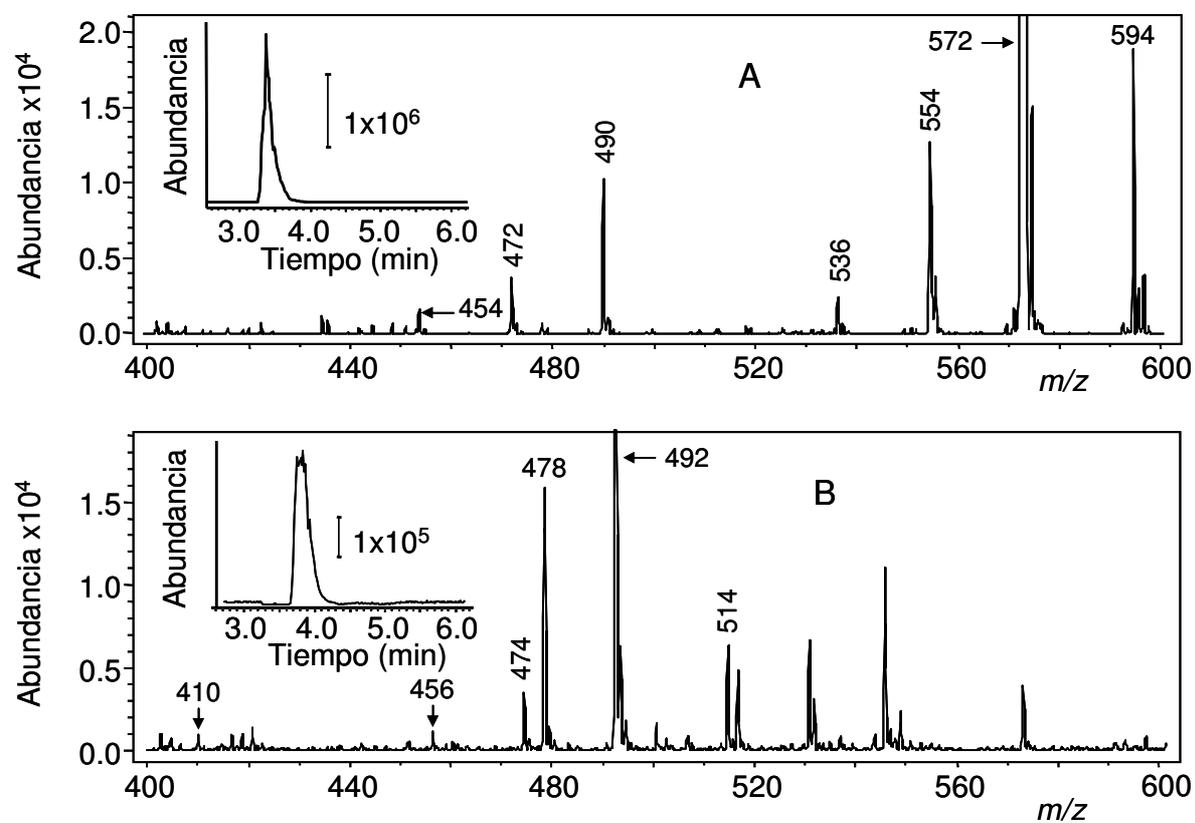


Figura 10. Señal CZE-ESI-MS para **I**; espectros de masas a 3,4 (A) y 3,9 min (B); en A y B se indican los valores de m/z de los picos significativos de los espectros de **I5P** y **I4P**, respectivamente; los insertos muestran los EIEs obtenidos para m/z $572,0 \pm 0,5$ (A) y $492,0 \pm 0,5$ (B).

VIII.4. Conclusiones

Los APPs de grado técnico se pueden caracterizar de forma rápida empleando infusión directa en ITMS, trabajando en modo ion-negativo, y usando tanto medio ácido como básico. Se pueden detectar las impurezas que contienen uno o dos grupos fosfonato menos que el respectivo compuesto nominal, y se pueden establecer sus estructuras. Para los alquilaminofosfonatos (productos **I** a **V**) se observaron perfiles espectrales característicos, basados en reglas simples, que incluían iones $[M-nH+(n-1)Na]^-$ (o los equivalentes pero con iones potasio en lugar de iones sodio), pérdidas de agua, de H_3PO_3 y pérdidas combinadas, siendo el número de pérdidas dependiente del número de grupos fosfonato en la estructura.

El espectro del hidroxibisfosfonato **VI** mostró picos correspondientes a ésteres intermoleculares formados hasta por 4 unidades del compuesto nominal. Cada uno de estos ésteres experimenta deshidratación y formación de aductos con agua. Los espectros de MS^2 y MS^3 mostraron también las esperadas pérdidas de H_3PO_3 . Por su parte, el hidroxibisfosfonato **VII** no mostró formación de ésteres, probablemente debido a impedimento estérico. El producto **VII** también mostró un perfil complejo de pérdidas de agua y H_3PO_3 . El espectro de masas del ácido fosfono-tricarboxílico **VIII**, mostró iones con la estructura $[M-nH+(n-1)Na]^-$ y pérdidas de agua y CO_2 .

Se explicaron satisfactoriamente todos los caminos de reacción de los productos **I** a **VIII**, incluyendo los compuestos predominantes y sus respectivas impurezas. Espectros tan complejos obtenidos usando una fuente tan suave como ESI revelan una alta reactividad para los alquilaminopolifosfonatos y para compuestos relacionados. Se usó un procedimiento de CZE-ESI-ITMS para aislar los compuestos nominales y sus impurezas, y asegurar así la existencia de estas últimas. Se ha demostrado cómo la espectrometría de masas, sin y con separación electroforética

previa, puede ser muy útil para el control de calidad de APPs industriales, y para identificar y caracterizar estos compuestos en productos manufacturados y muestras medioambientales.

VIII.5. Referencias

- [1] B. Nowack, Environmental chemistry of phosphonic acids, in Phosphorus in Environmental Technology, E. Valsami-Jones, ed., IWA Publ., London 2004, pp. 147-173.
- [2] B. Nowack, Water Res. 37 (2003) 2533.
- [3] A. T. Stone, M. A. Knight, B. Nowack, Speciation and chemical reactions of phosphonate chelating agents in aqueous media, in Chemicals in the Environment: Fate, Impacts and Remediation, R. L. Lipnick, R. P. Mason, M. L. Phillips, C. U. Pittman, eds., ACS Symposium Series No. 806, Am. Chem. Soc., Washington DC 2001, pp. 59-94.
- [4] G. Tchäbunin, P. Fisher, G. Schwedt, Fresenius Z. anal. Chem. 333 (1989) 111.
- [5] G. Tchäbunin, P. Fisher, G. Schwedt, Fresenius Z. anal. Chem. 333 (1989) 117.
- [6] E. Vaeth, P. Sladek, K. Kenar, Fresenius Z. anal. Chem. 329 (1987) 584.
- [7] R. Thompson, N. Grinberg, H. Perpall, G. Bicker, P. Tway, J. Liq. Chromatogr. 17 (1994) 2511.
- [8] K. Mahabir, S. van Stroe, J. Chromatogr. A 771 (1997) 1155.
- [9] B. Nowack, J. Chromatogr. A 773 (1997) 139.
- [10] B. Nowack, Water Res. 32 (1998) 1271.
- [11] J. Klinger, F. Sacher, H-J. Brauch, D. Maier, Acta Hydrochim. Hydrobiol. 25 (1997) 79.
- [12] S. A. Shamsi, N. D. Danielson, Anal. Chem. 67 (1995) 1845.
- [13] K. Huikko, T. Kotiaho, J. Yli-Kauhaluoma, R. Kostianen, J. Mass Spectrom. 37 (2002) 197.
- [14] K. Huikko, R. Kostianen, J. Chromatogr. A 872 (2000) 289.
- [15] H. H. Hill, S. J. Martin, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 2281.
- [16] M. Palit, A. K. Gupta, R. Jain, S. K. Raza, J. Chromatogr. A 1043 (2004) 275.

-
- [17] E. W. J.Hooijschuur, C. E.Kientz, U. A. T.Brinkman, J. Chromatogr. A 907 (2001) 165.
- [18] E. W.Hooijschuur, C. E. Kientz, U. A. Brinkman, J. Chromatogr A 928 (2001) 187.
- [19] A. E. Nassar, S. V.Lucas, W. R. Jones, L. D.Hoffland, Anal. Chem. 70 (1998) 1085.
- [20] A. E. Nassar, S. V.Lucas, C.A. Myler, W. R. Jones, M. Campisano, L. D. Hoffland, Anal. Chem. 70 (1998) 3598.
- [21] J. P.Mercier, P.Morin, M. Dreux, A.Tambute, J. Chromatogr A 741 (1996) 279.
- [22] J.Jiang, C. A. Lucy, J. Chromatogr A 966 (2002) 239.
- [23] R. W. Read, R. M. Black, J. Chromatogr A 862 (1999) 169.
- [24] J. P. Mercier, P. Chaimbault, P. Morin, M. Dreux, A. Tambuté, J. Chromatogr A 825 (1998) 71.
- [25] K.Huikko, R. Kostianen, J. Chromatogr. A 893 (2000) 411.
- [26] G. A. Pianetti, M.Taverna, A. Baillet, G. Mahuzier, D. Baylocq-Ferrier, J. Chromatogr. A 630 (1993) 371.

Capítulo IX

Caracterización rápida de alquilpolifosfonatos por electroforesis capilar zonal con detección espectrofotométrica indirecta y espectrometría de masas

(Trabajo enviado para su publicación en la revista *Electrophoresis*)

IX.1. Introducción

En el capítulo VIII se presentó una introducción a la química analítica de los APPs (ver referencias 1-26 del capítulo anterior), y se describieron e interpretaron los espectros de masas de los ocho APPs más comunes. Dichos espectros se obtuvieron por infusión directa en la fuente ESI del espectrómetro de masas de trampa iónica (ESI-ITMS), y se usaron para caracterizar materias primas industriales. También se aplicó un procedimiento de CZE-MS. La finalidad del trabajo expuesto en el presente capítulo consistió en mejorar la resolución del método de CZE-MS, y desarrollar un método de CZE-IPD que también se pudiera usar en control de calidad de APPs en materias primas y productos industriales. Se eligió como agente revelador para IPD el adenosín trifosfato (ATP), que posee un cromóforo intensamente coloreado y un grupo trifosfato fuertemente ácido. Además es bastante más barato que el AMP [1], teniendo, como este último una alta capacidad amortiguadora de pH a lo largo de toda la escala de acidez. Usando un medio francamente ácido (pH 2,2) se consiguió una excelente resolución entre los compuestos nominales y sus impurezas a lo largo de la variable tiempo de migración. El método de CZE-MS se usó tanto para establecer la composición de los ocho APPs más comúnmente usados como materias primas, así como para asignar los picos obtenidos por CZE-IPD a algunos de los compuestos identificados. El método CZE-MS también se aplicó a la identificación de APPs en productos de limpieza.

IX.2. Materiales y métodos

IX.2.1 Instrumentación y condiciones de trabajo

Se usó un sistema de electroforesis capilar 3D CE, provisto de un detector espectrofotométrico de fila de diodos (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), y capilares de sílice fundida (d.i. 50 μm y d.e. 363 μm , Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). El sistema de electroforesis capilar también se acopló a un sistema MS de trampa de iones 1100 Series VL, que disponía de una fuente ESI (Agilent) y de suministro de nitrógeno (pureza 99,5 %, generador Gaslab NG LCMS 20, Equeien, Madrid). Se ha demostrado la posibilidad de utilizar IPD y MS mediante una única inyección en un capilar de 120 cm de longitud [2]. Sin embargo, en este trabajo, se realizaron inyecciones secuenciales en el mismo capilar de 64,5 cm (56 cm de longitud efectiva en el caso de IPD), que se usó tanto en IPD como en detección por MS. Para esta última el capilar se colocó entre el vial más cercano a la salida del sistema de CE y la fuente ESI, sin pasar por la interfaz óptica del espectrofotómetro. Se usó inyección hidrodinámica (5 kPa x 3 s para CZE-IPD, pero 5 kPa x 6 s para CZE-MS), 25 °C y -20 kV. En IPD se usó una longitud de onda de medida de 450 nm, con 260 nm como referencia. Los espectros de infusión directa se obtuvieron en ausencia de voltaje y aplicando 200 kPa en el extremo de entrada del capilar de 64,5 cm, para mantener un caudal continuo de muestra.

En CZE-MS, para establecer el contacto eléctrico a la salida del capilar en el nebulizador triconcéntrico, se usó una envoltura líquida proporcionada por una bomba isocrática HP 1100 de Agilent (con un flujo de 0,4 mL min⁻¹), equipada con una unión en forma de T para producir una división de flujo de 1:100 (por lo tanto, el flujo final de la envoltura líquida fue de 4 $\mu\text{L min}^{-1}$). La envoltura líquida contenía ácido tricloroacético 10 mM en una mezcla metanol-agua con el pH ajustado a 2,2 con amoníaco. Se usó nitrógeno (obtenido del generador) como gas de nebulización (12 psi) y gas de secado (4 L min⁻¹ a 300 °C), y He (C-50, Carbueros Metálicos,

Aranjuez) como gas de colisión. El espectrómetro realizó barridos dentro del rango de 50-800 m/z , el voltaje del capilar fue 4 kV, y se aplicaron 6 V a la máscara 2; el voltaje de la máscara 1 se fijó automáticamente en función de la masa diana. Todas las medidas se hicieron con una carga máxima de la trampa de 3×10^4 cuentas, y un tiempo de acumulación de 300 ms. En infusión directa, el tiempo de adquisición fue de 2 min. Para análisis de datos se utilizó el programario de Agilent LC/MSD v. 4.2.

IX.2.2 Reactivos y muestras

Se usaron los mismos fosfonatos de grado técnico que en el capítulo VIII (ver el apartado VIII.2.2 de dicho capítulo). También se utilizan las mismas abreviaturas, **I-VIII**. Las estructuras moleculares y nombres químicos de los correspondientes compuestos nominales, y de otros compuestos usados en el trabajo desarrollado en este capítulo, se dan en las Tablas 1 a 4. En este capítulo, para hacer referencia a los compuestos nominales de los productos **I** a **VIII** y a sus impurezas, se adoptaron los acrónimos C_nN_mPr que indican el número de átomos de carbono y nitrógeno en el esqueleto hidrocarbonado, y el número de átomos de fósforo (que coincide con el número de grupos fosfonato unidos al esqueleto hidrocarbonado). También se indicaron los grupos adicionales como -OH y -COOH, por ejemplo, **VI-C4N1P2(OH)**. Cuando fue necesario, se añadió una letra minúscula para distinguir isómeros posicionales. En la Tablas 1-3 también se dan los pesos estadísticos de los isómeros dentro de sus respectivos grupos. Estos pesos se computaron a partir del número de combinaciones de los sitios disponibles para enlazar grupos -PO(OH)₂ o -CH₂PO(OH)₂ que daban lugar al mismo isómero. Por ejemplo, hay cuatro posibles lugares para acomodar grupos -PO(OH)₂ en los átomos de carbono localizados en los extremos de la cadena hidrocarbonada de **I**. Sin embargo, sólo hay una posición en el átomo de carbono

enlazado al átomo de nitrógeno central. Por lo tanto, la abundancia relativa de los isómeros **I-C9N3P4a** y **I-C9N3P4b** sería aproximadamente 4:1.

Los demás reactivos utilizados son metanol (Scharlab, Barcelona), ácidos tricloroacético y fórmico, amoníaco acuoso (Panreac, Barcelona), sal disódica hidratada del adenosin 5'-trifosfato (ATP, Fluka, Buchs, Suiza), dietilentriamina (DETA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), y agua desionizada (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA, USA).

IX.2.3. Procedimientos

Los capilares nuevos para CZE se trataron con NaOH 1 y 0,1 M y agua a 60 °C (10 min cada disolución). Diariamente antes de su uso, los capilares se lavaron con NaOH 0,1 M (5 min), agua (5 min) y el tampón de separación (10 min) a 25 °C. Entre inyecciones el capilar se acondicionó con el tampón (5 min). Después de cada sesión de trabajo se lavó con agua durante 10 min. Antes de inyectar, todas las disoluciones se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro (Albet, Alemania). Se inyectaron disoluciones acuosas que contenían 1000, 2000 y 5000 µg mL⁻¹ de cada producto de **I** a **VIII**. Las disoluciones de ATP se almacenaron en nevera a 4 °C.

IX.3 Resultados y discusión

IX.3.1 Composición de los productos I a VIII según los espectros de infusión directa

En el estudio del capítulo anterior se encontraron impurezas de los productos **I** a **V** que contenían el mismo esqueleto hidrocarbonado que el compuesto nominal, pero con uno o dos grupos fosfonato, -PO(OH)₂, sustituidos por protones. En el trabajo desarrollado en este capítulo, también se reconocieron otros tipos de impurezas, a saber, las que carecen de uno o dos grupos metileno-fosfonato, -CH₂PO(OH)₂, o las que no tienen simultáneamente un grupo fosfonato y

otro metileno-fosfonato respecto al correspondiente compuesto nominal. Estas nuevas impurezas se añaden a las ya conocidas, que presentan un déficit de grupos fosfonato pero no de grupos metileno-fosfonato. Como se muestra en las Tablas 1-4, los alquilaminopolifosfonatos (AAPPs) que tienen grupos metileno-fosfonato sustituidos por un protón son aminas secundarias, y los que tienen dos grupos metileno-fosfonato sustituidos por protones pueden ser aminas secundarias o primarias, mientras que los compuestos nominales y sus impurezas a las que exclusivamente les falten grupos fosfonato son aminas terciarias.

Los espectros de masas de infusión directa de las impurezas con grupos metileno-fosfonato sustituidos por protones mostraron los mismos perfiles característicos que los previamente observados para los compuestos nominales y para sus impurezas conteniendo grupos fosfonato sustituidos por protones (véase capítulo anterior). Por tanto, para cada compuesto o grupo de isómeros, los picos principales correspondieron a $[M - H]^-$ y a las sucesivas sustituciones de protones ácidos de los grupos fosfonatos presentes por iones sodio (o potasio), siguiendo la serie $[M - 2H + Na]^-$, $[M - 3H + 2Na]^-$ y así sucesivamente. El máximo número de sustituciones de protones ácidos por iones sodio fue igual al número de grupos fosfonato menos uno (el grupo que contenía la carga negativa). Para los productos **I** a **V**, las Tablas 1 a 3 muestran los valores de m/z de estos picos. En los productos **II** (Tabla 2) y **IV** (Tabla 3) se observaron los picos de la serie $[M - nH + (n-1)K]^-$. Como se indica en las Tablas 1 y 3, picos con varios valores de m/z fueron comunes a dos o más compuestos; sin embargo, cada compuesto o cada grupo de isómeros dio lugar a al menos un pico con un valor de m/z diferente de los de algún otro pico del compuesto nominal o de las otras impurezas que le acompañan, lo que indicó su presencia en la muestra. Muchos otros picos pequeños que aparecen en los espectros de masas de APPs (no indicados en las Tablas) correspondieron a todas las posibles pérdidas de agua, HPO_2 y pérdidas combinadas de agua y HPO_2 con respecto a los iones $[M - nH + (n-1)Na]^-$. Finalmente, otros

picos presentes en los espectros de **I** a **VIII** indicaron la presencia tanto de compuestos deshidratados (ésteres y anhídridos de los compuestos nominales), como de APPs con un esqueleto hidrocarbonado diferente que el de sus respectivos compuestos nominales (secciones IX.3.4 a IX.3.8). Además, con los estudios de CZE-IPD y CZE-MS, se confirmó la presencia de todos los compuestos de las Tablas 1 a 3 en los productos **I** a **V** (secciones IX.3.4 a IX.3.6). Los isómeros no se pueden distinguir unos de otros en los espectros de infusión directa, pero sí que se pueden resolver a lo largo del eje de tiempo en los electroferogramas.

Cuando un valor de m/z coincide con un ion de la serie $[M - nH + (n-1)Na]^+$ para un determinado APP, cualquier otra alternativa queda descartada. La razón es que la masa a la que corresponde la sustitución de un grupo fosfonato por un protón, 80, no coincide con ninguna combinación de C, H y N, excepto si se consideran tres insaturaciones (como tres dobles enlaces, o dos dobles enlaces y un ciclo). La presencia de compuestos insaturados en los APPs no es probable, por lo tanto, una pérdida de 80 unidades de m/z implica la presencia de un grupo fosfonato.

El número de átomos de nitrógeno está limitado por la regla del nitrógeno, que establece que iones con valores impares de m/z o no tienen, o tienen un número par de átomos de nitrógeno, y que iones con valores pares de m/z tienen un número impar de átomos de nitrógeno. Todos los picos de los espectros de masas de **I**, **V** y **VI** tienen valores pares de m/z , y los de los compuestos **IV**, **VII** y **VIII** tienen valores impares (Tablas 1-4). Esto coincide con la paridad del número de nitrógenos del compuesto nominal, impar para **I**, **V** y **VI**, y par para **IV**, **VII** y **VIII**. Esto también indica que el número de nitrógenos de las impurezas tiene la misma paridad que el correspondiente compuesto nominal. Por el contrario, los espectros de **II** y **III** mostraron picos intensos tanto con valores de m/z pares como impares. El compuesto nominal de **II** tiene tres nitrógenos, y de acuerdo a su espectro mostró picos con valores pares de m/z (Tabla 2); sin

embargo también presentó picos a valores de m/z 491, 533 y 403 (Fig. 1). Los dos primeros picos se atribuyeron a la presencia de **IV**-C10N2P4 (el compuesto nominal de **IV**, Tabla 3) y **II**-C13N2P4 (Tabla 2) como impurezas, respectivamente. Para la impureza a m/z 403 no se encontró una estructura razonable. El compuesto nominal de **III** tiene dos nitrógenos, de acuerdo con esto, en el espectro se observaron picos a valores impares de m/z , excepto un pico a m/z 298 que se interpretó como la presencia de **V**-C3N1P3 como impureza (Tabla 3). Finalmente, la presencia de los compuestos indicados en las Tablas 1-4 se confirmó con los EIEs.

IX.3.2 Selección del BGE

Para optimizar el BGE, se llevaron a cabo inyecciones de **I** usando CZE-IPD y medios de ambos tipos, ácidos y básicos. Los BGEs básicos contenían 5 mM de ATP y DETA. La concentración de la amina se varió para ajustar el pH a 7,5, 8,5 y 9,5. Empleando polaridad negativa se obtuvieron varios picos con tiempos de migración inferiores a 6 min. Los BGEs ácidos contenían: (i) 10 mM de ATP que proporcionó un pH de 3,3, y (ii) 10 mM de ATP con la cantidad necesaria de HCl para ajustar el pH a 3,0, 2,5, 2,2 y 2,0. En medio ácido los picos fueron más simétricos y con mejores relaciones señal-ruido, por lo tanto se eligió este medio para los estudios siguientes. También se probó a usar ácido fórmico en lugar de HCl para preparar el BGE a pH 2,2; sin embargo, se obtuvo la misma eficacia y selectividad para los componentes de **I**; por lo tanto, en el resto de experimentos se usó HCl.

La movilidad del EOF a pH 9,0 fue $10 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, y disminuyó al reducir el pH. La movilidad aparente del ATP fue $-7,3 \times 10^{-4}$ y $-6,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ a pH 3,3 y 2,2, respectivamente. La carga neta del ATP es -4 a pH > 6,5, y alrededor de -2 dentro del rango de pH 3,5-2,0 [3, 4], lo cual coincide con su elevada movilidad. La movilidad de los componentes de **I** también fue aniónica y algo menor que la del ATP. La movilidad aparente del compuesto

nominal de **I** (el pico predominante) fue $-3,7 \times 10^{-4}$ y $-3,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ a pH 3,3 y 2,2, respectivamente. A estos pHs las movilidades de las impurezas de **I** fueron algo menores que la del compuesto nominal. Tomando como compuesto modelo para la acidez de los APPs el ácido metilfosfónico, $\text{CH}_3\text{PO}(\text{OH})_2$, con $\text{pK}_1 = 2,3$ y $\text{pK}_2 = 7,8$ (referencia 3 del capítulo VIII), se deduce la presencia de una y menos de una carga negativa por grupo fosfonato a pH 3,3 y 2,2, respectivamente. La presencia de varios grupos fosfonato explica las elevadas movilidades. Finalmente, las movilidades de los componentes de **I** fueron algo menores que la del contra-ion del BGE (ATP), lo cual contribuyó al hacinado de la muestra, ayudando por lo tanto a conseguir mayores eficacias en un amplio rango de movilidades de analito [5].

La resolución a lo largo de los componentes de **I** mejoró cuando el pH se redujo desde 3,0 hasta 2,2 (Fig. 2). Todo el trabajo siguiente se hizo a pH 2,2. Usando en CZE-IPD un capilar de longitud 64,5 cm en lugar de 33,5 cm se consiguió también mucha mayor resolución entre los componentes de los productos **I** a **VIII**, sin que se produjera un aumento excesivo del tiempo de análisis; por tanto, en los experimentos siguientes se usó el capilar de mayor longitud. También se examinó la estabilidad de la disolución de ATP. Para ello, se registró el espectro de masas de infusión directa del BGE a pH 2,2 que había sido almacenado por más de 45 días, y se comparó con el espectro obtenido con el BGE recién preparado. Los espectros mostraron que la relación entre los picos de los iones $[\text{M-H}]^-$ de ATP y de adenosin difosfato fue aproximadamente de 2 en un BGE con 45 días y en uno nuevo. Por lo tanto, se puede asumir que la disolución de ATP usada como BGE es estable.

Tabla 1. Estructuras moleculares y picos principales de los compuestos encontrados en el producto I (Briquest 543/45AS)

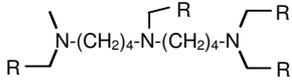
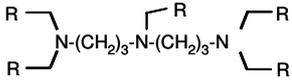
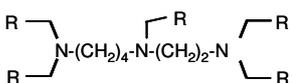
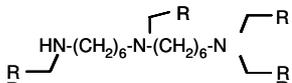
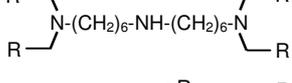
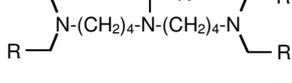
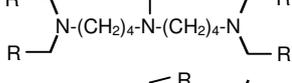
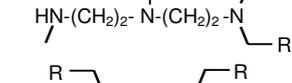
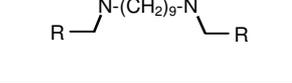
Estructura molecular R = PO(OH) ₂	Nombre químico, acrónimo, peso estadístico dentro del grupo de isómeros (p.est.), y picos de las series [M - nH + (n - 1)Na] ⁻
	Ácido dietilen-triaminopentakis(metilenfosfónico) ^{a)} I-C9N3P5, sin isómeros, <i>m/z</i> 572, 594, 616, 638, 660
	Ácido dietilen-triamino(1-metil)tetrakis(metilenfosfónico) I-C9N3P4a, p.est. 4, <i>m/z</i> 492, 514, 536 ^{b)} , 558 ^{b)}
	Ácido dietilen-triamino(4-metil)tetrakis(metilenfosfónico) I-C9N3P4b, p.est. 1, <i>m/z</i> 492, 514, 536 ^{b)} , 558 ^{b)}
	Ácido dietilen-triamino(1,1'-dimetil)tris(metilenfosfónico) I-C9N3P3a, p.est. 2, <i>m/z</i> 412 ^{b)} , 434, 456 ^{c)}
	Ácido dietilen-triamino(1,4-dimetil)tris(metilenfosfónico) I-C9N3P3b, p.est. 2, <i>m/z</i> 412 ^{b)} , 434, 456 ^{c)}
	Ácido dietilen-triamino(1,1-dimetil)tris(metilenfosfónico) I-C9N3P3c, p.est. 1, <i>m/z</i> 412 ^{b)} , 434, 456 ^{c)}
	Ácido dietilen-triaminotetrakis(1,1,4,1'-metilenfosfónico) I-C8N3P4a, p.est. 4, <i>m/z</i> 478 ^{c)} , 500 ^{b)} , 522, 544
	Ácido dietilen-triaminotetrakis(1,1,1'-metilenfosfónico) I-C8N3P4b, p.est. 1, <i>m/z</i> 478 ^{c)} , 500 ^{b)} , 522, 544
	Ácido dietilen-triaminotris(1,4,1'-metilenfosfónico) I-C7N3P3a, p.est. 2, <i>m/z</i> 384, 406, 428
	Ácido dietilen-triaminotris(1,1,1'-metilenfosfónico) I-C7N3P3b, p.est. 2, <i>m/z</i> 384, 406, 428
	Ácido dietilen-triaminotris(1,1,4-metilenfosfónico) I-C7N3P3c, p.est. 1, <i>m/z</i> 384, 406, 428
	Ácido dietilen-triamino(1-metil)tris(1,4,1'-metilenfosfónico) I-C8N3P3a, p.est. 2, <i>m/z</i> 398, 420, 442
	Ácido dietilen-triamino(4-metil)tris(1,1,1'-metilenfosfónico) I-C8N3P3b, p.est. 1, <i>m/z</i> 398, 420, 442
	Ácido dietilen-triamino(1-metil)tris(1,1,1'-metilenfosfónico) I-C8N3P3c, p.est. 1, <i>m/z</i> 398, 420, 442
	Ácido dietilen-triamino(1-metil)tris(1',1',4-metilenfosfónico) I-C8N3P3d, p.est. 1, <i>m/z</i> 398, 420, 442

^{a)} Compuesto nominal

^{b)} Solapados con alguno de los siguientes picos de los compuestos nominales: [M - 2H + Na - 2H₂O]⁻ (*m/z* 558), [M - H - 2H₂O]⁻ (*m/z* 536), [M - H - 4H₂O]⁻ (*m/z* 500) y [M - 2H + Na - H₂O - 2H₃PO₃]⁻ (*m/z* 412)

^{c)} Solapados con alguno de los siguientes picos de los isómeros de I-C9N3P4 : [M - 2H + Na - 2H₂O]⁻ (*m/z* 478) y [M - H - 2H₂O]⁻ (*m/z* 456)

Tabla 2. Estructuras moleculares y picos principales de los compuestos encontrados en el producto **II** (Dequest 2090)

Estructura molecular R = PO(OH) ₂	Nombre químico, acrónimo, peso estadístico dentro del grupo de isómeros (p.est.), y picos de las series [M - nH + (n - 1)Na] ⁻
	Ácido dihexameten-triaminopentakis(metilenfosfónico) ^{a)} II-C17N3P5 , sin isómeros, <i>m/z</i> 684, 706, 722 ^{b)}
	Ácido dipropilen-triaminopentakis(metilenfosfónico) II-C11N3P5 , isómero simétrico, <i>m/z</i> 600
	Ácido butilen-etilen-triaminopentakis(metilenfosfónico) II-C11N3P5 , posible isómero asimétrico, <i>m/z</i> 600
	Ácido dihexameten-triaminotetrakis(1,1,8,1'-metilenfosfónico) II-C16N3P4a , p.est. 4, <i>m/z</i> 590
	Ácido dihexameten-triaminotetrakis(1,1,1',1'-metilenfosfónico) II-C16N3P4b , p.est. 1, <i>m/z</i> 590
	Ácido dibutilen-triamino(1-metil)tetrakis(metilenfosfónico) II-C13N3P4a , p.est. 4, <i>m/z</i> 548
	Ácido dibutilen-triamino(6-metil)tetrakis(metilenfosfónico) II-C13N3P4b , p.est. 1, <i>m/z</i> 548
	Ácido dietilen-triamino(1,1'-dimetil)bis(1,4-metilenfosfónico) II-C8N3P2 , mezcla de seis isómeros posicionales, <i>m/z</i> 318
	Ácido nonameten-diaminotetrakis(metilenfosfónico) II-C13N2P4 , sin isómeros, <i>m/z</i> 533

^{a)} Compuesto nominal

^{b)} Ion conteniendo K⁺ en lugar de Na⁺

Tabla 3. Estructuras moleculares y picos principales de los compuestos encontrados en los productos **III**, **IV** y **V**

Producto y nombre comercial	Estructura molecular R = PO(OH) ₂	Nombre químico, acrónimo, peso estadístico dentro del grupo de isómeros (p.est.), y picos de las series [M - nH + (n - 1)Na] ⁻
III Dequest 2046		Ácido etilen-diaminotetrakis(metilenfosfónico) ^{a)} III-C6N2P4 , sin isómeros, <i>m/z</i> 435, 457, 479, 501
		Ácido etilen-diamino(N-metil)tris(metilenfosfónico) III-C6N2P3 , sin isómeros, <i>m/z</i> 355, 377, 399 ^{b)}
		Ácido etilen-diamino(N,N'-dimetil)bis(metilenfosfónico) III-C6N2P2a , p.est. 2, <i>m/z</i> 275, 297
		Ácido etilen-diamino(N,N-dimetil)bis(metilenfosfónico) III-C6N2P2b , p.est. 1, <i>m/z</i> 275, 297
		Ácido etilen-diaminotris(metilenfosfónico) III-C5N2P3 , sin isómeros, <i>m/z</i> 341, 363, 385
		Ácido etilen-diaminobis(N,N'-metilenfosfónico) III-C4N2P2a , p.est. 2, <i>m/z</i> 247, 269
		Ácido etilen-diaminobis(N,N-metilenfosfónico) III-C4N2P2b , p.est. 1, <i>m/z</i> 247, 269
		Ácido etilen-diaminobis(N-metil)bis(N,N'-metilenfosfónico) III-C5N2P2a , p.est. 2, <i>m/z</i> 261, 283
IV Dequest 2054		Ácido hexametilen-diaminotetrakis(metilenfosfónico) ^{a)} IV-C10N2P4 , sin isómeros, <i>m/z</i> 491, 529 ^{c)} , 567 ^{c)} , 605 ^{c)}
		Ácido hexametilen-diamino(N-metil)bis(metilenfosfónico) IV-C10N2P3 , sin isómeros, <i>m/z</i> 411, 449 ^{c)} , 487 ^{c)} , 525 ^{c)}
V Briquest 301-50A		Ácido aminotris(metilenfosfónico) ^{a)} V-C3N1P3 , sin isómeros, <i>m/z</i> 298, 320, 342
		Ácido metilaminobis(metilenfosfónico) V-C3N1P2 , sin isómeros, <i>m/z</i> 218, 240
		Ácido aminobis(metilenfosfónico) V-C2N1P2 , sin isómeros, <i>m/z</i> 204, 226

^{a)} Compuesto nominal

^{b)} Pico solapado con el pico [M - H - 2 H₂O]⁻ del compuesto nominal de **III**
^{c)} Ion conteniendo K⁺ en lugar de Na⁺

Tabla 4. Estructuras moleculares y picos principales de los compuestos encontrados en los productos **VI**, **VII** y **VIII**

Producto y nombre comercial	Estructura molecular R = PO(OH) ₂	Nombre químico, acrónimo y pico principal
VI SPE 0101		Ácido hidroxietil-aminobis(metilenfosfónico) ^{a)} VI-C4N1P2(OH) , <i>m/z</i> 248
		Éster intramolecular del compuesto nominal VI-C4N1P2(O) , <i>m/z</i> 230
VII Briquest ADPA-60A		Ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico ^{a)} VII-C2P2(OH)a , <i>m/z</i> 205
		Ácido 1-hidroxietiliden-1,2-difosfónico VII-C2P2(OH)b , <i>m/z</i> 205
VIII Bayhibit AM		Ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico ^{a)} VIII-C4P1(COOH)₃ , <i>m/z</i> 269
		Seis anhídridos intramoleculares del compuesto nominal, <i>m/z</i> 251

^{a)} Compuesto nominal

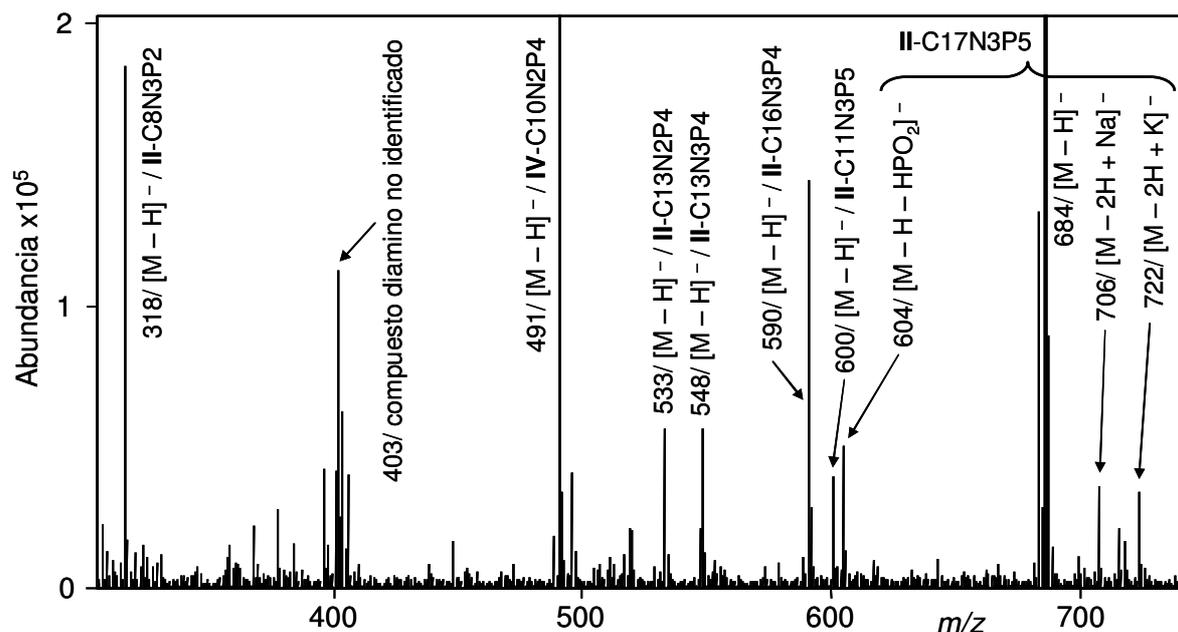


Figura 1. Sección del espectro de **II** en modo ion-negativo, obtenido por infusión de una disolución de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Están marcados los picos de las series $[\text{M} - n\text{H} + (n-1)\text{Na}]^-$ y $[\text{M} - n\text{H} + (n-1)\text{K}]^-$ (indicados en la Tabla 2), más el pico $[\text{M} - \text{H} - \text{HPO}_2]^-$ a m/z 604, y los de las diaminas a valores de m/z impares.

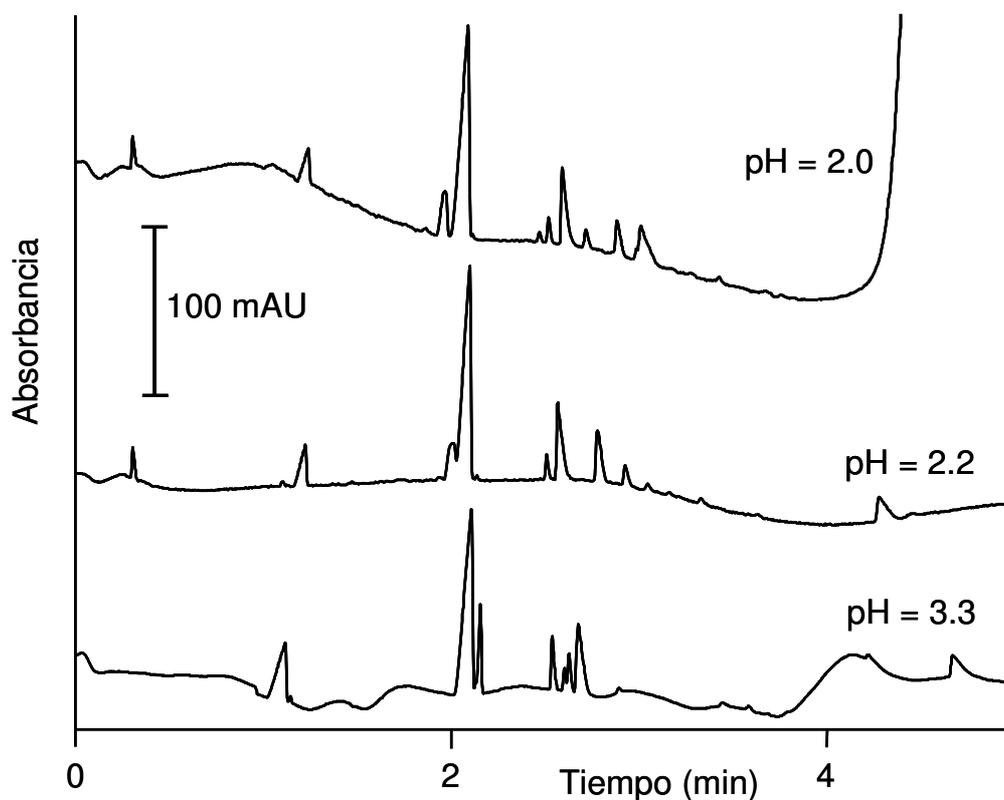


Figura 2. Electroferograma CZE-IPD de **I**, obtenido con el capilar de 33,5 cm de longitud inyectando una disolución de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a diferentes valores de pH.

IX.3.3 Selección de las condiciones de trabajo para CZE-MS e interpretación de los datos

Los primeros experimentos se llevaron a cabo inyectando **I** y usando CZE-MS con el capilar de 64.5 cm. Sobre el electroferograma de iones totales (TIE) se observaron picos con tiempos de migración muy cortos y con una resolución bastante baja. El electroferograma contenía también picos a valores de m/z de los componentes de la muestra extendidos por todo el intervalo de tiempo observado. Esto se atribuyó al efecto de la presión de succión ejercida por el nebulizador de la fuente ESI durante las etapas de inyección y separación. Se obtuvieron resultados mucho mejores manteniendo inoperativos los suministros de gas de nebulización y de secado durante la inyección, y conectándolos inmediatamente después de empezar a aplicar el voltaje de separación. Además se aplicó una presión negativa en el vial de entrada durante la separación, para contrarrestar la presión de succión, lo que mejoró la resolución y retrasó los picos. La mejor resolución se obtuvo usando -30 mbar (-3 kPa), que canceló en su mayor parte el efecto de la presión de succión. Con esto se consiguió que los picos en los electroferogramas de CZE-MS aparecieran aproximadamente dentro de la misma región de tiempos que en los electroferogramas de CZE-IPD.

En estas condiciones se obtuvieron los electroferogramas de CZE-MS de los productos **I** a **VIII**, usando en cada caso como masa diana el valor de m/z del pico $[M - H]^+$ del compuesto nominal. Se examinaron sistemáticamente los electroferogramas bidimensionales en MS para obtener los electroferogramas de ion extraído (EIEs) a los valores de m/z de todos los picos significativos presentes en los correspondientes espectros de infusión directa. Como se muestra en las secciones siguientes, esto dio lugar a la identificación de la mayoría de los picos que aparecieron en los trazos CZE-IPD. Debido a la separación de los compuestos a lo largo de la variable tiempo, no fue necesario preocuparse por buscar y extraer iones que no tuviesen solapamiento espectral. Para comprobar si los compuestos deshidratados (ésteres y anhídridos)

estaban presentes en las disoluciones inyectadas, se tomó la precaución de obtener también los EIEs a los valores de m/z de los picos $[M - H - H_2O]^+$ de los espectros.

En las Figs. 3-8, 10 y 11 (partes A), se muestran los electroferogramas de CZE-IPD de los productos **I** a **VIII**, acompañados en cada caso por los EIEs que mostraron tener picos significativos. Los EIEs se obtuvieron a partir de los respectivos electroferogramas de CZE-MS (partes B de las figuras). Los ejes de tiempo de los trazos CZE-MS (cada uno constituido por una colección de EIEs) no coincidieron con los de los trazos CZE-IPD, debido a la irregular e incompleta compensación del efecto de succión. Por ello, para facilitar la comparación de los trazos, el eje de tiempos del trazo CZE-MS se desplazó y se expandió con respecto al eje de tiempos de los respectivos trazos de CZE-IPD.

IX.3.4 Composición de I

El pico más intenso de los electroferogramas de CZE-IPD de **I** (Fig. 3A) correspondió al ion $[M - H]^+$ del compuesto nominal, **I-C9N3P5**. Como se muestra en los EIEs (Fig. 3B), a continuación le seguían los picos de las impurezas con cuatro grupos fosfonato. La asignación de los picos en el electroferograma CZE-IPD se hizo a la vista de la estrecha semejanza entre el electroferograma CZE-IPD y los correspondientes EIEs a m/z 492 y 478. El orden entre los pares de isómeros **I-C9N3P4a/ I-C9N3P4b** y **I-C8N3P4a/ I-C8N3P4b** también se estableció de acuerdo con la semejanza entre las relaciones de las áreas de los picos en los electroferogramas y los pesos estadísticos de la Tabla 1. Así, el pico con más área de cada pareja se asignó al isómero “a”, cuyo peso estadístico es mayor.

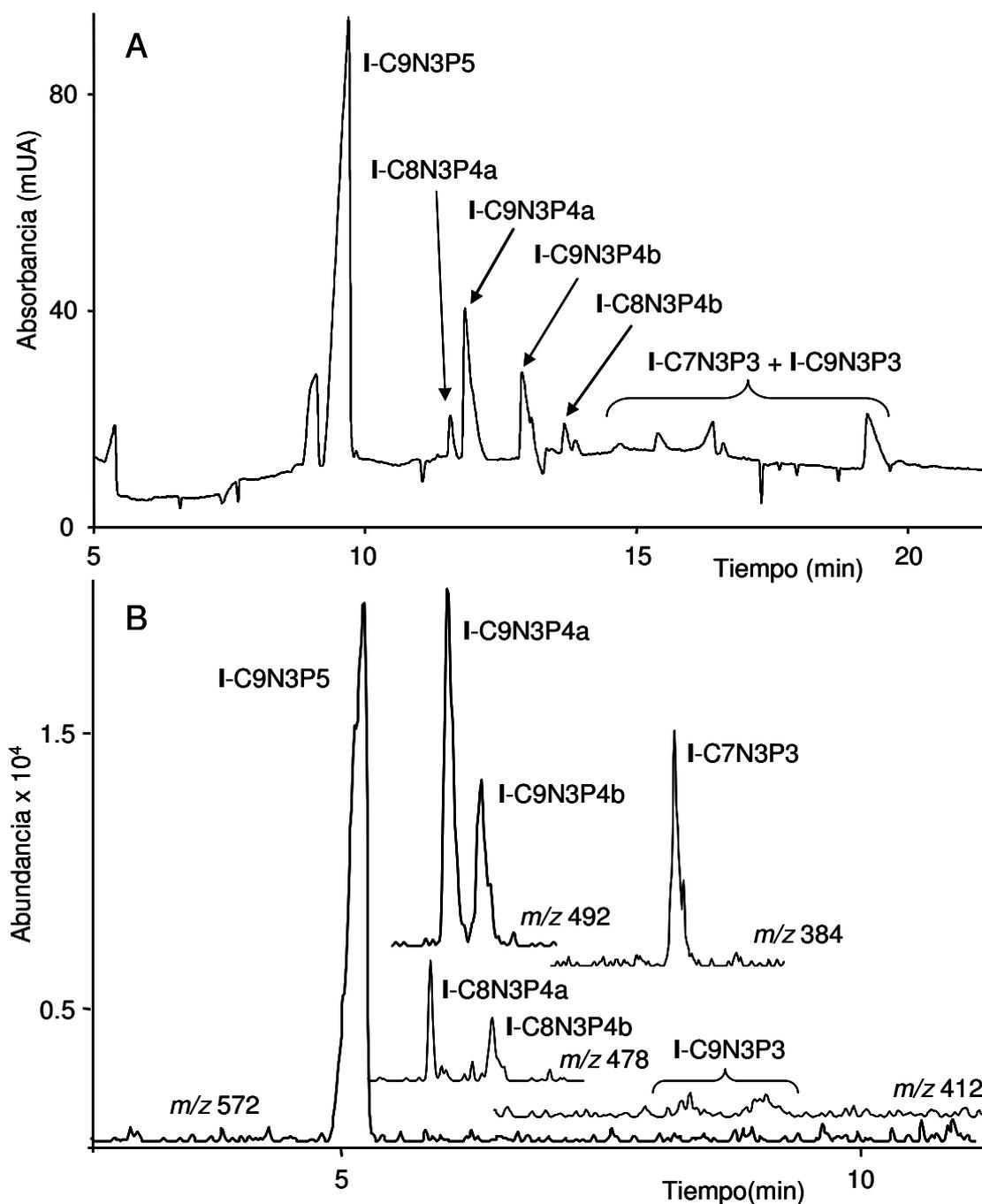


Figura 3. Electroferogramas de **I** obtenidos inyectando una disolución de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$: CZE-IPD (parte A) y CZE-MS (parte B; EIEs extraídos a los valores de m/z indicados en los trazos).

El orden observado en los electroferogramas indica que es mayor la disminución de la densidad de carga de las impurezas con respecto al compuesto nominal, cuando falta el grupo fosfonato en uno de los nitrógenos localizados cerca de los extremos del esqueleto hidrocarbonado que cuando falta sobre el nitrógeno en posición central. Es lógico que sea así, ya que en el primer caso, la ausencia del grupo ácido se produce en un lugar próximo a otro grupo ácido, mientras que en el último caso, se produce a mayor distancia de los otros grupos ácidos. Por lo tanto, **I-N3C9P4a** y **I-N3C8P4a** deberían ser más ácidos que sus respectivos isómeros **I-N3C9P4b** y **I-N3C8P4b**. El orden de los tiempos de migración esperados que se deduce de la diferente acidez de estas parejas de isómeros en disolución, coincide con las asignaciones realizadas.

A tiempos de migración mayores se encontraron los picos de las impurezas con tres grupos fosfonato, **I-C7N3P3** (m/z 384) y **I-C9N3P3** (m/z 412). Debido probablemente a las bajas concentraciones individuales de los cuatro isómeros **I-C8N3P3**, no se encontraron picos significativos en el EIE a m/z 398. Como se deduce del orden de tiempos de migración observados, la densidad de carga de los APPs disminuye si se reduce el número de grupos fosfonato. En efecto, aparecen primero los compuestos nominales, seguidos de las impurezas con cuatro grupos fosfonato, y a tiempos más largos las que tienen tres grupos fosfonato.

IX.3.5 Composición de **II**

El espectro de masas de **II** (Fig. 1) mostró un pico predominante a m/z 684 que correspondía al ion $[M - H]^-$ del compuesto nominal, junto con dos pequeños picos, uno debido a $[M - 2H + Na]^-$ a m/z 706, y otro debido a $[M - 2H + K]^-$ a m/z 722 (**II** es una sal de potasio). Con excepción del pico a m/z 604, atribuido a $[M - H - HPO_2]^-$, los picos producidos por pérdidas de agua y pérdidas adicionales de HPO_2 con respecto a $[M - H]^-$ fueron muy pequeños. Los trazos de

CZE-IPD y CZE-MS de **II** se muestran en la Fig. 4. De acuerdo a su valor de m/z (491), el intenso pico que aparece a un tiempo de migración bajo (8,3 y 9,2 min en los trazos CZE-IPD y CZE-MS, respectivamente) debe atribuirse a **IV-C10N2P4**, que es el compuesto nominal de **IV**. Siguiendo la regla del nitrógeno, el pico pequeño a m/z 533 en el electroferograma de CZE-MS se atribuyó a una diamina con 4 grupos metileno-fosfonato y un esqueleto hidrocarbonato con 9 átomos de carbono (ver Tabla 2). El pico siguiente (a m/z 600) podría ser una triamina similar al compuesto nominal de **II** (con 5 grupos fosfonato), pero con 6 grupos metileno en el esqueleto hidrocarbonado en lugar de 12. En la Tabla 2 se indican 2 isómeros que cumplen estas condiciones. En el electroferograma de CZE-MS, estos dos pequeños picos estaban seguidos por uno más grande con m/z 684, que correspondía al pico $[M - H]^-$ del compuesto nominal. La asignación de los picos de m/z 533, 600 y 684 en los EIEs a los picos de los CZE-IPD no es segura; sin embargo, parece razonable asignar los picos de CZE-IPD a 10,5 y 11 min a las impurezas con m/z 533 y 600 o viceversa, y el pico con la mayor área de los tres (a 12,1 min en el trazo de CZE-IPD) al compuesto nominal de **II**.

De acuerdo también con los EIEs, las series de picos a 13,5-16 y 17,5-19 min en el trazo de CZE-IPD se atribuyeron a los grupos de isómeros con m/z 318 y 548, respectivamente. Varias triaminas, con dos y cuatro grupos metileno-fosfonato respectivamente, coinciden con estos valores de m/z (ver las posibles estructuras en la Tabla 2). Finalmente, el último pico a aproximadamente 20 min en el trazo de CZE-IPD se asignó al pico que aparece a unos 22 min en el EIE con m/z 590. Este pico se atribuyó al compuesto con la estructura del compuesto nominal, pero con uno de los grupos fosfonato sustituido por un protón. En la Tabla 2 se indican los dos posibles isómeros y sus pesos estadísticos. Finalmente, es importante destacar que **I** y **II** tienen impurezas con estructuras moleculares bastante diferentes.

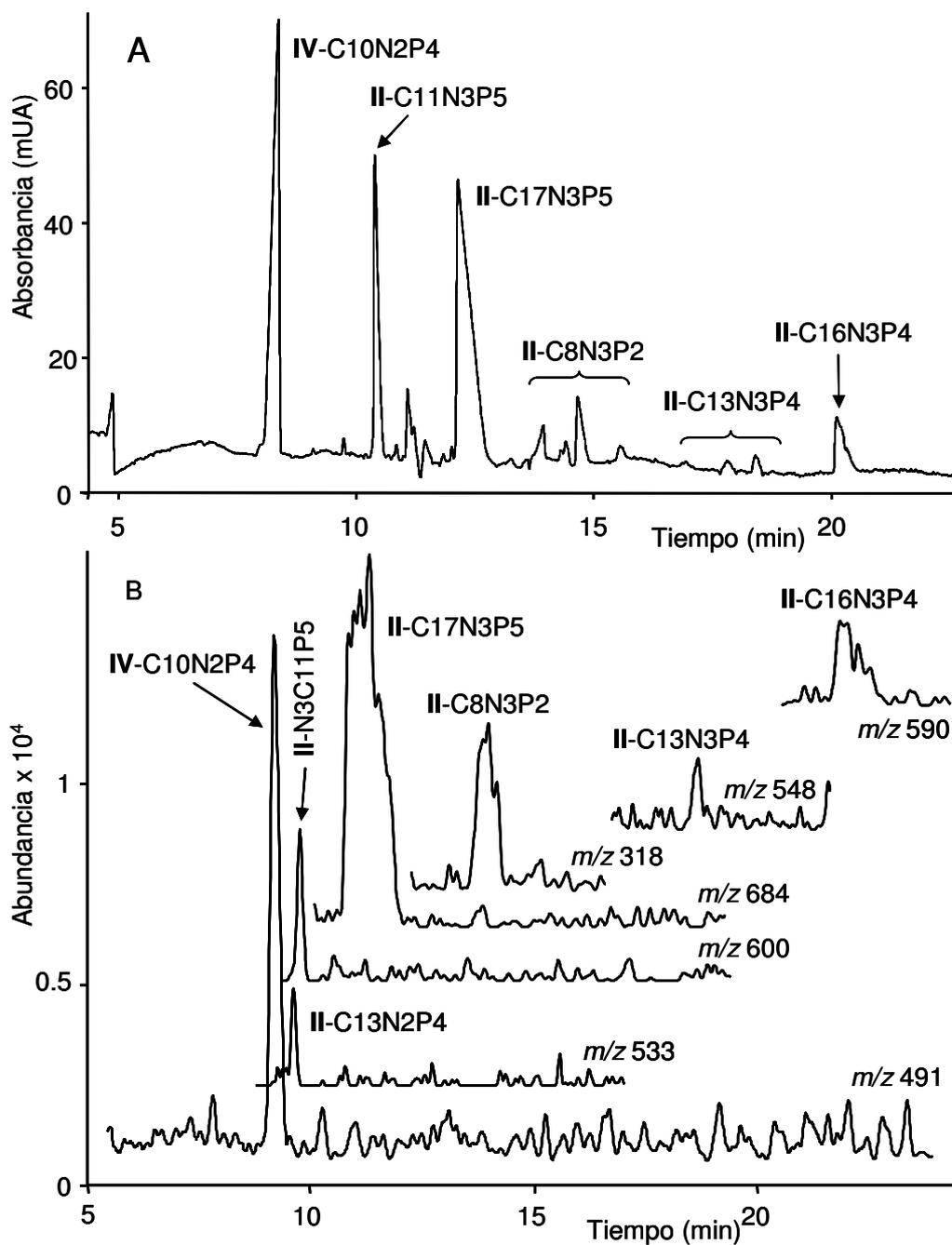


Figura 4. Electroferogramas de II obtenidos inyectando una disolución de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$: CZE-IPD (parte A) y CZE-MS (parte B; EIEs extraídos a los valores de m/z indicados en los trazos).

IX.3.6 Composición de **III**, **IV** y **V**

En el trazo de CZE-IPD de **III** se observó también un pico predominante y varios picos más pequeños (Fig. 5 A). Los EIEs (Fig. 5 B) indicaron que el pico principal correspondía al compuesto nominal, **III**-C6N2P4, y que dos de los picos siguientes correspondían a impurezas con tres grupos fosfonato, a saber, **III**-C6N2P3 y **III**-C5N2P3 a m/z 355 y 341, respectivamente. Otros picos pequeños presentes a tiempos de migración mayores que el compuesto nominal no pudieron ser identificados. En el CZE-IPD de **III**, uno de los picos pequeños a tiempos de migración menores que el pico predominante, debe atribuirse al compuesto nominal de **V**, **V**-C3N1P3 (m/z 298), y el otro a un derivado deshidratado del compuesto nominal de **III** (m/z 417). El EIE a m/z 417 también mostró un pico pequeño al mismo tiempo de migración que el compuesto nominal, que era debido a su deshidratación en el espectrómetro de masas; sin embargo, el pico a 5,7 min en el trazo a m/z 417 debe ser atribuido a un compuesto deshidratado que ya estaba presente en la muestra durante la separación. Este compuesto podría ser un anhídrido formado entre dos grupos fosfonato. Como se muestra posteriormente, en los EIEs de otros APPs también se observaron otros derivados deshidratados de los compuestos nominales, incluyendo anhídridos y ésteres.

El producto **IV** es una sal de potasio, lo cual concuerda con la presencia en el espectro de los picos $[M - nH + (n - 1)K]^-$ en lugar de $[M - nH + (n - 1)Na]^-$ (ver Tabla 3, el espectro se muestra en el capítulo anterior). El trazo de CZE-IPD de **IV** (Fig. 6 A) mostró un pico predominante, que de acuerdo con el EIE (Fig. 6 B) corresponde al compuesto nominal, **IV**-C10N2P4. El trazo de **IV** mostró también un pico más pequeño a 8,5 min que no pudo ser identificado. Finalmente, el electroferograma de CZE-IPD y los EIEs de **V** (Figs. 7 A y B) mostraron un pico del compuesto nominal, **V**-C3N1P3, seguido por su principal impureza, **V**-C3N1P2. Los otros pequeños picos del trazo de CZE-IPD no pudieron ser identificados.

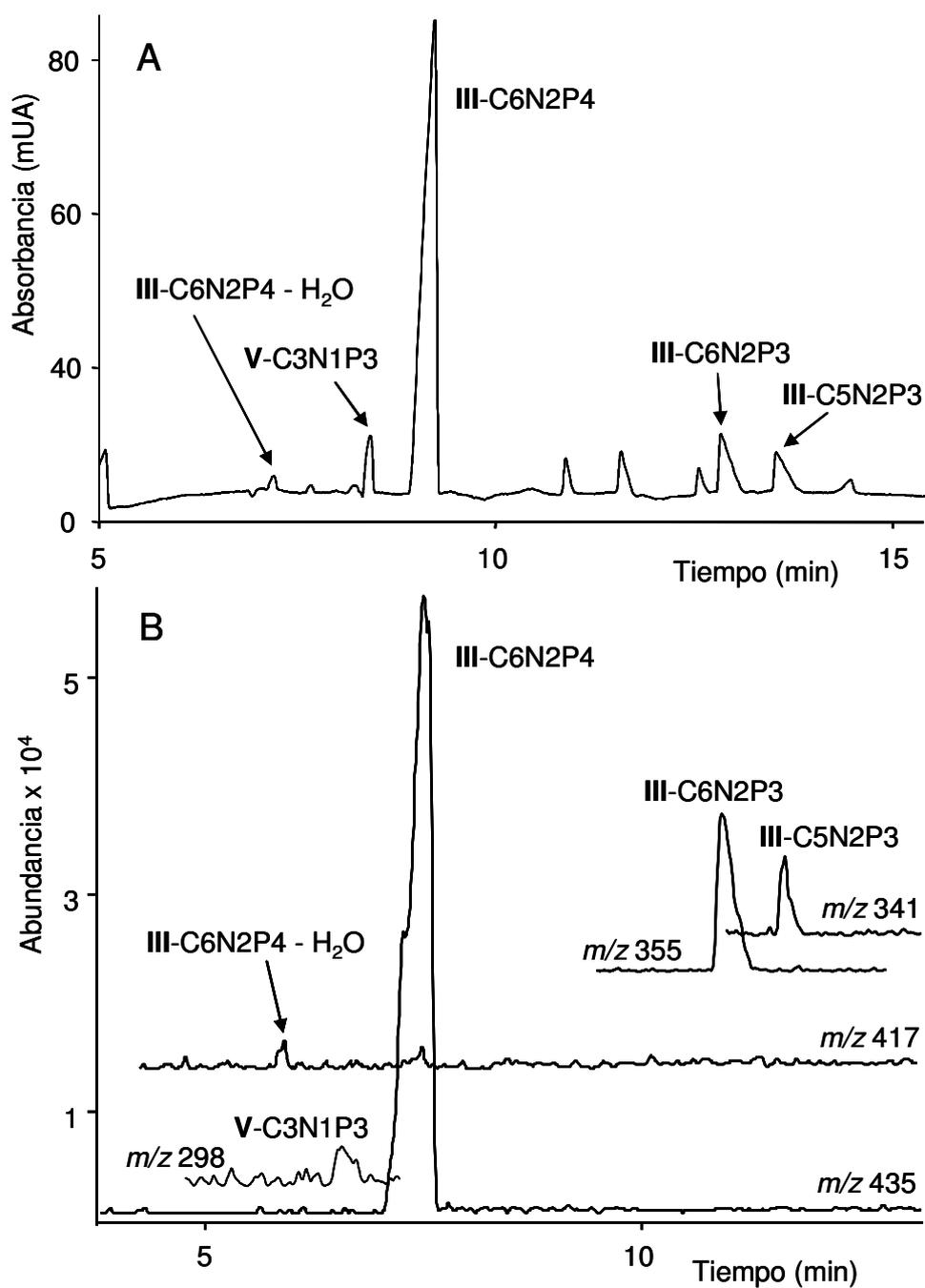


Figura 5. Electroferogramas de **III** obtenidos inyectando una disolución de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$: CZE-IPD (parte A) y CZE-MS (parte B; EIEs extraídos a los valores de m/z indicados en los trazos).

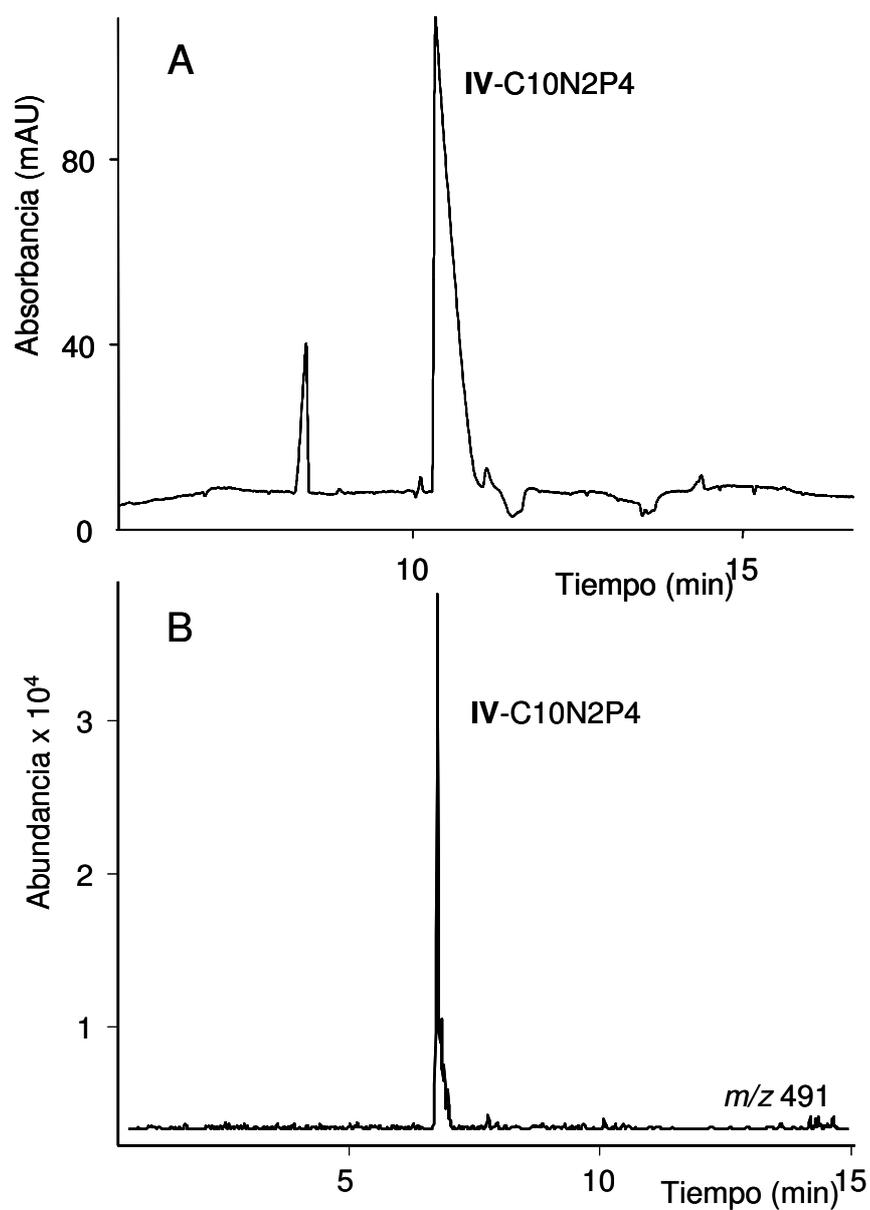


Figura 6. Electroferogramas de **IV** obtenidos inyectando una disolución de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$: CZE-IPD (parte A) y CZE-MS (parte B; EIE extraído al valor de *m/z* indicado sobre el trazo).

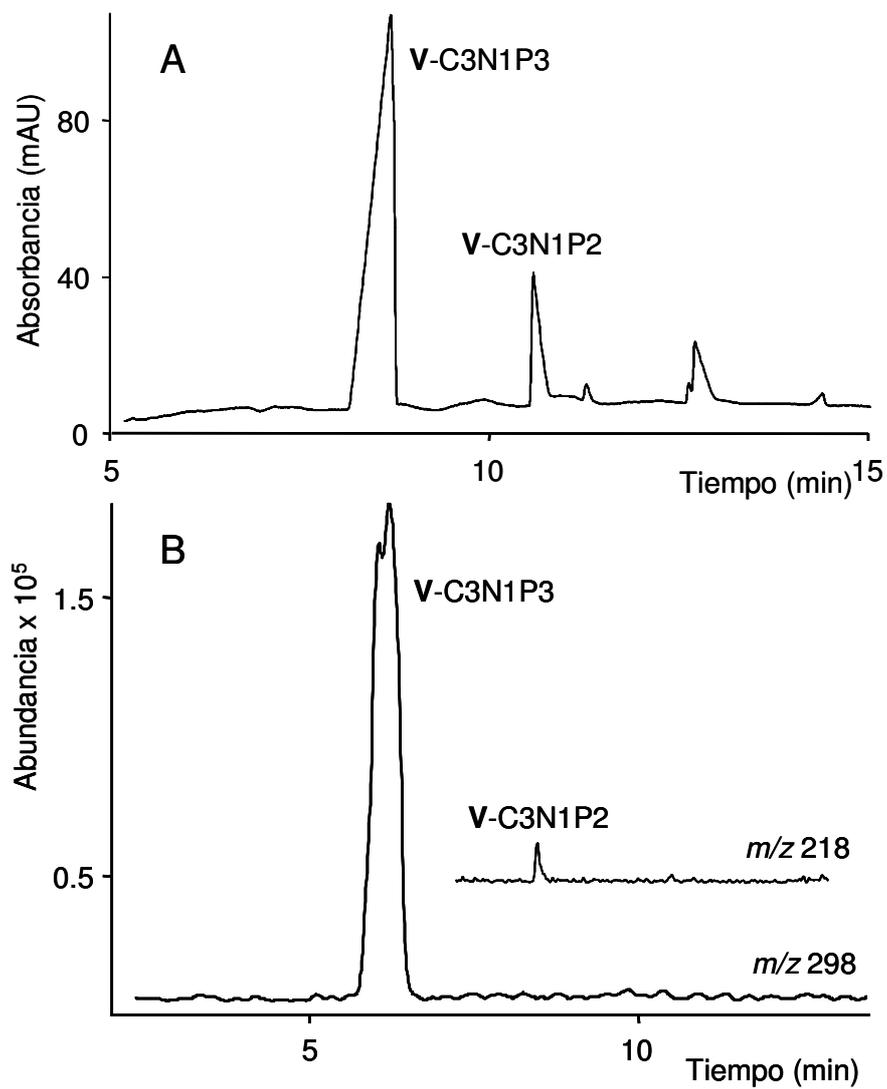


Figura 7. Electroferogramas de **V** obtenidos inyectando una disolución de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$: CZE-IPD (parte A) y CZE-MS (parte B; EIEs extraídos a los valores de m/z indicados en los trazos).

IX.3.7 Composición de **VI** y reinterpretación de su espectro de masas

Los trazos de CZE-IPD y CZE-MS de **VI** mostraron dos picos con áreas similares en lugar de un pico predominante (Fig. 8). El EIE a m/z 248 mostró que el pico grande a mayor tiempo de migración era el compuesto nominal, $(\text{HO})(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{PO}(\text{OH})_2)_2$ o **VI-C4N1P2(OH)** (ver Tabla 4). El otro pico grande correspondió a un compuesto deshidratado con respecto al compuesto nominal (EIE a m/z 230). El pico pequeño que sigue al pico predominante en el EIE a m/z 230 mostró que el compuesto nominal también se deshidrata en el espectrómetro de masas; sin embargo, el retraso en el tiempo de migración entre los dos picos sólo se puede explicar por la presencia de una alta concentración del compuesto deshidratado en la disolución de la muestra. Es muy probable que este componente deshidratado de **VI** sea un éster intramolecular, formado por la condensación entre el hidroxilo y uno de los grupos fosfonato. Como se ilustra en la Tabla 4, esta reacción estaría favorecida por la formación de un anillo de seis miembros. Una explicación alternativa es la condensación entre dos grupos fosfonato para formar un anhídrido; sin embargo, entre los ocho APPs estudiados en este trabajo, sólo en **III** se encontró un anhídrido fosfónico intramolecular, y su concentración fue muy baja, mientras que **VI** mostró una alta concentración del compuesto deshidratado. Esto sugiere la intervención del hidroxilo en la reacción de deshidratación para dar lugar al éster. Se usará el acrónimo **VI-N1C4P2(O)** para nombrar a este compuesto en la Fig. 8 y en el texto que sigue.

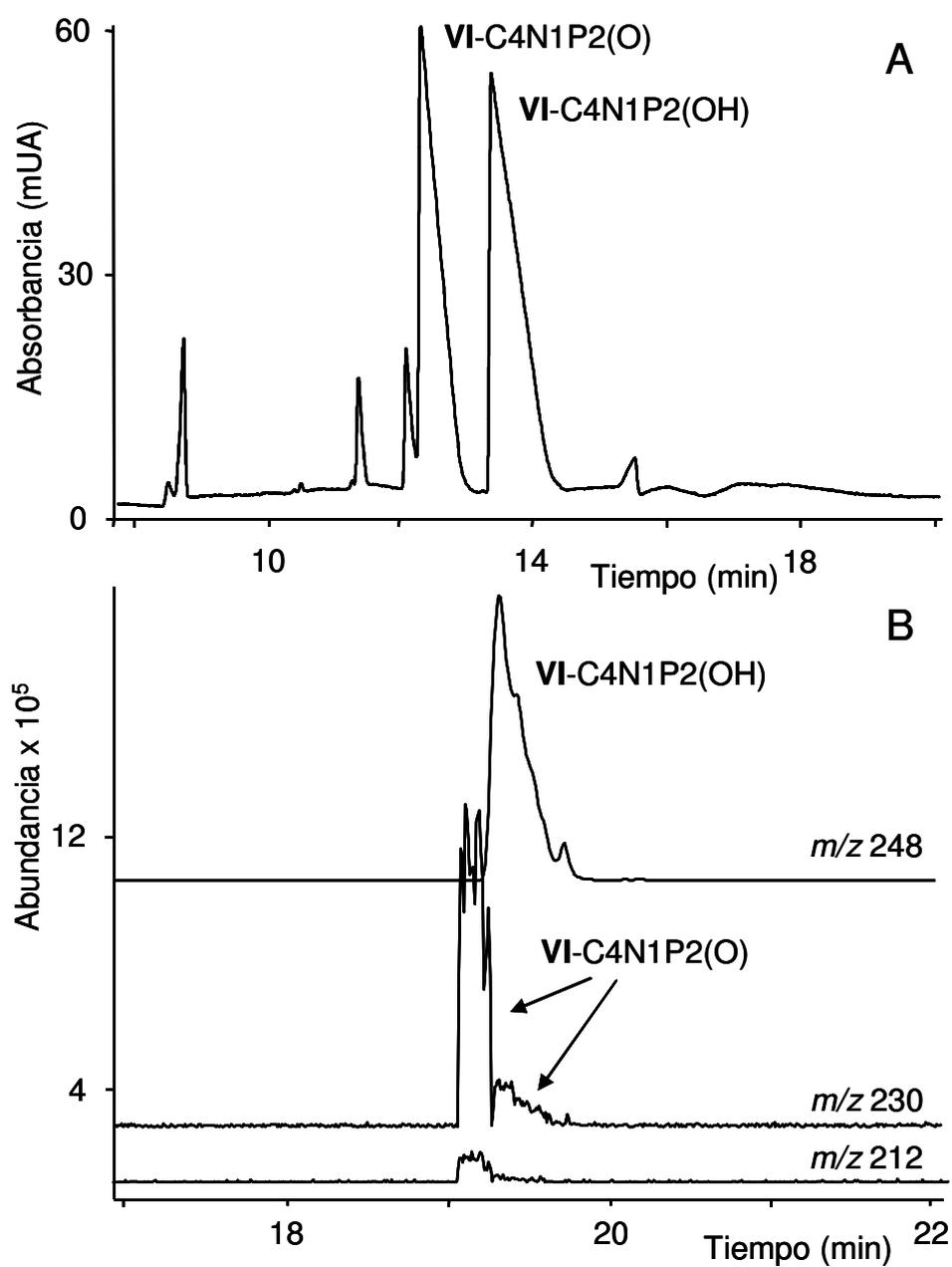


Figura 8. Electroferogramas de VI obtenidos inyectando una disolución de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$: CZE-IPD (parte A) y CZE-MS (parte B; EIEs extraídos a los valores de m/z indicados en los trazos).

Para estimar la relación de concentraciones **VI-N1C4P2(O)**/**VI-N1C4P2(OH)**, primero se corrigieron las áreas de pico de los electroferogramas de CZE-IPD y CZE-MS (dividiendo por el correspondiente tiempo de migración de los picos). La relación de las áreas de pico en los EIEs a m/z 230 y 248 fue 42/ 58; sin embargo, debido a que no se conocen las diferencias de sensibilidad entre el compuesto nominal y el deshidratado, la relación real entre sus concentraciones puede ser diferente de este valor. La relación de las áreas de pico del trazo CZE-IPD fue 46/ 54, la cual puede estar también sesgada por las diferencias de sensibilidad. Sin embargo, estas dos estimaciones de la relación de concentración coinciden bastante bien, y como se discute a continuación, también coinciden con los datos obtenidos a partir del espectro de infusión directa. El espectro de masas de **VI** (Fig. 9) se interpretó en el capítulo anterior como debido a la formación de varios ésteres intermoleculares de la forma $[pM + H \pm mH_2O]^+$, donde p variaba desde 1 hasta 4, y m correspondía tanto a pérdidas como a ganancias de agua. El primer grupo de picos se atribuyó a los monómeros, donde $p = 1$, y donde el pico a m/z 230 se interpretó como debido a una importante deshidratación del ion a m/z 248 en el espectrómetro de masas. Sin embargo, esta explicación debe ser revisada para tener en cuenta la presencia de una alta concentración del derivado deshidratado del compuesto nominal en **VI**. Comparando las áreas de pico de los dos EIEs entre 19,3 y 19,7 min (Fig. 8 B) se puede deducir que menos del 10 % del compuesto **VI-N1C4P2(OH)** experimenta deshidratación en el espectrómetro de masas. Por consiguiente, en el espectro de **VI**, la mayor contribución a la abundancia del ion a m/z 230 se debe atribuir a la presencia del compuesto deshidratado en la disolución inyectada, y sólo una pequeña parte de ésta puede ser explicada por deshidratación del compuesto nominal en el espectrómetro de masas. Como se muestra en el EIE a m/z 212 (Fig. 8B), un pequeño porcentaje de **VI-N1C4P2(O)** también se deshidrata en el espectrómetro de masas. Por lo tanto, el pequeño

pico a m/z 212 en el espectro de infusión directa se puede atribuir a esta deshidratación, y el pico a m/z 266 debe estar causado por retención de agua por parte del **VI-N1C4P2(OH)**.

El grupo de picos a m/z 461, 479 y 497 se deben atribuir a los dímeros [**2VI-N1C4P2(O) - H**]⁻, [**VI-N1C4P2(OH) + VI-N1C4P2(O) - H**]⁻ y [**2VI-N1C4P2(OH) - H**]⁻, respectivamente. De forma similar se pueden obtener trímeros, tetrámeros y pentámeros. Se puede utilizar una distribución binomial para estimar las intensidades relativas de las agrupaciones dentro de su grupo de picos correspondiente. Una distribución binomial es el desarrollo del término $(x + 1)^p$, donde x es la relación de probabilidades entre las dos posibilidades (deshidratado/ nominal), y p es el número de casos o el número de unidades en la combinación, desde 1 a 4 para monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros, respectivamente. El valor de x no es conocido, pero debe estar cercano a la relación de concentraciones **VI-N1C4P2(O)/ VI-N1C4P2(OH)**. Como se ha indicado antes, los trazos CZE-IPD y CZE-MS indicaron relaciones de intensidad cercanas a 46/ 54 y 42/ 58, respectivamente. En la Fig. 9 se indican las intensidades de pico relativas predichas por la distribución binomial suponiendo $x = 46/ 54$ a valores crecientes de p . Los perfiles de intensidad resultantes son primeras aproximaciones a las contribuciones reales de las agrupaciones a la abundancia de los distintos iones, pero al menos son ilustrativas acerca de la naturaleza del espectro de **VI**. Dentro de cada grupo de picos, la mayor proporción de las especies más ligeras con respecto a los valores calculados se podría deber a la deshidratación adicional de las agrupaciones en el espectrómetro de masas.

Los dímeros y trímeros se produjeron principalmente en el espectrómetro de masas; sin embargo, se investigó también su posible presencia en la muestra usando EIEs. No se encontraron picos significativos a tiempos de migración diferentes de los observados para los dos compuestos predominantes.

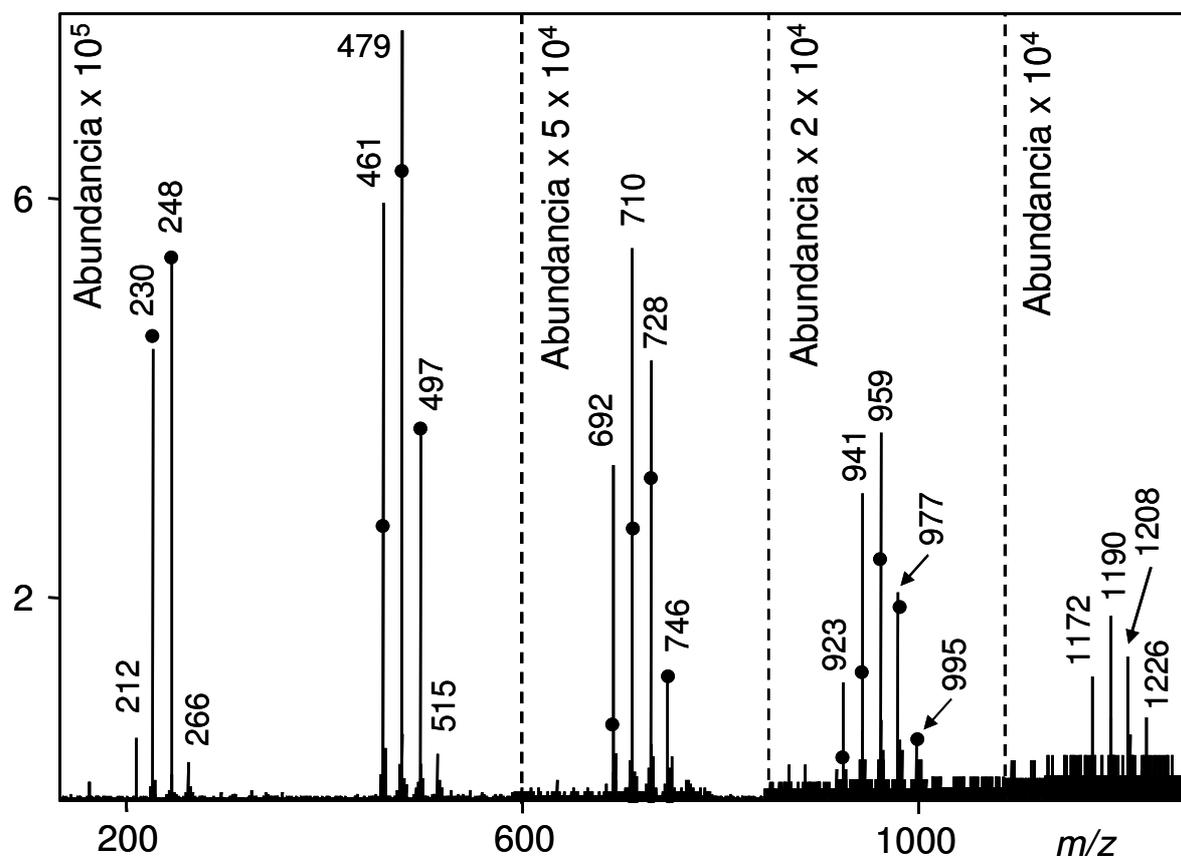


Figura 9. Espectro de masas de **VI** en modo ion-negativo, obtenido por infusión directa de una disolución de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los círculos sobre los picos muestran las intensidades predichas por las distribuciones binomiales calculadas para $\text{VI-N1C4P2(O)}_d / \text{VI-N1C4P2(OH)} = 46/54$. La escala de abundancia es distinta para cada sección de m/z .

IX.3.8 Composición de **VII** y **VIII**

El compuesto nominal de **VII**, $(\text{HO})\text{C}(\text{CH}_3)(\text{PO}(\text{OH})_2)_2$ o **VII-C2P2(OH)**, también tiene un grupo hidroxilo y dos grupos fosfonato, pero a diferencia de **VI**, no se observó esterificación intramolecular. Esta reacción es poco probable por requerir la formación de un anillo de tres miembros. El trazo de CZE-IPD (Fig. 10 A) mostró un pico predominante precedido por otro pequeño. Entre los EIEs que fueron examinados, sólo el trazo a m/z 205 dio picos significativos (Fig. 10 B), en concreto un pico predominante precedido de dos más pequeños. De acuerdo con lo observado en el EIE a m/z 205, los dos picos de CZE-IPD deberían corresponder al compuesto

nominal y a un isómero posicional del mismo. Los isómeros posicionales del compuesto nominal de **VII** pueden ser formulados como ácido 1-hidroxiethyliden-1,2-difosfónico o $(\text{HO})\text{CH}(\text{PO}(\text{OH})_2)\text{CH}_2\text{PO}(\text{OH})_2$, y como ácido 1-hidroxiethyliden-2,2-difosfónico o $(\text{HO})\text{CH}_2\text{CH}(\text{PO}(\text{OH})_2)_2$. Sus respectivos pesos estadísticos son 2:1, por lo tanto, el pico pequeño en el trazo CZE-IPD podría ser debido al primero de ambos isómeros (ver Tabla 4).

El CZE-IPD de **VIII** mostró un pico predominante (Fig. 11 A), que de acuerdo al EIE a m/z 269 (Fig. 11 B) correspondió al compuesto nominal, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{CH}_2\text{COOH})(\text{COOH})(\text{PO}(\text{OH})_2)$ o **VIII-C4P1**(COOH)₃. Se observaron también varios picos pequeños dentro de un corto tiempo de migración antes y después del pico predominante. De acuerdo al EIE a m/z 251, estos picos pequeños deben corresponder a compuestos que tienen una molécula de agua menos que el compuesto nominal y que están presentes en la disolución inyectada. En consecuencia, estos picos se atribuyeron a anhídridos intramoleculares. Se pueden producir hasta tres anhídridos diferentes por condensación de parejas formadas por los tres carboxilatos del compuesto nominal, y se pueden formular hasta tres anhídridos más por condensación entre uno de los carboxilatos y el grupo fosfonato.

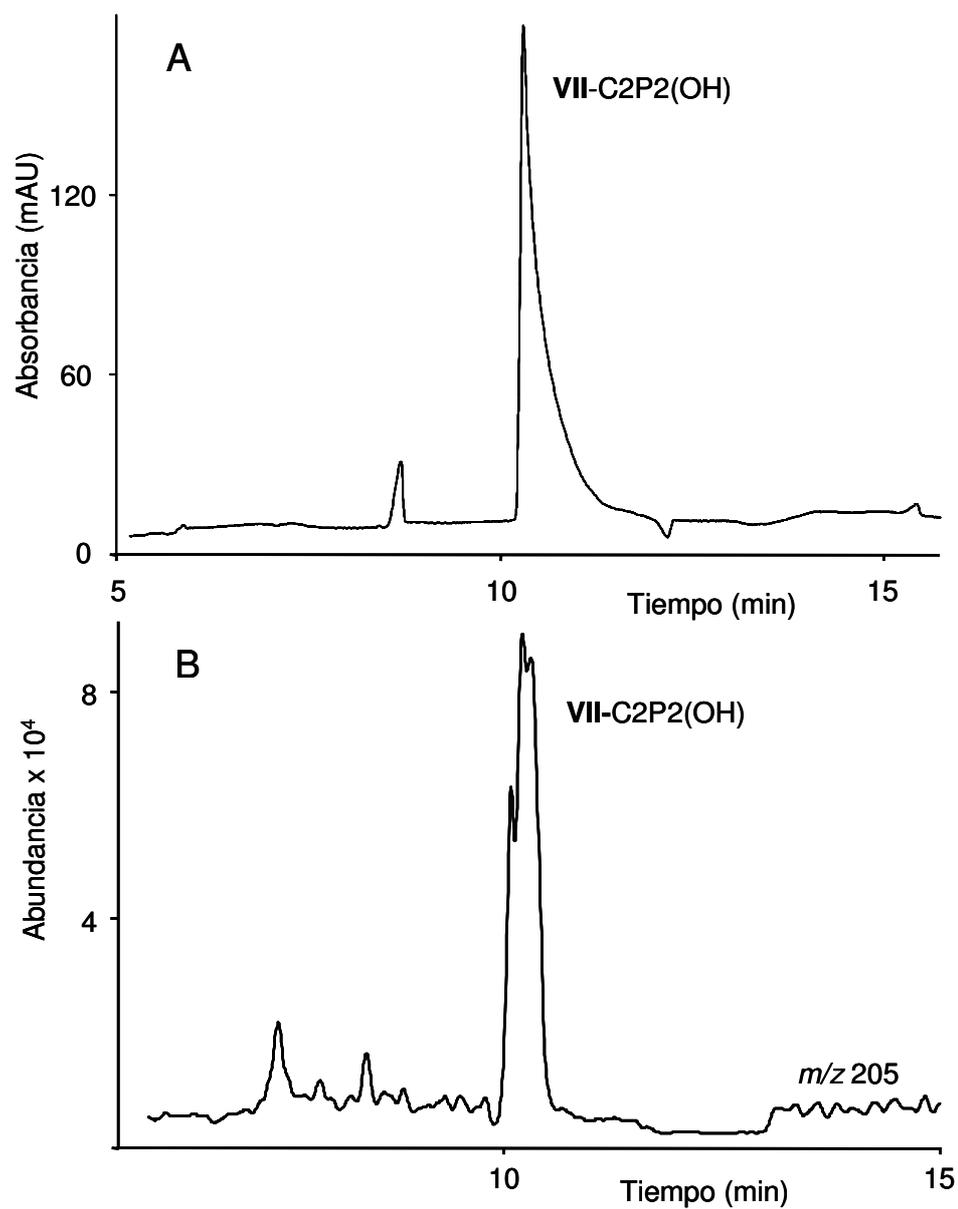


Figura 10. Electroferogramas de **VII** obtenidos inyectando una disolución de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$: CZE-IPD (parte A) y CZE-MS (parte B; EIE extraído al valor de m/z indicado sobre el trazo).

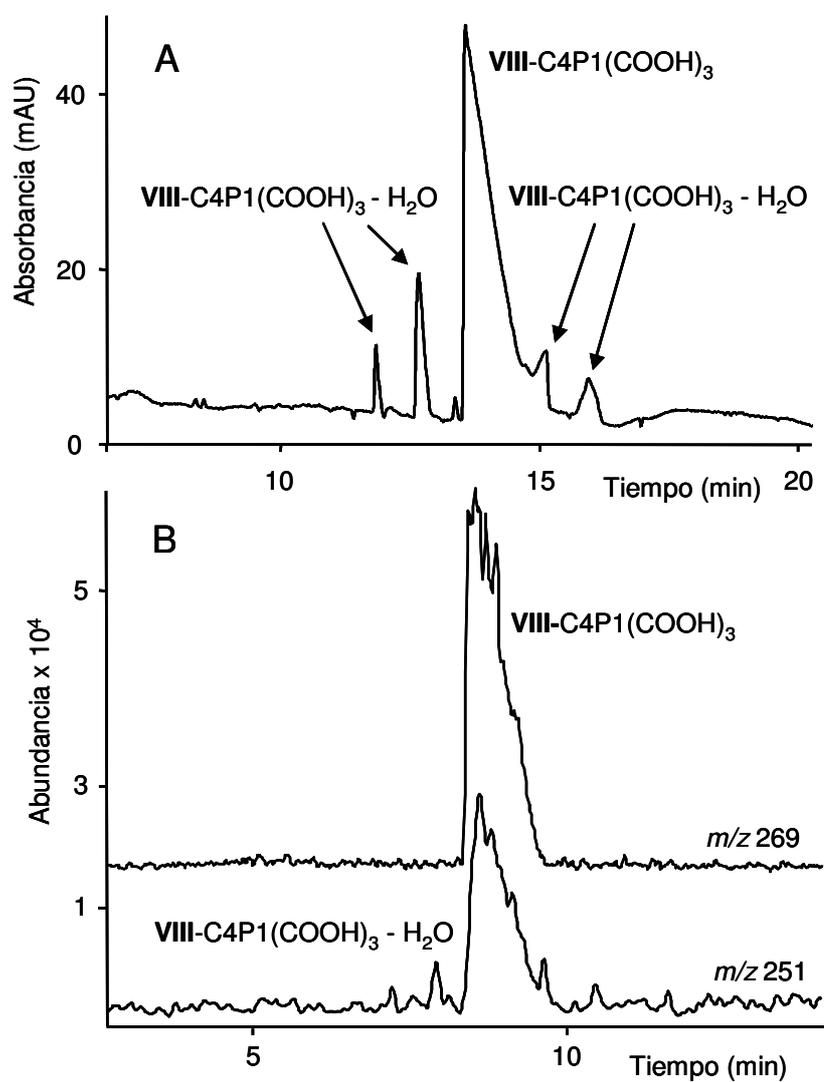


Figura 11. Electroferogramas de **VIII** obtenidos inyectando una disolución de 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$: CZE-IPD (parte A) y CZE-MS (parte B; EIEs extraídos a los valores de m/z indicados en los trazos).

IX.3.9 Aplicación a productos industriales

Se analizaron un detergente para lavado a mano, que contenía un 1,4 % de **V**, y otro para automáticas, que contenía un 0,1 % de **I** (concentraciones declaradas por el fabricante). Además de los APPs, las muestras también contenían concentraciones altas de surfactantes no-iónicos y aniónicos, y pequeñas concentraciones de estireno, etilendiaminotetraacetato, bacterioestáticos, perfumes y otros componentes. Usando CZE-MS y obteniendo los correspondientes EIEs, en el detergente líquido para lavado a mano se observaron, con buena relación señal-ruido, los picos de **V-C3N1P3** y de su principal impureza, **V-C3N1P2**. Los electroferogramas se muestran en la Fig. 12. Los otros EIEs de la figura muestran la posición de los surfactantes aniónicos a lo largo del tiempo de migración (ABS, AES y ácidos grasos). Los surfactantes no-iónicos (FAEs) no dan señal en el modo ion-negativo. Como muestra la Fig. 13, en el detergente líquido para automáticas también se identificaron los picos de **I-C9N3P5** y los de sus impurezas principales, **I-C9N3P4a** y **I-C9N3P4b**, en presencia de concentraciones todavía mayores de los surfactantes. Las Figs. 12 y 13 son ilustrativas de la capacidad del método de CZE-MS para resolver APPs y otros ingredientes que son habituales en productos de limpieza.

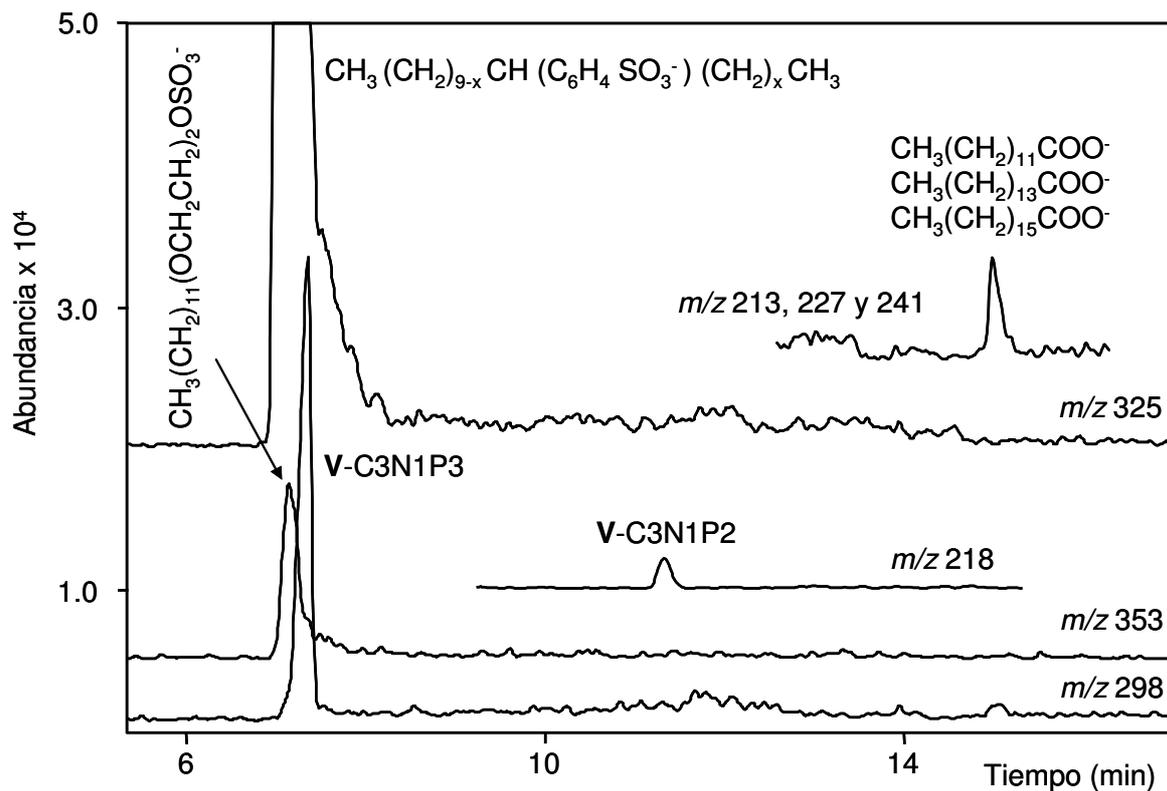


Figura 12. CZE-MS de un detergente líquido para lavado a mano que contiene un porcentaje declarado de **V** de 1,4 %. Los EIEs extraídos a los valores de m/z indicados en los trazos muestran el compuesto nominal de **V** (m/z 298) y su principal impureza (m/z 218). Otros trazos: ABS (trazo de los isómeros con 12 átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada, m/z 235), AES (trazo del oligómero con 12 átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada y dos unidades de EO, m/z 353), y varios ácidos grasos (m/z 213, 227 y 241).

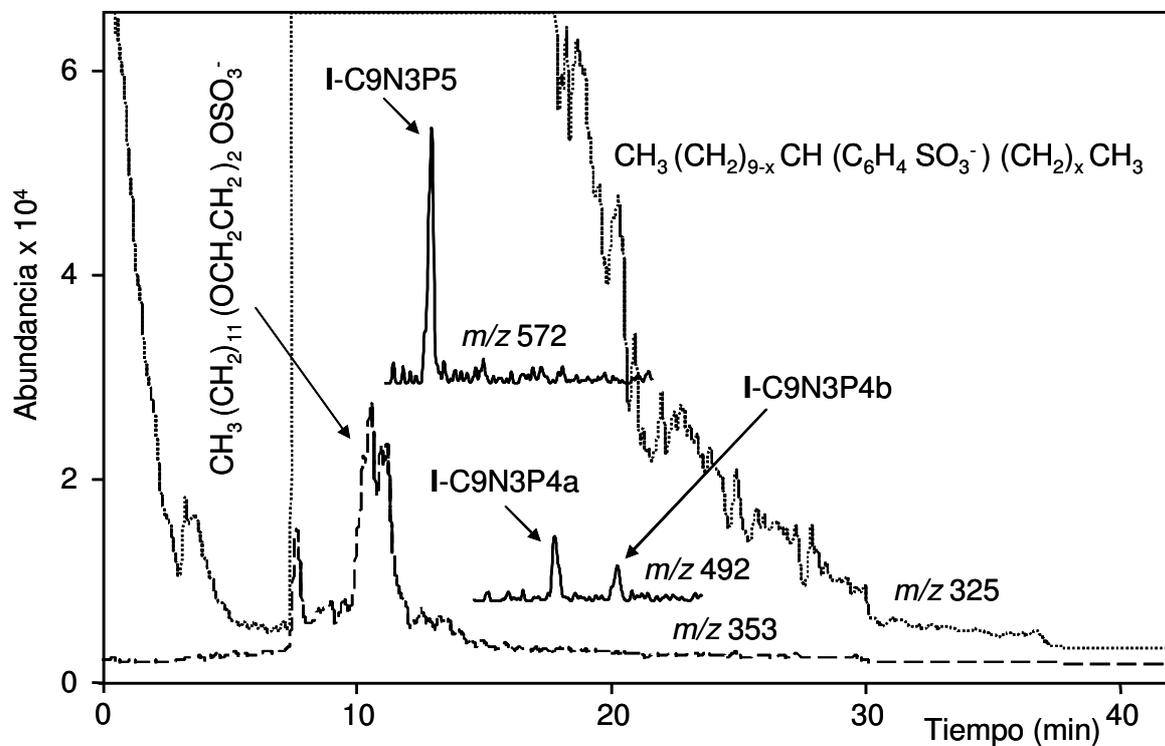


Figura 13. CZE-MS de un detergente líquido para automáticas que contiene un porcentaje declarado de **I** de 0,1 %; EIEs extraídos a los valores de m/z indicados en los trazos. La intensidad de los ejes se multiplicó por 10 para los trazos de m/z 572 y 492 (compuesto principal y principales impurezas de **I**). Para la interpretación de los trazos a m/z 325 y 353, ver Fig. 12.

IX.4. Conclusiones

Los APPs de grado técnico pueden ser adecuadamente caracterizados en cortos tiempos de análisis mediante infusión directa en MS, o por CZE-IPD y CZE-MS. Tanto para la detección IPD como por MS se recomienda un BGE acuoso constituido por 10 mM de ATP, con el pH ajustado a 2,2 con HCl 0,1 M. El BGE tiene una excelente estabilidad, que ha sido demostrada durante al menos 45 días. A todos los valores de pH, el ATP tiene mayor capacidad amortiguadora que el AMP propuesto previamente [1], siendo además mucho más barato. Se consiguió una excelente resolución con un corto tiempo de análisis usando CZE-IPD con un capilar de 64,5 cm de longitud. Usando el mismo capilar para obtener espectros de infusión directa y electroferogramas bidimensionales de CZE-MS, fue posible la identificación de los compuestos nominales de los ocho APPs más habituales, y de sus impurezas con un menor número de grupos fosfonato y metileno-fosfonato respecto a los compuestos nominales, más otras impurezas con un esqueleto hidrocarbonato diferente. También se identificaron otros compuestos, como ésteres y anhídridos. Dentro de éstos, en las disoluciones de **VI** se encontró un compuesto deshidratado en concentración alta, probablemente un éster intramolecular formado entre el hidroxilo y uno de los fosfonatos. Esto puede ser importante desde el punto de vista de la efectividad de **VI** en relación a sus aplicaciones industriales. Este punto, así como también la presencia de altas concentraciones de ésteres intramoleculares en otros APPs con grupos hidroxilo sin impedimento estérico, merece ser objeto de mayor estudio.

Los métodos de infusión en MS, CZE-IPD y CZE-MS aquí propuestos se pueden aplicar convenientemente al control de calidad de APPs industriales. También se ha demostrado la capacidad del método de CZE-MS para identificar APPs en muestras complejas, como detergentes para la ropa. Finalmente, la identificación de las impurezas de los APPs en materias

primas y productos proporciona una huella dactilar que puede ser usada para investigar el origen del producto.

IX.5. Referencias

- [1] S. A. Shamsi, N. D. Danielson, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1845.
- [2] C. Ackbay, S. A. A. Rizvi, S. A. Shamsi, *Anal Chem.* 77 (2005) 1672.
- [3] P. Paoli, G. Camici, G. Manao, E. Giannoni, G. Ramponi, *Biochem J.* 349 (2000) 43.
- [4] M. E. Tate, *Biochem J.* 195 (1981) 419.
- [5] W. R. Jones, *Electrophoretic capillary ion analysis*, en *Handbook of capillary electrophoresis*, J. P. Landers, ed., CRC, Boca Raton 1994, p. 217.

Capítulo X

Conclusiones generales y perspectivas

En este capítulo se resumen las conclusiones alcanzadas en los trabajos desarrollados en los capítulos III a IX de la presente tesis. Los primeros capítulos están enfocados a la resolución de mezclas de surfactantes empleando CZE con detección espectrofotométrica. En el capítulo III se desarrolla un procedimiento que permite separar, caracterizar y determinar mezclas de AES y ácidos grasos en productos de limpieza. El procedimiento permitió la completa caracterización y cuantificación de AES en dichas mezclas, y se demostró su aplicación al control de calidad de productos comerciales. Los métodos desarrollados en el capítulo IV permiten resolver mezclas sintéticas y en productos comerciales de los surfactantes anteriores con el ABS, un surfactante aniónico absorbente también muy utilizado en limpiadores. En este capítulo, además de un procedimiento experimental sencillo, basado en la selección de las longitudes de onda de detección, se describen procedimientos quimiométricos alternativos. Estos últimos son de aplicación más general, ya que permiten eliminar la interferencia producida en detección UV-vis indirecta por un soluto absorbente cualquiera, conocido o no, en electroferogramas o cromatogramas de solutos no absorbentes.

En el capítulo V se desarrolló la separación de varias familias de surfactantes no iónicos y ambiónicos con el ABS. Además de optimizar las condiciones experimentales, se emplearon herramientas quimiométricas capaces de resolver todos los homólogos de las familias de surfactantes, y de asegurar la correcta asignación de los picos de los electroferogramas a cada familia. Además se demostró la capacidad del método para resolver las mezclas cuando se inyectaron por el extremo corto del capilar, consiguiendo reducir el tiempo de análisis de 30 a 7 min. El procedimiento se aplicó a la identificación y cuantificación de estos surfactantes en productos de limpieza.

Los FAEs son surfactantes no iónicos ampliamente utilizados. La falta de carga impide su determinación mediante CZE. Además son no-absorbentes, de modo que no se pueden detectar mediante UV-Vis sin derivatización previa. En el capítulo VI se llevó a cabo un estudio acerca de la determinación de estos compuestos mediante MS sin derivatización previa. Se determinaron los factores de respuesta por infusión directa, observando una gran dependencia con el medio, así como con el número de átomos de carbono de la cadena alquílica y el número de moles de EO. En el medio elegido como óptimo se establecieron modelos de predicción de los factores de respuesta, para evitar así trabajar con un gran número de estándares de calibrado, reduciendo el esfuerzo experimental. Se demostró la compatibilidad del método de infusión directa con una técnica de separación previa cromatográfica o electroforética. En este estudio se excluyeron los alcoholes sin etoxilar, ya que mostraban una sensibilidad extremadamente baja que impidió su calibración. Para mejorar la sensibilidad en MS de estos últimos y de los que tenían un bajo grado de etoxilación, se desarrolló en el capítulo VII un procedimiento rápido y sencillo de oxidación del grupo alcohol a ácido carboxílico empleando óxido crómico. Para alcoholes grasos sin etoxilar la reacción fue cuantitativa, pero se obtuvieron rendimientos inferiores al 100 % para los alcoholes etoxilados. Esto último, unido a la falta de estándares de los ácidos etoxi-carboxílicos, que son necesarios para establecer factores de respuesta, y también la degradación de la cadena de EOs durante la oxidación, hizo no recomendable el uso de este procedimiento para la cuantificación de alcoholes etoxilados. Sin embargo, se demostró la utilidad del método para cuantificar alcoholes grasos no etoxilados en cosméticos y productos de higiene personal.

Como se ha comentado en la introducción desarrollada en el capítulo I, los productos industriales de limpieza contienen además de surfactantes otros aditivos, entre los cuales se encuentran los APPs. En el capítulo VIII, mediante infusión directa en ESI-MS, se

caracterizan de forma rápida ocho de los APPs más comúnmente utilizados. Se detectaron impurezas cuyas estructuras moleculares mostraban la falta de uno o más grupos fosfonato respecto al compuesto nominal. Con ayuda de estudios de MS² se explicaron satisfactoriamente todos los caminos de reacción observados. Para garantizar la presencia de impurezas se desarrolló un método de CZE-MS. Se demostró la utilidad de la espectrometría de masas para el control de calidad de APPs industriales. Finalmente, en el capítulo IX se desarrolló un método de CZE-IPD para caracterizar de forma rápida y sencilla los APPs. También se mejoró la resolución del método de CZE-MS, permitiendo la comparación de los electroferogramas de CZE-IPD y CZE-MS. La mejora de la resolución permitió identificar nuevas impurezas no encontradas en el estudio anterior. El método de CZE-MS se aplicó a la determinación de APPs en productos de limpieza de formulación compleja.

Entre las perspectivas de futuro que se plantean de modo más inmediato figuran la aplicación de los métodos desarrollados en el capítulo IX a la cuantificación de APPs en productos de limpieza, el desarrollo de métodos de infusión directa en MS o mediante HPLC-MS para caracterizar y cuantificar otros surfactantes como los alquilpoliglucósidos, y la determinación de FAEs mediante CZE o HPLC con detección IPD o MS previa derivatización con anhídridos de ácido o con SO₃. También tiene un gran interés el empleo de la electrocromatografía acoplada a MS para mejorar los métodos anteriores consiguiendo menores tiempos de análisis y mejores eficacias.