

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

DESARROLLO DE MÉTODOS DE ANÁLISIS DE  
SURFACTANTES Y OTROS ADITIVOS EN FORMULADOS  
DE PRODUCTOS DE CONSUMO Y EN MUESTRAS  
AMBIENTALES.

ANNA MICÓ TORMOS

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de juliol de 2009 davant un tribunal format per:

- Dra. María Luisa Marina Alegre
- Dr. Óscar Ballesteros García
- Dra. Emma Chiavaro
- Dr. Lorenzo Cerretani
- Dr. José Manuel Herrero Martínez

Va ser dirigida per:

Dr. Guillermo Ramis Ramos

Dr. Ernesto Fco. Simó Alfonso

©Copyright: Servei de Publicacions  
Anna Micó Tormos

---

Dipòsit legal: V-4147-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7634-8

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT  
D<sup>Ń</sup> VALÈNCIA

FACULTAT DE QUÍMICA

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Desarrollo de métodos de análisis  
de surfactantes y otros aditivos  
en formulados de productos de consumo  
y en muestras ambientales**

Memoria para alcanzar  
el grado de doctora  
(Doctorado Europeo)  
presentada por:

**Anna Micó Tormos**

Directores:

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

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

Certifican

Que la presente memoria, que lleva por título *Desarrollo de métodos de análisis de surfactantes y otros aditivos en formulados de productos de consumo y en muestras ambientales*, y que se presenta para la obtención del título de Doctorado Europeo, constituye la tesis doctoral de Dña. Anna Micó Tormos.

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

Burjassot, Junio 2009

Guillermo Ramis Ramos

Ernesto Fco. Simó Alfonso

Aquesta tesi s'ha realitzat gràcies a un beca de  
Formación de Personal Investigador del MEC

Als meus pares

## **Agraïments:**

Al Dr. Guillermo Ramis Ramos, pel temps, la dedicació i les ganes invertits en el desenvolupament d'aquesta memòria, així com en la meua formació científica.

Al Dr. Ernesto Fco. Simó Alfonso, per les seues aportacions al meu treball científic i a aquesta tesi, i per la disponibilitat en resoldre qualsevol problema sorgit al laboratori.

Al Dr. José Vicente Gimeno Adelantado, per la disponibilitat permanent dels seus equips, sense els quals haguera sigut més difícil la realització del meu treball.

Al Dr. José Ramón Torres Lapasió, per la seua col.laboració en algun capítol d'aquesta memòria.

Als meus companys de laboratori: Amparo, Claudia, Federico, Hugo, Isabel, José Manuel i Victoria; per tots els bons moments que hem compartit; a Cristina, una estupenda tècnic de laboratori; i a Míriam i Virginia, per tot el suport i l'alegria que m'han donat en aquest llarg camí, des del principi fins al final.

A la resta d'amics d'aquesta Universitat que han compartit amb mi la preparació d'una tesi doctoral: Alejandro, Andreu, Dani, José, José Ramón, Juan, Pau, Sandra i Zaca, i als amics del departament de Química Inorgànica. I a Santi, que des de primer de carrera fins al final d'aquest camí, continua siguent un company inestimable amb qui sempre puc comptar.

Als meus pares, per la confiança, la força i el bon humor que m'han trasmés sempre; als meus germans, Pau i Natxo, per tots els bons consells i el suport incondicional; i a Pilar i Susana, per escoltar-me i animar-me a cada moment.

A Marcos, Salomé, Paula i Joana, per ser com són.

## ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ADP	Adenosín difosfato
ALS	Mínimos cuadrados alternados
AMP	Adenosín monofosfato
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APPI	Ionización por fotoionización a presión atmosférica
APPs	Alquilpolifosfonatos
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
BGE	Electrolito de fondo
CE	Electroseparación capilar
CEC	Electrocromatografía capilar
CGE	Electroforesis capilar en gel
CIEF	Isoelectroenfoque capilar
CITP	Isotacoforesis capilar
CI	Ionización química
CZE	Electroforesis capilar zonal
DAD	Detector de fila de diodos
EI	Impacto electrónico o ionización electrónica
EIEs	Electroferogramas de ion extraído
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EO	Unidad de óxido de etileno
EOF	Flujo electroosmótico
ESI	Ionización por electronebulización
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
FAD	Adsorción/ desorción total
FAEs	Alcoholes grasos etoxilados
FD	Desorción por campo
FI	Ionización por campo
FID	Detección fotométrica de llama
GC	Cromatografía de gases

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-2D	Cromatografía líquida bidimensional
IC	Cromatografía iónica
IPD	Detección fotométrica indirecta
LCCC	Cromatografía líquida en condiciones críticas
LD	Desorción por láser
LEAC	Cromatografía de exclusión-adsorción
LIF	Fluorescencia inducida por láser
LODs	Límites de detección
MALDI	Ionización por desorción láser asistida por la matriz
MEKC	Cromatografía micelar electrocinética capilar
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
NP	Fase normal
OPA	Aproximación de la proyección ortogonal
PD	Desorción por plasma
PFP	Pentafluorofenil
PEEK	Polietileno-éter-cetona
PEG	Polietilenglicol
PTFE	Politetrafluoroetileno
RID	Detector de índice de refracción
RP	Fase inversa
SAX	Intercambiador de aniones fuerte
SCX	Intercambiador de cationes fuerte
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños
SIMS	Espectrometría de masas de iones secundarios
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano
TOF	Tiempo de vuelo
WAX	Intercambiador de aniones débil
WCX	Intercambiador de cationes débil

---

# ÍNDICE

	Pág.
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Capítulo I. Introducción</b>	
<i>I.1. Alcoholes grasos etoxilados</i>	
<i>I.1.1. Características generales de los surfactantes</i> .....	11
<i>I.1.2. Clasificación de los surfactantes</i> .....	13
<i>I.1.3. Surfactantes no iónicos: FAEs</i> .....	14
<i>I.1.4. Separación cromatográfica de FAEs por series</i> .....	19
<i>I.1.5. Separación de FAEs mediante cromatografía 2D</i> .....	21
<i>I.2. Alquilpolifosfonatos</i>	
<i>I.2.1. Antecedentes</i> .....	27
<i>I.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución</i>	
<i>I.3.1. Fundamentos</i> .....	31
<i>I.3.2. Componentes de un cromatógrafo de HPLC</i>	
<i>I.3.2.1. Sistema de bombeo, válvulas e inyector</i> .....	32
<i>I.3.2.2. Fase móvil y fase estacionaria</i> .....	33
<i>I.3.2.3. Clasificación de técnicas cromatográficas por el</i> <i>mecanismo de retención</i> .....	33
<i>I.3.2.4. Detectores</i> .....	35
<i>I.3.3. Propiedades cromatográficas</i> .....	37
<i>I.3.4. Conmutación de columnas y cromatografía bidimensional</i> .....	40
<i>I.4. Electroforesis capilar</i>	
<i>I.4.1. Introducción</i> .....	44
<i>I.4.2. Principios de la CE</i>	
<i>I.4.2.1. Electromigración</i> .....	48
<i>I.4.2.2. Electroósmosis</i> .....	49
<i>I.4.2.3. Control del EOF</i> .....	51

I.4.3. <i>Ensanchamiento de bandas en CE</i> .....	54
I.4.4. <i>Técnicas de electroseparación</i> .....	55
I.4.5. <i>Electroforesis capilar zonal</i> ... ..	55
I.5. <i>Detección por MS</i>	
I.5.1. <i>Principios de la MS</i> ... ..	57
I.5.2. <i>Componentes de un espectrómetro de masas</i> ... ..	60
I.5.3. <i>Técnicas de separación acopladas a MS</i> ... ..	61
I.5.4. <i>Fuentes de ionización</i> ... ..	62
I.5.5. <i>Analizadores de MS</i> .....	71
<b>Chapter II. Objectives</b> ... ..	77
<b>Capítulo III. Parte experimental</b>	
III.1. <i>Reactivos</i> ... ..	83
III.2. <i>Instrumentación</i>	
III.2.1. <i>FAEs</i> ... ..	86
III.2.2. <i>APPs</i> ... ..	87
III.2.3. <i>Montaje experimental para cromatografía 2D</i> ... ..	87
III.3. <i>Procedimientos</i>	
III.3.1. <i>FAEs</i> ... ..	91
III.3.2. <i>APPs</i> ... ..	94
<b>Capítulo IV. Determinación de FAEs mediante derivatización con anhídrido maleico</b>	
<i>Abstract</i> ... ..	99
IV.1. <i>Introducción</i> ... ..	101
IV.2. <i>Resultados y discusión</i>	
IV.2.1. <i>Optimización del procedimiento de esterificación</i> .....	102
IV.2.2. <i>Factores de respuesta UV-Vis de los derivados</i> ... ..	109
IV.2.3. <i>Separación de los derivados mediante HPLC</i> ... ..	110
IV.2.4. <i>Deconvolución de las series hidrocarbonadas</i> ... ..	115

IV.2.5. Aplicación a muestras industriales...	117
IV.2.6. Aplicación a muestras ambientales...	120
IV.3. Conclusiones...	121

## **Capítulo V. Modelización de la retención**

Abstract...	127
V.1. Antecedentes y planteamiento del problema...	129
V.2. Retención de los oligómeros en función de la fuerza eluyente media.....	129
V.3. Construcción y validación de un modelo de retención.....	135
V.4. Aplicación del modelo al diseño de gradientes de elución...	137

## **Capítulo VI. Determinación de FAEs mediante derivatización con**

### **anhídrido ftálico**

Abstract...	143
VI.1. Optimización del procedimiento de esterificación...	145
VI.2. Tolerancia al agua...	147
VI.3. Factores de respuesta UV-Vis de los derivados y reproducibilidad. ....	147
VI.4. Separación de los oligómeros e influencia de la temperatura de la columna...	149
VI.5. Estudios de cuantificación y aplicación a muestras industriales...	152
VI.6. Aplicación a muestras ambientales...	157

## **Capítulo VII. Determinación de FAEs mediante derivatización con**

### **anhídrido difénico**

Abstract...	163
VII.1. Velocidades y temperaturas de esterificación.....	165
VII.2. Tolerancia al agua...	171
VII.3. Sensibilidades relativas, factores de respuesta, límites de detección, eficacias y línea base...	172

<i>VII.4. Comparación de la separación cromatográfica de maleatos, ftalatos y difenatos de los oligómeros de los FAEs...</i>	176
<i>VII.5. Optimización de la separación cromatográfica de los difenatos de los oligómeros de los FAEs...</i>	179
<i>VII.6. Aplicación a muestras ambientales...</i>	180

## **Capítulo VIII. Caracterización de FAEs mediante cromatografía**

### **bidimensional**

<i>Abstract...</i>	187
<i>VIII.1. Selección del sistema para la separación en la primera dimensión...</i>	189
<i>VIII.2. Diseño de la etapa de transferencia...</i>	192
<i>VIII.3. Optimización de la elución en la segunda dimensión...</i>	193
<i>VIII.4. Conclusiones...</i>	197

## **Capítulo IX. Caracterización de APPs por CZE-IPD y CZE-MS**

<i>Abstract...</i>	201
<i>IX.1. Introducción...</i>	203
<i>IX.2. Resultados y discusión</i>	
<i>IX.2.1. Espectros de masas de infusión de los productos I-VIII...</i>	204
<i>IX.2.2. Optimización del BGE...</i>	211
<i>IX.2.3. Selección de las condiciones de trabajo para CZE y tratamiento de datos...</i>	214
<i>IX.2.4. Interpretación de los espectros</i>	
<i>IX.2.4.1. Composición de I...</i>	215
<i>IX.2.4.2. Composición de II...</i>	217
<i>IX.2.4.3. Composición de III, IV y V...</i>	220
<i>IX.2.4.4. Composición de VI...</i>	223
<i>IX.2.4.5. Composición de VII y VIII...</i>	228
<i>IX.2.5. Aplicación a productos industriales...</i>	231
<i>IX.3. Conclusiones...</i>	233

---

<b>Chapter X. Conclusions</b> .....	237
<b>Capítulo XI. Referencias</b> .....	247
<b>Anexo I</b>	
<i>Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatisation with maleic anhydride followed by liquid chromatography with UV-vis detection</i> .....	A3
<b>Anexo II</b>	
<i>Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatization with phthalic anhydride followed by liquid chromatography with UV-vis detection</i> .....	A13
<b>Anexo III</b>	
<i>Determination of fatty alcohol ethoxylates with diphenic anhydride derivatization and liquid chromatography with spectrometric detection. A comparative study with other anhydrides</i> .....	A23
<b>Anexo IV</b>	
<i>Rapid characterization of alkylpolyphosphonates by CZE with indirect photometric and mass spectrometric detection</i> .....	A33

---

## **Abstract**

---

## Abstract

The aim of this work was to develop improved analytical methods for the quality control of cleaning products, and for the evaluation of their environmental impact. Focus was put on the widely used fatty alcohol ethoxylates (FAEs), which presented severe separation and detection difficulties. On the other hand, the problem of how to characterize alkylpolyphosphonates (APPs), which are frequently used as additives in cleaning products, was also addressed.

Concerning FAEs, a systematic study with the aim of developing improved methods for their characterization and determination in industrial and environmental matrices, using previous derivatization with cyclic anhydrides, followed by high performance liquid chromatography (HPLC), was carried out. The objectives were to increase the rate and yield of derivatization reactions of FAEs with the anhydrides, to improve their reproducibility and tolerance to the presence of water in the samples, to enhance chromatographic resolution between both the successive hydrocarbon series and the oligomers within the series, to level-off the response factors of the oligomers as much as possible, and to reduce the limits of detection concerning both UV-Vis and mass spectrometric detection.

We tried first derivatization with maleic anhydride (A. Micó-Tormos et al., *J. Chromatogr. A* 1180, 32-34, 2008). The yields were low and the reaction frequently failed, then we tried several additives to improve performance. We found high and reproducible yields in the presence of suspended grinded urea in the reaction medium. This was attributed to both trapping of residual water and urea hydrolysis, which probably hinders acidification of the medium; however, other explanations are also possible. At 80 °C, a 100 % yield was achieved in 15 min. The procedure was tolerant to the presence of more than 80% water in the

---

sample, although internal standard corrections should be recommended with more than 50% water. The UV-Vis response factors of the derivatives of individual FAE oligomers varied little with the number of carbon atoms in the alkyl chain,  $n$ , and the number of ethylene oxide units,  $m$ .

Derivatized samples of industrial FAE mixtures, cleaning products and river and sea waters were chromatographed on a C8 column of the fused-core type using gradient elution with acetonitrile/ water mixtures plus 0.1 % acetic acid. The hydrocarbon series with even values of  $n$  from 8 up to 20, were well resolved using column temperatures in the 15 - 30 °C range. Superior resolution between the consecutive oligomers within the series was also obtained at large values of  $m$ ; however, reversion of the elution order for the derivatives with  $m = 1$  and 0 hindered direct quantitation of a few oligomers at low  $m$  values. Full resolution of all the oligomers was achieved by deconvolution with a genetic algorithm assisted by the unconstrained local method of Powell. After preconcentration with C18 extraction cartridges, both river and sea water samples from urban areas also showed the signature of the FAE oligomers.

Regularity of the elution of FAE derivatives according to both  $n$  and  $m$  was used to predict the retention time of the oligomers. For this purpose, models which predicted the retention times as functions of the average acetonitrile (ACN) concentration along the gradient, were developed. These models were useful to design mobile phases with a preselected total analysis time.

Then, we studied the esterification of FAEs with phthalic anhydride in 1,4-dioxane (A. Micó-Tormos et al., *J. Chromatogr. A* 1203, 47-53). At 110 °C and in the presence of urea, which also increased the reaction rate, esterification was

---

completed in 60 min. The reaction yield did not decrease when the sample contained up to 50 % water. For the non-ethoxylated alcohols, the UV-Vis response factors of the derivatives were not significantly different from each other ( $f = 1$  for C12E0 as reference). The response factors decreased when the number of ethylene oxide units,  $m$ , increased, reaching constant values of ca. 0.40 and 0.65 for the  $n = 8$  and 18 series, respectively, when  $m \geq 3$ . Using a C8 column and gradient elution with ACN/ water plus 0.1 % acetic acid, FAEs in industrial mixtures and cleaning products were characterized. At column temperatures of 25 and 35 °C, hydrocarbon series with even values of  $n$  from 8 up to 20, were resolved up to  $m = 14$  and 18, respectively, and at 25 °C, series with consecutive even and odd values of  $n$  were resolved up to  $m = 7$ . Within the series, superior resolution of the oligomers with large values of  $m$  was achieved; however, the elution order was reversed for the  $m = 1$  and 0 oligomers, which produced overlapping of a few peaks within the series. A simple procedure for the accurate prediction of the concentrations of all the oligomers in industrial samples was described. After preconcentration with C18 solid-phase extraction cartridges, FAEs were also characterized and quantified in environmental samples (river and sea water). The limits of detection (LODs) were of ca. 2  $\mu\text{M}$  ( $S/N = 3$ ) in the injected solutions.

Finally, we introduced FAE derivatisation with diphenic anhydride (A. Micó-Tormos et al., *J. Chromatogr. A* 1216, 3023-3030, 2009). The use of this novel reagent was compared to the use of maleic and phthalic anhydrides. Advantages from both the chromatographic and UV-Vis detection viewpoints were found for diphenic anhydride. Thus, sensitivity at 200 and 220 nm was significantly better for the FAE diphenates. Accordingly, the LODs at both wavelengths were also lower for the diphenates than for maleates and phthalates. The response factors of

---

the diphenates decreased less than those of the phthalates when the number of ethylene oxide (EO) units,  $m$ , increased, reaching a constant value of ca. 0.62 when  $m > 3$ . Peak symmetries and efficiencies were also better than those found for the other anhydrides. The optimized procedure was applied to the characterization and determination of FAEs in the effluent of a wastewater treatment plant and in sea water. Peak identification was confirmed by using mass spectrometry detection.

More recently, we addressed the problem of overlapping of the non-ethoxylated and mono-ethoxylated oligomers (oligomers with  $m = 0$  and 1, respectively) with heavier oligomers within the respective hydrocarbon series. We obtained well ordered series, with full oligomer resolution within the series, by combining derivatization with diphenic anhydride with two-dimensional chromatography (2D-HPLC). This was implemented by using a novel set-up in which a single quaternary pump served the two columns. Alternate operation of the first and second dimensions is possible by means of the combination of a column selection valve with an auxiliary six-port two-position valve. An alkyl-diol column with ACN/ water gradient was used as first dimension to separate the FAE hydrocarbon series. The heart-cut series were transferred to the second dimension. Separation on the second dimension was also performed with an ACN/ water gradient, but using either a C8 or a penta-fluoro-phenyl (PFP) column. Excellent resolution between the oligomers within the series was achieved with both columns; however, with the PFP column analysis time was shorter, resolution was higher, and the degree of reversion of the  $m = 0$  and 1 oligomers was smaller. Further, using low temperatures (3 °C), resolution increased, and all the oligomers, including those with  $m = 0$  and 1, were resolved.

---

Finally, methods for the rapid characterization of industrial APPs by infusion in the mass spectrometry (MS) detector and capillary zone electrophoresis (CZE) with indirect photometric (IPD) and MS detection, were described (V. Bernabé-Zafón, A. Micó-Tormos et al., *Electrophoresis* 28, 341-352, 2007). Technical grade APPs, including alkylaminepolyphosphonates with 3 - 5 phosphonate groups and different hydrocarbon skeletons, as well as hydroxyethyl-aminobis(methylenephosphonic) acid, hydroxyethylidene-diphosphonic acid, and 2-phosphonobutane-1,2,4-tricarboxylic acid, were examined. A 10 mM solution of adenosine triphosphate disodium salt (ATP) at pH 2.2 was used as BGE. The nominal compounds of the industrial APPs and their impurities were well resolved in less than 15 min. The peaks were identified by using extracted ion electropherograms, which were obtained at the  $m/z$  values indicated by the peaks of the infusion spectra. Low concentrations of esters, anhydrides and APPs having different hydrocarbon skeletons than the nominal compounds, and lacking phosphonate and methylene-phosphonate groups with respect to them, were found. Also, hydroxyethyl-aminobis(methylenephosphonic) acid contained an intramolecular ester in a concentration close to that of the nominal compound. Application of CZE-IPD and CZE-MS to the quality control of industrial APPs, and of CZE-MS to the identification and characterization of APPs in cleaning products, was demonstrated.



**Capítulo I**  
**Introducción**

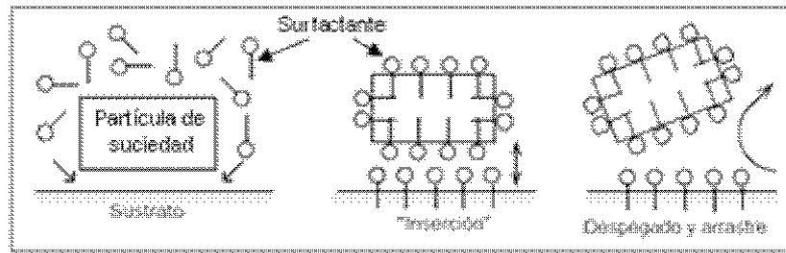
## **I.1. Alcoholes grasos etoxilados**

### *I.1.1. Características generales de los surfactantes*

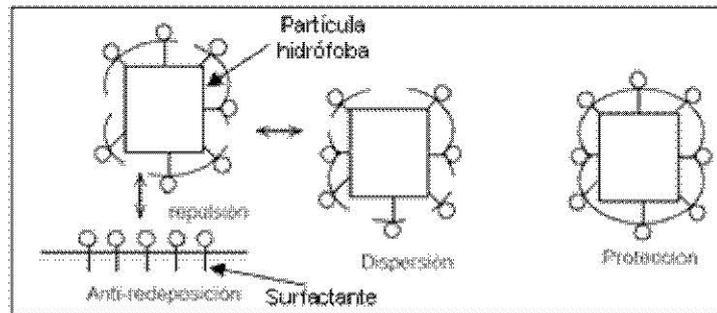
Los surfactantes son compuestos que alteran la tensión superficial de los líquidos. Poseen una constitución molecular típica, esencialmente lineal y asimétrica, con dos zonas diferenciadas, una hidrófoba y otra hidrófila. La parte hidrófoba es una cadena alifática, lineal o ramificada, que tiene por lo general entre 10 y 18 átomos de carbono. En los productos naturales, como los aceites vegetales (principalmente aceites de palma y coco) u otras fuentes renovables utilizadas en la fabricación de surfactantes, así como en los productos derivados de dichas fuentes, predominan las cadenas no ramificadas con valores pares en el número de átomos de carbono de la cadena alifática. Sin embargo, en los derivados del petróleo y los productos obtenidos por síntesis (usualmente a partir del carbón) existen multitud de cadenas ramificadas, y se encuentran valores tanto pares como impares en el número de átomos de carbono de la cadena alifática [1]. La parte hidrofílica, 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 se puede tratar de un grupo polar no iónico.

Estas características les confieren la propiedad de la detergencia, fenómeno caracterizado por los siguientes efectos (ver Fig. I.1.1, 2, 3 y 4):

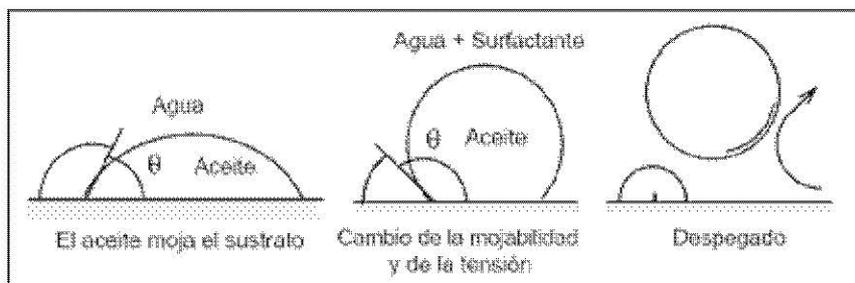
- 1) desestabilización de la adhesión de partículas hidrofóbicas a superficies,
- 2) estabilización de la dispersión de dichas partículas,
- 3) reducción de su mojabilidad (aumentando el ángulo de contacto), y
- 4) solubilización micelar de compuestos y partículas hidrofóbicas.



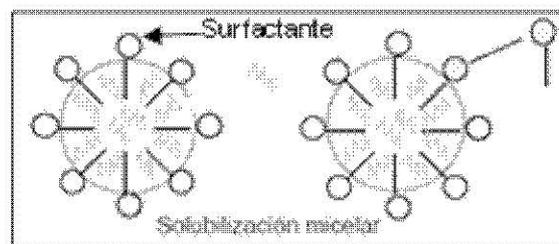
**Fig. I.1.1.** Desestabilización de la adhesión de una partícula hidrófoba a una superficie.



**Fig. I.1.2.** Estabilización de la dispersión de partículas hidrófobas.



**Fig. I.1.3.** Reducción de la mojabilidad de partículas hidrofóbicas.



**Fig. I.1.4.** Solubilización micelar.

Los surfactantes, ya sean naturales o sintéticos, organizan el medio en el que se encuentran mediante la formación de micelas y otras nanoestructuras, cambiando a su vez la solubilidad y el estado de otros constituyentes presentes en dicho medio. Sobre las propiedades surfactantes de un compuesto influyen, además de la propia naturaleza del grupo hidrófilo, la situación que éste ocupa en la molécula, ya sea terminal o en medio de la cadena. También existen surfactantes con dos o más grupos hidrófobos, como las sales de dialquildimetilamonio, o con dos o más grupos hidrófilos, como las betaínas o los alquilsulfosuccinatos.

### *1.1.2. Clasificación de los surfactantes*

Atendiendo a su carga, los surfactantes se clasifican en aniónicos, catiónicos, iones dobles y no iónicos. Los aniónicos tienen el grupo hidrófilo de carácter ácido, formando un anión por encima de cierto pH. Los catiónicos tienen el grupo hidrófilo de carácter básico. Los surfactantes que tienen simultáneamente grupos con carácter ácido y básico son iones dobles o zwitteriones. 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 EO (grupos éter espaciados con grupos etileno), con un oxhidrilo terminal. Los FAEs pertenecen a este grupo. Han sido estudiados a lo largo de cinco capítulos de esta tesis, por lo que a continuación se profundiza en diversos aspectos relacionados con este grupo de surfactantes.

### *I.1.3. Surfactantes no iónicos: FAEs*

Los surfactantes no iónicos actualmente más utilizados son los FAEs. Se producen por condensación de óxido de etileno con alquifenoles y con alcoholes de cadena larga. Esta condensación da lugar a mezclas de homólogos con distinto número de unidades de EO. En el caso de alcoholes lineales, la estructura es la siguiente:



que se puede abreviar como  $C_nE_m$ , donde  $n$  adopta generalmente valores entre 8 y 18, y  $m$ , entre 0 y 30. Los grupos éter le proporcionan la polaridad necesaria para garantizar su solubilidad en agua. Si bien la cadena de polioxietileno no es tan polar como un grupo ionizado, un conjunto de 5 a 10 unidades de EO puede alcanzar una notable capacidad hidrófila.

Los FAEs son los surfactantes no iónicos más empleados en productos de limpieza, cosméticos, herbicidas, etc. Los etoxilados de alquifenol, principalmente octilfenoles y nonilfenoles, poseen una cadena alquílica unida a un grupo aromático, que a su vez está unido a una cadena de unidades de EO. Durante años, su utilización en detergentes fue muy popular, pero en la actualidad están sometidos a una fuerte restricción legal debido a la baja biodegradabilidad de sus metabolitos más hidrófobos, concretamente, los alquifenoles no etoxilados y los monoetoxilados.

Los FAEs son excelentes agentes humectantes, compatibles tanto con surfactantes aniónicos como catiónicos, y su detergencia no se reduce en presencia de iones metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , como sucede con los surfactantes aniónicos. Tienden a ser líquidos o ceras de bajo punto de fusión y, por consiguiente, son difícilmente utilizables en la formulación de detergentes en polvo. Otro de sus inconvenientes es su tendencia a precipitar a temperaturas

elevadas o fuerzas iónicas altas, debido a la menor solvatación de la cadena de polioxietileno en comparación con los grupos iónicos. Además, a temperaturas elevadas, se reduce el peso estadístico de las conformaciones polares de la cadena de polioxietileno, de modo que la zona polar pierde buena parte de su carácter hidrofílico.

Por otra parte, los FAEs lineales se biodegradan más rápidamente, y tienen además mejores propiedades de detergencia que los alquilbenceno sulfonatos (LAS, surfactantes aniónicos muy habituales) sobre muchos tipos de suciedad, siendo especialmente buenos para eliminar la grasa de las fibras sintéticas. Además trabajan bien en frío. Por estas razones, los FAEs son actualmente los surfactantes no iónicos de mayor uso entre los principales componentes de los detergentes domésticos, siendo también muy utilizados en aplicaciones industriales [1-3].

Los FAEs lineales se caracterizan, a grandes rasgos, por el rango de valores de  $n$  (también llamado ‘corte hidrofóbico’), y por el número medio de unidades de EO; sin embargo, tanto para los procesos de control de calidad de las industrias como para estudios ambientales, se requiere información sobre la distribución de los oligómeros. La caracterización de FAEs es importante porque sus propiedades fisicoquímicas, así como el riesgo ambiental que comportan, vienen fuertemente condicionados por las distribuciones de sus cadenas hidrofóbica e hidrofílica [1, 4-9].

La determinación y caracterización de los FAEs sin derivatizar no es sencilla por una serie de motivos. A causa de la baja volatilidad e inestabilidad térmica de la cadena de EO, el uso de la cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) está limitado a los oligómeros con valores con  $m < 4$  [4, 10-12]. Debido a la carencia de un grupo cromóforo, la separación mediante

HPLC empleando como técnica de detección la espectrofotometría UV-Vis no es factible, y debido a la elevada volatilidad de los oligómeros con  $m < 3$ , si se emplea un detector evaporativo de dispersión de luz (*evaporative light scattering detector*, ELSD) se obtienen distribuciones sesgadas [13, 14]. También se ha empleado HPLC con detector de índice de refracción (*refractive index detector*, RID) [15-18], pero los LODs obtenidos son muy altos. Empleando MS con ionización por electronebulización (*electrospray ionization*, ESI), se observan los aductos  $[M+H]^+$  y  $[M+Na]^+$ , pero los factores de respuesta de los oligómeros sin derivatizar descienden alrededor de dos órdenes de magnitud cuando  $m < 4$ , y además los alcoholes no etoxilados ( $m = 0$ ) no se detectan [3, 4, 10, 12, 14 – 17, 19-21]. La baja sensibilidad de los oligómeros con un grado de etoxilación bajo se atribuye a su escasa capacidad para formar aductos con protones u otros cationes en fase gas [22].

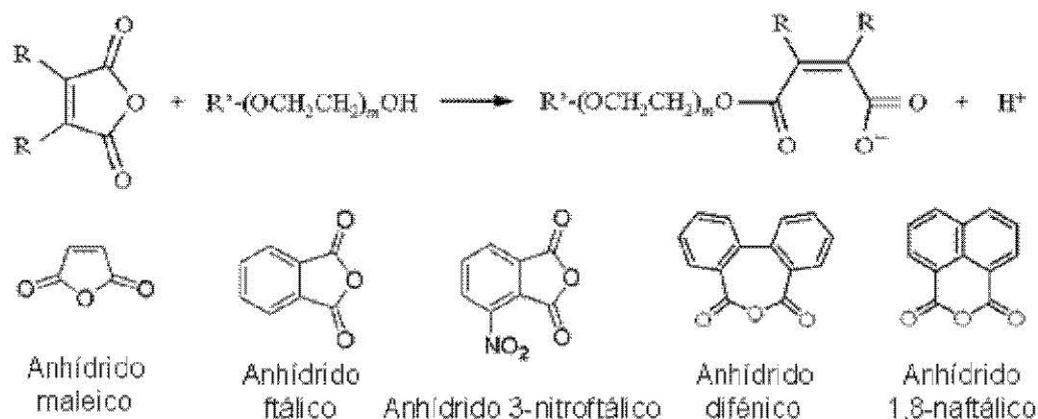
Para superar estas dificultades de detección, se han descrito para GC procedimientos de derivatización previa en los que se aumenta la volatilidad de los oligómeros [1, 23, 44], o bien, se les adiciona un cromóforo o una carga, previamente a su separación mediante HPLC [1, 15, 24 - 36] o electroforesis capilar (*capillary electrophoresis*, CE) [3, 14, 15, 17, 23 -41], tanto con detección UV-Vis como con detección fluorimétrica o mediante MS. Además, se han revisado y comparado las condiciones de trabajo para HPLC en fase normal (*normal phase*, NP) y en fase inversa (*reversed phase*, RP), en relación con la separación de los oligómeros de los FAEs previa derivatización con fenil-isocianato, 1-naftil isocianato y cloruro de 1-naftóilo [1, 31, 42, 44]. Los oligómeros de los FAEs también se han resuelto mediante cromatografía de exclusión por tamaños (*size exclusion chromatography*, SEC) [18] o mediante 2D-HPLC [18, 43], usando tanto NP- HPLC como RP-HPLC acoplados a

detección por MS, empleando una fuente ESI [10, 14, 45, 46], o bien una fuente de ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) [47 – 49]. En este último caso se han observado bajas sensibilidades a valores bajos de  $m$ , así como también degradación térmica de la cadena de EO [9, 21]. También se ha evaluado la determinación de la distribución de oligómeros de los FAEs mediante ionización láser asistida por la matriz (*matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI).

Mediante derivatización se reducen significativamente las diferencias de sensibilidad entre los oligómeros de los FAEs, en concreto, se reducen notablemente las diferencias de varios órdenes de magnitud, observadas mediante detección por ELSD y MS. Sin embargo, para diversos reactivos derivatizantes, se han descrito diferencias todavía importantes entre los factores de respuesta de los derivados correspondientes a distintos oligómeros [14, 19]. Hasta la fecha son escasos los estudios sobre los aspectos cuantitativos de los procedimientos de derivatización, incluido el rendimiento de la misma, o la obtención de los factores de respuesta de los derivados de los oligómeros, así como la tolerancia del procedimiento de derivatización frente al agua. Sin embargo, para validar un método se requiere un estudio de los factores de respuesta de los FAEs derivatizados, tanto a lo largo de  $n$  como de  $m$ , ya que tanto los rendimientos de reacción de los oligómeros como los factores de respuesta de los derivados dependen de estas dos variables. Se han establecido factores de respuesta para unos pocos procedimientos de derivatización, incluyendo la adición de un grupo naftilo para detección por fluorescencia [31]; la conversión de los grupos alcohol a grupos sulfato con el complejo dimetilformamida-SO<sub>3</sub>, seguido de detección por MS [17, 50]; y la esterificación con cloruro de 2-furoilo [28], seguida de detección UV-Vis.

Tanto la estabilidad del agente derivatizante, como la tolerancia de la reacción frente a la presencia de agua en la muestra, son características importantes que hay que conocer en los procedimientos de derivatización de los FAEs. Por ejemplo, el p-toluenosulfonato de 2-fluoro-N-metilpiridinio, que ha sido muy empleado para la determinación de FAEs en muestras ambientales [5, 15, 51], es extremadamente sensible a la humedad, lo que puede hacer fracasar la reacción de derivatización [15]. La sensibilidad frente a la humedad es también un inconveniente de los isocianatos y de los cloruros de acilo [28, 52]. Por otra parte, se ha demostrado que una deshidratación total de las muestras que contienen FAEs conlleva un alto riesgo de pérdida de analitos, de hasta más del 50% para el caso de los alcoholes no etoxilados, así como pérdidas de porcentajes significativos de oligómeros mono- y di-etoxilados [15], lo que subraya el interés que tiene el desarrollo de procedimientos de derivatización que sean tolerantes al agua.

Los anhídridos tienen la ventaja de que reaccionan con el agua más lentamente que los isocianatos o los cloruros de acilo. La esterificación de los FAEs con anhídridos cíclicos simétricos conduce a los correspondientes hemiésteres, proporcionando al mismo tiempo un grupo cromóforo y una carga, lo que facilita su detección tanto en UV-Vis como mediante MS.



**Fig. I.1.5.** Esterificación de FAEs con anhídridos cíclicos.

Se ha descrito la derivatización de los FAEs con una disolución de anhídrido ftálico en imidazol y piridina, seguido de separación mediante electroforesis capilar en gel con detección UV-Vis [38], o mediante RP-HPLC con una columna C18 empleando detección ESI-MS [3]. También se ha usado anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico [53, 54], pero este reactivo tiene una estructura molecular asimétrica, lo que conduce a dos derivados distintos por cada grupo alcohol; como consecuencia, al derivatizar FAEs o polietilenglicoles (*polyethyleneglicol*, PEG), se obtienen cromatogramas con picos dobles o triples por cada oligómero, respectivamente.

#### *I.1.4. Separación cromatográfica de FAEs por series*

Diversos autores han intentado separar los FAEs por series hidrocarbonadas, sin que se produzca a la vez separación entre los homólogos con distinta longitud de la cadena de EO. Se ha obtenido siempre un éxito limitado, debido a las condiciones extremas de elución (medios no acuosos de fuerza eluotrópica elevada), y a la baja resolución conseguida entre series. En la

primera referencia sobre el tema, la separación por series se obtuvo empleando una fase estacionaria C18 y una mezcla 9:1 acetona-agua como fase móvil [55].

La separación de FAEs por series hidrocarbonadas fue descrita también por Okada [26]. Para facilitar la elución con gradiente, y exaltar la sensibilidad de la detección, se procedió a la derivatización previa con cloruro de 3,5-dinitrobenzoílo. La separación de los derivados por series hidrocarbonadas se consiguió mediante una columna MCI gel, constituida por un gel de copolímero de estireno-divinilbenceno, y con una fase móvil conteniendo mezclas 1:5 y 1:4 de acetonitrilo (*acetonitrile*, ACN) –metanol (*methanol*, MeOH). Este sistema tiene también una fuerza eluyente elevada, y si bien se consiguió separar las series hidrocarbonadas, la resolución entre series consecutivas fue bastante reducida.

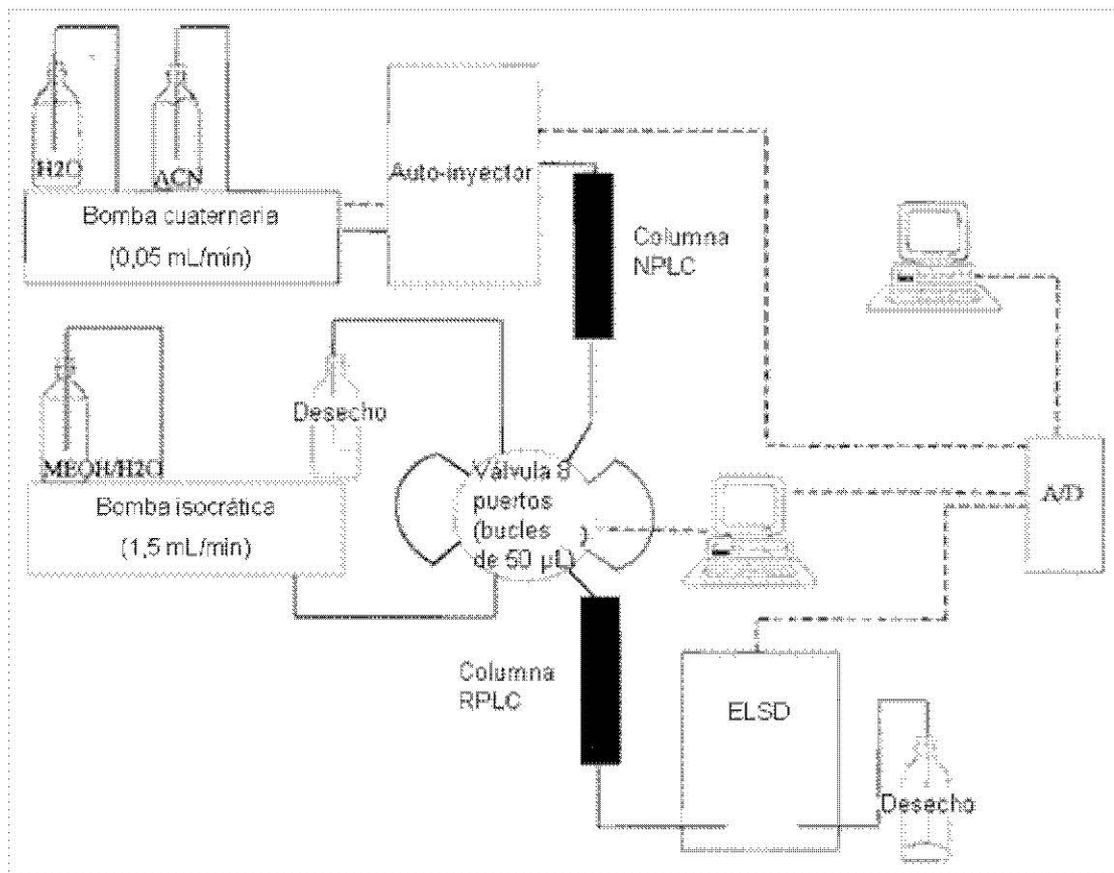
La separación de los FAEs por series ha sido también descrita por Zanette y col. [31]. Los FAEs se derivatizaron previamente con cloruros de 4-nitrobenzoílo y de 1-naftoílo. La separación de los derivados por series bien resueltas ( $n = 12, 14, 16$  y  $18$ ) se consiguió sobre una columna C18, utilizando una fase móvil no acuosa constituida por 90% de MeOH y 10% de ACN. Jandera y col. [47] separaron por series FAEs sin derivatizar, empleando una fase C18 a 40 °C, con una mezcla 90:10 de MeOH / agua, y detección mediante APCI-MS.

Otros autores han utilizado concentraciones más bajas de ACN en agua para separar las series, lo que cuestiona la necesidad de usar fases móviles no acuosas, cuya fuerza eluyente sobre fases estacionarias hidrofóbicas es muy elevada. La co-elución de oligómeros con distinto número de EO es posible en presencia de concentraciones relativamente altas de agua porque la cadena de EO se desolvata drásticamente por debajo de cierta concentración de agua. La desolvatación de la cadena de EO aumenta la retención de los FAEs sobre fases

estacionarias hidrofóbicas. La máxima retención de los oligómeros de los FAEs sobre columnas de C18 se produce a valores intermedios de la proporción ACN/ agua o MeOH/ agua. Recientemente, Liu y Pohl [56] han descrito la separación por series de los FAEs sin derivatizar sobre columnas de diol-alkil-sílice, utilizando ELSD. Como fase móvil, se utilizó una mezcla 70:30 de ACN/ agua conteniendo acetato amónico 0,1 M. Una ventaja es la fuerza eluyente relativamente baja de esta fase móvil, cuya composición es próxima a la que conviene utilizar para iniciar el gradiente en la separación en una segunda dimensión sobre una columna C8 o C18. La baja fuerza eluyente y la compatibilidad de las fases facilita la inyección en la segunda columna de cortes medulares (*heart-cut*) del eluato de la primera columna, sin que éstas tengan una fuerza eluyente excesiva, como ocurre con las fases propuestas por otros autores.

#### *I.1.5. Separación de FAEs mediante cromatografía 2D*

La separación de FAEs mediante cromatografía 2D fue descrita por primera vez por Murphy [43]. El esquema del montaje instrumental, empleado para la separación de FAEs sin derivatizar utilizando ELSD, se muestra en la Fig. I.1.6. Este montaje está diseñado para obtener cromatogramas 2D completos (*comprehensive 2D-HPLC*).



**Fig. I.1.6.** Esquema del montaje 2D-HPLC empleado por Murphy [43].

Siguiendo el esquema de la figura, la bomba cuaternaria impulsa a la fase móvil hasta la primera columna (de sílice), donde se realiza una separación en fase normal. Mediante la operación de la válvula de 8 puertos y 2 posiciones, el eluato se almacena, alternativamente, en uno de los dos bucles de 50 µL. Durante el llenado de un bucle, el otro bucle ha quedado permanece insertado en el flujo que proviene de la bomba isocrática, la cual lleva su contenido hasta la segunda columna (de C18). En esta columna se lleva a cabo una separación en fase inversa. En la primera columna, el gradiente ACN/ agua separa parcialmente los oligómeros de acuerdo a la longitud de la cadena de EO. Por el contrario, en la segunda columna, una fase móvil isocrática de 95:5 MeOH/ agua separa los

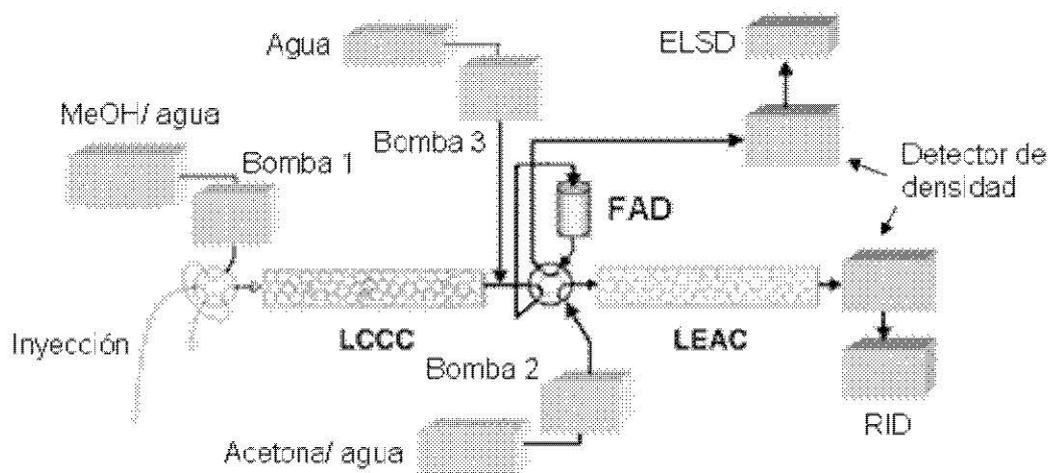
oligómeros de acuerdo con la longitud de la cadena hidrocarbonada. El uso de fases miscibles (ACN/ agua y MeOH/ agua) es necesario para evitar problemas de mezclado en la cabeza de la segunda columna.

La mezcla inicial de disolventes para eluir la primera columna fue de un 10:90 ACN/ agua, y la mezcla final, de un 80:20. El tiempo de elución en la primera dimensión fue del orden de los 60 min. El muestreo del eluato se realizó una vez por minuto, ya que la elución sobre la segunda columna se completaba también en 1 min por cada cromatograma. A lo largo de la primera dimensión, los cromatogramas bidimensionales mostraron una separación incompleta, con una resolución muy baja entre los sucesivos oligómeros con valores crecientes del número de EO. Por otra parte, la segunda dimensión condujo a una buena resolución entre los sucesivos oligómeros con  $n = 12, 14, 16$  y  $18$ .

Okada [26] describió el procedimiento para separar cortes medulares de eluato correspondientes a las series  $n = 12, 14, 16$  y  $18$ . Dichos cortes fueron introducidos secuencialmente en una segunda columna para separar los homólogos dentro de cada serie. Para la separación en la segunda dimensión se utilizó una columna de intercambio catiónico fuerte (*strong cation exchanger*, SCX). Los homólogos se separaron por el distinto grado de asociación con el  $K^+$ , utilizando una fase móvil constituida por una disolución metanólica de KCl. El sistema separador estaba constituido por tres bombas y tres columnas, dos de las cuales eran separadoras y la tercera, de pre-concentración.

La separación de FAEs mediante cromatografía bidimensional fue también investigada por Trathnigg y col. [17, 57, 58]. El primer enfoque propuesto por estos autores [57] combina la cromatografía líquida en condiciones críticas (*liquid critical conditions chromatography*, LCCC) en la primera dimensión con una cromatografía de exclusión-adsorción (*liquid exclusion/*

*adsorption chromatography*, LEAC) como segunda dimensión. En la primera columna se consigue una separación por series hidrocarbonadas, y en la segunda dimensión, se separan los oligómeros de cada serie de acuerdo al grado de etoxilación. La detección de los FAEs sin derivatizar se realizó con detectores de índice de refracción y de densidad (basado en un oscilador piezoeléctrico). La separación por LCCC es poco habitual. Para el caso de los FAEs, se consigue con una columna C18 trabajando con elevadas concentraciones de MeOH, tal como un 97-95% de MeOH y un 3-5% de agua. Por su parte, la separación por LEAC se lleva a cabo sobre columnas de C18 con tamaño de poro de 10 nm, utilizando fases de ACN/ agua, que tienen la ventaja de ser miscibles con el eluato de la primera dimensión.



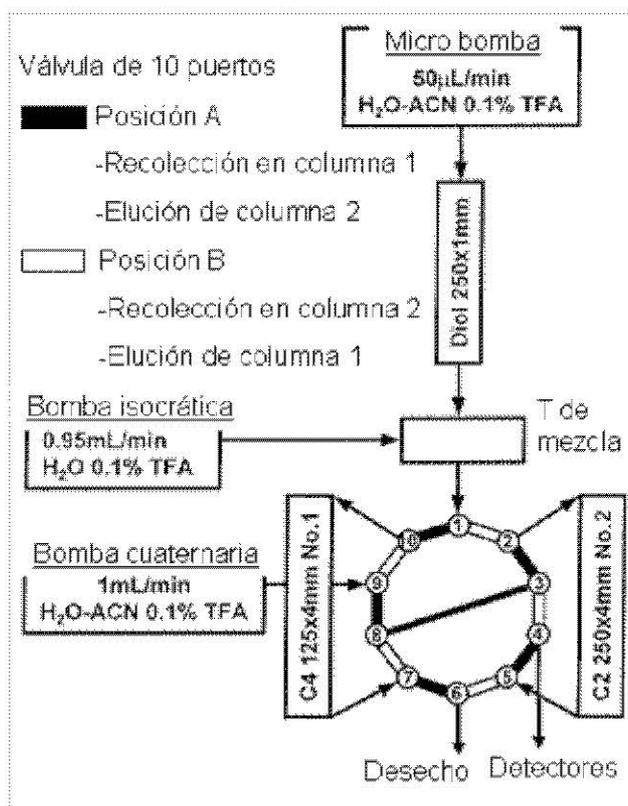
**Fig. I.1.7.** Montaje experimental para LC bidimensional, con LCCC como primera dimensión, LEAC como segunda dimensión y etapa de preconcentración de fracciones (FAD) [17].

En un trabajo posterior, Trathnigg y Rappel [17] describieron el montaje de la Fig. I.1.7 que aplicaron a la separación bidimensional de FAEs. Los

mecanismos de separación fueron los mismos que en un trabajo anterior [57], esto es, una LCCC como primera dimensión, y una LEAC como segunda. La diferencia respecto al trabajo anterior consistió en intercalar, entre ambas dimensiones, una etapa de retención intermedia de los solutos (*full adsorption/desorption*, FAD). Ambas dimensiones se desarrollaron en condiciones isocráticas, utilizando detectores de índice de refracción y de densidad para detectar los oligómeros de los FAEs sin derivatización. Como se muestra en la Fig I.1.7, el montaje hace uso de tres módulos de bombas. La bomba 1 se utiliza para la elución en la primera dimensión. Una sección del eluato queda retenida en la columna FAD. Mediante una bomba auxiliar (bomba 3 en la Fig. I.1.7) se sustituye el medio (85:15 de MeOH/ agua) por agua. Esta operación tiene por objeto eliminar el MeOH y asegurar la retención sobre la columna FAD. Finalmente, mediante la bomba 2, se hace pasar un eluyente de ACN/ agua por la columna FAD para desorber los analitos y conseguir su separación, de acuerdo con el grado de etoxilación, a lo largo de la segunda dimensión. Este mismo sistema bidimensional fue aplicado por Trathnigg y col. [58] a la separación de ésteres grasos de PEG.

Haefliger [59] describió un montaje para cromatografía 2D capaz de separar una mezcla compleja de surfactantes catiónicos, bi-iónicos, no iónicos y aniónicos. La separación por familias de surfactantes tenía lugar sobre una columna diol, que proporcionaba la primera dimensión. La elución sobre esta columna se realizaba con una fase móvil ACN/ agua en presencia de ácido trifluoroacético al 0,1%. Las proporciones ACN/ agua, próximas al cociente 60:40, se optimizaron para conseguir la máxima retención de la mayoría de los oligómeros sobre la columna diol.

Las separaciones en la segunda dimensión se efectuaban sobre una columna de fase inversa, siendo C4 y C2 las fases estacionarias recomendadas. La elución sobre estas columnas se llevó a cabo mediante gradientes ACN/ agua, ajustando en cada caso la fuerza eluyente a la naturaleza de la familia de surfactantes a separar. En todos los casos se utilizó ELSD.



**Fig. I.1.8.** Montaje experimental para HPLC bidimensional descrito por Haefliger [59].

La Fig. I.1.8 muestra el montaje experimental, que está basado en una válvula de dos posiciones y diez puertos. Uno de los inconvenientes de este sistema es que requiere tres bombas. La primera bomba se encarga de eluir la columna diol. Se utiliza una columna de 1 mm de diámetro para minimizar el

efecto de dispersión que puede suponer bombear porciones de eluato con una elevada fuerza eluyente sobre la segunda dimensión. La segunda bomba se utiliza para reducir la fuerza eluyente, para asegurar así el enfoque de los solutos en cabeza de la segunda columna. Finalmente, la tercera bomba se encarga de llevar a cabo el gradiente en la segunda dimensión. La válvula de 10 puertos permite conectar las columnas C4 y C2 de forma que cada una de ellas se encuentre alternativamente en una u otra de las posiciones siguientes:

- (a) Intercalada entre la salida de la primera dimensión y el desagüe, con el objeto de transferir un segmento del eluato de una dimensión a otra.
- (b) Intercalada entre la bomba cuaternaria y el detector, para poder desarrollar el cromatograma de la segunda dimensión.

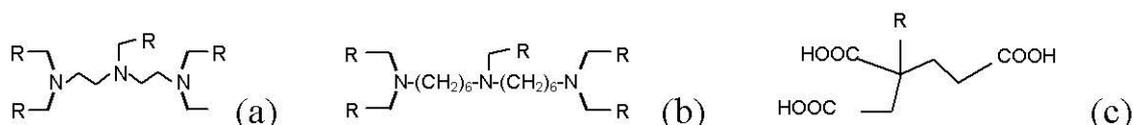
Aplicado a mezclas complejas de surfactantes, este sistema dio lugar a separaciones rápidas, aunque poco eficaces. Su principal ventaja fue la separación en un único cromatograma bidimensional de al menos 6 familias de surfactantes con propiedades muy distintas.

## **I.2. Alquilpolifosfonatos**

### *I.2.1. Antecedentes*

Los APPs son compuestos que contienen grupos fosfonato,  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ , y que actúan como agentes quelantes de calcio y metales pesados. Los alquilaminopolifosfonatos, que contienen nitrógenos amino con grupos metilénfosfonato,  $-\text{CH}_2-\text{PO}(\text{OH})_2$ , enlazados a los nitrógenos, constituyen una importante subclase de APPs. Debido a sus excelentes propiedades como secuestrantes de

iones metálicos, los APPs tienen un amplio campo de aplicación, incluyendo tratamiento de aguas, inhibición de la formación de depósitos de calcio y de la corrosión de metales, perforaciones petrolíferas, producción de papel y textil, agricultura y aditivos para productos de limpieza y otros productos industriales [60]. Algunos ejemplos de APPs se muestran en la siguiente figura:



**Fig. I.2.1.** Ácidos (a) dietilén-triaminopentakis(metilenfosfónico), (b) dihexametil-triaminopentakis(metilenfosfónico) y (c) 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico, siendo  $R = -CH_2-PO(OH)_2$ .

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, se encuentran también APPs y ácidos policarboxílicos. No todas las formulaciones los llevan, y su composición puede diferir en función del uso industrial del producto. Estos dos tipos de compuestos actúan como coadyuvantes y fortificadores, y en parte proporcionan la alcalinidad adecuada para el lavado. Además, evitan la deposición de carbonatos de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , e inhiben la acción de los catalizadores de oxido-reducción, como  $Fe^{3+}$ , alargando así la vida y la eficacia de los blanqueadores oxidantes (como el perborato y el percarbonato).

Algunos bisfosfonatos (compuestos con dos grupos fosfonato) se emplean en productos farmacéuticos para tratar enfermedades de los huesos, como la osteoporosis, y en la regulación del metabolismo del calcio [61]. Los APPs tienen baja toxicidad y son metabolizados por algunas bacterias; sin embargo, su

capacidad para extraer metales pesados de los sedimentos y acuíferos resulta preocupante desde el punto de vista ambiental [62]. Además, los alquil-fosfatos y alquil-fosfonatos actúan como fertilizantes de las algas, haciendo que se reproduzcan muy deprisa. La gran cantidad de algas agota el oxígeno del agua, que deja de estar disponible para la función respiratoria de microbios y peces, con la consiguiente mortandad y putrefacción anaeróbica de la materia orgánica, generando malos olores. Este fenómeno se llama eutrofización, y ha causado desequilibrios muy graves en lagos y ríos [62]. En la mayoría de países europeos, y en buena parte de Norteamérica, está prohibido utilizar estos ingredientes (en algunos lugares desde 1970), mientras que en España aún no. Los sustitutos más utilizados de los APPs son las zeolitas, que tienen el inconveniente de no ser solubles en agua, por lo que se acumulan en el fondo de las plantas depuradoras. Para sustituir a los APPs en numerosas aplicaciones, se usa el ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico, que minimiza el problema debido a su menor contenido en fósforo.

Los APPs han sido determinados en muestras de agua mediante cromatografía iónica (*ion chromatography*, IC). La formación de complejos incoloros de Fe(III) con los APPs se detecta por la pérdida de color del eluato, al que se adiciona una disolución de nitrato férrico [63, 64]. Otra forma de detectar APPs consiste en su oxidación post-columna hasta fosfato, con posterior aplicación del método del azul de molibdeno [65]. Los APPs también han sido determinados mediante HPLC con detección por MS previa metilación con diazometano para aumentar su volatilidad [66]. Para separar bisfosfonatos en compuestos farmacéuticos se ha empleado cromatografía iónica con IPD en presencia de ácido bencenotricarboxílico como agente revelador [67]. Los APPs con nitrógeno amino en su estructura molecular se pueden detectar

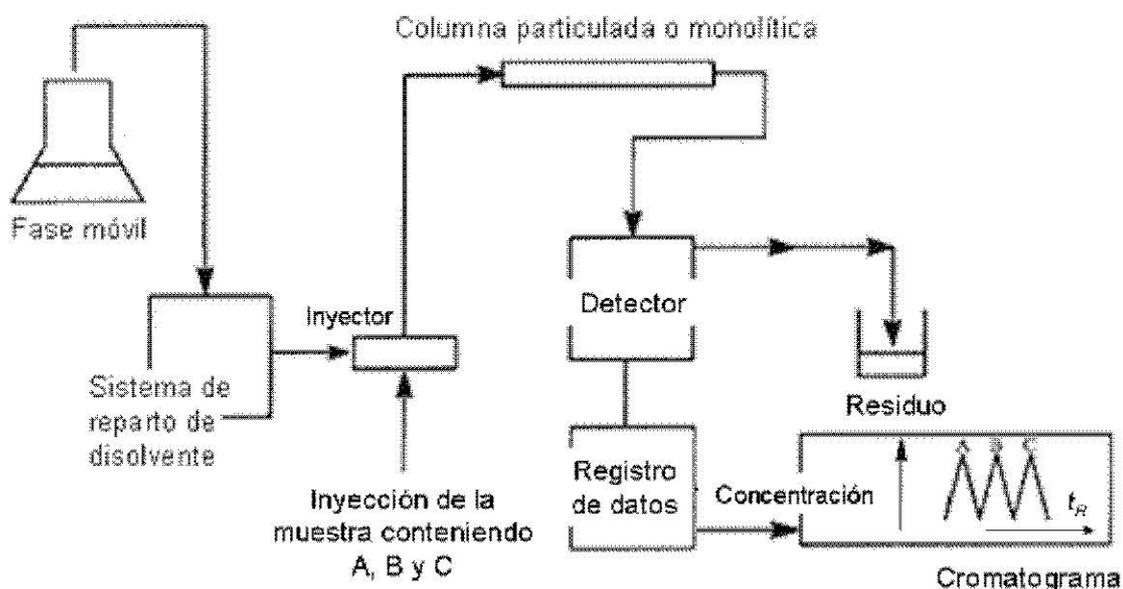
amperométricamente [68]. En otro método, basado en la separación de los complejos APP-Fe(III) mediante HPLC de pares iónicos, se consiguió un LOD muy bajo (0,05  $\mu$ M). Este método tiene interés en el análisis de aguas naturales y residuales, si bien no es aplicable a la determinación de bisfosfonatos [69, 70]. Además, se han separado mezclas de APPs utilizando CZE-IPD a pH 7,8 en presencia de adenosín-monofosfato (*adenosin monophosphate*, AMP) como revelador [71]. También se ha puesto especial atención en el desarrollo de métodos capaces de detectar trazas de ácidos alquilmonofosfónicos y sus ésteres. Estos compuestos aparecen en muestras acuosas como residuos producidos por hidrólisis en los lugares donde se han utilizado agentes de guerra química [72].

Para detectar APPs también se ha usado GC-MS con formación previa de los derivados de pentafluorobencilo [73], HPLC con detección fotométrica de llama (*flame ionization detection*, FID) [74, 75], CZE con IPD y detección conductimétrica [75-77], y cromatografía micelar electrocinética (*micellar electrokinetic chromatography*, MEKC). También se ha hecho uso de un detector de fluorescencia inducida por láser (*laser induced fluorescence*, LIF) previa formación de derivados con bromuro de panacilo [78]. En CZE-IPD se ha usado sorbato como agente visualizante [79, 80]. Los APPs se han detectado mediante HPLC-MS empleando una columna C18 con MeOH/ agua como fase móvil, empleando APCI en modos ion-positivo y ion-negativo [81], y mediante CZE-UV-MS en línea, en modo ion negativo, con ácido sórbico-amoniaco (5 mM a pH 6,5) como BGE y agente revelador [80]. Se han determinado los ácidos alquilaminofosfónicos en muestras de la industria farmacéutica empleando CZE con detección espectrofotométrica de sus ésteres fosfo-borato [82], y mediante CZE-IPD, empleando ácido fenilfosfónico como agente visualizador en medios neutro y básico [83].

### I.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución

#### I.3.1. Fundamentos

La cromatografía es un método de separación en el cual los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases: la fase estacionaria, que permanece fija, y la fase móvil, que se mueve en una dirección definida. La fase móvil es un fluido que percola a través de la fase estacionaria. Puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido rígido o gelatinoso, o un líquido. Un sistema cromatográfico se compone al menos de un sistema de bombeo, un dispositivo para la introducción de la muestra, una columna y un detector, más el sistema adecuado de adquisición de datos y control.



**Fig.I.3.1.** Diagrama de bloques de los componentes de un cromatógrafo de HPLC.

### *I.3.2. Componentes de un cromatógrafo de HPLC*

#### *I.3.2.1. Sistema de bombeo, válvulas e inyector*

Una bomba de HPLC debe proporcionar flujos estables, entre  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  y  $2 \text{ mL min}^{-1}$ , a presiones que pueden llegar hasta los 40 MPa. Las bombas empleadas en HPLC se clasifican en dos tipos: isocráticas y de gradiente. Los módulos de bombas para gradiente generan, mediante su control programado, mezclas de composición variable. Según el tipo de bomba, las mezclas se preparan a baja o alta presión. Las características de cada tipo son:

- a) Cuaternarias o de mezcla a baja presión. Los disolventes se mezclan en las proporciones adecuadas mediante una válvula programable de cuatro entradas antes del sistema de compresión de doble pistón. Para crear el gradiente, se aumentan los tiempos de admisión de un disolvente a medida que se reducen los tiempos de admisión los demás, de modo que el caudal total de salida se mantenga constante.
- b) Binarias o de mezcla a alta presión. El gradiente se crea aumentando la velocidad de bombeo de un módulo, a la vez que se reduce la velocidad del otro módulo. Estas bombas sólo permiten mezclar dos disolventes a la vez en lugar de cuatro; sin embargo, la mezcla se realiza con mayor precisión, el ruido debido a un mezclado incompleto de los disolventes es siempre insignificante y el caudal es más constante, sobre todo a valores bajos.

Las conexiones entre los distintos elementos se hacen con tubos de acero y de un plástico de alta resistencia a la presión, concretamente de polietileno-éter-

cetona (*polyethylenetherketone*, PEEK), de 1/16 de pulgada de diámetro externo, y con diámetros internos de entre 5 – 7 milésimas de pulgada. Tanto en cromatografía líquida como en otras técnicas analíticas, la muestra se inserta en el flujo de fase móvil mediante una válvula de 6 vías (o de 6 puertos) y 2 posiciones, que puede ser manual o automática.

### *I.3.2.2. Fase móvil y fase estacionaria*

La característica más sobresaliente de la fase móvil es su fuerza eluotrópica o fuerza eluyente, esto es, su capacidad para arrastrar a los solutos retenidos en la fase estacionaria. Las características de retención de un analito vienen determinadas por el balance de sus interacciones con ambas fases. Estas interacciones determinarán la retención, la selectividad y la resolución entre analitos en el sistema cromatográfico. En LC de reparto, el analito debe ser soluble en ambas fases.

Una separación realizada con una composición constante de fase móvil se denomina *elución isocrática*, mientras que aquella separación que tiene lugar variando la composición de la fase móvil, por lo general, aumentando progresivamente la fuerza eluyente, se denomina *elución en gradiente*. La separación de analitos con polaridades muy distintas requiere el uso de elución en gradiente.

### *I.3.2.3. Clasificación de técnicas cromatográficas por el mecanismo de retención*

La fase estacionaria puede ser:

a) La superficie de un sólido en cromatografía de adsorción, si bien la retención por adsorción se utiliza sobre todo en columnas de eficacia baja y

media, especialmente a escala preparativa, siendo raro utilizarla en HPLC con finalidad analítica.

b) Una fase enlazada en cromatografía de reparto. Dependiendo de las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos modalidades: RP-HPLC, cuando la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar, o bien NP-HPLC, cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar.

c) Un intercambiador iónico. En este caso, puede tratarse de un intercambiador catiónico o aniónico de tipo ácido o base fuerte, (SCX, y *strong anion exchanger*, SAX) o débil (*weak cation exchanger*, WCX, y *weak anion exchanger*, WAX). Esta modalidad de HPLC se conoce como IC.

d) Los poros de un sólido microporoso o de un gel, en SEC.

Las fases estacionarias más habituales en NP-HPLC son propil-ciano ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CN}$ , que se puede usar también en fase inversa por tener una polaridad intermedia), sílice sin derivatizar, propil-diol ( $\text{-CH}_2\text{CHOH-CH}_2\text{OH}$ ) y propil-amino ( $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ). Como fase móvil apolar se utiliza un hidrocarburo, habitualmente isohexano o heptano. Para incrementar la fuerza eluyente, el heptano se mezcla en concentraciones crecientes con disolventes polares miscibles, habitualmente diclorometano, cloroformo o iso-propanol. El disolvente polar miscible se denomina 'modificador'. Los solutos polares prefieren la fase estacionaria, por lo que la elución es en orden de polaridad creciente. La fuerza eluyente de la fase móvil aumenta con su polaridad, y es tanto mayor cuanto más se parece la fase móvil a la estacionaria polar.

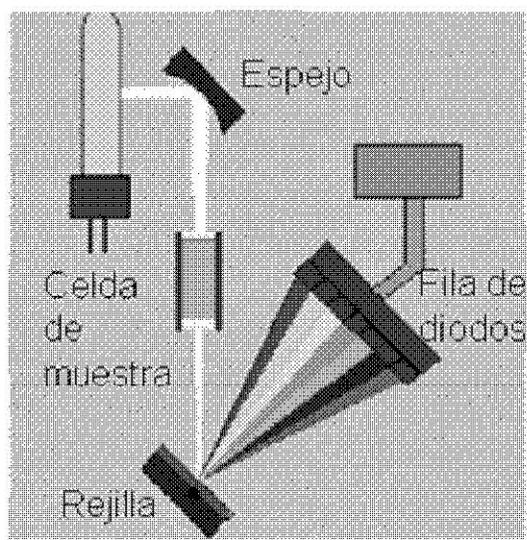
En RP-HPLC, la fase estacionaria típica es el octadecilo (C18), si bien, para solutos muy hidrofóbicos se usan también fases de octilo, butilo y etilo (C8,

C4 y C2), con el fin de que la retención no resulte excesiva. Como fase móvil, se utiliza un tampón acuoso mezclado con un modificador orgánico, en este caso un disolvente orgánico miscible. Modificadores habituales en RP-HPLC son ACN, MeOH y tetrahidrofurano (*tetrahydrofurane*, THF). Los solutos apolares son ahora los que prefieren la fase estacionaria, por lo que la elución es en orden de polaridad decreciente. La fuerza eluyente de la fase móvil aumenta con su hidrofobicidad. De nuevo, la fuerza eluyente es tanto mayor cuanto más se parece la fase móvil a la fase estacionaria hidrofóbica. Si los solutos pueden experimentar reacciones ácido-base, se añade al medio un amortiguador de pH. De este modo se controla su ionización. Si se utiliza un ácido débil, tal como el acético o el trifluoroacético, se favorece la protonación de los grupos silanoles residuales de la fase estacionaria, lo que a su vez reduce la posible formación de colas de adsorción.

#### *1.3.2.4. Detectores*

La elección del detector es crucial para el éxito del método. Las técnicas de detección más empleadas son la espectrofotometría UV-Vis, la fluorimetría, la MS y los RID, así como diversos detectores electroquímicos y conductimétricos. En espectrofotometría UV-Vis, la señal es proporcional a la concentración molar del soluto, cuya absorptividad molar depende de la naturaleza del grupo o grupos absorbentes. Cuando la sensibilidad de estos grupos no es suficiente, se utilizan técnicas de preconcentración, o se aumenta la absorptividad de los solutos aumentando su conjugación por derivatización. Los detectores obedecen a dos tipos de diseños: longitud de onda variable y fila o matriz de diodos. En los primeros, se selecciona una longitud de onda de medida fija, mientras que los segundos son capaces de barrer todo el rango del espectro UV-Vis varias veces

por segundo. En este último caso, no existe monocromador, de modo que sobre la muestra incide radiación de todas las frecuencias. Después del paso del haz por la muestra, se dispersa la radiación transmitida, de modo que cada longitud de onda incide sobre un fotodiodo distinto.



**Fig. I.3.2.** Detector UV-Vis de fila de diodos.

En MS, el detector es un instrumento que permite analizar con gran precisión estructuras moleculares, diferenciando entre grupos funcionales, elementos químicos e isótopos atómicos, separando los fragmentos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Un detector de MS acoplado a un cromatógrafo puede diferenciar compuestos con características de retención muy similares, siendo posible identificarlos y/o cuantificarlos aunque sólo estén parcialmente resueltos, o incluso no resueltos en absoluto. En el apartado I.3. se presentan más extensamente los tipos de detectores espectrométricos de masas utilizados a lo largo de la presente memoria.

### I.3.3. Propiedades cromatográficas

Para llevar a cabo una separación cromatográfica, el analista debe establecer si se puede separar adecuadamente al analito del resto de componentes de la muestra, y en su caso, si la cantidad en que se halla es suficiente como para poderlo detectar y, en su caso, determinar. El tiempo que transcurre desde la inyección hasta la detección de un analito es su *tiempo de retención*,  $t_R$ . Por su parte, el *factor de capacidad* o *retención relativa*,  $k$ , expresa la retención neta en unidades de tiempo muerto,  $t_0$ , o tiempo que tarda en eluir un compuesto que no presenta retención:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = K_D \frac{V_S}{V_M} \quad \text{Ec. I.3.1}$$

donde  $K_D$  es la constante de distribución del soluto entre las fases estacionaria y móvil, y  $V_S$  y  $V_M$ , los volúmenes de dichas fases, respectivamente. El intervalo óptimo de valores de  $k$  es 1-5, si bien son aceptables valores dentro del rango 0,2-20.

La capacidad de un sistema cromatográfico para distinguir entre dos componentes A y B se estima mediante la *selectividad* o *factor de separación*,  $\alpha$ , que se define como la relación existente entre las constantes de distribución, y por lo tanto, también entre las retenciones relativas de los factores de capacidad de los dos solutos.

$$\alpha = \left( \frac{K_{D,B}}{K_{D,A}} \right) = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{R,B} - t_0}{t_{R,A} - t_0} \quad \text{Ec. I.3.2}$$

siendo por convenio,  $t_{R,B} \geq t_{R,A}$  y por lo tanto  $\alpha \geq 1$ .

El grado de separación entre dos componentes es la *resolución*,  $R$ :

$$R = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{0,5(w_A + w_B)} \quad \text{Ec. I.3.3}$$

siendo  $w_A$  y  $w_B$  las anchuras de las bases de los picos de los dos solutos.

Por su parte, la eficacia se mide como  $1/H$ , o número de platos teóricos por unidad de longitud, siendo  $H$  el aumento de la varianza de zona por unidad de distancia o de tiempo migrado. La eficacia global de un sistema se estima por el número total de platos teóricos,  $N$ , siendo  $N = L/H$ . Suponiendo picos gaussianos, la eficacia global de un sistema se estima a partir de datos cromatográficos, como:

$$N = 16 \left( \frac{t_A}{w_A} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_A}{w_{0,5}} \right)^2 \quad \text{Ec. I.3.4}$$

donde  $w_{0,5}$  es la anchura tomada a la mitad de la altura del pico. Sustituyendo esta expresión y la definición de  $k$  dada por la Ec. I.3.1, se obtiene, en la Ec. I.3.3, la relación entre resolución y eficacia:

$$R = 0,25 \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_B}{1 + k_B} \right) \sqrt{N} \quad \text{Ec. I.3.5}$$

donde  $k_B$  es la retención relativa del segundo de los dos solutos eluidos. Esta ecuación indica que la resolución es el resultado de la combinación de tres factores: selectividad ( $\alpha$ ), retención ( $k_B$ ) y eficacia global, ( $N$ ).

La retención relativa,  $k$ , viene determinada fundamentalmente por la fuerza eluyente, y ésta se estima mediante diversos parámetros de polaridad. La polaridad global de disolventes, solutos y fases estacionarias se puede estimar mediante el parámetro de Hilderbrand y mediante coeficientes de adsorción sobre sílice y otros adsorbentes. Los parámetros de polaridad global intentan resumir,

en un valor numérico único, el conjunto de fuerzas con las que una molécula interacciona con otras. El parámetro de solubilidad de Hildebrand ofrece una medida global de las fuerzas que actúan en el seno de un disolvente para mantener sus moléculas unidas, lo que permite disponer de una escala cuantitativa de polaridad. Dicho parámetro se define como la raíz cuadrada de la energía cohesiva por unidad de volumen:

$$\delta^2 = -E / v \quad \text{Ec. I.3.6}$$

siendo  $E$  la energía cohesiva y  $v$ , el volumen molar o volumen que ocupa un mol del disolvente.

**Tabla I.3.1.** Parámetros de Hildebrand para algunos disolventes.

<b>Disolvente</b>	<b><math>\delta</math></b>	<b>Disolvente</b>	<b><math>\delta</math></b>
Agua	25,5	1,4-Dioxano	10,7
MeOH	15,9	THF	9,9
ACN	13,1	Acetato de etilo	9,5
Isopropanol	11,6	Cloroformo	9,4
Diclorometano	10,7	Alcanos	7,0

Según este parámetro, el agua se encuentra en lo más alto de la escala, como corresponde a un líquido muy fuertemente asociado, y otros disolventes polares ocupan posiciones intermedias, correspondiendo a los alcanos la polaridad más baja.

### *I.3.4. Conmutación de columnas y cromatografía bidimensional*

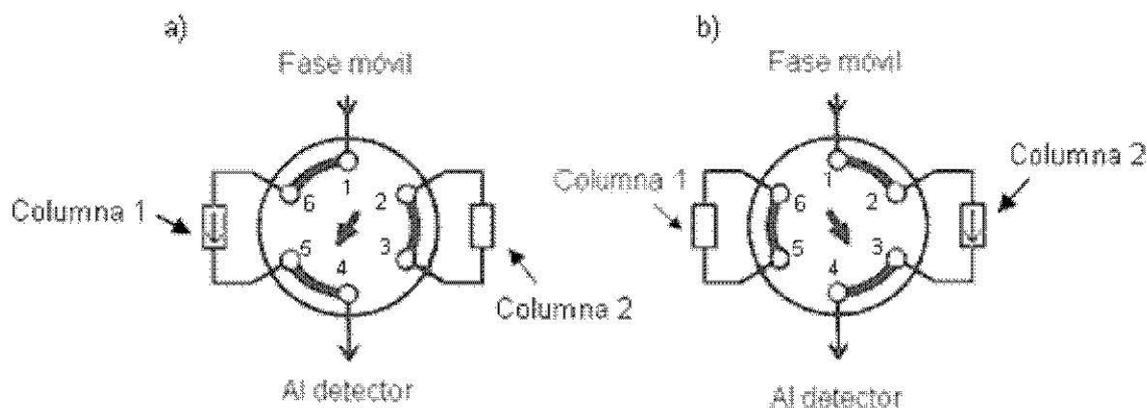
La conmutación de columnas es básicamente un método de selección de columna en línea. Mediante el giro o conmutación de una válvula se puede seleccionar una columna particular para separar una muestra determinada, pero también para desviar una parte del eluato de una primera columna hacia otra columna con una selectividad diferente. Las tres aplicaciones típicas son:

- a) Enriquecimiento o preconcentración de trazas sobre una columna de preconcentración, para su posterior separación sobre una columna analítica.
- b) Eliminación de parte de la matriz de una muestra sobre una primera columna (*sample clean-up*), para reducir así el impacto de la presencia de interferencias, mejorando la línea base, antes de realizar la separación de los analitos sobre una segunda columna. Entre una y otra etapa, se modifica la selectividad mediante la selección de las fases móvil y estacionaria (ortogonalidad de las dos separaciones).
- c) El desvío de fracciones seleccionadas del eluato de una primera columna hacia una segunda columna o sistema de distinta selectividad.

La tercera de estas aplicaciones constituye una de las dos modalidades de cromatografía en dos dimensiones (2D), mencionada en el apartado I.1.4 de este capítulo, concretamente la modalidad de corte medular [84]. La otra modalidad de cromatografía bidimensional es la denominada ‘completa’ (*comprehensive*). En esta segunda modalidad, todo el efluente de una primera columna, dividido en pequeñas secciones, se introduce secuencialmente en una segunda columna de distinta selectividad. El resultado es una matriz de datos que se suele representar en forma de mapa de contornos o mapa topológico, con los tiempos

correspondientes a cada una de las dos separaciones sobre los ejes cartesianos [43].

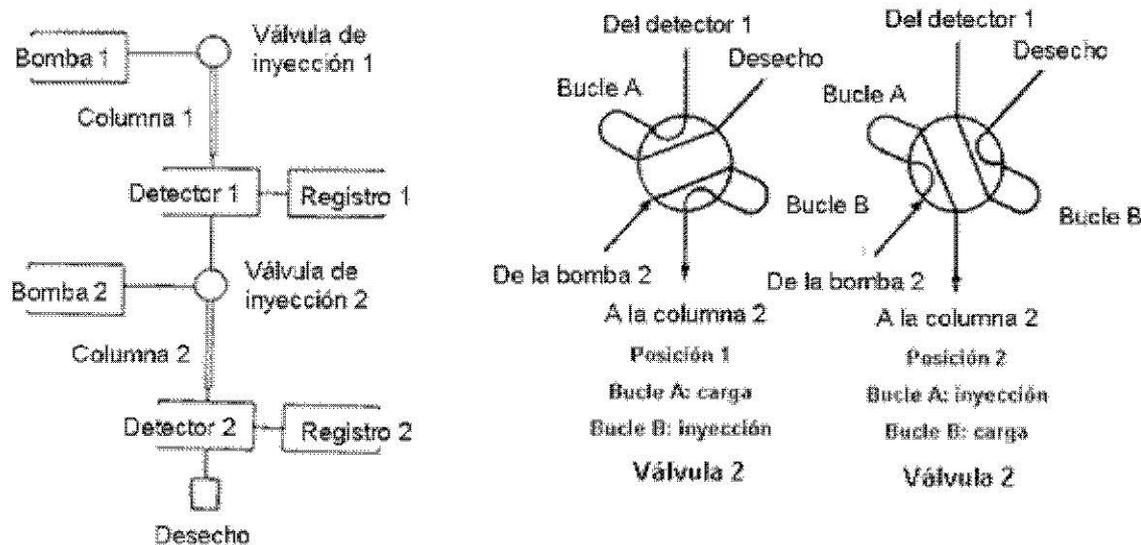
Mediante la conmutación de columnas se consigue incrementar sustancialmente la versatilidad de la cromatografía líquida. En la Fig. I.3.3 se muestra un ejemplo de un montaje para conmutación de columnas, basado en una válvula de seis puertos y dos posiciones [85]. La columna 1 está intercalada entre los puertos 5 y 6, y la columna 2 entre los puertos 2 y 3. La fase móvil que proviene de la válvula de inyección, o más frecuentemente de otra columna, entra por el puerto 1 y, cualquiera que sea la posición de la válvula, va a parar al detector a través del puerto 4. La válvula permite seleccionar la elución entre las columnas 1 y 2.



**Fig. I.3.3.** Montaje con conmutación. a) Elución por la columna 1. b) Elución por la columna 2.

La primera separación en 2D-HPLC fue descrita por Erni y Frei en 1978 [86]. Separaron glicósidos sobre una columna de permeación en gel como primera dimensión, utilizando una separación en fase inversa con una columna C18 como segunda dimensión. Como se muestra en la Fig. I.3.4, el montaje

consistió en una válvula de 8 puertos y 2 posiciones (válvula 2), combinada con la acción de dos bombas.

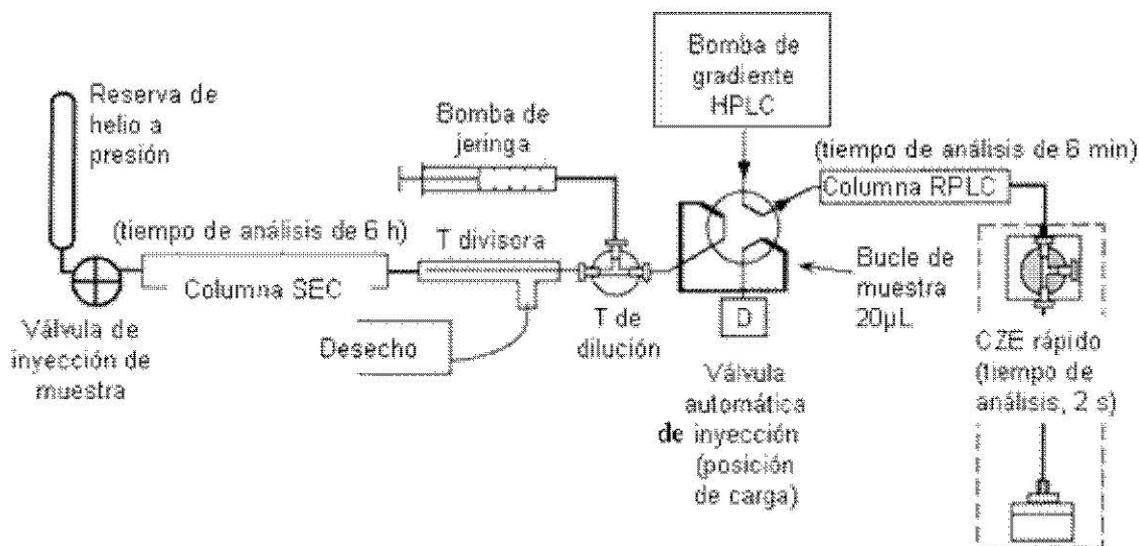


**Fig. I.3.4.** Esquema del montaje para HPLC-2D en línea descrito por Erni y Frei [86].

El efluente de la primera columna llena alternativamente uno u otro de los dos bucles conectados a la válvula 2. Mientras un bucle se llena, el otro es eluido por la segunda bomba a través de la segunda columna. Un requisito de este montaje, que limita sus posibles aplicaciones, es que el eluato de la primera columna debe tener una fuerza eluyente menor que la fase móvil alimentada a la segunda columna. En caso contrario, se producen efectos de dilución de los analitos cuando el contenido de los bucles se introduce en la segunda columna.

El diseño básico de Erni y Frei [86] se ha utilizado en numerosas ocasiones con muy pequeñas variantes [87-90]. Así por ejemplo, Choi [87] describió un montaje con conmutación para trabajar con dos columnas

separadoras, más una columna intermedia o de preconcentración. En versiones simplificadas del montaje de Erni y Frei se sustituye la válvula de ocho puertos por la más común de seis puertos y dos posiciones [91-94]. Como se muestra en la Fig. I.3.5, al reducir el número de puertos de ocho a seis, no se puede montar más que un bucle único. Salvo si se practica detención del flujo en la primera dimensión, este montaje sólo permite la introducción de parte del efluente de la primera dimensión a la segunda.



**Fig. I.3.5.** Esquema de un instrumento para SEC/RP-LC/CZE [94].

En 1997, Opitek y col. [95] introdujeron un montaje que evita el uso de bucles de espera, ya que utiliza una válvula de cuatro puertos y dos posiciones para llevar directamente el efluente de la primera columna a una de las dos columnas paralelas utilizadas como segunda dimensión.

En un desarrollo posterior, las dos válvulas de cuatro puertos y dos posiciones fueron sustituidas por una única válvula de diez puertos y dos

posiciones [96-98]. Esta válvula es capaz de operar a la vez con dos columnas paralelas en la segunda dimensión, derivando alternativamente el flujo de la primera columna hacia una o hacia otra columna, llevando además el efluente final hacia el desagüe o hacia el detector, respectivamente. La columna que no está admitiendo efluente queda conectada a una segunda bomba que lleva a cabo su elución hacia el detector.

Todos los montajes anteriormente descritos hacen uso de válvulas para cargar secciones del eluato de la primera columna en una segunda columna, sin que en ningún momento se detenga el flujo en ningún punto del sistema. Sin embargo, en 2006, Bedani y col. [99] demostraron que es posible detener el flujo en la primera columna sin que se observe una dispersión significativa de las bandas ocupadas por los solutos.

## **I.4. Electroforesis capilar**

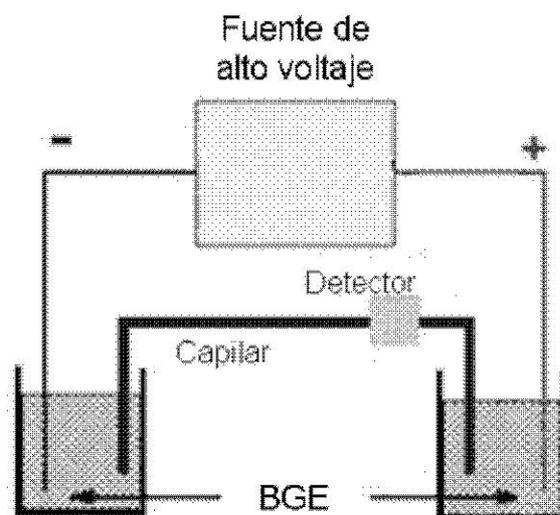
### *I.4.1. Introducción*

La CE comprende un conjunto de técnicas de separación basadas en la migración diferencial de partículas cargadas en el seno de un campo eléctrico. Los capilares empleados suelen ser de sílice fundida, de entre 25 y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, que se rellenan con un electrolito de fondo (*background electrolyte*, BGE), el cual permite la conducción de la corriente eléctrica cuando se aplica un campo eléctrico entre los extremos del capilar [100]. Preferentemente, y con el objeto de preservar la resolución, la detección tiene lugar en el interior del capilar. La elevada resistencia eléctrica del capilar permite aplicar voltajes altos con una mínima generación de calor, dando lugar a tiempos

de análisis cortos y a elevadas eficacias. Debido a la gran relación superficie/volumen del capilar, el calor generado es disipado con rapidez, minimizándose con ello el establecimiento de un gradiente radial de temperatura.

La fuerza que impulsa el flujo en CE se genera en la misma pared interna del capilar mediante el efecto conocido como electroósmosis, cuyo fundamento se comenta más adelante. El bombeo mediante electroósmosis da lugar a un perfil de flujo prácticamente plano, al contrario de lo que sucede en HPLC, donde la presión externa da lugar a un flujo con perfil parabólico. En el caso ideal, en CE se consigue un ensanchamiento de bandas controlado por difusión molecular, alcanzándose eficacias que superan los  $10^5$  platos teóricos [100-105].

Se han descrito diversas técnicas de electroseparación, basadas en mecanismos puramente electroforéticos, cromatográficos y mixtos, lo que permite abarcar aplicaciones muy diversas. Así, el campo de aplicación de la CE se extiende tanto a cationes como a aniones, y mediante las oportunas modificaciones del BGE, también a iones dobles sin carga efectiva neta, así como a moléculas, abarcando un rango muy amplio de masas moleculares, desde el  $\text{Li}^+$  hasta proteínas y fragmentos de ADN. Además, se inyectan, ya sea hidrodinámica o cinéticamente, volúmenes de muestra mínimos (1 – 50 nL). La instrumentación es muy sencilla, lo que ha facilitado su automatización. El esquema básico de un equipo de CE se muestra en la Fig. I.4.1.



**Fig.I.4.1.** Esquema instrumental básico para electroforesis capilar.

En el período 1930-1937, Tiselius desarrolló la electroforesis en disolución libre, cuya aplicación principal fue el estudio de diversas fracciones proteicas. Esta técnica se practicaba en un tubo de vidrio en forma de U. La mayor densidad de la disolución depositada en el fondo del tubo minimizaba la mezcla convectiva, lo que permitió conseguir separaciones impensables para la época. Este estudio le valió a su autor el Premio Nobel de Química en 1947. Hjertén publicó en 1967 la primera separación electroforética en un tubo capilar de vidrio [106]. Posteriormente, Virtanen [107] y Mikkers [108] desarrollaron separaciones electroforéticas en capilares de vidrio y de politetrafluoro etileno (*polytetrafluoroethylene*, PTFE), respectivamente. En 1981, Jorgenson y Lukacs [109] describieron separaciones en capilares de sílice fundida de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. Jorgenson [110] 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. En 1989 se comercializaron los primeros instrumentos para CE.

Una serie de avances tecnológicos han contribuido al desarrollo de lo que constituye en la actualidad la CE, entre los que cabe destacar:

- Los capilares flexibles de sílice fundida, desarrollados para GC en 1983, lo que permitió el desarrollo práctico de la electroforesis capilar al evitar la frecuente rotura de los capilares.
- La disponibilidad de fuentes de potencia de alto voltaje, de hasta 30 kV, altamente estabilizadas y automatizadas para el mantenimiento estable de la tensión aplicada.
- Los detectores desarrollados para HPLC, especialmente los espectrofotómetros de alta sensibilidad, que se aplicaron al tubo capilar con las oportunas modificaciones de la óptica.
- La adaptación a la CE de las técnicas de electroforesis en capa de gel de poliacrilamida, agarosa y otros lechos porosos, lo que permitió el desarrollo de técnicas de CE de separación de proteínas basadas en el tamizado molecular.
- El desarrollo de mezclas de anfolitos, obtenidos por reacción entre el ácido acrílico y diversas polietilenpoliaminas, que hacen posible la generación de gradientes de pH continuos y estables que permiten separar proteínas con puntos isoeléctricos muy próximos entre sí.
- El desarrollo de herramientas quimiométricas capaces de exaltar la resolución, haciendo uso de la información disponible en los dominios del tiempo y de la longitud de onda.

## I.4.2. Principios de la CE

### I.4.2.1. Electromigración

En electroforesis capilar la separación se produce por las diferentes velocidades que adquieren los solutos en el seno de una disolución en presencia de un campo eléctrico. Dichas velocidades son proporcionales al campo eléctrico:

$$v = \mu_e E \quad \text{Ec.I.4.1}$$

donde  $v$  es la velocidad del ion,  $\mu_e$  su movilidad electroforética y  $E$  el campo eléctrico. Por convenio, las movilidades catiónicas son positivas y las aniónicas, negativas. El campo eléctrico es el cociente entre el voltaje aplicado y la longitud del capilar (igual a la distancia entre los electrodos), mientras que la movilidad electroforética es una constante característica del ion en un determinado medio, y es en parte la responsable de su electromigración. La velocidad aparente del ion es, en realidad, la suma de su velocidad electroforética, dada por la Ec.I.4.1, y su velocidad electroosmótica.

La movilidad electroforética es proporcional a la relación entre la carga y el tamaño de la especie iónica, e inversamente proporcional a la fuerza iónica del medio [111]. La movilidad electroforética es proporcional a la fuerza de atracción electrostática,  $F_e$ , que se contrapone a las fuerzas de rozamiento con el medio,  $F_r$ . Estas dos fuerzas vienen dadas por:

$$F_e = qE \quad \text{Ec. I.4.2}$$

$$F_r = 6 \pi \eta r \quad \text{Ec. I.4.3}$$

donde  $r$  es el radio del ion hidratado y  $\eta$  es la viscosidad de la disolución. Cuando se alcanza el estado estacionario ambas fuerzas son de la misma magnitud, pero de signo opuesto, por lo que se puede escribir:

$$qE = 6\pi\eta r v_e \quad \text{Ec.I.4.4}$$

Despejando  $v_e$ :

$$v_e = \frac{qE}{6\pi\eta r} \quad \text{Ec.I.4.5}$$

Teniendo en cuenta la Ec.I.4.1, la movilidad electroforética del ion es:

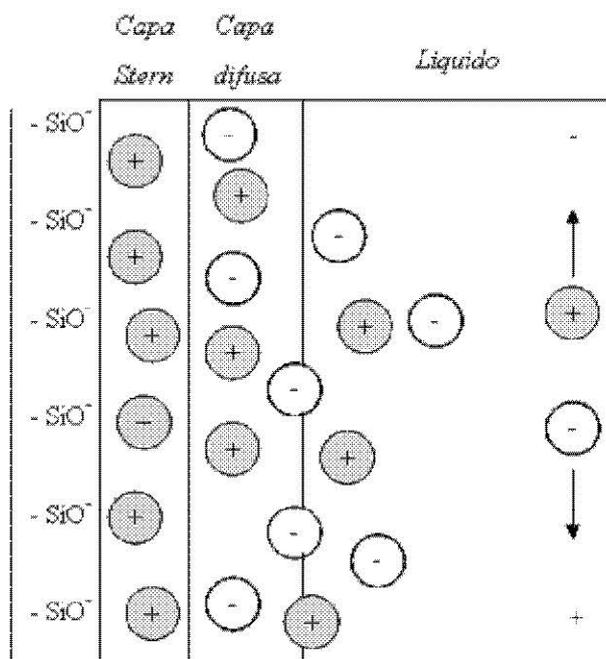
$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{Ec.I.4.6}$$

Se deduce que los iones con mayor densidad de carga, situados en medios de baja viscosidad, tendrán movilidades electroforéticas mayores.

#### *I.4.2.2. Electroósmosis*

Un fenómeno fundamental en CE es el flujo electroosmótico (*electroosmotic flow*, EOF). El EOF es consecuencia de la densidad de carga sobre la pared interna del capilar. La superficie está cargada negativamente debido a la desprotonación de los grupos silanol. En presencia del BGE, las cargas positivas del mismo son atraídas por las cargas negativas de la pared del capilar, formándose así una primera capa de iones fuertemente retenidos, llamada capa de Stern. Sin embargo, la capa de Stern no llega a neutralizar por completo la carga de la pared, en la cual permanece una densidad de carga residual conocida como *potencial zeta* o *zeta* ( $\zeta$ ). La carga residual da lugar a una capa difusa de contraiones, débilmente retenidos, en la que predominan los iones de signo opuesto a la carga de la pared. Al aplicar un campo eléctrico, la capa difusa

se mueve hacia el cátodo, generándose así un flujo conocido como EOF, que arrastra todo el contenido del capilar.



**Fig.I.4.2.** Cationes acumulados sobre la superficie. Los cationes se señalan con círculos oscuros, y los aniones, con círculos claros.

El EOF depende del pH, de la fuerza iónica y de la viscosidad del BGE, así como de la historia de la pared del capilar. La velocidad del EOF es proporcional al campo eléctrico:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E \quad \text{Ec.I.4.7}$$

donde el coeficiente de proporcionalidad es la movilidad electroosmótica, que es una función del potencial zeta de la superficie de la pared,  $\zeta$ :

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon_0 \epsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad \text{Ec.I.4.8}$$

donde  $v_{EOF}$  y  $\mu_{EOF}$  son respectivamente la velocidad y la movilidad electroosmóticas, y  $\varepsilon_0$  es la permisividad eléctrica o constante dieléctrica del medio. El potencial zeta viene determinado por la densidad de carga de la superficie de la pared del capilar y, como la carga depende del pH del medio, la magnitud del EOF, tal y como se ha comentado anteriormente, depende también del pH. A pHs elevados, los grupos silanol se encuentran desprotonados en gran medida, por lo que el EOF es considerablemente mayor que a pHs bajos. La movilidad aparente del soluto,  $\mu_{ap}$ , es la suma de sus movilidades electroforética y electroosmótica:

$$\mu_{ap} = \mu_e + \mu_{EOF} \quad \text{Ec.I.4.9}$$

La movilidad aparente de un ion se puede medir a partir de su tiempo de migración,  $t$ , mediante:

$$\mu_{ap} = \frac{v_{ap}}{E} = \frac{L'}{tE} = \frac{L'L}{tV} \quad \text{Ec.I.4.10}$$

siendo  $V$  el voltaje aplicado,  $L'$  la distancia recorrida por el ion desde el extremo de inyección hasta la ventana de detección, y  $L$  la longitud total del capilar.

#### *I.4.2.3. Control del EOF*

Es necesario ejercer un control sobre el EOF, ya que influye decisivamente en las características analíticas de la separación. El efecto de diversos factores sobre el EOF se detalla en la Tabla I.4.1.

**Tabla I.4.1.** Técnicas de control del EOF y sus efectos.

<b>Variable</b>	<b>Resultado</b>	<b>Otros efectos</b>
Campo eléctrico, $E$	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 $\zeta$ y del EOF	Elevada fuerza iónica crea 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 $\zeta$ y la viscosidad	Cambios complejos Puede alterar la selectividad
Surfactante	Se adsorbe a la pared del capilar vía interacciones hidrofílicas y/o iónicas	Alteran la selectividad Surfactantes aniónicos aumentan el EOF, surfactantes catiónicos disminuyen o invierten 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

Algunas aplicaciones de la CE requieren la supresión o la inversión del EOF, lo que se puede conseguir de distintos modos:

- Supresión del EOF trabajando a  $\text{pH} \leq 2$ , o en presencia de surfactantes o polímeros no iónicos, o mediante el uso de capilares recubiertos de un compuesto no iónico enlazado (como el alcohol polivinílico).
- Inversión del EOF mediante adición de surfactantes catiónicos o de polímeros policationicos al BGE.

### I.4.3. Ensanchamiento de bandas en CE

Las causas que producen ensanchamiento de bandas, y por tanto, pérdida de eficacia, se resumen en la Tabla I.4.2.

**Tabla I.4.2.** Causas de ensanchamiento de bandas en CE.

<b>Fuente</b>	<b>Comentario</b>
Difusión molecular longitudinal	Constituye el límite último de la eficacia Solutos con bajos coeficientes de difusión permiten alcanzar mayores eficacias
Efecto Joule	Un gradiente térmico radial reduce la eficacia
Longitud de inyección	La longitud de inyección debe ser menor que la longitud de la zona controlada por difusión Si el LOD no es lo suficientemente bajo, se requiere un volumen o longitud de inyección mayor que el ideal
Adsorción del soluto	La interacción del soluto con las paredes del capilar genera picos con cola
Electrodispersión	Solutos con conductividades mayores o menores que el tampón dan picos triangulares de baja eficacia
Distinto nivel de líquido en los reservorios de electrolito de fondo	Genera flujo por presión externa (perfil parabólico)
Tamaño de celda	Debe ser pequeño con referencia a la anchura de zona

#### *I.4.4. Técnicas de electroseparación*

La versatilidad de la CE deriva, en parte, de las diversas técnicas que permite aplicar: CZE, MEKC, electroforesis capilar en gel (*capillary gel electrophoresis*, CGE), isoelectroenfoque capilar (*capillary isoelectric focusing*, CIEF), isotacoforesis capilar (*capillary isotacophoresis*, CITP) y electrocromatografía capilar (*capillary electrochromatography*, CEC). Estas técnicas proporcionan diferentes selectividades debido a los diferentes mecanismos de separación en que se basan, tal como se describe en la Tabla I.4.3. En esta memoria se comenta tan sólo la CZE, ya que es la única técnica de electroseparación capilar utilizada en la parte experimental.

**Tabla I.4.3.** Técnicas de electroseparación capilar.

<b>Técnicas</b>	<b>Mecanismo de separación</b>
CZE	Movilidad en disolución libre
MEKC	Interacción hidrofóbica con micelas
CGE	Tamaño y carga
CIEF	Punto isoeléctrico
CITP	Movimiento límite. Arrastre entre un electrolito rápido y otro lento
CEC	Combinación de mecanismos electroforéticos y cromatográficos

#### *I.4.5. Electroforesis capilar zonal*

La CZE es una de las técnicas de electroseparación capilar más utilizadas debido a su sencillez y versatilidad. Sus áreas de aplicación incluyen el análisis de todo tipo de iones orgánicos e inorgánicos, tanto de baja masa molecular

como de masas medias y elevadas, incluyendo péptidos. La selectividad y el orden relativo de migración de los solutos vienen determinados por sus movilidades electroforéticas que cambian con la fuerza iónica y otras características del BGE. La capacidad de controlar la selectividad puede mejorar la resolución de muchas parejas de compuestos, difíciles de resolver por otros medios.

La selección del BGE es una etapa muy importante para el éxito de cualquier separación en CE. Un componente muy importante del BGE es el tampón o regulador del pH, que idealmente debe tener las siguientes características:

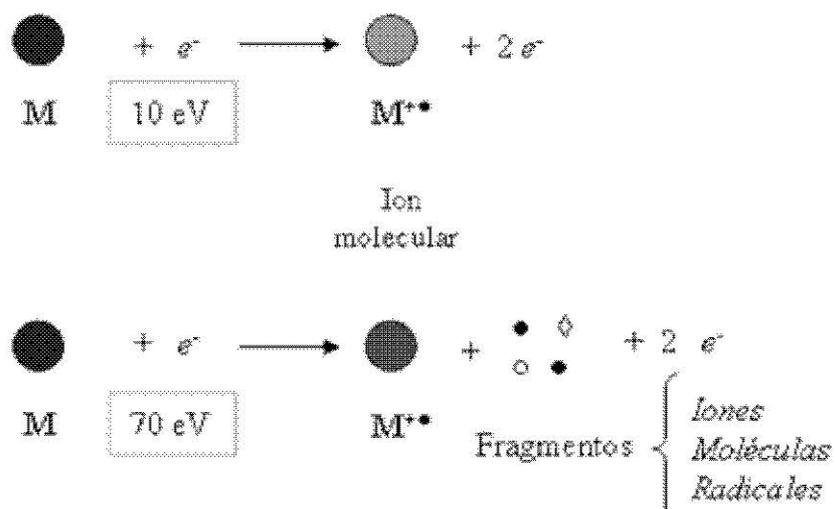
- Buena capacidad amortiguadora en el rango de pH escogido.
- Baja absorbancia a la longitud de onda de detección.
- Baja movilidad para minimizar la generación de corriente.
- El ion del tampón que tenga carga del mismo signo que los analitos debe tener asimismo una movilidad electroforética similar a la de éstos, para minimizar la electrodispersión.

Se pueden obtener resoluciones adecuadas a pHs bajos, pero cuando el pH se aumenta para alterar la carga del soluto, el EOF puede llegar a ser tan alto que los solutos eluyan antes de que se alcance suficiente resolución entre ellos. En este caso, es necesario aumentar la longitud del capilar, lo que no tiene efectos positivos más allá de cierto valor (unos 40-50 cm como máximo). Es así porque alargar el capilar implica reducir el campo eléctrico. Por su parte, para reducir el EOF se puede aplicar cualquiera de los métodos descritos en la Tabla I.4.1.

## I.5. Detección por espectrometría de masas

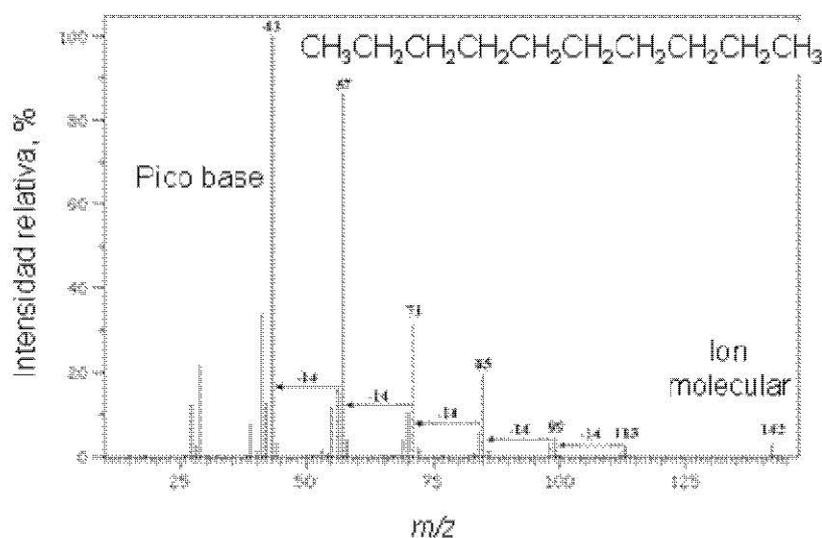
### I.5.1. Principios de la MS

La MS la conforman un conjunto de técnicas analíticas basadas en el estudio de iones en fase gas. Los iones pueden proceder directamente de la muestra, o formarse mediante reacciones de colisión y fragmentación provocadas por medios muy diversos. En la figura siguiente se muestran dos moléculas de analito bombardeadas por electrones de distinta energía. Al chocar con la molécula, dependiendo de la energía del electrón, ésta se ionizará o se fragmentará, dando lugar en este último caso a diversos fragmentos, que pueden ser nuevos iones, moléculas o radicales.



**Fig. I.5.1.** Ionización de una molécula bombardeada con electrones de distinta energía.

Los espectrómetros de masas son instrumentos que permiten analizar con gran precisión estructuras moleculares, con diferenciación entre grupos funcionales, elementos químicos e isótopos atómicos, separando los fragmentos en función de su relación  $m/z$ . Los espectros de masas ofrecen información de alto nivel sobre la naturaleza de los solutos. Un espectro de masas tiene forma de diagrama de barras, en el que la altura indica la abundancia relativa de los distintos iones producidos.



**Fig. I.5.2.** Espectro de masas de decano.

La MS es probablemente, de entre todas las herramientas analíticas, la de aplicación más general, ya que permite obtener información de alto nivel sobre todo tipo de iones y moléculas. Sus características más sobresalientes son:

- i) Amplio campo de aplicación, desde átomos a moléculas complejas (macromoléculas).
- ii) Información cualitativa (huella dactilar) y cuantitativa, tanto para analitos orgánicos como inorgánicos, a partir de muestras complejas.

- iii) Información estructural, siendo posible analizar con detalle las estructuras de una amplia variedad de especies binarias y moleculares complejas.
- iv) Gran sensibilidad (LODs del orden del  $\mu\text{g L}^{-1}$  y menores).
- v) Respuesta casi universal y específica, con posibilidad de procesar muestras sólidas, líquidas y gaseosas, siempre que los líquidos se evaporen o se sublimen los sólidos.
- vi) Determinación de la masa molecular de los solutos.
- vii) Información sobre la estructura y composición de superficies sólidas.
- viii) Información sobre relaciones isotópicas.
- ix) Rapidez: un espectro se puede obtener en décimas de segundo.
- x) Instrumentos muy evolucionados y altamente automatizados, con capacidad para ser utilizados como detectores en HPLC y CE.

En gran medida, la importancia de la MS radica en que los espectros de masas de muchos compuestos son suficientemente específicos y reproducibles como para permitir su identificación con total certeza, especialmente cuando se obtienen con una fuente de impacto electrónico. Sin embargo, deben tenerse en cuenta algunos inconvenientes como son:

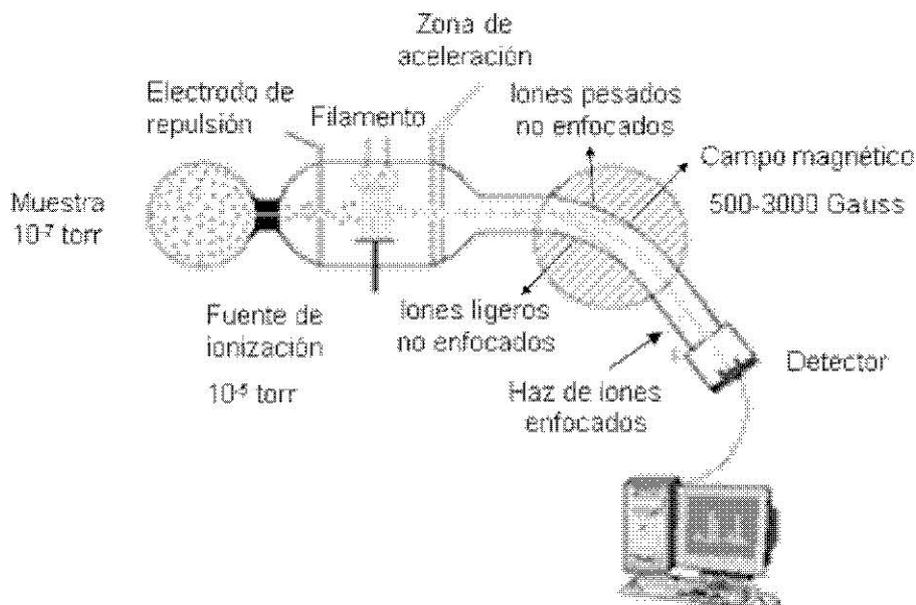
- i) La necesidad de disponer de la muestra en fase vapor sin descomposición, lo que implica que la sustancia a analizar sea volátil y termoestable.
- ii) Es una técnica destructiva.
- iii) Es necesario un vacío elevado ( $10^{-4} - 10^{-8}$  torr), lo que encarece los instrumentos.

A lo largo de las últimas décadas, los límites de volatilidad y termoestabilidad han sido ampliados hasta extremos impensables, especialmente a raíz del desarrollo de las fuentes de iones basadas en la nebulización y en el bombardeo con átomos rápidos.

El fenómeno de emisión de iones secundarios fue observado por primera vez a comienzos del siglo XX. El primer instrumento similar a un espectrómetro de masas fue descrito en 1899 por el científico inglés J. J. Thomson, que estaba interesado en medir la relación  $m/z$  del electrón. En 1918 y 1919, A. J. Dempster y F. W. Aston construyeron los primeros instrumentos capaces de actuar como espectrómetros de masas. En 1960 se construyó el primer espectrómetro de masas comercial.

### *I.5.2. Componentes de un espectrómetro de masas*

Un espectrómetro de masas consta de tres componentes fundamentales: la *fente de ionización*, el *analizador* o *filtro de masas* y el *detector de iones*. En comparación con instrumentos ópticos, una diferencia esencial es la necesidad de un sistema de vacío para mantener presiones muy bajas ( $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  torr) en diversos componentes del instrumento.



**Fig. I.5.3.** Esquema de un espectrómetro de masas con fuente de impacto electrónico y analizador de sector magnético.

### *I.5.3. Técnicas de separación acopladas a MS*

Los espectrómetros de masas a menudo están acoplados con sistemas cromatográficos de gases o de líquidos de alta resolución, lo que permite la separación y determinación de componentes en mezclas muy complejas. Si el analito de interés se encuentra como parte de una mezcla, y el espectro de masas obtenido contiene iones de todos los componentes presentes y, en particular, si el analito de interés es un componente minoritario de la mezcla, la identificación será muy difícil. La combinación de la capacidad de resolución de la cromatografía con la capacidad de identificación del espectrómetro de masas, es claramente muy ventajosa. La diversidad de los analitos que se pueden detectar y evaluar es extraordinariamente amplia. El acoplamiento de una columna cromatográfica a un espectrómetro de masas requiere la utilización de un sistema de entrada o interfaz.

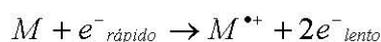
#### I.5.4. Fuentes de ionización

Una fuente de iones es un mecanismo ideado para crear partículas cargadas mediante bombardeo con electrones, iones, moléculas o fotones. En la fuente, las moléculas se rompen en fragmentos, algunos de los cuales están cargados y otros no. Se obtiene un haz de iones positivos o negativos que es acelerado hacia el analizador de masas. Las fuentes de iones no son exclusivas de los espectrómetros de masas, siendo también utilizadas en los aceleradores de partículas, implantadores de iones y motores iónicos.

Los métodos de ionización más comunes se pueden clasificar en dos categorías: fuentes de fase gas, que requieren la volatilización de la muestra antes de su ionización, y fuentes de desorción, que permiten el análisis de moléculas no volátiles y térmicamente inestables a partir de muestras líquidas sin vaporizar. Como se comenta a continuación, cada una de estas categorías comprende distintos tipos de fuentes de iones. Los tipos de fuentes de fase gas son:

- a) Ionización por electrones o impacto electrónico (*electron ionization* o *electron impact*, EI)

En EI, el analito en fase vapor es bombardeado con electrones de elevada energía (70 eV). En la cámara de ionización, un haz de electrones procedente de un filamento de wolframio ioniza los átomos y moléculas presentes en fase gas. Las moléculas de analito absorben parte de esta energía, lo que ocasiona una serie de procesos. En el caso más sencillo, el analito se ioniza por pérdida de un electrón.



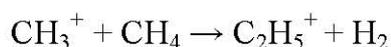
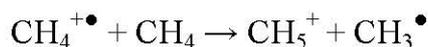
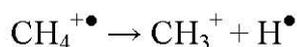
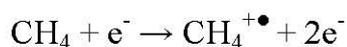
Se genera un catión radical denominado ion molecular ( $M^{\bullet+}$ ), cuya  $m/z$  corresponde a la masa molecular del analito. Este proceso requiere normalmente

10 eV, por lo que el ion así formado tiene energía en exceso, que empleará para su fragmentación.

Una de las mayores limitaciones de la fuente de EI es que el exceso de energía impartido a la molécula del analito durante el bombardeo electrónico conduce a una fragmentación tan rápida que, con frecuencia, el ion molecular no se observa en el espectrómetro de masas. En este caso, uno de los datos analíticos más importantes se pierde, reduciéndose así el valor del espectro de masas.

b) Ionización química (*chemical ionization*, CI)

Esta técnica se desarrolló específicamente para favorecer la producción de especies moleculares, es decir, para reducir la fragmentación asociada a la ionización. Las fuentes de CI son fundamentalmente fuentes de impacto electrónico, con la diferencia de que, mediante un conducto auxiliar, mezclan un reactivo con la muestra antes de que ésta llegue a la cámara de ionización. A continuación, la mezcla es bombardeada con electrones y tiene lugar la ionización. Como el gas reactivo está presente en grandes cantidades comparado con las moléculas de analito (suele ser una proporción de 1000:1), es casi exclusivamente el primero el que se ioniza. Si se usa metano, se originan cationes muy reactivos, como  $\text{CH}_3^+$  y  $\text{CH}_5^+$ , los cuales reaccionan con las moléculas de analito dando lugar a iones moleculares y a diversos fragmentos



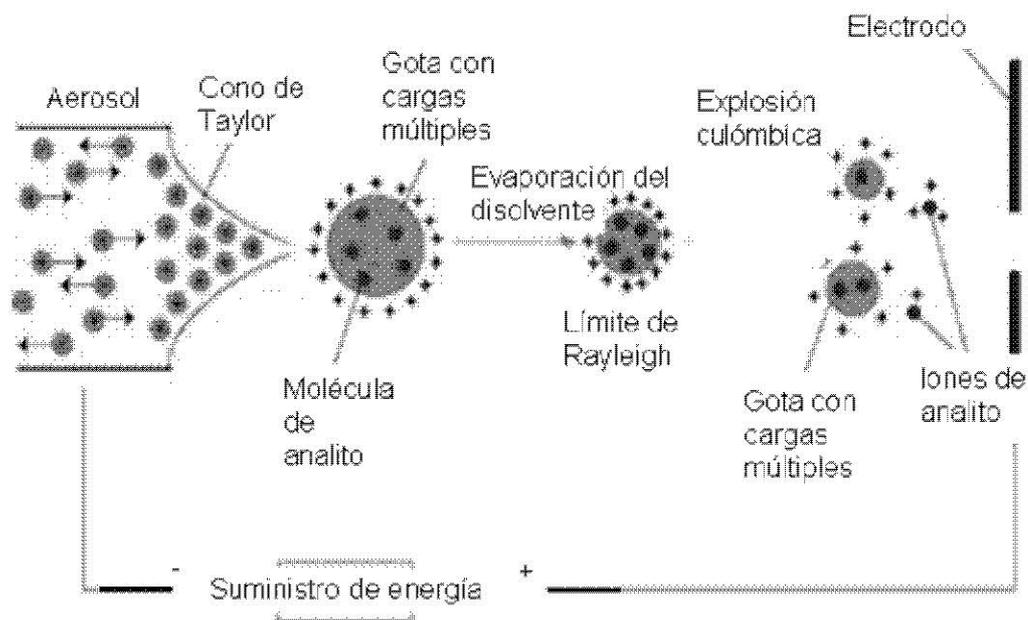
Las reacciones específicas que tienen lugar dependen de diversos factores termodinámicos, pero suelen llevar a la formación de aductos de los iones generados por el metano con moléculas de analito, siguiendo procesos de energía relativamente baja, que implican un grado de fragmentación pequeño.



Además de metano, también se utilizan MeOH, ACN, amoníaco e isobutanol. Si se utiliza MeOH o ACN, se tiene la ventaja de que el catión producido se adiciona a los solutos sin que éstos se fraccionen excesivamente, dando lugar, en general, a picos de masa  $M + 1$ , o bien  $M + \text{CH}_3\text{OH} + 1$  o  $M + \text{CH}_3\text{CN} + 1$ . Todas estas reacciones tienen lugar antes de alcanzar la zona de bajas presiones del espectrómetro de masas. Las fuentes de EI y CI son las preferidas en la conexión GC-MS.

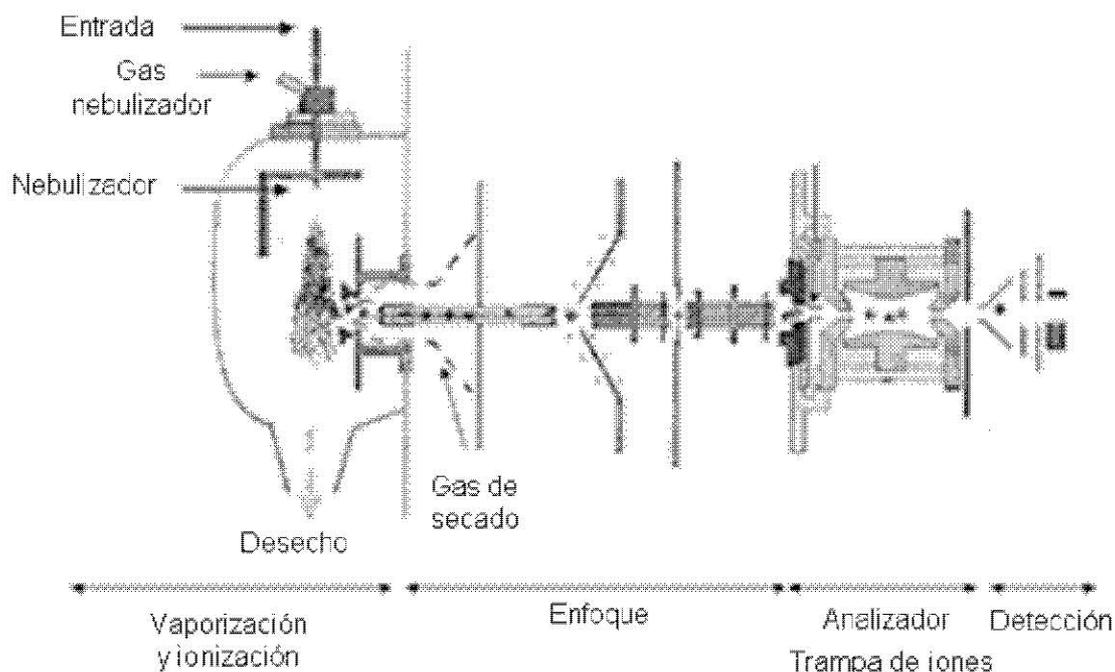
### c) Ionización por ESI

En esta fuente, los iones en fase gas se generan simultáneamente al proceso de evaporación. Se dispone un campo eléctrico de  $5 - 10 \text{ kV cm}^{-1}$  en torno al extremo de una aguja hueca, constituida por dos canales concéntricos. El canal interior lleva la muestra, y el exterior, un gas que ayuda a la formación del aerosol. Se forman pequeñas gotas con carga eléctrica, que son atraídas hacia un electrodo a través del espacio abierto de la cámara de nebulización. En la cámara caliente ( $200 - 350 \text{ }^\circ\text{C}$ ), las gotas se mueven en contra del gas de secado mientras se evapora parte del disolvente, de modo que el volumen de las gotas disminuye y los iones que se encuentran en la superficie se aproximan entre sí. En un momento dado, la repulsión de los iones se hace mayor que la tensión superficial que mantiene unida a la gota (límite de Rayleigh), con lo que ésta estalla en un proceso conocido como explosión culómbica.



**Fig. I.5.4.** Formación de gotas y explosión culómbica.

El proceso tiene lugar varias veces para cada gota original, hasta que sólo quedan moléculas del disolvente y iones en fase gas. Dependiendo de la polaridad del extremo del nebulizador, se habrán generado gotas con predominio de iones de uno u otro signo que, una vez liberados en la fase gas, serán atraídos hacia el orificio de entrada del analizador de masas mediante campos eléctricos. Dependiendo de la polaridad del campo, en el analizador de masas entran sólo los aniones (operación en modo ión-negativo) o sólo los cationes (operación en modo ión-positivo).



**Fig. I.5.5.** Esquema de un espectrómetro de masas de trampa iónica con fuente ESI.

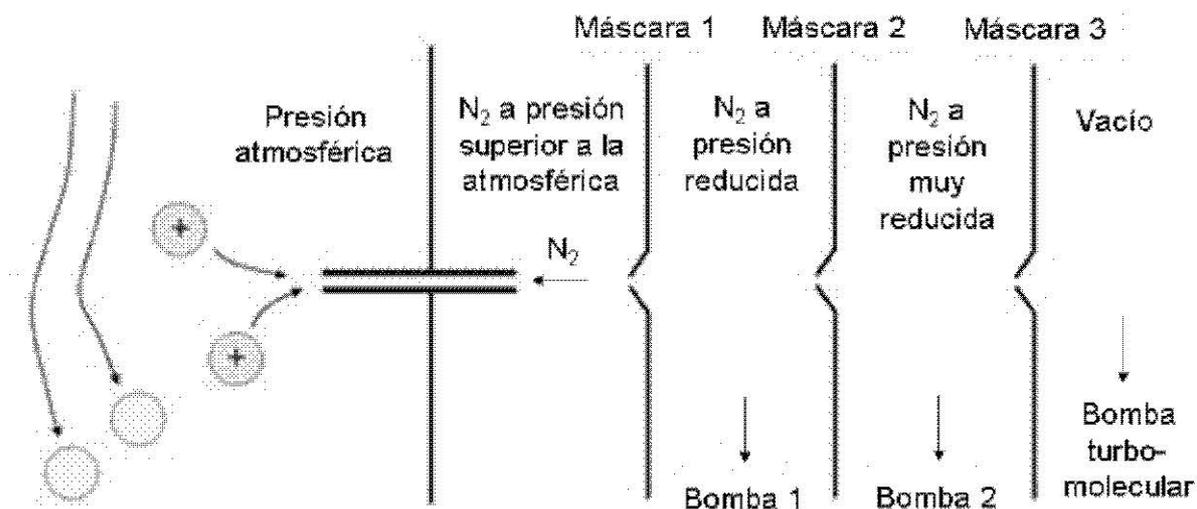
Cualquier cambio en la superficie de las gotas (como la curvatura debida a la tensión superficial, o la presión de vapor, ambas función de la mezcla de disolventes) influirá en los procesos de generación de los iones y evaporación del disolvente, ya que éstos son procesos superficiales. La ESI genera iones en fase gas en el mismo modo en que se encuentran inicialmente en disolución. A la vez impide la entrada de grandes cantidades de disolvente en el analizador de masas, lo que supondría la rotura del vacío en el interior del analizador, la pérdida de los iones de los solutos por choque con las moléculas de disolvente, y la saturación del detector con un exceso de iones sin interés.

La fuente ESI se caracteriza por:

- El proceso de ionización es muy suave, por lo que en general sólo se observan los iones moleculares, o a lo sumo unos pocos fragmentos.

- b) Puede producir iones con carga múltiple, lo cual permite el análisis de compuestos de elevada masa molecular.
- c) La ESI trabaja a presión atmosférica (no a vacío), lo que facilita la conexión HPLC-ESI-MS.
- d) Es muy versátil, ya que permite trabajar con moléculas de muy diverso tamaño, disueltas en todo tipo de medios, tanto acuosos como orgánicos.

Otras interfaces para HPLC-MS utilizan el mismo sistema que la ESI para evaporar y eliminar el disolvente, y se distinguen por el mecanismo de ionización de los solutos. La discriminación soluto-disolvente se produce mediante un tubo capilar por el que circula una corriente de nitrógeno. Bajo la acción de un campo eléctrico, sólo los iones son capaces de avanzar en contra de la corriente de nitrógeno, resultando así rechazadas las moléculas de los disolventes.

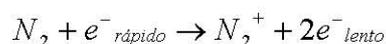


**Fig. I.5.6.** Discriminación de iones y moléculas de disolvente en fuentes ESI, APCI y APPI.

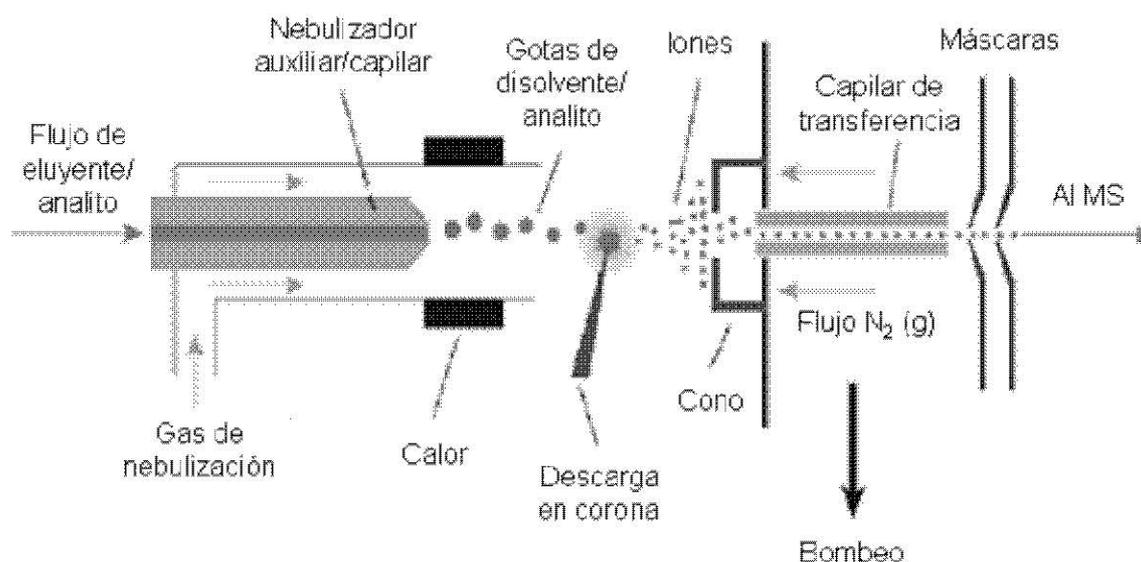
La ionización extremadamente suave de los analitos permite el análisis de proteínas, glicoproteínas, oligosacáridos, nucleótidos (ADN, ARN y oligonucleótidos), fullerenos, polímeros sintéticos, compuestos inorgánicos y organometálicos, entre otras muchas especies tanto estables como termolábiles. Su campo de aplicación incluye áreas tan diversas como biotecnología, bioanalítica, biología molecular, química medicinal y farmacéutica, y nuevos materiales, incluyendo compuestos organometálicos y polímeros sintéticos. Es importante el estudio de las interacciones entre biomoléculas desde el punto de vista estructural, cinético y termodinámico, ya que la presencia de interacciones nativas no covalentes permanece inalterada, así como las interacciones proteína-proteína, y enzima-inhibidor, o interacciones del tipo centro activo proteico-fármaco o ADN-fármaco. El proceso de plegado y desplegado de proteínas también se puede estudiar con esta técnica. Estas aplicaciones especiales, sumado al hecho de que también es adecuada como interfaz CE-MS, son los factores que han contribuido a la popularización de la ESI-MS.

#### d) Ionización mediante APCI

A diferencia de lo que ocurre en la ESI, en APCI, la ionización se produce después de la nebulización. 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 respecto al potencial de las paredes de la cámara de ionización. El electrodo produce una descarga en corona, constituida por electrones acelerados por el intenso campo eléctrico. En las proximidades del electrodo, los electrones rápidos chocan con las moléculas de nitrógeno y las ionizan. Se tiene:



El nitrógeno ionizado reacciona con las moléculas del disolvente en fase gas dando lugar a otros iones, como  $\text{H}_3\text{O}^+$ , que a su vez reaccionan con las moléculas y iones de los solutos. El resultado es un rendimiento alto en el ión molecular,  $\text{M}^+$ , y en diversos aductos, como  $[\text{M} + \text{H}_3\text{O}]^+$ .

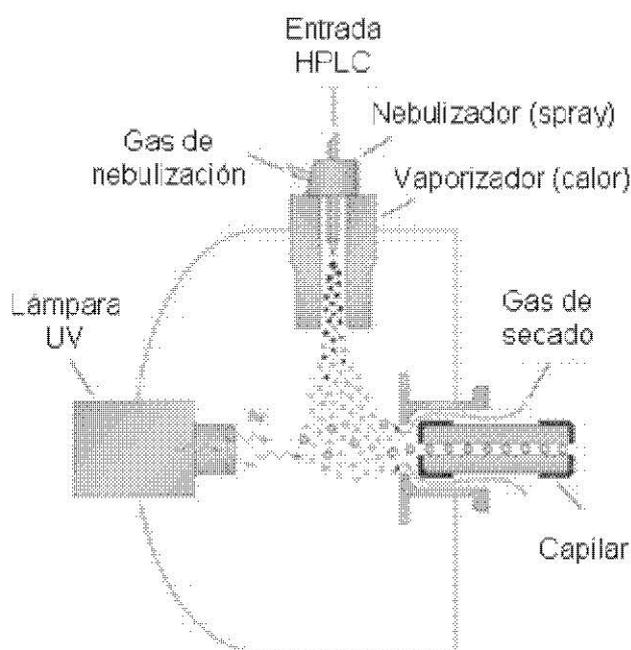


**Fig. I.5.7.** Esquema de una interfaz APCI.

La fuente APCI ioniza de modo más eficiente compuestos con polaridades media y baja, por lo que resulta complementaria respecto a la ESI. Con esta última, las mayores sensibilidades se obtienen para compuestos iónicos. La ionización en APCI es mucho más energética que en ESI, por lo que la APCI no es útil para el análisis de biomoléculas grandes. Sin embargo, es aplicable al análisis de muchos compuestos térmicamente lábiles, pudiéndose estudiar pequeños péptidos con una masa límite inferior a 2000 Da.

e) Ionización por fotoionización (*atmospheric pressure photoionization*, APPI)

En una fuente APPI, los iones se generan después de la evaporación mediante irradiación del gas con luz UV emitida por una lámpara de Kr. Para que la interfaz funcione correctamente es necesario añadir a la fase móvil una cierta concentración de un disolvente que absorba la radiación UV, como por ejemplo un 1% de acetona (los disolventes habituales en HPLC no se ionizan a la longitud de onda de emisión del Kr). La radiación UV ioniza a la acetona, la cual a su vez ioniza a los solutos. Finalmente, los iones producidos por los solutos son atraídos hacia el capilar mediante un campo eléctrico, y las moléculas de disolvente son rechazadas por la contracorriente de N<sub>2</sub>. La APPI es a su vez complementaria con las fuentes ESI y APCI, ya que permite obtener espectros de compuestos muy hidrofóbicos y apolares, o muy poco polares, como hidrocarburos poliaromáticos y esteroides.



**Fig. I.5.8.** Esquema de una fuente APPI.

Por su parte, en las interfaces de desorción las muestras son introducidas por medio de una sonda directa. Los iones se desorben debido al calentamiento rápido de la punta de la sonda, o por otros medios, como el bombardeo con átomos rápidos o mediante radiación láser. Se utilizan preferentemente en el estudio de muestras líquidas y sólidas, para obtener espectros de alta resolución. Técnicas de este tipo son la ionización por campo (*field ionization*, FI), la desorción por campo (*field desorption*, FD), el bombardeo con átomos rápidos (*fast atom bombardment*, FAB), la espectrometría de masas de iones secundarios (*secondary ion mass spectrometry*, SIMS), la desorción por láser (*laser desorption*, LD) y la desorción por plasma (*plasma desorption*, PD).

#### *I.5.5. Analizadores de MS*

Los iones producidos en la fuente de iones se aceleran mediante campos eléctricos hacia el analizador de masas, donde se separan en función de sus relaciones  $m/z$ . El poder de resolución de un espectrómetro de masas va a depender principalmente de las prestaciones del analizador de masas. Son habituales los siguientes tipos:

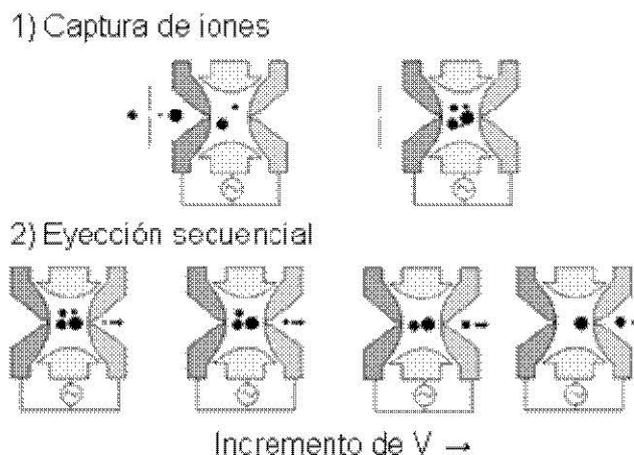
a) Analizador de *sector magnético* o de *enfoque simple*, en el que los iones describen un sector de arco. A un valor dado del campo magnético, sólo los iones con un determinado valor de  $m/z$  alcanzan el detector. Los que tienen un valor de  $m/z$  menor o mayor, siguen una trayectoria curvada que no coincide con la rendija de salida del analizador, perdiéndose por choque contra las paredes del tubo. Mediante un barrido del campo magnético, se consigue abarcar un determinado rango de valores de  $m/z$ .

b) Analizador de *doble sector magnético* o de *doble enfoque*. En estos instrumentos se miden las masas atómicas y moleculares con mucha mayor

exactitud. Mediante una combinación de campos magnéticos y electrostáticos se minimizan las aberraciones direccionales y de energía de los iones.

c) *Filtro de masas cuadrupolar*. Los iones atraviesan el espacio vacío entre cuatro electrodos en forma de barra. Mediante corrientes alternas, se genera un campo magnético oscilante en el espacio entre las barras. Los iones entran en resonancia y siguen una trayectoria también oscilante entre ellas. Sin embargo, sólo iones con un determinado valor de  $m/z$  experimentan oscilaciones de baja amplitud, llegando al detector. Las oscilaciones de los demás iones experimentan una ganancia en amplitud, hasta que chocan con las barras y se pierden.

d) Analizador de *trampa de iones*. La trampa es una caja formada por dos electrodos en forma de copa, y por un tercer electrodo en forma de anillo. La corriente de iones entra por el hueco central de una de las copas. Los iones quedan atrapados por los campos magnéticos oscilantes creados por los electrodos, y giran dentro de la trampa siguiendo órbitas estacionarias. Cuando se han acumulado suficientes iones (de 10 a 100 ms), se vacía la trampa mediante una rampa de voltaje superpuesta a la corriente alterna del electrodo de salida. Los iones salen por el hueco central del electrodo en orden creciente de valores  $m/z$ . La ventaja de la trampa de iones es que permite aislar y acumular a un ion durante un cierto tiempo (el ion padre o progenitor), durante el cual se le puede hacer colisionar con moléculas de He. Se consigue así una fragmentación de dicho ion. Al sacar a los iones ‘hijos’ de la trampa, se tiene un espectro de masas de segunda generación o espectro  $MS^2$ . A su vez, se puede aislar a uno de los iones hijos y mantenerlo en la trampa, colisionando con más moléculas de He, y así sucesivamente. Se pueden obtener varias generaciones sucesivas de espectros.



**Fig. I.5.9.** Esquema de funcionamiento de una trampa de iones.

e) Analizador de tiempo de vuelo (*time of flight*, TOF). En la zona de alto vacío de un TOF, y a partir de un cierto punto, los iones reciben un impulso electromagnético que los lanza a una zona libre de campos eléctricos y magnéticos. La zona de vuelo libre se denomina tubo de desplazamiento. En esta zona, los iones se mueven todos con una misma energía cinética, y por tanto a distintas velocidades dependiendo de su masa. Llegan al detector en orden creciente de valores de  $m/z$ . Los que tienen menores valores de  $m/z$  van más rápidos, ya que con la misma cantidad de energía (la del impulso) habrán adquirido mayor velocidad. La trayectoria desde el electrodo del impulso hasta el detector podría ser recta, pero se tiene un efecto beneficioso de enfoque de los iones de un determinado valor de  $m/z$  si, a mitad del recorrido, se les hace dar una curva de casi  $180^\circ$ , haciéndolos regresar a un lugar cercano al punto de partida, donde está el detector. El giro de casi  $180^\circ$  se consigue mediante campos magnéticos generados por un espejo magnético o reflectrón.

La ventaja del analizador TOF es su capacidad para medir valores de  $m/z$  con una precisión y exactitud muy elevadas. La determinación de masas con

desviaciones típicas del orden de unas pocas partes por millón ( $\sim 10^{-4}$  %) permite conseguir una identificación mucho más segura de los analitos.

f) Combinaciones de analizadores de masas. Las combinaciones de analizadores de masas (como por ejemplo, el triple cuadrupolo) tienen por objeto aumentar la selectividad del detector, al tiempo que reducir el ruido de fondo, consiguiéndose reducciones importantes de los LODs. Además, una detección más selectiva reduce la necesidad de una selectividad alta en la separación previa en el cromatógrafo. Es posible detectar y cuantificar solutos que co-eluyen, ya que no van a tener picos a los mismos valores de  $m/z$ . Por esta razón, se pueden usar columnas más cortas y menos eficaces, y caudales más altos, reduciéndose el tiempo de los análisis y los esfuerzos necesarios para poner a punto nuevos métodos.

---

## **Chapter II**

### **Objectives**

## II: Objectives

Among non-ionic surfactants, FAEs are most widely used in industry and household cleaners. The most direct consequence is the annual pouring of thousands of tons of FAEs in rivers, lakes and sea waters, which generates landscape deterioration, probably a low but continuous environmental impact. Thus, analytical methods for FAE characterization and determination are required both for industrial quality control and to support studies concerning to their environmental impact. Concerning these two application fields, selective, simple and fast methods are needed.

As commented in the introduction (Chapter I), owing to lack of a chromophore and a charge, FAE oligomers are not easily detected. Using GC, the oligomers with  $m > 3$  cannot be volatilized without partial destruction of the EO chain. Further, HPLC with ELSD or MS detection has the problem of the large variation of the response factors of the oligomers. The response factors decrease several orders of magnitude when the number of EO decreases, and non-ethoxylated alcohols are not detected. Several derivatization procedures have been described, but in most cases the reaction yields and response factors of the derivatives of the oligomers are not known.

In this memory, the development of analytical methods for FAE characterization and analysis based on the derivatization with cyclic anhydrides, followed by RP-HPLC, will be systematically studied. The methods are applied to quality control of industrial products, as well as to environmental samples. Both UV-Vis and MS will be used to detect the derivatives. Concerning to the chromatographic separation of the oligomers, the aim was to achieve total resolution between the consecutive hydrocarbon series, and as well to improve resolution among the consecutive oligomers within the series.

Also, an objective was to provide solutions to the problem of the overlapping of the  $m = 0$  and 1 oligomers with other oligomers within their respective hydrocarbon series. This problem is inherent to the chemistry of FAEs in solution, and affects also to all the FAE derivatives. Overlapping hinders quantitation of a few oligomers within each series. The solutions investigated in this memory shall be: (i) deconvolution using chemometric tools, (ii) application of simple interpolation and correction procedures, and (iii) to apply combined strategies, including 2D-HPLC, derivatization with bulk reagents (as diphenic anhydride), column selectivity, and operation at low column temperatures, to eliminate or to reduce overlapping as much as possible.

Derivatization of FAEs with at least three cyclic anhydrides, i.e. maleic, phthalic and diphenic, should be tried, and the features and analytical figures of merit of the optimized procedures should be compared. Other cyclic anhydrides should be also tried. Derivatization should be carried out in mild conditions, but at the same time, they should be completed as quickly as possible. Additives to speed up the reactions should be tried. Within this concern, esterification can be speeded up, and the reaction yield increased, by introducing anti-acids agents like urea in the reaction medium. Thus the effects of the urea as additive shall be thoroughly investigated. Tolerance of the reaction to the presence of water in the samples should be also studied both in the absence and presence of urea. Another important point should be selection of the stationary and mobile phases for the separation of the derivatives. According to literature, C8 gives adequate retention of underivatized and derivatized FAEs (furoyl and naphthyl derivatives), thus, this column will be mostly used. Performance of the novel fused-core type columns, mainly concerning to efficiency and resolution, should be also checked.

A novel 2D-HPLC set up should be designed and implemented. The aim is to drive the system with a single quaternary pump. Alternated operation along the

first and second dimensions would be made possible by programming of two valves, i.e. a column selection valve and auxiliary 6-port 2-position valve. This system should lead to the isolation of the hydrocarbon series along the first dimension; then, the oligomers within the series should be separated along the second dimension. In this way, more freedom concerning to the selection of the separation conditions along the second dimension should be achieved. The ultimate purpose should be the total resolution of the oligomers, also avoiding or reducing the reversion of the elution order of the lighter oligomers as much as possible.

Using any of the anhydrides to derivatize the FAEs, application of the methods to quality control of industrial products shall be demonstrated. Attention should be paid also to environmental applications, particularly using the aromatic cyclic anhydrides, since in comparison to maleic anhydride, lower LODs at longer wavelengths should be expected. River and sea waters, as well as effluents of waste water treatment plants will be used.

On the other hand, the possibility of predicting the retention time of the oligomers as a function of the average percentage of ACN employed during either isocratic or gradient elution, should be investigated. For this purpose, models should be established. Both standards of the oligomers and industrial FAEs containing different hydrocarbon series and wide distributions of the oligomers within the series will be used to establish the models. These models should be useful to design segmented gradients with pre-selected features such as inter- and intra-series resolution, and maximal elution times.

Finally, another part of the memory will be devoted to the development of analytical methods for the characterization of APPs. These substances are chelating agents for calcium, magnesium and heavy metals. They contain two or more than two phosphonate groups,  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ , attached to a short hydrocarbon

skeleton which may also contain amino nitrogen. They are employed chiefly to avoid the formation of carbonate deposits, and to reduce the catalytic activity of certain metallic ions in industrial processes and in commercial products.

The characterization of APPs is important from both the environmental and industrial points of view. Environmental concern relates to their capacity to extract heavy metals from sediments and aquifers, as well as to their effect on eutrofization of aquatic resources. In this work, CZE-IPD and CZE-MS methods for the quick characterization of industrial APPs shall be developed. In addition, the composition of these technical mixtures will be intended to be established in detail. Application of the methods to the identification of APPs in commercial products of the cleaning industry should be demonstrated. Further, the presence of impurities in technical grade APPs should be useful as a way of providing a fingerprint to establish the origin of the additives.



## **Capítulo III**

### **Parte experimental**

### III. Parte experimental

#### III.1. Reactivos

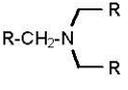
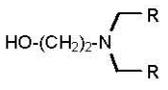
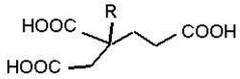
Se emplearon metanol, ácido acético, ACN, piridina, trietilamina (Scharlab, Barcelona, España), urea (99,5%, Prolabo, Fontenay s/Bois, Francia, y 99,5%, Fluka, Buchs, Suiza), ácidos clorhídrico, tricloroacético y fórmico, amoníaco acuoso (Panreac, Barcelona), acetona (marcador del EOF), sal disódica hidratada de ATP (Fluka), dietilentriamina, ácido oleico y 1,4-dioxano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Se estudiaron los siguientes alcoholes polietoxilados: C8E0, C8E1, C9E0, C12E1, C12E2, C12E6, C12E7, C14E0, C14E6, C16E1, C16E7, C18E0, C18E1, C18E3 (Fluka), C10E0, C12E0, C16E0 (Sigma-Aldrich), C10E3, C10E4, C12E3, C12E4, C12E5, C12E8, C14E4, C16E2, C16E4, C16E5 y C16E6 (donados, amablemente, por C. Solans, CSIC, Barcelona), así como Dehydol LT-7 (mezcla industrial de FAEs, nominalmente con  $12 \leq n \leq 18$  y con una media de  $m = 7$ , Cognis, Monheim, Alemania), Lutensol A07 (mezcla industrial de FAEs, nominalmente con  $n = 13$  y  $15$ , y con una media de  $m = 7$ , Basf, Ludwigshafen, Alemania), Lutensol XP-99 (constituido por la serie C10Em, con un valor medio de  $m = 6$ , Basf), otras mezclas industriales (Dehydol PLS 6, Genapol OX-079, Findet 13/ 18,5, Dehydol Pit 8/ 85, y Genapol UD-079), detergentes líquidos comerciales adquiridos en el comercio local y agua desionizada (desionizador Barnstead, Syborn, Boston, MA, USA).

Además se estudiaron los siguientes APPs de grado técnico: Briquest 543/45AS (I), Dequest 2090 (II), Dequest 2046 (III), Dequest 2054 (IV), Briquest 301-50A (V), SPE 0101 (VI), Briquest ADPA-60A (VII) y Bayhibit AM (VIII). Briquest es una marca registrada de Rodia (Cranbury, NJ, USA), Dequest y SPE

son de Solutia Europe (Louvain-la-Neuve, Bélgica) y Bayhibit es de Bayer (Wiesdorf, Alemania). Las estructuras moleculares y los nombres químicos de los compuestos nominales de los productos I-VIII se dan en la Tabla III.1. Los productos están en forma ácida, excepto III y IV, que corresponden a sales de sodio y potasio respectivamente. Se han adoptado acrónimos de la forma  $C_nN_mP_r$ , donde  $n$ ,  $m$  y  $r$  indican el número de átomos de carbono y de nitrógeno y el número de grupos fosfonato, respectivamente. Grupos como  $-OH$  y  $-COOH$  se indican con un paréntesis adicional. En la Tabla III.1 se muestran también las estructuras de los compuestos nominales de los APPs estudiados.

**Tabla III.1.** Nombre comercial, estructura y nombre químico de los compuestos nominales de los APPs estudiados.

Producto y nombre comercial	Estructura molecular $R = PO(OH)_2$	Nombre, acrónimo y picos de las series $[M - nH + (n - 1)Na]^{-a)}$
<b>I</b> Briquest 543/ 45AS		Ácido dietilén- triaminopentakis(metilenfosfónico) <b>I-C9N3P5</b> , $m/z$ 572, 594, 616, 638, 660
<b>II</b> Dequest 2090		Ácido dihexametilén-triaminopentakis (metilenfosfónico) <b>II-C17N3P5</b> , $m/z$ 684, 706, 722 <sup>b)</sup>
<b>III</b> Dequest 2046		Ácido etilén- diaminotetrakis(metilenfosfónico) <b>III-C6N2P4</b> , $m/z$ 435, 457, 479, 501
<b>IV</b> Dequest 2054		Ácido hexametilén- diaminotetrakis(metilenfosfónico) <b>IV-C10N2P4</b> , $m/z$ 491, 529 <sup>b)</sup> , 567 <sup>b)</sup> , 605 <sup>b)</sup>

<p><b>V</b> Briquest 301-50 A</p>		<p>Ácido aminotris(metilenfosfónico) <b>II-C3N1P3</b>, <i>m/z</i> 298, 320, 342</p>
<p><b>VI</b> SPE 0101</p>		<p>Ácido hidroxietil- aminobis(metilenfosfónico) <b>I-C4N1P2(OH)</b>, <i>m/z</i> 248</p>
<p><b>VII</b> Briquest ADPA- 60A</p>		<p>Ácido 1-hidroxietilidén-1,1-difosfónico <b>VII-C2P2(OH)a</b>, <i>m/z</i> 205</p>
<p><b>VIII</b> Bayhibit AM</p>		<p>Ácido 2-fosfonobutano-1, 2, 4- tricarboxílico <b>VIII-C4P1(COOH)3</b>, <i>m/z</i> 269</p>

a) Picos observados en el estudio realizado en esta memoria (ver Cap. IX).

b) El ion contiene  $K^+$  en lugar de  $Na^+$ .

Se tomaron varias muestras ambientales en diversas áreas, tanto de aguas fluviales como marinas. Las muestras de agua fluvial fueron tomadas del río Barxell, 10 km antes de la entrada en la zona urbana e industrial de Alcoi (Alicante, España), e inmediatamente después de la salida de esta zona. Se tomaron otras muestras del río Turia, en un área urbana, a unos 15 km de la desembocadura (Manises, Valencia, España). También se tomaron muestras del efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales (Aqualia, Paterna, Valencia, España). Las muestras de agua de mar se tomaron en una playa cerca del área urbana de La Pobla de Farnals (Valencia, España), y en la playa de la Malvarrosa (Valencia, España). En todos los casos, una vez tomada la muestra se añadió inmediatamente un 3% de formaldehído. Las muestras se almacenaron a 4 °C. Para tratar estas muestras, se usaron cartuchos de extracción en fase sólida (500 mg/ 6 mL, 55  $\mu$ m, 140 Å, Strata C-18-T, Phenomenex, Torrance, USA). Antes de la extracción, las muestras se pasaron a través de filtros de nailon, de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro (GE Water & Process Technologies, Madrid).

### III.2. Instrumentación

#### III.2.1. FAEs

Para la separación y detección de FAEs, se empleó un cromatógrafo líquido de la Serie 1100 (Agilent), provisto de una bomba cuaternaria y de un compartimento termostatizador de columnas, unido a un detector espectrofotométrico UV-Vis de fila de diodos (*diode array detector*, DAD) (Agilent). La columna empleada para la separación fue una C8, con un relleno de partículas de sílice de tipo núcleo fundido (Ascentis-Express, 2,7  $\mu\text{m}$ , 15 cm  $\times$  4,6 mm ID, Supelco, Bellefonte, PA, USA). El cromatógrafo se acopló a la fuente ESI del sistema de detección de un espectrómetro de masas de trampa de iones.

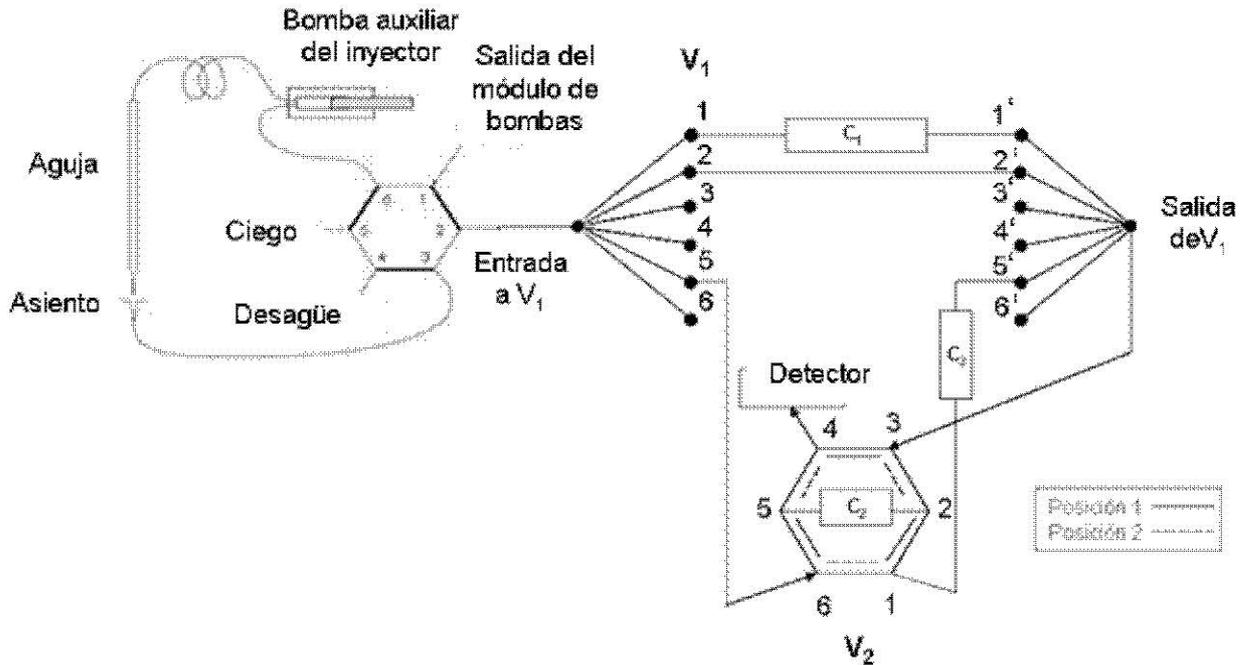
Para moler los cristales de urea, se empleó un molino de cuchillas. Los tamaños de los cristales se midieron empleando un microscopio electrónico de emisión de campo (modelo 4100, Hitachi, Tokyo, Japón). Para poder ver los cristales en el microscopio, estos fueron recubiertos, mediante bombardeo, con Au-Pd (metalizador SC-500, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). El tamaño medio de los cristales se estimó midiendo su longitud y anchura en cinco campos microscópicos. Para obtener el espectro  $^1\text{H}$  NMR de los hemiésteres, se empleó un espectrómetro DPX de resonancia magnética nuclear (NMR, modelo Advance 300, Bruker, Silberstreifen, Alemania); los espectros se obtuvieron en  $\text{CDCl}_3$ , usando el residuo del disolvente no-deuterado (7,26 ppm por protón) como referencia.

### *III.2.2. APPs*

Para la separación y detección de APPs, se empleó un sistema CE provisto de un DAD (3-D, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) y capilares de sílice fundida (50  $\mu\text{m}$  ID, 363  $\mu\text{m}$  ED, Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). El sistema de CE se acopló a un sistema 1100 Series VL IT-MS, provisto de una fuente ESI (Agilent), y un generador de nitrógeno con una pureza superior al 99,5% (Gaslab NG LCMS 20, Eucien, Madrid, España).

### *III.2.3. Montaje experimental para cromatografía 2D*

El montaje experimental utilizado para cromatografía en 2D se muestra en la Fig. III.1. La novedad de este montaje respecto a los descritos en la bibliografía es que sólo requiere un único módulo de bombas. El montaje consta de una válvula selectora de columnas ( $V_1$ ), combinada con una válvula de 6 vías y 2 posiciones ( $V_2$ ). La válvula selectora está constituida por 14 puertos, de los cuales uno es para la entrada de disolución y el otro para la salida. Los 12 puertos restantes se comunican internamente por parejas, de modo que la válvula puede seleccionar hasta 6 canales. En el montaje que se propone, se insertó una primera columna analítica ( $C_1$ ) en uno de los canales con el objeto de utilizar dicha columna para la separación en la primera dimensión. Los puertos de un segundo canal se intercomunicaron mediante un tubo PEEK de corta longitud con objeto de permitir la limpieza o los cambios de eluyente en los canales de conexión entre el módulo de bombas,  $V_1$  y  $V_2$ .



**Fig. III.1.** Diseño instrumental del sistema bidimensional empleado.

Finalmente, se conectó la válvula  $V_2$  con los puertos de  $V_1$  tal como se muestra en la Fig. III.1. Siguiendo el esquema de esta figura, se observa que cuando  $V_2$  está en posición 1, la salida de  $V_1$  dirige directamente el efluente hacia el detector. Esta posición, combinada con el uso del canal adecuado en  $V_1$  (en la figura, el canal 1-1') permite obtener el cromatograma de  $C_1$  o primera dimensión. Con este montaje, existen al menos dos posibilidades para cortar un segmento del eluyente de  $C_1$  e inyectarlo en una segunda columna para obtener un cromatograma en 2D:

- a) Intercalar una segunda columna,  $C_2$ , entre los puertos 2-5 de  $V_2$ . Al girar esta válvula a la posición 2, el eluyente de  $C_1$  pasa a  $C_2$ , lo que permite introducir en  $C_2$  el segmento deseado del cromatograma de  $C_1$ . Cuando el segmento que interesa aislar ha eluido de  $C_1$ , el cambio de posición de  $V_1$  al canal 2-2' y el cambio de  $V_2$  a la

posición 1, detiene la elución en  $C_1$  y en  $C_2$ , lo que permite sustituir un eluyente por otro, el cual será el adecuado para iniciar el gradiente en  $C_2$ . Para ello, se gira de nuevo  $V_2$  a la posición 2, desviando así el eluyente hacia el detector a través de  $C_2$ . Una vez completa la elución en  $C_2$ , se equilibra esta columna por unos minutos con la fase móvil adecuada para que quede preparada para iniciar un nuevo cromatograma. A continuación, se gira  $V_1$  a la posición 1-1' para regresar al punto del gradiente en el que se interrumpió la elución en  $C_1$ . La elución en  $C_1$  continúa, ya sea directamente hacia el detector, o bien hacia  $C_2$ , dependiendo de la posición de  $V_2$ . Todas estas operaciones se resumen en el diagrama de tiempos de la Tabla III.2.

- b) Con el esquema de la Fig. III.1 se dispone también de una forma alternativa para obtener cromatogramas bidimensionales. En lugar de obtener la segunda dimensión eluyendo en  $C_2$ , es posible enfocar previamente los analitos invirtiendo el flujo en  $C_2$ , para obtener luego la segunda dimensión con una tercera columna,  $C_3$ . Para ello, una vez introducido un segmento del eluato de  $C_1$  en  $C_2$ , se gira  $V_1$  al canal 5-5', y  $V_2$  se gira a la posición 1. De este modo se eluye el contenido de  $C_2$  en sentido inverso hacia  $C_3$  y hacia el detector.

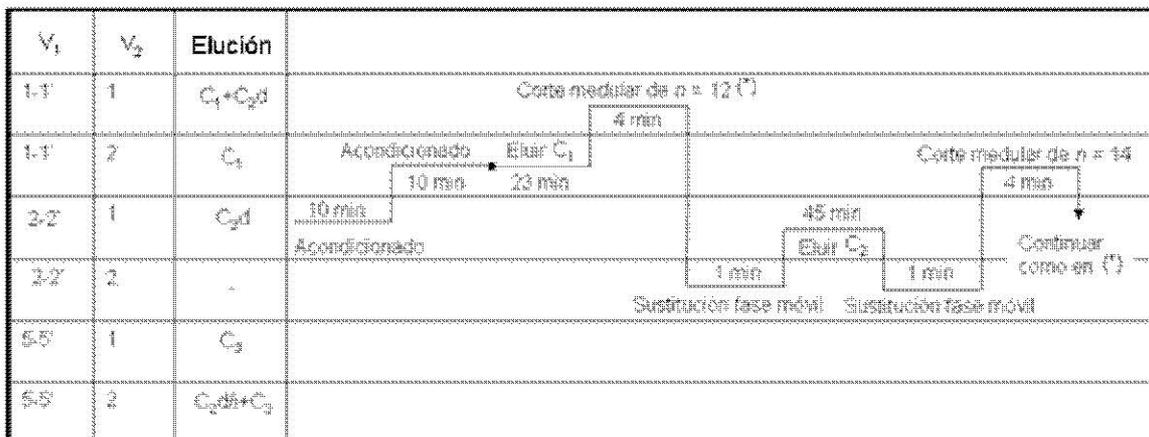
**Tabla III.2.** Programa de operaciones en función del tiempo.

Tiempo <sup>a</sup>	Operación
10	Acondicionar C <sub>2</sub> con 50:50 de ACN/ agua acidificada
10	Acondicionar C <sub>1</sub> con agua acidificada
23	Eluir C <sub>1</sub> Gradiente de 0 a 100% de ACN a 1 mL min <sup>-1</sup> en 60 min (gradiente A)
0	Detener el caudal y conectar el eluyente de C <sub>1</sub> con C <sub>2</sub>
4	Aumentar el caudal a razón de 1 mL min <sup>-1</sup> y eluir C <sub>1</sub> + C <sub>2</sub> Continuar con el gradiente A
0 (*)	Detener el caudal y desconectar C <sub>1</sub> y C <sub>2</sub>
1	Sustituir el suministro de fase móvil por la mezcla inicial del gradiente B (del 50 al 95% de ACN en 45 min)
45	Conectar C <sub>2</sub> con el módulo de bombas y el detector, y eluir con el gradiente B
0	Detener el caudal y desconectar C <sub>2</sub>
1	Sustituir el suministro de fase móvil por la mezcla adecuada para continuar el gradiente A (por ejemplo, 39% ACN para iniciar la elución de la serie $n = 14$ )
0	Conectar C <sub>1</sub> y C <sub>2</sub>
4	Aumentar el caudal a razón de 1 mL min <sup>-1</sup> y eluir C <sub>1</sub> + C <sub>2</sub> Continuar con el gradiente A Repetir el proceso a partir de (*) para eluir las series siguientes

<sup>a</sup>Tiempo no acumulado de cada operación, en minutos.

En la Tabla III.2, se muestra un ejemplo de las operaciones programadas de acuerdo con la primera de estas opciones para conseguir la separación de las series hidrocarbonadas, y la posterior separación de los oligómeros dentro de

cada una de ellas. A continuación, se detallan en forma de esquema gráfico (diagrama de tiempos) las operaciones realizadas a lo largo del programa.



d = sentido directo, el mismo al eluir que al llenar, si la salida 5' de  $V_1$  se conecta con el puerto 1 de  $V_2$   
 i = sentido inverso, el contrario al eluir que al llenar, si la salida 5' de  $V_1$  se conecta con el puerto 6 de  $V_2$ .  
 $V_1$  = válvula selectora.  
 $V_2$  = válvula de 6 vías y 2 posiciones.

**Figura III.2.** Diagrama de tiempos, mostrando un ejemplo del uso del montaje para cromatografía 2D; 1-1', 2-2', etc representan canales de  $V_1$ .

### III.3. Procedimientos

#### III.3.1. FAEs

Utilizando 1,4-dioxano como disolvente, se prepararon disoluciones que contenían  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  de oligómeros individuales de FAEs, mezclas seleccionadas de éstos, así como FAEs industriales. Se introdujeron alícuotas de estas disoluciones en tubos de 15 mL provistos de tapón roscado. Las muestras de productos de limpieza se pesaron directamente en estos tubos (unos 160 mg). Para extraer los FAEs presentes en muestras de aguas fluviales y marinas se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida que se acondicionaron con

MeOH seguido de agua desionizada. Las muestras de 1 L de agua se hicieron pasar a través de estos cartuchos a un flujo de unos 5 mL min<sup>-1</sup>. A continuación, se pasaron dos porciones de 2 mL de HCl 1 mM para eliminar los posibles restos de formaldehído retenidos en los cartuchos. La elución de los FAEs retenidos se realizó pasando, por triplicado, porciones de 2 mL de MeOH, y por tres veces más, porciones de 2 mL de isopropanol. Los eluatos combinados (12 mL) se evaporaron a temperatura ambiente bajo corriente de nitrógeno hasta que quedó un residuo viscoso.

En todos los casos, la cantidad de 1,4-dioxano se completó hasta 4 mL. De acuerdo con el procedimiento optimizado, se añadió anhídrido y urea finamente molida. El tubo se agitó y se mantuvo durante un tiempo fijo en un baño termostático de aceite de silicona. En caliente, el anhídrido se disolvió, pero la urea permaneció en suspensión en la mezcla de reacción. Una vez enfriado el tubo bajo un chorro de agua fría, se completó el volumen hasta 10 mL con una mezcla 2:1 de MeOH/ NH<sub>3</sub> 0,1 M acuoso. El tubo se sonicó hasta disolución completa. En los casos en que fue necesario, se diluyó con la misma mezcla disolvente en proporciones mayores. Las disoluciones se inyectaron inmediatamente, o bien, se almacenaron congeladas. En el caso de los anhídridos maleico y ftálico, se utilizaron 10 mmoles, que equivalen a 0,98 y 1,41 g, respectivamente (en la práctica se recomendó utilizar 1 y 1,5 g de anhídrido). Para el anhídrido difénico se trabajó con 0,75 g, reduciendo el volumen total de reacción de 4 a 2 mL. Se emplearon 0,5 g de urea en el caso de maleatos y ftalatos, y 0,25 g en el caso de difenatos.

Antes de inyectar, las disoluciones de FAEs se pasaron a través de filtros de nailon de 0,45 µm de tamaño de poro (Albet, Barcelona, España). Las fases móviles se prepararon mezclando ACN y agua, ambos conteniendo un 0,1% de

ácido acético. En todos los casos, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$ , y se utilizó un flujo de 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Para establecer el rendimiento de la reacción y los factores de respuesta UV-Vis de los derivados de los estándares de cada oligómero, se eluyó en modo isocrático con fases móviles que contenían del 50% al 70% de ACN.

Para separar los derivados de los FAEs obtenidos con muestras ambientales e industriales se empleó elución con gradiente. Para ello se usaron fases móviles que contenían hasta un 95% de ACN. Para reducir el ruido de fondo y mejorar la reproducibilidad, los gradientes se obtuvieron a partir de disolventes premezclados, conteniendo al menos un 5% de agua o de ACN. La detección UV-Vis se realizó tanto a  $200 \pm 10$  nm, como a la longitud de onda de los máximos de absorción de los ftalatos de los FAEs,  $230 \pm 10$  nm. Para los difenatos se usó también 224 nm. Como longitud de onda de referencia se tomó siempre  $360 \pm 60$  nm.

La detección mediante MS se llevó a cabo barriendo en el rango de  $m/z$  100-900. El voltaje del capilar fue de 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 objetivo. La carga máxima de la trampa de iones fue de  $3 \times 10^4$  cuentas o 300 ms. Se usó nitrógeno como gas de nebulizado (a 35 psi) y de secado ( $7 \text{ L min}^{-1}$  a  $300^\circ\text{C}$ ). En el caso de los estudios de deconvolución realizados con anhídrido maleico, los algoritmos de deconvolución fueron programados usando MATLAB 6.5 (The MathWorks, Natick, MA, USA).

Para mejorar la sensibilidad en la detección de los iones  $[\text{M} - \text{H}]^-$  de los hemiésteres, se aumentó el pH del eluato antes de llegar al detector de MS. Para ello, se instaló una unión T entre la salida de la columna y la fuente ESI, una de cuyas ramas se conectó al flujo proporcionado por una bomba de HPLC isocrática auxiliar. Las otras ramas de la T se conectaron con el eluato de la

columna de HPLC y con la entrada de la fuente de iones del MS. De este modo, el eluato se mezcló con una corriente de  $0,05 \text{ mL min}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$   $0,02 \text{ M}$ . Para el análisis de datos se usaron los programas Excel (Microsoft) y ChemStation LC/MSD v. 4.2 (Agilent).

### III.3.2. APPs

Se ha demostrado la posibilidad de detectar secuencialmente APPs utilizando IPD y MS como detectores en serie, utilizando para ello una única inyección en un capilar de sílice fundida de 120 cm de longitud [112]. En el trabajo presente en esta memoria, se realizaron inyecciones en un capilar de sílice fundida de 64,5 cm de longitud, utilizando alternativamente IPD o MS, siendo las longitudes efectivas de 56 cm para IPD y 64,5 cm para MS. Para la detección con MS, el extremo de salida del capilar se conectó a la fuente ESI mediante un nebulizador triconcéntrico. Se obtuvieron los electroferogramas de ion extraído (*extracted ion electropherogram*, EIEs) a los valores de  $m/z$  representativos de los picos obtenidos en el espectro de infusión. Todas las inyecciones se hicieron hidrodinámicamente ( $5 \text{ kPa} \times 3 \text{ s}$  para CZE-IPD y  $5 \text{ kPa} \times 6 \text{ s}$  para CZE-MS), y la separación se llevó a cabo a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y a un voltaje de  $-20 \text{ kV}$ . Para IPD se usó una longitud de onda de  $450 \text{ nm}$  con referencia a  $260 \text{ nm}$ . Para obtener los espectros de masas de infusión se utilizó el mismo capilar de electroforesis, si bien en ausencia de voltaje, y aplicando  $200 \text{ kPa}$  en el vial de entrada.

Para mantener el contacto eléctrico del nebulizador a la salida del capilar triconcéntrico de la interfaz CZE-ESI-MS se empleó una envoltura líquida proporcionada por una bomba isocrática HP 1100 (Agilent). La bomba fue programada a  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ . Teniendo en cuenta que la salida de esta bomba está conectada a un divisor de flujo ajustada a 100:1, el caudal de la envoltura líquida

a la salida del capilar fue de  $4 \mu\text{L min}^{-1}$ . Para la envoltura líquida se utilizó una mezcla 60/ 40 de MeOH/ agua conteniendo TCA 10 mM. El pH de la mezcla se ajustó gota a gota con amoníaco hasta pH 2,2. Se usó nitrógeno (del generador) como gas de nebulización (a 12 psi) y como gas de secado ( $4 \text{ L min}^{-1}$  a  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ); como gas de colisión se usó He (C-50, Carburos Metálicos, Aranjuez, España). Se registró el espectro en un rango de  $m/z$  entre 50-800; el voltaje del capilar fue de 4 kV y se aplicaron 6 kV a la máscara 2; el voltaje de la máscara 1 se seleccionó automáticamente en función de la masa objetivo. Todas las medidas se obtuvieron con una carga máxima de la trampa de iones de  $3 \times 10^4$  cuentas. El tiempo de acumulación fue de 2 min para infusión por MS, y de 300 ms para CZE-MS. Para el análisis de datos, se usó el programa ChemStation LC/MSD v. 4.2 (Agilent).

---

**Capítulo IV**  
**Determinación de FAEs**  
**mediante derivatización**  
**con anhídrido maleico**

---

## Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatisation with maleic anhydride followed by liquid chromatography with UV-Vis detection

### Abstract

The reaction rate and yield of esterification of FAEs by melting with maleic anhydride was largely improved by adding suspended grinded urea to the reaction mixture. A 100 % yield was achieved in 15 min at 80 °C. The procedure was tolerant to the presence of large amounts of water. The UV-Vis response factors of the derivatives of individual FAE oligomers varied little with the number of carbon atoms in the alkyl chain,  $n$ , and the number of ethylene oxide units,  $m$ . Derivatized samples of industrial FAE mixtures and cleaning products were chromatographed on a fused-core 2.7  $\mu\text{m}$  particle size - C8 column using gradient elution with ACN/ water mixtures plus 0.1 % acetic acid. The hydrocarbon series of FAEs of most industrial interest, with even values of  $n$  from 8 up to 20, were well resolved using column temperatures in the 15-30 °C range. Superior resolution between the consecutive oligomers within the series was also obtained at large values of  $m$ ; however, reversion of the elution order for the derivatives with  $m = 1$  and 0 hindered direct quantitation of a few oligomers at low  $m$  values. Full resolution of all the oligomers was achieved by deconvolution with a genetic algorithm assisted by the unconstrained local method of Powell. Applications to quality control of industrial samples were demonstrated.

## IV. Determinación de FAEs mediante derivatización con anhídrido maleico

### *IV.1. Introducción*

En el trabajo presentado en este capítulo se estudió la esterificación de los FAEs con anhídrido maleico en presencia de urea, prestando especial interés a los aumentos de la velocidad de reacción y del rendimiento de la misma. Estos efectos fueron producidos por la adición de urea en suspensión al medio de reacción. Se alcanzó un rendimiento máximo al mantener la mezcla a 80 °C durante al menos 15 min. La separación de los hemiésteres se llevó a cabo sobre una columna C8 con un relleno de partículas del tipo ‘núcleo fundido’. Se empleó un gradiente de elución utilizando mezclas ACN/ agua en presencia de un 0,1 % de ácido acético. La influencia de la temperatura de la columna se estudió en el rango de 15-30 °C. Se demostró la tolerancia del proceso a la presencia de pequeñas cantidades de agua.

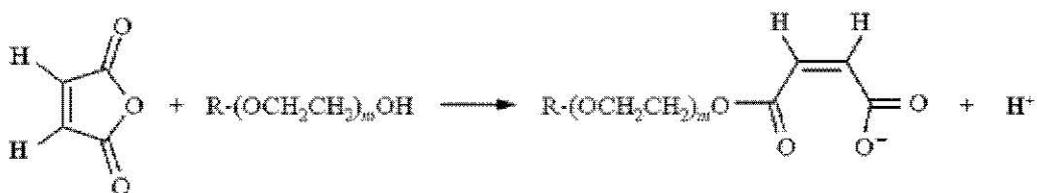
Se detectó una inversión en el orden de elución esperado para los derivados con valores de  $m = 1$  y 0. Esta inversión impedía la cuantificación directa de unos pocos oligómeros con valores bajos de  $m$  debido al solapamiento de los picos de dichos oligómeros con los de valores de  $m \geq 2$ . Sin embargo, se consiguió la resolución completa de todos los oligómeros mediante deconvolución con un algoritmo genético, combinado con el método local no restringido de Powell.

Finalmente, el método de caracterización y determinación de FAEs basado en la derivatización pre-columna con anhídrido maleico se aplicó a productos comerciales de limpieza, así como a muestras de aguas fluviales y marinas.

## IV.2. Resultados y discusión

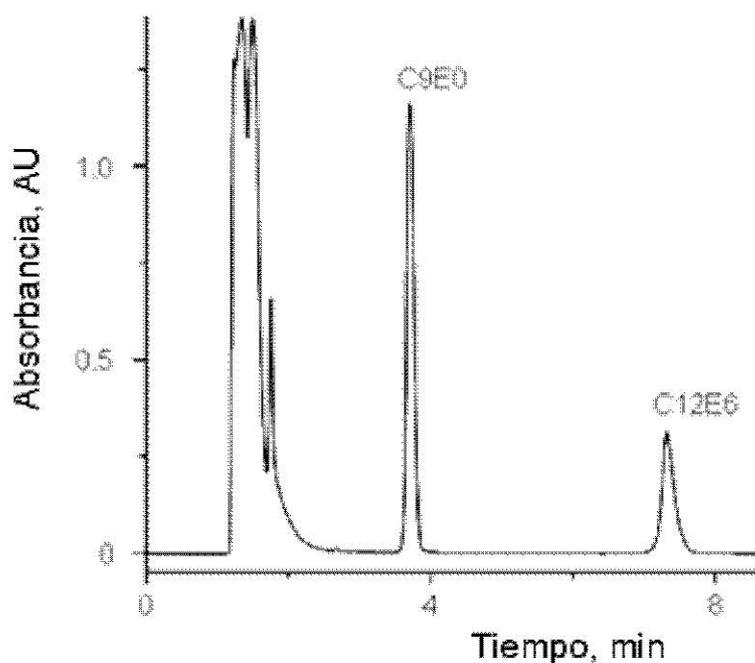
### IV.2.1. Optimización del procedimiento de esterificación

La reacción de esterificación de los FAEs con anhídrido maleico se ilustra en la Fig. IV.1.



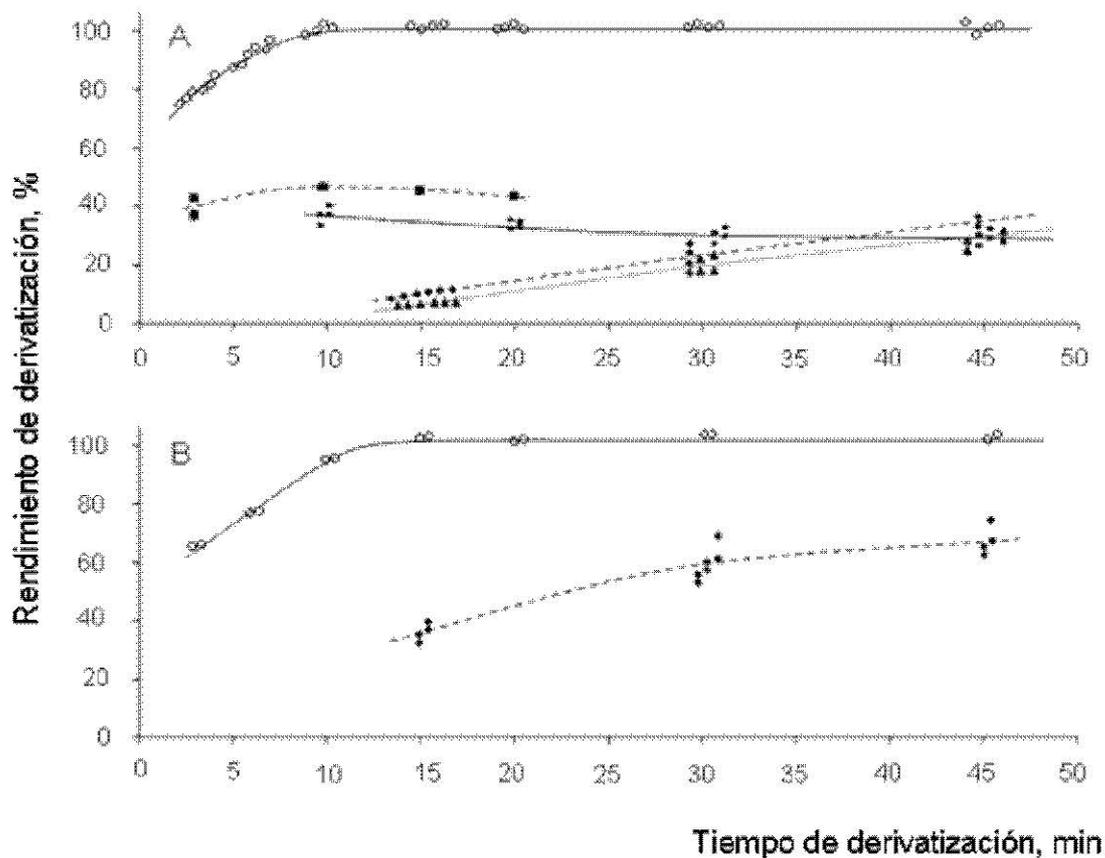
**Fig. IV.1.** Esterificación de FAEs con anhídrido maleico

La derivatización se llevó a cabo inicialmente fundiendo mezclas de 2 o 3 oligómeros conteniendo 40 mg de cada uno de ellos con un gran exceso de anhídrido maleico (1 g) en un baño termostático a 80 °C (el punto de fusión del anhídrido es de 53 °C). De este modo, se aseguró un exceso de anhídrido, incluso en presencia de muestras que pudiesen contener agua (1 g de anhídrido equivale a 10,2 mmol del mismo, capaces de reaccionar con 184 mg de agua). La mezcla de reacción se mantuvo a 80 °C durante 20 min. A continuación, se enfriaron los tubos de reacción, y la pasta resultante se disolvió y diluyó como se indica en el Capítulo III. Mediante elución isocrática con 70% de ACN en medios neutro y básico (0,1% NH<sub>3</sub> añadido a la fase móvil), se observó una deficiente separación de los derivados. Sin embargo, como se muestra en la Fig. IV.2, se consiguió una retención adecuada en medio ácido (0,1% de ácido acético añadido a la fase móvil).



**Fig. IV.2.** Cromatograma mostrando los picos de los hemiésteres de C9EO y C12E6 (ca. 1,4 mM y 0,44 mM en la disolución inyectada, respectivamente). Fase móvil: 70:30 ACN/ agua con 0,1 % de ácido acético.

Para calibrar las áreas de los picos de los hemiésteres en términos de concentraciones molares, se prepararon disoluciones que contenían concentraciones crecientes de C12E0 y C12E6 en ACN/ agua 40:60. Se inyectaron alícuotas de estas disoluciones. La elución se realizó en modo isocrático, usando una fase móvil con 70% de ACN y 0,1% de ácido acético. Al representar las áreas de los picos frente a las concentraciones de los hemiésteres, y para todas las concentraciones inferiores a 1,5 mM (concentraciones máximas usadas en las disoluciones inyectadas), se obtuvo una excelente linealidad (6 puntos por curva). Estos puntos se usaron para calcular los rendimientos de los hemiésteres de C12E0 y C12E6 en el procedimiento de esterificación optimizado.



**Fig. IV.3.** Rendimiento de la derivatización para C12E6, A y C12E0, B, representado frente al tiempo de esterificación. Cada punto representa una síntesis independiente realizada a 80 °C. Símbolos: sin aditivo (◆, línea de trazos), con piridina (▲, línea de puntos), con urea de Prolabo (cristales grandes, ●, línea continua), con urea de Fluka (cristales pequeños, ■, línea de trazos), con urea finamente molida de Fluka (○). Para mayor claridad, algunos puntos han sido desplazados ligeramente en la dirección del eje de tiempos.

Como se muestra en la Fig. IV.3, para el estándar C12E0 y en ausencia de aditivos, la derivatización progresó muy lentamente, teniendo lugar a una velocidad aún menor para C12E6. En ningún caso se alcanzaron rendimientos por encima del 70%, ni siquiera después de tiempos de reacción superiores a 90 min (los resultados obtenidos a tiempos superiores a 45 min no se muestran en esta figura). Los rendimientos no mejoraron al añadir 2 mL de piridina (Fig. IV.3A) o 2 mL de trietilamina, y las disoluciones obtenidas con estos aditivos

presentaban color oscuro y aspecto aceitoso. Por el contrario, en presencia de 0,5 g de urea se obtuvo un rendimiento de reacción mucho mayor en tiempos de reacción considerablemente menores. Las posibles explicaciones para este comportamiento son: (i) la eliminación de trazas de agua por la formación de puentes de hidrógeno con la urea, y también el posible atrapamiento de agua dentro de los cristales de urea, y (ii) la hidrólisis de la urea, que genera carbonato amónico, lo que amortigua la acidificación del medio de reacción durante la esterificación. Después de enfriar la mezcla de reacción se obtuvo, tanto con urea como sin ella, una pasta sólida y blanquecina, fácilmente soluble en una mezcla 2:1 MeOH/ NH<sub>3</sub> acuoso 0,1 M.

Como también se muestra en la Fig. IV.3, se apreciaron diferencias significativas, tanto en el rendimiento como en la velocidad de la reacción, al usar urea con cristales de distinto tamaño (tamaño promedio 390 × 750 μm y 190 × 350 μm para la urea de Prolabo y de Fluka, respectivamente). Como también se aprecia en esta figura, la velocidad y el rendimiento de la reacción aumentaron considerablemente al moler la urea hasta polvo fino (tamaño promedio de los cristales molidos, 11 × 25 μm). La mejora del rendimiento y velocidad de reacción fue similar tanto para FAEs etoxilados como para no etoxilados. El efecto debe atribuirse a la mayor área superficial de la urea, y a su presencia generalizada en todos los puntos del medio de reacción. Los cristales de urea se disuelven muy poco en dicho medio, tanto en ausencia como en presencia de dioxano, así que el molido es muy importante para obtener una suspensión bien dispersa. Con urea finamente molida, el rendimiento de la derivatización alcanzó su máximo a los 15 min, y no decreció al emplear tiempos de reacción mayores. Los puntos obtenidos a tiempos de reacción de 15 min o superiores presentaron rendimientos en el rango de 100-115%, siendo los valores superiores al 100% atribuibles a la acumulación de errores sistemáticos.

Además, para estos puntos ( $n = 8$  y  $12$ , síntesis independientes para C12E0 y C12E6, respectivamente), la desviación estándar relativa fue del 2%.

La concentración de los hemiésteres de C12E0 y C12E6 se estimó de forma aproximada mediante  $^1\text{H-NMR}$ ; sin embargo, como se comenta a continuación, existen evidencias adicionales que indican que el rendimiento de la derivatización en presencia de urea molida se aproximó al 100%. Estas evidencias son: (i) los valores constantes de las áreas de los picos obtenidos con los estándares de C12E0 y C12E6, para un gran número de experimentos independientes, usando tiempos de reacción diferentes por encima de los 15 min (Fig. IV.3); (ii) la similitud entre las áreas de los picos obtenidos con estos estándares y con estándares de otros oligómeros de FAEs, siendo las pequeñas diferencias atribuidas a los factores de respuesta (ver sección IV.2.2.); (iii) como se comenta a continuación, la linealidad de las curvas de calibrado obtenidas con Dehydol LT-7; (iv) las áreas de picos obtenidas para la derivatización de Dehydol LT-7 en presencia de mayores concentraciones de anhídrido maleico y urea, que no aumentaron, sino que permanecieron constantes.

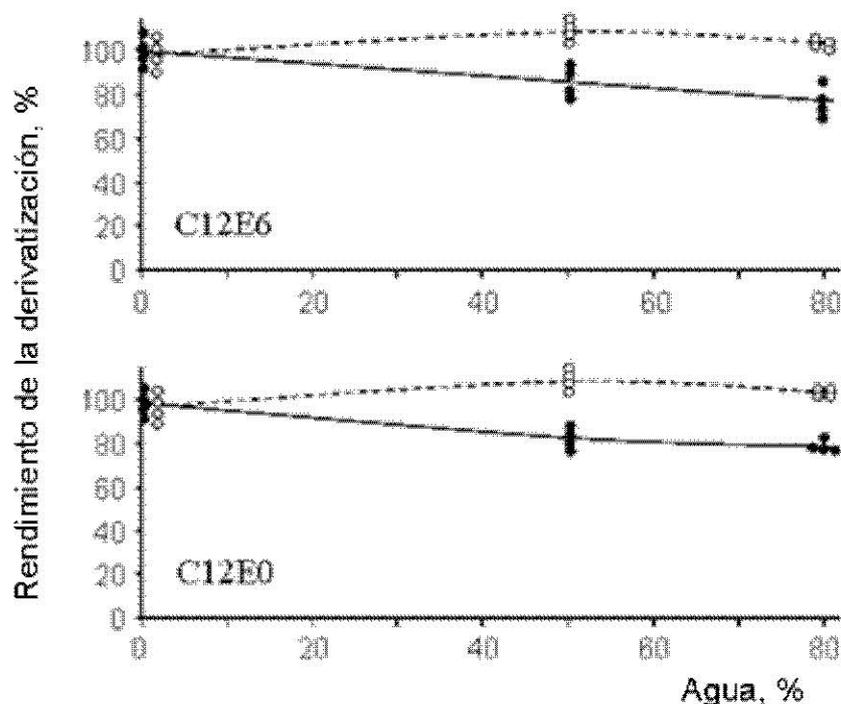
Las curvas de calibrado se construyeron a partir de una disolución de 20 mg mL<sup>-1</sup> de Dehydol LT-7 disuelto en dioxano. Se introdujeron cantidades crecientes de esta disolución en los tubos de reacción; el volumen final (2 mL) se completó con dioxano, y se llevó a cabo la esterificación y la separación cromatográfica de acuerdo con el procedimiento optimizado. Se alcanzaron excelentes linealidades ( $r \geq 0,99$ ,  $n = 8$  por curva), y las pendientes no difirieron significativamente de las esperadas para un rendimiento máximo, de acuerdo con los resultados de la Fig. IV.3. Se repitieron diversos puntos de la curva de calibrado sin emplear dioxano, pesando entre 20-40 mg de muestra, sin que se apreciaran diferencias de sensibilidad. Se puede concluir que la introducción de dioxano en la mezcla de reacción no modificó significativamente ni las

velocidades ni los rendimientos de reacción. Además, en presencia de una gran cantidad de dioxano en la disolución inyectada, la forma de los picos cromatográficos apenas se modificó. La raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las desviaciones de los puntos experimentales respecto a los puntos ajustados, dividida por la pendiente de la curva de calibrado, fue de 1 mg de analito, aproximadamente; por lo tanto, se puede esperar una desviación estándar relativa del 5% para un contenido total en FAEs de unos 20 mg.

A continuación, las cantidades de anhídrido maleico y urea se aumentaron a 2 y 1 g, respectivamente, y se repitieron diversos puntos de la curva de calibrado. Las pendientes apenas se modificaron. Si el procedimiento global no hubiese sido cuantitativo, o casi cuantitativo, hubiera sido altamente improbable obtener calibraciones lineales, y áreas de pico constantes bajo condiciones experimentales tan diferentes, incluyendo distintos tiempos de reacción y un amplio rango de concentraciones de reactivos. Por estas razones y para todos los casos, y con un alto grado de probabilidad, se puede afirmar que se alcanzó un rendimiento de derivatización cercano al 100%. Como los rendimientos de reacción para el procedimiento optimizado se acercaban al 100%, excepto en los experimentos desarrollados en presencia de agua, no se usó la corrección del estándar interno.

El agua está presente siempre, como componente mayoritario, en los FAEs industriales, y la mayor parte de los productos de limpieza la contienen en grandes cantidades. Los rendimientos de diversos procedimientos de derivatización se reducen en gran medida en presencia de agua [113-116]. Además, la reducción previa del contenido en agua de las muestras por volatilización comporta un alto riesgo de perder los oligómeros con valores bajos de  $m$  [115]. Por tanto, la tolerancia al agua es una característica importante de cualquier procedimiento de derivatización para análisis de FAEs. Como se

muestra en la Fig. IV.4, en presencia de urea molida, cuando la muestra contiene hasta un 80% de agua, el rendimiento de la reacción disminuye sólo ligeramente.

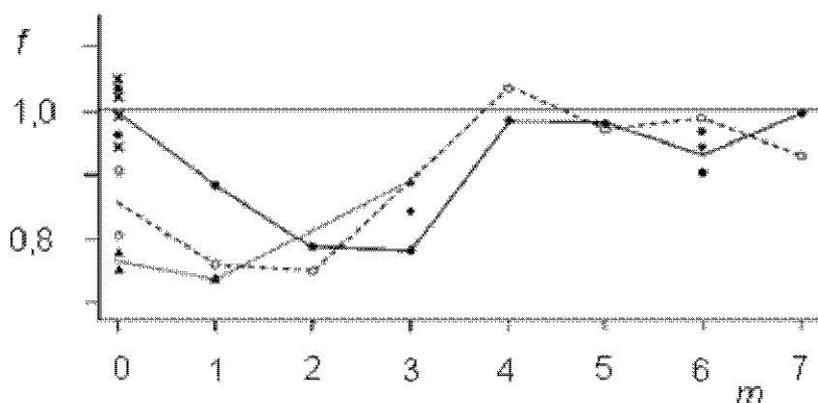


**Fig. IV.4.** Rendimientos de reacción para los estándares C12E6 y C12E0, cuando la esterificación se realiza en presencia de cantidades crecientes de agua. Puntos sin corrección del estándar interno (●, línea continua) y con dicha corrección (○, línea de trazos). Para mayor claridad, algunos puntos se han desplazado ligeramente en sentido lateral.

Como se puede ver también en esta figura, las pérdidas de rendimiento de reacción se corrigieron bastante bien al aplicar la corrección del patrón interno. La retención de agua por parte de los cristales de urea puede ser muy importante para mejorar la tolerancia del procedimiento frente al agua. De hecho, se observó que la solubilidad de la urea en la mezcla de reacción aumentaba considerablemente en presencia de pequeñas cantidades de agua.

## IV.2.2. Factores de respuesta UV-Vis de los derivados

Los factores de respuesta UV-Vis de los derivados,  $f$ , se obtuvieron cromatografiando estándares derivatizados de FAEs, tanto etoxilados como no-etoxilados. Para calcular  $f$ , se usó como referencia el valor promedio de las sensibilidades obtenidas para C9E0 y C12E0 ( $f = 1$ ). Como se observa en la Fig. IV.5, se obtuvieron valores de  $f$  en el rango 0,73 – 1,00.



**Fig. IV.5.** Representación de los factores de respuesta UV-Vis,  $f$ , obtenidos para un conjunto representativo de estándares, frente a  $m$ . El promedio de los puntos obtenidos con C9E0 y C12E0 se tomó como 1. Símbolos: C9E0 (x), C10E3 (◆), C12Em (●, línea continua), C14E6 (▼), C16Em (○, línea de trazos), C18Em (▲, línea de puntos).

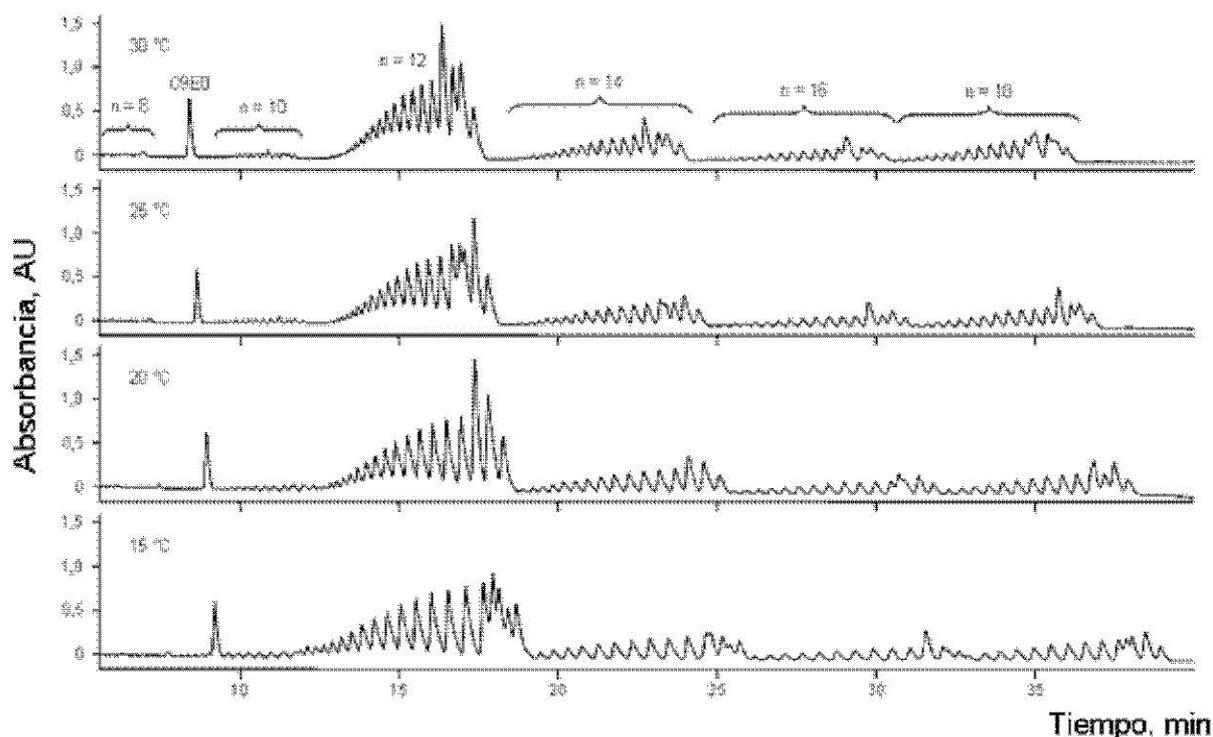
Para valores de  $m$  altos,  $f$  se aproximó a 1, pero disminuyó cuando  $m < 4$ , y también cuando  $n$  aumentó de 12 a 18, a bajos valores de  $m$ . Sin embargo, en comparación con las diferencias de sensibilidad de varios órdenes de magnitud que se observan con los oligómeros de los FAEs no derivatizados, usando los detectores ELSD y MS, los resultados de la Fig. IV.5 muestran una variación relativamente pequeña de los factores de respuesta UV-Vis, tanto con  $n$  como con  $m$ . En la Tabla IV.1 se observan una serie de valores de  $f$ , promediados e interpolados dentro de los rangos investigados de valores de  $m$  y  $n$ .

**Tabla IV.1.** Factores de respuesta UV-Vis promedios y predichos (en cursiva), tomando C12E0 como referencia.

n	m					
	0	1	2	3	4	≥ 4
12	1.00	0.89	0.78	0.77	1.00	0.95
14	0.92	0.82	0.77	0.80	1.00	0.95
16	0.86	0.76	0.75	0.86	1.00	0.95
18	0.76	0.73	0.76	0.88	1.00	0.95

#### IV.2.3. Separación de los derivados mediante HPLC

En la Fig. IV.6 se muestran los cromatogramas de una mezcla industrial de FAEs (Dehydol LT-7), obtenidos con un gradiente lineal de 50 – 95% de ACN, a diversas temperaturas de columna. Los cromatogramas muestran una buena resolución entre las series hidrocarbonadas consecutivas, las cuales eluyen siguiendo un orden creciente de valores de  $n$ , desde  $n = 8$  hasta 18 (también se distinguen trazas de la serie de  $n = 20$ ).

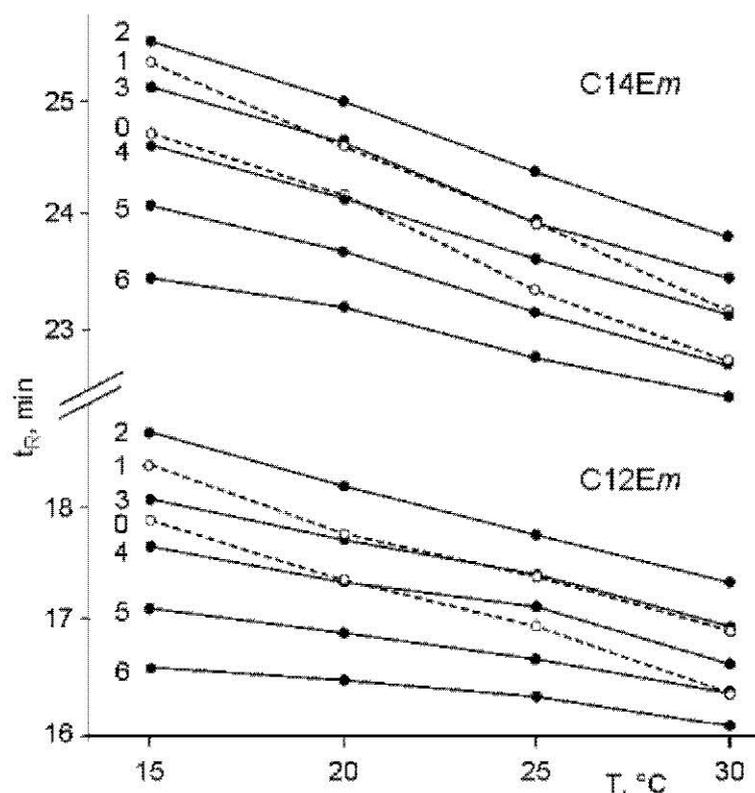


**Fig. IV.6.** Cromatogramas de Dehydrol LT-7 derivatizado (40 mg seguidos de dilución con 3 mL de una mezcla 2:1 de MeOH/ NH<sub>3</sub> 0,1 M, después de la esterificación) obtenidos a la temperatura de columna indicada en las trazas. Se eluyó con un gradiente lineal del 50 al 95% de ACN en 45 min.

La mejor resolución entre series se obtuvo a 30 °C, sin embargo, los oligómeros dentro de las series no se resolvieron a esta temperatura. La resolución dentro de las series mejoró al disminuir la temperatura, pero a costa de una pérdida de resolución entre series. Un efecto similar fue observado por Cho et al. [16] para alcoholes no derivatizados. La disminución de la resolución entre series, a medida que se reduce la temperatura, debe atribuirse al aumento del peso estadístico de los conformeros polares *gauche* de la cadena de EO, a expensas de la reducción del peso estadístico de los conformeros *anti* no polares [117, 118].

El orden de elución dentro de las series se indica en la Fig. IV.7 para las series  $n = 12$  y 14. Para establecer el orden de elución, en primer lugar se inyectaron muestras de estándares derivatizados de unos pocos oligómeros por

mezcla. El orden de elución se confirmó mediante detección por MS, inyectando Dehydol LT-7 derivatizado, y utilizando la matriz de datos de MS-tiempo, para extraer los cromatogramas a los valores seleccionados de  $m/z$ . Para valores grandes de  $m$ , los oligómeros de una misma serie eluyeron siguiendo un orden decreciente de  $m$ , esto es, un orden de hidrofobicidad creciente. Los oligómeros consecutivos llegaron a resolverse bastante bien, particularmente a temperaturas bajas; sin embargo, los oligómeros con  $m = 1$  y  $0$  mostraron una inversión en el orden de elución. Como se muestra en las Figs. IV.6 y IV.7, los picos de los derivados con  $m = 1$  y  $0$  se solaparon con los picos de algunos oligómeros con valores grandes de  $m$ , dentro de sus respectivas series hidrocarbonadas.



**Fig. IV.7.** Variación de  $t_R$  con la temperatura de la columna, para los oligómeros derivatizados de las series C12Em y C14Em, hasta  $m = 6$ . Los valores de  $m$  se indican a la izquierda de los trazos. Las líneas de trazos y los círculos vacíos indican los derivados con  $m = 1$  y  $0$ , respectivamente. Otros detalles como en la Fig. IV.6.

La inversión en el orden de elución para  $m = 1$  y  $0$  se puede atribuir a la rigidez de la mitad hidrofílica de estos iones (parte etoxilada de la molécula), que al ser muy corta, impide la solvatación intramolecular, haciendo así disminuir su hidrofobicidad con respecto a los iones con  $m > 1$ . Por el contrario, una mitad hidrofílica larga y flexible permite la solvatación intramolecular en los oligómeros con  $m > 1$ , lo que incrementa su hidrofobicidad. De este modo, en comparación con los oligómeros que tienen valores altos de  $m$ , los derivados con  $m = 1$  y  $0$  mostraron un comportamiento más hidrofílico de lo esperado. Por otra parte, para cada serie hidrocarbonada, el final brusco de la elución en  $m = 2$  es también una ventaja, ya que permite separar más limpiamente series hidrocarbonadas consecutivas; sin embargo, la inversión en el orden de elución

dificulta la cuantificación de los oligómeros más ligeros dentro de las series. El solapamiento de algunos picos no es problema para la detección mediante MS; sin embargo, en muchos laboratorios industriales sólo se utiliza la detección UV-Vis. Por esta razón, en este trabajo se desarrolló un procedimiento para deconvolucionar todos los oligómeros.

Como se ve en la Fig. IV.7, el aumento de  $t_R$  al disminuir la temperatura fue más pronunciado para los oligómeros con  $m = 1$  y  $0$  que para el resto de los oligómeros. Este comportamiento distinto de los oligómeros con  $m = 1$  y  $0$  facilita el control de la selectividad mediante el control de la temperatura de la columna. Controlar la selectividad es importante, ya que evitar picos perfectamente solapados es necesario para poder estimar las concentraciones relativas de los oligómeros más ligeros, alcanzando resultados satisfactorios, al aplicar cualquier algoritmo de deconvolución. Como se deduce de la Fig. IV.8, los picos de los oligómeros con  $m = 1$  y  $0$  de las series de C12Em y C14Em solapan completamente con los de otros oligómeros si se trabaja en las proximidades de 20 y de 30 °C, pero no a otras temperaturas. Así por ejemplo, para estas series, se puede alcanzar un compromiso entre la resolución intra-series e inter-series, sin un solapamiento completo de ninguna pareja de picos, si se trabaja en las proximidades de 25 °C o de 15 °C. Para las series C16Em y C18Em, se observaron también temperaturas a las que no se producía el solapamiento completo de ninguna pareja de picos. Por lo tanto, se recomienda trabajar a 30 °C tanto para establecer la distribución de las series, como para tener una idea de la distribución de los oligómeros dentro de las series. Por otra parte, para establecer la distribución total de los oligómeros dentro de las series, es útil trabajar a una temperatura más baja, seguido de la aplicación de un algoritmo de deconvolución.

#### IV.2.4. Deconvolución de las series hidrocarbonadas

Se reconstruyeron las contribuciones aisladas de todos los oligómeros mediante la aplicación de técnicas de procesamiento de señales al cromatograma obtenido a 15 °C (Fig. IV.6). Con este objetivo, se usaron con éxito diversos modelos de pico. Cuando se inyectaron FAEs industriales derivatizados a bajas concentraciones, los perfiles de los picos de los oligómeros fueron consistentes con funciones de Gauss ligeramente distorsionadas (factor de asimetría,  $B/A$ ,  $\sim 1,5$ ). En este caso, cada serie hidrocarbonada se pudo ajustar a una combinación lineal de estas funciones. Típicamente, cada serie hidrocarbonada incluía hasta 25 picos (hasta  $m = 24$ ), con tres parámetros ajustables por pico: altura de pico, tiempo de retención y desviación estándar de pico.

En primer lugar, se trabajó dejando evolucionar libremente todos los parámetros; sin embargo, el número total de parámetros resultó ser excesivo, ya que impedía obtener convergencia en un tiempo razonable. Los métodos locales eran propensos a divergir, llevando incluso a la cancelación de picos realmente existentes en la serie. La evolución hacia una solución local errónea sólo podía evitarse usando métodos globales, pero estos eran inaceptablemente lentos. Debe tenerse en cuenta que las dificultades no eran debidas a la resolución local, que resultaba por lo general favorable, sino al gran número de parámetros que debían ajustarse.

Intentando conseguir un balance entre las ventajas de las búsquedas globales y locales, se propuso un algoritmo híbrido. La idea fue aplicar los ajustes locales como sigue: (i) realizar un ajuste restringido dentro de una ventana de tiempos cromatográficos pequeña, abarcando sólo los picos de uno o dos oligómeros; (ii) mover la ventana de ajuste secuencialmente de izquierda a derecha a lo largo de toda la serie hidrocarbonada, y después de derecha a izquierda y viceversa, de modo que el ajuste global a lo largo de las series

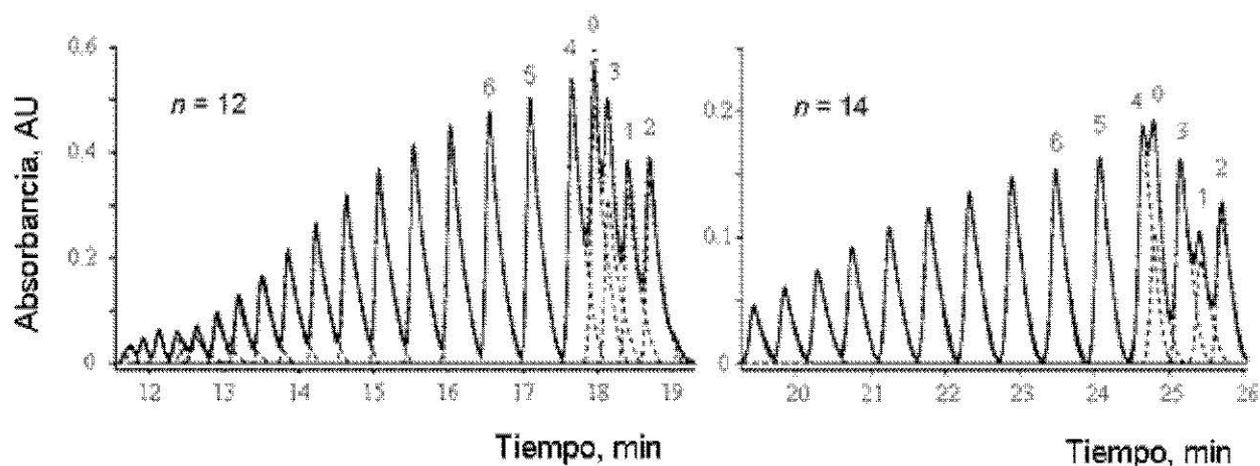
mejorase gradualmente; y (iii) para mejorar todavía más la exactitud, cambiar la parte más esencial del algoritmo, pasando de un método global a uno local en los últimos pasos del ajuste.

Se hicieron estimaciones iniciales asistidas por derivadas de primer y segundo orden, que se obtuvieron aplicando previamente un suavizado de Savitzky-Golay [119]. Empezando desde el último pico de cada serie ( $m = 2$ ), se consideró que los picos sucesivos con  $m > 2$  estaban situados regularmente a valores de tiempo decrecientes. Los picos con  $m = 1$  y  $0$  también debían ser localizados y, a su vez, resueltos con respecto a los demás picos. En las primeras iteraciones, se aplicó localmente un algoritmo genético [120], con codificación binaria, usando un número reducido de bits. Como se ha indicado, este proceso se aplicó a una ventana de tiempo que se fue desplazando desde el final de una serie hidrocarbonada (pico con  $m = 2$ ) hasta el otro extremo, y viceversa. Típicamente, se alcanzó una convergencia aproximada al cabo de 2 o 3 barridos en la doble dirección del eje de tiempos. Entonces, la parte esencial del algoritmo se reemplazó por el método local de Powell, que se aplicó sin restricciones [121]. El papel del algoritmo genético fue asegurar una estimación inicial adecuada, para aplicar luego el método local, evitando de este modo que los picos menores fuesen cancelados.

Por otra parte, las series hidrocarbonadas constituidas por picos asimétricos (concentraciones grandes, ver Fig. IV.6), se ajustaron en dos pasos. Primero, se ajustó un pico de la zona central de las series, por ejemplo  $m = 5$ , a una función PMG [122]. Una función PMG se define como una función Gaussiana en la que el término de desviación estándar ha sido reemplazado por una función polinomial de la forma:

$$s = s_0 + s_1(t - t_R) + s_2(t - t_R)^2 + \dots + s_i(t - t_R)^i + \dots \quad \text{Ec. IV.1.}$$

donde  $t_R$  del pico y  $s_i$  ( $i = 0, 1, 2, \dots$ ) son parámetros de ajuste. Para ajustar series hidrocarbonadas, en primer lugar,  $t_R$  y la altura de pico fueron ajustados individualmente para cada pico, mientras que los coeficientes  $s_i$  se consideraron constantes a lo largo de las series. A continuación, se mantuvieron constantes tanto  $t_R$  como las alturas de los picos, y se ajustaron los coeficientes  $s_i$ . De este modo, la convergencia fue muy rápida, y se obtuvieron ajustes exactos con dos ciclos. Los cromatogramas deconvolucionados de las series C12Em y C14Em de la Fig. IV.6 se muestran en la Fig. IV.8.



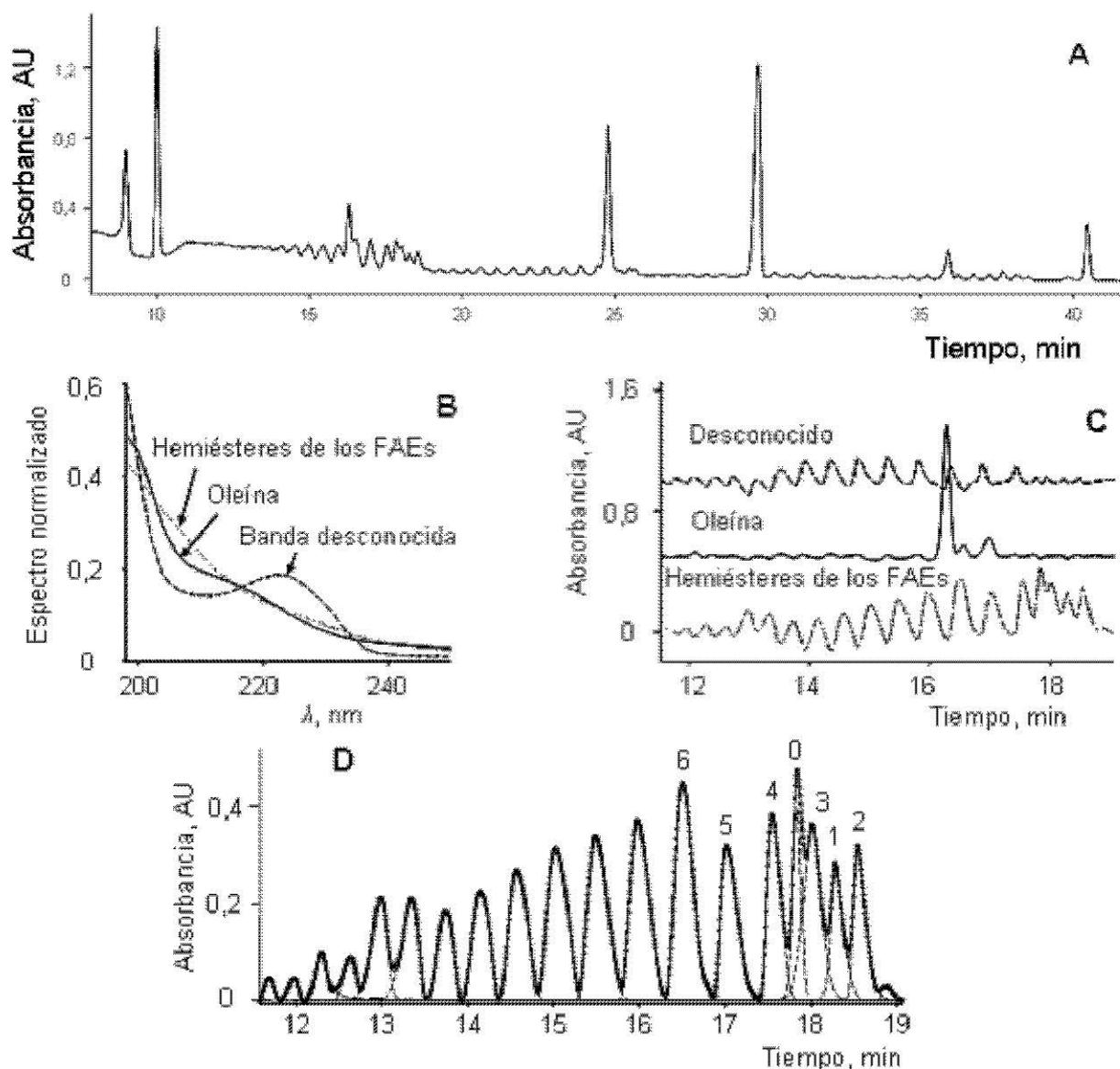
**Fig. IV.8.** Secciones del cromatograma de la Fig. IV.6 a 15 °C, mostrando las series hidrocarbonadas de C12Em y C14 Em (líneas de trazos), y los picos de los oligómeros individuales obtenidos por deconvolución (líneas continuas). Los números sobre los picos indican los valores de  $m$  de los oligómeros más ligeros.

#### IV.2.5 Aplicación a muestras industriales

En la Fig. IV.9 A se puede observar el cromatograma, realizado a 15 °C, de un limpiador en gel que contenía un 5% de Dehydol LT-7. Las separaciones de las series hidrocarbonadas y de los oligómeros dentro de una misma serie fueron similares a las obtenidas con Dehydol LT-7 (Fig. IV.6); sin embargo, los

picos de los glicéridos de una oleína industrial, así como los picos de otros componentes de la muestra, solaparon con los picos de los FAEs derivatizados. Un estudio preliminar de la matriz DAD indicó la posibilidad de usar técnicas multivariantes para deconvolucionar las señales de los derivados de los FAEs y los de sus interferencias. La aplicación de la aproximación de la proyección ortogonal (*orthogonal projection approach*, OPA) [123, 124] permitió detectar tres espectros significativos en la región de  $n = 12$ , y dos espectros más en otras regiones del cromatograma. Estos espectros preliminares se refinaron usando mínimos cuadrados alternados (*alternating least-squares*, ALS) [125], dando lugar a espectros normalizados y a perfiles de concentración como los mostrados en las Fig. IV.9 B y C para la serie de  $n = 12$ .

Tanto el espectro como los perfiles de concentración reconstruidos de los derivados de los FAEs coincidían muy bien con los encontrados usando Dehydol LT-7 (Fig. IV.6, traza a 15 °C), y el espectro y los perfiles de concentración de una de las interferencias coincidió también perfectamente con los perfiles obtenidos al inyectar oleína pura. Por último, los perfiles de concentración de los FAEs derivatizados se procesaron como se indica en el apartado IV.2.4. Como se puede observar en la Fig. IV.9 D, para la serie C12Em, los perfiles de concentración se deconvolucionaron satisfactoriamente. Se obtuvieron resultados similares con productos de limpieza que contenían otros FAEs industriales.

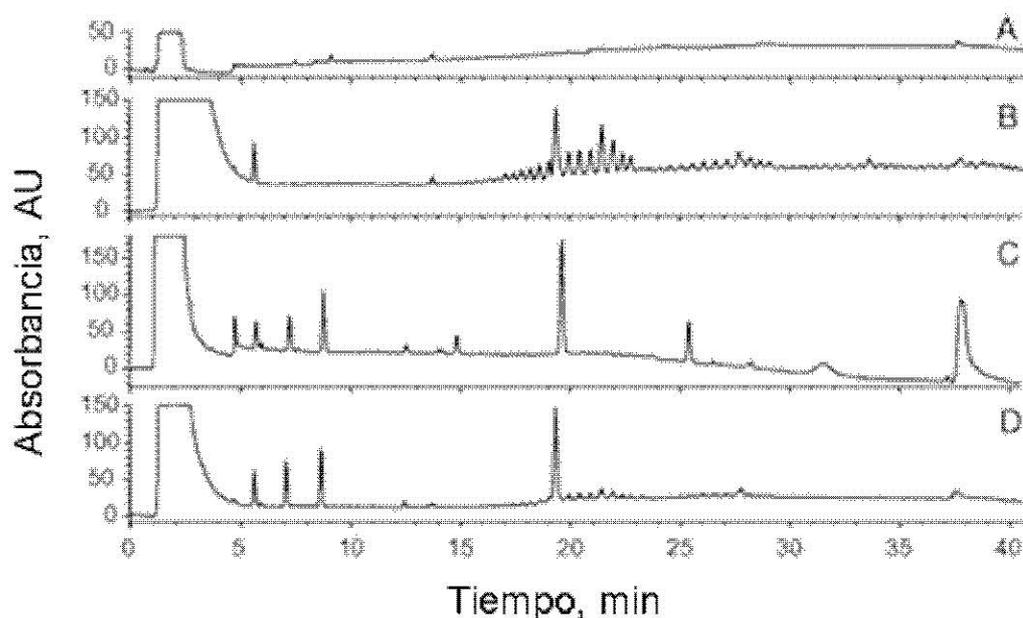


**Fig. IV.9.** Cromatograma, a 15 °C, de un limpiador comercial en gel (160 mg esterificados, seguido de dilución con 3 mL de MeOH/ NH<sub>3</sub> 0,1 M) (A). Espectro (B) y correspondientes perfiles de concentración (C, desplazados verticalmente) de los hemiésteres de los FAEs e interferencias (oleína e interferencia desconocida) encontrados en la región de  $n = 12$  mediante deconvolución multivariante con OPA-ALS [125]. Cromatograma obtenido por deconvolución del perfil de concentración de los hemiésteres de la serie C12Em (D). Otros detalles, como en las Figs. IV.6 y IV.8. El limpiador en gel contenía agua (~ 75%), Dehydol LT-7 (5%) oleína (~ 5%), ácido dodecibencenosulfónico, lauril etoxisulfato sódico y otros componentes.

#### IV.2.6. Aplicación a muestras ambientales

Se analizaron muestras de agua de río y de mar, tanto aditivadas como no aditivadas, tomadas en áreas urbanas. Muestras de 500 mL de agua de río y de 250 mL de agua de mar se aditaron con 0,50 mL y 0,25 mL, respectivamente, de una disolución de Dehydol LT-7 en dioxano (concentración final de Dehydol LT-7 añadida en las muestras aditivadas,  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los cartuchos de extracción en fase sólida se acondicionaron con MeOH, seguido de agua desionizada, y las muestras aditivadas así como las no aditivadas se pasaron a través de estos cartuchos a un flujo de unos  $5 \text{ mL min}^{-1}$ . Seguidamente, se pasaron por los cartuchos dos porciones de 2 mL de HCl 1 mM para eliminar los restos de formaldehído. Para eluir los cartuchos se emplearon tres porciones sucesivas de 2 mL de MeOH seguidas de otras tres porciones de 2 mL de isopropanol. Los eluatos se evaporaron a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno hasta que quedó un residuo viscoso. Este residuo se esterificó como se indica en el procedimiento optimizado. Después de enfriar, la pasta solidificada obtenida se disolvió en 10 mL de MeOH/  $\text{NH}_3$  0,1 M acuoso, y se tomaron alícuotas para su inyección en el cromatógrafo.

Otras dos muestras de 500 mL de agua de río y de 250 mL de agua de mar se sometieron también a extracción en fase sólida, y se evaporaron los extractos como se ha indicado. Sin embargo, en este caso no se procedió a su esterificación. El residuo obtenido después de evaporar los extractos se disolvió en 10 mL de MeOH/  $\text{NH}_3$  0,1 M acuoso, y se tomaron alícuotas para su inyección en el cromatógrafo. Como se muestra en la Fig. IV.10, tanto las muestras aditivadas de agua de río y de mar como las no aditivadas, mostraron la huella dactilar de las series hidrocarbonadas de los FAEs, desde  $n = 12$  hasta 18, con una relación  $S/N$  notablemente alta para muchos de los oligómeros.



**Fig. IV.10.** Cromatogramas de muestras no aditivadas de agua de río (A y B) y mar (C y D), tomadas en áreas urbanas. Las muestras se sometieron a extracción en fase sólida y posterior evaporación. Los residuos de las muestras A y C no se derivatizaron, mientras que las muestras B y D se procesaron incluyendo la etapa de esterificación. Se inyectó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de una disolución final de 10 mL en MeOH/  $\text{NH}_3$  0,1 M.

De acuerdo con la curva de calibrado externo preparado con Dehydol LT-7, las concentraciones totales de los FAEs en las muestras de agua de río y mar fueron de 5,7 y 2,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (285 y 65  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en las disoluciones inyectadas). Estos valores concuerdan con los obtenidos por el método de adición de estándares (usando muestras aditivadas antes de derivatizar).

### IV.3. Conclusiones

Los oligómeros de los FAEs carecen de grupo cromóforo y de carga, además los oligómeros con  $m > 3$  se descomponen antes que volatilizarse en un cromatógrafo de gases, y sus factores de respuesta, tanto en ELSD como en MS,

varían ampliamente con el número de átomos de carbono de la cadena alquílica alifática,  $n$ , y especialmente con el número de unidades de EO,  $m$ . Además, los alcoholes no etoxilados no se detectan usando ELSD y MS. La derivatización de los FAEs puede llevarse a cabo en condiciones suaves (80 °C), fundiendo la muestra con anhídrido maleico. En presencia de un exceso de urea molida suspendida en el medio, y probablemente debido a que la urea retiene agua e impide la acidificación del mismo, se observa una aceleración de la reacción y un considerable aumento de los rendimientos de derivatización, siendo estos cercanos al 100 %, tanto para alcoholes etoxilados como para no etoxilados, en un tiempo de reacción corto (15 min). Los rendimientos y velocidades de reacción en presencia de urea no se reducen si se utiliza 1,4-dioxano como medio de reacción, lo cual es muy útil para introducir cantidades pequeñas y precisas de estándares en el medio de reacción. Usando una disolución en 1,4-dioxano se puede introducir, si es necesario, un estándar interno, para corregir descensos ocasionales en el rendimiento, como los observados en presencia de grandes cantidades de agua. Sin embargo, el procedimiento tolera bastante bien la presencia de agua. Además, los factores de respuesta UV-Vis de los hemiésteres de los oligómeros de los FAEs son cercanos a la unidad.

Las series hidrocarbonadas de los FAEs lineales de interés industrial, desde  $n = 8$  hasta 20, se resolvieron bien usando una columna C8 con partículas de tipo núcleo fundido, con elución en gradiente con ACN/ agua en presencia de un 0,1 % de ácido acético. Además, se consiguieron excelentes resoluciones entre los oligómeros consecutivos dentro de cada serie hidrocarbonada a valores altos de  $m$ ; sin embargo, una inversión en el orden de elución para los oligómeros con  $m < 2$  impidió la cuantificación directa de unos pocos oligómeros dentro de cada serie. La causa de dicha inversión es probablemente la solvatación intramolecular, que debe ocurrir ampliamente cuando  $m < 2$ . La

inversión en el orden de elución cuando  $m < 2$  se puede atribuir a la rigidez de la mitad hidrofílica de los hemiésteres cuando la cadena de EO es demasiado corta, lo que debe impedir la solvatación intramolecular.

La resolución entre series hidrocarbonadas mejora al aumentar la temperatura de la columna, resolviéndose las series de modo satisfactorio al trabajar a 15 °C. Por el contrario, la resolución entre oligómeros consecutivos dentro de cada serie mejora a temperaturas decrecientes. La selectividad entre los oligómeros con  $m = 0$  y 1 respecto a los otros oligómeros dentro de las series depende también de la temperatura. La distinta dependencia de la retención de estos oligómeros con la temperatura, en relación a los oligómeros más pesados, permite encontrar temperaturas en las cuales se evita un perfecto solapamiento de picos. De este modo, se hace posible estimar las abundancias relativas de los oligómeros más ligeros, y asegurar el éxito, al aplicar algoritmos de deconvolución.

Se ha demostrado la resolución de los oligómeros en mezclas de FAEs industriales y de productos manufacturados, mediante la aplicación de una estrategia de deconvolución novedosa, basada en un algoritmo genético asistido por el método local de Powell no restringido. Las interferencias ocasionales causadas por picos debidos a otros componentes de las muestras, como la oleína, se eliminaron por deconvolución multivariante previa, empleando la información espectral proporcionada por el DAD. Finalmente, se ha demostrado la utilidad del procedimiento propuesto para investigar FAEs en muestras ambientales, en concreto en aguas fluviales y marinas.

Este estudio ha dado lugar a un artículo titulado *Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatisation with maleic anhydride followed by liquid chromatography with UV-vis detection*, publicado en *Journal of Chromatography A*, 1180 (2008) 32-41.

---

## **Capítulo V**

### **Modelización de la retención**

---

## **Characterization of polyethoxylated alcohols by HPLC using models to predict the retention times of the derivatized oligomers**

### **Abstract**

After derivatization with maleic anhydride, the elution times of the successive oligomers of FAEs were observed to depend linearly on the average ACN concentration of the mobile phase (concentration at the mid-point of the linear elution gradient). Other linear and quadratic relationships among the number of carbon atoms in the hydrocarbon chain, and the number of ethylene oxide units, with respect to the average mobile phase composition, were found. Models describing these relationships, capable of predicting the retention times of the oligomers, were constructed. In all cases, retention times were predicted with errors below  $\pm 0,7$  min along a total chromatographic time of 60 min. Models made easier the design of elution gradients to improve resolution between the consecutive oligomer pairs of selected hydrocarbon series, without increasing the overall chromatographic time.

## V. Modelización de la retención de los oligómeros

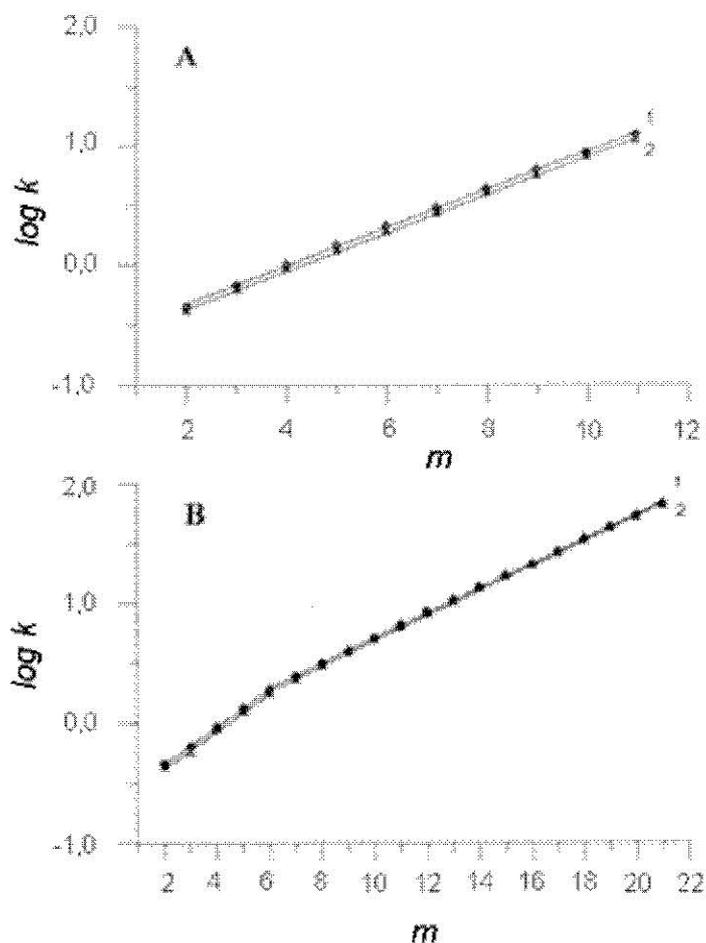
### *V.1. Antecedentes y planteamiento del problema*

Jandera y col. [47], utilizando cromatografía en NP, tanto en ausencia como en presencia de concentraciones muy bajas de agua, representaron la retención relativa,  $k$ , de los oligómeros de cada serie hidrocarbonada frente a  $m$ , obteniendo una relación lineal entre ambos parámetros (Fig. V.1). Esta relación no dependía de la pendiente del gradiente, cumpliéndose incluso para elución isocrática. Sin embargo, no se realizaron estudios de modelización de la retención de los oligómeros de los FAEs, ni se hizo uso de las relaciones observadas para predecir la retención de los mismos. En consecuencia, dichas relaciones tampoco se utilizaron para diseñar gradientes de elución. Tampoco se han estudiado las relaciones entre fuerza eluyente promedio y los parámetros  $n$  y  $m$  en RP. El objeto del presente estudio es completar el conocimiento de las relaciones entre la retención, la fuerza eluyente en RP, y los valores de  $n$  y  $m$ , y desarrollar sus posibles aplicaciones.

### *V.2. Retención de los oligómeros en función de la fuerza eluyente media*

Con el objeto de estudiar y modelizar la retención de los oligómeros, se obtuvieron varios cromatogramas en distintas condiciones de elución. Se emplearon dos materias primas industriales, Dehydol LT7 y Lutensol XP-99. Asimismo se utilizó Lutensol A07 para validar los modelos construidos con las otras dos materias primas. En todos los casos, se procedió a derivatizar previamente las muestras con anhídrido maleico. Los estudios preliminares se hicieron en modo isocrático, y luego se trabajó en modo gradiente, siempre a 25

°C. Se utilizó una fase estacionaria C8 (2,7  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm ID) y fases móviles de ACN/ agua en presencia de un 0,1% de ácido acético.

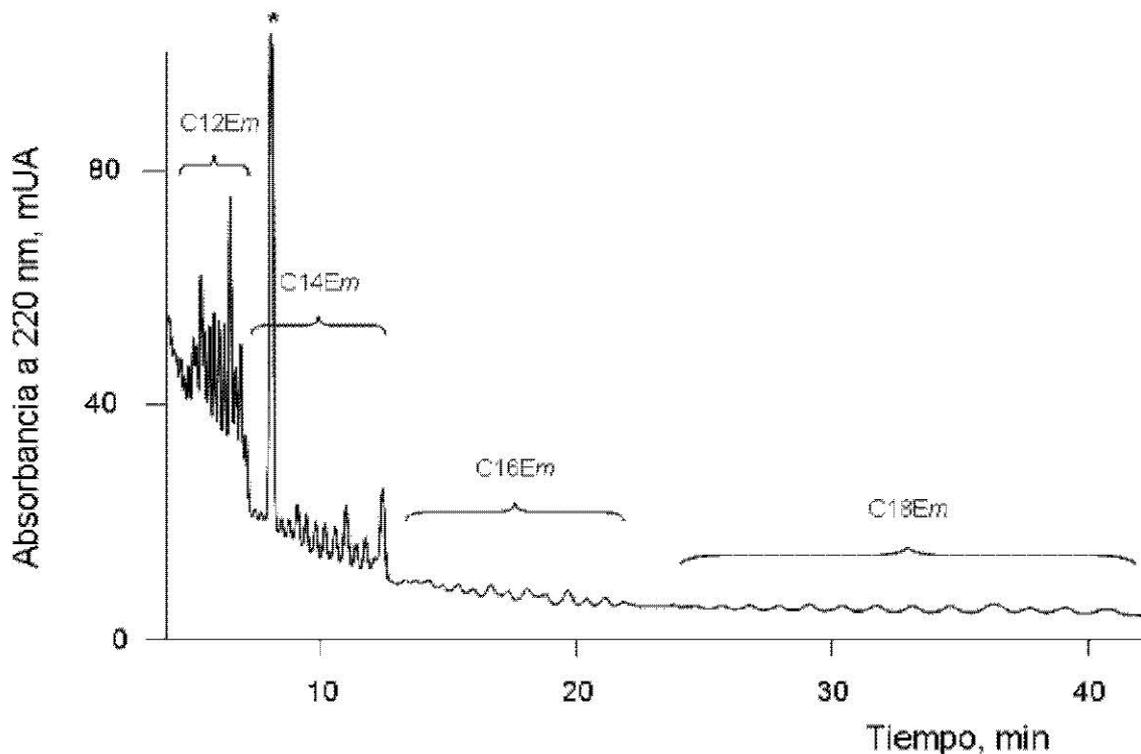


**Fig. V.1.** Log  $k$  frente a  $m$  (número de moles de EO) para las series C12Em (1) y C14Em (2) en Empilan KBS8. Columna para NP-HPLC Separon SGX-NH<sub>2</sub> (7  $\mu\text{m}$ , 150 x 3 mm ID). Fase móvil: (A) hexano/ 2-propanol (80:20); (B) ACN/ agua/ diclorometano (69,3:0,7:30). Tomado de la ref. [47].

Inicialmente, se utilizó una fase móvil constituida por una mezcla ACN/ agua 50:50. En estas condiciones los oligómeros de las series C12Em y C14Em eluyeron en unos 120 min, con excelente resolución entre todos ellos, a excepción de los oligómeros afectados por la inversión en el orden de elución de

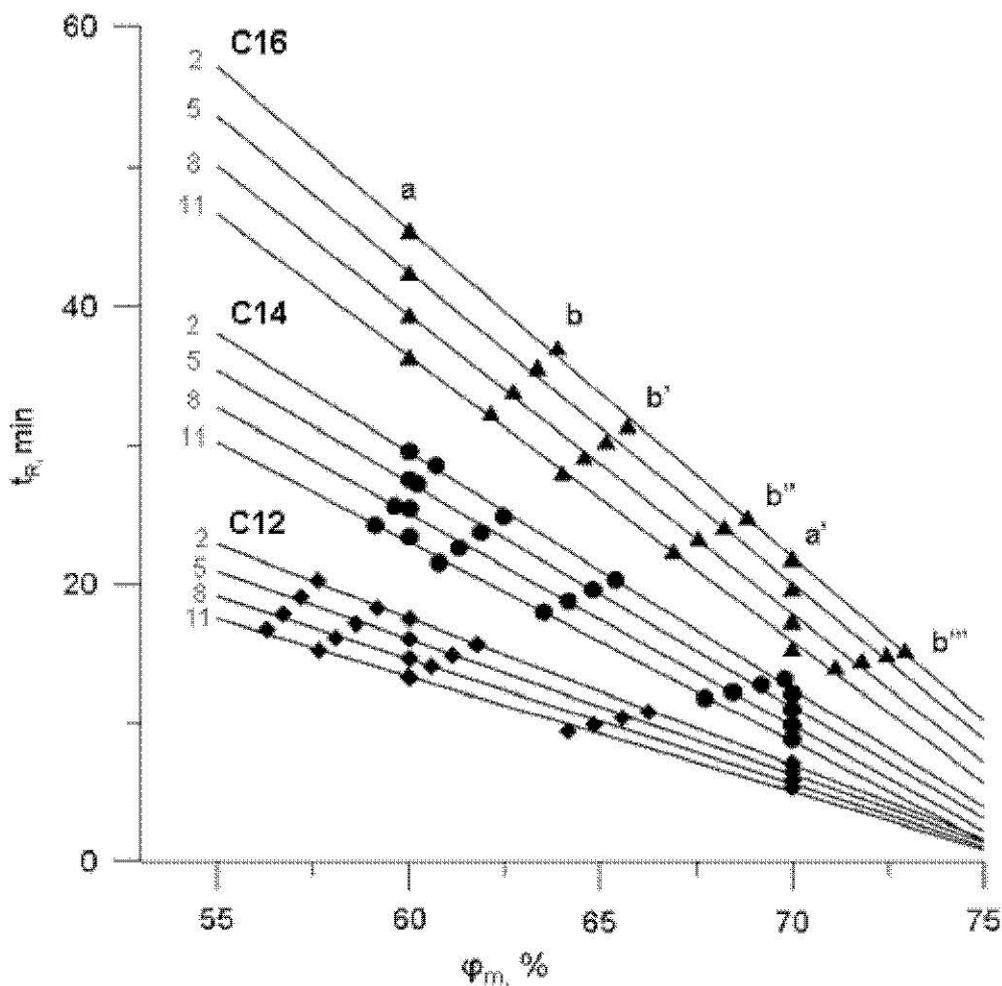
los derivados con  $m = 0$  y 1. Cuando la relación ACN/ agua se aumentó a 70:30, los oligómeros de las series C14Em, C16Em y C18Em aparecieron bien resueltos, pero los oligómeros de la serie C12Em eluyeron sin resolver, debido a su baja retención relativa (Fig. V.2). Usando un gradiente de elución lineal entre 70 y 95% (v/v) de ACN durante 30 min, las series hidrocarbonadas, desde C12Em hasta C18Em, aparecieron bien resueltas, pero la resolución entre homólogos consecutivos dentro de las series más ligeras, C12Em y C14Em, fue muy baja. Por esta razón, se redujo la fuerza eluyente inicial del gradiente. Utilizando el intervalo 50-95% (v/v) de ACN durante 30 min, se alcanzó una excelente resolución entre las sucesivas series hidrocarbonadas, y también entre los oligómeros consecutivos dentro de cada serie. Por lo tanto, se escogió este gradiente lineal para los estudios posteriores.

Usando un tiempo de gradiente elevado, tal como 60 min, todos los oligómeros aparecieron bien resueltos, excepto CnE0 y CnE1, que aparecieron solapados con los oligómeros CnE5 y CnE3, respectivamente, dentro de sus correspondientes series. Con el fin de reducir el tiempo de análisis, se estudiaron tiempos de gradiente decrecientes. Para 45 y 15 min de gradiente, se observó una excelente resolución entre las series hidrocarbonadas de los FAEs (cromatogramas no mostrados, similares a los presentados en la Fig. IV.6). Sin embargo, para un tiempo de gradiente de 15 min, la resolución entre los sucesivos oligómeros dentro de las series no fue satisfactoria, por lo que el tiempo de gradiente utilizado en estudios posteriores fue de 30 min.



**Fig. V.2.** Cromatograma obtenido al inyectar una muestra industrial (Dehydol LT7), previamente derivatizada con anhídrido maleico. Condiciones de elución: 70% de ACN en modo isocrático. El asterisco corresponde a un pico no identificado.

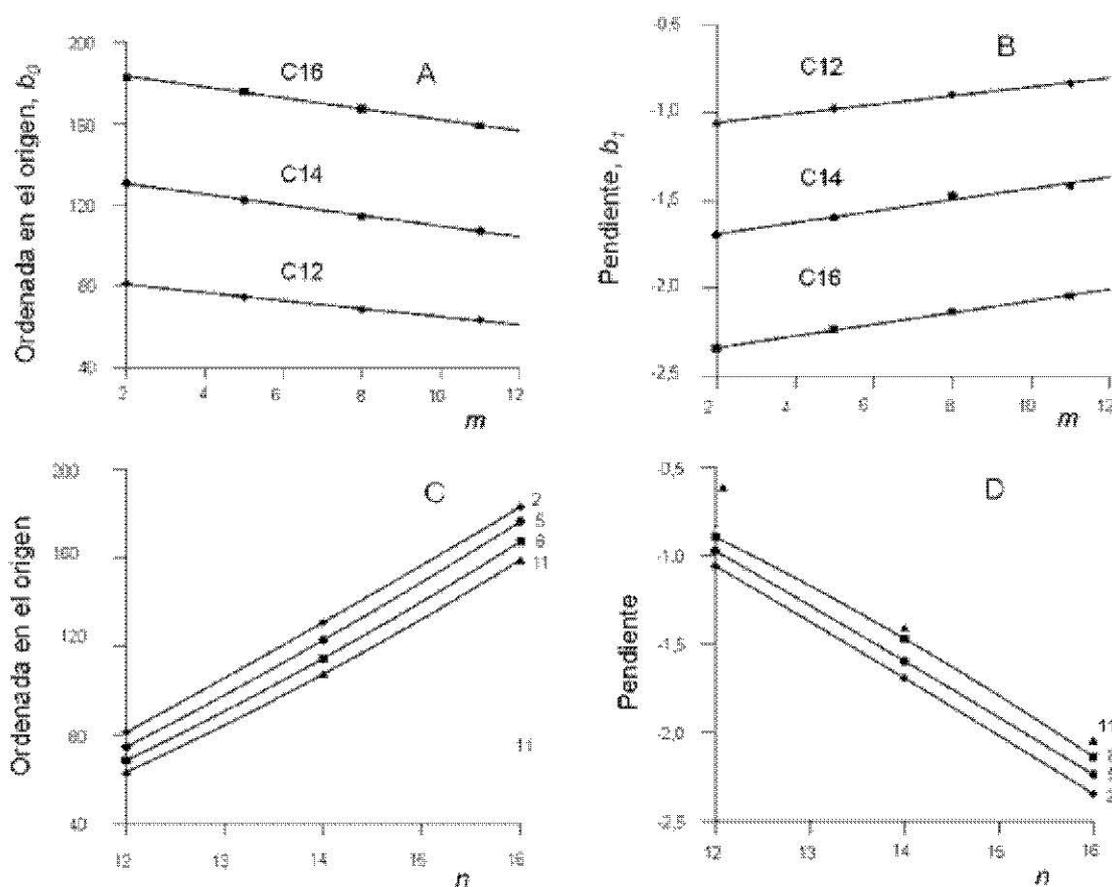
Utilizando elución con gradiente, se representó el  $t_R$  de cada oligómero frente a la variable  $\varphi_m$ , definida como concentración media de ACN utilizada para eluir un determinado oligómero, o también, como fuerza eluyente media experimentada por cada oligómero durante su elución, ya sea en condiciones isocráticas o de gradiente. Se observó una relación lineal entre ambos parámetros,  $t_R$  y  $\varphi_m$  (Fig. V.3). Sobre esta figura se representan los puntos experimentales, que corresponden a cromatogramas obtenidos en condiciones isocráticas ( $a$  y  $a'$ ) y con gradientes lineales de 60, 45, 30 y 15 min ( $b$ ,  $b'$ ,  $b''$  y  $b'''$ , respectivamente). Como se discute más adelante, este diagrama resulta muy útil para diseñar los gradientes de elución y obtener cromatogramas con unas determinadas características.



**Fig. V.3.** Representación del  $t_R$  de los oligómeros  $m = 2, 5, 8$  y  $11$  de las series  $n = 12, 14$  y  $16$  frente a  $\varphi_m$ . Las separaciones obtenidas mediante elución isocrática se indican con  $a$  y  $a'$ , y las obtenidas con gradiente lineal de 50 a 95% de ACN en 60, 45, 30 y 15 min, se indican con  $b, b', b''$  y  $b'''$ , respectivamente.

Mediante regresión lineal se obtuvieron las correspondientes rectas de ajuste  $t_R = f(\varphi_m)$  para cada oligómero. Se observó que las ordenadas en origen y pendientes de dichas rectas,  $b_0$  y  $b_1$ , presentaban también una relación lineal respecto al número de unidades de EO de los oligómeros,  $m$  (Fig. V.4, partes A y B, respectivamente). Por otra parte, se observó una relación cuadrática de baja curvatura entre  $b_0$  y el número de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada,  $n$ , así como también entre las pendientes  $b_1$  y  $n$  (Fig. V.4, partes

C y D). En estas relaciones entre  $b_0$  y  $n$ , y entre  $b_1$  y  $n$ , el coeficiente del término de segundo grado fue muy pequeño para  $m = 2$ , pero aumentó al crecer  $m$ . Por lo tanto, la curvatura de las funciones  $b_0 = f(n)$  y  $b_1 = f(n)$  no fue despreciable, especialmente a valores altos de  $m$ . La distinta curvatura al crecer  $m$  indicó que un modelo para describir el comportamiento general de la retención debía incluir un término de interacción, tal como  $nm$ .



**Fig. V.4.** Parte A: Ordenada en origen de las rectas  $t_R = f(\varphi_m)$  frente a  $m$  (ver Fig. V.3). Parte B: Pendiente de las mismas rectas frente a  $m$ . Partes C y D: mismas representaciones que en A y B para las relaciones entre la ordenada en el origen y  $n$  (C), y entre la pendiente y  $n$  (D). Puntos unidos mediante modelos de ajuste lineales en A y B, y cuadráticos en C y D.

Probablemente, las relaciones lineales entre  $b_0$  y  $m$ , y entre  $b_1$  y  $m$ , reflejan la escasa o nula interacción entre la cadena de óxido de etileno y la fase estacionaria hidrofóbica, C8. Con excepción de los oligómeros  $C_nE_0$  y  $C_nE_1$ , un aumento en  $m$  implica un aumento lineal de la interacción del derivado del oligómero con la fase móvil, sin que se vea afectada su interacción con la fase estacionaria. Por el contrario, un aumento en  $n$  implica un aumento no lineal de la retención, debido a ambos, una reducción de la afinidad del oligómero por la fase móvil, y a un aumento probablemente no lineal de la interacción de la cadena hidrocarbonada con la fase estacionaria hidrofóbica.

### *V.3. Construcción y validación de un modelo de retención*

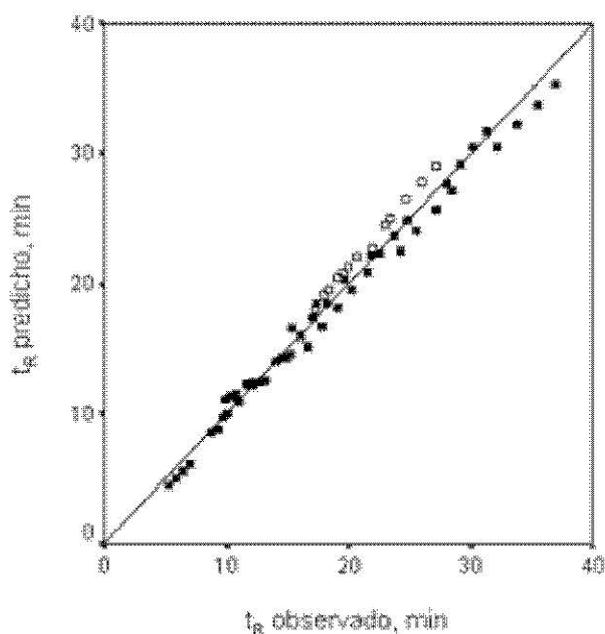
La relación lineal con  $m$ , y la relación cuadrática con  $n$ , pueden ser útiles para predecir los tiempos de retención de los oligómeros en distintas condiciones de elución. Para estudiar esta posibilidad, se construyeron diversos modelos utilizando todas las posibles combinaciones de las variables independientes  $\varphi_m$ ,  $m$  y  $n$  hasta el tercer grado, siendo  $t_R$  la variable dependiente. Los modelos se construyeron mediante regresión lineal múltiple, utilizando los datos obtenidos con Dehydol LT-7 y Lutensol XP-99 en diversas condiciones de elución, tanto isocráticas como con gradiente (cromatogramas  $a$ ,  $a'$ ,  $b - b''$ ). Para establecer el mejor modelo, se utilizó el algoritmo de selección de variables basado en pasos hacia adelante-atrás o algoritmo de pasos sucesivos (SPSS v. 11.5). El proceso de selección de variables condujo al siguiente modelo de regresión:

$$t_R = 2,496 \varphi_m + 4,913 n - 0,110 n m + 0,007 n^2 \varphi_m - 120,757 \quad \text{Ec. V.1}$$

La aplicación del modelo a la predicción de la retención de los oligómeros de Dehydol LT7 y de Lutensol XP-99 para el conjunto de cromatogramas  $a$ ,  $a'$  y  $b - b''$  indicados en la Fig. V.3 dió lugar a un error medio de  $\pm 0,7$  min, siendo el

tiempo cromatográfico total de unos 40 min (hasta C16E2). En la Fig. V.5 se comparan los valores predichos para Dehydol LT-7 y Lutensol XP-99 con los valores observados experimentalmente (cuadrados llenos).

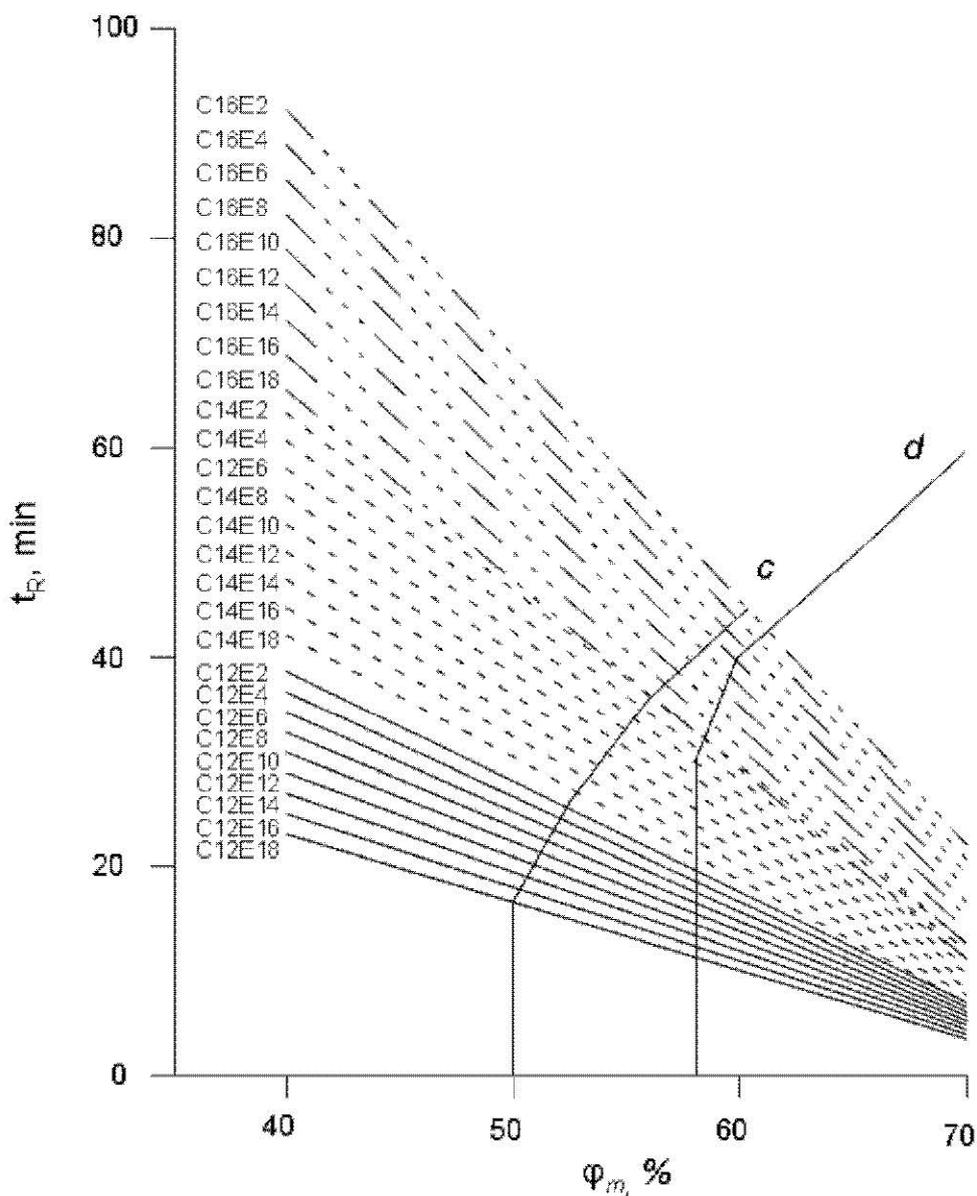
Para validar el modelo, se derivatizó una muestra del surfactante industrial Lutensol A07. Los cromatogramas se obtuvieron mediante elución con el gradiente  $b''$  descrito en la Fig. V.3 y Tabla V.1 (de 50 a 95% de ACN en 30 min). En la Fig. V.5 se representan los valores del  $t_R$  predichos por el modelo para estos oligómeros frente a los valores observados experimentalmente (cuadrados vacíos). Para estos oligómeros, no utilizados en la construcción del modelo (series  $n = 13$  y  $15$ ), la aplicación del mismo dió lugar a un error medio de predicción de  $\pm 1,1$  min, para un tiempo cromatográfico total de unos 30 min (hasta C15E2).



**Fig. V.5.** Tiempos de retención predichos frente a observados. Oligómeros de las series C12Em, C14Em y C16Em de Dehydol LT-7 y de Lutensol XP-99 (■), y de las series C13Em y C15Em de Lutensol A07 (□).

#### *V.4. Aplicación del modelo al diseño de gradientes de elución*

El modelo se utilizó para construir la Fig. V.6, útil para predecir la retención de los oligómeros ya sea con elución isocrática como con gradiente, pudiendo tratarse de gradientes lineales o no lineales. El objetivo fue diseñar gradientes de elución con determinadas características. Así por ejemplo, la línea *c* de la Fig. V.6 corresponde a un gradiente segmentado para el que se obtendría un mismo espaciado entre oligómeros consecutivos de las series  $n = 12, 14$  y  $16$ , esto es, la resolución sería constante dentro de cada una de estas tres series, siendo también la misma para oligómeros consecutivos de las distintas series. Por lo tanto, el trazo *c* daría lugar a una resolución constante entre todos los pares de oligómeros sucesivos para un tiempo total de análisis de 45 min (hasta C16E2). Un gradiente segmentado que se aproxima al trazo *c*, se indica en la Tabla V.1.



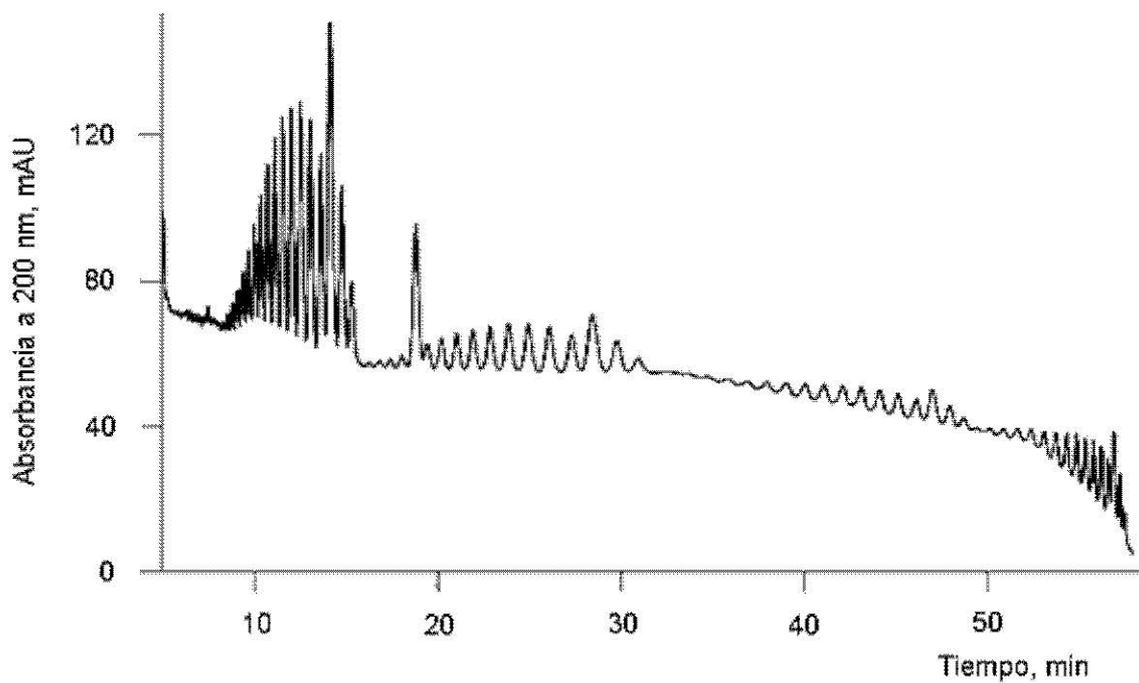
**Fig. V.6.** Valores de  $t_R$  frente a  $\phi_m$  para oligómeros de las series  $n = 12, 14$  y  $16$ , predichos con la Ec.V.1; los trazos  $c$  y  $d$  corresponden a gradientes diseñados para obtener una resolución constante entre oligómeros consecutivos de las series  $n = 12$  a  $16$  ( $c$ ), y para exaltar la resolución de las series  $n = 14$  y  $16$  ( $d$ ).

Por su parte, el trazo  $d$  se diseñó para obtener una máxima resolución entre los oligómeros de las series  $n = 14$  y  $16$ , a costa de reducir la resolución interna de las series  $n = 12$  y  $18$ , y manteniendo un tiempo cromatográfico máximo de  $60$  min hasta C18E2, (ver Fig. V.4 y V.6).

**Tabla V.1.** Gradientes segmentados correspondientes a los trazos *c* y *d* de la Fig. V.6.

<i>Gradiente segmentado</i>	<i>Tiempo acumulado, min</i>	<i>%ACN inicial</i>	<i>%ACN final</i>
<i>c</i>	17	50	50
	26	50	64
	36	64	74
<i>d</i>	30	58	58
	50	58	72
	60	72	100

En la Fig. V.7 se muestra el cromatograma experimental obtenido utilizando el gradiente *d*.



**Fig. V.7.** Cromatograma obtenido con una muestra industrial (Dehydol LT7) previa derivatización con anhídrido maleico. Elución mediante el gradiente *d* descrito en la Fig.V.6 y Tabla V.1.

Los tiempos predichos y los experimentales coincidieron muy satisfactoriamente. La aplicación del gradiente  $d$  permitió obtener una separación con una resolución hasta el oligómero  $m = 18$  entre las series  $n = 14$  y  $16$ , tal como predice el modelo. Por lo tanto, es posible utilizar el modelo descrito para diseñar gradientes de elución que permitan obtener una mayor resolución para un determinado grupo de oligómeros, así como para distribuir los picos de forma equitativa a lo largo del cromatograma para todas las series de interés.

---

**Capítulo VI**  
**Determinación de FAEs**  
**mediante derivatización**  
**con anhídrido ftálico**

---

## Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatization with phthalic anhydride followed by liquid chromatography with UV-Vis detection

### Abstract

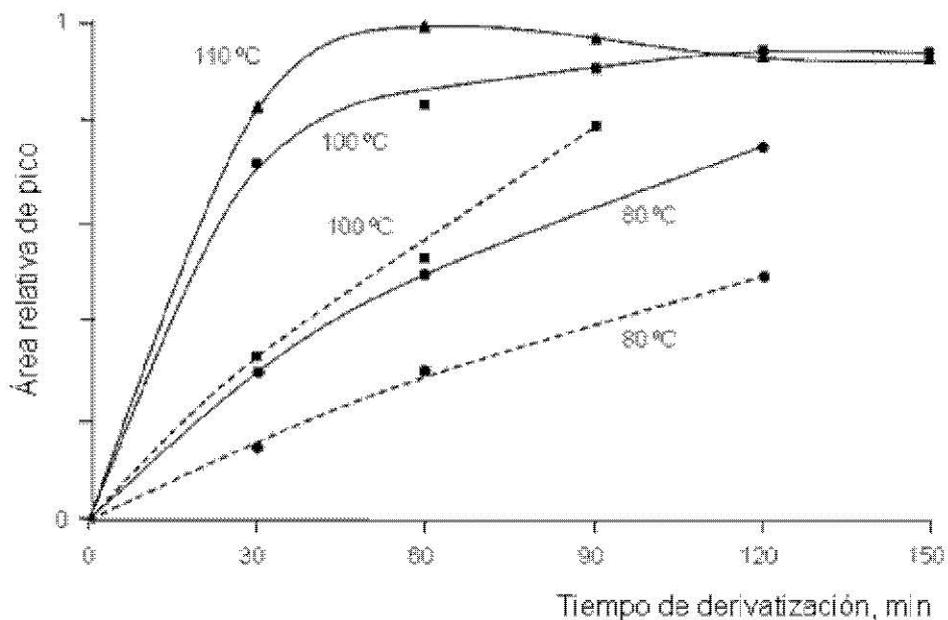
The esterification of FAEs with phthalic anhydride in 1,4-dioxane was studied. At 110 °C and in the presence of urea which increased the reaction rate, esterification was completed in 60 min. The reaction yield did not decrease when the sample contained up to 50% water. The UV-Vis response factors of the derivatives decreased to ca. 0.40 and 0.65 for the  $n = 8$  and 18 series, respectively, when the number of ethylene oxide units,  $m$ , increased from  $m = 0$  up to  $m = 3$ . Using a C8 column and gradient elution with ACN/ water plus 0.1% acetic acid, FAEs in industrial mixtures and cleaning products were characterized. At column temperatures of 25 and 35 °C, homologous series with even values of  $n$  from 8 up to 20, were resolved up to  $m = 14$  and 18, respectively, and at 25 °C, series with consecutive even and odd values of  $n$  were resolved up to  $m = 7$ . Within the series, superior resolution of the oligomers with large values of  $m$  was achieved; however, the elution order was reversed for the  $m = 1$  and 0 oligomers, which produced overlapping of a few peaks within the series. A simple procedure for the accurate prediction of the concentrations of all the oligomers in industrial samples was described. After preconcentration with C18 solid-phase extraction cartridges, FAEs were also characterized and quantified in environmental samples (river and sea water). The LODs were of ca. 2  $\mu\text{M}$  ( $S/N = 3$ ) in the injected solutions (100 times smaller in the samples).

## VI. Determinación de FAEs mediante derivatización con anhídrido ftálico

### *VI.1 Optimización del procedimiento de esterificación*

La cantidad de anhídrido que se empleó para la derivatización se calculó en exceso, de modo que se pudieran derivatizar muestras que contuviesen grandes cantidades de agua (con 1,5 g de anhídrido ftálico se pueden derivatizar hasta 182 mg de agua). La optimización del procedimiento de derivatización se llevo a cabo tomando alícuotas de 2 mL de una disolución de Dehydol LT-7 en 1,4-dioxano. Se seleccionó este disolvente por su miscibilidad con agua y alcoholes en cualquier proporción, por no presentar reactividad frente a anhídridos, por su carácter como aceptor débil de protones y por su alto punto de ebullición, 101 °C, el cual aumentó hasta 120 °C en presencia del anhídrido disuelto. Por otra parte, si se añade una cantidad excesiva de urea a la mezcla de reacción, se puede llegar a impedir la mezcla adecuada de los reactivos. Utilizando un volumen final de 4 mL de 1,4-dioxano, se pudieron añadir hasta 0,5 g de urea molida sin que el tubo de reacción resultase obstruido.

A continuación se estudió la influencia de la temperatura en la velocidad y el rendimiento de la reacción, tanto en ausencia como en presencia de urea. En la Fig. VI.1 se representa la suma de las áreas de los picos de los derivados de los oligómeros de Dehydol LT-7 frente al tiempo de reacción. La velocidad de reacción se incrementó notablemente con el aumento de la temperatura, así como con la adición de urea. A 110 °C se alcanzó un rendimiento constante en un tiempo de reacción de 60 min.



**Fig. VI.1.** Influencia de la temperatura en la velocidad de derivatización de Dehydrol LT-7. Se representa la suma de las áreas de los picos de los derivados de todos los oligómeros frente al tiempo de derivatización. Cada punto representa una derivatización independiente llevada a cabo a la temperatura indicada en las curvas. Las líneas de trazos y continuas conectan los puntos obtenidos en ausencia y presencia de urea, respectivamente.

Se obtuvieron curvas parecidas a la mostrada en la Fig. VI.1 para C9E0, C12E0 y C12E6 a 110 °C. Se deduce que la velocidad de reacción es similar tanto para los oligómeros etoxilados como para los no etoxilados; sin embargo, las áreas de los picos obtenidas para la derivatización de 0,1 mmol de C12E6 (45 mg) resultaron ser aproximadamente la mitad que las áreas obtenidas para la misma cantidad de C9E0 y C12E0. La menor sensibilidad para C12E6 se atribuyó a factores de respuesta menores de los alcoholes etoxilados en comparación con los no etoxilados (apartado VI.3), lo que se confirmó en experimentos posteriores.

### *VI.2. Tolerancia al agua*

Se derivatizaron mezclas que contenían 0,03 mmol de cada uno de los siguientes oligómeros: C9E0, C12E0, C12E2 y C12E6 (en total, unos 20 mg). Las derivatizaciones se realizaron en presencia de cantidades de agua crecientes, hasta 7,8 mmol (140 mg). Después de la reacción, se aforó a 10 mL y se inyectaron alícuotas. Los rendimientos de la reacción fueron los mismos, tanto en presencia como en ausencia de 20 mg de agua (50% en peso de la mezcla inicial), decreciendo regularmente al aumentar más la cantidad de agua. Así, con 40 y 140 mg de agua (67 y 87% en peso en la mezcla), los rendimientos obtenidos fueron del 80 y 50% respecto a los alcanzados sin agua, respectivamente. Por lo tanto, el procedimiento propuesto permite procesar muestras que contengan pequeñas cantidades de agua (hasta el 50% de su peso) sin riesgo de obtener bajos rendimientos de derivatización.

### *VI.3. Factores de respuesta UV-Vis de los derivados y reproducibilidad*

Para establecer los factores de respuesta UV-Vis,  $f$ , de los hemiésteres de los oligómeros individuales, se derivatizaron diversas mezclas de estándares. Para evitar el solapamiento de picos, se prepararon tres mezclas, dos de las cuales contenían los oligómeros con valores pares e impares de  $m$ , respectivamente, excepto los oligómeros con  $m = 0$  y 1. Por su parte, la tercera mezcla contenía estos últimos oligómeros. Para estudiar la precisión del procedimiento sin y con la corrección del estándar interno, se añadió C9E0 a todas las mezclas. La pendiente de la recta de calibrado de C12E0 se usó como referencia ( $f = 1$ ). La reproducibilidad de las pendientes de las rectas de calibrado, sin y con la corrección del estándar interno, fue de 15 y 5%, respectivamente (como desviaciones estándar relativas).

**Tabla VI.1.** Valores promediados e interpolados de los factores de respuesta UV-Vis,  $f$ .<sup>a</sup>

$n$	$m$			
	1	2	3	$\geq 4$
8	0,54	0,45	0,40	0,39
10	0,54	0,45	0,41	0,40
12	0,55	0,46	0,42	0,42
14	0,56	0,52	0,52	0,52
16	0,58	0,57	0,60	0,61
18	0,59	0,62	0,65	0,66

<sup>a</sup>  $f = 1,00$  para  $m = 0$  para todos los valores de  $n$

Los  $f$  obtenidos después de aplicar la corrección de patrón interno se usaron para construir la Tabla VI.1, donde se dan tanto valores promediados como interpolados, estos últimos para el caso de los estándares de los que no se dispone. Como se observa en la tabla, los  $f$  disminuyeron al aumentar  $m$ , alcanzando valores bastante constantes cuando  $m \geq 3$ . Por otra parte, los  $f$  no fueron significativamente distintos unos de otros cuando  $m = 0$ , pero aumentaron ligeramente con  $n$  cuando  $m \geq 1$ . Las diferencias entre valores de  $f$  resultaron ser lo suficientemente grandes como para que deban ser tenidas en cuenta en los calibrados, especialmente para evitar la subestimación de los alcoholes etoxilados cuando el calibrado se realiza con un alcohol no etoxilado como patrón.

#### *VI.4. Separación de los oligómeros e influencia de la temperatura de la columna*

Los cromatogramas correspondientes a Dehydol LT-7, obtenidos con un gradiente lineal de 50 a 95% de ACN a diversas temperaturas de columna, se muestran en la Fig. VI.2. Las series de homólogos consecutivas eluyen siguiendo un orden creciente de valores de  $n$ , desde 8 (trazas) hasta 18. Entre 45 y 15 °C se consiguió resolución hasta la línea base entre los picos de oligómeros sucesivos dentro de las series. La resolución entre oligómeros mejoró a temperaturas decrecientes, lo que se debe atribuir no sólo a una mayor retención, sino también a la creciente polaridad de la cadena de EO [51-53]. Sin embargo, a temperaturas decrecientes, y por el mismo motivo, se observó una expansión de las series homólogas a lo largo del dominio del tiempo, con un solapamiento progresivo entre series consecutivas. Así por ejemplo, a 35 y 25 °C, las series consecutivas con valores pares de  $n$  se resolvieron hasta  $m = 18$  y 14, respectivamente.

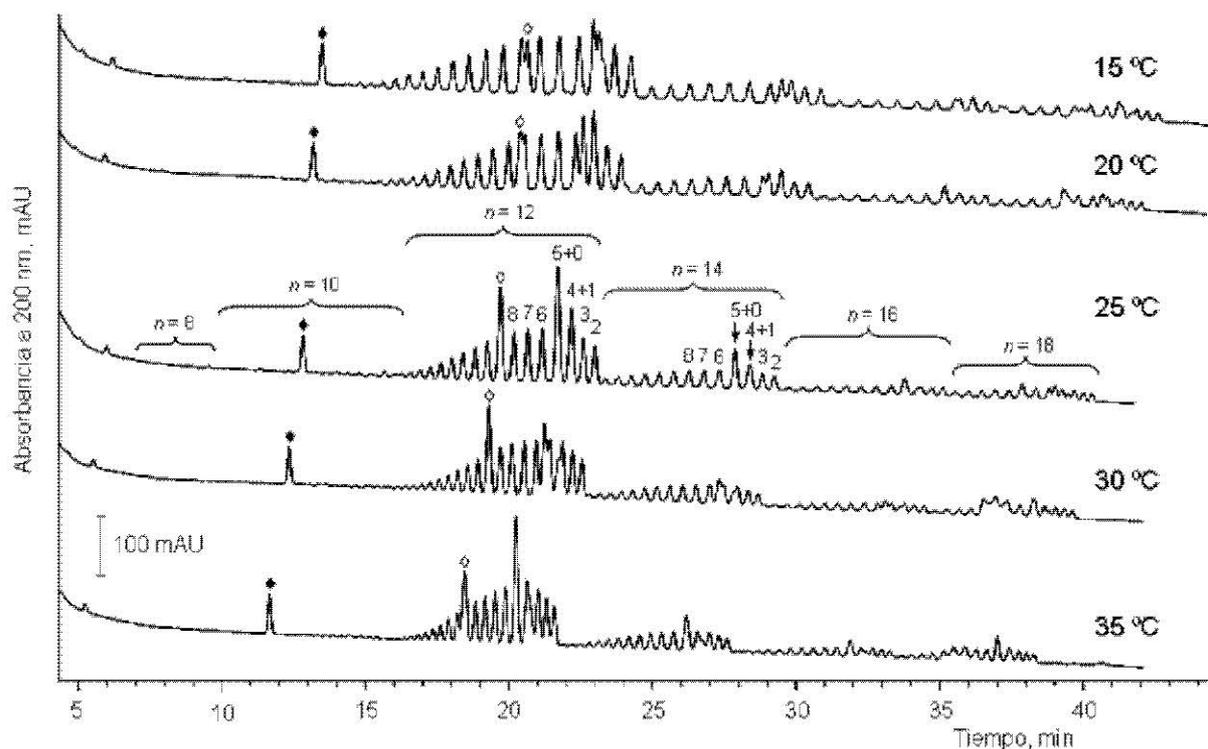
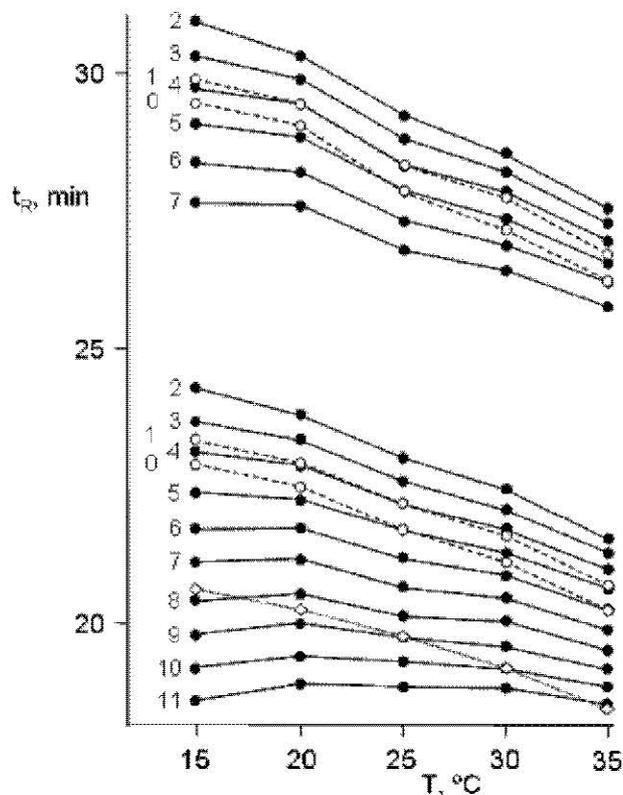


Fig. VI.2. Cromatogramas obtenidos mediante esterificación de 40 mg de Dehydol LT-7 en presencia de 0,18 mg de C9E0 (como estándar interno), seguida de dilución con 2:1 MeOH/ NH<sub>3</sub> 0,1 M hasta 10 mL. La temperatura de la columna se indica junto a los trazos. Se eluyó con un gradiente lineal del 50 al 95 % de ACN en 45 min. Sobre cada cromatograma se indican el pico del estándar interno (◈) y un pico presente en el blanco de los reactivos (◊). En el cromatograma a 25 °C también se indica la expansión de las series consecutivas, desde  $m = 2$  hasta 14, así como los valores de  $m$  de algunos oligómeros representativos de las series  $n = 12$  y 14.

A valores grandes de  $m$ , los oligómeros eluyeron siguiendo el orden decreciente de  $m$ , lo que coincidió con el orden esperado de hidrofobicidad creciente; sin embargo, el orden de elución se invirtió para los homólogos con  $m = 0$  y 1. Como consecuencia, los picos de los homólogos con  $m = 0$  y 1 se solaparon con los de otros homólogos dentro de sus respectivas series. Este orden de elución fue confirmado mediante detección por MS (EIEs a los valores de  $m/z$

de los iones  $[M-H]^-$  de los oligómeros). La inversión en el orden de elución y el consiguiente solapamiento de picos se perciben mejor en la Fig. VI.3.



**Fig. VI.3.** Variación del  $t_R$  con la temperatura de columna, para los derivados de las series C12Em y C14Em (hasta  $m = 7$  y 11, respectivamente). Los valores de  $m$  se indican a la izquierda de los trazos. Las líneas de trazos y los círculos vacíos indican los derivados con  $m = 1$  y 0. También se muestra la posición del pico del blanco de reactivos ( $\diamond$ ). Otros detalles como en la Fig. VI.2.

En esta figura se muestra que, para la serie C12Em a unos 25 °C, los picos de los homólogos con  $m = 0$  y 1 se solaparon con los picos de los homólogos con  $m = 4$  y 5, respectivamente. También se observa un comportamiento similar para la serie C14Em. En el Capítulo IV, se informó acerca de una inversión similar en el orden de elución de los hemiésteres del anhídrido maleico cuando  $m = 0$  y 1.

Dicha inversión se atribuyó a la baja hidrofobicidad de los derivados cuando  $m \leq 1$ . En estos derivados, el grupo polar hemiéster no se encuentra protegido por enlaces intramoleculares con los grupos éter de la cadena de EO, como ocurre cuando  $m \geq 2$ , lo que reduce su hidrofobicidad, y por consiguiente también se reduce su retención. Las Figs. VI.2 y VI.3 muestran también un pico del blanco de reactivos, que se solapa con los picos de uno o dos oligómeros de la serie C12Em a valores altos de  $m$ .

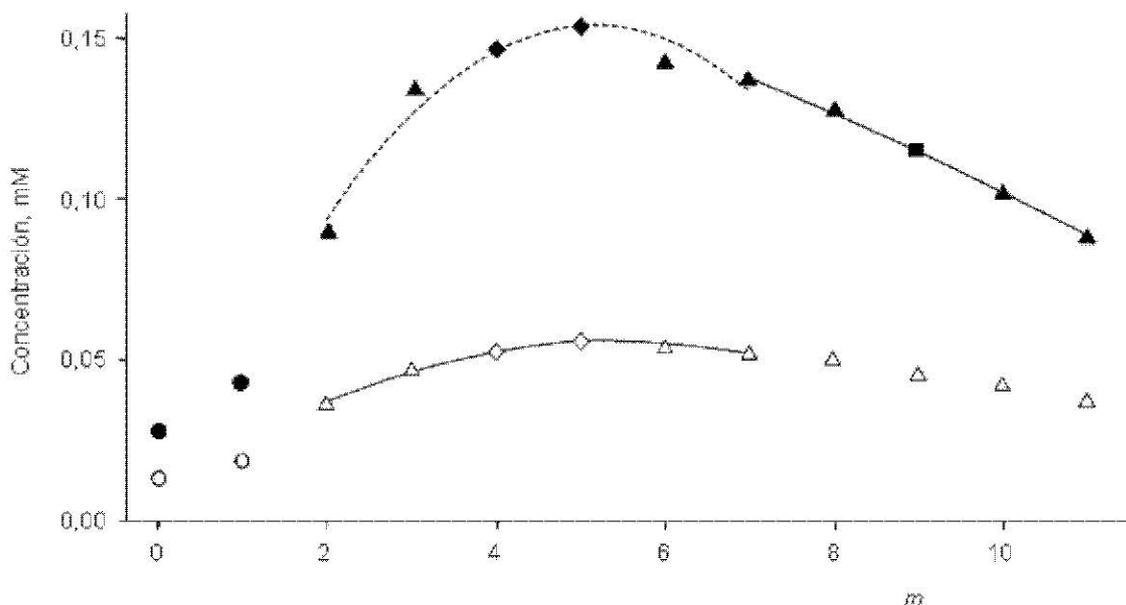
#### *VI.5. Estudios de cuantificación y aplicación a muestras industriales*

Las curvas de calibrado preparadas usando tanto Dehydol LT-7 (sumas de las áreas de todos los picos), como mezclas de estándares de C9E0, C12E0 y C12E6, mostraron una linealidad satisfactoria ( $n = 6$ ,  $r \geq 0,99$ ). Los LODs se estimaron como la concentración de analito correspondiente a una relación señal-ruido de 3, medida en unidades de absorbancia (altura de pico). A 200 nm, y tanto para alcoholes etoxilados como no etoxilados con  $m \geq 3$ , los LODs fueron 4 y 2  $\mu\text{M}$ , respectivamente. La sensibilidad disminuyó en un factor de hasta 4 veces a 230 nm, pero el ruido de fondo también se redujo en un factor de unas 5 veces. Consecuentemente, los LODs mejoraron ligeramente cuando la detección se llevó a cabo a 230 nm.

La inversión en el orden de elución para los oligómeros con  $m = 0$  y 1 impidió su cuantificación directa, así como también la cuantificación de otros oligómeros dentro de su serie homóloga. En el Capítulo IV de esta memoria, se desarrolló un procedimiento basado en la aplicación de técnicas de deconvolución multivariante, capaz de establecer las concentraciones de todos los oligómeros en FAEs industriales. A continuación, se describe una solución

alternativa más sencilla, que también conduce a predicciones exactas de las concentraciones exactas de todos los oligómeros.

A temperaturas de columna cercanas a 25 °C, y para las series  $n = 12$  y 14, los picos de los oligómeros con  $m = 0$  y 1 se solapan totalmente con los picos de los oligómeros con  $m = 5$  y 4, respectivamente (Figs. VI.2 y VI.3), De modo similar, el pico del blanco de reactivo se solapa totalmente con el pico de C12E9. A esta temperatura, las áreas de los picos de los oligómeros que preceden y siguen inmediatamente a los picos solapados pueden medirse directamente sin error sistemático. Por lo tanto, a partir de las áreas de los picos vecinos, es posible establecer con exactitud, por interpolación, las áreas que deberían corresponder a los picos de los oligómeros situados en medio. Como se muestra en la Fig. VI.4 para las series  $n = 12$  y 14 del Dehydol LT-7, las áreas de los picos corregidas (divididas por los factores de respuesta) de varios oligómeros no solapados obtenidos a 25 °C se transformaron primero en concentraciones molares (haciendo uso del calibrado con C9E0), y luego se representaron frente a  $m$ . Como se observa en esta representación, la distribución regular de las concentraciones de los oligómeros sucesivos hace posible predecir con exactitud satisfactoria las áreas de los picos solapados. Así, usando los datos de la Fig. VI.4, las áreas corregidas de los picos  $m = 4$  y 5 de las series con  $n = 12$  y 14 se obtuvieron mediante ajuste cuadrático de las áreas corregidas de los picos adyacentes con  $m = 2, 3, 6$  y 7, seguidas de interpolación sobre la curva ajustada.



**Fig. VI.4.** Concentraciones de los oligómeros para las series con  $n = 12$  y  $14$  de Dehydrol LT-7 representados frente a  $m$  (símbolos llenos y vacíos, respectivamente). Las concentraciones fueron calculadas dividiendo las áreas de pico corregidas (divididas por los factores de respuesta) por la pendiente de la curva de calibrado de C9E0. Las áreas corregidas de los picos con  $m = 4$  y  $5$  (◆,◇), y la de C12E9 (■) fueron obtenidas mediante interpolación cuadrática (se representan las tres curvas ajustadas). Las áreas corregidas de los picos con  $m = 0$  y  $1$  (●,○), se obtuvieron mediante las ecuaciones VI.2 y VI.3. El cromatograma fue obtenido a  $25$  °C. Otros detalles como en la Fig. VI.2.

De modo similar, el área corregida para el pico del C12E9 de la serie  $n = 12$  se obtuvo mediante ajuste cuadrático de las áreas corregidas de los picos adyacentes con  $m = 7, 8, 10$  y  $11$ . La suma de las áreas de los picos para los oligómeros con  $m = 4$  y  $1, A_{4+1}$ , se puede expresar como sigue:

$$A_{4+1} = A_{C,4}f_4 + A_{C,1}f_1 \quad \text{Ec. VI.1}$$

siendo  $A_{C,4}$  y  $A_{C,1}$  las áreas corregidas de los picos de los oligómeros con  $m = 4$  y  $1$ , y siendo  $f_4$  y  $f_1$  sus respectivos factores de respuesta.

Así, el área corregida para el oligómero con  $m = 1$  viene dada por:

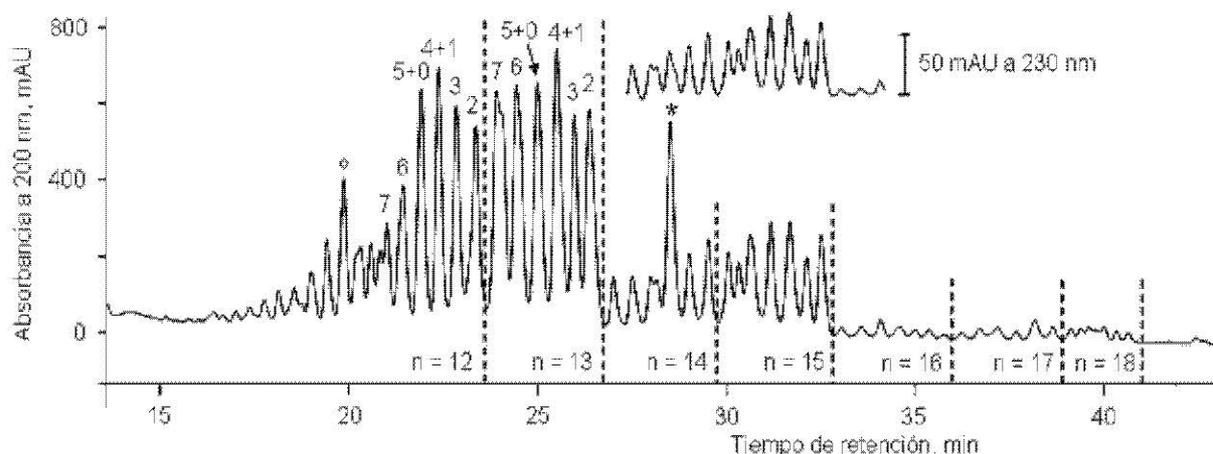
$$A_{C,1} = \left( \frac{1}{f_1} \right) (A_{4+1} - A_{C,4} f_4) \quad \text{Ec. VI.2}$$

De modo similar, teniendo en cuenta que  $f_0 = 1$ , resulta:

$$A_{C,0} = A_{5+0} - A_{C,5} f_5 \quad \text{Ec. VI.3}$$

donde  $A_{5+0}$  es la suma de las áreas de los picos de los oligómeros con  $m = 5$  y 0,  $A_{C,0}$  y  $A_{C,5}$  son las respectivas áreas corregidas, y  $f_5$  es el factor de respuesta del oligómero con  $m = 5$ . En la Fig. VI.4, se representan las áreas corregidas de los oligómeros con  $m = 0$  y 1 de las series  $n = 12$  y 14, calculadas con las Ecs. VI.2 y VI.3, convertidas a unidades de concentración de acuerdo con la curva de calibrado del C9E0. Este procedimiento de corrección e interpolación proporciona información no sesgada sobre la distribución de oligómeros dentro de las series hidrocarbonadas. El procedimiento también se aplicó a Lutensol A07, materia prima que contiene principalmente oligómeros de las series hidrocarbonadas  $n = 13$  y 15, con un valor medio de EO de 7. Se obtuvo una representación similar a la mostrada en la Fig. VI.4.

En la Fig. VI.5 se muestra el cromatograma de un limpiador líquido comercial para ropa blanca obtenido a 25 °C. Se observaron series hidrocarbonadas consecutivas, que incluían valores de  $n$  pares e impares, desde 10 hasta 18. La identificación de los picos se confirmó mediante HPLC-MS.



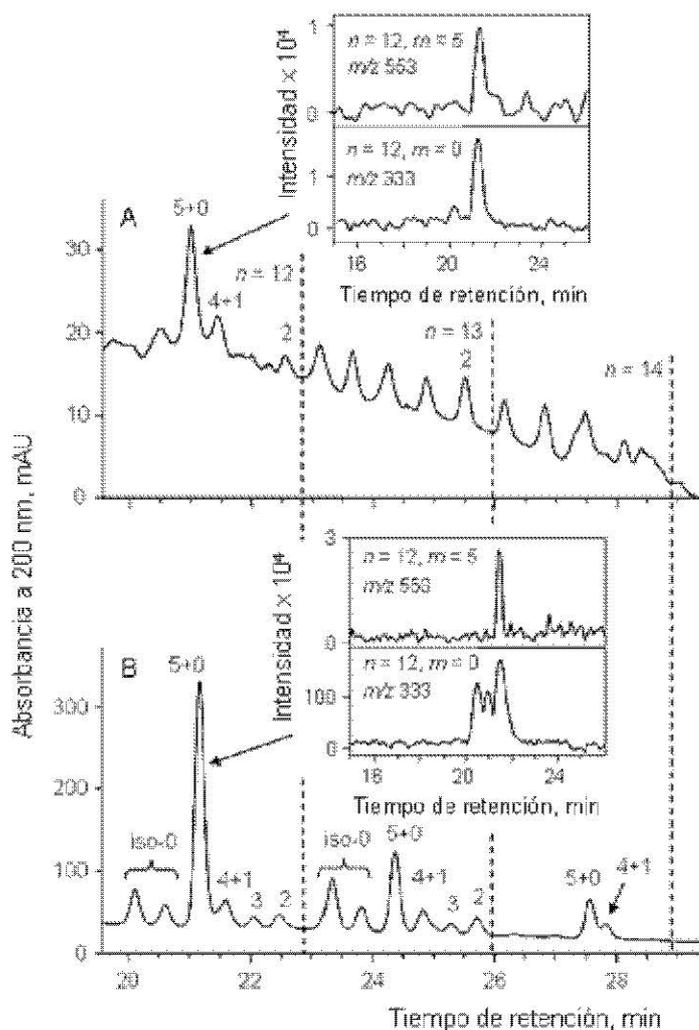
**Fig. VI.5.** Cromatograma obtenido a 25 °C mediante esterificación de 160 mg de limpiador líquido para lavadora, seguida de dilución con 2:1 MeOH/ $\text{NH}_3$  0,1 M hasta 10 mL. Las líneas de trazos indican el tiempo máximo de retención para las series consecutivas de homólogos. Para cada serie, se indican los valores de  $m$  de los oligómeros que se identificaron mediante HPLC-MS. También se indican el pico del blanco de reactivos (◇) y el del ácido oleico (\*). La muestra contiene fosfonatos ( $\leq 5\%$ ), surfactantes no iónicos y aniónicos (5 – 15 %), y otros componentes. Otros detalles como en la Fig. VI.2.

Usando detección UV-Vis se pudieron distinguir los oligómeros dentro de cada serie, hasta  $m = 7$ . Usando HPLC-MS, se observaron también picos con los mismos valores de  $m/z$  que los oligómeros lineales C12E0 y C13E0, pero con valores de  $t_R$  ligeramente menores. Estos picos se atribuyeron a oligómeros ramificados [3]. Apareció también en medio de la serie  $n = 14$ , un pico que se identificó como ácido oleico. Como se observa en el inserto del gráfico, la interferencia del ácido oleico se redujo en gran medida a 230 nm. La Fig. VI.5 fue obtenida con una muestra de matriz compleja, que también contenía una de las mezclas de FAEs más complejas que se pueden encontrar en productos industriales, incluyendo series de homólogos pares e impares, y un porcentaje significativo de oligómeros ramificados. Sin embargo, y a pesar de la

contaminación cruzada de los picos de cada serie hidrocarbonada con los de las series inmediatas anterior y posterior, este cromatograma muestra que, con el método propuesto, se puede obtener información útil acerca de la composición de los FAEs presentes en muestras industriales.

#### *VI.6. Aplicación a muestras ambientales*

Se tomaron muestras de agua de río y mar en un área rural y un área urbana respectivamente, y se extrajeron los alcoholes mediante extracción en fase sólida, tal como se indica en la sección IV.2.6. Como se muestra en la Fig. VI.6 A y B, se observó la presencia de oligómeros con valores pares e impares en las series hidrocarbonadas, tanto en la muestra de agua de río como en la de mar. En la misma figura, se indican los picos que fueron claramente identificados mediante HPLC-MS. Para estimar las concentraciones de los oligómeros, se usaron los procedimientos de corrección, interpolación (cuando se pudo aplicar) y calibración descritos anteriormente. Las concentraciones de los oligómeros fueron menores en la muestra de agua de río; se estimaron  $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$  del oligómero C12E3 en el agua de río, frente a  $13 \mu\text{g L}^{-1}$  en el agua de mar. La muestra de agua de río que fue tomada corriente abajo, después de las áreas urbana e industrial, exhibió un perfil similar al mostrado en la Fig. VI.6 A, aunque con contenidos de las series de  $n = 13$  y  $14$  ligeramente mayores.



**Fig. VI.6.** Cromatogramas de muestras de agua de río (A) y mar (B). Las muestras de 1 L se trataron mediante extracción en fase sólida, y el residuo se derivatizó, llevándolo a 10 mL con 2:1 MeOH/  $\text{NH}_3$  0,1 M acuoso antes de la inyección. Los isómeros ramificados de  $C_nE_0$  se indican como iso-0. En los insertos se muestran los EIEs a los valores de  $m/z$  de los oligómeros con  $m = 0$  y 5 de las series de  $n = 12$ . Otros detalles como en la Fig. VI.5.

En la muestra de agua de mar (Fig. VI.6 B), y de acuerdo con los cromatogramas obtenidos con HPLC-MS (ver el inserto de la Fig. VI.6 B), los dos picos inmediatamente situados a tiempos de retención ligeramente menores que los picos de  $C_nE_0$ , se atribuyeron a los correspondientes oligómeros ramificados. Suponiendo que los oligómeros con  $m = 4$  y 5 tengan la misma

concentración que el oligómero con  $m = 3$  de la misma serie, la concentración total de FAEs lineales (no ramificados) en la muestra de agua de mar se estimó en 120 y 67  $\mu\text{g L}^{-1}$  para las series  $n = 12$  y 13, respectivamente.

Este estudio dió lugar al artículo titulado *Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatization with phthalic anhydride followed by liquid chromatography with UV-vis detection*, publicado en *Journal of Chromatography A*, 1203 (2008) 47-53.

---

**Capítulo VII**

**Determinación de FAEs**

**mediante derivatización**

**con anhídrido difénico**

---

## **Determination of FAEs with diphenic anhydride derivatization and liquid chromatography with spectrophotometric detection. A comparative study with other anhydrides**

### **Abstract**

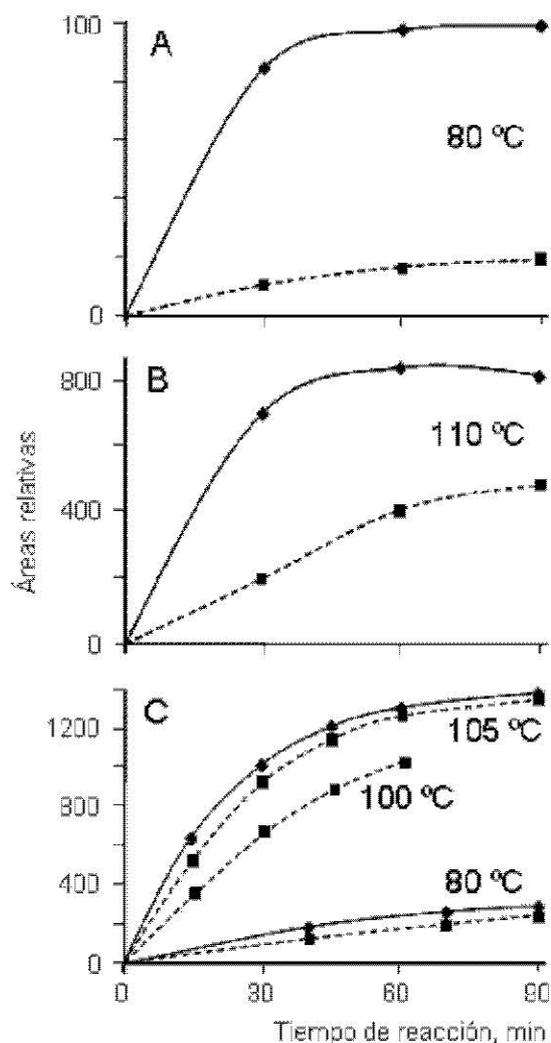
The derivatization of FAEs with maleic, phthalic and diphenic anhydrides, followed by RP-HPLC separation with UV-Vis detection of the derivatized oligomers, was comparatively studied. Gradient elution on a C8 column was performed with ACN/ water in the presence of 0.1% acetic acid. Advantages from both the chromatographic and UV-Vis detection viewpoints were found for diphenic anhydride. Thus, sensitivity at 200 and 220 nm was significantly better for the FAE diphenates. Accordingly, the LODs at both wavelengths were also lower for the diphenates than for maleates and phthalates. The response factors of the diphenates decreased less than those of the phthalates when the number of EO units,  $m$ , increased, reaching a constant value of ca. 0.62 when  $m > 3$ . Peak symmetries and efficiencies were also better than those found for the other anhydrides. The optimized procedure was applied to the characterization and determination of FAEs in the effluent of a wastewater treatment plant and in sea water. Peak identification was confirmed by using MS detection.

## VII. Determinación de FAEs mediante derivatización con anhídrido difénico

### *VII.1. Velocidades y temperaturas de esterificación*

Se estudió la derivatización de los FAEs con diferentes anhídridos (maleico, ftálico, difénico, 3-nitroftálico y 1,8-naftálico), para lo cual se empleó Dehydol LT-7. Las estructuras moleculares de estos anhídridos se indicaron en el Capítulo I (pág. 19). Las reacciones de derivatización se realizaron como se indica en la parte experimental (Capítulo III); sin embargo, en el caso del anhídrido difénico, la cantidad requerida era demasiado grande (2,24 g), lo que encarecía el procedimiento y dificultaba la disolución de la mezcla de reacción. Por esta razón, se optó por reducir todas las cantidades, en especial la del anhídrido, y proceder a la derivatización a menor escala. Para ello, se introdujeron en los tubos de derivatización 20 mg de los FAEs, 3,3 mmoles de anhídrido difénico, que corresponden aproximadamente a 0,75 g, y 0,25 g de urea. La mezcla de reacción se aforó a 2 mL con más dioxano, llevándose a un volumen final de 10 mL con MeOH/ NH<sub>3</sub> 0,1 M después de la derivatización. Todos los anhídridos dieron lugar a disoluciones claras sin ningún residuo sólido remanente, excepto para el caso del anhídrido 1,8-naftálico, que produjo un residuo sólido de aspecto pastoso. Este residuo no se pudo disolver en ninguna mezcla de disolventes. Tampoco se disolvió añadiendo ácido o base fuerte a los distintos medios ensayados. Por esta razón, se descartó el uso de este anhídrido en estudios posteriores. Como se comenta más adelante, el uso de anhídrido 3-nitroftálico tampoco produjo resultados satisfactorios.

Se estudió la velocidad de la reacción de derivatización de Dehydol LT-7 con anhídrido difénico a diferentes temperaturas, tanto en ausencia como en presencia de urea.



**Fig. VII.1.** Progreso de la derivatización de Dehydol LT-7 (suma de las áreas de los oligómeros con  $n = 12 - 18$ ) con los anhídridos maleico (A), ftálico (B) y difénico (C), a las temperaturas de reacción indicadas en las curvas. En C se muestran también datos obtenidos a 80 y 100 °C. Cada punto representa una derivatización independiente desarrollada a las temperaturas indicadas en las curvas. Las líneas de trazos y las continuas conectan puntos obtenidos en ausencia y presencia de urea, respectivamente.

En el diagrama de la Fig. VII.1 C se representa la suma de las áreas de los picos de los difenatos frente al tiempo de reacción. En este diagrama, cada punto representa una derivatización independiente. En la misma figura, las velocidades de reacción con anhídrido difénico se comparan con las obtenidas con los

anhídridos maleico y ftálico, a las respectivas temperaturas de trabajo óptimas (Fig. VII.1 A y 1 B, respectivamente). Sin embargo, a diferencia del estudio realizado en los capítulos IV y VI, y con fines comparativos, en esta figura se representa la suma de las áreas de los picos de todos los oligómeros de Dehydol LT-7 frente a  $t_R$ , en lugar de utilizar estándares de algunos oligómeros concretos.

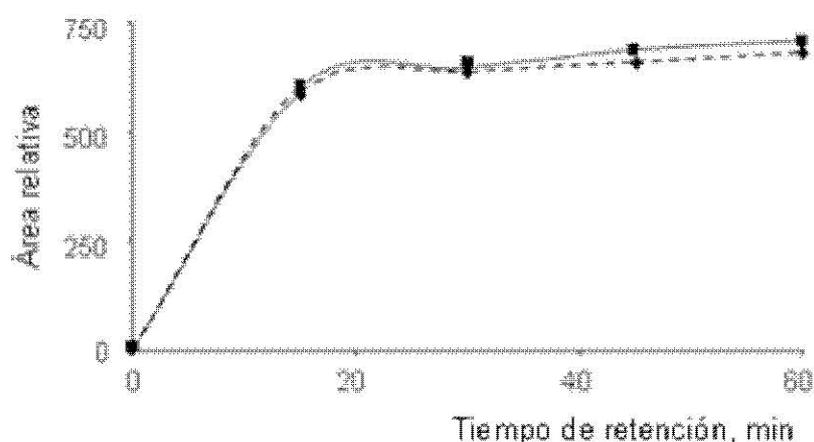
Como se puede observar, la presencia de urea fue muy efectiva para acelerar la esterificación con anhídrido maleico, moderadamente efectiva con anhídrido ftálico y sólo ligeramente efectiva con anhídrido difénico; sin embargo, el uso de urea es recomendable con todos los anhídridos, ya que no sólo aumenta el rendimiento de la reacción sino que, como se comenta más adelante, reduce el riesgo de que se produzcan esterificaciones fallidas, especialmente cuando la muestra contiene agua.

En presencia de urea, la reacción es muy rápida con anhídrido maleico, incluso a temperaturas bajas, como 80 °C. La velocidad de reacción fue menor con anhídridos aromáticos, por lo que en estos casos es necesario utilizar una temperatura lo más alta posible. Usando anhídrido ftálico, la reacción se puede llevar a cabo a 110 °C en 60 min; sin embargo, a esta temperatura se observó ebullición en los tubos que contenían anhídrido difénico. La ebullición se atribuyó a la menor concentración de anhídrido en comparación con la utilizada con anhídrido ftálico. Por lo tanto, la temperatura máxima para la reacción de derivatización con anhídrido difénico se estableció en 105 °C. A esta temperatura, se alcanzó un rendimiento máximo en 90 min.

Como se muestra más adelante, la derivatización con anhídrido difénico dio lugar a un procedimiento más sensible que los desarrollados con los otros anhídridos. Por esta razón, el uso de anhídrido difénico es adecuado para análisis de muestras, tanto industriales como ambientales, pero especialmente para estas

últimas que contienen cantidades muy pequeñas de alcoholes. Se justifica así la reducción de la cantidad de anhídrido del procedimiento, de 10 a 3,3 mmoles.

La reacción de Dehydol LT-7 con anhídrido 3-nitroftálico fue mucho más rápida que con anhídrido ftálico, tanto en ausencia como en presencia de urea (Fig. VII.2). Sin embargo, como se muestra en el apartado VII.3, los derivados con este reactivo dieron picos dobles a causa de la formación de los dos isómeros posicionales de los hemiésteres.



**Fig. VII.2.** Progreso de la derivatización de Dehydol LT-7 (suma de las áreas de los oligómeros con  $n = 12 - 18$ ) con anhídrido 3-nitroftálico, a 80 °C. Cada punto representa una derivatización independiente. Las líneas de trazos y las continuas conectan puntos obtenidos en ausencia y presencia de urea, respectivamente. La referencia del área relativa es la misma que en la Fig. VII.1.

Por último, como se deduce de la comparación de las escalas verticales de las Fig.VII.1 y VII.2, las sensibilidades relativas a 200 nm aumentaron en el siguiente orden: maleatos  $\ll$  ftalatos  $<$  3-nitroftalatos  $<$  difenatos. Para la suma de las áreas de los derivados de Dehydol LT-7, las sensibilidades relativas fueron 1:8:14, respectivamente. Los tiempos y temperaturas de reacción seleccionadas, sensibilidades relativas medias para Dehydol LT-7 y otros parámetros de la

derivatización de FAEs con los anhídridos maleico, ftálico y difénico, se resumen y comparan en la Tabla VII.1.

Para estimar los LODs y otros parámetros analíticos, se obtuvieron diversos puntos de calibrado. Para ello se utilizaron disoluciones de alcoholes no etoxilados. Las sensibilidades relativas se calcularon utilizando la curva de calibrado del maleato de C12E0 a 200 nm como referencia ( $n = 6$ ;  $r = 0,99$ ). Para establecer los LODs, se midió el ruido de la línea base a ambos lados de cada pico, tomando la anchura de la banda de ruido como 5s; los LODs se estimaron como las concentraciones de analito correspondientes a una altura de pico igual a 3s (criterio IUPAC de 1978). Los factores de simetría se midieron de acuerdo con la expresión de Foley-Dorsey [126].

Tabla VII.1. Comparación de los parámetros cromatográficos más relevantes obtenidos con los distintos anhídridos.

Característica	Maleico	Ftálico	Difénico
Temperatura de reacción recomendada en dioxano, °C	80	110	105
Tiempo de reacción recomendado, min	30	60	90
Rendimiento de derivatización relativo para una muestra con un 50% de agua, %	90	100	90
Sensibilidad relativa para Dehydol LT-7 a 200 nm <sup>a</sup>	1	8	14
Sensibilidad relativa para C12E0 a 200 nm	1	5,7	8,3
Sensibilidad relativa para C12E0 a otras longitudes de onda ( $\lambda$ , nm) <sup>b</sup>	0,35 (224)	1,7 (224)	7,4 (220)
LOD para C9E0-C18E0 a 200 nm, $\mu$ M	1,3	0,1	0,07
LOD para C9E0-C18E0 a 220-224 nm, $\mu$ M	2,2	0,3	0,07

Menor factor de respuesta, $f$ , de la serie C12Em <sup>c</sup>	0,73 para $m = 1$	0,42 para $m \geq 3$	0,62 para $m = 4$ y $5$
Factor de simetría para C12E0, A/B <sup>d</sup>	1,83	0,90	0,89
Eficacia para C12E0, N <sup>d</sup>	23900	60100	94300
Oligómeros solapados con un pico del blanco de reactivos a 25-35 °C <sup>d</sup>	Ninguno	C12E9- C12E11	Ninguno

<sup>a</sup> A partir de la suma de las áreas de las series C12Em y C14Em.

<sup>b</sup> Medidas obtenidas a una longitud de onda donde el espectro de los maleatos muestra una pendiente suave, el de ftalatos un hombro, y el de difenatos un máximo secundario; sensibilidades relativas obtenidas tomando como referencia el maleato de C12E0 a 200 nm.

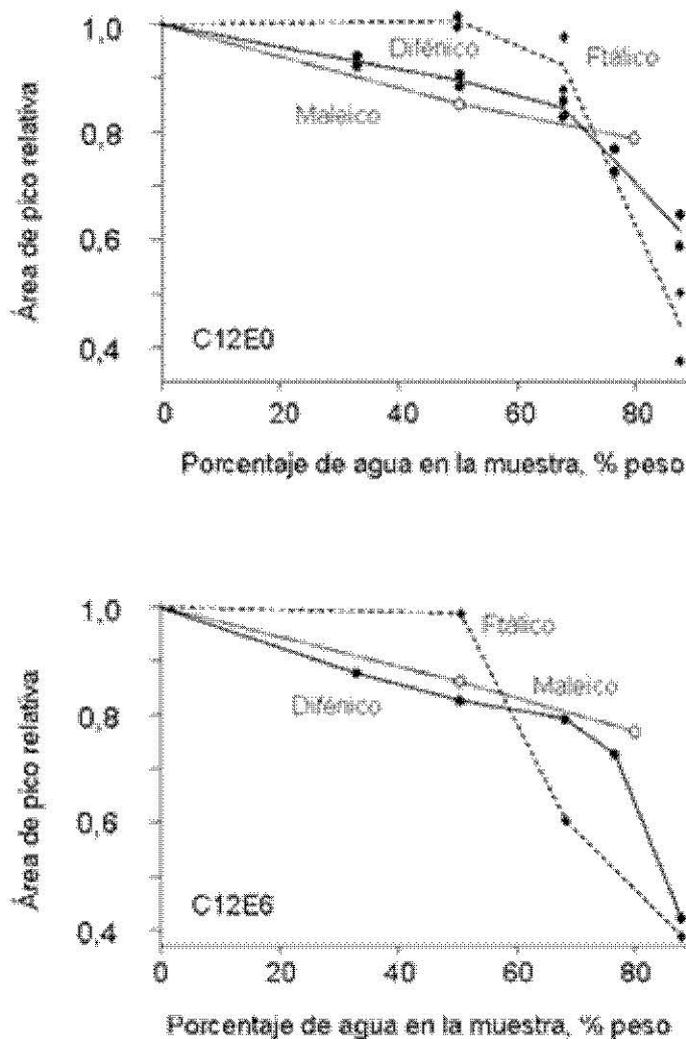
<sup>c</sup> Datos para maleatos y ftalatos tomados de los Capítulos IV y VI, respectivamente. Para difenatos, ver más adelante (Fig. VII.4).

<sup>d</sup> Parámetros calculados para cromatogramas obtenidos con las respectivas condiciones de elución optimizadas.

## VII.2. Tolerancia al agua

En todos los casos, los rendimientos de esterificación disminuyeron en presencia de agua; sin embargo, empleando los anhídridos maleico y ftálico en presencia de urea, se demostró una tolerancia satisfactoria a concentraciones moderadas de agua (Capítulos IV y VI, Fig. VII.3). Por lo tanto, empleando estos anhídridos se puede asegurar un rendimiento máximo, teniendo en cuenta que las muestras no contengan más del 50% de su peso en agua. Por otra parte, estudió la tolerancia al agua de la derivatización de C12E0 y C12E6 (20 mg) con anhídrido difénico en presencia de urea. Se utilizaron cantidades crecientes de agua, hasta 140 mg, que corresponde a un 87% de la masa total de muestra húmeda. La tolerancia observada fue similar a la descrita para otros anhídridos (Capítulos IV y VI). En todos los casos, los rendimientos de reacción estuvieron dentro del 90-

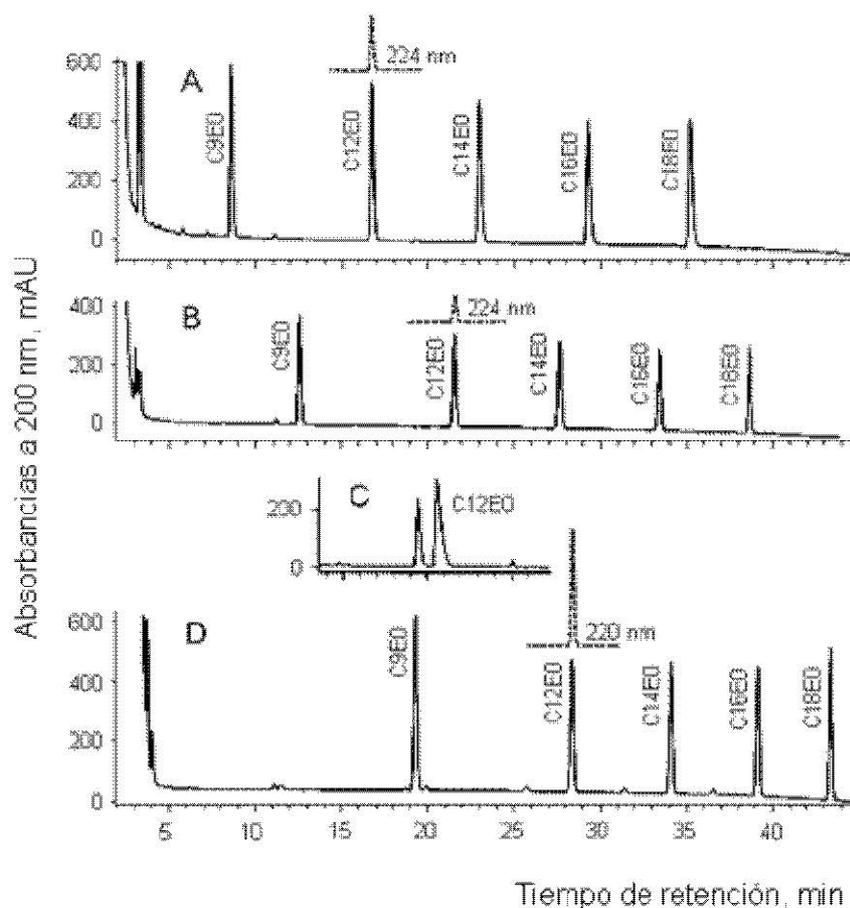
100% para muestras que contenían hasta un 50% de agua en peso, y disminuyeron rápidamente para muestras que contenían mayor cantidad de agua. Por ejemplo, para una muestra con un 87% de su peso en agua, el rendimiento de la derivatización disminuyó alrededor de un 50% respecto al máximo.



**Fig. VII.3.** Suma de las áreas de los picos de oligómeros con  $n = 12$  (C12E0 y C12E6) obtenidas al derivatizar con anhídridos maleico, ftálico y difénico, añadiendo cantidades crecientes de agua a la muestra.

*VII.3. Sensibilidades relativas, factores de respuesta, f, límites de detección, eficacias y línea base*

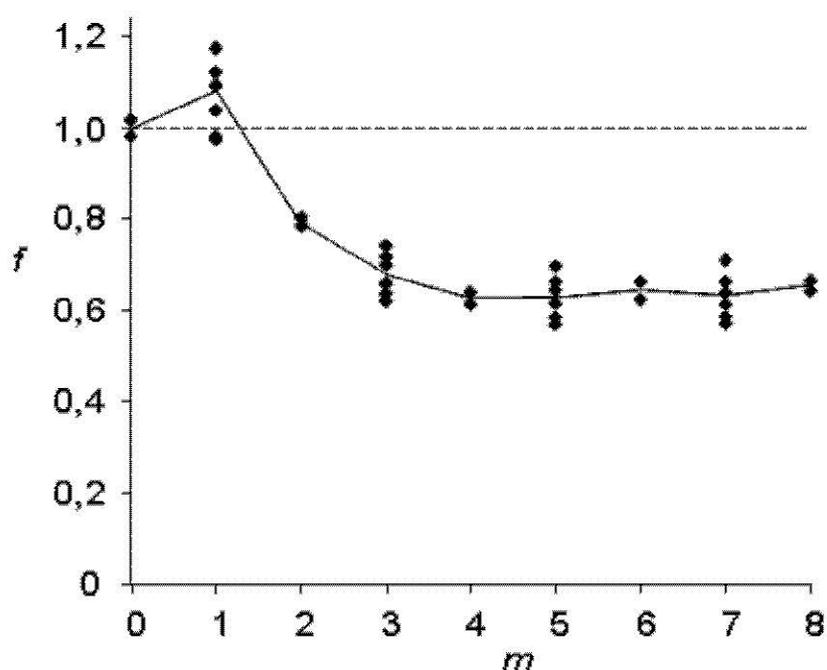
En la Fig. VII.4 se muestran una serie de cromatogramas obtenidos al derivatizar una mezcla de alcoholes no etoxilados, del C9E0 al C18E0, con los distintos anhídridos. Como se observa en la Fig. VII.4C para C12E0, el anhídrido 3-nitroftálico proporcionó picos dobles. La reactividad de este anhídrido asimétrico no está claramente orientada por el grupo 3-nitro hacia la formación de uno de los dos posibles isómeros posicionales, por lo que el uso de este anhídrido no resulta recomendable. Por esta razón no se realizaron más estudios con el anhídrido 3-nitroftálico. Para la derivatización tanto de FAEs como de PEGs con otro reactivo asimétrico, el anhídrido 1,2,4-bencenotricarboxílico, se observó el mismo problema [53, 54].



**Fig. VII.4.** Cromatogramas obtenidos mediante la esterificación de series de alcoholes no etoxilados con anhídridos maleico (A), ftálico (B), 3-nitroftálico (C) y difénico (D). Suponiendo un rendimiento de derivatización del 100%, la concentración inyectada de cada derivado fue de 1,4 mM para A, y 0,14 mM para B, C y D. La elución se desarrolló con un gradiente lineal de 50 a 95 % de ACN en 45 min, a 25 °C. La detección se efectuó a 200 nm (líneas continuas) y 220 o 224 nm (líneas de trazos).

Los demás anhídridos dieron lugar a un pico único por cada oligómero. Las sensibilidades relativas de los derivados de los alcoholes no etoxilados variaron ampliamente entre los diferentes anhídridos. Para los hemiésteres de C12EO, las sensibilidades relativas fueron 1:5,7:8,3, para maleatos, ftalatos y difenatos, respectivamente. Como se ha comentado antes, esta relación fue de 1:8:14 para Dehydol LT-7 (Fig. VII.1 de la Tabla VII.1). Esta aparente

discrepancia debe ser atribuida al predominio de los oligómeros etoxilados con  $m > 2$  en Dehydol LT-7. Los factores de respuesta a distintos valores de  $m$  no fueron iguales para los maleatos, ftalatos y difenatos. Concretamente, los factores de respuesta de los maleatos de oligómeros con  $m > 2$  fueron cercanos a 1 (Capítulo IV), y los de los ftalatos fueron del orden de 0,40-0,65 (Capítulo VI). Como se comenta más adelante, los factores de respuesta de los difenatos también disminuyeron a valores crecientes de  $m$ .



**Fig. VII.5.** Factores de respuesta,  $f$ , UV-Vis para FAEs de la serie C12E0. Cada punto se obtuvo mediante una derivatización independiente.

Los factores de respuesta de los difenatos se establecieron como se indica en el Capítulo VI para los ftalatos, mediante la derivatización y la inyección de una mezcla de diversos estándares, abarcando tanto oligómeros etoxilados como no etoxilados.

Como se muestra en la Fig. VII.5 para la serie C12Em, los factores de respuesta de los difenatos aumentaron ligeramente cuando  $m$  aumentó de 0 a 1, y

disminuyeron a valores de  $m$  mayores. Se obtuvieron factores de respuesta del orden de 0,62-0,65 para valores altos de  $m$ . Se obtuvieron también los factores de respuesta para los difenatos de los alcoholes etoxilados y no etoxilados a otros valores de  $n$ , desde 10 hasta 18; y con C9E0, sin embargo, no se observaron diferencias significativas debidas a la longitud de la cadena hidrocarbonada.

Los cromatogramas de la Fig. VII.4 se obtuvieron monitorizando la absorción UV-Vis en los máximos de absorción de ftalatos y difenatos, 224 y 220 nm, respectivamente. Por comparación, los cromatogramas de los maleatos se obtuvieron también a 224 nm, donde el espectro de los derivados muestra una pendiente suavemente decreciente a longitudes de onda crecientes. Como se muestra en los insertos de la Fig. VII.4, y como se indica en la Tabla VII.1, cuando la longitud de onda aumentó, la sensibilidad relativa se redujo en torno a 1/3 para los maleatos y los ftalatos, permaneciendo cercana al 90% de su valor a 200 nm, para los difenatos. Así, empleando anhídrido difénico, y debido a la elevada absorptividad de los derivados en torno a 220 nm, trabajando a esta longitud de onda, se puede alcanzar una mejor selectividad sin una reducción significativa de la relación  $S/N$ .

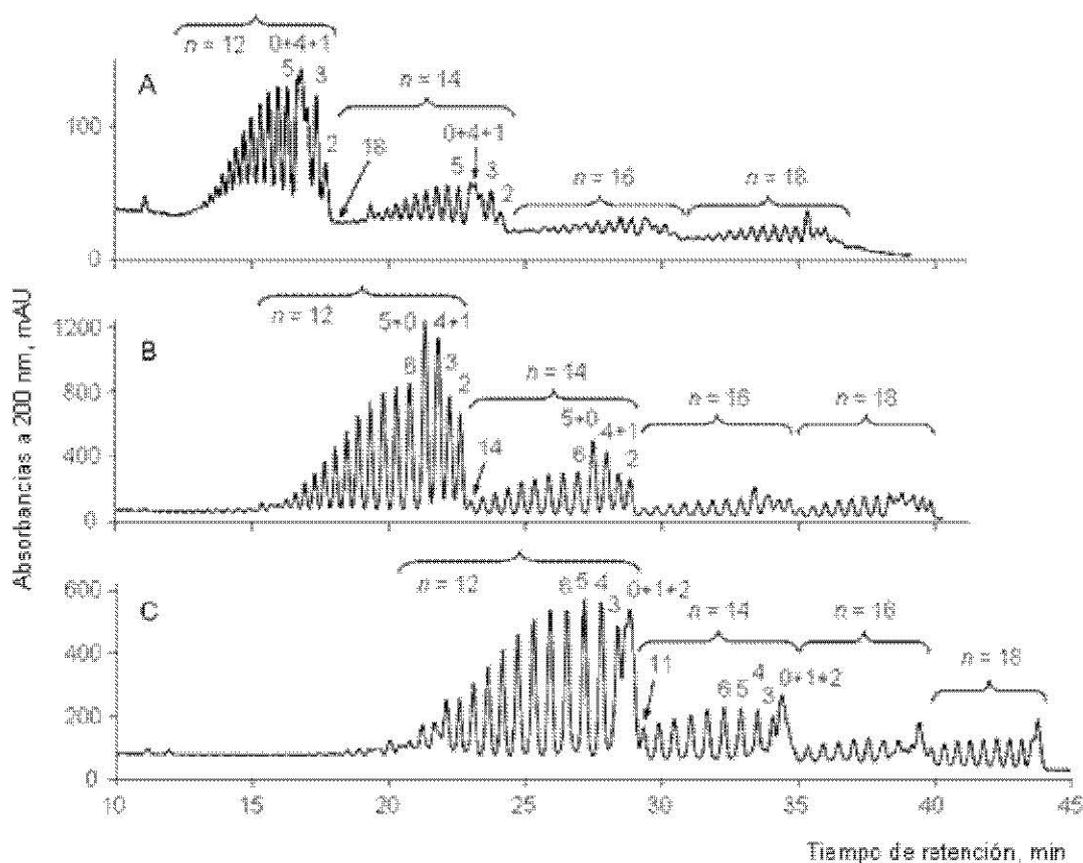
Las curvas de calibrado se prepararon mediante la inyección de una mezcla de alcoholes no etoxilados derivatizados, así como del alcohol C12E6 derivatizado a diluciones crecientes. En todos los casos se obtuvieron buenas linealidades ( $n = 6$ ,  $r > 0,99$ ). Los LODs de la Tabla VII.3 se estimaron en unidades de absorbancia para los derivados de C12E0 y C12E6, y para una relación  $S/N = 3$ . Los LODs resultantes siguieron el orden difenatos < ftalatos << maleatos. Además, los LODs fueron inversamente proporcionales a las sensibilidades relativas respectivas. Solamente en el caso de los difenatos, los

LODs no aumentaron cuando la longitud de onda lo hizo, desde 200 hasta 220 o 224 nm.

Como se muestra en la Fig. VII.6, y se resume en la Tabla VII.1, los picos de los ftalatos y de los difenatos fueron notablemente simétricos, mientras que los picos de los maleatos mostraron una ligera cola (ver Figs. IV.6 y IV.8). Las eficacias fueron elevadas, en particular para los difenatos. De acuerdo con la mejor simetría de pico y la mayor eficacia, el orden observado fue: maleatos  $\ll$  ftalatos  $<$  difenatos. Por último, como se describe en el Capítulo VI, en el caso de los ftalatos, la línea base del blanco de reactivos muestra un pico intenso que constituye una interferencia para los oligómeros con  $9 \leq m \leq 11$  de la serie C12Em. En el caso de los difenatos, no se observaron picos del blanco de reactivos a lo largo de la región de elución de las series con  $10 \leq n \leq 18$ .

#### *VII.4. Comparación de la separación cromatográfica de maleatos, ftalatos y difenatos de los oligómeros de los FAEs*

En la Fig. VII.6 se muestran los cromatogramas de Dehydol LT-7, obtenidos mediante su derivatización previa con los anhídridos maleico, ftálico y difénico. Estos cromatogramas se obtuvieron con un gradiente lineal de 50 – 95% de ACN a 25 °C.



**Fig. VII.6.** Cromatogramas obtenidos mediante esterificación de 40 mg de Dehydol LT-7 con los anhídridos maleico (A), ftálico (B) y difénico (C). Después de la esterificación, las disoluciones se llevaron a 10 mL (A y B) y a 25 mL (C) con 2:1 MeOH/  $\text{NH}_3$  0,1 M. Se debe prestar atención a las diferencias de la escala de absorbancias. La elución tuvo lugar con un gradiente lineal de 50 a 95% de ACN en 45 min, a 25 °C. Se indica la expansión de las series consecutivas, desde  $m = 2$  hasta 14, a lo largo del eje de tiempo, así como los valores de  $m$ , para algunos oligómeros representativos de las series  $n = 12$  y 14.

En comparación con maleatos y ftalatos, los difenatos también eluyen siguiendo un orden de valores decrecientes de  $n$ , pero con las diferencias que se comentan a continuación. Primero, la retención de todos los derivados aumenta en el orden maleatos  $\ll$  ftalatos  $<$  difenatos, lo cual está de acuerdo con el aumento de hidrofobicidad del grupo unido al alcohol. Segundo, para un

gradiente de ACN, y a una determinada temperatura de columna, la resolución intra-series aumenta, y la resolución inter-series disminuye siguiendo el orden maleatos < ftalatos < difenatos, siendo la resolución intra-series particularmente alta para ftalatos y difenatos. Como se muestra en el apartado VII.5, la optimización de las condiciones de elución condujo a una mejora de la resolución inter-series sin perder por ello demasiada resolución intra-series.

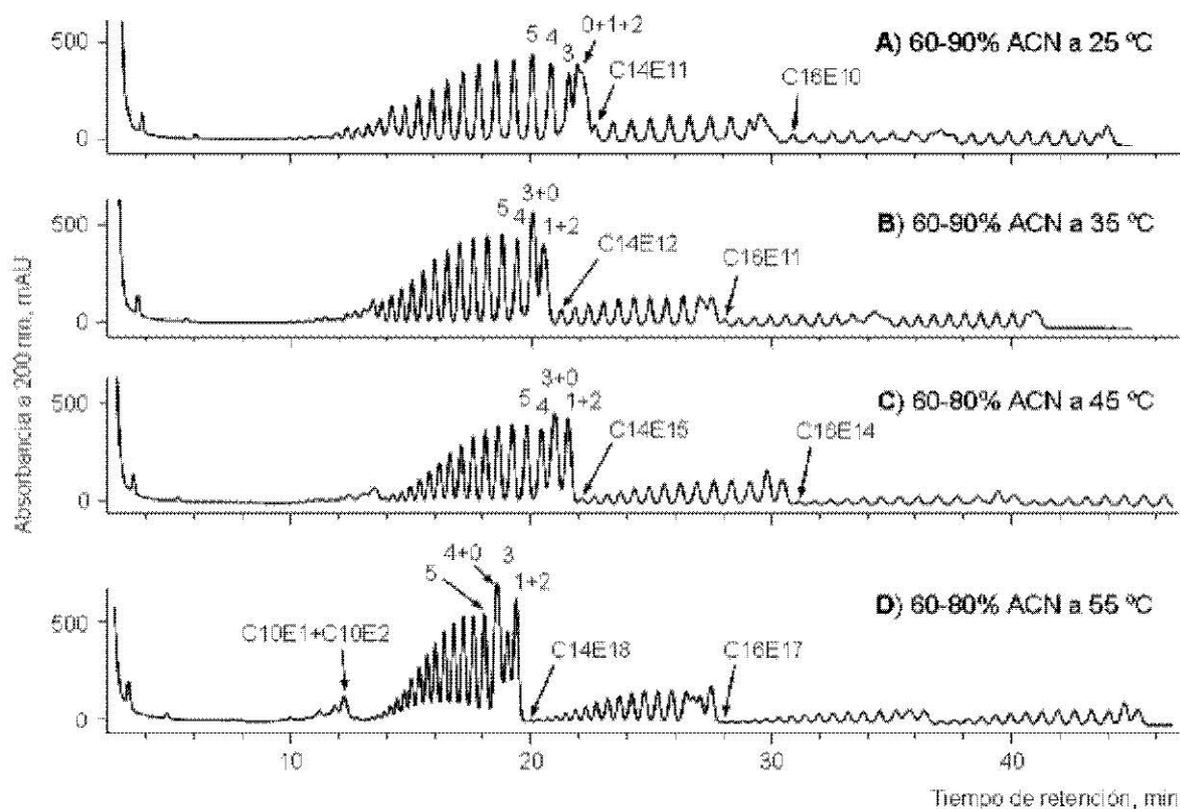
Otra diferencia significativa fue el desplazamiento de las posiciones relativas de los derivados de los oligómeros con  $m = 0$  y  $1$  dentro de sus respectivas series hidrocarbonadas. Como se comentó en capítulos anteriores, para los maleatos y ftalatos de los FAEs (Capítulos IV y VI), los oligómeros dentro de las series eluyeron siguiendo un orden decreciente de  $m$ , lo cual coincide con el orden de hidrofobicidad decreciente esperado; sin embargo, los oligómeros con  $m = 0$  y  $1$  se superponen con otros oligómeros con valores altos de  $m$ . La inversión en el orden de elución para los oligómeros con  $m = 0$  y  $1$  fue atribuida al plegamiento de la cadena de EO sobre sí misma cuando  $m > 1$ , con formación de uniones intramoleculares de los grupos éter polares con los grupos hidrofílicos éster y carboxilato (Capítulos IV y VI). Sin embargo, con  $m = 0$  y  $1$ , la cadena de EO es demasiado corta como para formar enlaces intramoleculares.

Para el caso de los difenatos se observó que los picos de los oligómeros con  $m = 0$  y  $1$  se superponían con picos de otros oligómeros con bajos valores de  $m$ , menores que en los casos de los maleatos y ftalatos. Así por ejemplo, a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el solapamiento de los picos de los oligómeros con  $m = 0$  de las series de  $n = 12$  y  $14$  tiene lugar con los oligómeros con  $m = 3-4$  y  $4-5$  para maleatos y ftalatos, respectivamente, pero con los oligómeros con  $m = 2-3$  para los difenatos. Este menor grado de inversión de los tiempos de elución de los oligómeros con  $m = 0$  y  $1$  puede ser debido a la elevada hidrofobicidad y gran tamaño del grupo

difenato, en comparación con los grupos maleato y ftalato. El grupo difenato podría dificultar la formación de enlaces intramoleculares de la cadena de EO con el grupo éster y el grupo carboxilato terminal.

#### *VII.5. Optimización de la separación cromatográfica de los difenatos de los oligómeros de los FAEs*

Para optimizar el gradiente de elución se aumentó la concentración inicial de ACN del 50 al 60%, y se redujo la concentración final, del 95 al 90%. Como se deduce al comparar la Fig. VII.6 C con la Fig. VII.7 A, se mejoró así la resolución intra-series, mientras que la resolución inter-series permaneció aproximadamente constante. Así por ejemplo, en los cromatogramas de la Fig. VII.6 A, las series con  $n = 12$  y 14 fueron resueltas hasta el oligómero C14E11. Como se muestra en la Fig. VII.7 B, C y D, la resolución inter-series mejoró al aumentar la temperatura de la columna. Para compensar el descenso en la retención al aumentar la temperatura, la pendiente del gradiente se redujo ligeramente (concentración final de ACN, 80% en lugar de 90%). Como se observa en la Fig. VII.7 D, las series con  $n = 12$  y 14 se resolvieron hasta el oligómero C14E18 a 55 °C. Una reducción de la resolución intra-series a temperaturas crecientes es consecuencia de un descenso en la polaridad de la cadena de EO, como se ha indicado para FAEs no derivatizados (Capítulo IV) [16]. Se seleccionó un gradiente de 60-90% de ACN a 45 °C como el mejor compromiso entre la resolución intra- e inter-series, manteniendo a la vez un tiempo de análisis razonablemente corto.

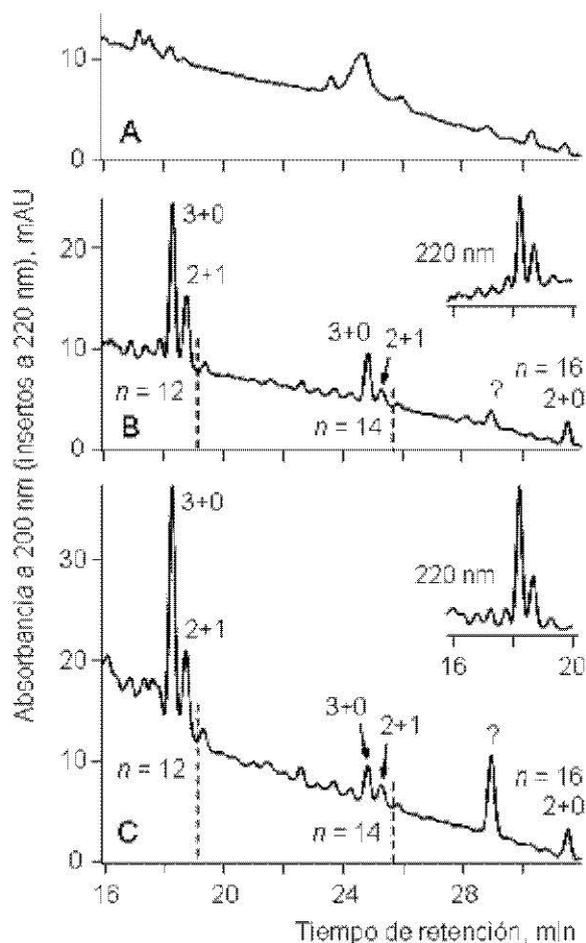


**Fig. VII.7.** Cromatogramas obtenidos mediante esterificación de 40 mg de Dehydol LT-7 con anhídrido difénico. Después de la esterificación, la disolución se llevó a 25 mL con 2:1 MeOH/ NH<sub>3</sub> 0,1 M. La elución tuvo lugar en 45 min, con un gradiente lineal en los rangos de concentraciones de ACN, y a las temperaturas de columna indicadas en los trazos. Se indican los valores de  $m$  para unos pocos oligómeros significativos de la serie  $n = 12$ , así como los oligómeros resueltos más pesados de las series  $n = 14$  y  $16$ , y el par de oligómeros más ligero de la serie  $n = 10$ .

#### VII.6. Aplicación a muestras ambientales

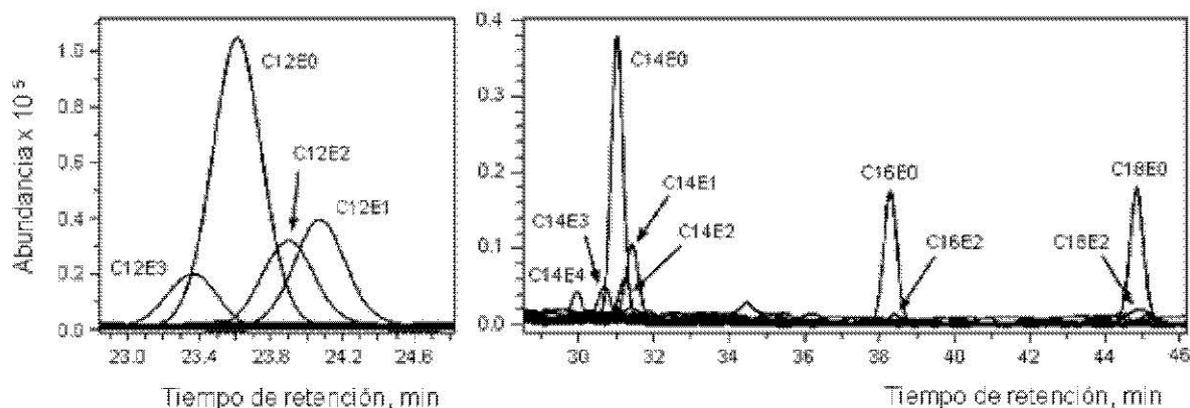
Para tratar muestras de agua de un efluente de una planta de depuración y de agua de mar (1 L de cada muestra), se aplicó el procedimiento indicado en el Capítulo III. La muestra se sometió a extracción en fase sólida, y derivatización del extracto con anhídrido difénico. La derivatización y separación cromatográfica se llevaron a cabo utilizando el procedimiento optimizado. Con

finés comparativos, la muestra procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales, una vez extraídos los FAEs, fue dividida en dos partes iguales. Una parte fue derivatizada con anhídrido ftálico, y la otra, con anhídrido difénico.



**Fig. VII.8.** Cromatogramas obtenidos mediante esterificación de extractos de 1 L de muestras de efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales con anhídridos ftálico (A) y difénico (B), y de agua de mar con anhídrido difénico (C). Después de la esterificación, las disoluciones se llevaron a 10 mL con 2:1 MeOH/  $\text{NH}_3$  0,1 M, pero antes de la inyección, el volumen de la disolución C se redujo a 2 mL con una corriente de nitrógeno. La elución tuvo lugar en 45 min, con un gradiente lineal de 60 a 90 % de ACN. Se indican los valores de  $m$  para unos pocos oligómeros de las series  $n = 12, 13$  y  $14$ . En los insertos de las partes B y C se muestra la región  $n = 12$ , registrada a 220 nm.

Como se muestra en la Fig. VII.8 A, utilizando anhídrido ftálico se obtuvieron picos pequeños con una baja relación  $S/N$ . Esta relación fue mucho mayor en el caso de los derivados de anhídrido difénico (Fig. VII.8 B). Es interesante destacar el parecido entre los perfiles obtenidos en efluentes de la planta de depuración y los obtenidos en agua de mar (Fig. VII.8 C). Probablemente, en relación a la contaminación con FAEs y alcoholes grasos, el agua de mar simplemente acusa el impacto de los efluentes de las instalaciones del sistema regional de tratamiento de aguas residuales. Como se puede ver en los insertos de la Fig. VII.8, la sensibilidad disminuye sólo ligeramente si se registran los cromatogramas de los difenatos a 220 nm. Los picos de la Fig. VII.8B y C se han interpretado a la vista de los cromatogramas de ion extraído de la Fig. VII.9.



**Fig. VII.9.** Electroferogramas de ion extraído a los valores de  $m/z$  de los difenatos para algunos de los oligómeros de las series  $n = 12 - 18$ . Los datos se obtuvieron con el mismo extracto del efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales que el empleado para obtener los cromatogramas de la Fig VII.9A y B. Las demás condiciones de trabajo se detallan en esa misma figura, y se especifican en el Capítulo III de esta memoria.

Para el efluente de la planta de depuración de aguas residuales, la concentración de los FAEs a lo largo de las series hidrocarbonadas sucesivas, desde  $n = 12$  hasta 18, se estimó como 0,12, 0,041, 0,028 y 0,023  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Teniendo en cuenta el volumen final antes de la inyección (10 mL), estos valores corresponden a una concentración total de FAEs en el efluente de 0,21  $\mu\text{g L}^{-1}$  (21  $\mu\text{g L}^{-1}$  en la disolución inyectada). Como dato de referencia, la media de los efluentes de plantas depuradoras USA en el año 2006 fue de 3,64  $\mu\text{g L}^{-1}$  [45]. De forma similar, y teniendo en cuenta que el volumen final antes de la inyección se redujo de 10 a 2 mL por evaporación con una corriente de nitrógeno, la concentración total de FAEs en las muestras de agua de mar fue de 52  $\text{ng L}^{-1}$  (26  $\text{ng L}^{-1}$  en la disolución inyectada). Teniendo en cuenta su distribución, entre las series con  $n = 12$  a 18, las concentraciones fueron las siguientes: 34, 11, 4 y 3  $\text{ng L}^{-1}$ , respectivamente.

En las muestras pueden estar presentes en realidad concentraciones mayores que las halladas, ya que los valores de recuperación, tanto para el proceso de filtrado como para el de extracción en fase sólida, son desconocidos. Además, estas concentraciones se estimaron a partir de la curva de calibrado de C12E0, sin corregir las áreas de acuerdo con los factores de respuesta; sin embargo, el sesgo debido al uso de áreas no corregidas fue probablemente muy bajo, ya que los oligómeros predominantes, aquellos con  $m = 0$  y 1, tienen valores de  $f$  iguales o cercanos a 1 (ver Fig. VII.5). Esta es otra de las ventajas del anhídrido difénico en comparación con otros anhídridos, ya que los factores de respuesta de los maleatos y ftalatos de los FAEs son significativamente menores que 1 para los oligómeros con  $m = 0$  y 1 (cerca de 0,55 y 0,45, respectivamente, para los ftalatos) (Capítulo VI). Para todas las series hidrocarbonadas, los alcoholes no etoxilados tienden a predominar en muestras

ambientales, no solamente debido a la biodegradabilidad de la cadena de EO, sino también como consecuencia de la presencia de fuentes adicionales de alcoholes grasos, diferentes de los FAEs, en los influentes de aguas residuales [6, 127].

El presente trabajo dio lugar a una publicación en *Journal of Chromatography A* 1216, 3023-3030 (2009), titulado *Determination of fatty alcohol ethoxylates with diphenic anhydride derivatization and liquid chromatography with spectrometric detection. A comparative study with other anhydrides.*

---

**Capítulo VIII**

**Caracterización de FAEs mediante**

**cromatografía bidimensional**

---

## Single-pump bi-dimensional chromatography applied to the characterization of FAE diphenates

### Abstract

A 6-position column selection valve (“in” and “out” ports, and 12 paired ports for the 6 channels) ( $V_1$ ) and a 6-port 2-position injection valve ( $V_2$ ) were jointly used to implement 2D chromatography in a system droved by a single quaternary pump. A column  $C_1$  and valve  $V_2$  were both inserted in different channels of  $V_1$ , and a pair of ports of a third channel of  $V_1$  were directly connected each other with a short PEEK tube for system flushing. Other ports of  $V_2$  were connected to the detector, to the outlet of  $V_1$  and to a column  $C_2$  where separation along a second dimension was performed. A third column,  $C_3$  was also inserted between  $V_1$  and  $V_2$  to be optionally used if required. At least six elution modes in either isocratic or gradient conditions were provided by this combination of valves and columns:  $C_1$ ,  $C_1+C_2$ ,  $C_2$ ,  $C_2+C_3$ ,  $C_3$  and system flushing or re-conditioning. These elution modes were used in two ways: (a) cycles of elution on  $C_1$ , followed by transfer of eluate heart-cuts to  $C_2$ , elution on  $C_2$  and re-conditioning of  $C_2$  and the pump-valves system to continue elution on  $C_1$ ; (b) cycles of elution on  $C_1$ , followed by transfer of eluate heart-cuts to  $C_2$ , back-wards transfer to  $C_3$ , elution on  $C_3$  and re-conditioning of  $C_2$ ,  $C_3$  and the pump-valves system to continue elution on  $C_1$ . FAEs were resolved into their consecutive hydrocarbon series using derivatization with diphenic anhydride followed by gradient elution with ACN/ aqueous ammonium acetate on a propyl-diol column at  $C_1$ . Resolution within the series was achieved by using either an octylsilica or a PFP column at  $C_2$ . Overlapping of the  $m = 0$  and 1 oligomers within the series was avoided by using the PFP column at low temperatures (3 °C). Zone broadening within  $C_1$  during elution of  $C_2$  and system re-conditioning was negligible.

## VIII. Caracterización de FAEs mediante cromatografía bidimensional

### *VIII.1. Selección del sistema para la separación en la primera dimensión*

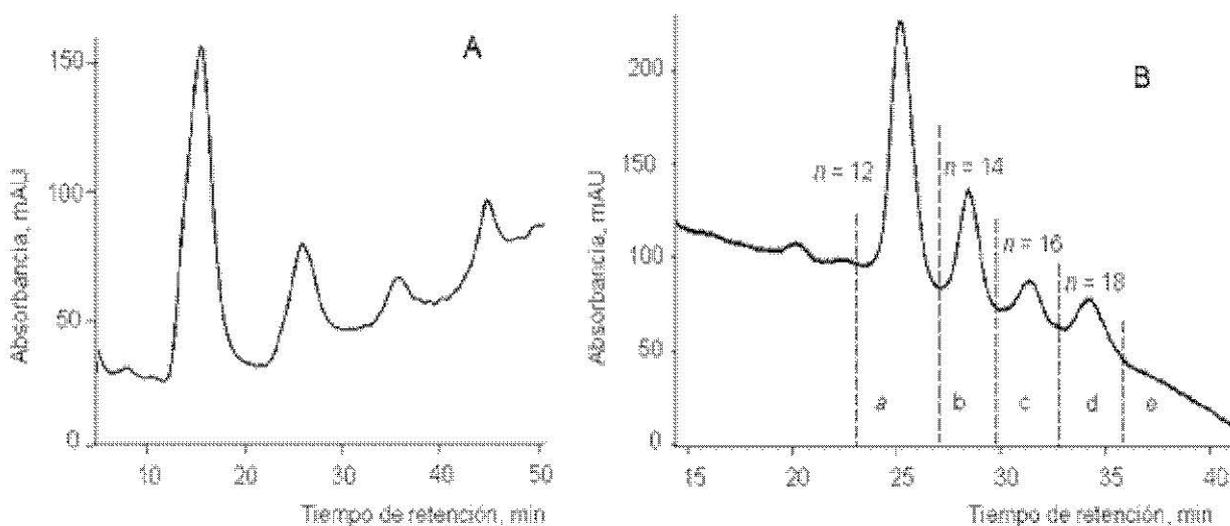
La elución de los difenatos de los oligómeros de Dehydol LT-7 en la primera dimensión se intentó con columnas de C8, C18, alquil-amino, alquil-ciano y alquil-diol. Por su parte, para la elución en la segunda dimensión se utilizaron columnas C8 y PFP. De acuerdo con la bibliografía, y en base a experimentos previos, la elución en la segunda dimensión se llevó a cabo exclusivamente mediante gradientes ACN/ agua en presencia de ácido acético o de acetato amónico. Por su parte, se probaron diversos eluyentes en la primera dimensión, incluyendo ACN/ agua, MeOH/ agua y MeOH/ ACN. Como mezclas de prueba se utilizaron Dehydol LT-7 y estándares con  $m = 0$  y 6 de las series  $n = 12$  y 14, que en todos los casos se derivatizaron con anhídrido difénico, como se detalla en el Capítulo VII.

Para el caso de las columnas C8 y C18, la experiencia adquirida en los capítulos anteriores indicaba una buena separación de los oligómeros dentro de las series utilizando fases de ACN/ agua en presencia de ácido acético. Por esta razón, y con el fin de conseguir una separación entre series sin distinguir los oligómeros dentro de las series, el eluyente utilizado fue MeOH/ agua en presencia de 0,1% de ácido acético. Se probaron distintos gradientes, incrementando el porcentaje de MeOH. Sin embargo, no se obtuvo una separación satisfactoria de las series hidrocarbonadas.

Para eluir los derivados de los oligómeros presentes en Dehydol LT-7 sobre la columna alquil-amino, se utilizaron también diversos gradientes de MeOH/ agua en el rango 40-100% MeOH. Con esta columna también se probó la elución en fase normal, tanto isocrática (composición de la fase móvil, 95% hexano, 5% isopropanol y 0,1% ácido acético) como con gradiente (aumento de

la concentración de isopropanol del 5 al 50%). Se obtuvieron diversos picos bien resueltos, pero que no correspondieron en ningún caso a las series hidrocarbonadas de los derivados de los FAEs.

En cambio, los resultados fueron mejores con las columnas alquil-ciano y alquil-diol (ver Fig. VIII.1). Con la columna alquil-ciano se hicieron pruebas en modo isocrático (50 y 90% de MeOH en agua en presencia de ácido acético al 0,1%), y en modo gradiente (del 30 al 95% de MeOH, y otros). Como se muestra en la Fig. VIII.1 A, el uso de un gradiente de MeOH con un 0,1% de ácido acético dio lugar a una separación satisfactoria de las sucesivas series hidrocarbonadas, sin separación interna de las series en función de las cadenas de óxido de etileno.



**Fig. VIII.1.** Cromatogramas obtenidos al inyectar Dehydrol LT-7 derivatizado con anhídrido difénico: (A) columna alquil-ciano y gradiente de 40 a 60% de MeOH con un 0,1% de ácido acético en 60 min; (B) columna alquil-diol y gradiente de 0 a 100% de ACN en 60 min. Entre todos los casos, la temperatura de la columna fue de 25 °C.

De acuerdo con el trabajo de Liu y col. [57], la separación de los derivados de los FAEs con la columna alquil-diol se llevó a cabo eluyendo con fases ACN/ agua en presencia de acetato amónico 0,1 M. Esta separación se intentó tanto en modo isocrático (30 y 70% ACN) como en modo gradiente (del 0 al 100% de ACN en 60 min, entre otros). Como se muestra en la Fig. VIII.1 B, la elución con gradiente condujo a una buena separación de las series hidrocarbonadas. En el cromatograma aparecen cuatro bandas de intensidades decrecientes, correspondientes a las sucesivas series con  $n = 12, 14, 16$  y  $18$ .

En comparación con el uso de la columna alquil-ciano, la columna alquil-diol proporcionó buenas resoluciones a tiempos de migración menores; además, los cromatogramas fueron muy reproducibles. Por otra parte, se tiene la ventaja de que el gradiente se realiza con ACN y no con MeOH, lo que facilita el cambio de eluyente entre la primera y la segunda dimensión (en la que también se utiliza ACN), y viceversa. Además, como se observa en la Fig. VIII.1 B, la elución de las series en la primera dimensión se completa a valores bajos de la concentración de ACN (las series  $n = 12$  y  $18$  eluyen antes de que se alcance un 45 y un 60% de ACN, respectivamente). La fuerza eluotrópica es relativamente baja en la primera dimensión, lo que facilita aún más la transferencia de fracciones a la segunda dimensión, siendo bajo el riesgo de que la transferencia produzca ensanchamiento excesivo de bandas o aparición de picos dobles.

También se han realizado experimentos en los que se ha detenido la elución de la columna  $C_1$  inmediatamente antes de la aparición de las bandas correspondientes a las series  $n = 14, 16$  y  $18$ . En cada caso, la elución se continuó después de un tiempo de espera de 60 min entre cada una de las series. Se comprobó que las bandas no experimentaban un ensanchamiento apreciable. Por las razones expuestas, se seleccionó la columna alquil-diol para realizar la separación en la primera dimensión. Asimismo, se estudió la influencia de la

temperatura de la columna sobre esta separación, para lo que se trabajó a 10, 20, 30 y 40 °C. A estas cuatro temperaturas se obtuvieron cromatogramas prácticamente idénticos a los de la Fig. VIII.1 B. Se deduce por lo tanto, que la posición y la forma de los picos no se alteran en un amplio rango de temperatura, lo que indica a su vez que la retención sobre la columna diol obedece a un mecanismo poco habitual.

La imposibilidad de modificar la selectividad y fuerza eluyente del sistema alquil-diol/ ACN/ agua variando la temperatura de la columna constituye una limitación. Sin embargo, la falta de sensibilidad del sistema frente a la temperatura permite dejar la primera columna a temperatura ambiente, fuera de la región termostatazada, sin que se produzcan variaciones apreciables de los tiempos de elución de las series en la primera dimensión.

### *VIII.2. Diseño de la etapa de transferencia*

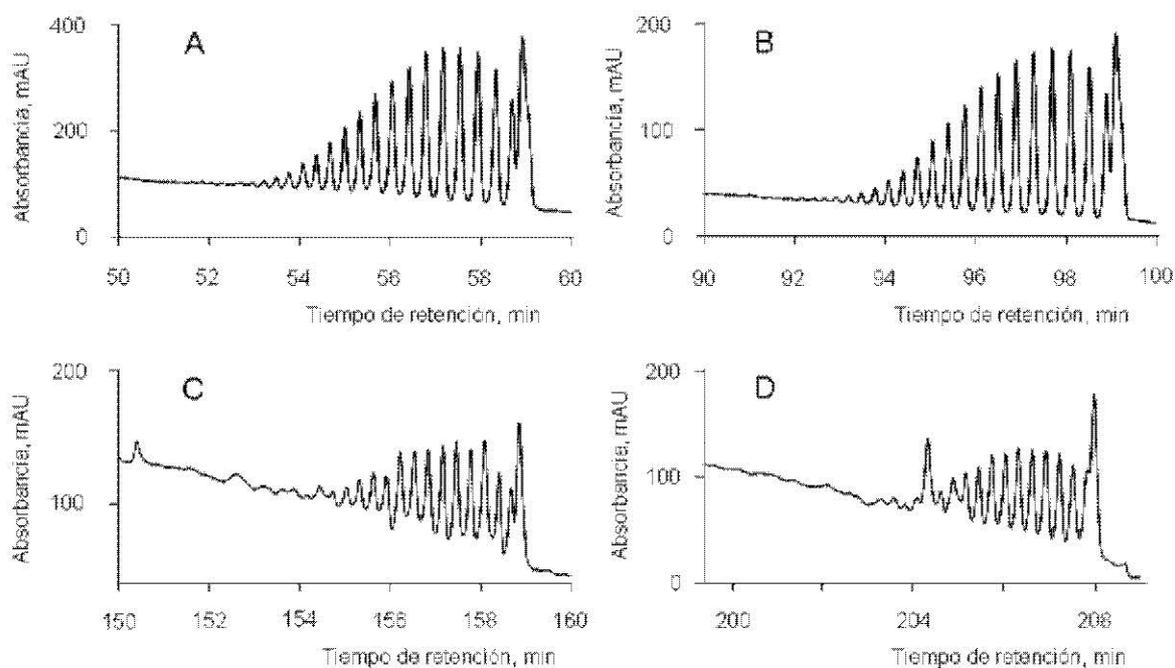
Para establecer la etapa de transferencia, y de acuerdo con el esquema de la Fig. III.1, se probaron dos alternativas: (a) introducir cortes medulares del eluyente de  $C_1$  en una columna intermedia ( $C_2$ ), conectar la columna intermedia con  $C_3$  (que constituye en este caso la segunda dimensión), y finalmente proceder a la elución en dicha columna  $C_3$ ; y (b) introducir directamente cortes medulares del eluyente de  $C_1$  en  $C_2$ . Esta segunda alternativa sólo es posible utilizando la columna alquil-diol como  $C_1$ , ya que sólo con esta columna se consigue una separación de los FAEs por series hidrocarbonadas a una fuerza eluyente baja, y con los mismos disolventes que los requeridos en la separación en la segunda dimensión (ACN/ agua). La alternativa (a) se intentó con una columna alquilciano (MTO-Supelcosil LC-CN 3  $\mu\text{m}$  x 7,5 cm x 3 mm ID), con una columna C18 (Eclipse XDB, 5  $\mu\text{m}$  x 15 cm x 4,6 mm ID) y con una columna C8 (Ascentis

Express, 2,7  $\mu\text{m}$  x 15 cm x 4,6 mm ID). Como columna intermedia se utilizaron las siguientes: C8 (Análisis Vínicos, 5  $\mu\text{m}$  x 1,5 cm x 4,6 mm ID) y C18 (Phenomenex, 5  $\mu\text{m}$  x 3 cm x 4 mm ID y Zorbax SB-C18, 3,5  $\mu\text{m}$  x 3 cm x 2,1 mm ID) como  $C_2$ . Con ninguna de las tres columnas se consiguió una retención suficiente de la serie  $n = 12$ . La adición de la columna  $C_2$  al sistema produjo un retraso cromatográfico adicional del orden de 1 min, insuficiente para separar series hidrocarbonadas completas. Como se deduce de la Fig. VII.1 B, para abarcar una serie hidrocarbonada completa, se necesita retener los analitos a lo largo de cortes medulares del orden de los 2-3 min. En otros trabajos se consigue aumentar el retraso cromatográfico en la etapa intermedia mediante la adición de agua al eluyente de  $C_1$  [17, 58]; sin embargo, esta operación requiere el uso de una bomba auxiliar. Por esta razón, para el trabajo que sigue, se seleccionó la alternativa (b).

### *VIII.3. Optimización de la elución en la segunda dimensión*

En primer lugar se utilizó la columna de octil-sílice (C8), que se termostató a 25 °C para llevar a cabo la separación en la segunda dimensión. En la Fig. VIII.2, partes A-D, se muestran las series aisladas después de introducir cortes medulares del eluyente de  $C_1$ , tomados a lo largo de las series a-b, b-c, c-d y d-e (Fig. VIII.1 B), en la columna  $C_2$ . Como se describe en el Capítulo VII, la elución en  $C_2$  se llevó a cabo con un gradiente de ACN/ agua en presencia de ácido acético al 0,1%. El cromatograma mostró la misma distribución de los oligómeros que la obtenida en dicho capítulo con un gradiente similar sobre la misma columna C8, esto es, la elución de los oligómeros siguió el orden de valores decrecientes de  $m$ , excepto para  $m = 0$  y 1. Como se observó también en el Capítulo VII, los picos de estos oligómeros aparecieron solapados con los

picos de oligómeros con  $m = 3$  y  $2$ , respectivamente. Sin embargo, a diferencia de los cromatogramas obtenidos con una sola dimensión, en este caso fue posible observar los oligómeros de las series aislados hasta valores de  $m$  superiores a 20.



**Fig. VIII.2.** Cromatogramas obtenidos utilizando una columna C8 como  $C_2$  (Ascentis Express), con un gradiente de ACN/ agua acidificada del 50 al 95% en 45 min, a 25 °C. Cada cromatograma corresponde a uno de los cuatro cortes medulares del eluato de  $C_1$  indicados en la Fig. VIII.1 B, siendo A, B, C y D los cromatogramas de las series  $n = 12, 14, 16$  y  $18$ , respectivamente.

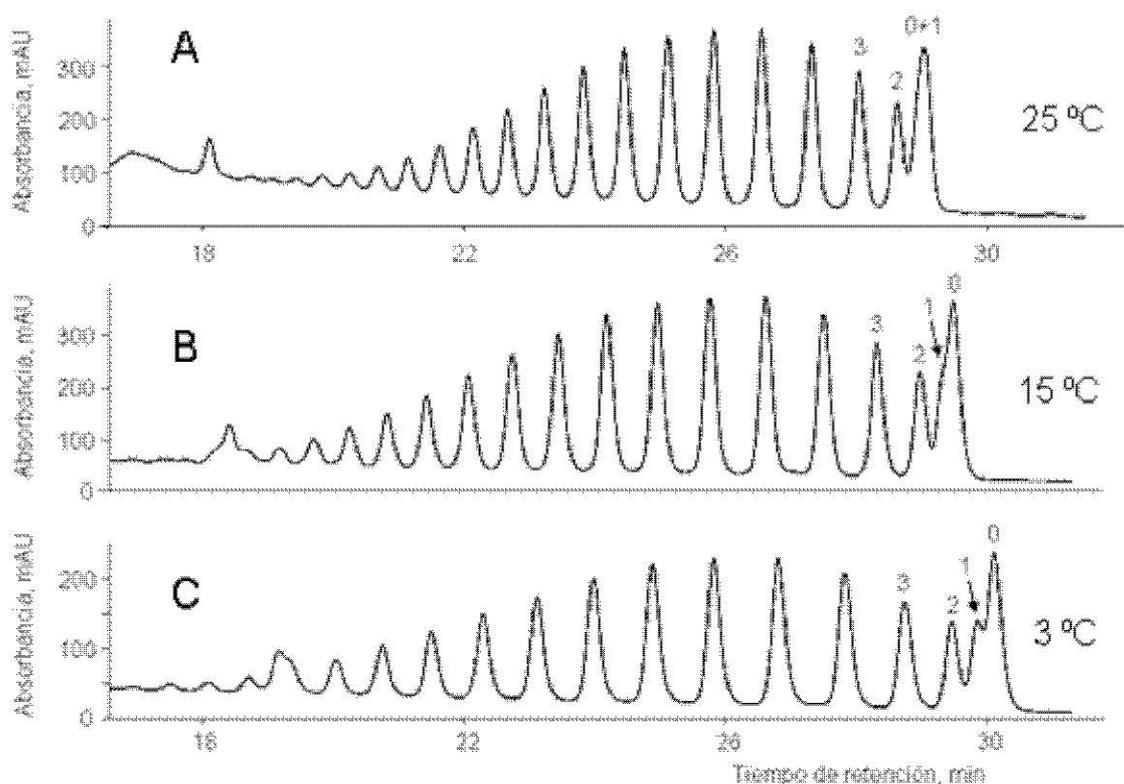
En comparación con un sistema monodimensional, una de las ventajas del sistema propuesto es la mayor libertad en la selección de fases estacionarias y móviles. De este modo, en el sistema 2D es posible modificar la selectividad y mejorar la resolución dentro de las series hidrocarbonadas, sin la limitación que supone la necesidad de mantener la resolución entre series. Esta ventaja es una consecuencia de la separación previa de las series sobre  $C_1$ . En el caso de los cromatogramas en una sola dimensión, el sistema tiene que ser capaz de

proporcionar resolución suficiente entre series, resolviendo simultáneamente los oligómeros dentro de las series, lo que limita mucho la selección de las fases y condiciones de elución.

La Fig. VIII.3 A, muestra el cromatograma obtenido para la serie  $n = 12$ , utilizando una columna de PFP como  $C_2$ , y cromatografiando a 25 °C. La elución en la segunda dimensión se llevó a cabo con un gradiente de ACN/ agua, ambos acidificados con 0,1 % de ácido acético, desde el 50 hasta el 95 % de ACN en 45 min. Para los oligómeros con  $m > 2$ , el cromatograma (Fig. VIII.3 A) mostró una selectividad similar a la obtenida con la columna C8, si bien, con una resolución mayor entre oligómeros consecutivos. Además se observó un menor solapamiento de los picos correspondientes a los oligómeros ligeros dentro de las series. Así, para la serie  $n = 12$ , tan sólo los picos correspondientes a los oligómeros  $m = 0$  y 1 aparecieron solapados entre ellos, quedando parcialmente resuelto el oligómero con  $m = 2$ . La identificación de estos picos se llevó a cabo inyectando muestras de Dehydol LT-7 derivatizadas y aditivadas con los derivados de los estándares de C12E0, C12E1 y C12E2, a razón de uno de ellos por inyección.

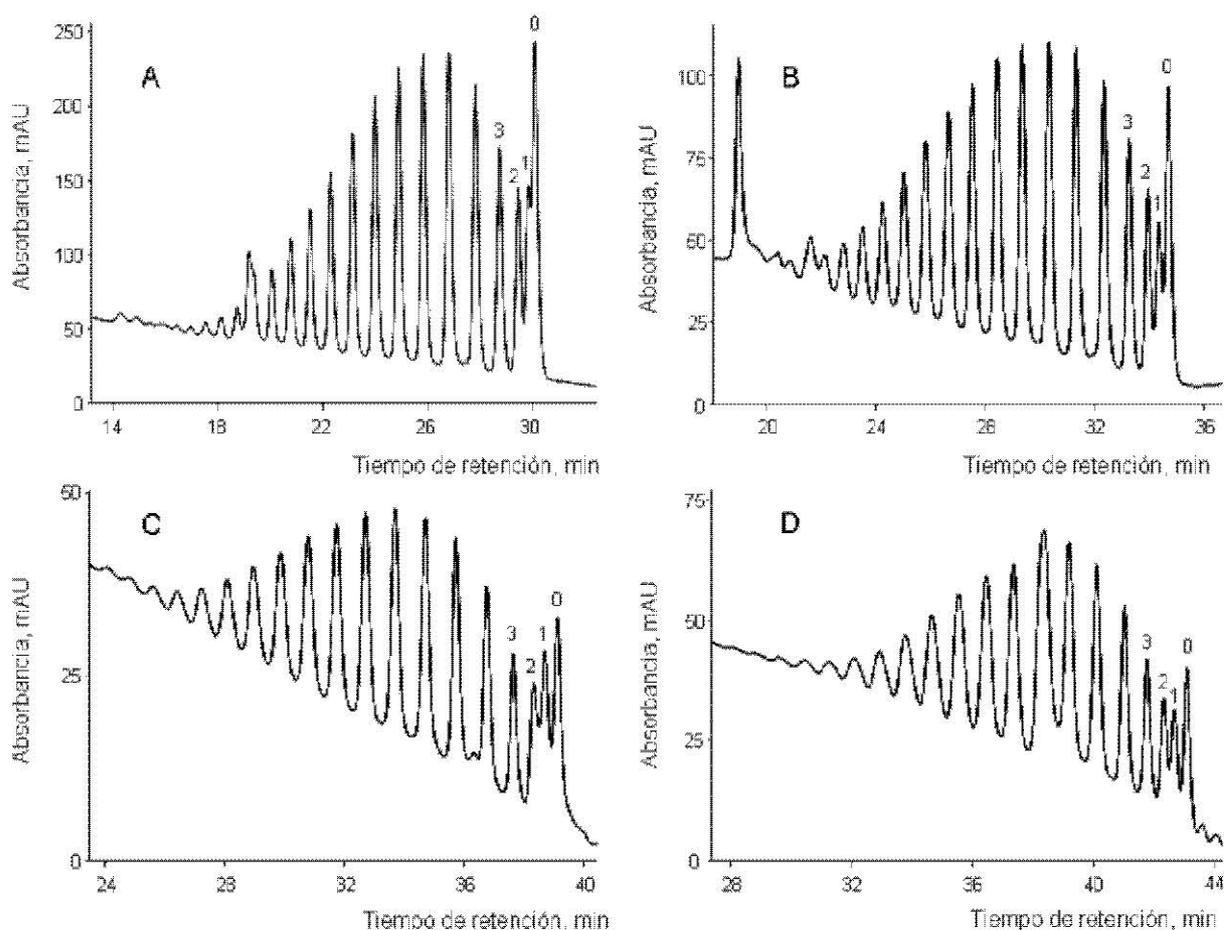
Por esta razón, con el objeto de mejorar la resolución entre los oligómeros más ligeros, y especialmente para estudiar la posibilidad de reducir el efecto de inversión en el orden de elución para todas las series, se llevaron a cabo eluciones de las series hidrocarbonadas manteniendo la columna de PFP a temperaturas decrecientes. El efecto de la reducción de temperatura sobre la serie  $n = 12$  se muestra en las Fig. VIII.3, B y C. A 3 °C, todos los oligómeros aparecieron en orden decreciente de valores de  $m$ , con resolución parcial de C12E1 y C12E0. Como se ha comentado anteriormente, la polaridad de los derivados de los FAEs aumenta al bajar la temperatura. Por esta razón, una menor temperatura debe tener el efecto de nivelar las hidrofobicidades de los

oligómeros con  $m \geq 2$  respecto a los oligómeros con  $m = 1$  y 0, lo que podría explicar la tendencia a inhibir la inversión en el orden de elución de estos últimos.



**Fig. VIII.3.** Cromatogramas obtenidos a lo largo de la segunda dimensión para la serie  $n = 12$ , con la columna de PFP a las temperaturas indicadas junto a los trazos. Otros detalles como en la Fig. VIII.2.

Finalmente, en la Fig. VIII.4 se muestran las cuatro series hidrocarbonadas, de  $n = 12$  a 18, eluyendo a 3 °C en  $C_2$ . Los oligómeros aparecen en todos los casos en el orden decreciente de valores de  $m$ , y además se observa una resolución creciente entre los oligómeros  $m = 0$  y 1 al aumentar  $n$ .



**Fig. VIII.4.** Cromatogramas obtenidos utilizando la columna PFP como  $C_2$ , con un gradiente de ACN/ agua acidificada, del 50 al 95% en 45 min, a 3 °C. Otros detalles, como en la Fig. VIII.2.

#### VIII.4. Conclusiones

El sistema 2D propuesto permite aislar las series hidrocarbonadas, y también los oligómeros dentro de las series, hasta valores muy altos de  $m$ . Además, utilizando cromatografía 2D y una baja temperatura de columna, ha sido posible aumentar la resolución entre oligómeros consecutivos, lo que asegura la recuperación de oligómeros con un alto grado de pureza. Por otra parte, la mayor resolución abre una vía para la caracterización de FAEs ramificados. Esta posible aplicación del sistema 2D no ha sido todavía estudiada.

Además, la combinación del mayor volumen e hidrofobicidad del grupo difenato respecto a otros grupos, juntamente con el uso de temperaturas de columna muy bajas, y aprovechando también la distinta selectividad proporcionada por una columna PFP en relación con las columnas C8 y C18, han permitido obtener en forma ordenada todos los oligómeros dentro de las series, desde  $m = 0$  hasta  $m = 20$ . Se evita así, por primera vez, el engorroso solapamiento observado en todos los cromatogramas de FAEs, tanto sin derivatizar como derivatizados, y que afecta a varios oligómeros dentro de las series. Por estas razones, el sistema 2D propuesto tiene interés a escalas analítica y preparativa, en particular para la obtención de oligómeros con valores bajos ( $m = 0, 1$  y  $2$ ) y muy elevados de  $m$ , difíciles de aislar por otros medios.

---

**Capítulo IX**  
**Caracterización de APPs**  
**por CZE-IPD y CZE-MS**

---

## Rapid characterization of APPs by CZE with IPD and MS detection

### Abstract

Methods for the rapid characterization of industrial APPs by infusion in a MS detector, and by CZE with IPD and MS detection, were described. Technical grade APPs, including alkylaminepolyphosphonates with 3 - 5 phosphonate groups and different hydrocarbon skeletons, hydroxyethyl-aminobis(methylenephosphonic acid), hydroxyethylidene-diphosphonic acid, and 2-phosphonobutane-1,2,4-tricarboxylic acid, were examined. A 10 mM solution of adenosine triphosphate disodium salt (ATP) at pH 2.2 was used as BGE. The nominal compounds of the industrial APPs and their impurities were well resolved in less than 15 min. The peaks were identified by using extracted ion electropherograms, which were obtained at the  $m/z$  values indicated by the peaks of the infusion spectra. Low concentrations of esters, anhydrides and APPs having different hydrocarbon skeletons than the nominal compounds, and lacking phosphonate and methylene-phosphonate groups with respect to them, were found. Also, hydroxyethyl-aminobis(methylenephosphonic acid) contained an intramolecular ester in a concentration close to that of the nominal compound. Application of CZE-IPD and CZE-MS to the quality control of industrial APPs, and of CZE-MS to the identification and characterization of APPs in cleaning products, was demonstrated.

## IX. Caracterización rápida de APPs por CZE-IPD y CZE-MS

### *IX. 1. Introducción*

En el Capítulo I se presentó una introducción a la química analítica de los APPs (ver también referencias [62]-[84]). En el trabajo expuesto en el presente capítulo se mejora la resolución de un método de CZE-MS publicado anteriormente [128], y se desarrolla también un método de CZE-IPD útil para el control de calidad de APPs en materias primas y productos industriales. Se eligió ATP como agente revelador para IPD, ya que posee un cromóforo intensamente coloreado y un grupo trifosfato fuertemente ácido. Además es bastante más barato que el AMP (adenosín mono-fosfato) utilizado en una referencia anterior [72], 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 para uso industrial, como para asignar los picos obtenidos por CZE-IPD a algunos de los compuestos identificados, presentes como impurezas en dichas materias primas. El método CZE-MS también se aplicó a la identificación de APPs en productos de limpieza.

Mediante el empleo de CZE-MS se demostró que las impurezas de los APPs están realmente presentes como tales en las muestras, y que no se forman en el espectrómetro de masas. También se consiguió aumentar la eficacia del método de separación mediante CZE, y se desarrolló un método de CZE-IPD. En un BGE ácido conteniendo ATP como agente revelador, los compuestos nominales de los APPs y sus impurezas se resolvieron en tiempos cortos. Además, se encontraron nuevos compuestos que carecían de uno o más grupos -

PO(OH)<sub>2</sub> y -CH<sub>2</sub>-PO(OH)<sub>2</sub>, o incluso, que tenían un esqueleto hidrocarbonado diferente al de los compuestos nominales. También se encontró un éster intramolecular en concentración elevada en uno de los hidroxidi-fosfonatos. Finalmente, el método CZE-MS propuesto se aplicó a la identificación de APPs en productos de limpieza comerciales.

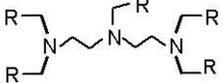
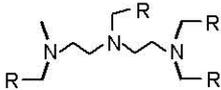
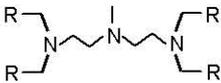
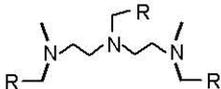
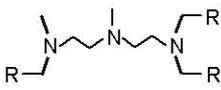
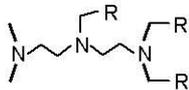
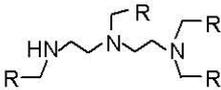
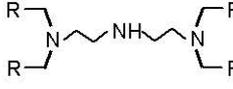
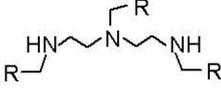
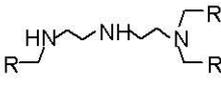
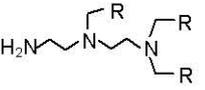
## *IX.2. Resultados y discusión*

### *IX.2.1. Espectros de masas de infusión de los productos I-VIII*

En un estudio previo se hallaron impurezas de los productos I-V que contenían el mismo esqueleto hidrocarbonado que el correspondiente compuesto nominal, pero con uno o dos grupos -PO(OH)<sub>2</sub> sustituidos por protones [128]. En el presente trabajo se encontraron también impurezas cuya estructura molecular, en comparación con la estructura del compuesto nominal, carecía de uno o dos grupos -CH<sub>2</sub>-PO(OH)<sub>2</sub>. Se encontraron además compuestos que carecían de grupos -PO(OH)<sub>2</sub> y -CH<sub>2</sub>-PO(OH)<sub>2</sub> simultáneamente (ver Tablas IX.1-IX.2). A continuación se discuten los procedimientos de identificación utilizados.

En primer lugar, con excepción del producto VI, el espectro de infusión de los APPs mostró un perfil o patrón característico [128]. Para cada compuesto o grupo de isómeros, los picos más intensos correspondieron a series del tipo  $[M - nH + (n - 1)Na]^+$ , donde  $n$  va desde 1 hasta el número de grupos -PO(OH)<sub>2</sub> presentes en la molécula del compuesto nominal. Los espectros de los productos I-V mostraron todos los picos de la serie, donde M corresponde a las impurezas indicadas en las Tablas IX.1-IX.3 (los valores de  $m/z$  se dan también en las tablas). En los compuestos II (Tabla IX.2) y IV (Tabla IX.3) se observaron además iones de la serie  $[M - nH + (n - 1)K]^+$ .

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

<i>Estructura molecular</i> $R = PO(OH)_2$	<i>Nombre, acrónimo, peso estadístico dentro del grupo de isómeros</i> <i>(p.est.) y picos de las series <math>[M - nH + (n - 1)Na]^+</math></i>
	Ácido dietilén-triaminopentakis(metilenfosfónico) <sup>a)</sup> I-C9N3P5, sin isómeros, $m/z$ 572, 594, 616, 638, 660
	Ácido dietilén-triamino(1-metil)tetrakis(metilenfosfónico) I-C9N3P4a, p. est. 4, $m/z$ 492, 514, 536 <sup>b)</sup> , 558 <sup>b)</sup>
	Ácido dietilén-triamino(4-metil)tetrakis(metilenfosfónico) I-C9N3P4b, p. est. 1, $m/z$ 492, 514, 536 <sup>b)</sup> , 558 <sup>b)</sup>
	Ácido dietilén-triamino(1,1'-dimetil)tris(metilenfosfónico) I-C9N3P3a, p. est. 2, $m/z$ 412 <sup>b)</sup> , 434, 456 <sup>c)</sup>
	Ácido dietilén-triamino(1,4-dimetil)tris(metilenfosfónico) I-C9N3P3b, p. est. 2, $m/z$ 412 <sup>b)</sup> , 434, 456 <sup>c)</sup>
	Ácido dietilén-triamino(1,1-dimetil)tris(metilenfosfónico) I-C9N3P3c, p. est. 1, $m/z$ 412 <sup>b)</sup> , 434, 456 <sup>c)</sup>
	Ácido dietilén-triaminotetrakis(1,1,4,1'-metilenfosfónico) I-C8N3P4a, p. est. 4, $m/z$ 478 <sup>c)</sup> , 500 <sup>b)</sup> , 522, 544
	Ácido dietilén-triaminotetrakis(1,1,1',1'-metilenfosfónico) I-C8N3P4b, p. est. 1, $m/z$ 478 <sup>c)</sup> , 500 <sup>b)</sup> , 522, 544
	Ácido dietilén-triaminotris(1,4,1'-metilenfosfónico) I-C7N3P3a, p. est. 2, $m/z$ 384, 406, 428
	Ácido dietilén-triaminotris(1,1,1'-metilenfosfónico) I-C7N3P3b, p. est. 2, $m/z$ 384, 406, 428
	Ácido dietilén-triaminotris(1,1,4-metilenfosfónico) I-C7N3P3c, p. est. 1, $m/z$ 384, 406, 428

	Ácido dietilén-triamino(1-metil)tris(1,4,1'-metilénfosfónico) I-C8N3P3a, p. est. 2, $m/z$ 398, 420, 442
	Ácido dietilén-triamino(4-metil)tris(1,1,1'-metilénfosfónico) I-C8N3P3b, p. est. 1, $m/z$ 398, 420, 442
	Ácido dietilén-triamino(1-metil)tris(1,1,1'-metilénfosfónico) I-C8N3P3c, p. est. 1, $m/z$ 398, 420, 442
	Ácido dietilén-triamino(1-metil)tris(1',1',4-metilénfosfónico) I-C8N3P3d, p. est. 1, $m/z$ 398, 420, 442

a) Compuesto nominal.

b) Pico solapado con alguno de los siguientes picos de los compuestos nominales:  $[M - 2H + Na - 2H_2O]^-$  ( $m/z$  558),  $[M - H - 2H_2O]^-$  ( $m/z$  536),  $[M - H - 4H_2O]^-$  ( $m/z$  500) y  $[M - 2H + Na - H_2O - 2H_3PO_3]^-$  ( $m/z$  412).

c) Pico solapado con alguno de los siguientes picos de los isómeros de I-C9N3P4:  $[M - 2H + Na - 2H_2O]^-$  ( $m/z$  478) y  $[M - H - 2H_2O]^-$  ( $m/z$  456).

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

<i>Estructura molecular</i> $R = PO(OH)_2$	<i>Nombre, acrónimo, peso estadístico dentro del grupo de isómeros (p. est.) y picos de las series</i> $[M - nH + (n - 1)Na]^-$
	Ácido dihexametilén-triaminopentakis(metilénfosfónico) <sup>a)</sup> II-C17N3P5, sin isómeros, $m/z$ 684, 706, 722 <sup>b)</sup>
	Ácido dipropilén-triaminopentakis(metilénfosfónico) II-C11N3P5, isómero simétrico, $m/z$ 600
	Ácido butilén-etilén-triaminopentakis(metilénfosfónico) II-C11N3P5, posible isómero asimétrico, $m/z$ 600
	Ácido dihexametilén-triaminotetrakis(1,1,8,1'-metilénfosfónico) II-C16N3P4a, p. est. 4, $m/z$ 590

	Ácido dihexametilén-triaminotetrakis(1,1,1',1'-metilénfosfónico) II-C16N3P4b, p. est. 1, $m/z$ 590
	Ácido dibutilén-triamino(1-metil)tetrakis(metilénfosfónico) II-C13N3P4a, p. est. 4, $m/z$ 548
	Ácido dibutilén-triamino(6-metil)tetrakis(metilénfosfónico) II-C13N3P4b, p. est. 1, $m/z$ 548
	Ácido dietilén-triamino(1,1'-dimetil)bis(1,4-metilénfosfónico) II-C8N3P2, mezcla de seis isómeros posicionales, $m/z$ 318
	Ácido nonametilén-diaminotetrakis(metilénfosfónico) II-C13N2P4, sin isómeros, $m/z$ 533

a) Compuesto nominal.

b) Ion conteniendo  $K^+$  en lugar de  $Na^+$ .

**Tabla. IX.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, acrónimo, peso estadístico dentro del grupo de isómeros (p.est.) y picos de las series $[M - nH + (n - 1)Na]^-$
III Dequest 2046		Ácido etilén-diaminotetrakis (metilénfosfónico) <sup>a)</sup> III-C6N2P4, sin isómeros, $m/z$ 435, 457, 479, 501
		Ácido etilén-diamino( <i>N</i> -metil)tris(metilénfosfónico) III-C6N2P3, sin isómeros, $m/z$ 355, 377, 399 <sup>b)</sup>
		Ácido etilén-diamino( <i>N,N'</i> -dimetil)bis(metilénfosfónico) III-C6N2P2a, p. est. 2, $m/z$ 275, 297
		Ácido etilén-diamino( <i>N,N'</i> -dimetil)bis(metilénfosfónico) III-C6N2P2b, p. est. 1, $m/z$ 275, 297
		Ácido etilén-diaminotris(metilénfosfónico) III-C5N2P3, sin isómeros, $m/z$ 341, 363, 385

		Ácido etilén-diaminobis( <i>N, N'</i> -metilénfosfónico) III-C4N2P2a, p. est. 2, <i>m/z</i> 247, 269
		Ácido etilén-diaminobis( <i>N, N'</i> -metilénfosfónico) III-C4N2P2b, p. est. 1, <i>m/z</i> 247, 269
		Ácido etilén-diamino( <i>N</i> -metil)bis( <i>N, N'</i> -metilénfosfónico) III-C5N2P2a, p. est. 2, <i>m/z</i> 261, 283
		Ácido etilén-diamino( <i>N</i> -metil)bis( <i>N, N'</i> -metilénfosfónico) III-C5N2P2b, p. est. 1, <i>m/z</i> 261, 283
IV Dequest 2054		Ácido hexametilén-diaminotetrakis(metilénfosfónico) <sup>a)</sup> IV-C10N2P4, sin isómeros, <i>m/z</i> 491, 529 <sup>e)</sup> , 567 <sup>e)</sup> ,
V Briquest 301- 50 A		Ácido aminotris(metilénfosfónico) <sup>a)</sup> V-C3N1P3, sin isómeros, <i>m/z</i> 298, 320, 342
		Ácido metilaminobis(metilénfosfónico) V-C3N1P2, sin isómeros, <i>m/z</i> 218, 240
		Ácido aminobis(metilénfosfónico) V-C2N1P2, sin isómeros, <i>m/z</i> 204, 226

<sup>a)</sup> Compuesto nominal.

<sup>b)</sup> Pico solapado con el pico  $[M - H - 2H_2O]^-$  del compuesto nominal de III.

<sup>b)</sup> Ion conteniendo  $K^+$  en lugar de  $Na^+$ .

Cuando fue necesario, se añadió una letra minúscula para distinguir entre isómeros posicionales (Tablas IX.1, 2 y 3). Los pesos estadísticos de los isómeros se calcularon a partir del número de posibles combinaciones de los sitios accesibles a enlazarse con  $-PO(OH)_2$  o con  $-CH_2-PO(OH)_2$ , dando lugar al mismo isómero.

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

<i>Producto y nombre comercial</i>	<i>Estructura molecular,</i> $R = PO(OH)_2$	<i>Nombre, acrónimo y pico principal</i>
<b>VI</b> SPE 0101		Ácido hidroxietil-aminobis(metilenfosfónico) <sup>a)</sup> VI-C4N1P2(OH), $m/z$ 248
		Éster intramolecular del compuesto nominal VI-C4N1P2(O), $m/z$ 230
<b>VII</b> Briquest ADPA- 60A		Ácido 1-hidroxietilidén-1,1-difosfónico <sup>a)</sup> VII-C2P2(OH)a, $m/z$ 205
		Ácido hidroxietilidén-1,2-difosfónico VII-C2P2(OH)b, $m/z$ 205
<b>VIII</b> Bayhibit AM		Ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico <sup>a)</sup> VIII-C4P1(COOH) <sub>3</sub> , $m/z$ 269. Seis anhídridos intramoleculares del compuesto nominal, $m/z$ 251

<sup>a)</sup> Compuesto nominal

Como se indica en las tablas, los valores de  $m/z$  de unos pocos iones  $[M - nH + (n - 1) Na]^+$  resultaron ser comunes a dos compuestos diferentes; sin embargo, en todos los casos se observó al menos un pico característico de cada compuesto, así como picos de baja intensidad debidos a pérdidas de agua y  $HPO_2$  con respecto a  $[M - nH + (n - 1) Na]^+$ , tanto para el compuesto nominal como para todas las impurezas (valores de  $m/z$  no indicados). Se observó una pérdida de  $HPO_2$  ( $m/z$  -64) que no encaja con ninguna combinación común de C, H, N y O, siendo por lo tanto característica de iones progenitores que contienen al menos un grupo  $-PO(OH)_2$ . Por su parte, el producto VI mostró un espectro

muy distinto de los obtenidos con los otros APPs. Las principales diferencias fueron la presencia de un pico intenso, que se atribuyó al ion  $[M - H - H_2O]^+$  ( $m/z$  230), y la presencia de grupos de picos con un patrón característico, y espaciados a intervalos regulares. La posible composición de VI, deducida a partir del espectro de infusión y de los electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD y CZE-MS, se discute en el apartado IX.2.5.

En segundo lugar, cuando un valor de  $m/z$  coincide con el ion  $[M - nH + (n - 1)Na]^+$  de un APP propuesto, todas las demás alternativas razonables se reducen considerablemente. Esto es así porque la pérdida de  $m/z$  80, que corresponde a la sustitución de un grupo  $-PO(OH)_2$  por un protón, no encaja con ninguna combinación de C, H, N y O, excepto con aquellas que tienen tres insaturaciones. La presencia de compuestos insaturados en los APPs no es probable de modo que, para interpretar los espectros, se aceptó desde un principio la presencia de grupos  $-PO(OH)_2$ . Habitualmente se tiene una confirmación de la presencia de grupos  $-PO(OH)_2$  gracias a picos con diferencias de -64 o -82 unidades de  $m/z$  (pérdidas de  $HPO_2$  y  $H_2O + HPO_2$ ) respecto al pico de interés. Cuando ya se han producido  $n$  sustituciones de grupos  $-PO(OH)_2$  por protones, las interpretaciones posibles de las pequeñas masas remanentes son muy reducidas. Generalmente, dichas masas coinciden con las del esqueleto hidrocarbonado del compuesto nominal, o con el esqueleto de moléculas que tienen una estructura similar a la del compuesto nominal.

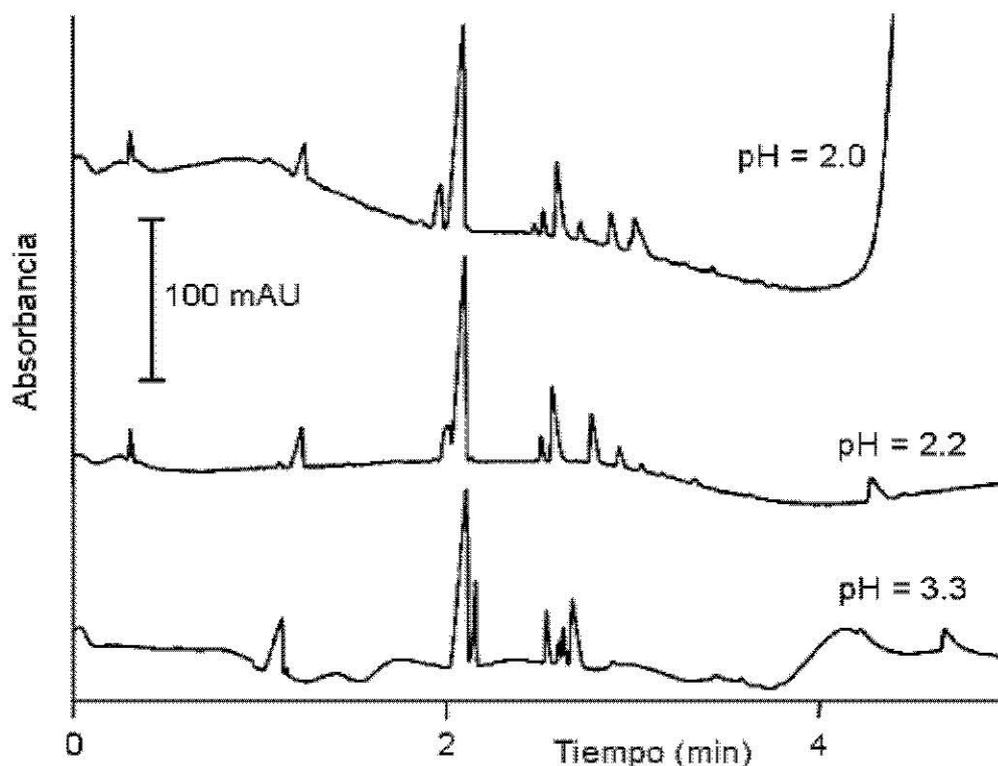
Finalmente, en tercer lugar, el número de nitrógenos está limitado por la regla del nitrógeno, que establece que iones con valores de  $m/z$  impares no tienen átomos de nitrógeno, o tienen un número par de éstos, y que iones con valores pares de  $m/z$  tienen un número impar de átomos de nitrógeno. Todos los picos significativos de los espectros de masas de los productos I (3 átomos de nitrógeno), V y VI (1 átomo de nitrógeno cada uno) presentaron valores pares de  $m/z$ , y los de IV (2 átomos de nitrógeno), VII y VIII (sin átomos de nitrógeno en

todos los casos) mostraron valores impares (Tablas IX.1-IV.4). Por lo tanto, los espectros de masas de estos productos indicaron que el número de nitrógenos en las impurezas tenían la misma paridad que el correspondiente compuesto nominal. Por el contrario, los espectros de los productos **II** y **III** mostraron picos intensos tanto a valores pares como impares de  $m/z$ . El compuesto nominal de **II** tiene tres nitrógenos, y de acuerdo con su espectro, mostró picos con valores de  $m/z$  pares (Tabla IX.2); sin embargo, se observaron también picos intensos a valores de  $m/z$  491, 533 y 403 (Fig. IX.3). Los picos con  $m/z$  491 y 533 se atribuyeron a la presencia de **IV-C10N2P4** (el compuesto nominal de **IV**, Tabla IX.3) y de **II-C13N2P4** (Tabla IX.2) como impurezas, respectivamente. El pico a  $m/z$  403 no pudo ser asignado a ninguna estructura razonable. Por su parte, el compuesto nominal del producto **III** tiene dos nitrógenos, y en consonancia, el espectro mostró picos con valores impares de  $m/z$ , excepto un pico a  $m/z$  298, que se atribuyó a la presencia de **V-C3N1P3** como impureza (Tabla IX.3). Por último, los EIEs confirmaron la presencia de los compuestos indicados en las tablas IX.1-IX.4 en los productos **I-VIII** (apartado IX.2.4).

### IX.2.2. Optimización del BGE

Para optimizar el BGE se realizaron inyecciones del compuesto **I** (2000  $\mu\text{g/mL}$ ) utilizando CZE-IPD. Se probaron medios tanto ácidos como básicos. Los BGEs alcalinos contenían 5 mM de ATP y dietilentriamina. La concentración de la amina se varió para ajustar el pH a 7,5, 8,5 y 9,5. El BGE ácido contenía: (i) ATP 10 mM, que dio un pH de 3,3 y (ii) ATP 10 mM en presencia de la cantidad de HCl necesaria para reducir el pH a 3,0, 2,5, 2,2 y 2,0. En medio ácido, los picos fueron más simétricos, y se obtuvo una mayor relación  $S/N$ , por lo que se seleccionó este medio para los experimentos siguientes (Fig. IX.1).

Se probó también el uso de ácido fórmico en lugar de HCl para preparar el BGE a pH 2,2; sin embargo, la eficacia y selectividad entre los componentes de I fue similar. Los experimentos posteriores se realizaron en presencia de HCl.



**Fig. IX.1.** 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.

La movilidad del EOF fue de  $10,0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  a pH 9,0, y disminuyó cuando el pH se redujo. Para el ATP, las movilidades aparentes fueron de  $-7,3 \times 10^{-4}$  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 está cercana a -2 dentro de estos intervalos de pH [129, 130], lo cual está de acuerdo con sus altas movilidades. Las movilidades aparentes del compuesto nominal de I (pico predominante) fueron de  $-3,7 \times 10^{-4}$  y  $-3,3 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$  a pH 3,3 y 2,2, respectivamente. Las movilidades de las impurezas de I fueron algo menores que las del compuesto nominal. El comportamiento de los iones de

los APPs puede explicarse usando las constantes de ionización descritas para el ácido metilfosfónico,  $\text{CH}_3\text{PO}(\text{OH})_2$ , cuyo valor es  $\text{p}K_1 = 2,3$  y  $\text{p}K_2 = 7,8$  [131]. Estos valores corresponden a la presencia de una carga negativa, o en todo caso a una carga negativa parcial, para los grupos  $-\text{PO}(\text{OH})_2$  a pH 3,3 y 2,2, respectivamente. La presencia de más de un grupo  $-\text{PO}(\text{OH})_2$  por ion explica las altas movilidades.

Por último, las movilidades de los componentes de I fueron algo menores que las del ATP (el co-ion del BGE). Como indica la teoría de la CZE, una menor movilidad de los iones de la muestra respecto a la movilidad de los iones del BGE contribuye al hacinamiento de la muestra, lo que permite alcanzar mayores eficacias [132].

La resolución entre los componentes de I mejoró conforme el pH se redujo de 3,3 a 2,0, lo que a su vez produjo cambios en la selectividad. El trabajo posterior se realizó a pH 2,2. Para comprobar la estabilidad del ATP a este pH se registró el espectro de infusión del BGE almacenado durante más de 45 días a 4 °C, y se comparó con los espectros de dos BGEs recién preparados (provenientes de dos frascos diferentes de ATP de Fluka). Estas tres disoluciones mostraron los picos  $[\text{M} - \text{H}]^-$  de ambos, el ATP y el adenosín difosfato (ADP), manteniéndose en todos los casos el mismo cociente de intensidades entre los picos (ATP/ADP  $\sim 2$ ). Es posible que el ADP estuviera presente en el reactivo sólido, o que se formase en las disoluciones de ATP, o bien que se generara en el espectrómetro de masas a partir del ATP; sin embargo, en cualquier caso, los espectros indicaron una reproducibilidad y estabilidad satisfactoria de las disoluciones de ATP como revelador.

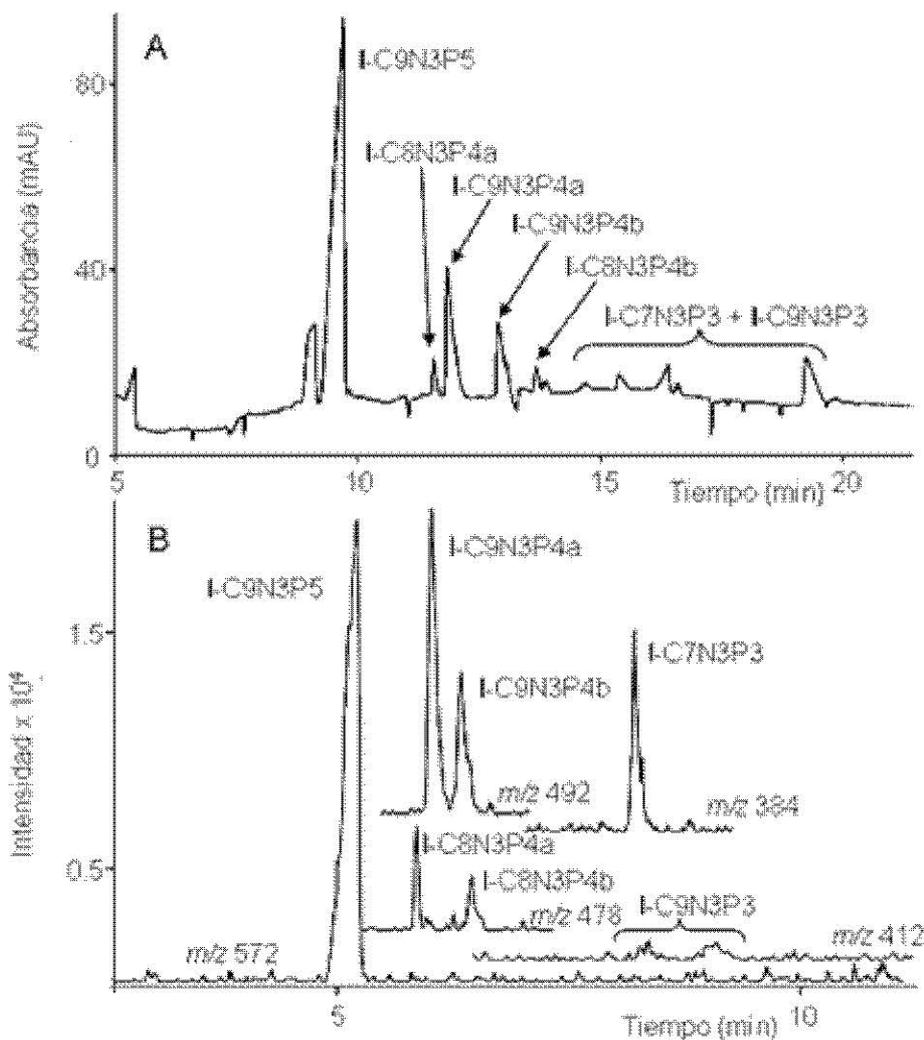
*IX.2.3. Selección de las condiciones de trabajo para CZE y tratamiento de datos*

Se realizaron inyecciones preliminares de **I** usando CZE-MS, que dieron tiempos de migración bajos, resoluciones pobres entre el compuesto nominal y sus impurezas, y bajos valores de *S/N*. Esto se atribuyó a la succión ejercida por el nebulizador de la fuente de ionización ESI, tanto durante la etapa de inyección como durante la separación. Los electroferogramas mejoraron mucho al detener el flujo de gas de nebulización y el de gas de secado antes de la inyección. La detención de los flujos de gas se implementó manualmente, deshabilitando la correspondiente opción en el cuadro de diálogo del programa de control del espectrómetro. Cuando se inició el método electroforético programado (inmediatamente después de la inyección), los suministros de gas se reactivaron de inmediato hasta alcanzar los valores preseleccionados. Este modo de trabajo proporcionó electroferogramas satisfactorios; sin embargo, se consiguió un mayor retraso de los picos, juntamente con una mejora en la resolución, mediante la aplicación de presión negativa sobre el vial de entrada durante la separación. De este modo se equilibró la presión de succión ejercida por el nebulizador del espectrómetro de masas. La mejor resolución entre los picos se alcanzó aplicando -30 mbar (-3 kPa). Esta presión negativa canceló la mayor parte del efecto de succión, haciendo que los picos de CZE-MS apareciesen en la misma región de migración que la observada para los electroferogramas de CZE-IPD. En estas condiciones, se obtuvieron los electroferogramas de CZE-MS de los productos **I-VIII**, usando los valores de *m/z* del pico de  $[M - H]^-$  del compuesto nominal como masa objetivo. Se obtuvieron sistemáticamente EIEs a los valores de *m/z* de todos los picos significativos observados en el espectro de infusión (valores de *m/z* en las Tablas IX.1-IX.4).

#### IX.2.4. Interpretación de los espectros

##### IX.2.4.1. Composición de I

Los electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD y los EIEs de I se muestran en la Fig. IX.2 A y B, respectivamente. El desfase temporal en los ejes de los electroferogramas de CZE-IPD y CZE-MS se puede atribuir a pequeñas variaciones de la presión de succión en el nebulizador de la fuente ESI y de la presión negativa aplicada a la entrada del capilar. Tanto los electroferogramas de CZE-IPD como los EIEs mostraron el pico del ion predominante,  $[M - H]^-$ , del compuesto nominal, I-C9N3P5 ( $m/z$  572). Después de este pico aparecieron los picos  $[M - H]^-$  de los dos pares de isómeros con cuatro grupos  $-PO(OH)_2$ , I-C9N3P4 y I-C8N3P4 ( $m/z$  492 y 478). En los correspondientes EIEs, los isómeros 'a' y 'b' (Tabla IX.1) fueron asignados de acuerdo con la similitud de los cocientes entre las áreas de los picos respecto a sus pesos estadísticos. Así, el pico mayor de cada par fue asignado al isómero 'a'. Además, en una estructura molecular dada, la ionización de un grupo ácido se inhibe cuando otro grupo ácido sufre ionización en una posición cercana dentro de la molécula. Por esta razón, la densidad de carga de los isómeros posicionales debe ser tanto mayor cuanto más alejados entre sí se encuentren los grupos  $-PO(OH)_2$ . Como consecuencia, los picos que migran más rápidamente deben atribuirse a los isómeros 'a', lo que coincide con las asignaciones realizadas en base a los cocientes de las áreas de los picos.



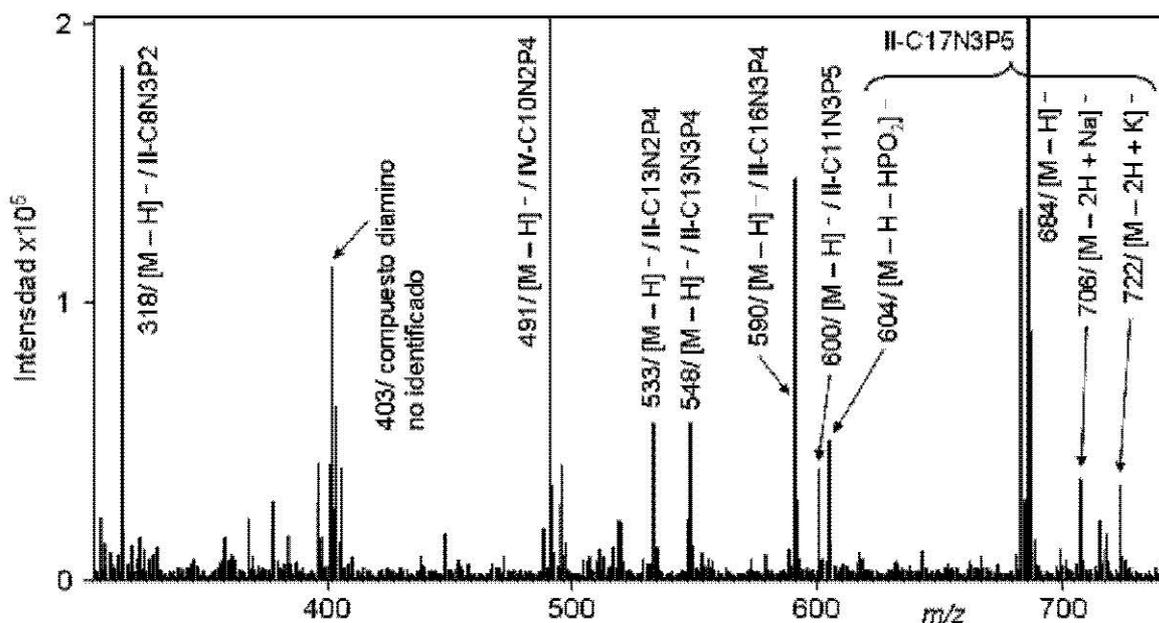
**Fig. IX.2.** Electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD (A) y CZE-MS (B), a partir de una disolución de 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de **I**; EIEs a los valores de  $m/z$  indicados (trazos desplazados verticalmente para mayor claridad); las estructuras se dan en la Tabla IX.1.

Los picos  $[\text{M} - \text{H}]^-$  de las impurezas con tres grupos fosfonato, **I-C7N3P3** ( $m/z$  384) y **I-C9N3P3** ( $m/z$  412), se detectaron a tiempos de migración largos. Debido probablemente a las bajas concentraciones individuales de los cuatro isómeros **I-C8N3P3**, no se encontraron picos significativos en el EIE con  $m/z$  398. En este caso, sólo los espectros de infusión proporcionaron evidencias sobre la presencia de isómeros **I-C8N3P3**. El compuesto con cinco grupos  $-\text{PO}(\text{OH})_2$  (el compuesto nominal) migra primero, seguido de las impurezas con cuatro y

tres grupos, respectivamente. Por lo tanto, el orden de migración global indica que la densidad de carga de los APPs disminuye cuando el número de grupos  $\text{PO(OH)}_2$  también lo hace. La asignación de los picos obtenidos mediante CZE-IPD a partir de los EIEs es tentativa; sin embargo, esta asignación está de acuerdo con las similitudes entre los valores relativos de ambos tiempos de migración y con las áreas relativas.

#### *IX.2.4.2. Composición de II*

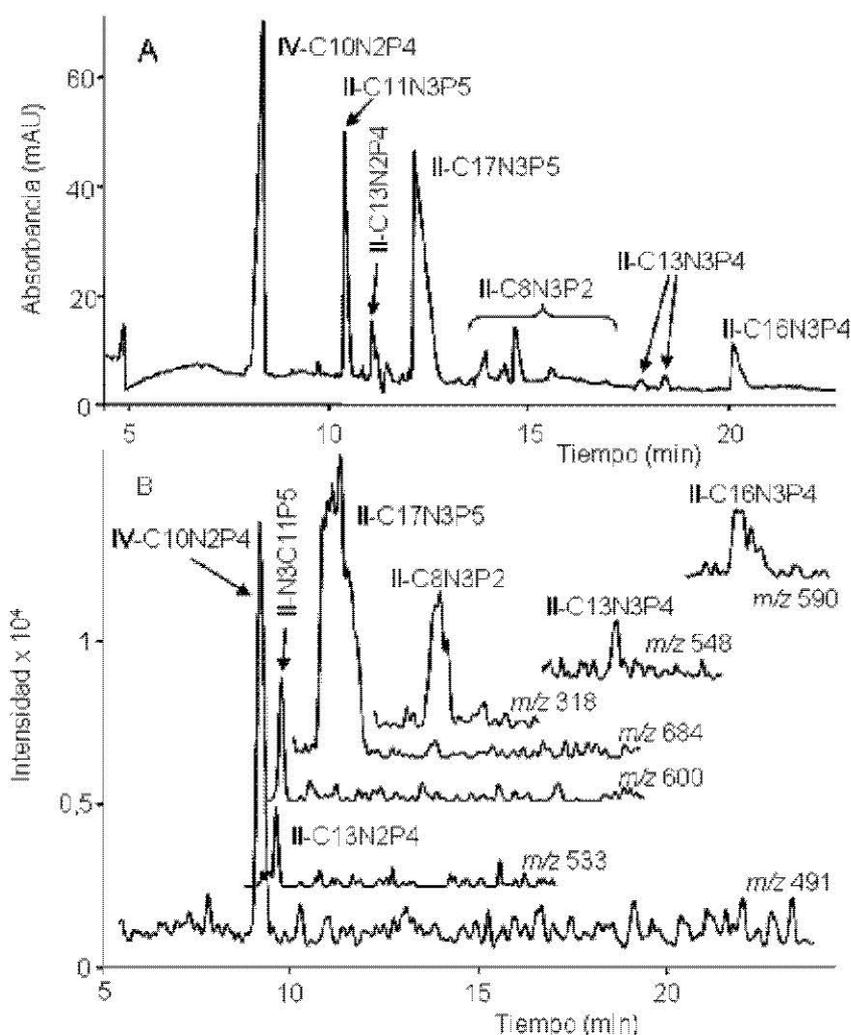
El espectro de masas de infusión del producto **II** (Fig. IX.3) mostró un pico predominante a  $m/z$  684, que correspondía al ion  $[\text{M} - \text{H}]^-$  del compuesto nominal, junto con dos pequeños picos, uno debido a  $[\text{M} - 2\text{H} + \text{Na}]^-$  a  $m/z$  706, y otro debido a  $[\text{M} - 2\text{H} + \text{K}]^-$  a  $m/z$  722 (**II** es una sal de potasio). Con excepción del pico a  $m/z$  604, atribuido a  $[\text{M} - \text{H} - \text{HPO}_2]^-$ , los picos producidos por pérdidas de agua y pérdidas adicionales de  $\text{HPO}_2$  con respecto a  $[\text{M} - \text{H}]^-$  fueron muy pequeños.



**Fig. IX.3.** Sección del espectro de **II** en modo ion-negativo, obtenido por infusión de una disolución de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se han rotulado 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 IX.2), más el pico  $[\text{M} - \text{H} - \text{HPO}_2]^-$  a  $m/z$  604, y los de las diaminas, que aparecen a valores de  $m/z$  impares.

Los electroferogramas de CZE-IPD y CZE-MS de **II** se muestran en la Fig. IX.4. De acuerdo con 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 hidrocarbonado con 9 átomos de carbono (ver Tabla IX.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 IX.2 se indican dos isómeros que cumplen estas condiciones. En el trazo de CZE-MS, estos dos pequeños picos aparecieron seguidos por uno más grande con  $m/z$  684, que correspondía al pico  $[\text{M} - \text{H}]^-$  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, pero 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**.



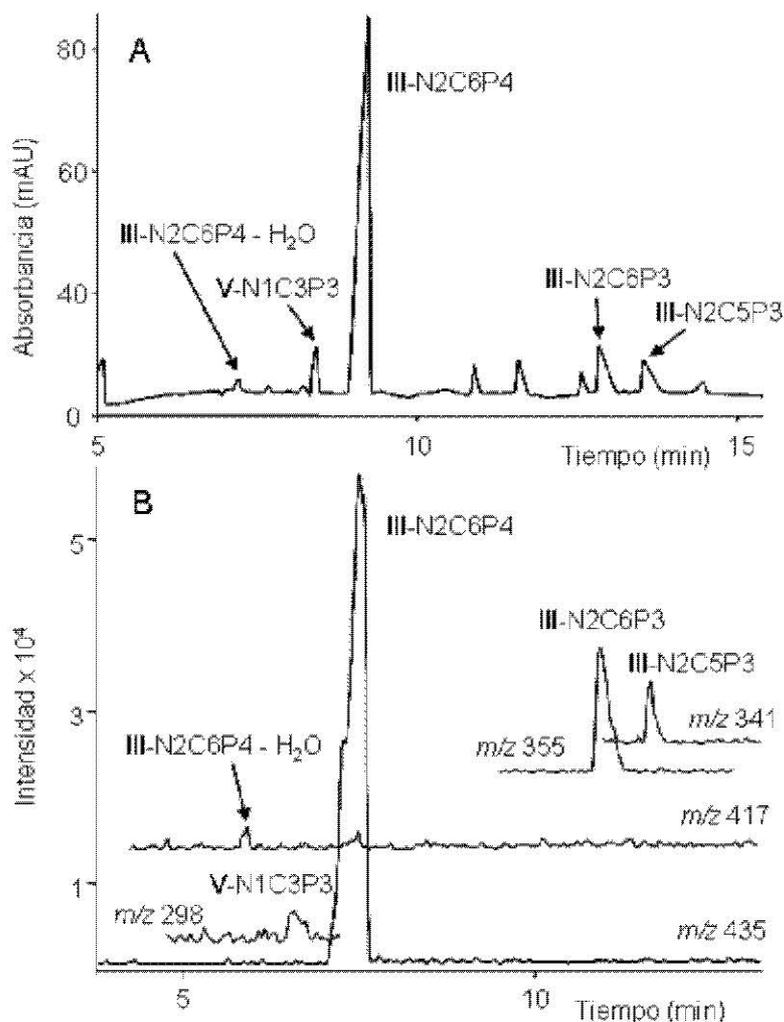
**Fig. IX.4.** Electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD (A) y CZE-MS (B) de una disolución de  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de **II**; las estructuras se muestran en la Tabla IX.2 (estructuras de **IV-C10N2P4** en la Tabla IX.3). Otros detalles como en la Fig. IX.2.

De acuerdo también con los EIEs, las series de los 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 IX.2). Finalmente, el último pico situado aproximadamente a un tiempo de migración de 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 IX.2 se indican los dos posibles isómeros y sus correspondientes pesos estadísticos.

#### *IX.2.4.3. Composición de III, IV y V*

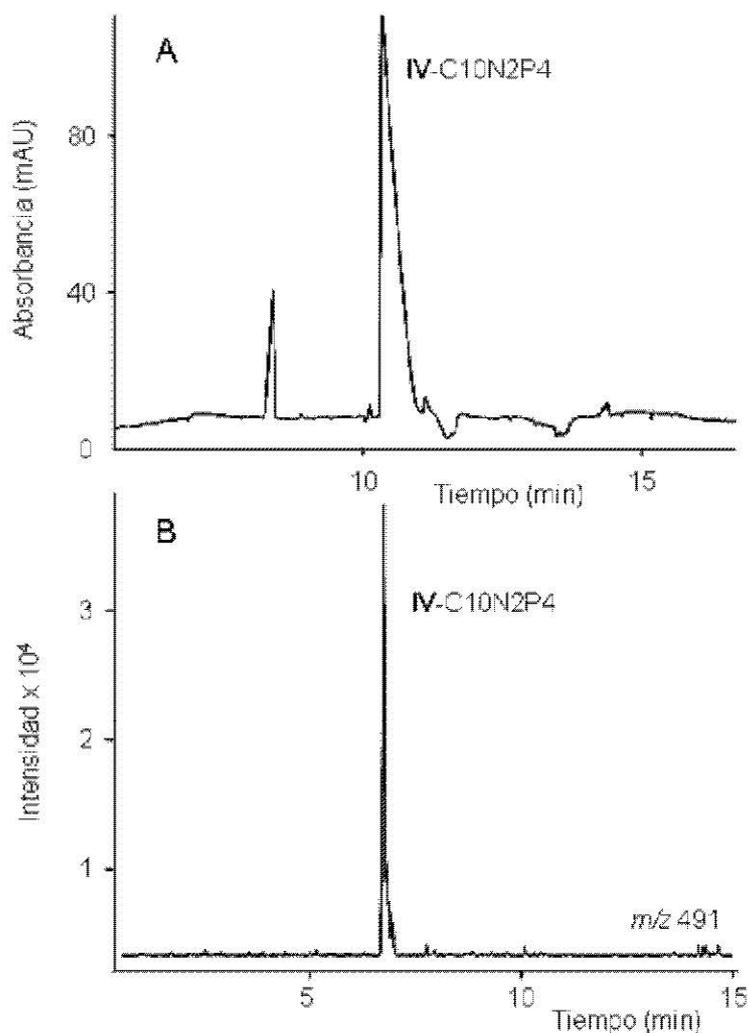
Por su parte, los electroferogramas de CZE-IPD y EIEs de **III** se muestran en la Fig. IX.5. Se observan los picos de los iones  $[M - H]^-$  del compuesto nominal ( $m/z$  435, Tabla IX.3), que predominan a los 9,3 min, así como picos de impurezas que carecen tanto de un grupo  $-PO(OH)_2$  como de un grupo  $-CH_2-PO(OH)_2$  con respecto al compuesto nominal ( $m/z$  355 y 341, respectivamente).



**Fig. IX.5.** Electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD (A) y CZE-MS (B) de una disolución de  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de **III**; las estructuras se muestran en la Tabla IX.3. Otros detalles como en la Fig. IX.2.

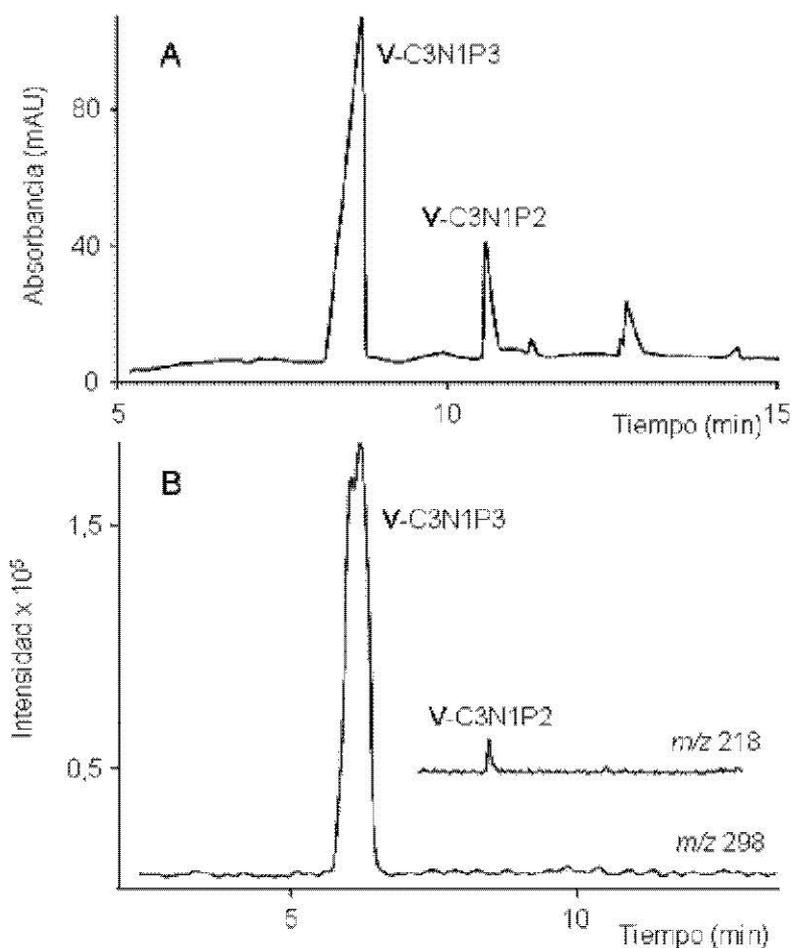
El compuesto nominal de **V**, **V-C3N1P2**, que está presente como impureza en **III**, da un pico pequeño a  $m/z$  298. Los electroferogramas de CZE-IPD del compuesto **III** mostraron otros picos pequeños que no pudieron ser identificados.

Los electroferogramas de CZE-IPD de **IV** (Fig. IX.6) mostraron un pico predominante a 10,3 min, que de acuerdo con el EIE a  $m/z$  451 correspondía al ion  $[\text{M} - \text{H}]^-$  del compuesto nominal, **IV-C10N2P4**. También mostraron un pico pequeño a 8,5 min que no pudo ser identificado.



**Fig. IX.6.** Electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD (A) y CZE-MS (B) de una disolución de  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de IV; las estructuras se dan en la Tabla IX.3. Otros detalles como en la Fig. IX.2.

Los electroferogramas de CZE-IPD y los EIEs de V (Fig. IX.7) mostraron el pico del ion  $[\text{M} - \text{H}]^-$  del compuesto nominal, V-C3N1P3 ( $m/z$  298), que predomina a los 8,7 min, y el de su impureza V-C3N1P2, que aparece a los 10,6 min ( $m/z$  218). Un pico pequeño a 12,7 min no pudo ser identificado. Por último, sólo el espectro de infusión proporcionó evidencias sobre la presencia de la impureza V-C2N1P2 (Tabla IX.3).

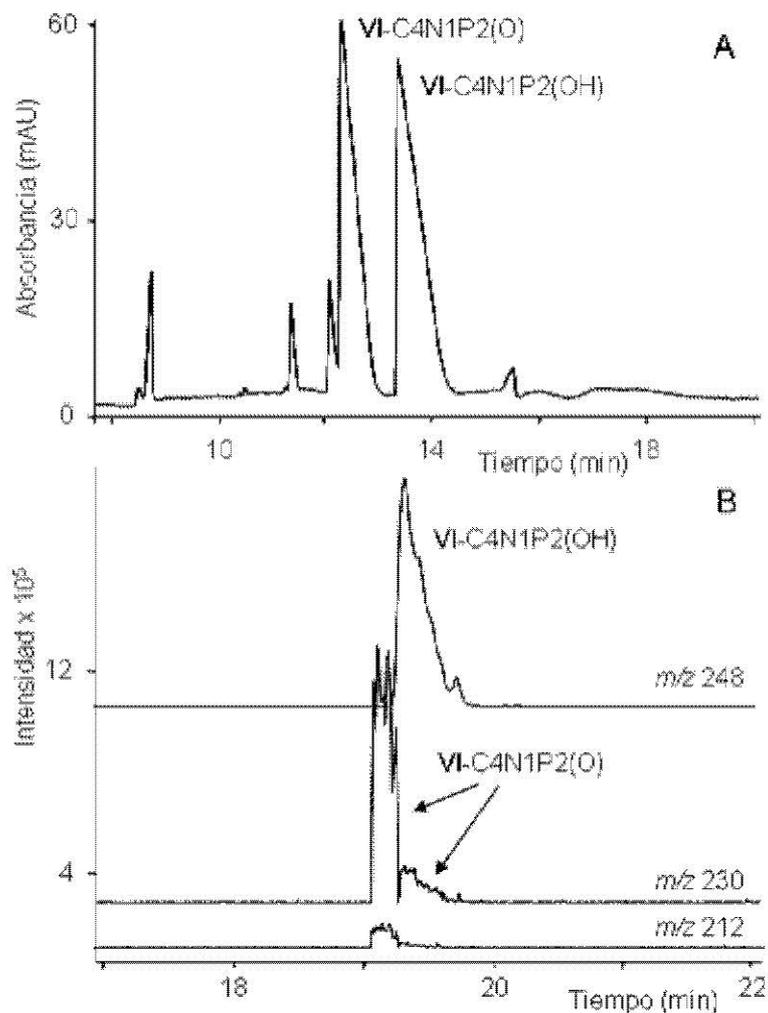


**Fig. IX.7.** Electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD (A) y CZE-MS (B) de una disolución de  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de V; las estructuras se muestran en la Tabla IX.3. Otros detalles como en la Fig. IX.2.

#### IX.2.4.4. Composición de VI

Los electroferogramas de CZE-IPD de VI mostraron dos picos de gran intensidad con áreas similares, en lugar de un único pico predominante (Fig. IX.8 A). El EIE a  $m/z$  248 mostró que el pico grande a mayor tiempo de migración correspondía al compuesto nominal VI-C4N1P2(OH) (Tabla IX.4). El otro pico grande correspondió a un compuesto deshidratado con respecto al compuesto nominal (EIE a  $m/z$  230). El pico pequeño adyacente al primer 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 IX.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. Por lo tanto, la presencia de una alta concentración del éster intramolecular resulta singular, lo que soporta la hipótesis de la intervención del hidroxilo en la reacción de deshidratación para dar lugar al éster. Se usará el acrónimo **VI- C<sub>4</sub>N<sub>1</sub>P<sub>2</sub>(O)** para nombrar a este compuesto en la Fig. IX.8 y en el texto que sigue.



**Fig. IX.8.** Electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD (A) y CZE-MS (B) de una disolución de  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de VI; las estructuras se dan en la Tabla IX.4. Otros detalles como en la Fig. IX.2.

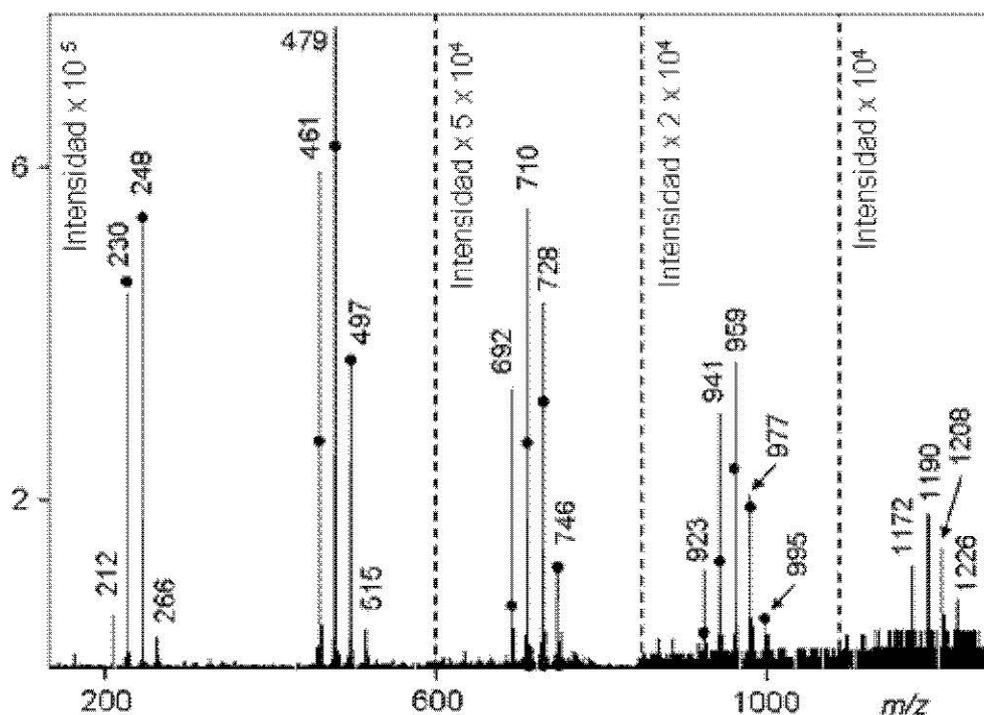
Para estimar la relación de concentraciones VI-C4N1P2(O)/ VI-C4N1P2(OH), primero se corrigieron las áreas de los picos de los electroferogramas de CZE-IPD y CZE-MS (dividiendo por el correspondiente tiempo de migración de los picos). La relación de las áreas corregidas de los dos picos predominantes, expresada como cociente de porcentajes fue 46/ 54 para el trazo CZE-IPD, y 42/ 58 para los EIEs a  $m/z$  230 y 248; sin embargo, debido a que no se conocen las diferencias de sensibilidad entre el compuesto nominal y el deshidratado, ni en IPD ni en MS, la relación real entre sus concentraciones puede ser diferente de estos valores. Sin embargo, estas dos estimaciones de la

relación de concentraciones coinciden bastante bien, lo que indica que el cociente real de concentraciones no debe ser muy distinto de 46/ 54 o de 42/ 58.

Por otra parte, si se comparan las áreas de los picos de los EIEs a valores de  $m/z$  230 y 248 entre 19,3 y 19,7 min (Fig. IX.8 B) se deduce que menos del 10% del compuesto VI-C4N1P2(OH) experimenta deshidratación en el espectrómetro de masas. Por consiguiente, en el espectro de infusión de VI, la mayor contribución a la abundancia del ion a  $m/z$  230 se debe atribuir a la presencia del compuesto deshidratado, VI-C4N1P2(O), en la disolución inyectada, y sólo una pequeña parte de dicha contribución puede ser debida a deshidratación del compuesto nominal en el espectrómetro de masas. Como se muestra en el EIE a  $m/z$  212 (Fig. IX.8 B), un pequeño porcentaje de VI-C4N1P2(O) también se deshidrata en el espectrómetro de masas. Por lo tanto, el pequeño pico a  $m/z$  212 en el espectro de infusión se puede atribuir a esta deshidratación. Por el contrario, el pico a  $m/z$  266 debe estar causado por retención de agua por parte del VI-C4N1P2(OH).

El grupo de picos con  $m/z$  461, 479 y 497 (Fig. IX.9) puede atribuirse a dímeros con la siguiente composición:  $[2 \text{ VI-C4N1P2(O)} - \text{H}]^-$ ,  $[\text{VI-C4N1P2(OH)} + \text{VI-C4N1P2(O)} - \text{H}]^-$  y  $[2 \text{ VI-C4N1P2(OH)}]^-$ , respectivamente. De un modo similar, el grupo de picos con  $m/z$  692, 710, 728 y 746 pueden deberse principalmente a trímeros con la siguiente composición:  $[3 \text{ VI-C4N1P2(O)} - \text{H}]^-$ ,  $[2 \text{ VI-C4N1P2(OH)} + \text{VI-C4N1P2(O)} - \text{H}]^-$ ,  $[\text{VI-C4N1P2(OH)} + 2 \text{ VI-C4N1P2(O)} - \text{H}]^-$  y  $[3 \text{ VI-C4N1P2(OH)} - \text{H}]^-$ , respectivamente. Pueden formularse combinaciones análogas de VI-C4N1P2(O) y VI-C4N1P2(OH) para explicar los grupos de picos de tetrameros ( $m/z$  692, 710, 728 y 746), pentámeros ( $m/z$  923, 941, 959, 977 y 995) y así sucesivamente. Se puede usar una serie binomial para estimar las intensidades relativas de los oligómeros dentro del correspondiente grupo de picos. Una serie binomial es la expansión de  $(x + 1)^p$ , donde  $x$  es la razón de probabilidades entre dos sucesos,

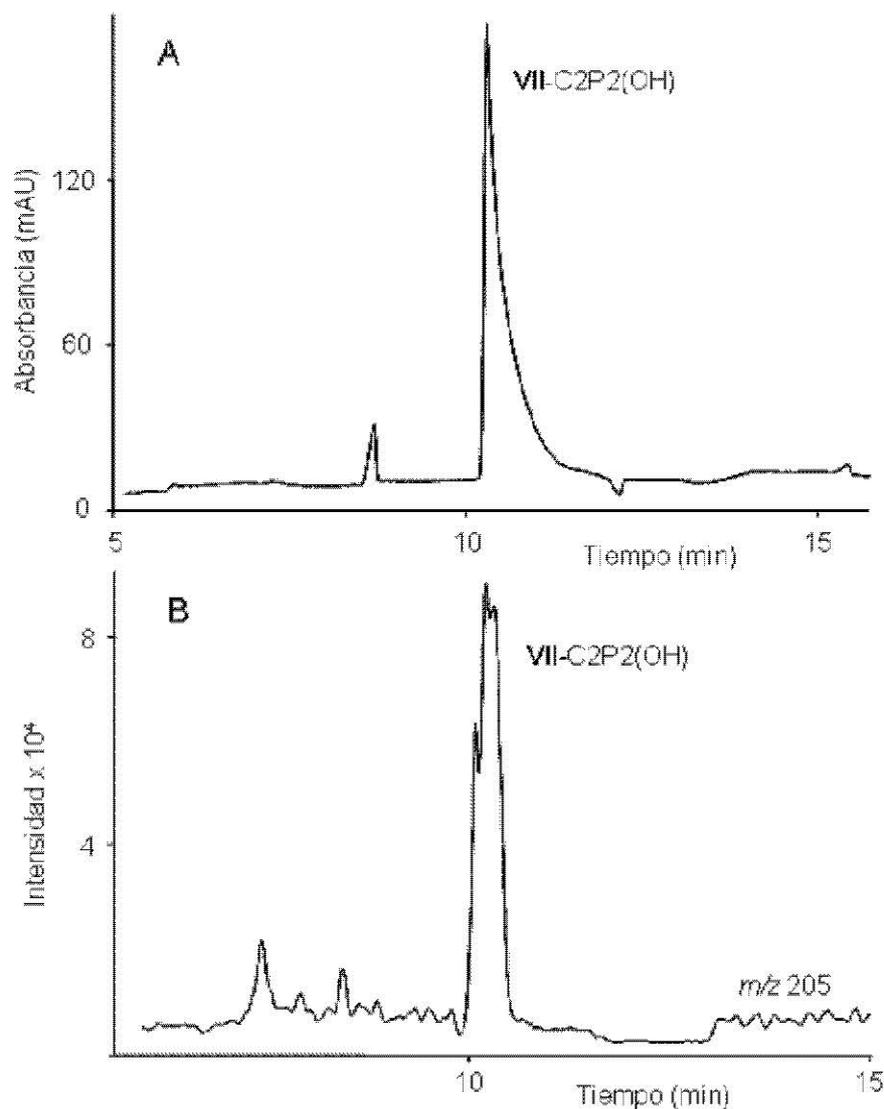
por ejemplo, una unidad de VI-C4N1P2(O) frente a una de VI-C4N1P2(OH). El número de sucesos,  $p$ , es el número de unidades en el oligómero, siendo  $p = 1, 2, 3$  y  $4$  para monómeros, dímeros, trímeros y tetrameros, respectivamente. El valor de  $x$  no se conoce, pero debe ser cercano al cociente entre las concentraciones de VI-C4N1P2(O) y VI-C4N1P2(OH). Como se ha discutido anteriormente, los electroferogramas de CZE-IPD y los EIEs indican una relación de concentraciones cercana a  $46/54$  y a  $42/58$ , respectivamente. Las intensidades relativas entre picos, predichas por la distribución binomial para  $x = 46/54$  a valores crecientes de  $p$ , se indican en la Fig. IX.9. Los perfiles de intensidad resultantes son aproximaciones groseras a las contribuciones reales de los oligómeros a las abundancias de los picos, pero ilustran la naturaleza del espectro de VI. Dentro de un mismo grupo de picos, la proporción mayor de las especies más ligeras respecto a los valores calculados puede ser debida a la deshidratación de los oligómeros en el espectrómetro. La deshidratación de un oligómero, puede ocurrir por formación de un éster intramolecular, contribuyendo así a la abundancia del pico del oligómero de masa inmediatamente inferior.



**Fig. IX.9.** Espectro de masas en modo ion negativo de VI, obtenido por infusión 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  $\text{VI-C4N1P2(O)}/\text{VI-C4N1P2(OH)} = 46/54$ . Como se indica en la figura, la escala de abundancia es distinta para cada sección de  $m/z$ .

#### IX.2.4.5. Composición de VII y VIII

Los compuestos nominales de ambos, VII y VIII, son hidroxidifosfonatos, pero con grandes diferencias estructurales y propiedades muy distintas entre ellos. Así, la esterificación intramolecular, que hubiese supuesto la formación de un anillo de tres miembros, no se observa en VII. En el electroferograma de CZE-IPD se observó un pico predominante a 10,2 min, precedido por otro más pequeño a 8,6 min (Fig. IX.10).

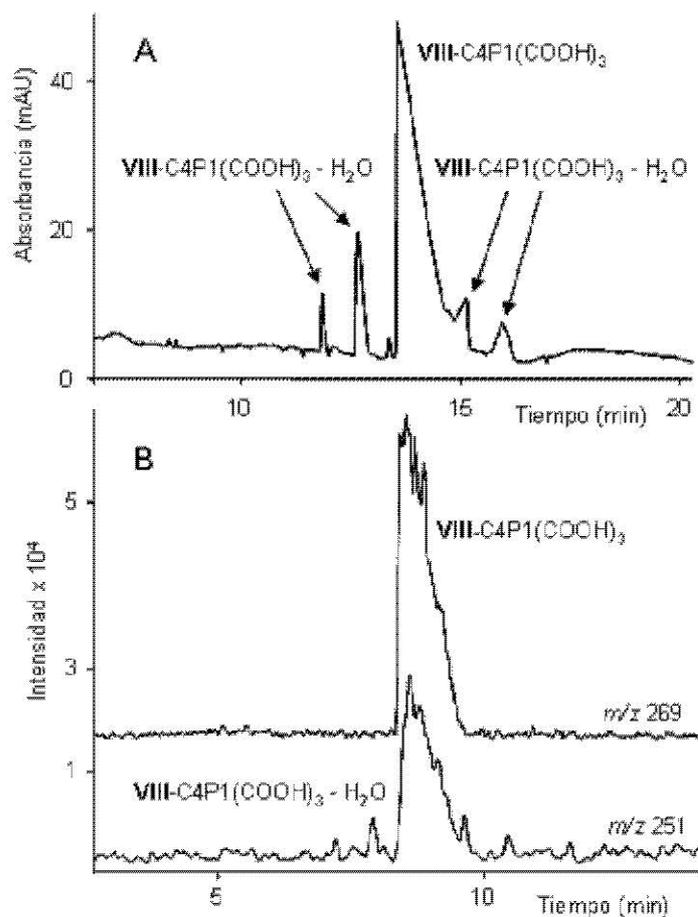


**Fig. IX.10.** Electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD (A) y CZE-MS (B) de una disolución de  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de VII; las estructuras se dan en la Tabla IX.4. Otros detalles, como en la Fig. IX.2.

Se obtuvieron EIEs para los valores de  $m/z$  de todos los picos significativos del espectro de infusión; sin embargo, sólo el electroferograma con  $m/z$  205 (Fig. IX.10), que corresponde al ion  $[\text{M} - \text{H}]^-$  del compuesto nominal (Tabla IX.4.), proporcionó picos significativos. En el EIE obtenido a  $m/z$  205 se observó un pico predominante a 10,1 min, precedido por dos picos pequeños a 7,2 y 8,3 min. De acuerdo con lo observado, los picos predominantes tanto del electroferograma de CZE-IPD como del EIE obtenido a  $m/z$  205 se asignaron al compuesto nominal, y los picos pequeños, a isómeros posicionales. Los isómeros

pueden formularse como ácido 1-hidroxiethylidén-1,2-difosfónico (cuya estructura molecular se indica en la Tabla IX.4), y ácido 1-hidroxiethylidén-2,2-difosfónico. Sus pesos estadísticos respectivos son de 2:1, de modo que el pico pequeño del electroferograma de CZE-IPD puede ser debido al primero de estos dos isómeros.

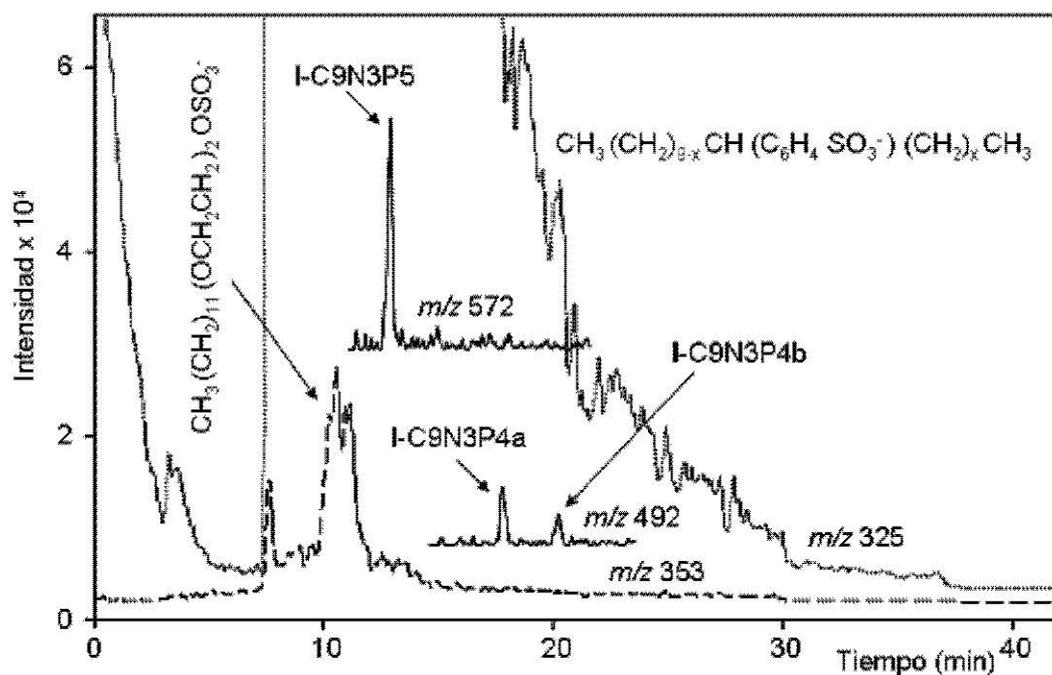
En el electroferograma de CZE-IPD de VIII y en sus EIEs (Fig. IX.11) se muestran el pico del ion  $[M - H]^-$  del compuesto nominal, VIII-C4P1(COOH)<sub>3</sub> ( $m/z$  269, Tabla IX.4), que es predominante a 13,5 min, y al menos cuatro picos más pequeños, los cuales aparecen en el rango 11,9 – 16,0 min. Estos picos, con  $m/z$  251, corresponden a los iones  $[M - H - H_2O]^-$ , siendo M la masa del compuesto nominal. De acuerdo con lo observado, estos picos se atribuyeron a la presencia de anhídridos intramoleculares en las disoluciones inyectadas. Se pueden formular hasta tres anhídridos diferentes por condensación entre los tres carboxilatos del compuesto nominal, tomados los grupos carboxilato de dos en dos, y hasta tres anhídridos más por condensación entre el grupo  $-PO(OH)_2$  y cada uno de los grupos carboxilato.



**Fig. IX.11.** Electroferogramas obtenidos mediante CZE-IPD (A) y CZE-MS (B) de una disolución de  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de VIII; las estructuras se dan en la Tabla IX.4. Otros detalles, como en la Fig. IX.2.

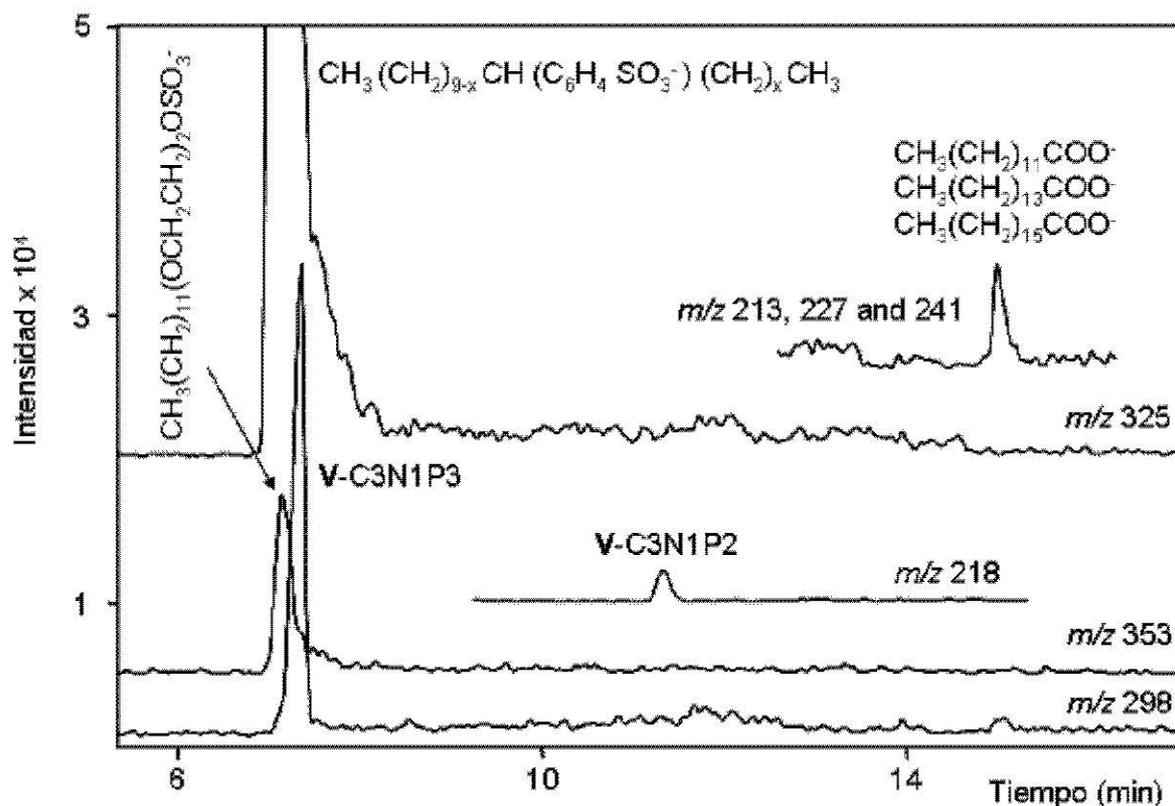
#### IX.2.5. Aplicación a productos industriales

Se analizaron detergentes líquidos para lavado a mano y a máquina, conteniendo el 0,1% de I y el 1,4% de V, respectivamente (concentraciones declaradas por el fabricante). Las muestras también contenían grandes concentraciones de surfactantes aniónicos y no iónicos (alquilbencénsulfonatos, alquilétersulfatos, ácidos grasos y alcoholes polietoxilados), así como pequeñas concentraciones de otros productos.



**Fig. IX.12.** Electroferogramas CZE-MS de un detergente líquido para lavado automático, que contiene un porcentaje declarado de I de 0,1%; EIEs 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). Otros trazos: alquilbencénsulfonato (trazo de los isómeros con 12 átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada,  $m/z$  325), alquilétersulfato (trazo del oligómero con 12 átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada y dos unidades de EO,  $m/z$  353).

Los picos de los APPs se observaron mediante CZE-IPD y CZE-MS; sin embargo, las relaciones  $S/N$  fueron mejores mediante detección con MS. En la Fig. IX.12 se muestran los EIEs, en los que se pueden observar los picos de los iones  $[M - H]^-$  de I-C9N3P5 y de sus dos impurezas principales, I-C9N3P4a y I-C9N3P4b, para el detergente líquido para lavado a máquina. En esta figura se muestran también los EIEs obtenidos a los valores de  $m/z$  de los iones  $[M - H]^-$  de varios surfactantes aniónicos presentes en la muestra. Del mismo modo, en el detergente líquido para lavado a mano se observaron los picos de los iones  $[M - H]^-$  de V-C3N1P3 y de su impureza principal, V-C3N1P2, juntamente con los picos de algunos ácidos grasos y de diversos surfactantes aniónicos (Fig. IX.13).



**Fig. IX.13.** Electroferogramas CZE-MS de un detergente líquido para lavado a mano que contiene un porcentaje declarado de V de 1,4 %. Los EIEs 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). Trazos de varios ácidos grasos a  $m/z$  213, 227 y 241; otros trazos como en la Fig. IX.12.

### IX.3. Conclusiones

Los APPs de grado técnico se han podido caracterizar en tiempos cortos mediante CZE-IPD y CZE-MS. Se recomienda el empleo de un BGE acuoso conteniendo ATP a pH 2-3, tanto para detección mediante IPD como mediante MS. Los compuestos nominales y las impurezas presentes en ocho APPs comunes en la industria y en productos de consumo doméstico se pudieron resolver en tiempos de análisis muy cortos. La identificación de los compuestos presentes se consiguió mediante el estudio de los EIEs, que se obtuvieron a los valores de  $m/z$  de los picos más significativos observados en los espectros de infusión. Se han hallado compuestos carentes de uno o más grupos  $-\text{PO}(\text{OH})_2$  y

$-\text{CH}_2\text{-PO}(\text{OH})_2$ , o incluso compuestos que presentaban un esqueleto hidrocarbonado distinto respecto al de su compuesto nominal. En el compuesto VI se ha detectado la presencia, en concentración elevada, de un compuesto deshidratado, no formado en el espectrómetro de masas, y que probablemente es un ester intramolecular formado entre el grupo hidroxilo y uno de los grupos  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ . La presencia de este compuesto puede ser relevante desde el punto de vista de las propiedades de VI en relación a sus aplicaciones industriales. En el producto VIII se han encontrado anhídridos formados por condensación entre pares de grupos carboxilato, o bien entre uno de los tres grupos carboxilato y el grupo fosfonato  $-\text{PO}(\text{OH})_2$ .

Los métodos analíticos propuestos pueden aplicarse ventajosamente al control de calidad de APPs industriales. Además, como los APPs se producen en grandes cantidades, es de especial interés conocer la naturaleza tanto de los compuestos nominales como de las impurezas que se vierten realmente en el medio ambiente. También se ha demostrado la capacidad del método de CZE-MS para identificar APPs en muestras complejas, como los productos para lavado de ropa. Por último, los APPs y sus impurezas proporcionan una huella dactilar que puede ser útil para trazar el origen de las materias primas y productos que contengan estos aditivos.

El presente trabajo se publicó en *Electrophoresis* 2007, 28, 341-352, con el título *Rapid characterization of alkylpolyphosphonates by CZE with indirect photometric and mass spectrometric detection*.



**Chapter X**  
**Conclusions**

## X. Conclusions

**Derivatization of FAEs with maleic anhydride.** Derivatization of FAEs can be performed in mild conditions (80 °C) by melting the sample with maleic anhydride. In the presence of an excess of suspended grinded urea, which retains water and hinders acidification of the reaction mixture, the reaction was largely speeded up, the derivatization yields of both non-ethoxylated and ethoxylated alcohols approaching 100% in a short time (15 min). In the absence of urea, the reaction rates and yields were rather low.

**Use of 1,4-dioxane as reaction medium.** Esterification with maleic anhydride can be also quickly performed with a ca. 100% yield in the presence of 1,4-dioxane, which is useful to accurately introduce small standard concentrations in the reaction mixture. Using a 1,4-dioxane solution, an internal standard can be also introduced if necessary, i.e. to correct occasional decreases of the reaction yield, as those observed in the presence of large amounts of water. 1,4-dioxane was selected as solvent at the sight of its low reactivity, weak proton acceptor character, good solvent properties, water miscibility in all proportions, high boiling point, and low environmental impact.

**Derivatization of FAEs with phthalic anhydride.** Esterification of FAEs with phthalic anhydride was also conveniently carried out using 1,4-dioxane as reaction medium. Solubility of phthalic anhydride in 1,4-dioxane increased with temperature, which made possible the use of a 2.5 M solution. This assured an excess reagent with a minimum dilution of the samples, even in the presence of significant amounts of water. The boiling point of this solution approached 120

°C, which made possible the use of high temperatures during derivatization, thus reducing reaction time. As occurred with maleic anhydride, the reaction was speeded up when grinded urea was added to the reaction medium, derivatization being completed at 110 °C in 60 min.

**Derivatization of FAEs with diphenic anhydride.** In comparison to maleic and phthalic anhydrides, FAE derivatization with diphenic anhydride was slower, being completed at 105 °C in about 90 min. However, as stated below, derivatization with diphenic anhydride had a number of advantages concerning both chromatographic performance and UV-Vis detection.

**Derivatization of FAEs with other cyclic anhydrides.** Derivatization with 3-nitrophthalic and 1,8-naphthalic anhydrides was also tried. The reaction rates were high with 3-nitrophthalic anhydrides, but reactivity was only weakly oriented towards one of the two possible derivatives (positional isomers). Therefore, this asymmetric reagent gave two chromatographic peaks per oligomer. On the other hand, the derivatives of 1,8-naphthalic anhydride were not soluble in any of the aqueous or hydroorganic media tried, then this reagent was also discarded.

**Tolerance of FAE esterification to water.** Using any of the anhydrides, the procedures were fairly tolerant to the presence of small or moderate amounts of water. When the sample contained 50% water, the reaction yield decreased to ca. 90% with maleic and diphenic anhydrides. Correction with an internal standard was demonstrated.

**Response factors of the esterified FAE oligomers.** Using maleic anhydride, the UV-vis response factors of the hemiesters of the FAE oligomers were relatively close to 1. The lowest response factors were those of the mono- and diethoxylated oligomers, with values not lower than 0.7. The response factors of FAE phthalates decreased when the number of EO units increased, reaching constant values of ca. 0.40 and 0.65 for the  $n = 8$  and 18 series, respectively, when  $m > 3$ . Differently from FAE maleates and phthalates, FAE diphenates of the monoethoxylated and diethoxylated oligomers ( $m = 1$  and 2) showed large response factors (close to 1 and 0.80, respectively), and a constant value of ca. 0.62 was reached when  $m > 3$ . This was of interest, since the oligomers with  $m = 1$  and 2 predominate in environmental samples.

**Chromatographic separation of the derivatives.** Using derivatization with either maleic, phthalic or diphenic anhydride, the successive hydrocarbon series of linear FAEs of industrial interest, from  $n = 8$  up to 20, were well resolved using a C8 column of the fused-core type and gradient elution with ACN/ water plus 0.1% acetic acid. Also, superior resolution between the consecutive oligomers within the series was obtained at high values of  $m$ .

**Reversion of the elution order of the lighter oligomers within the series.** Independently from the nature of the cyclic anhydride, a reversion of the elution order for the oligomers with  $m < 2$  hindered direct quantitation of a few oligomers within the series. Intramolecular solvation should extensively occur when  $m > 2$ ; thus, reversion of the elution order when  $m < 2$  was attributed to the rigidity of the hydrophilic moiety of the hemiesters when it is too short, which should hinder intramolecular solvation.

**Influence of the column temperature.** Also for all the cyclic anhydrides, resolution between consecutive hydrocarbon series improved at increasing column temperatures. On the contrary, resolution between the consecutive oligomers within the series was enhanced at decreasing temperatures. Thus, using phthalic anhydride, a column temperature as high as 35 °C was recommended to better resolve the series (up to  $m = 18$  in the case of FAEs with even values of  $n$ ), while still maintaining a satisfactory baseline resolution between consecutive peaks. For the diphenates, all the oligomers with  $m > 3$  were very well resolved within the series, and using column temperatures of 45-55 °C, consecutive series with even values of  $n$  were resolved up to the  $m = 18$  oligomer.

**Column temperature and reversion of the elution order.** The selectivity between the oligomers with  $m = 0$  and 1 with respect to the other oligomers within the series depends also on temperature. This opened a way to avoid perfectly overlapped peaks, which is necessary both to visually estimate the relative abundances of the lighter oligomers, and to success when a deconvolution algorithm is applied. Alternatively, perfect overlapping of pairs of peaks can be achieved by selecting the column temperature, which was useful to estimate the areas of the overlapped peaks by interpolation (see below). The degree of reversion of the elution order of the oligomers with  $m = 0$  and 1 was reduced by reducing temperature, which was also useful to obtain fully ordered series with a PFP column (see below).

**Peak symmetry and efficiency.** Derivatization with maleic anhydride gave tailing peaks. The shape of the peaks of the FAE maleates also varied with the concentration of the oligomers. On the contrary, using phthalic and diphenic

anhydrides, fairly symmetric peaks were obtained. The diphenates of the FAE oligomers show peak symmetries similar to those of the phthalates, and much better than those of the maleates. The efficiency also increased in the order maleates  $\ll$  phthalates  $<$  diphenates.

**Sensitivity and LODs at different detection wavelengths.** The UV-Vis sensitivity at 200 nm was significantly higher for the FAE diphenates than for the phthalates, and much higher than for the maleates. Using phthalic anhydride and detection at 200 nm, the LODs were of ca. 2 and 4  $\mu$ M for non-ethoxylated and ethoxylated alcohols with  $m \leq 3$ , respectively, and improved slightly at 230 nm. The LODs were lower for the diphenates. Using either phthalic or diphenic anhydride, monitoring at 220-224 nm rather than using 200 nm can be performed without a LOD increase.

**Prediction of the retention time of the derivatives upon modelling.** Using FAE maleates, models capable of predicting the retention time of the oligomers as a function of the average ACN concentration during isocratic or gradient elution, were developed. Models are useful to achieve even resolution between consecutive oligomers for groups of target oligomers and within a given chromatographic time.

**Full FAE characterization by peak deconvolution.** Using maleic anhydride, full resolution of all the oligomers in industrial FAE mixtures and manufactured products by peak deconvolution was demonstrated. For this purpose, a novel deconvolution strategy, which was based on a genetic algorithm, assisted by the unconstrained local method of Powell, was developed. The occasional

interference caused by exotic peaks, as those of olein, was removed by previous multivariate deconvolution making use of the DAD spectral information.

**Full FAE characterization by peak area interpolation.** Deconvolution by multivariate chemometric techniques requires expertise and time. Then, prediction of the areas of the overlapped peaks by interpolation, which provided a much simpler solution, was also developed. For this purpose, chromatograms obtained at selected column temperatures, where overlapping involved a reduced number of peaks (ideally only two peaks overlapped each other within a given chromatographic time region), were used. With these chromatograms, and owing to both the regularity of the retention time of the successive oligomers, and the smooth variation of the oligomer concentrations within the hydrocarbon series, the concentrations of all the oligomers were accurately established.

**Development of a 2D-HPLC system served by a single pump.** A novel way of carrying out HPLC-2D with a single pump was designed and demonstrated. For this purpose, the combined operation of a column selection valve and an auxiliary 6-port 2-position valve was implemented. Flow at the first dimension column was stopped during system re-conditioning and elution on the second dimension column. However, it was shown that band broadening within the first column during elution on the second dimension was negligible.

**FAE characterisation by 2D-HPLC.** Separation of FAE diphenates by hydrocarbon series was achieved using an alkyl-diol column as first dimension. Separation of the series was also achieved with an alkyl-cyano column, but the alkyl-diol column was preferred. The use of an ACN/ water gradient was very convenient owing to compatibility with the mobile phase required to elute the

second dimension column. The effluent was heart-cut to transfer the series to the second dimension. The oligomers within the series were resolved by using either a C8 or a PFP column, and an ACN/ water gradient, as second dimension.

**Full FAE resolution within the hydrocarbon series by 2D-HPLC.** The reversion of the  $m = 0$  and 1 oligomers within the series, which was low when bulky diphenic anhydride was used for derivatization, was reduced when the C8 column was replaced by a PFP column at the second dimension, and was further progressively reduced by decreasing the column temperature. At 3 °C, all the oligomers within the series, from  $m = 0$  up to  $m > 20$ , appeared well ordered, with partial resolution between the  $m = 0$  and 1 peaks. Resolution of the lighter oligomers within the series further improved as  $n$  increased from  $n = 12$  to 18.

**Application to FAE characterization and determination in industrial and environmental samples.** The practical use of the proposed procedure to characterize and quantify FAEs in manufactured products, as well as in river and sea waters, and in effluents of wastewater treatment plants, was demonstrated. Using UV-Vis detection, the lowest LODs were obtained using derivatization with diphenic anhydride.

**Characterization of industrial APPs by CZE-IPD and CZE-MS.** Technical grade APPs can be characterized in a short time by CZE-IPD and CZE-MS. An aqueous BGE containing ATP at pH 2 - 3 was recommended for both IPD and MS detection. The nominal compounds and the impurities present in eight common industrial APPs were well resolved in a short time. Identification of the compounds was based on the EIEs, which were obtained at the  $m/z$  values of the significant peaks observed in the infusion spectra.

**Impurities found in industrial APPs.** Compounds lacking  $-\text{PO}(\text{OH})_2$  and  $-\text{CH}_2-\text{PO}(\text{OH})_2$  groups, or having a different hydrocarbon skeleton, with respect to the nominal compounds, were found. A dehydrated compound, probably an intramolecular ester formed between the hydroxyl and one of the  $-\text{PO}(\text{OH})_2$  groups, was found in a large concentration in hydroxyethylaminobis(methylenephosphonic acid) (product VI). This can be relevant from the viewpoint of the properties of product VI in relation to its industrial applications. Anhydrides formed by condensation between carboxylates, or between a carboxylate and the  $-\text{PO}(\text{OH})_2$  group, were observed in 2-phosphonobutane-1,2,4-tricarboxylic acid (product VIII).

**Application of CZE-MS of APPs to quality control of cleaning products.** The capability of CZE-MS to identify APPs in complex samples, as cleaners for clothes, was demonstrated. Finally, the detection of APPs and their impurities provided a fingerprint which can be useful to trace back the origin of raw materials and products containing these additives.

---

## **Capítulo XI**

### **Referencias**

**XI. Referencias:**

- [1] A. Marcomini, M. Zanette, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 193.
- [2] H. P. Fiedler, *Lexicon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und Angrenzende Gebiete*, Edition Cantor, Aulendorf, 1989.
- [3] C. J. Sparham, I. D. Bromilow, J. R. Dean, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 39.
- [4] P. Rudewicz, B. Munson, *Anal Chem.* 58 (1986) 674.
- [5] C.V. Eadsforth, A. J. Sherren, M.A. Shelby, R. Toy, W.S. Eckhoff, D. C. McAvoy, E. Matthijs, *Ecotox. Environ. Safe.* 64 (2006) 14.
- [6] S. E. Belanger, P. B. Dorn, R. Toy, G. Boeije, S. J. Marshall, T. Wind, R. Van Compernelle, D. Zeller, *Ecotox. Environ. Safe.* 64 (2006) 85
- [7] R. Van Compernelle, D. C. McAvoy, A. Sherren, T. Wind, M.L. Cano, S. E. Belanger, P. B. Dorn, K. M. Kerr, *Ecotox. Environ. Safe.* 64 (2006) 61
- [8] I. Ribosa, J. Sanchez-Leal, A. Marsal, M.T. García, *Afinidad* 64 (2007) 528.
- [9] E. Jurado, M. Hernández-Serrano, J. Nunez-Olea, M. Lechuga, *J. Surfactants Deterg.* 10 (2007) 145.
- [10] C. Crescenzi, A. Di-Corcia, R. Samperi, A. Marcomini, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1797.
- [11] N.S. Battersby, A.J. Sherren, R.N. Bumpus, R. Eagle, I.K. Molade, *Chemosphere* 45 (2001) 109.
- [12] S. Chiron, E. Sauvard, R. Jeannot, *Analisis* 28 (2000) 535.
- [13] W. Miskiewicz, J. Szymanowski, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 25 (1996) 203.
- [14] V. Bernabé-Zafón, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, *J. Chromatogr. A* 1118 (2006) 188.
- [15] Y. Mengerink, H.C.J. De Mans, S. Van der Wal, *J. Chromatogr.* 552 (1991) 593.
- [16] D. Cho, J. Hong, S. Park, T. Chang, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 199.

- [17] B. Trathnigg, C. Rappel, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 149.
- [18] B. Trathnigg, A. Gorbunov, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 207
- [19] J.C. Dunphy, D.G. Pessler, S.W. Morrall, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1223.
- [20] K.B. Sherrard, P.J. Marriott, M.J. McCormick, R. Colton, G. Smith, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3394.
- [21] G. Cassani, C. Pratesi, L. Faccetti, S. Pravettoni, G. Nucci, N. Andriollo, L. Valtorta, L. Matheson, *J. Surf. Det.* 7 (2004) 195.
- [22] M. Petrovic, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 1173.
- [23] J. Hübner, R. Taheri, D. Melchior, H. W. Kling, S. Gäb, O.J. Schmitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1755.
- [24] 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.
- [25] A.T. Kiewiet, J.M.D. Vandersteen, J.R. Parsons, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4409.
- [26] T. Okada, *J. Chromatogr.* 609 (1992) 213.
- [27] B.J. Hoffman, L.T. Taylor, S. Rumbelow, L. Goff, J.D. Pinkston, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 285.
- [28] H. Bachus, H.J. Stan, *Tens. Surf. Det.* 40 (2003) 10.
- [29] C. Sun, M. Baird, H.A. Anderson, D.L. Brydon, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 145.
- [30] B.J. Hoffman, L.T. Taylor, S. Rumbelow, L. Goff, J.D. Pinkston, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 207.
- [31] M. Zanette, A. Marcomini, E. Marchiori, R. Samperi, *J. Chromatogr. A* 756 (1996) 159.
- [32] T. Okada, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1043.
- [33] K. Lemr, M. Zanette, A. Marcomini, *J. Chromatogr. A* 686 (1994) 219.
- [34] K. Lemr, *J. Chromatogr. A* 732 (1996) 299.

- 
- [35] K. Lemr, J. Sevcik, J. Hlavac, *J. Chromatogr. A* 1021 (2003) 19.
- [36] A.M. Desbene, L. Geulin, C.J. Morin, P.L. Desbene, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 159.
- [37] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 281.
- [38] R.A. Wallingford, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2541.
- [39] R. Sebastiano, A. Citterio, P.G. Righetti, E. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 235.
- [40] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1885.
- [41] C. Vogt, K. Heinig, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 612.
- [42] T. Cserhati, E. Forgacs, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 265.
- [43] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4353.
- [44] A.T. Kiewiet, P. deVoogt, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 185.
- [45] L.H. Levine, J.L. Garland, J.V. Johnson, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2064.
- [46] L.H. Levine, J.L. Garland, J.V. Johnson, *J. Chromatogr. A* 1062 (2001) 207.
- [47] P. Jandera, M. Holčapek, G. Theodoridis, *J. Chromatogr. A* 813 (1998) 299.
- [48] M. Castillo, F. Ventura, D. Barceló, *Waste Manage.* 19 (1999) 101.
- [49] K.A. Krogh, K.V. Vejrup, B.B. Morgensen, B. Halling-Sorensen, *J. Chromatogr. A* 957 (2002) 45.
- [50] C.R. Pratesi, L. Faccetti, N. Andriollo, G. Cassani, *Riv. Ital. Sost. Grasse* 83 (2006) 18.
- [51] S.D. Dyer, H. Sanderson, S.W. Waite, R. van Compernelle, B. Price, A.M. Nielsen, A. Evans, A.J. Decarvalho, D.J. Hooton, A.J. Sherren, *Environ. Monit. Assessm.* 120 (2006) 45.
- [52] S.W. Morvan, M. Saluden, V. Agasse, F. Barbot, P. Cardinael, J.P. Bouillon, G. Decock, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 3.
- [53] J.P. Barry, D.R. Radtke, W.J. Carton, R.T. Anselmo, J.V. Evans, *J. Chromatogr. A* 800 (1998) 13.

- [54] K.A. Oudhoff, P.J. Schoenmakers, W.Th. Kok, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 479.
- [55] M. Kudoh, *J. Chromatogr.*, 291 (1984) 327.
- [56] X. Liu, C. Pohl, *J. Chromatogr. A*, 1191 (2008) 83.
- [57] B. Trathnigg, M. Kollroser, C. Rappel, *J. Chromatogr. A*, 922 (2001) 193.
- [58] B. Trathnigg, C. Rappel, R. Raml, A. Gorbunov, *J. Chromatogr. A*, 953 (2002) 89.
- [59] O.P. Haefliger, *Anal. Chem.* 75 (2003) 371.
- [60] K.D. Demadis, R.G. Raptis, P. Baran, *Bioinorg. Chem. Appl.* 3 (2005) 119.
- [61] H. Fleisch, *Bisphosphonates in Bone Disease. From the Laboratory to the Patient*, 4<sup>th</sup> Edn., Academic Press, London 2000.
- [62] B. Nowack, in: Vlasami-Jones, E. (Ed.), *Phosphorous in Environmental technology*, IWA Publishers, London 2004, pp. 147.
- [63] G. Tchäbunin, P. Fischer, G. Schwedt, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 333 (1989) 111.
- [64] G. Tchäbunin, P. Fischer, G. Schwedt, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 333 (1989) 117.
- [65] E. Vaeth, P. Sladek, K. Kenar, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329 (1987) 584.
- [66] J. Klinger, F. Sacher, H-J. Brauch, D. Maier, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 1997, 25, 79-86.
- [67] R. Thompson, N. Grinberg, H. Perpall, G. Bicker, P. Tway, *J. Liq. Chromatogr.* 17 (1994) 2511.
- [68] K. Mahabir, S. van Stroe, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 1155.
- [69] B. Nowack, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 139.
- [70] B. Nowack, *Water Res.* 32 (1998) 1271.
- [71] S.A. Shamsi, N.D. Danielson, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1845.
- [72] H.H. Hill, S.J. Martin, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 2281.

- 
- [73] M. Palit, A. K. Gupta, R. Jain, S. K. Raza, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 275.
- [74] E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 165.
- [75] E.W. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 187.
- [76] A.E. Nassar, S.V. Lucas, W.R. Jones, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1085.
- [77] A.E. Nassar, S.V. Lucas, C.A. Myler, W.R. Jones, M. Campisano, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3598.
- [78] J. Jiang, C.A. Lucy, *J. Chromatogr. A*, 966 (2002) 239.
- [79] J.P. Mercier, P. Morin, M. Dreux, A. Tambute, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 279.
- [80] J.P. Mercier, P. Chaimbault, P. Morin, M. Dreux, A. Tambute, *J. Chromatogr. A*, 825 (1998) 71.
- [81] R.W. Read, R.M. Black, *J. Chromatogr. A*, 862, (1999) 169.
- [82] K. Huikko, R. Kostianen, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 411.
- [83] G.A. Pianetti, M. Taverna, A. Baillet, G. Mahuzier, D. Baylocq-Ferrier, *J. Chromatogr. A* 630 (1993) 371.
- [84] Toshihiko Hanai, *Column Switching for Fast Analysis*, Jack Cazes (Editor), *Encyclopedia of Chromatography*, second edition, Publisher: Taylor and Francis, 2002, London.
- [85] *Chrom-Ed Book Series*, Raymond P. W. Scott, "Liquid chromatography", (2003), pg 18-19.
- [86] F. Erni, R.W. Frei, *J. Chromatogr.* 149 (1978) 561.
- [87] Sun Ok Choi, So Young Uma, Sung Hee Junga, Seo Jeong Junga, Joo Il Kima, Hwa Jeong Leeb and Soo Youn Chunga, *J. Chromatogr. B*, Volume 830, Issue 2, 18 January 2006, Pages 301-305.

- [88] M.M. Bushey, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 62 (1990) 161.
- [89] G.J. Opiteck, K.C. Lewis, J.W. Jorgenson, R.J. Anderegg, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1518.
- [90] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1585.
- [91] L.A. Holland, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3275.
- [92] A.W. Moore, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3456.
- [93] E. Venema, P. deLeeuw, J.C. Kraak, H. Pooppe, R. Tijssen, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 135.
- [94] L.A. Holland, J.W. Jorgenson, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 371.
- [95] G.J. Opiteck, J.W. Jorgenson, R.J. Anderegg, *Anal. Chem.* 69 (1997), 2283.
- [96] K.K. Hunger, K. Racaityte, K. Wagner, T. Miliotis, L.E. Edholm, R. Bischoff, G. Marko-Varga, *J. High Resolut. Chromatogr.* 23 (2000) 259.
- [97] K. Wagner, T. Miliotis, G. Marko-Varga, R. Bischoff, K.K. Unger, 74 (2002) 809.
- [98] A.P. Köhne, T. Welsch, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 463.
- [99] F. Bedani, W.T. Kok, H.G. Janssen, *J. Chromatogr. A*, 1133 (2006) 126.
- [100] D.N. Heiger, High performance capillary electrophoresis, an introduction, HP publ. No. 12.5091-6199E, Waldbronn (Alemania) 1992.
- [101] J.P. Landers, ed., *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, 1994.
- [102] S.F.Y. Li, *Capillary Electrophoresis, principle, practice and applications*, Elsevier, Amsterdam, 1992.
- [103] P. Camilleri, ed., *Capillary Electrophoresis, theory and practice*, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [104] P.R. Brown, E. Grushka, eds., *Advances in Chromatography*, Vol. 35, Capítulos 1-5, Marcel Dekker, nueva York, 1995.
- [105] M.M. Rogan, K.D. Altria, *Introduction to the theory and applications of capillary electrophoresis*, Beckman publ. No. 726388, Fullerton, CA, 1993.

- [106] S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.*, 9 (1967) 122.
- [107] R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand.*, 123 (1974) 1.
- [108] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, 169 (1979) 11.
- [109] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.
- [110] J.W. Jorgenson, *Trends Anal. Chem.* 3 (1984) 51.
- [111] B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, Enhancing sensitivity in capillary electrophoresis, *TrAC* 22 (2003) 605.
- [112] C. Ackbay, S.A.A. Rizvi, S.A. Shamsi, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1672.
- [113] C. Crescenzi, A. Di-Corcia, R. Samperi, A. Marcomini, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1797.
- [114] T. Okada, *J. Chromatogr.* 609 (1992) 213.
- [115] J.C. Dunphy, D.G. Pessler, S.W. Morrall, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1223
- [116] 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.
- [117] W.R. Melander, A. Nahum and C. Horváth, *J. Chromatogr.* 185 (1979), 129.
- [118] K. Holmberg, B. Jonsson, B. Kronberg, B. Lindman, *Surfactants and polymers in aqueous solution*, 2<sup>nd</sup> ed., J. Wiley, Chichester 2003, pp. 108.
- [119] M. Savitsky, J.E. Golay, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627.
- [120] D.B. Hibbert, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 19 (1993) 277.
- [121] W.H. Press, S.A. Teukolsky, W.T. Vetterling, B.P. Flannery, *Numerical Recipes in C*, second ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1992.
- [122] J.R. Torres-Lapasió, J.J. Baeza-Baeza, M.C. García Álvarez-Coque, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3822.
- [123] F. Cuesta-Sánchez, B. van den Bogaert, S.C. Rutan, D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 34 (1996) 139.

- [124] F. Cuesta-Sánchez, J. Toft, B. van den Bogaert, D.L. Massart, *Anal. Chem.* 68 (1996) 79.
- [125] R. Tauler, D. Barceló, *TrAC* 12 (1993) 319
- [126] J.P. Foley, J.G. Dorsey, *Anal. Chem.* 55 (1983) 730.
- [127] T. Wind, R.J. Stephenson, C.V. Eadsforth, A. Sherren, R. Toy, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64 (2006) 42.
- [128] S. Ortega-Gadea, V. Bernabé-Zafón, E.F. Simó-Alfonso, C. Ochs, G. Ramis Ramos, *J. Mass Spectrom.*, (2006) 41 (1), 23.
- [129] P. Paoli, G. Camici, G. Mao, E. Giannoni, G. Ramponi, *Biochem. J.*, 349 (2000) 43.
- [130] M.E. Tate, *Biochem. J.*, 195 (1981) 419.
- [131] A.T. Stone, M.A. Knight, B. Nowack, in: R.L. Lipnick, R.P. Mason, M.L. Phillips, C.U. Pittman, (Eds.) *Chemicals in the Environment: Fate, Impacts and Remediation*, ACS Symposium Series No. 806, American Chemical Society, Washington DC 2001, pp. 59-94
- [132] W.R. Jones, J.P. Landers, (Ed.) *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC, Boca Raton, FL 1994, p. 217.

---

## **Anexo I**

---

En el siguiente enlace se puede encontrar el artículo titulado '*Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatisation with maleic anhydride followed by liquid chromatography with UV-vis detection*', publicado en *Journal of Chromatography A*, 1180 (2008) 32-41.

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TG8-4R98K6V-2&\\_user=1647180&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_acct=C000053935&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=1647180&md5=476f39419](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TG8-4R98K6V-2&_user=1647180&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000053935&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1647180&md5=476f39419)

43342048507cc2599246a4e

---

## **Anexo II**

---

En el siguiente enlace se puede encontrar el artículo titulado '*Determination of fatty alcohol ethoxylates by derivatization with phthalic anhydride followed by liquid chromatography with UV-vis detection*', publicado en *Journal of Chromatography A*, 1203 (2008) 47-53.

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TG8-4SYJS6M-B&\\_user=1647180&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_acct=C000053935&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=1647180&md5=0d9fdb30cb0645ab54b11adea5050280](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TG8-4SYJS6M-B&_user=1647180&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000053935&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1647180&md5=0d9fdb30cb0645ab54b11adea5050280)

---

## **Anexo III**

---

En el siguiente enlace se puede encontrar el artículo titulado '*Determination of fatty alcohol ethoxylates with diphenic anhydride derivatization and liquid chromatography with spectrometric detection. A comparative study with other anhydrides*', publicado en *Journal of Chromatography A* 1216, 3023-3030 (2009).

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TG8-4VJ4WRF-8&\\_user=1647180&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_acct=C000053935&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=1647180&md5=c76caeb04a264aa71946a88886c7857a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TG8-4VJ4WRF-8&_user=1647180&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000053935&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1647180&md5=c76caeb04a264aa71946a88886c7857a)

---

**Anexo IV**

---

En el siguiente enlace se puede encontrar el artículo titulado '*Rapid characterization of alkylpolyphosphonates by CZE with indirect photometric and mass spectrometric detection*', publicado en *Electrophoresis* 2007, 28, 341-352.

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/114030985/PDFSTART>