

Alicia Olmo Mora

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO ANÁLISIS DEL POLIETILENGLICOL

Trabajo fin de grado

Dirigido por el Sr. Cesar Sanz y la Dra. Carmen Aguilar

GRADO DE QUÍMICA



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2017

RESUMEN

El polietilenglicol es un poliéter con una amplia gama de aplicaciones en distintas industrias, como son la farmacéutica o la cosmética. Las propiedades físicas y químicas de estos polímeros influyen en las características del producto final, por lo que es importante conocerlas.

La *Size Exclusion Chromatography* es de interés para el estudio de las aplicaciones finales de los polímeros, ya que a través de esta técnica se obtiene la amplitud de la distribución de la masa molar del polímero, la cual define sus propiedades, que afectan tanto al procesado como a su uso final.

La empresa *Industrias Químicas del Óxido de Etileno* requiere de un método para el control de la calidad del polietilenglicol fabricado en sus plantas. El estudio descrito en este informe, muestra la optimización de un método de cromatografía de exclusión por tamaño para el análisis de muestras de polietilenglicol de masas molares entre 190-9000 g/mol, y la posterior obtención de la distribución de masas molares del polímero.

ABSTRACT

Polyethylene glycol is a polyether with a wide range of applications in different industries, such as pharmaceuticals or cosmetics. The physical and chemical properties of these polymers influence the characteristics of the final product, so it is important to know them.

The *Size Exclusion Chromatography* is of interest for the study of the final applications of the polymers, because through this technique the amplitude of the distribution of the molar mass of the polymer is obtained, which defines its properties, that affect both the processing and its end use.

The company *Industrias Químicas del Óxido de Etileno* requires a method to control the quality of the polyethylene glycol manufactured in its plants. The study described in this report shows the optimization of a size exclusion chromatography method for the analysis of polyethylene glycol samples of molar masses between 190-9000 g/mol, and the subsequent obtaining of the distribution of molar masses of the polymer.

ÍNDICE

1. OBJETIVO	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 PRESENTACIÓN DE LA EMPRESA IQOXE.....	2
2.1.1. Histórico.....	2
2.1.2. Productos y servicios.....	2
3. POLIETILENGLICOL	4
3.1 PEG PRODUCIDO EN IQOXE.....	4
4. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO, TÉCNICA SEC	6
4.1 FUNDAMENTO TEÓRICO.....	6
4.1.1 Utilidad de la <i>Size Exclusion Chromatography</i>	6
4.1.2. Distribución del peso molar.....	7
4.2 PARÁMETROS DE RETENCIÓN.....	9
4.2.1 Retención del soluto en la columna.....	9
4.2.2 Retención del soluto en SEC.....	10
4.2.3 Modelo termodinámico del mecanismo de retención SEC.....	12
4.3 COLUMNAS SEC.....	13
4.3.1 Columnas acuosas SEC.....	14
4.4. DETECTOR.....	14
4.4.1 Índice de Refracción.....	14
5. VARIABLES EXPERIMENTALES	16
5.1 EFECTOS DEL DISOLVENTE.....	16
5.1.1 Solubilidad de la muestra.....	16
5.1.2 Selección del disolvente y de la FM.....	16
5.2 EFECTOS DE LA MUESTRA.....	18
5.2.1 Concentración de la muestra.....	18
5.2.2 Volumen de inyección.....	18
5.3 FLUJO.....	18
5.4 TEMPERATURA.....	19

6. CALIBRACIÓN	20
6.1. CALIBRACIÓN ESTÁNDAR NARROW-MMD.....	21
6.1.1 Calibración <i>Peak-Position</i>	21
7. ESTUDIO EXPERIMENTAL	23
7.1 OBJETIVO.....	23
7.2 TIPO DE MUESTRA.....	23
7.3 REACTIVOS.....	23
7.4 INSTRUMENTACIÓN y MATERIAL.....	23
7.5 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO.....	24
7.6 CONDICIONES EXPERIMENTALES A OPTIMIZAR.....	25
7.6.1 Disolvente.....	25
7.6.2 Volumen de inyección.....	27
7.6.3 Concentración.....	28
7.6.4 Flujo.....	28
7.6.5 Temperatura.....	29
7.7. CURVA DE CALIBRACIÓN.....	30
7.7.1 Ajuste de la curva.....	31
7.8 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	35
7.8.1 Repetibilidad	36
7.9 RESULTADOS.....	37
7.9.1 PEG-200.....	38
7.9.2 PEG-400.....	39
8. CONCLUSIONES	40
9. BIBLIOGRAFÍA	41

TABLAS

Tabla 2.1.2.1 Aplicaciones de los productos fabricados en IQOXE.....	3
Tabla 7.6.1.1 Experimentación para la determinación del tipo de disolvente.....	26
Tabla 7.6.2.1 Experimentación para la valoración del efecto del volumen de inyección.....	27
Tabla 7.6.3.1 Experimentación para la determinación de la concentración.....	28
Tabla 7.6.3.2 Efecto de la concentración en la eficiencia.....	28
Tabla 7.6.4.1 Experimentación para la determinación del flujo.....	29
Tabla 7.6.4.2 Efecto del flujo en la eficiencia.....	29
Tabla 7.6.5.1 Experimentación para la determinación de la temperatura.....	30
Tabla 7.6.5.2 Efecto de la temperatura en la eficiencia.....	30
Tabla 7.7.1.1 Ensayos de calibración.....	32
Tabla 7.7.1.2 Gráficos de las curvas de calibración.....	32
Tabla 7.7.1.3 Cromatogramas <i>Calibración 4</i>	34
Tabla 7.8.1 Validación del método.....	36
Tabla 7.8.1.1 Repetibilidad en los resultados.....	37
Tabla 7.9.1.1 Predicción de los valores del peso molar del PEG-200.....	38
Tabla 7.9.2.1 Predicción de los valores del peso molar del PEG-400.....	39

FIGURAS

Figura 2.1.2.1 Esquema de fabricación IQOXE.....	3
Figura 4.1.2.1 MMD polímeros sintéticos.....	8
Figura 4.2.2.1 Linealidad de la calibración.....	11
Figura 4.2.3.1 Representación termodinámica proceso SEC.....	13
Figura 6.3.1.1 Calibración peak-position.....	21
Figura 7.8.1 Predicción de la M_p del patrón 194.....	35
Figura 7.9.1.1 Perfil de la curva de elución PEG-200.....	38
Figura 7.9.1.2 MMD PEG-200.....	38
Figura 7.9.2.1 Perfil de la curva de elución PEG-400.....	39
Figura 7.9.2.2 MMD PEG-400.....	39

ECUACIONES

Ecuación 1.1.....	7
Ecuación 1.2.....	7
Ecuación 1.3.....	7
Ecuación 1.4.....	8
Ecuación 1.5.....	8
Ecuación 1.6.....	9
Ecuación 1.7.....	9
Ecuación 1.8.....	10
Ecuación 1.9.....	10
Ecuación 1.10.....	10
Ecuación 1.11.....	11
Ecuación 1.12.....	12
Ecuación 1.13.....	12
Ecuación 1.14.....	12
Ecuación 1.15.....	12
Ecuación 1.16.....	16
Ecuación 1.17.....	21
Ecuación 1.18.....	28
Ecuación 1.19.....	31
Ecuación 1.20.....	33
Ecuación 1.21.....	35
Ecuación 1.22.....	36

REACCIÓN

Reacción 3.1 Polimerización y formación del PEG.....	4
--	---

1. OBJETIVO

El objetivo principal de este informe es la obtención de un método para la determinación de la distribución de la masa molar de muestras de polietilenglicol producidas en las instalaciones de IQOXE, con el fin de controlar la calidad del producto final.

Se desarrolla un método de análisis por Cromatografía de exclusión por tamaño (**S**ize **E**xclusion **C**hromatography) y para ello es necesario:

- Entender el fundamento teórico de la SEC y los parámetros que la controlan.
- Aprender a manipular el software y el equipo proporcionado por la empresa.
- Optimizar un método por SEC para el análisis de muestras de polietilenglicol.
- Calibrar el método optimizado y validarlo.
- Analizar muestras reales e interpretar los resultados.

2. INTRODUCCIÓN^[1]

El trabajo desarrollado en este informe se ha realizado en el laboratorio de las instalaciones de la empresa *Industrias Químicas del Óxido de Etileno*: IQOXE.

2.1 PRESENTACIÓN DE LA EMPRESA IQOXE

IQOXE es una compañía petroquímica, dedicada a la producción de óxido de etileno, glicoles y derivados del óxido de etileno, ubicada en el Polígono Petroquímico de Tarragona, en la carretera N-340, km 1157.

2.1.1. Histórico

IQOXE es heredera de la tradición de la antigua Compañía IQA, que comenzó su producción en 1964, con la participación de varias empresas químicas multinacionales (Shell, Explosivos Rio Tinto, Hoescht, Cepsa), iniciándose con una unidad de cracking de naftas. De manera progresiva, se abrieron nuevas instalaciones productivas, alcanzando en 1967 las 460.000 t/a de una docena de derivados químicos. En 1978 se puso en servicio la actual planta de óxido de etileno y glicoles. En 1985, la multinacional Shell adquirió el 100% de las acciones de la empresa, que posteriormente, en 1995, vendió a La Seda de Barcelona (LSB). Más recientemente, en abril de 2014, el CL Grupo Industrial adquirió los activos productivos de LSB, creándose así la nueva empresa IQOXE.

Des de 2004 presenta el certificado de sistema de calidad ISO 9001:2008 y des de 2006 el certificado de gestión ambiental 14001:2004.

Actualmente, IQOXE es el único productor de óxido de etileno en España.

2.1.2. Productos y servicios

IQOXE está formado por una planta de producción continua de óxido de etileno y glicoles, con una capacidad productiva de hasta 140.000 t/a de óxido de etileno, de las cuales unas 80.000 t/a se pueden transformar en 106.000 t/a de etilenglicol; también dispone de tres plantas de producción discontinua para la fabricación de derivados de óxido de etileno y óxido de propileno, como los polietilenglicoles (PEG), polioles y etoxilados. En la figura 2.1.2.1 se muestra el esquema de fabricación.

Además, presenta instalaciones auxiliares para generar los servicios necesarios para operar en las plantas productivas: caldera de vapor, cogeneración, planta de tratamiento de aguas residuales, planta de agua osmotizada y agua desmineralizada, compresores de aire de instrumentos y bombas de agua de mar de refrigeración.

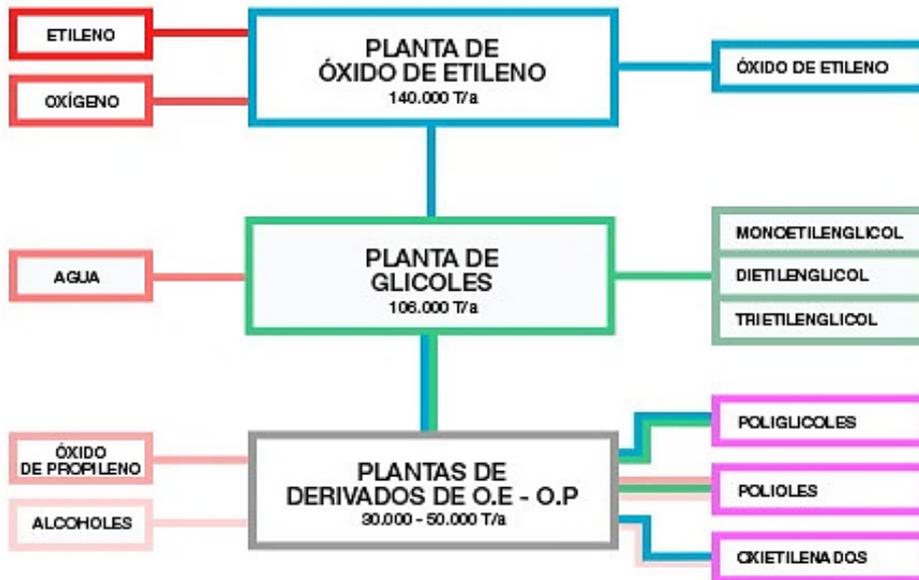


Figura 2.1.2.1 Esquema de fabricación IQOXE: materia prima, plantas de producción, capacidad de producción y producto sintetizado.

En la tabla 2.1.2.1 se muestran las principales aplicaciones que presentan cada uno de los productos sintetizados en las plantas de esta industria.

Tabla 2.1.2.1 Principales aplicaciones de los productos fabricados en IQOXE.

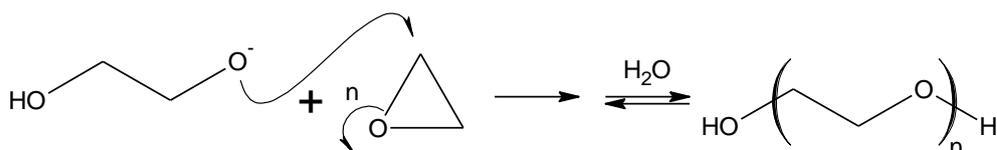
PRODUCTOS	APLICACIONES
Óxido de etileno	Glicoles y etoxilados (detergentes)
Monoetilenglicol	Fibra poliéster, PET, resinas poliéster, anticongelantes y deshumidificante
Dietilenglicol	Resinas, Plastificantes y deshumidificante
Polietilenglicol	Líquidos serigrafía, aditivos cerámicos, farmacia y cosméticos.
Polióles	Espumas de poliuretano

3. POLIETILENGLICOL ^{[1][2]}

El polietilenglicol (PEG) es un poliéter con una amplia gama de aplicaciones en la industria.

Es sintetizado a través del mecanismo de polimerización por apertura de anillo del óxido de etileno (C_2H_4O), en presencia de agua y etilenglicol ($C_2H_6O_2$) como iniciador de la reacción. Es catalizada por catalizadores ácidos o básicos, y la longitud de la cadena del polímero PEG depende de la relación de los reactivos. Su fórmula molecular es $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$.

Reacción 3.1 Mecanismo de polimerización y formación del PEG.



Las propiedades físicas, como la viscosidad, dependen de la longitud de la cadena, por lo tanto del peso molar; pero las propiedades químicas, independientemente de la masa, son casi idénticas. Los PEG son líquidos o sólidos de bajo punto de fusión; el punto de fusión aumenta a medida que aumenta el peso molar; el punto de ebullición se encuentra en los $200^{\circ}C$; y presenta un pH entre 6 y 7 en soluciones al 5%.

El número que acompaña a las siglas PEG indica el peso molar del polímero.

La distribución del tamaño se puede caracterizar estadísticamente por su masa molar promedia en peso (M_w) y su masa molar promedia en número (M_n), la relación de las cuales se llama índice de polidispersidad (M_w/M_n).

El PEG es soluble en agua, pero por la presencia de grupos hidrofóbicos (cadenas alifáticas) y grupos hidrofílicos (éter y alcohol) se producen variaciones de la solubilidad con la temperatura. También es soluble en muchos disolventes orgánicos como el tolueno o diclorometano. Pero es insoluble en hidrocarburos alifáticos.

3.1 PEG PRODUCIDO EN IQOXE

En IQOXE es formado por reacción en procesos batch del óxido de etileno con monoetilenglicol, dietilenglicol o poliglicoles líquidos. Es sintetizado mediante una catálisis básica, una posterior neutralización del producto con ácido fosfórico y la eliminación de las sales en el filtro.

No son compuestos químicamente homogéneos, sino mezclas de polímeros homólogos muy semejantes entre sí.

Tanto el Polietilenglicol 200, 300, como 400 son a $20^{\circ}C$ un líquido no volátil, claro y transparente, mientras que el PEG-600 lo es a temperaturas superiores de $22^{\circ}C$. Son solubles en agua y en numerosos

disolventes orgánicos, tales como alcoholes, glicoles, glicoléteres, cetonas e hidrocarburos aromáticos. Son ligeramente solubles en hidrocarburos alifáticos y éteres. Poseen un bajísimo nivel de toxicidad por lo que son incluidos en numerosos preparados farmacéuticos y cosméticos.

Por seguridad, se debe evitar el contacto prolongado y repetido con la piel.

Se debe tener en cuenta que, aunque es poco inflamable, puede arder. En caso de una situación de incendio se debería utilizar polvo seco, dióxido de carbono, espuma antialcohol, agua pulverizada, arena o tierra.

Las principales aplicaciones son:

- Componente en preparados farmacéuticos y cosméticos.
- Componente en lubricantes sintéticos, aceites de corte, fluidos hidráulicos y betunes.
- Utilizado en la fabricación de resinas sintéticas, plastificantes y adhesivos.
- Materia prima en la fabricación de ésteres de polietilenglicol.
- Utilizado en las industrias del papel, caucho, textil, metal y artes gráficas.

4. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO, TÉCNICA SEC

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes que se han de separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria, FE) mientras que la otra (fase móvil, FM) se mueve en una dirección definida^[3].

Según el estado físico de la fase móvil, la cromatografía se clasifica en cromatografía de gas (CG) y en cromatografía líquida (CL). Existen distintos métodos de CL según el equilibrio que se establece entre las fases y el soluto, por lo que hace a la cromatografía de exclusión se utiliza una FE sólida en forma de tamiz molecular y no se produce interacción química entre los analitos y la FE.

Los métodos de exclusión, a su vez se pueden clasificar en cromatografía de permeación en gel (GPC), cromatografía de filtración en gel (GFC) y en cromatografía de exclusión por tamaño. A través de la separación de las cadenas de polímeros individuales en función de su tamaño en la disolución y no en función de sus características químicas, éstas técnicas son utilizadas para medir la distribución del peso molar de los polímeros naturales y sintéticos. La GPC se utiliza para describir el análisis de polímeros en disolventes orgánicos, la GFC hace referencia al análisis de biopolímeros en solución acuosa, y la SEC se emplea para describir el análisis de polímeros en agua y disolventes basados en agua.^{[4][5]}

4.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

4.1.1 Utilidad de la Size Exclusion Chromatography^[6]

Ésta técnica es empleada en macromoléculas solubles en agua de origen bioquímico, la separación por cromatografía de exclusión es destinada para varias aplicaciones:

- Preparación de fracciones moleculares para su caracterización o para un futuro uso, y separación de los interferentes en matrices de muestras complejas.
- Método alternativo al proceso de separación de moléculas por diálisis.
- Estimación de la distribución de la masa molar.
- Estimación de constantes de asociación molecular.

La SEC es de interés para el estudio de las aplicaciones finales de los polímeros. A menudo los polímeros se analizan a través de la distribución de las propiedades químicas y físicas presentes en ellos. La amplitud de la distribución de la masa molar (MMD) puede indicar la elongación y la resistencia a la tracción de la macromolécula, y las propiedades adhesivas del producto final; la ramificación de cadenas largas presenta relación con la viscosidad de la masa, de las soluciones, y la resistencia al cizallamiento; la heterogeneidad química afecta a la tenacidad, fragilidad y biodegradabilidad de los plásticos... Éstas propiedades afectan tanto al procesado del polímero, como a su uso final.

4.1.2 Distribución del peso molar ^{[4][6][7][8]}

Como se ha explicado en el apartado anterior, uno de los mayores intereses de la SEC es ser usada como procedimiento analítico para separar moléculas por su diferencia en el tamaño. Para una mejor caracterización, el pico eluido se divide en varios cortes de volumen equidistante y se calculan los promedios de peso molecular; así se obtiene la masa molar media en número (M_n), en peso (M_w), y en z (M_z) o información de la MMD del polímero, ya que estos datos presentan correlación con sus propiedades físicas.

La curva de datos brutos que se obtiene en el análisis SEC es la curva de distribución de tamaños moleculares. Si se usa un detector sensible a la concentración, es una curva de distribución de tamaños dependiente de la concentración del polímero. En el caso de la calibración para análisis cualitativos, la curva de datos brutos es convertida en una de distribución de masa molar, a través de la cual se calcula la media de la masa molar respectivamente.

La magnitud M_n es sensible a la presencia de bajos pesos moleculares en el material. Es el peso molar promedio de todas las cadenas del polímero de la muestra, y se define a través de la ecuación:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} = \frac{\sum W_i}{\sum (W_i / M_i)} \quad (1.1)$$

Siendo N_i el número de moléculas del grado de polimerización; M_i el peso de una molécula del grado de polimerización; y W_i es el peso de la muestra en gramos. M_n puede ser predicho por los mecanismos de polimerización, y determinado a partir de métodos tradicionales que midan el número de moléculas presentes en una muestra, como por ejemplo el análisis de grupos finales o mediante la medida de propiedades coligativas.

En SEC la ecuación 1.1. es transformada en los términos adecuados para poder ser calculada:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^N h_i}{\sum_{i=1}^N (h_i / M_i)} \quad (1.2)$$

Siendo h_i la altura de la curva; y M_i la masa molar de la especie que eluye.

El M_w es sensible a la presencia de altos pesos moleculares. Este parámetro tiene en cuenta el peso molecular de la cadena en la determinación del peso molar promedio. Se define a través de la ecuación:

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i} \quad (1.3)$$

M_w puede ser determinado tradicionalmente por fraccionamiento o por difusión de luz.

Para SEC la ecuación 1.3. es transformada en:

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^N (h_i M_i)}{\sum_{i=1}^N h_i} \quad (1.4)$$

El valor M_w es siempre mayor que el M_n , excepto cuando se estudia un sistema monodisperso, donde los valores son idénticos. La proporción M_w/M_n conocida como polidispersidad es una medida de la amplitud de la distribución de la masa molar del polímero. En un sistema monodisperso el valor de polidispersidad es igual a la unidad, mientras que en sistemas polidisperso es mayor que la unidad. M_n proporciona información sobre la flexibilidad y M_w sobre la resistencia del material.

El parámetro M_z es sensible a los pesos moleculares más altos. Está relacionado con el procesado de los polímeros, en particular con la flexibilidad y la rigidez. Se define a través de la ecuación:

$$M_z = \frac{\sum N_i M_i^3}{\sum N_i M_i^2} \quad (1.5)$$

Existen otros parámetros para el estudio de la masa molar: la masa molar media del pico (M_p) y de viscosidad (M_v).

La M_p se determina a partir del máximo del pico eluido en SEC y se utiliza en la calibración para asignar la masa molar.

Para un polímero polidisperso el valor relativo de cada uno de los promedios es: $M_n < M_v < M_w < M_z < M_z + 1$

La MMD puede expresarse gráficamente en forma de integral como la fracción de peso acumulativo o la fracción de número acumulativo, frente a la masa molar. También puede ser expresada como el diferencial de la fracción de peso o de número, frente a la masa molar. La masa molar del polímero se obtiene de multiplicar el peso molecular de la unidad repetitiva, por el número de unidades repetitivas.

A través del método SEC, se produce la separación por tamaño de los componentes de una muestra, cuyo perfil describe la MMD.

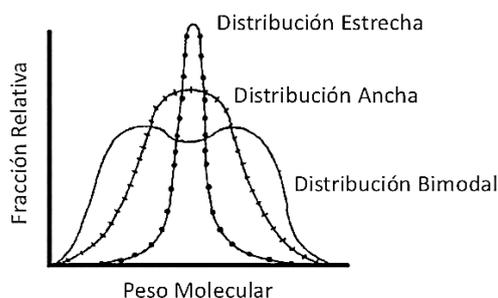


Figura 4.1.2.1 MMD de tres tipos de polímeros sintéticos. [4] (pagina 2)

4.2 PARÁMETROS DE RETENCIÓN ^[6]

Generalmente, en las columnas cromatográficas los componentes de la muestra migran a través de ella a diferentes velocidades, eluyendo de la columna a diferentes tiempos. El soluto es transportado por la FM y es detenido momentáneamente por la superficie del empaquetamiento de la columna.

El mecanismo de separación y la información que se obtiene con SEC, difiere con la de otros métodos de CL. Por ejemplo, es el único que presenta un mecanismo de retención en el que la distribución del soluto entre las fases se establece por entropía en lugar de por diferencia de entalpía. Por esta razón, la nomenclatura y las convenciones derivadas para este método a menudo no son coherentes con las de otros.

A continuación, se explican los conceptos básicos sobre el mecanismo de retención para la realización de una buena interpretación de los parámetros de retención en SEC y las diferencias más significativas respecto la cromatografía convencional.

4.2.1 Retención del soluto en la columna ^{[6][9]}

Hay cuatro formas diferentes de informar sobre la retención del soluto en la columna: tiempo de retención (t_R), volumen de retención (V_R), factor de retención (k') y coeficiente de distribución del soluto K_{LC} .

El tiempo de retención se mide directamente a través de la experimentación, pero es el parámetro menos aconsejable para identificar los componentes de una muestra en SEC. Por otra parte, el coeficiente de distribución es el parámetro más difícil de determinar, pero el más exacto.

El t_R es el tiempo requerido para que un componente de la muestra eluya de la columna desde la inyección de la muestra. Este parámetro se ve afectado por cambios en las condiciones experimentales, como es el flujo o el tipo de columna.

El V_R es el volumen de FM necesaria para eluir un soluto de la columna cromatográfica y además, explica las diferencias de caudal. Para calcular el V_R , el flujo de la fase móvil (F) y el t_R deben ser conocidos, ya que $V_R = F \cdot t_R$ (1.6). De esta forma V_R no depende de los cambios que se produzca en el caudal, pero si puede verse modificado por cambios en el tamaño de la columna o por el volumen muerto (V_M) instrumental, que es el volumen de FM que se consume sin que se detecte ningún componente. Tales variaciones se compensan con el parámetro de retención k' . La relación que presenta con el volumen de retención es:

$$k' = \frac{V_R - V_M}{V_M} \quad (1.7)$$

Físicamente, k' representa la relación de peso del soluto entre la FE y la FM. Con un incremento en la cantidad de FE, k' aumenta y la elución se produce más lenta. Pero k' no compensa las diferencias de

concentración de la FE, causadas por el área superficial y la porosidad del empaquetamiento de la columna. Para compensar estas diferencias se debe usar el parámetro K.

Físicamente, K representa la relación de concentración de soluto entre la FE y la FM. Refleja el equilibrio termodinámico del soluto entre las dos fases. La relación que presenta con k' es:

$$k' = \frac{K \cdot V_s}{V_M} \quad (1.8)$$

Siendo V_s el volumen equivalente de la fase estacionaria.

De esta relación se determina que cuando k' y K son proporcionales. Por lo tanto valores altos de K indican eluciones lentas.

En CL convencional la fórmula que representa el equilibrio teórico de la retención del pico en la columna es $V_R = V_M + K_{LC} V_s$ (1.9), mientras que en SEC es $V_R = V_0 + K_{SEC} \cdot V_i$ (1.10). Por lo tanto, usar directamente la terminología tradicional de CL en las aplicaciones de SEC puede ser a veces erróneo.

Estas diferencias pueden ser explicadas si se analiza el mecanismo de interacción que se produce entre el soluto y las fases de la columna.

4.2.2 Retención del soluto en SEC ^[6]

A medida que el soluto avanza con el disolvente, las moléculas del soluto se difunden dentro y fuera de los poros del empaquetamiento. La fuerza motriz de este proceso es el gradiente de concentración entre las fases. Las moléculas más grandes de soluto eluyen más rápidamente que las moléculas pequeñas, la razón es que como más grande es el tamaño de la molécula, menos penetración se produce en los poros del empaquetamiento.

En los métodos cromatográficos convencionales los componentes de la muestra son retenidos por el empaquetamiento de la columna, y eluyen después del pico del disolvente. Sin embargo, en SEC, el soluto es excluido parcialmente del empaquetamiento de la columna y eluye antes que el pico del disolvente $V_R \leq V_M$, ya que la separación solamente ocurre dentro del volumen de FM. Por este motivo en cromatografía de exclusión es importante diferenciar el V_M , entre volumen de FM estancada (V_i) que es la que reside en los poros del empaquetamiento y actúa como FE, y el volumen de FM móvil (V_0) que actúa como disolvente portador.

La separación SEC es el resultado de la distribución del soluto dentro y fuera de los poros. Esta distribución puede ser descrita a través de K_{SEC} , que representa la relación de concentración media del soluto en los poros y fuera de ellos.

Teniendo en cuenta que no todo el volumen V_i es accesible a todos los componentes de la muestra y que la concentración del soluto dentro de los poros decrece con el incremento del tamaño de éste, el

volumen total del líquido accesible para solutos de diferentes tamaños es $V_0 + K_{SEC} \cdot V_i$. De esta forma se obtiene que $V_R = V_0 + K_{SEC} \cdot V_i + K_{LC} \cdot V_s$ (1.11).

Es importante que el último término de la ecuación $K_{LC} \cdot V_s$ sea minimizado, utilizando empaquetamientos de columna inertes para evitar efectos superficiales que influyan en la retención del soluto.

La retención de SEC se puede aproximar a $V_R = V_0 + K_{SEC} \cdot V_i$ (1.10).

Como $V_R \leq V_M$ los valores de k' pueden ser negativos y por lo tanto el factor de separación α entre dos picos consecutivos no es utilizado en cromatografía de exclusión.

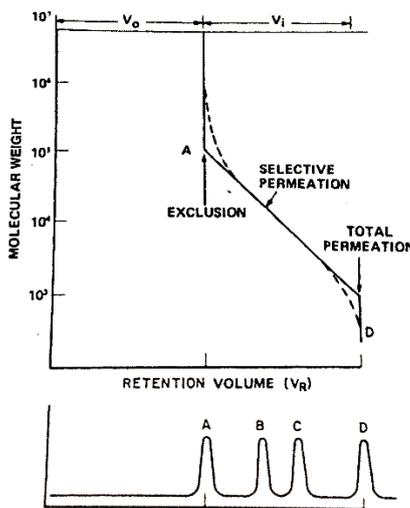


Figura 4.2.2.1 Calibración SEC. [6]

La figura 4.2.2.1 representa una curva de calibración SEC. Se observa que **A** (solutos de masa molar más elevada) eluye al volumen V_0 . Este soluto migra únicamente fuera de los poros del empaquetamiento, y es lo que se conoce como límite de exclusión. **A** puede estar formada por diferentes solutos, todos de tamaño superior al volumen del poro más grande de la columna. Cuando la masa molar del soluto disminuye, la fracción de volumen accesible al soluto en los poros aumenta, provocando que los picos que eluyen lo hagan más tarde. El soluto **D** es suficientemente pequeño para acceder a todos los volúmenes de los poros, por lo tanto, la elución tiene lugar en el límite de permeación total. **D** puede estar compuesto por diferentes solutos, pero en este caso todos los componentes de este pico son de tamaño inferior al volumen del poro más pequeño.

Para cualquier columna SEC, independientemente del tamaño, $K_{SEC} = 0$ en la exclusión y $K_{SEC} = 1$ en la permeación total. La línea discontinua ilustra el acercamiento gradual de la curva de calibración experimental a los límites de exclusión y permeabilidad. La línea continua, indica la aproximación lineal a la curva de calibración que se utiliza generalmente en SEC para facilitar los cálculos de MMD.

La separación SEC está restringida a que se produzca dentro de los límites marcados por el volumen del poro, por lo tanto, es una limitación para el análisis de moléculas pequeñas.

A diferencia de la CL convencional, la técnica SEC presenta intrínsecamente baja resolución, pero no impide usarla para obtener importante información sobre la masa molar del polímero; además, de información sobre la estructura y la termodinámica del polímero en solución.

El valor de K_{SEC} está restringido entre 0 y 1, esto significa que la distribución del soluto se encuentra favorecida fuera del poro; mientras que los valores de K_{LC} son ilimitados, lo que significa que la distribución del soluto se encuentra favorecida en la fase estacionaria.

Estas diferencias son indicativas de que los balances termodinámicos involucrados en el control de la distribución del soluto en la columna difieren en CL y SEC.

4.2.3 Modelo termodinámico del mecanismo de retención SEC ^{[4][6]}

Las moléculas de soluto migran a través de la columna cromatográfica, redistribuyéndose constantemente entre las fases para satisfacer el equilibrio termodinámico. Bajo condiciones normales de cromatografía, la distribución del soluto se aproxima al equilibrio termodinámico $\Delta G = 0$, ya que el potencial químico de cada componente del soluto es el mismo en las dos fases.

Para soluciones en equilibrio, la distribución del soluto puede estar relacionada con la diferencia de energía libre estándar entre las fases. A temperatura y presión constante, la variación de la energía libre de Gibbs se define como $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ (1.12) y a través de $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ (1.13) se relaciona con el coeficiente de distribución del soluto (K).

En la CL convencional la separación del soluto se produce en gran parte debido a la interacción FE-soluto. La absorción o adsorción implica la transferencia del soluto entre las fases, a través de fuerzas intermoleculares y cambios sustanciales de entalpía. El cambio de entropía es generalmente pequeño. Combinando las ecuaciones anteriores y despreciando el término ΔS , se obtiene que $K_{CL} = e^{-\Delta H^\circ / RT}$ (1.14). El valor para ΔH° es generalmente negativo (que corresponde a una interacción atractiva fase estacionaria-soluto exotérmica), obteniendo valores de K_{LC} mayores que la unidad.

Por otro lado, la distribución de soluto en SEC se rige principalmente por el cambio de entropía del polímero en el poro. Combinando las ecuaciones y con un $\Delta H \cong 0$ se obtiene que $K_{SEC} = e^{\Delta S^\circ / R}$ (1.15). La movilidad del soluto se hace más limitada dentro de los poros del empaquetamiento de la columna, a causa de la resistencia que opone el poro a la libre conformación del polímero, por esta razón la entropía suele disminuir, y como consecuencia también la K_{SEC} . En la figura 4.2.3.1 se muestra una representación termodinámica del proceso que tiene lugar en la cromatografía de exclusión.

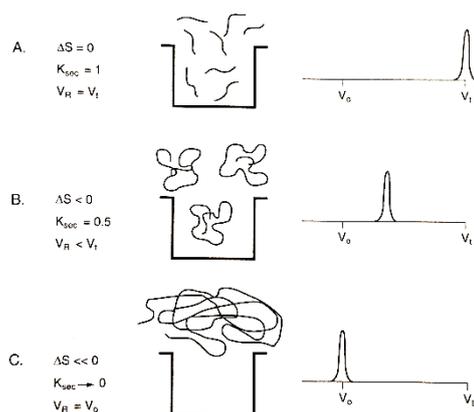


Figura 4.2.3.1 **A.** El polímero presenta libertad de movimiento en el poro; **B.** El polímero ocupa mucho volumen del poro y su libertad conformacional es restringida; **C.** El polímero es excluido completamente del poro. [4]

Las ecuaciones (1.14) y (1.15), además, demuestran que existe una dependencia directa de la temperatura en la retención de los picos con los métodos LC convencionales y una independencia de la temperatura en SEC. Los cambios de temperatura presentan únicamente un pequeño efecto indirecto en la retención, ya que afectan al tamaño de las moléculas de los polímeros, y a su vez afecta a la entropía del sistema. Si se utiliza un buen solvente el tamaño de las moléculas cambia muy poco. Aun así, como en toda CL el aumento de la temperatura en las curvas de calibración mejora la eficiencia.

4.3. COLUMNAS SEC [4][6][8]

Existe una gran variedad de empaquetamientos para las columnas SEC/GPC. En general, se clasifican en empaquetamientos de geles poliméricos (geles orgánicos semirrígidos) y geles de sílice (geles rígidos).

Los geles de poliestireno y estireno-divinilbenceno son generalmente los más utilizados en el análisis de polímeros solubles en disolventes orgánicos, mientras que los geles semirrígidos hidrófilos son los utilizados en los análisis de polímeros solubles en agua.

Los geles de sílice presentan varias ventajas sobre los poliméricos, son mecánicamente más estables y pueden ser usados con una gama más amplia de disolventes. Su principal inconveniente es la adsorción que sufren los solutos en la superficie del material del empaquetado, provocando una reducción en el volumen disponible del poro.

Es necesario emplear partículas de empaquetamiento pequeñas y totalmente porosas, y solutos con altas tasas de difusión para obtener una buena eficiencia. Es importante tener en cuenta que el ensanchamiento de la banda es inherente al método SEC, y que por tal de minimizar los efectos causados por la difusión de Eddy y obtener una buena eficiencia, es necesario el uso de partículas porosas pequeñas para el empaquetamiento de la columna y solutos con altas tasas de difusión, ya que así el movimiento de las partículas se ve facilitado.

Para obtener un rendimiento óptimo del material de embalaje SEC es imprescindible que la presión que se crea en el sistema de la columna sea baja; una buena estabilidad mecánica, química y térmica de la columna; que la degradación de las fracciones de la masa molar en macromoléculas sea mínima; que se genere la mínima interacción entre el soluto y el material de relleno de la columna.

La combinación de estas propiedades da lugar a una buena resolución en los resultados.

4.3.1 Columnas acuosas SEC^{[4][6]}

El interés por las columnas acuosas SEC proviene de varios motivos. Muchos solutos, principalmente los polímeros naturales, se disuelven preferentemente en disolventes acuosos; algunos biopolímeros preservan sus propiedades estructurales en los disolventes acuosos, permitiendo que la estructura de mayor orden pueda ser estudiada; y el coste del disolvente es usualmente bajo.

El empaquetamiento de estas columnas presenta una alta superficie hidrófila, evitando lugares hidrofóbicos e iónicos. Como FM se usa agua o soluciones tampón acuosas y el pH se debe encontrar entre 2-10, para evitar la degradación del gel. Una preocupación adicional en las columnas acuosas, es la posibilidad de que se desarrollen bacterias en la columna o en otra parte del sistema cromatográfico. Este problema se puede prevenir con la adición de pequeñas cantidades de sodio azide (NaN_3 , 0.02%) en la FM. Si la adición de esta sustancia perjudica al análisis, es recomendable pasar un flujo periódicamente de esta solución.

4.4 DETECTOR^[4]

El detector es utilizado para controlar los cambios de concentración en el proceso de elución de la columna, midiendo la concentración o el peso del soluto. En SEC pueden ser utilizados tres tipos de detectores:

- Detectores sensibles a la concentración, que miden el cambio en una propiedad física de la elución, tal como el índice de refracción (IR).
- Detectores selectivos a la estructura, que miden propiedades específicas del soluto, y solo son sensibles a los componentes de la muestra, como el UV-visible.
- Detectores sensibles al peso molecular y a la concentración del soluto, como el de dispersión de la radiación.

4.4.1 Índice de Refracción

El IR detecta la cantidad de soluto en la elución, midiendo la diferencia del índice de refracción entre la FM y el pico de elución (soluto + FM), ya que esta diferencia es proporcional a la concentración del soluto. Es decir, hay una relación directa entre intensidad de la respuesta que proporciona el detector y la concentración del analito.

Es considerado un detector universal, ya que puede ser usado con todo tipo de solutos. Por ejemplo, las muestras que no tienen absorción UV no pueden ser medidas con un detector de UV, en cambio el índice de refracción se produce en todos los analitos.

5. VARIABLES EXPERIMENTALES ^{[4][6]}

Algunas consideraciones de las variables de experimentación en las columnas SEC difieren con las de otros métodos de CL. Por ejemplo, en SEC el empaquetamiento poroso de la columna es el que determina mayoritariamente la retención y la resolución del análisis; la fase móvil es escogida principalmente por la solubilidad de la muestra...

5.1 EFFECTOS DEL DISOLVENTE

5.1.1 Solubilidad de la muestra

Dependiendo de la estructura química y del peso molecular, los polímeros pueden ser solubles en agua o en disolventes orgánicos. Un polímero es soluble en agua cuando posee un número suficiente de grupos hidrófilos a lo largo de la cadena principal o de las cadenas laterales.

El proceso de disolución de los polímeros presenta dos etapas: la primera es típicamente lenta y se produce el hinchamiento del polímero por la solvatación de las moléculas del disolvente en éste, y en la segunda se produce la liberación de las cadenas que forman los polímeros. En sustancias de bajo peso molecular este proceso puede variar. Como regla general, la solubilidad decrece con el incremento del peso molecular.

La etapa del control de la velocidad es la difusión del disolvente al penetrar el polímero y la cristalinidad que presenta la muestra. Al calentar la mezcla, se reduce la viscosidad del solvente, acelerando la difusión y la disolución. Si las condiciones termodinámicas son favorables se forma una única fase líquida homogénea y si no lo son, la disolución es sólo parcial, y la fase en disolución líquida coexiste con la fase de sólido hinchado.

Un material es soluble en un disolvente si las moléculas de los dos compuestos son compatibles y es determinado a través del parámetro de solubilidad (δ). La disolución tiene lugar cuando δ del polímero y del disolvente son iguales.

$$\delta = \frac{D \sum G}{M} \quad (1.16)$$

Siendo D la densidad, M el peso molecular de la unidad estructural, y G la constante de atracción molar.

5.1.2 Selección del disolvente y de la FM

En cromatografía SEC el disolvente utilizado debe ser el mismo que el de la FM de la columna, por lo tanto, no puede ser usado un gradiente de elución. La selección del disolvente implica ciertas

consideraciones incluyendo la conveniencia, el tipo de muestra, el empaquetamiento de la columna, las variables experimentales del análisis...

Las columnas acuosas SEC son compatibles con agua, soluciones acuosas de sales inorgánicas neutras y soluciones tampón.

El tipo de solución tampón, la concentración de la sal y el pH influyen en la retención de muestras poliméricas iónicas, ya que la sal inorgánica que se forma puede ser neutra, ácida o básica y ésta en solución es disociada en sus respectivos iones. Con la adición de un solvente orgánico se puede evitar que el soluto quede retenido en la columna.

Las muestras poliméricas no iónicas se ven afectadas por menos factores y como fase móvil puede utilizarse agua.

Las sales en general parecen acelerar la degradación del empaquetamiento de la columna particularmente a temperaturas por encima del ambiente.

El disolvente debe disolver completamente la muestra. Si no es así, la muestra puede ser parcialmente fraccionada dependiendo de la masa molar, la cristalinidad, y la composición del polímero. A su vez, no debe degradar la muestra durante la disolución, ni el análisis. Un indicio en la degradación de la muestra es el cambio en la viscosidad de la disolución, ya que las moléculas más grandes del soluto son las más susceptibles a la degradación, y son éstas las que más influyen en la viscosidad de la solución.

La FM no varía el control de la resolución, más bien, está limitada al solvente en el que se disuelve la macromolécula de la muestra. Es recomendable el uso de disolventes de baja viscosidad, teniendo en cuenta la temperatura del análisis, para mejorar la transferencia de masa. Para obtener una buena resolución, el disolvente debe presentar una temperatura de ebullición 25-50°C superior a la temperatura a la que se optimiza la columna. De esta forma se asegura que la viscosidad de la FM sea baja y por lo tanto que la velocidad de difusión del soluto sea relativamente alta.

En la selección del disolvente se debe tener en cuenta también la compatibilidad de éste con el detector, es decir, permitir una detección adecuada del soluto en el eluyente. Por ejemplo, en el uso de un detector de índice de refracción, el índice de la FM debe ser lo más diferente posible al índice de refracción de la muestra. En el caso de los detectores UV la FM debe presentar una absorción más baja que la de la muestra.

Es importante tener en cuenta que a menudo el mayor gasto de tiempo en los experimentos SEC se produce en el cambio de disolvente de un método a otro, ya que la estabilidad basal requiere mucho tiempo. Si se puede evitar el cambio de disolvente, se realizarán los análisis de diferentes tipos de muestra sin demora.

5.2 EFECTOS DE LA MUESTRA

5.2.1 Concentración de la muestra

La concentración de la muestra se debe encontrar entre 0.1-0.5% en peso dependiendo del MW de la muestra.

En SEC el aumento de la concentración de la muestra provoca un aumento en la retención del polímero. Para obtener la máxima precisión en la determinación de la masa molar utilizando curvas de calibración, se debe minimizar la dependencia de la concentración en el volumen de retención, trabajando así con la concentración más baja posible, pero teniendo en cuenta la relación señal/ruido.

La concentración también está limitada por la viscosidad de la muestra. A altas concentraciones, el aumento de la viscosidad de la solución puede causar un ensanchamiento significativo en la banda. Para prevenir problemas de este tipo, se recomienda que la solución no presente más del doble de viscosidad que la fase móvil. Para los polímeros de gran masa molar se requiere una concentración de menos de 0,1% para eliminar estos efectos.

5.2.2 Volumen de inyección

El efecto que produce el volumen de inyección en la retención es importante cuando se lleva a cabo una calibración. El uso de un loop inyector es esencial y debe ser empleado para todos con todos los patrones y las muestras.

La retención de la muestra incrementa con el aumento de volumen de inyección, al mismo tiempo que la eficiencia de la columna disminuye. Las variables de inyección pueden provocar un ensanchamiento en la banda, lo que reduce la resolución y provoca mediciones inexactas de la masa molar. Para incrementar la eficiencia de la columna es recomendable utilizar volúmenes reducidos.

Cuando se han seleccionado las condiciones experimentales óptimas, se debe considerar si es más ventajoso la inyección de un pequeño volumen de una solución de alta concentración o al revés.

5.3 FLUJO

Generalmente, se utiliza un flujo inferior a 2 ml/min con un diámetro de columna aproximado de 0.8 cm. Hay que encontrar un compromiso entre velocidad y resolución-eficiencia, normalmente esto se obtiene a 1 ml/min, ya que se debe tener en cuenta que los polímeros de masa molar muy grande son degradados con altas velocidades en la FM. Un aumento excesivo en el flujo, produce una disminución de la resolución, y a diferencia de otros métodos de CL convencionales también produce una disminución en la eficiencia.

En las curvas de calibración SEC destinadas al cálculo de la masa molar, las fluctuaciones de los caudales instrumentales pueden causar grandes errores en los promedios y distribuciones de la masa molar. La diferencia entre los volúmenes de retención de diferentes solutos es a veces pequeña y, por lo tanto, los errores asociados con las variaciones del caudal pueden ser significativos. En sistemas de alto

rendimiento, se requiere un caudal constante y preciso desde los ensayos de calibración hasta el análisis de la muestra. El tolueno y la acetona se usan a menudo como marcadores de flujo. La adición de una pequeña cantidad de cualquiera de estas sustancias generalmente produce un pico nítido y diferente, lejos de cualquier pico del soluto. Si el marcador es añadido a cada uno de los patrones de calibración, se puede promediar el volumen de retención del marcador sobre todas las inyecciones de todos los patrones. Comparando el volumen de retención del marcador en una inyección individual con el valor medio sobre todas las inyecciones de todos los estándares, los volúmenes de retención de los patrones de polímero pueden ser corregidos con relación al promedio.

La mayoría de las casas comerciales de paquetes de software de procesamiento de datos SEC permiten correcciones del volumen de retención usando un marcador de flujo. Es importante darse cuenta de que las fluctuaciones grandes son probablemente indicativas de un problema con el sistema de suministro del disolvente o de alguna fuga en alguna parte del sistema.

5.4 TEMPERATURA

La temperatura se incrementa para aumentar la solubilidad de la muestra, o para mejorar la eficiencia de la columna disminuyendo la viscosidad del disolvente. Generalmente, es un parámetro que se optimiza según la conveniencia, si la muestra es suficientemente estable, con fase acuosa se puede mejorar la eficiencia y la resolución aumentando la temperatura a 50-70°C.

Aunque la temperatura puede presentar cierto efecto sobre la resolución de la columna, no es reflejado en la curva de calibración, ya que su influencia en la pendiente y en la posición de la masa molar es despreciable. Además, este efecto se reduce si la muestra se disuelve en buen solvente.

6. CALIBRACIÓN ^{[4][6]}

Una vez acabada la experimentación SEC, las moléculas de los polímeros de diferentes tamaños son separadas y detectadas como una función del V_R . El V_R aumenta con la disminución del tamaño de la molécula de soluto que eluye.

Mientras que la separación por SEC de oligómeros o macromoléculas naturales puede dar lugar a distintos picos, el análisis de polímeros sintéticos suele dar picos anchos y continuos, ya que habitualmente estas muestras contienen una amplia distribución de masa molar.

El pico de elución SEC se puede interpretar como un perfil de la distribución de tamaños moleculares que presenta la muestra. Los datos obtenidos del pico de elución son útiles para la comparación cualitativa entre muestras. Sin embargo, la comparación es válida únicamente cuando los resultados son obtenidos en las mismas condiciones experimentales, ya que la elución no es función únicamente de la distribución de tamaño molecular de la muestra, sino que también de la columna y la instrumentación específica utilizada en el experimento.

Cuando el pico de elución de una muestra es tratado con una curva de calibración MMD, es entonces cuando se pueden comparar datos de diferentes instrumentos y es extraída la información MMD de la muestra. Para lograr un resultado más exacto y preciso se debe eliminar las influencias que resultan de las características específicas del experimento en particular, pero no las características que nos definen la MMD, que es intrínseca del polímero. Para ello se extrae la información de la masa molar, estableciendo una calibración que relacione el V_R de la elución del pico con la masa molar del polímero. Es utilizada la masa molar y no el tamaño de las moléculas para describir la calibración, porque el tamaño real de las moléculas de los polímeros, al encontrarse en solución, cambia con la temperatura y el disolvente, pero la masa molar del polímero es directamente proporcional a su longitud, y por lo tanto es una propiedad más intrínseca al polímero. Además, para minimizar el efecto producido por los cambios de flujo. Debe ser reportada en términos de V_R .

La calibración de masa molar en SEC es válida solo para un sistema en particular de polímero-disolvente y teniendo un conocimiento específico de las condiciones experimentales. La retención se determina por el tamaño relativo de las macromoléculas de soluto y el tamaño de los poros de la columna. Los diferentes tamaños de poro pueden cambiar el grado en el que las macromoléculas están excluidas de las estructuras de los poros y por lo tanto esto también afecta a la retención.

La calibración debe repetirse con frecuencia para compensar el deterioro de la columna. Pequeñas fluctuaciones en la temperatura o en la presión pueden alterar la calibración, cambiar las columnas, el disolvente o la naturaleza del polímero, requerirá la recalibración del experimento.

Existen varias maneras de calibrar de modo que se pueda realizar una transformación de la curva de elución en una curva MMD. Actualmente, la transformación de datos se realiza mediante softwares comerciales.

6.1 CALIBRACIÓN ESTÁNDAR NARROW-MMD

Los *estándar narrow-MMD* son estándares de polímeros con una MMD estrecha y una M_p conocida. Este tipo de patrones se encuentra disponible para muy pocos polímeros: poliestireno, polimetilmetacrilato, polietileno, polietilenglicol y poli(óxido de etileno).

La importancia de este tipo de calibración es optimizar la resolución de las columnas y las condiciones de separación.

6.1.1 Calibración *Peak-Position*

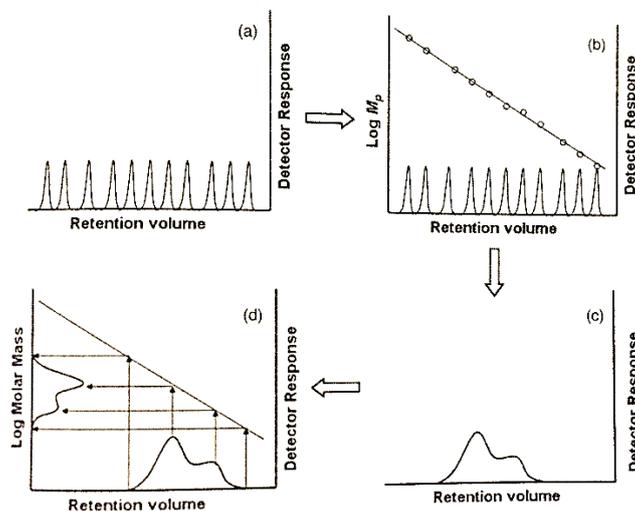


Figura 6.3.1.1 Construcción de la curva de calibración *peak-position* y obtención de la MMD de una muestra desconocida. [6]

En la figura 6.3.1.1 se muestra cómo se lleva a cabo una calibración relativa según la posición del pico y como se usa para obtener la MMD de la muestra desconocida.

En el procedimiento de calibración se utiliza una serie de patrones lineales, de polidispersidad estrecha y masa molar conocida y se analizan por SEC (a). A los picos máximos del cromatograma se les asigna el valor de masa molar proporcionada por el fabricante (M_p). Para cubrir amplios rangos de masas molares se representa de manera convencional con la masa molar en escala logarítmica en base 10. La curva de calibración es construida a través del $\log(M_p)$ en la ordenada y el volumen o el tiempo de elución en la abscisa (b), obteniendo la función $\log(M_p)=f(V_R)$ (1.17). Para rangos de masa molar extendida, estas curvas pueden ser una ecuación polinómica de grado segundo o tercero. Pero se debe tener en cuenta que ajustar los datos de calibración a polinomios de grado superior (cuarto o quinto) proporciona mejores ajustes, pero genera datos más inexactos. Esto se debe a un ajuste excesivo, en el que no solo se están ajustando los datos experimentales, sino que también el ruido y el error experimental, reduciendo así la capacidad

predictiva de la curva de calibración. Las columnas que presentan empaquetamientos mixtos pueden lograr la linealidad en la calibración, proporcionando así una amplia capacidad analítica MMD. En estos tipos de columna, se recomienda la calibración de primer orden.

El análisis de muestras desconocidas se debe realizar en el mismo equipo y bajo las mismas condiciones experimentales que la calibración. Cuando se analiza una muestra desconocida (**c**), su pico/perfil de elución se refleja en el eje de la masa molar y la altura de la elución proporciona una medida de la cantidad de materia que presenta. Por lo tanto, la combinación del V_R y de la respuesta del detector se utiliza para obtener la MMD de la muestra (**d**). Usando las ecuaciones del apartado 4.1.2, la masa molar de cada elución (M_i) y la altura de cada elución (h_i), se obtiene la masa molar media, en número y en peso de la muestra desconocida.

La curva de calibración relativa es bastante precisa, y su exactitud es excelente cuando la estructura y la química de analitos es idéntica a la de los estándares de la calibración. Desafortunadamente, no suele ser así. Por lo tanto, es necesario establecer las condiciones de análisis (disolvente, temperatura, conjunto de columnas, método de detección) por tal de que los resultados sean reproducibles.

Las columnas acuosas SEC se calibran generalmente a través del método de calibración por pico.

7. ESTUDIO EXPERIMENTAL

7.1 OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método basado en la técnica SEC para medir la distribución del peso molar de muestras PEG, ya que como se ha explicado en el apartado 3.1 la MMD es una propiedad que influye en muchos de los parámetros físicos de los materiales, como la fuerza, la rigidez y la resistencia química.

Para la determinación de la MMD en muestras reales es necesario la realización de una curva de calibración.

7.2 TIPO DE MUESTRA

Las muestras a analizar son PEG sintetizado en las plantas de IQOXE (PEG-200, PEG-300, PEG-400, y PEG-600). Están formados por reacción del óxido de etileno con monoetilenglicol, con dietilenglicol o con poliglicoles líquidos, como se ha explicado en el apartado 3.1.

- Los PEG líquidos son claros, transparentes, viscosos y moderadamente higroscópicos.
- Los PEG sólidos son blancos, parecidos a la cera y presentados en escamas.

7.3 REACTIVOS

Agua Millipore	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua ultra pura
Metanol	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pureza: 99.9% ▪ Tóxico e inflamable
Acetato sódico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pureza: 99% ▪ Irritante e inflamable
Ácido acético	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pureza: 99% ▪ Corrosivo, irritante e inflamable.
Acetona	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pureza: 99.5% ▪ Irritante e inflamable

7.4 INSTRUMENTACIÓN y MATERIAL

- La columna utilizada es una *Agilent PL aquagel-OH* con un tamaño de poro de 5 μm y un tamaño de columna de 300 x 7.5 mm. Este tipo de columna cubre un rango de masas molares de entre 100-10.000 g/mol, y está destinada a polímeros de bajo peso molar. Todas las columnas *PL Aquagel-OH* contienen un relleno polimérico macroporoso con una superficie extremadamente hidrofílica. Son columnas de excelente estabilidad mecánica y larga duración,

respecto a otras columnas de SEC acuosas. Los grupos funcionales polihidroxilos de su superficie permiten el análisis de la mayoría de los polímeros neutros hidrófilos, simplemente utilizando agua como eluyente. Además, resisten disolventes de elevada fuerza iónica, generalmente usados para evitar fenómenos de agregación de los polímeros, por eso son ideales para el análisis de polielectrolitos. En el caso de los polímeros relativamente hidrófobos, puede añadirse hasta un 50% de metanol en el disolvente utilizado.

Además, el sistema cromatográfico presenta entre el inyector y la columna analítica, una precolumna con las mismas características que la anterior, pero de 50 mm. Su función es eliminar interferencias y contaminaciones de la muestra o del solvente antes de que lleguen a la columna analítica, y así aumentar la vida y las prestaciones de ésta.

- Para la calibración del método se utiliza un *GPC/SEC Calibration kit* de *Agilent* con estándares de PEG. Estos patrones de polímeros son el material de referencia utilizado para llevar a cabo la calibración de la columna de manera precisa y fiable, con garantía de la norma de calidad ISO 9001:2000. Los kits se envasan en paquetes de diez patrones de polímeros diferentes que cubren un rango de masa molar entre 106 y 22.000 g/mol, para su uso con disolventes orgánicos y acuosos, de polaridad media y polares. Cada polímero individual cuenta con su propio certificado de análisis de valores y condiciones analíticas. Los polímeros se seleccionan para proporcionar puntos de calibración equidistantes en una escala logarítmica de PM, ofreciendo una curva de calibración más uniforme.^[10]
- Software utilizado en la calibración del método y en la predicción de la masa de las muestras: *Agilent GPC Data Analysis Software for Agilent ChemStation* ^[11].

7.5. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Tanto en la optimización como en la calibración del método, el procedimiento a seguir para tratar la muestra es el mismo.

En una balanza analítica con la ayuda de un vaso de precipitados de 50 ml se pesan los gramos necesarios de muestra, y se añade el disolvente hasta un peso de 25 g. La disolución resultante es homogenizada con un agitador. A continuación, con un filtro de nylon de 25 mm y 0.45 µm de tamaño de poro se filtra la disolución, para evitar interferencias que afecten al análisis y a la columna. En el caso de la calibración del método, es necesario un último paso, antes de que la muestra sea inyectada en el cromatógrafo: a la disolución resultante se le añade 1 µl de acetona que será utilizado como marcador de flujo. Finalmente, con una micro jeringa y un inyector manual, la muestra es analizada por SEC y detectada con un RI.

En el rango de masas molares en el que se trabaja, las muestras de mayor peso presentan un estado sólido y las de menor peso un estado líquido, se recomienda el uso de la punta de una espátula y el uso de una micro jeringa, para la manipulación de las muestras respectivamente.

Mediante el análisis de una solución de concentración 0.2% en peso de PEG-1000 se ha comprobado si con el filtrado hay pérdida de la muestra, comparado las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma. En el caso de la muestra sin filtrar presenta un área de $4.52744e-5$, mientras que el área de la filtrada es de $4.51559e-5$. Teniendo en cuenta que el análisis de la distribución de la masa molar es cualitativo y la despreciable diferencia entre las áreas de los picos observada, se puede determinar que el filtrado no afecta al estudio de la muestra.

Se ha observado que cuando la línea base del cromatograma muestra muchas fluctuaciones, indica que la FM del cromatógrafo debe renovarse; y que es recomendable bajar o subir el flujo poco a poco cuando se cambia de método o de FM, ya que la columna puede sufrir sobrepresiones.

7.6. CONDICIONES EXPERIMENTALES A OPTIMIZAR

Optimizar las condiciones de un análisis en cromatografía significa obtener una buena resolución, una distancia adecuada entre los picos del cromatograma; una alta eficiencia, minimizando los efectos que producen el ensanchamiento del pico; y un tiempo de análisis coherente. En el caso de la cromatografía SEC la resolución y la eficiencia dependen mayoritariamente de la polidispersidad de la muestra de polímero, el tamaño de poro de la columna y la pendiente de la curva de calibración.

Para la optimización del método, se han utilizado muestras de PEG 200, 300, 400 y 600 sintetizados en las plantas de IQOXE y estándares comerciales de 1000, 7000 y 13.000. Cada tipo de PEG se prepara en matraces diferentes, ya que se ha comprobado experimentalmente que si se inyectan juntos se solapan todos los picos. El análisis de cada muestra se ha realiza por duplicado y se ha calcula el valor del T_R medio para la discusión de los resultados ($\overline{T_R}$).

No se ha adjuntado los valores de los análisis de todos los PEGs, ya que la interpretación de los resultados es la misma. Las tablas que resumen la experimentación muestran los datos más representativos.

7.6.1 Disolvente

Como ya se ha explicado en el apartado 5.1 existen distintos factores a tener en cuenta a la hora de escoger el disolvente adecuado para el análisis. Se pretende determinar con que disolvente se obtiene mejor resolución, es decir, más diferencia entre los tiempos de retención de distintas masas molares de muestras de PEG.

Las tres propuestas de disolvente se han determinado a través de la información bibliográfica y las recomendaciones de la guía *Agilent*. Teniendo en cuenta que la muestra es un polímero neutro, no hace

falta la adición de una solución tampón para el ajuste del pH, solo tener en cuenta que se debe encontrar dentro de las especificaciones de la columna, aun así se comprueba el efecto que produce el uso de una solución buffer.

Tabla 7.6.1.1 Tabla resumen de las pruebas realizadas con los tres tipos de disolventes: disolvente/FM, pH de la disolución, concentración en % peso del PEG, temperatura del sistema, volumen de inyección, flujo/caudal, tipo de muestra PEG, T_R experimental y diferencia entre los T_R .

Disolvente	pH	Concentración (% peso)	Temperatura (°C)	Inyección (µl)	Flujo (ml/min)	PEG	$\overline{T_R}$	Diferencia entre T_R
Agua Millipore	6.2	0.4	40	20	1	400	11,165	0.134
						600	11,031	
Agua + 30% metanol	6.1				0.6	400	17.169	0.353
						600	16.816	
Solución tampón de ácido acético/acetato de sodio	4.6				1	400	11,484	0,013
						600	11,497	

Otra especificación para el uso de la columna *PL aquagel-OH*:

- La presión del sistema no debe superar los 112 bar, por lo tanto, el flujo no se puede mantener como una variable constante, ya que cada disolvente ejerce una presión distinta en la columna y el caudal se debe adecuar para que la presión que se ejerce no exceda el límite. Para mejorar el mantenimiento de columna se ha trabajado a flujos que no superen los 80 bar de presión en el sistema.
- El pH de la disolución se debe encontrar entre 2 y 10.
- La temperatura del sistema no debe superar los 80°C y debe presentar como mínimo 10°C menos que la temperatura de ebullición de la disolución. Se recomienda trabajar a 40°C.

A través del análisis de los resultados se determina que el disolvente/FM que proporciona una mejor resolución es la solución acuosa al 30% en metanol. Aun así, hay múltiples motivos para escoger como disolvente agua, de entre los más importantes:

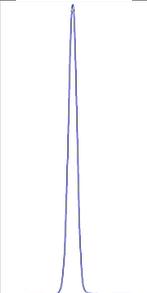
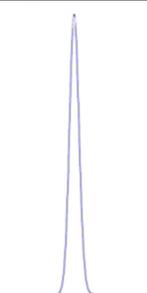
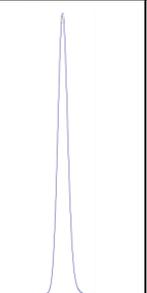
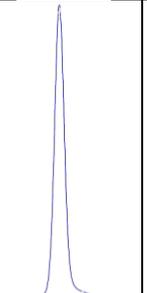
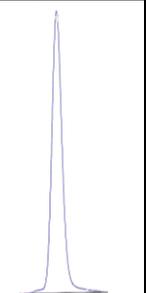
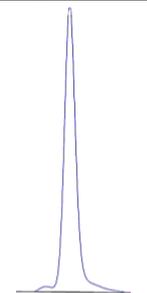
- La resolución entre los picos del cromatograma es suficiente para la calibración.
- Permite el uso de flujos más elevados, proporcionando menor tiempo de análisis y por lo tanto mayor eficiencia.
- El rango de masas de PEG analizado es completamente soluble en agua.
- Proporciona un mayor mantenimiento de la columna.
- Es el recomendado por la casa comercial *Agilent*.
- Es el más económico.
- No presenta toxicidad.

7.6.2 Volumen de inyección ^[10]

El volumen de inyección requerido depende del tamaño de las partículas de la columna: las partículas más pequeñas necesitan volúmenes de inyección inferiores para minimizar el volumen muerto. Los volúmenes de inyección de mayor tamaño son recomendados para muestras con un peso molar elevado en concentraciones bajas. De esta forma, se reduce la viscosidad y se asegura la obtención de un cromatograma de calidad.

El sistema de inyección del que se dispone se utiliza para diversas columnas y métodos, por esta razón es necesario adaptarse a un loop de 20 μl , con un sistema de inyección manual. Teniendo en cuenta que *Agilent* recomienda que se utilice una inyección de 100 a 200 μl para partículas cuyo tamaño sea de 5 μm , y que como se ha explicado en el apartado 5.2.2 el uso de un volumen pequeño aumenta la eficiencia; a través de la experimentación se comprueba la eficiencia que proporcionan 20 μl de inyección en muestras de PEG, con un intervalo de masas molares de 300-13.000 g/mol.

Tabla 7.6.2.1 Condiciones de análisis: disolvente agua *Millipore*, concentración del 0.3% PEG, 40°C, 20 μl , 1 ml/min.

PEG-300 \overline{T}_R : 11.265	PEG-400 \overline{T}_R : 11.143	PEG-600 \overline{T}_R : 11.011	PEG-1000 \overline{T}_R : 11.832	PEG-7000 \overline{T}_R : 8.801	PEG-13.000 \overline{T}_R : 8.406
					

Se determina la eficiencia con el ensanchamiento de la banda, podría ser calculada a través de la teoría de los platos o con la teoría de las velocidades, pero no es necesario porque visualmente ya se observa que la eficiencia se mantiene en el análisis de todas las muestras, ya que la elución de los picos se produce prácticamente en el mismo intervalo de tiempo.

El volumen de inyección propuesto, se adecua a las necesidades del análisis, ya que se obtienen picos bien definidos y únicamente se observa una pérdida de simetría al aumentar el peso molar (asimetría positiva y negativa). Este efecto puede ser producido por la propia polidispersidad de la muestra o el por el límite de exclusión de la columna. En el caso de realizar un análisis cuantitativo, si se debería tener en cuenta la asimetría de la banda, pero en el análisis de la distribución del peso molar que se lleva a cabo en este informe únicamente se tiene en cuenta el T_R o V_R en el que aparece el pico y su altura.

7.6.3 Concentración

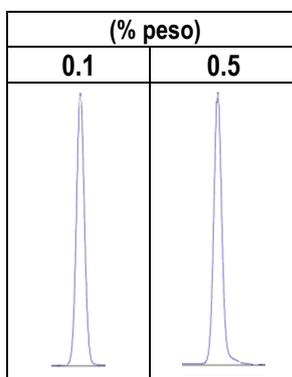
La concentración debe encontrarse en un intervalo entre 0.1-0.5% en peso, por esta razón se comprueba el efecto de la concentración en este rango.

$$\% \text{ en peso} = \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{masa de solución (g)}} \times 100 \quad (1.18)$$

Tabla 7.6.3.1 Tabla resumen de las pruebas realizadas a tres niveles de concentraciones de PEG-400: disolvente/FM, concentración en % peso del PEG-400, temperatura del sistema, volumen de inyección, flujo/caudal, PEG-400, T_R medio experimental.

Disolvente	Concentración (% peso)	Temperatura (°C)	Inyección (µl)	Flujo (ml/min)	PEG	\overline{T}_R
Agua Millipore	0.1	40	20	1	400	11.101
	0.3					11.143
	0.5					11.185

Tabla 7.6.3.2 Efecto de la concentración en la eficiencia del pico. Condiciones de experimentación tabla 7.6.3.1.



La tabla 7.6.3.2 muestra los efectos que provoca el aumento de la concentración en la banda cromatográfica. Se determina que un aumento en la concentración provoca un aumento en la asimetría de la banda, esto concuerda con lo explicado en el apartado 5.2.1, ya que se recomienda trabajar a concentraciones lo más bajas posibles, para obtener mejor eficiencia. Por lo tanto, la concentración de 0.1 es la más adecuada.

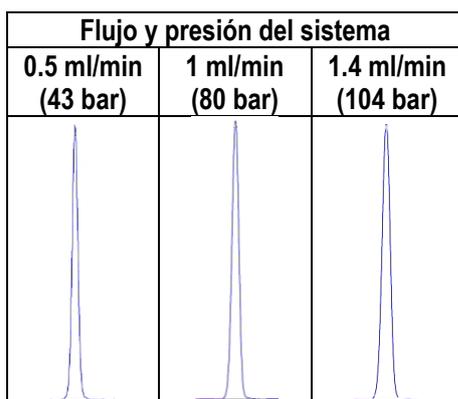
7.6.4 Flujo

Generalmente se trabaja a 1 ml/min obteniendo una buena resolución y eficiencia. La guía *Agilent* recomienda que la presión del sistema no supere los 112 bar. A través de la experimentación se comprueba el efecto del flujo sobre la elución del pico a tres niveles de caudal.

Tabla 7.6.4.1 Tabla resumen de las pruebas realizadas: disolvente/FM, concentración en % peso, temperatura del sistema, volumen de inyección, flujo/caudal, tipo de PEG, T_R medio experimental, diferencia entre los T_R .

Disolvente	Concentración (% peso)	Temperatura (°C)	Inyección (µl)	Flujo (ml/min)	PEG	\overline{T}_R	Diferencia entre T_R
Agua Millipore	0.1	40	20	0.5	300	22.858	0.281
					600	22.640	
				1	300	11.219	0.245
					600	10.974	
				1.4	300	8.076	0.184
					600	7.892	

Tabla 7.6.4.2 Efecto del flujo en la eficiencia del pico. Condiciones de experimentación tabla 7.6.4.1, muestra de PEG 300.



Por lo que hace a la resolución, como se observa en la tabla 7.6.4.1, al disminuir el flujo la separación entre picos aumenta. En la tabla 7.6.4.2 se muestra como la eficiencia también aumenta con la disminución del caudal, ya que así se reduce la degradación del polímero, y la elución es más homogénea.

Se confirma lo explicado en el apartado 5.3.

Se determina trabajar a un flujo de 0.7 ya que con este caudal se establece un compromiso entre el tiempo de análisis y la resolución-eficiencia; además, se consigue un mejor mantenimiento de la columna.

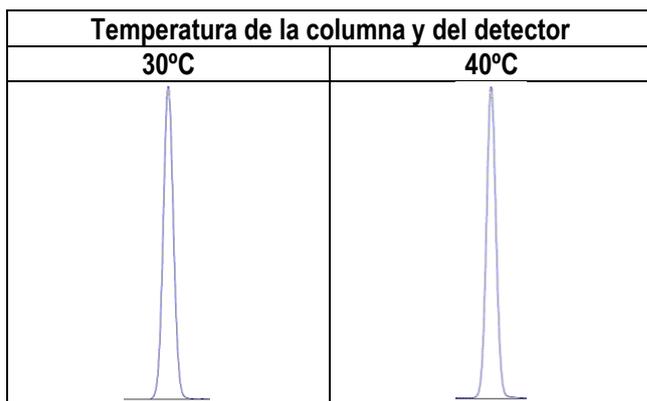
7.6.5 Temperatura

La temperatura es el último parámetro a optimizar, ya que como se ha demostrado en el apartado 4.2.3 y se ha explicado en el apartado 5.4, su influencia en la retención del polímero es mínima y su ajuste únicamente afecta a la solubilidad de la muestra. La guía *Agilent* recomienda trabajar a 40°C, por este motivo se comprueba el efecto de la temperatura a dos niveles.

Tabla 7.6.5.1 Tabla resumen de las pruebas realizadas: disolvente/FM, concentración en % peso, temperatura del sistema, volumen de inyección, flujo/caudal, tipo de PEG, T_R medio experimental, diferencia entre los T_R .

Disolvente	Concentración (% peso)	Inyección (μ l)	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Flujo (ml/min)	PEG	\overline{T}_R	Diferencia entre T_R
Agua Millipore	0.1	20	30	1	400	11.112	0.123
					600	10.989	
			40	1	400	11.101	0.127
					600	10.974	

Tabla 7.6.5.2 Efecto de la temperatura en la eficiencia del pico. Condiciones de experimentación tabla 7.6.5.1, muestra de PEG 400.



El efecto de la temperatura sobre la resolución es despreciable, ya que la separación de los picos en los dos niveles es prácticamente la misma. Por lo que hace a la eficiencia, temperaturas elevadas proporcionan mejor solubilidad a la muestra, eluyendo el pico a T_R menores y mejorando así la eficiencia, pero en este intervalo de temperatura no es un efecto apreciable.

Como se observa en las tablas 7.6.5.1 y 7.6.5.2 el efecto de este parámetro no influye prácticamente en el análisis, así que se determina trabajar a 40 $^{\circ}$ C ya que, en épocas de verano, los cromatógrafos pueden alcanzar temperaturas superiores a los 30 $^{\circ}$ C afectando así a las condiciones experimentales.

7.7. CURVA DE CALIBRACIÓN

Para la calibración de la curva se utiliza una serie de estándares de *GPC/SEC Calibration kit* de *Agilent* que cubren un rango de masas molares entre 106 y 22000 g/mol; y para la construcción de la curva el software *Agilent GPC Data Analysis Software for Agilent ChemStation*.

- Material de referencia con certificado de análisis: estándares de PEG con un M_p de 106,194, 410, 615, 1020, 1450, 4040, 8160, 16100 y 21160 (g/mol).

Condiciones optimizadas del análisis para la construcción de la curva de calibración:

Columna	Agilent PL aquagel-OH 5 µm; 300 x 7.5 mm	Concentración PEG (% peso)	0.1 (% peso)
Detector	Índice de refracción	Flujo	0.7 ml/min
Disolvente	Agua Millipore	Temperatura	40°C
Volumen de inyección	20 µl		

La concentración de PEG en cada muestra es calculada a través de la ecuación 1.19:

$$\text{Concentración \% peso del PEG} = \frac{0.025 \text{ g PEG}}{25 \text{ g solución}} \times 100 = 0.1\% \text{ (1.19)}$$

Una vez analizados por SEC la serie de estándares PEG utilizados para calibrar la columna, se obtiene el cromatograma de cada uno de ellos y se procede a la calibración. Se debe tener en cuenta que el software utilizado *Agilent* únicamente permite la calibración con el V_R obtenido en el cromatograma de cada estándar, no con la media de repeticiones.

Una vez seleccionados los cromatogramas con los que se construirá la curva de calibración (teniendo en cuenta que el análisis de cada PEG se ha realizado bajo las mismas condiciones) y el tipo de calibración, se relaciona el M_p de cada estándar proporcionado por la casa comercial y el T_R obtenido. En el caso de utilizar el corrector de flujo, también se debe indicar el T_R en el que aparece el marcador (acetona). El software también tiene en cuenta la línea base de cada análisis, de esta forma se eliminan interferencias y aumenta la exactitud en el resultado.

Por último, se representa el $\log(M_p)$ respecto el T_R o V_R obteniendo la función (1.17), utilizada para estimar el peso molar del polímero eluido a V_R específico.

7.7.1 Ajuste de la curva

Mediante una calibración *Narrow Standards*, se realizan una serie de pruebas usando distintos estándares y grados polinómicos en la ecuación de la curva de calibración, por tal de conseguir un mejor ajuste y por lo tanto una M_p predicha más exacta.

En la tabla 7.7.1.1 se muestran seis ensayos de calibración utilizando el material de referencia proporcionado. Se debe tener en cuenta que la función (1.17) únicamente es válida cuando se encuentra entre el límite de exclusión y el límite de permeación. Es utilizado el coeficiente de determinación (r^2) para determinar la calidad de la regresión, aceptando valores de $r^2 \geq 0.99$:

- Comparando el coeficiente de determinación de la curva de calibración con corrector de flujo y sin corrector de flujo, se observa que las rectas más ajustadas son la que presentan marcador para la corrección del flujo (F) ya que de esta forma se minimiza la distorsión de la curva debido

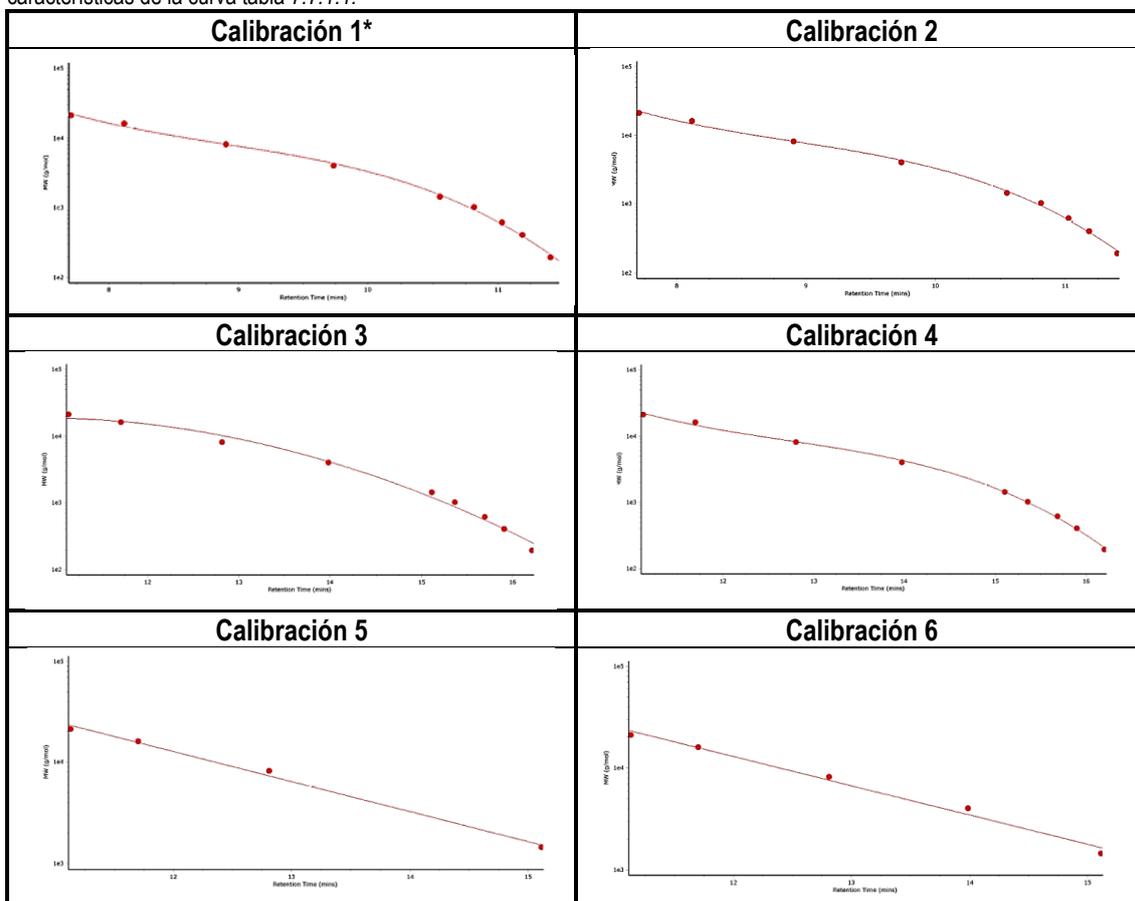
a las posibles variaciones en el flujo, y asegura una mayor exactitud en los resultados, de esta forma se trabaja con V_R y no con T_R (ecuación 1.6).

- Según los datos obtenidos se considera eliminar la M_p 106 para mejorar el ajuste de la regresión, ya que si se analiza el gráfico de la *Calibración 1* se observa que este punto se encuentra en el límite de permeabilidad de la calibración.
- Si se aumenta el grado de la ecuación polinómica de la curva de calibración, el ajuste es mayor.

Tabla 7.7.1.1 Resultados de los seis ensayos de calibración: con y sin marcador de flujo, puntos de la curva, grado de la ecuación polinómica de la curva de calibración y coeficiente de determinación.

Calibración	Marcador de flujo	Puntos/estándares	Grado del polinomio	Coficiente de determinación (r^2)
1	No	106, 194, 410, 615,	1	0,9292
	No	1020, 1450, 4040,	2	0,9792
	No	8160, 16100, 21160	3	0,9935
2	No	194, 410, 615,	3	0,9982
3	Si	1020, 1450, 4040,	2	0,9905
4	Si	8160, 16100, 21160	3	0,9990
5	Si	194, 410, 615, 1020	1	0.9863
6	Si	1450, 4040, 8160, 16100, 21160	1	0.9889

Tabla 7.7.1.2 Curvas de calibración obtenidas en las distintas pruebas. Condiciones de la experimentación apartado 7.7 y características de la curva tabla 7.7.1.1.



*Ecuación de la curva de tercer grado.

Se decide trabajar con la *Calibración 4*, y se determina que la relación entre el log de M_p (y) y el V_R (x) sigue una ecuación polinómica de tercer grado, por lo tanto, una función no lineal:

$$y = -0.02123x^3 + 0.8092x^2 - 10.49x + 50.1 \quad (1.20)$$

Para la validación de la recta, se utiliza el coeficiente de determinación (0.9990) y el coeficiente de correlación (-0.9756) obtenidos en la curva. El coeficiente de determinación, como ya se ha explicado, determina la calidad de la regresión y su valor debe ser igual o superior a 0.99; el coeficiente de correlación determina la relación entre las dos variables, siendo aceptado un valor entre 1 y -1, pero diferente de 0 (puntos totalmente desajustados).

La calibración es validada con los datos proporcionados por el software, ya que en la construcción de la curva, además, de la M_p y el T_R , el programa tiene en cuenta otros parámetros como las oscilaciones provocadas por el flujo o la línea base.

Tabla 7.7.1.3 Cromatogramas de los estándares utilizados en la calibración 4: valor certificado de la M_p (g/mol), tiempo de retención del PEG y tiempo de retención del marcador de flujo F (acetona).

M_p	T_R - PEG	T_R - F	PEG	T_R - PEG	T_R - F
194	16.200	22.894	4040	13,982	22.883
410	15.902	22.876	8160	12,816	22.883
615	15.678	22.862	16100	11.706	22.883
1020	15.360	22.879	21160	11.125	22.883
1450	14.153	22.882			

A través de la tabla 7.7.1.3 se verifica que el tiempo de elución del pico disminuye con el aumento de la masa molar.

7.8. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Como se ha explicado en el apartado 6.3 la curva de calibración obtenida en este tipo de análisis, si se estudia un rango de masa molar amplio, puede ser una ecuación polinómica de grado segundo o tercero. Pero se debe tener en cuenta que ajustar los datos de calibración a polinomios de grado superior (cuarto o quinto) proporciona mejores ajustes, pero genera datos más inexactos.

Por este motivo se procede a la validación del método, para verificar que es adecuado a los requerimientos y que puede ser utilizado para resolver el problema analítico en particular.

Para llevar a cabo la validación, se utiliza como material de referencia el del apartado 7.7. Cada estándar va acompañado de un certificado de análisis, en el que se indican los métodos usados en la caracterización y los valores de las propiedades especificadas en el análisis (M_p , M_n , M_w , M_v en g/mol).

A través del test estadístico *T-Student*, (*de dos colas*) se realiza la comparación del valor M_p obtenido a través de la *Calibración 4* y el valor M_p de la referencia, asumiendo que presentan varianzas comparables, ya que el material de referencia no la especifica. El M_p de la referencia ha sido caracterizado a través de una GPC de alta resolución.

Para comprobar la exactitud del método se ha realizado en análisis de cada patrón por triplicado, en las mismas condiciones con las que se realiza la calibración, obteniendo el T_R de cada repetición y prediciendo la M_p con el software *Agilent GPC Data Analysis* (Figura 7.8.1) que utiliza la ecuación polinómica (1.20).

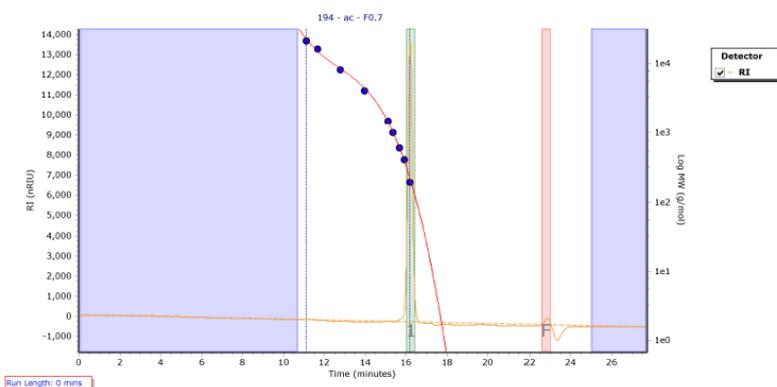


Figura 7.8.1 Predicción de la M_p del patrón 194 con el software *Agilent GPC Data Analysis* y la *Calibración 4*

A través de la ecuación (1.21) se obtiene la $T_{calculada}$ que es comparada con la $T_{tabulada}$, siendo n el número de repeticiones de cada patrón = 3 y S la desviación estándar de la media:

$$T_{calculada} = \frac{|\overline{M_p} - M_p \text{ REFERENCIA}|}{S/\sqrt{n}} \quad (1.21)$$

Tabla 7.8.1 Validación de la *Calibración 4*.

M _p REFERENCIA	M _p PREDICHA	M _p PREDICHA	M _p PREDICHA	$\overline{M_p}$ PREDICHA	S de la M _p PREDICHA	T _{calculada}
194	200	205	211	205,333	5,508	3,564
410	401	398	405	401.333	3.512	4.274
615	625	623	619	622.333	3.055	4.158
1020	1015	1019	1016	1016.667	2.082	2.774
1450	1445	1447	1448	1446.667	1.528	3.780
4040	4057	4046	4052	4051.667	5.508	3.669
8160	8174	8168	8166	8169.333	4.163	3.883
16100	16150	16145	16157	16149.333	6.028	14.559
21160	21123	21129	21115	21122.333	7.024	9.289

Con un $\alpha=0.05$ y $n-1=2$ grados de libertad se obtiene un T_{tabulada} de 4.303.

Si la $T_{\text{calculada}}$ es menor que la T_{tabulada} , las media de la M_p de referencia y la de la predicha son comparables. Por lo tanto, el método es válido, presenta la exactitud requerida con un intervalo de confianza del 95%.

Se determina que la *Calibración 4* es válida para el análisis de muestras con una M_p entre 190-9000 g/mol. Las masas entre 16000-22000 g/mol se encuentran en el límite de exclusión de la calibración, por este motivo la *Calibración 4* no es válida para el análisis de muestras con una M_p que se encuentre en este intervalo. Esta afirmación coincide con las características de la columna *Agilent PL aquagel-OH* utilizada, que cubre un rango de masa molar de 100-10.000 g/mol.

7.8.1 Repetibilidad

Para valorar la precisión del método se analiza la repetibilidad en los resultados. Repetibilidad significa cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud, efectuadas en las mismas condiciones: mismo procedimiento, mismo observador, mismo instrumento en las mismas condiciones, mismo lugar y repetición de las medidas dentro de un período de tiempo corto.

Se determina la repetibilidad a través de los datos obtenidos en el apartado 7.8. y mediante la ecuación de Horwitz (1.22):

$$RSD_{\text{tabulada}} = 2^{1-0.5 \log C} \quad (1.22)$$

En estadística, RSD representa la Desviación Estándar Relativa, y mide la precisión de la media en los resultados ($\frac{S}{\bar{x}}$). Cuanto menor es la RSD calculada, más precisa es la medición.

Tabla 7.8.1.1 Cálculo de la repetibilidad en los resultados.

M_p PREDICHA	M_p PREDICHA	M_p PREDICHA	\overline{M}_p PREDICHA	S de la M_p PREDICHA	RSD CALCULADA	RSD TABULADA	$\frac{1}{2}$ RSD TABULADA
200,000	205,000	211,000	205,333	5,508	2,68E-02	0,897	0,449
401,000	398,000	405,000	401,333	3,512	8,75E-03	0,811	0,406
625,000	623,000	619,000	622,333	3,055	4,91E-03	0,759	0,380
1015,000	1019,000	1016,000	1016,667	2,082	2,05E-03	0,705	0,353
1445,000	1447,000	1448,000	1446,667	1,528	1,06E-03	0,669	0,334
4057,000	4046,000	4052,000	4051,667	5,508	1,36E-03	0,573	0,286
8174,000	8168,000	8166,000	8169,333	4,163	5,10E-04	0,515	0,258
16150,000	16145,000	16157,000	16150,667	6,028	3,73E-04	0,465	0,233
21123,000	21129,000	21115,000	21122,333	7,024	3,33E-04	0,447	0,223

* Para hacer la M_p adimensional, se multiplica por la constante de masa molar 1 g/mol.

Para que el método sea preciso es necesario que la RSD calculada sea menor que la $\frac{1}{2}$ RSD tabulada. Esto se da en todo el rango de masas molares de la calibración, por lo tanto, se determina que la *Calibración 4* proporciona resultados precisos.

7.9. RESULTADOS

En un polímero, la variable fundamental que controla sus características y propiedades es el peso molar. Sin embargo, debido a que los métodos de síntesis son procesos aleatorios y estadísticos en los que el crecimiento de la cadena que polimeriza, está influenciado por multitud de variables, el resultado final es que se obtiene un producto formado por cadenas macromoleculares de distinta longitud. Es decir, no se obtiene un peso molar único sino una distribución de pesos molares, más o menos estrecha, dependiendo del método de síntesis. Por ello, los métodos experimentales de determinación del peso molar proporcionan un valor medio, que será diferente según se emplee una u otra técnica.

Los polímeros que presentan distribución de pesos molares se les denomina polidispersos, formados por una mezcla de cadenas moleculares que, teniendo todas las mismas estructuras químicas, difieren en su tamaño o grado de polimerización.

Con la técnica SEC, como ya se ha explicado, se pueden fraccionar polímeros de acuerdo con su tamaño molecular, y es útil para determinar los valores del peso molar del polímero, su distribución de pesos molares y la forma de la curva de la distribución.

Como se ha explicado en el apartado 4.1.2 la curva de distribución se obtiene de representar la cantidad de polímero en el eje de ordenadas y el peso molar en el eje de abscisas. Una vez obtenido el pico de elución, se refleja la M_p en el eje de la masa molar, proporcionando la altura de elución una medida de la cantidad de materia que presenta. Por lo tanto, la combinación del V_R y de la respuesta del detector se utiliza para obtener la MMD de la muestra.

El principal objetivo del método descrito en el presente informe es la obtención de la distribución de masa molar de una muestra de PEG desconocida, para controlar la calidad del producto final, producido en las instalaciones de IQOXE.

Se analizan dos muestras reales de PEG-200 y PEG-400 con una MMD desconocida, suministradas por IQOXE. Es utilizada la *Calibración 4* para la predicción.

7.9.1 PEG-200

Tabla 7.9.1.1 Predicción de los valores del peso molar del PEG-200

T_R	M_P	M_n	M_w	M_v	M_z	M_{z+1}	PD
16.177	207	198	207	214	216	224	1.045

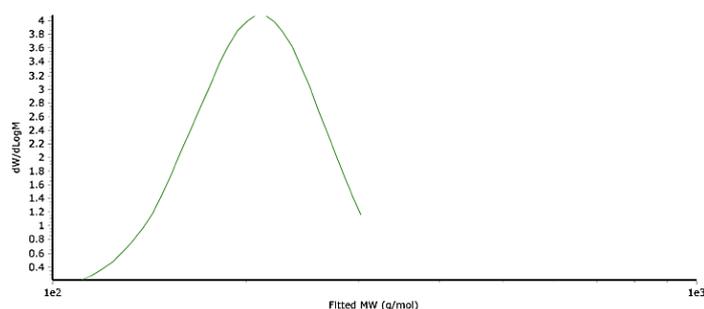


Figura 7.9.1.1 Perfil de la curva de elución PEG-200

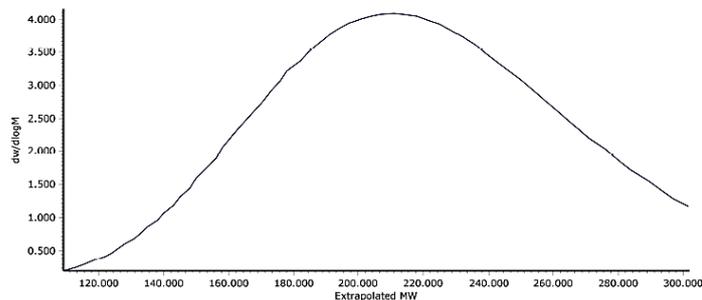


Figura 7.9.1.2 MMD PEG-200

Se predice un peso molar de 207 g/mol y un valor de polidispersidad baja, indicando una distribución bastante homogénea entre las cadenas que forman el polímero. Esto también se refleja en el perfil de la curva de elución, ya que describe una distribución estrecha, por lo tanto, indica la presencia de pocas cadenas cortas y pocas cadenas largas, respecto al peso molar predicho. Esta observación se confirma con la MMD, presentando un máximo entre los pesos molares 200-220 g/mol y un intervalo de masas molares entre 110 y 300 g/mol.

7.9.2 PEG-400

Tabla 7.9.2.1 Predicción de los valores del peso molar del PEG-400

T_R	M_P	M_n	M_w	M_v	M_z	M_{z+1}	PD
15.939	385	360	403	444	452	513	1.119

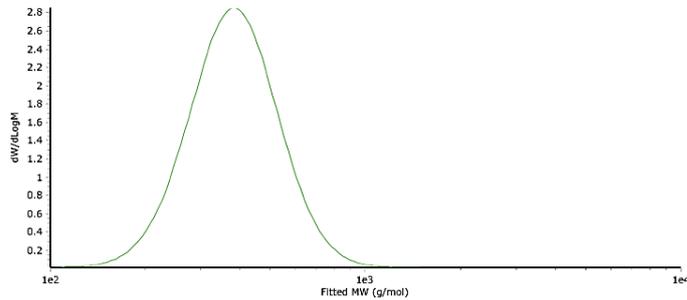


Figura 7.9.2.1 Perfil de la curva de elución PEG-400

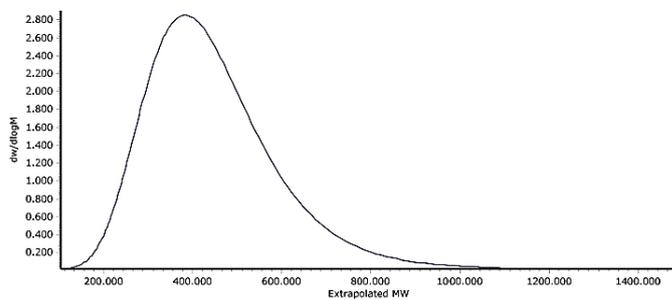


Figura 7.9.2.2 MMD PEG-400

Se predice un peso molar de 385 g/mol y un valor de una polidispersidad más alto que en el PEG-200. La distribución entre las cadenas que forman el polímero es menos homogénea. Esto también se refleja en el perfil de la curva de elución, ya que describe una distribución más ancha, presentando cadenas más cortas y cadenas más largas. Esta observación se confirma con la DMM, con un máximo en el peso molar a 400 g/mol, pero un intervalo de masas molares entre 150-1000 g/mol.

8. CONCLUSIONES

El método SEC desarrollado permite la predicción de la distribución de la masa molar en PEGs con un peso entre 190-9000 g/mol, proporcionando resultados precisos y exactos en términos de repetibilidad. La precisión intermedia (reproductibilidad) no se ha determinado por falta de tiempo.

Observando los valores obtenidos de desviación estándar, se determina que el método presenta menos calidad en la predicción de resultados con pesos molares cercanos al límite de exclusión y de permeabilidad de la columna.

IQOXE fabrica PEG-200, 300, 400 y 600, por lo que la predicción del peso molar de estos polímeros es posible con las condiciones de análisis optimizadas y la Calibración 4. Por lo tanto, se concluye que el objetivo se ha logrado.

Respecto a la experiencia adquirida en cromatografía SEC, se recomienda un buen mantenimiento de la columna y una calibración periódica. Pequeñas variaciones que provoquen que el análisis no se lleve a cabo en las mismas condiciones en las que se a realizado la calibración, reproduce resultados inexactos.

CONCLUSIONS

The development of the SEC method allows the prediction of the molar mass distribution in PEGs with weights between 190-9000 g/mol, providing precise and exact results in terms of repeatability. Intermediate precision (reproducibility) has not been determined due to lack of time.

The values obtained have been observed and it is determined that the method presents less quality in the prediction of results with molar masses close to the limit of exclusion and permeability of the column.

IQOXE manufactures PEG-200, 300, 400 and 600; whereby the prediction of the molar mass of these polymers is possible with optimized analysis conditions and *Calibration 4*. Therefore, it is concluded that the objective has been achieved.

Regarding the experience gained in SEC chromatography, good column maintenance and periodic calibration are recommended. When the analysis is carried out with small variations in comparison with the calibration performed, it can cause inaccurate results.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] IQOXE - Industrias Químicas del Óxido de Etileno
<http://www.iqoxe.com/es/> (accessed may 27, 2017).
- [2] Polietilenglicol (PEG) | Tecnología de los Plásticos
<http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com.es/2013/06/peg.html> (accessed may 27, 2017).
- [3] IUPAC, Nomenclature for chromatography, *Pure Appl. Chem.* 65, 819 (1993).
- [4] Mori, S.; Barth, H. G. *Size exclusion chromatography*; Springer, 1999.
- [5] De Selección, G. Guía rápida para la selección de columnas y patrones para cromatografía de permeación en gel (GPC) y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)
<http://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/Public/5990-6868ES.pdf> (accessed may 27, 2017).
- [6] Striegel, A. M. *Modern size-exclusion liquid chromatography*; Wiley, 2009.
- [7] Polymer Molecular Weight Distribution and Definitions of MW Averages
<http://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-7890EN.pdf> (accessed may 27, 2017).
- [8] Polymer analysis by GPC-SEC
http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097250048.pdf (accessed may 27, 2017).
- [9] Consideraciones teóricas y parámetros cromatográficos | Textos Científicos
<https://www.textoscientificos.com/quimica/cromatografia/parametros> (accessed may 27, 2017).
- [10] Columnas para separaciones de moléculas pequeñas, Agilent
<http://sglab.net/wp-content/uploads/2013/11/5991-1059ES-LC-and-LC-MS-2-de-2.pdf> (accessed may 27, 2017).
- [11] Agilent GPC Data Analysis Software for Agilent ChemStation Installing and Understanding GPC Data Analysis Software for ChemStation Notices Manual Part Number Software Revision Technology Licenses Restricted Rights Legend
https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2182-90002_GPC.pdf (accessed may 27, 2017).