Álvaro Pérez Domínguez

EXTRACCIÓN DE POLIETILENGLICOL EN METOXIPOLIETILENGLICOL Y CARACTERIZACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE PERMEACIÓN DE GEL

Trabajo de Fin de Grado. Grado de Química

Dirigido por el Dr. Aurelien Viterisi y la Dra. Carme Aguilar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Junio 2019

Tarragona

Agradecimientos

En primer lugar, dar mis más sinceros agradecimientos a todos los trabajadores del laboratorio de producción e investigación de IQOXE, ya que sin sus consejos, sin su ayuda y sin su apoyo, me habría sido imposible llevar a cabo esta investigación.

De todos ellos, destacar al Dr. Aurelien Viterisi, mi supervisor, ya que en todo momento ha estado dispuesto a resolver mis dudas y problemas durante el transcurso del trabajo, así como en la búsqueda de soluciones para todos ellos.

Reconocer también a Carme, mi tutora, por el tiempo invertido en mí y por todos los ánimos que me ha dedicado siempre.

Agradecer también a mi compañero de clase y de laboratorio de IQOXE, Adrián Valledor, ya que en todo momento ha sido un gran apoyo en los momentos más duros de la investigación.

Por último, dar las gracias a mis familiares y amigos más cercanos que siempre me han empujado a seguir adelante en los malos momentos.

Muchas gracias a todos.

Índice

1. Resumen 4

2. Introducción 5
2.1 IQOXE 5
2.2 Metoxipolietilenglicol 1000 6
2.2.2 Producción 6
2.3 Cromatografía por Permeación de Gel 8

3. Objetivo 11

4. Parte experimental 11
4.1 Aparatos e instrumentos 11
4.2 Reactivos y materiales 12
4.3 Métodos de análisis cromatográficos 14
4.3.1 HPLC 14
4.3.2 GPC 16
4.4 Procedimientos de extracción 17
4.4.1 Procedimiento A 17
4.4.2 Procedimiento B 18
4.4.3. Procedimiento C 19

5. Resultados y discusión 20
5.1 Procedimiento A 20
5.2 Procedimiento B 27
5.3 Procedimiento C 29

6. Conclusiones 39

7. Bibliografía 40

1. Resumen

En el proceso de formación de metoxipolietilenglicol, puede formarse polietilenglicol como subproducto, disminuyendo así su calidad. En este trabajo, se comparan tres procedimientos distintos para la extracción de polietilenglicol de metoxipolietilenglicol para su análisis mediante cromatografía de líquidos y, posteriormente cromatografía de permeación de gel, ya que de este modo, se podrá conocer el peso molecular del polietilenglicol, objetivo principal de este proyecto.

Para llevar a cabo este proceso de extracción, se evaluaron distintos parámetros con el fin de conseguir una máxima separación entre ambas sustancias, como la solubilidad en diversos disolventes, o su retención en columnas cromatográficas según la fase móvil utilizada. La técnica HPLC se utilizó para evaluar si la separación de los productos se había desarrollado correctamente. Posteriormente se realizó el análisis mediante GPC, con el objetivo de determinar el peso molecular del producto extraído.

El último de los tres procedimientos de extracción utilizados produjo mejores resultados. Desarrollando este método, se logró determinar el peso molecular del polietilenglicol, y validar la hipótesis formulada inicialmente de que éste, es menor al que *a priori* se podía imaginar.

Abstract

In the production of methoxy polyethylene glycol, polyethylene glycol can be formed as a by-product, decreasing its quality. In this work, three different procedures are compared for the extraction of polyethylene glycol from methoxy polyethylene glycol for its liquid chromatography and gel permeation chromatography analysis, since in this way, the molecular weight of polyethylene glycol can be known, which is the main objective of this project.

To carry out this extraction process, different parameters were evaluated in order to achieve a maximum separation between both products, such as the solubility in various solvents, or their retention in chromatographic columns depending on the mobile phase used. The HPLC technique was used to evaluate if the separation of the products had developed correctly. Subsequently, the GPC analysis was carried out, in order to determine the molecular weight of the extracted product.

The last extraction procedure used produced better results. By developing this method, it was possible to determine the molecular weight of polyethylene glycol, and validate the initial hypothesis that the molecular weight of polyethylene glycol is lower than what firstly could be expected.

2. Introducción

La parte experimental del trabajo se ha llevado a cabo en el laboratorio de producción e investigación de IQOXE. En primer lugar se describirá de forma general, la historia y el proceso de producción de IQOXE, para de este modo contextualizar l parte experimental desarrollada

2.1 IQOXE

Industrias Químicas del Óxido de Etileno (IQOXE) es una compañía petroquímica dedicada a la producción de óxido de etileno, glicoles y derivados del óxido de etileno situada en el polígono petroquímico de Tarragona. Proviene de la antigua compañía *Industrias Químicas Asociadas* (IQA), la cual empezó con una unidad del *cracking* de la nafta. De forma progresiva se fueron abriendo nuevas plantas de producción, hasta que en el año 1985, la empresa *Shell*, compró el 100% de las acciones, que posteriormente vendieron a *La Seda de Barcelona* (LSB). En 2014, el grupo CL Grupo Industrial adquirió los activos productivos de LSB surgiendo de este modo, IQOXE.

Actualmente IQOXE es el único productor de óxido de etileno en España con una capacidad de producción de 140.000 toneladas al año. Más del 50% de esta producción se ve destinada a la producción de glicol, una de las principales materias primas para la producción de polímeros de tereftalato de polietileno. En la siguiente figura, se puede observar esquemáticamente todo el proceso de producción de IQOXE:

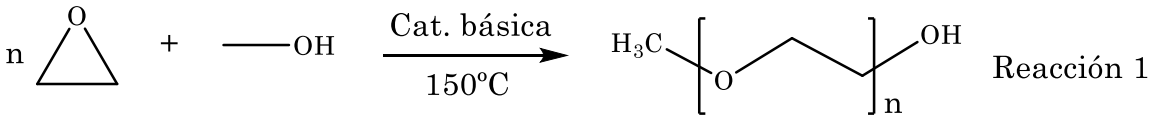
Figura 1: Esquema de fabricación de la empresa IQOXE

Como se observa en la figura 1, IQOXE dispone de tres plantas distintas de producción. La primera de ellas se basa en la producción de óxido de etileno a partir de etileno y oxígeno mediante un catalizador de Ag. Este óxido de etileno se utiliza posteriormente en distintas proporciones para producir monoetilenglicol, dietilenglicol y trietilenglicol en la planta de glicoles. Además, también dispone de la planta de derivados, donde a partir de óxido de propileno, óxido de etileno y alcoholes, tienen lugar distintos etoxilados[1].

Entre los distintos etoxilados que se producen, uno de ellos es el metoxipolietilenglicol (mPEG), concretamente el mPEG 1000. Este número, describe el peso molecular del etoxilado a modo de diferenciarlo del mismo producto de etoxilación, pero de menor o mayor peso molecular.

2.2 Metoxipolietilenglicol 1000

Éste compuesto, es producto de la etoxilación del metanol con óxido de etileno, mediante catálisis básica para obtener un polímero de un peso molecular alrededor de 1000 g/mol. En la siguiente reacción, se puede observar el proceso para obtener mPEG:



Reacción 1

Los mPEG están disponibles en una gran variedad de pesos moleculares, desde 200 hasta 5000. Aquellos cuyo peso molecular se encuentra entre 200 y 500 son claramente viscosos a temperatura ambiente. Sin embargo, a mayor peso molecular se presentan como un sólido blanco[2]. Este compuesto posee una elevada reactividad por el simple hecho de contener un grupo hidroxilo. Este grupo funcional le permite tener una elevada reactividad con otros grupos como ácidos carboxílicos, isocianatos y epóxidos, entre otros.

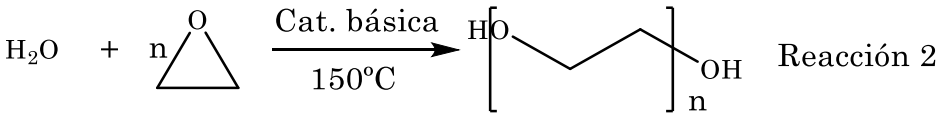
Su uso principal en la industria es como lubricante, regulador espumante, agente antiespumante, emulsionante, espesante, entre otras aplicaciones. También se utiliza el mPEG ultra puro para el acoplamiento con moléculas biológicas, como por ejemplo proteínas, anticuerpos u otras pequeñas moléculas con fines médicos[3].

2.2.2 Producción

Para conocer el producto sobre el cual se trabaja, es importante conocer su producción, y todos los pasos que están involucrados en el proceso ya que pueden ser de gran importancia en la calidad final del producto resultante, en la producción de mPEG las etapas involucradas son:

- Lavado del reactor.
- Preparación de materias primas.
- Adición de óxido de etileno.
- Digestión.
- Desgasificación
- Neutralización.

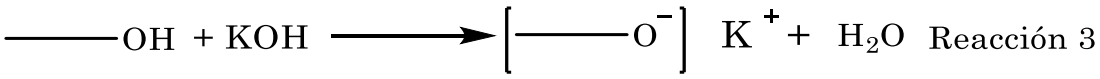
El primer paso de lavado, se lleva a cabo para eliminar el agua que pueda quedar retenida. Este paso es de gran importancia ya que el agua, compite con el metanol en la reacción de etoxilación para producir un subproducto indeseado en la reacción, el polietilenglicol (PEG) como se ve en la siguiente reacción:



Reacción 2

La formación de este subproducto, el cual se analiza en este trabajo, provoca una disminución de la calidad del mPEG 1000, ya que induce a una menor capacidad de lubricación, así como de antiespumante. Por ello, es importante eliminar la mayor cantidad de agua posible del reactor antes de iniciar el proceso de producción.

El catalizador que se utiliza para la reacción de polimerización es el metilato sódico. Generalmente se usa KOH para catalizar este tipo de reacciones de polimerización, pero en este caso su uso provocaría la formación de agua como se puede observar en la siguiente reacción:



Reacción 3

Tal y como ya se ha comentado, si se produce agua, ésta puede derivar a la formación de PEG, que como se ha comentado anteriormente, es completamente negativo. Sin embargo, el uso de metilato sódico como catalizador produce metanol, producto sobre el cual se lleva a cabo la etoxilación, y de este modo se evita así la formación así ningún subproducto no deseado.

El paso de adición de óxido de etileno es muy importante, ya que hay que controlar distintos parámetros como la temperatura, la presión, o el caudal de introducción del óxido. Este paso se lleva a cabo siempre en atmósfera de nitrógeno, cuando el metanol y el metilato sódico ya están en el interior del reactor. Mediante recirculación y agitación mecánica, el reactor favorecerá la formación del mPEG ya que la fase líquida (formada por metanol y metilato sódico) y la fase gas (OE) entrarán más fácilmente en contacto. En la siguiente figura, se puede observar esquemáticamente la composición de un reactor, así como de las entradas tanto de nitrógeno, como de OE:

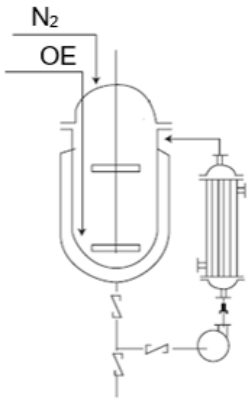


Figura 2: Esquema de un reactor en atmosfera inerte con recirculación y agitación.

Es de gran importancia controlar la presión y la temperatura en este proceso de adición de OE. Por lo que concierne a la temperatura, se va aumentando progresivamente a medida que avanza la reacción hasta llegar a 150ºC para aumentar su cinética. Sin embargo, subidas bruscas de temperatura pueden provocar una coloración amarillenta en el producto final. Este hecho, se detecta en el departamento de control de calidad y provocaría una deficiencia que inhabilitaría su venta. Por ello es importante el aumento paulatino y controlado de este parámetro Además, la reacción que se lleva a cabo es exotérmica (26.7 Kcal/mol) factor determinante para que se controle estrictamente la temperatura. Por ello, aunque no se esté aumentando ni disminuyendo, la temperatura nunca se estabiliza, sino que está en un rango del 10% como máximo por encima y por debajo para su mayor control.

Estos aumentos de temperatura se ven reflejados en la presión total del reactor, ya que a mayor temperatura, no solo aumenta más la velocidad de reacción, sino que aumenta la fase gas del sistema, lo que provoca un aumento en la presión. En caso de superar los 4 bar de presión, podría producirse un proceso de retroceso completamente indeseado, por lo que el caudal deberá disminuirse si la presión aumenta bruscamente, hasta que ésta disminuya debido al consumo de la fase gas en producto, momento en el cual podrá aumentarse de nuevo el caudal de OE.

Una vez introducido por completo el OE, tienen lugar los pasos de digestión, desgasificación y neutralización, en los cuales se deja consumir todo el OE durante 1.5 – 2h aproximadamente, se elimina toda la fase gas que ha quedado sin reaccionar y se neutraliza el catalizador con ácido, respectivamente.[4]

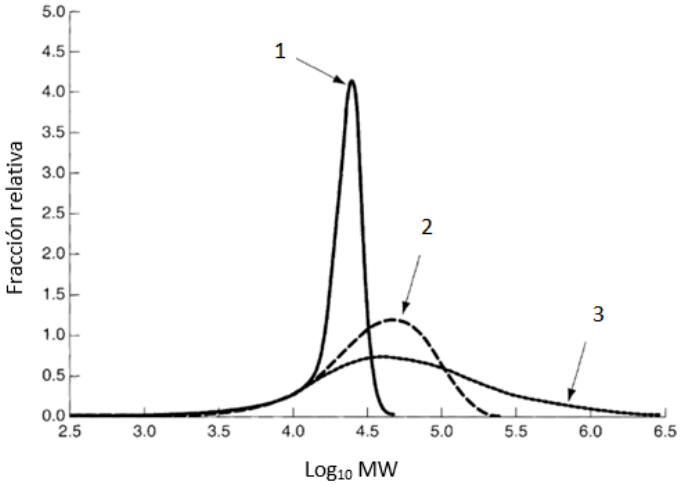
Aun efectuando minuciosamente cada uno de los pasos a seguir en la producción de mPEG 1000, es inevitable que el producto final tengan un cierto porcentaje de PEG debido al agua que posee el metanol o el OE. En este producto, está especificado por el departamento de control de calidad que, como máximo, el contenido de PEG en mPEG sea de un 0.5%.

Por ello, es de gran importancia llevar a cabo un control del % de PEG que se forma durante la producción y conocer su peso molecular, ya que como se ha descrito anteriormente, distintas propiedades se ven afectadas según su peso como la viscosidad, la solidez, el color, entre otras. Para llevar a cabo la caracterización del peso molecular del PEG, se utiliza la técnica de cromatografía de permeación de gel, la cual se describe detalladamente a continuación.

2.3 Cromatografía por Permeación de Gel

El peso molecular (MW) así como el tamaño juegan un papel determinante en diversas propiedades de los materiales poliméricos, como la solubilidad, las interacciones con otras moléculas o la viscosidad, entre otras.

A diferencia de las moléculas pequeñas, las cuales tienen un MW bien definido, la mayoría de polímeros sintéticos se componen de cientos, incluso miles, de cadenas de distintos MW y esto, produce una distribución de pesos moleculares. Cada polímero, tendrá una distribución de pesos moleculares (MWD) y la forma y amplitud de esta distribución, dependerá del mecanismo de polimerización de las condiciones cinéticas. En la siguiente figura, se muestra un ejemplo de las distintas MWD según el mecanismo de polimerización seguido.



1: Polimerización aniónica: distribución de pesos moleculares estrecha.

2: Polimerización por condensación: MWD más ancha.

3: Polimerización por radical libre: Distribución de pesos moleculares muy ancha.

Figura 3: Comparación de la MWD según el proceso de polimerización.

Para poder definir la MWD de un polímero, se calculan distintos promedios estadísticos. Los tres más comunes son: el promedio en número, M_n, el promedio de peso, M_w y el porcentaje z de pesos moleculares, M_z. La magnitud de M_n es sensible a la presencia de pesos moleculares bajos, mientras que M_w es sensible a la presencia de componentes de elevados pesos moleculares. M_z refleja cambios en los pesos moleculares más elevados de la distribución. La amplitud de esta distribución, llamada polidispersidad (PD) se determina mediante el ratio de M_w/M_n o en algunos casos, M_z/M_w.

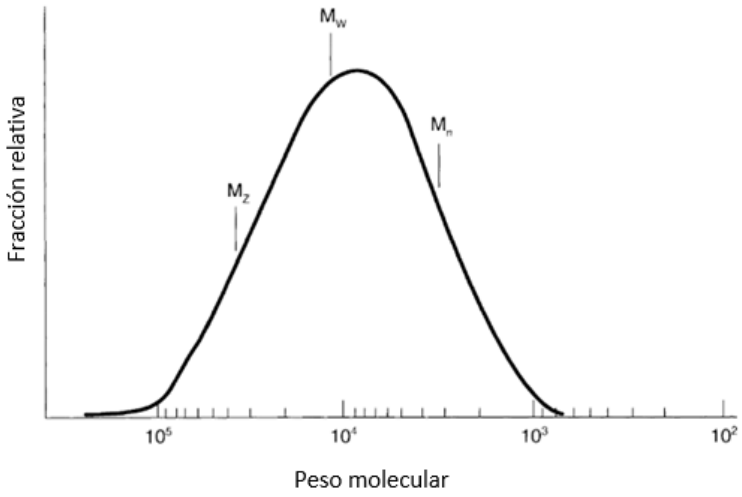


Figura 4: Representación de la sensibilidad de cada porcentaje sobre una distribución de pesos.

La técnica habitualmente más empleada para la determinación del peso molecular, es un tipo de técnica de cromatografía de líquidos, concretamente la cromatografía de exclusión por tamaño o también denominada cromatografía de filtración sobre geles o de permeabilidad de gel[5].

En la técnica de GPC la fase estacionaria está constituida por un material poroso (perlas) que retienen las moléculas en función de su tamaño. Estas perlas que constituyen la fase estacionaria contienen un tamaño de poro distinto entre ellas,

provocando que las distintas moléculas que se introducen, queden retenidas o no según su tamaño[6]. En caso de que éstas sean muy grandes provocará una muy leve interacción con los poros, ya que su tamaño imposibilitará circular a través de ellos, mientras que a medida que su tamaño disminuye, aumentará su paso a través de los poros, provocando una mayor retención en la columna. En la siguiente figura, se pueden ver los pasos que siguen dentro de una columna cromatográfica de GPC varias moléculas según su tamaño, y cómo las más grandes eluyen más rápidamente que las menores:

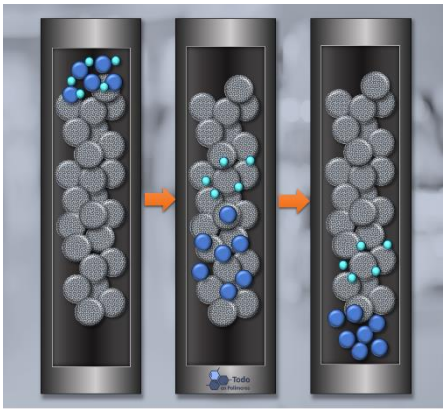


Figura 5: Mecanismo de retención de diversas moléculas según su tamaño en GPC.[7]

Es importante destacar que cuando se utiliza la técnica de GPC, uno de los detectores más habitualmente empleados es el detector de índice de refracción, ya que la mayor parte de polímeros presentan una variación de este parámetros en función de su peso molecular.

El detector de índice de refracción es un detector universal para HPLC. Se basa en la variación del índice de refracción del producto al salir de la columna respecto al blanco de la fase móvil. A mayor diferencia de índice de refracción entre la muestra y la fase móvil, mayor será la señal, así como la sensibilidad.

El detector, está compuesto por dos celdas: la celda de muestra y la celda de referencia.

Como se puede observar en la figura 6, en el ejemplo (A), la fase móvil pura está fluyendo tanto por la celda de referencia (celda inferior) como por la celda de muestra (celda superior). Por otro lado, en el ejemplo (B), se puede observar cómo, el hecho de que en la celda de muestra esté fluyendo la fase móvil con el producto a analizar, provoca una desviación en el haz de luz que se le aplica a ambas celdas, produciendo así una refracción. Esta información se verá reflejada en el cromatograma en forma de picos, dónde los primeros corresponderán a las moléculas de mayor tamaño, mientras que los últimos en aparecer, corresponderán a los polímeros de menor tamaño.

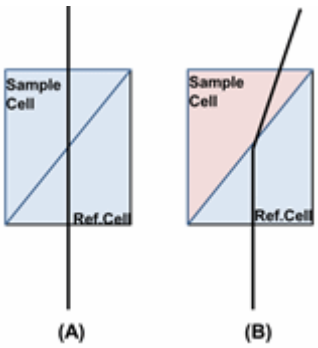


Figura 6: Ejemplo de funcionamiento de un detector RID

3. Objetivo

Generalmente, el contenido de PEG en distintos productos etoxilados, es mayor que en el caso del mPEG 1000 (recordar que su porcentaje en peso en la muestra es del 0.5%).

En la mayoría de los etoxilados, la formación del PEG tiene lugar debido al agua que contiene el alcohol que se utiliza para llevar a cabo la polimerización, sin embargo, teniendo en cuenta el bajo porcentaje de PEG, surge la posibilidad que en el caso del mPEG 1000, el agua que contiene el OE tenga un peso relevante en la formación de este subproducto.

Este hecho provocaría que a medida que va entrando OE en el reactor, se formen cadenas de PEG de un peso molecular menor al esperado (normalmente, el peso molecular del PEG es el doble que el del mPEG, ya que el PEG, posee dos grupos hidroxilo sobre los cuales puede efectuarse la etoxilación, mientras que el mPEG, solo uno).

Por ello, el objetivo de este proyecto es, llevar a cabo la extracción del PEG del mPEG, constatar mediante HPLC si la extracción ha sido fructífera, y efectuar la caracterización del PEG mediante cromatografía GPC.

4. Parte experimental

En este apartado se describirán detalladamente los distintos procesos de extracción de PEG en mPEG que se han llevado a cabo en esta investigación.

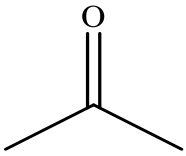
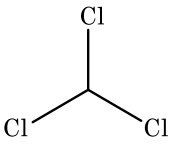
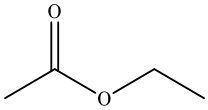
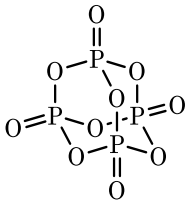
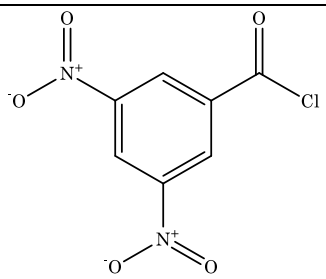
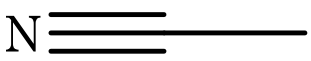
4.1 Aparatos e instrumentos

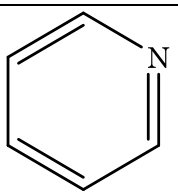
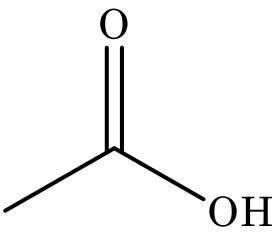
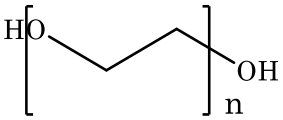
- Evaporador rotatorio de vacío (rotavapor) con matraces de fondo redondo adecuados para la evaporación y recolección de disolventes.
- Equipo de vacío. Éste, consistirá en dos matraces conectados a vacío, uno de estos actuando como trampa conteniendo P_2O_5 para favorecer el desecamiento de la muestra.
- Baño de agua para calentar el matraz de fondo redondo del rotavapor, manteniéndolo a una temperatura de entre 50-70ºC.
- Cromatógrafo líquido, provisto con un detector UV, IR y sistema de válvula de inyección.
- Equipo de integración digital.
- Horno a 70ºC.
- Balanza granataria
- Balanza analítica

4.2 Reactivos y materiales

En la siguiente tabla, quedan detallados todos los reactivos utilizados en los distintos procesos de caracterización, así como la peligrosidad que conlleva un uso inadecuado de los mismos.

Tabla 1: Tabla de reactivos[8]

Reactivo	Fórmula	Símbolo de peligro	Peligrosidad
Acetona			Altamente explosivo e inflamable
Cloroformo			Provoca somnolencia, náuseas, pérdida de conocimiento e irritación
Acetato de etilo			Altamente inflamable. Provoca somnolencia, pérdida de conocimiento e irritación
Pentóxido de difósforo			Provoca fuertes dolores, irritación cutánea y quemaduras
Cloruro de 3.5 dinitro-benzoilo (DNBC)			Combustible y explosivo a elevadas temperaturas. Puede provocar quemaduras e irritaciones.
Acetonitrilo			Altamente inflamable y explosivo. Puede provocar náuseas, dificultad respiratoria y dolor.

Piridina			Altamente inflamable y explosivo. Peligro por inhalación y por absorción en la piel provocando quemaduras e incluso pérdida del conocimiento.
Ácido acético			Inflamable y explosivo. Puede provocar dificultad respiratoria, dolores, quemaduras e incluso shock o colapso tras su ingesta.
Metanol			Puede provocar tos, vértigo, somnolencia, ceguera, dolor abdominal o pérdida de conocimiento
NaCl			
Polietilenglicol			Su ingesta puede provocar diarrea y náuseas.

Los materiales utilizados se detallan a continuación:

- Lana de algodón, calidad farmacéutica
- Embudos de decantación de 500 mL
- Probetas de 50 mL
- Jeringuillas
- Viales de vidrio de 10 mL de capacidad provistos de cabezales de aluminio para encapsular
- Encapsulador/desencapsulador
- Pipetas Pasteur
- Columna cromatográfica preparativa (5 g de sílice C18 con 45 mL de capacidad en columna de polipropileno. Tamaño de poro de 60Å y tamaño de partícula de 45µm. Adquiridas en CHROMABOND con número de referencia 730400.)
- Cartucho específico de intercambio aniónico

4.3 Métodos de análisis cromatográficos

En el siguiente apartado se describirán detalladamente los distintos métodos de análisis cromatográficos que se usan en este proyecto:

I. Método de análisis basado en HPLC para conocer la cantidad de PEG y mPEG que contiene la muestra el proceso extracción.
II. Método de análisis basado en GPC para la caracterización del peso molecular de la muestra

4.3.1 HPLC

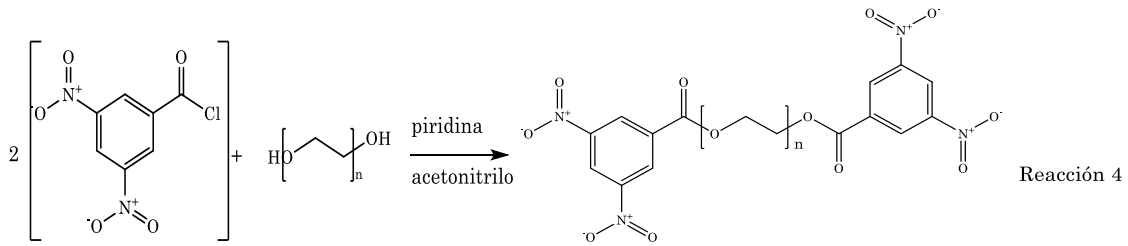
El equipo HPLC consiste en un cromatógrafo Agilent 1200 que dispone de un detector UV, así como de una bomba cuaternaria, y un horno integrado. Las separaciones se llevan a cabo en una columna Nova-Pack C18 de acero inoxidable, de 15 cm de longitud y 4 mm de amplitud con una eficacia de 16000 platos/m. Las condiciones cromatográficas empleadas para llevar a cabo el proceso son las que se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Esquema del método cromatográfico para el análisis del PEG en HPLC.

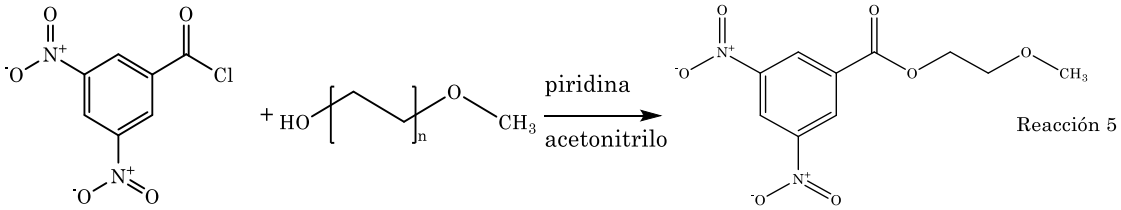
Fase móvil	Metanol (B) i Agua (A)			
Gradiente	50% de A y B durante 10 min	100% A durante 5 min	50% de A i B durante 5 min	1.0 mL/min vía bomba sin pulsos
Detector	UV a 208 nm			
Temperatura	40ºC +/- 3ºC			
Inyección	20 µL loop			

4.3.1.1 Calibración

Preparar una solución de calibración madre pesando con exactitud 100 mg de polietilenglicol 1000 en un vial al que se añaden 240 mg de DNBC (se añade en exceso para asegurarse de que reacciona todo el PEG). Sin demora, se añaden 5 mL de solución catalizador con una pipeta aforada, se sella inmediatamente el vial y se deja 30 minutos en la estufa a 70ºC, agitando una vez transcurridos 10 minutos. Al cabo de 30 minutos, se le añaden 0.5 mL de disolución de neutralización con una micro jeringa, y se vuelve a poner en la estufa a 70ºC durante 5 minutos. En las siguientes reacciones se muestra la reacción de derivatización que tiene lugar tanto para el PEG (reacción 4) como para el mPEG (reacción 5):



Reacción 4



Reacción 5

Seguidamente, se preparan tres soluciones de calibración de concentraciones 0.1, 0.2, 0.4% en peso diluyendo porciones separadas de 1 mL la solución de calibración stock en 200, 100 y 50 mL respectivamente de mezcla de calibración.

Finalmente, se calculan las concentraciones exactas y se procede al análisis cromatográfico siguiendo el método descrito en la tabla 2.
Finalmente, se construyen por separado gráficos de calibración para el PEG 1000 representando la media del pico, dividido por el peso de muestra de solución estándar derivatizada frente la concentración correspondiente del PEG 1000 en porcentaje. Efectuar una regresión lineal para obtener la recta de calibración.

4.3.1.2 Preparación de la muestra

Introducir en el vial pesando (con exactitud de 0.1 mg) 100 mg de muestra problema al que se añaden 100 mg de DNBC, garantizando siempre un leve exceso. Sin demorarse, se añade 1 mL de solución catalizador con una pipeta aforada, se sella inmediatamente el vial, y se deja 30 minutos en la estufa a 70ºC, agitándolo una vez transcurridos 10 minutos. Se puede formar un precipitado blanco el cual es característico del DNBC en exceso. Este mismo exceso se hidroliza en el paso de la neutralización, dejando una solución amarilla limpia, sin residuo sólido. Una vez finalizados los 30 minutos, se añade 0.1 mL de la solución de neutralización con una micro jeringa, y se vuelve a poner en la estufa a 70ºC durante 5 minutos más.

Si es inevitable, está permitido almacenar la solución problema derivatizada hasta 24h a 5ºC antes de ser analizada.

Sin más tratamientos, se inyecta la solución problema derivatizada en el HPLC.

4.3.2 GPC

Para llevar a cabo las medidas de GPC se utiliza mismo cromatógrafo HPLC que el descrito anteriormente, con las únicas variaciones de que la columna utilizada es una Agilent PL aquagel-OH, de 300 cm de longitud por 7.5 mm de amplitud con un tamaño de poro de 5 µm y el detector utilizado es de índice de refracción.

Para llevar a cabo el análisis de nuestro producto, es necesario diluirlo en agua Milli Q al 0,05% en peso aproximadamente (2,5 mg de producto hasta 5 g totales), debido a que en estas concentraciones obtenemos una señal buena evitando así la saturación, e introducirlo en un vial. Seguidamente, añadiremos 10 µL de acetona. Este paso se utiliza como comprobación de que el análisis se ha efectuado correctamente, ya que la acetona eluye más tarde que el PEG y en caso de detectar algún problema en ese pico, se repetiría de nuevo el análisis. En la siguiente tabla, se detallan todos los parámetros cromatográficos:

Tabla 3: Parámetros cromatográficos para el análisis con GPC

Fase móvil	Agua Milli Q	0.6 mL/ min
Detector	Índice de refracción	
Temperatura	40ºC +/- 3ºC	
Inyección	20 µL vía Loop	
Tiempo de análisis	35 minutos	

Primeramente se dejará pasar la fase móvil por ambas celdas (celda de muestra y celda de referencia) hasta que la línea base se haya estabilizado. De este modo, se eliminan posibles trazas de productos de anteriores análisis. La estabilización de la línea base puede tardar entre 1 y 2h. Seguidamente, se deja que la fase móvil que proviene de la columna pase por la celda de muestra, y se volverá a dejar que se estabilice la fase móvil. Una vez estabilizada, se carga el loop 5 veces con 20 mL de producto, para evitar contaminación provocada por el análisis anterior, y se procede al análisis.

4.4 Procedimientos de extracción

En este apartado, se describirán detalladamente los tres procedimientos distintos de extracción que se han utilizado para desarrollar este proyecto.

4.4.1 Procedimiento A[9]

El procedimiento de extracción que se llevará a cabo a continuación, se basa en la extracción del PEG de cualquier otro etoxilado debido a la diferencia de polaridad. Como ya se ha descrito anteriormente, el PEG posee un grupo funcional hidroxilo más que en este caso, el mPEG. Esto le aporta más polaridad y por tanto la posibilidad de separación utilizando los disolventes adecuados. Siguiendo esta directriz, se lleva a cabo la extracción según los pasos que se describen a continuación

Se pesan 10 g de muestra aproximadamente en un embudo de decantación. Se le añaden 50 mL de acetato de etilo y 50 mL de la solución de NaCl 5M. Se tapa el embudo y se agita durante dos minutos. Se deja en reposo para que se separen las fases completamente y se separa la fase acuosa a un segundo embudo de 500 mL. Se lleva a cabo otra extracción a la fase de acetato de etilo que ha quedado en el primer embudo con 50 mL más de la solución de NaCl, y se añade la segunda fase acuosa junto a la primera, en el segundo embudo.

Seguidamente, se añaden 50 mL de acetato de etilo a las dos fases acuosas combinadas, se agita durante 2 minutos y después de dejar separar correctamente ambas fases, se deposita la fase acuosa del fondo a un tercer embudo separador. Las capas de acetato de etilo se desechan.

Posteriormente, se añaden 50 mL de cloroformo para extraer el PEG que ha quedado retenido en la fase acuosa. Se agita durante dos minutos y se deja reposar hasta separación de las fases.

Se saca el cloroformo a través de un embudo filtrante, con un poco de algodón apretado para así, eliminar residuos sólidos. Seguidamente, se repite la extracción de nuevo, juntando las dos fases de cloroformo.

El siguiente paso, es destilar el cloroformo utilizando el rotavapor, conectado a vacío mediante una trompa de vacío (alrededor de 200 mbar) y a una temperatura alrededor de los 50ºC, no más elevada de 70ºC.

Una vez evaporado todo el disolvente, se obtiene el producto final, el cual se deja a vacío con P_2O_5 para secar durante al menos, 30 minutos. Posteriormente, se procede a la caracterización del PEG mediante HPLC para comprobar que producto hemos obtenido.

4.4.2 Procedimiento B[10]

Este procedimiento sigue las directrices de la norma europea UNE-EN 12139 para la determinación del contenido total de PEG en agentes de superficie aromáticos y alifáticos no iónicos.

A diferencia del anterior procedimiento, este se basa en la variación de la retención del PEG y del mPEG en introducir ambos productos sobre una columna cromatográfica preparativa. Ambas moléculas son estructuralmente distintas, ya que como se ha mencionado anteriormente, el PEG contiene un grupo funcional hidroxilo más que l mPEG. Este hecho provocará una distinta retención en la fase estacionaria de la columna cromatográfica preparativa, favoreciendo de este modo la separación entre ambos productos. Seguidamente, se detallan los pasos a seguir para llevar a cabo este proceso.

Se prepara una disolución madre pesando 5 g de la muestra en un matraz aforado de 50 mL y completando el volumen con la fase móvil. La disolución se coloca en un baño de ultrasonidos hasta disolución completa.

Seguidamente, se vierte el contenido del cartucho específico en la columna ya preparada, lavando 3 veces con un volumen de 5 mL para asegurar la compactación de la resina.

El hecho de utilizar la resina de intercambio iónico, es debido a que ésta, elimina los éteres poliglicólicos alquílicos de cadena larga, juntos con ácidos carboxílicos que se emplean para neutralizar el catalizador de la etoxilación, eliminando así posibles interferencias.

Acto seguido y sin que el contenido de la columna se seque, provocando así fisuras que lleven a una inefectiva separación, se añaden 2 mL de la solución madre y se añade el mínimo volumen de fase móvil para evitar sequedad de la columna. En la siguiente figura, se puede observar un ejemplo de la columna cromatográfica empleada en este procedimiento

Figura 7. Ejemplo de columna cromatográfica

Se fija la columna a la unidad de vacío y se recoge el producto de la separación en un vial.

Posteriormente, se llevará a cabo el análisis de PEG en mPEG del apartado 4.3.1, utilizando la cantidad de reactivo correspondiente, según el peso final obtenido de muestra, para determinar si la separación se ha efectuado correctamente.

4.4.3. Procedimiento C

Este procedimiento es una variación del método B en el cual a diferencia de utilizar una columna de sílice C 18 en fase reversa, se juntan 3 columnas para formar una única columna, y así aumentar la capacidad de separación, y posteriormente recolectar el producto en distintas fraccionas, para su posterior análisis y determinación de la fracción o fracciones de mayor pureza en PEG.

Primeramente, se vierte el contenido de sílice de 3 cartuchos CHROMABOND en un matraz de 250 mL y se disuelven en la mínima cantidad de fase móvil que se desee utilizar.

Debido a la no disponibilidad de columnas cromatográficas preparativas de vidrio en el laboratorio, se utilizará una jeringuilla de vidrio, con una capacidad de 70 mL para llevar a cabo la misma función.

Se introduce una pequeña cantidad de algodón calidad farmacéutica en la base de nuestra columna, para favorecer la compactación de la sílice, y de este modo evitar pérdidas tanto de la columna como de nuestro producto.

Seguidamente, se introduce lentamente la solución de sílice C 18 en la jeringuilla, evitando que el vertido contacte directamente con las paredes. Una vez introducida la mayor cantidad posible, se conecta a la trompa de vacío para comenzar la compactación, evitando siempre la sequedad de la columna que provocaría fisuras que disminuirían la separación críticamente.

Una vez bien compactada, se eliminan las posibles burbujas de aire que han podido quedar en el interior, mediante el uso de una pistola de vibración. Finalmente con una pipeta Pasteur se extrae la sílice sobrenadante así como la fase móvil, hasta la línea base de la columna.

En este momento, se añaden 2 mL de la solución madre que se preparó en el apartado 5.3 y finalmente arena fina desalinizada, para evitar la distorsión de la línea base superior de la columna a medida que se añade fase móvil.

En este momento, se procede a acoplar la columna a la trompa de vacío, dónde se recogían distintas fracciones en diversos Erlenmeyers para su posterior análisis.

Para ello, se evaporaba la fase móvil utilizando un rotavapor, para la posterior disolución del soluto obtenido, en la mínima cantidad de cloroformo (debido a su elevada solubilidad en este disolvente.) Tras la posterior evaporación del cloroformo, se puede llevar a cabo el análisis de PEG en mPEG como dicta el apartado 4.3.1

5. Resultados y discusión

En este apartado, se mostrarán todos los resultados que se han obtenido en los distintos procedimientos de extracción.

5.1 Procedimiento A

Primeramente, se desarrolló el procedimiento A y al analizar el producto obtenido se detectó que contenía una elevada concentración de mPEG, por lo que se llegó a la conclusión de que el mPEG y el PEG tienen solubilidades en los disolventes utilizados muy parecidas, provocando una difícil separación mediante estas extracciones. De todos modos, y teniendo en cuenta que no se tiene ningún interés cuantitativo, sino que solo se requiera una pequeña cantidad pura de PEG para poder analizarla mediante cromatografía GPC, se decidió hacer una variación en el sistema de extracciones:

1. Aumentar el número de lavados con acetato de etilo a 4 veces, con la intención de eliminar la mayor cantidad de mPEG posible.
2. Separar por fases cada extracción de la fase acuosa con cloroformo, obteniendo así 4 fracciones:
    a. Primer lavado de la fase acuosa con 50 mL de $CHCl_3$. (APD 1.1)
    b. Segundo lavado de la fase acuosa con 50 mL de $CHCl_3$. (APD 1.2)
    c. Tercer lavado de la fase acuosa con 50 mL de $CHCl_3$. (APD 1.3)
    d. Fase acuosa restante. (APD 1.4)

De este modo, se intenta averiguar si en alguna de estas fracciones obtenidas, se ha conseguido separar el mPEG del PEG, aunque se trate de concentraciones muy bajas.

APD 1.1

Se obtuvo una elevada cantidad de producto, descartando así la posibilidad de separación. El motivo es debido a que se sabe que el porcentaje en peso de PEG en mPEG está alrededor del 0.1 y 0.5% en peso. En caso de obtener un peso que sobrepase con creces el máximo que podría alcanzar el PEG, con alguna traza de mPEG, se descartará la posibilidad de llevar a cabo la caracterización, ya que esto únicamente provocará un gasto en reactivos, y tiempo en utilización de los aparatos implicados, sin ningún motivo.

APD 1.2

Tras evaporar el disolvente, y secar completamente al vacío, conectando nuestro producto a una trampa con P_2O_5, se obtiene una cantidad de producto final de 0.2832 g. Aun siendo una cantidad elevada, se decide proceder a la caracterización mediante el método explicado en el apartado 4.3.1, para así observar si el porcentaje de PEG ha aumentado en relación al inicial, evidenciando así, el comienzo de una posible separación entre ambos productos.

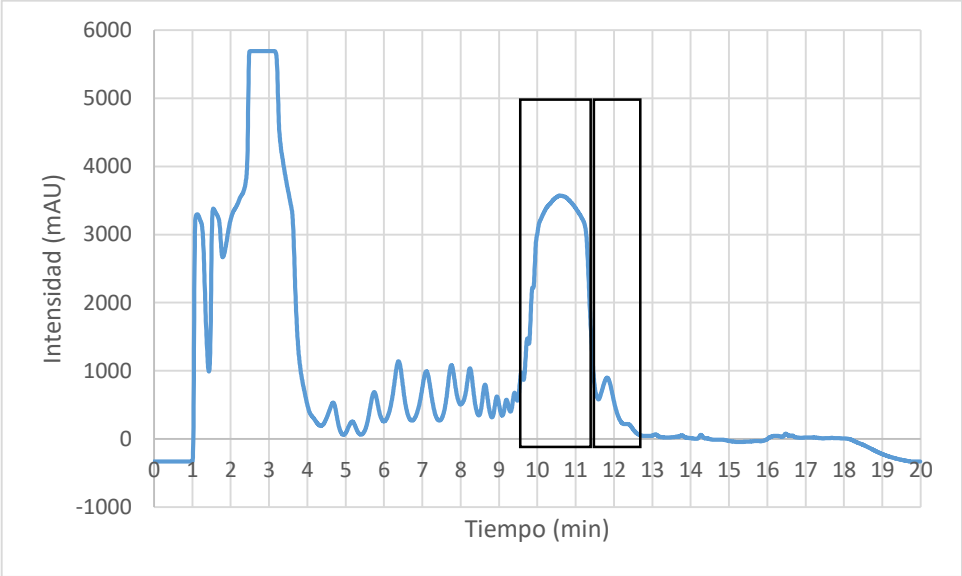


Figura 8: APD 1.2

La figura 8 muestra el resultado obtenido tras proceder a la derivatización del producto obtenido en el experimento APD 1.2.

El producto de hidrólisis del DNBC y el anión *pyridinium*, subproductos de la derivatización, eluyen junto al frente de elución. Mientras que el mPEG 1000 de la muestra problema y el PEG derivatizados eluyen tras el final del gradiente, siendo el último pico señalado, el PEG, y el primero, el mPEG.

La figura 9 es un ejemplo de una muestra analizada sin haberle aplicado ningún tipo de tratamiento de extracción. Como podemos observar, el resultado es prácticamente el mismo en comparación con la figura 8, por lo que podemos afirmar que la separación del experimento APD 1.2 no ha sido fructífera.

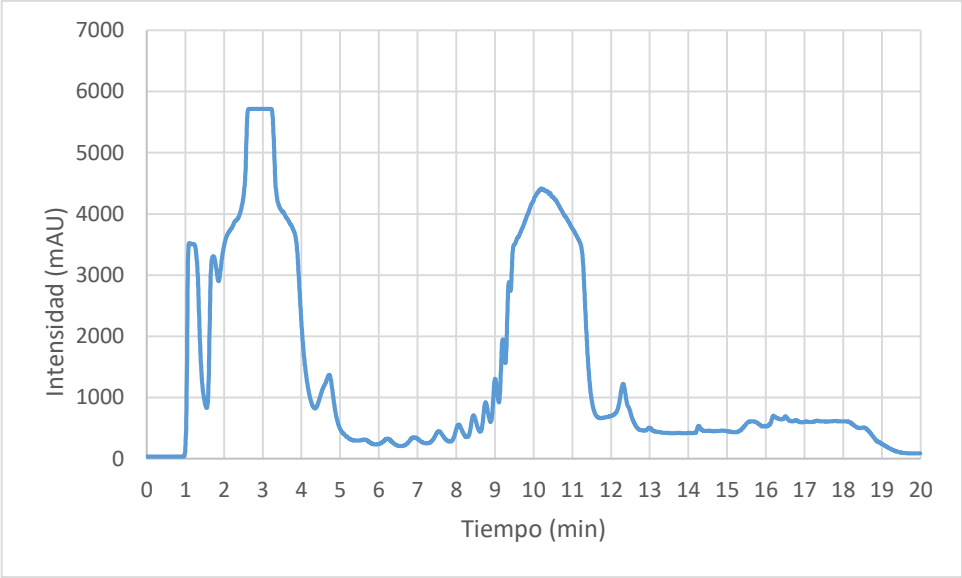


Figura 9: Cromatograma del mPEG 1000 sin ningún tipo de tratamiento

APD 1.3

Seguidamente, se analiza la siguiente fracción clorada en la cual se ha obtenido una cantidad de 0.0578 g. Según dicta el apartado 4.1.4, se necesitan 0.100 g de muestra para llevar a cabo el análisis. En estos casos, se ejecutará el proceso de derivatización con toda la muestra, añadiendo posteriormente las cantidades de reactivo correspondientes. De todas formas, siempre se añadirá un exceso prácticamente del doble de DNBC para asegurarnos de que todo el producto ha reaccionado, y así evitarnos pérdidas, que con tan poco producto pueden ser de gran importancia. En este caso, se añadieron 0.100 g de DNBC y 1 mL de solución catalizador.

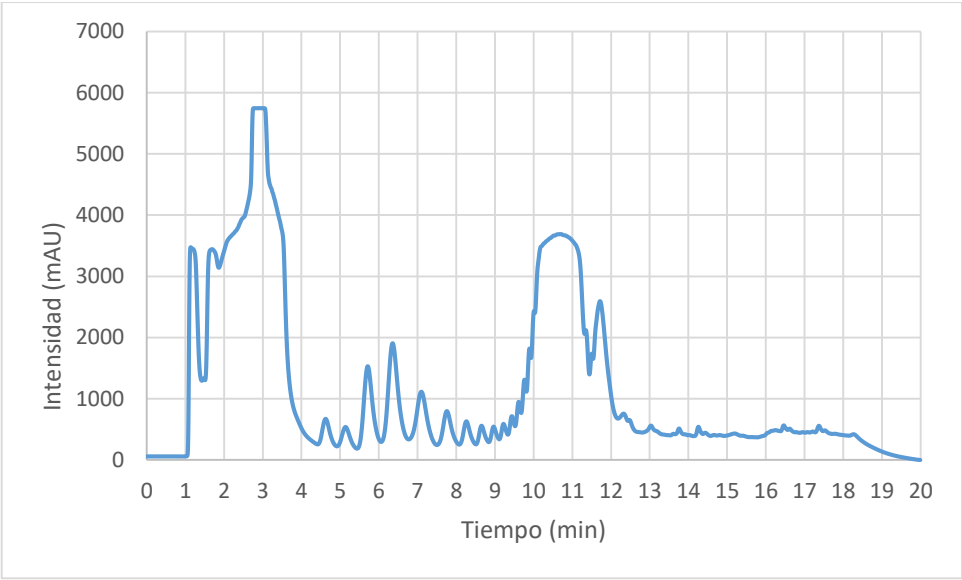


Figura 10: APD 1.3

En este experimento podemos ver un aumento de la cantidad de PEG con respecto a la del apartado APD 1.2, por lo que podemos verificar que la separación se está llevando a cabo. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la cantidad de mPEG 1000 sigue

siendo mucho mayor, por lo que aún no se dispone de la suficiente pureza de PEG para llevar a cabo el análisis mediante GPC.

APD 1.4

Finalmente, se efectuará el análisis de la fase acuosa obtenida en el experimento APD 1.4. Este apartado, requiere un mayor tratamiento de la muestra, debido a que la fase acuosa contiene una elevada cantidad de NaCl para evitar la formación de emulsiones tan habitual en etoxilados. De este modo, se añade 50 mL de acetona a la fase acuosa, para así disminuir la solubilidad de la sal en la solución. Efectivamente, se puede observar la precipitación de la sal que, se eliminará posteriormente mediante filtración utilizando un embudo y papel de filtro. En la siguiente figura, se muestran los diferentes aparatos utilizados durante el proceso de extracción. De izquierda a derecha, se muestra el rotavapor en el cual se eliminan los disolventes de las muestras, los embudos de decantación utilizados, y el embudo para la separación del NaCl una vez provocada la precipitación.

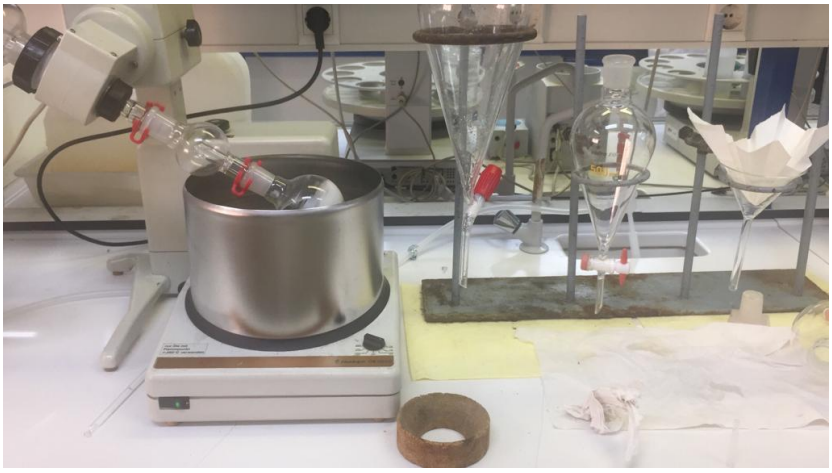


Figura 11: Aparatos utilizados en la extracción

Con el fin de evitar la aparición de precipitado, se repite el proceso de adición de acetona. Posteriormente, se evapora el disolvente mediante el rotavapor. A medida que se produce la evaporación, pueden quedar restos de NaCl que provocarán pequeñas explosiones debido a la porosidad de la solución.

El matraz de fondo redondo contiene de este modo, nuestro producto y NaCl. Para evitar la contaminación de la muestra con NaCl, se procede a la disolución de nuestro producto en la mínima cantidad de cloroformo (5 mL aproximadamente), ya que disuelve correctamente nuestro producto, y no la sal[11]. Así mismo, se añadirá también la cantidad suficiente de $MgSO_4$, que actuará como desencante del agua que haya podido permanecer y, finalmente, se vuelve a filtrar en un vial para obtener únicamente nuestro producto disuelto en cloroformo, el cual se eliminará mediante evaporación en el rotavapor.

Tras llevar a cabo este proceso se obtienen 0.0039 g aproximadamente de producto final. A pesar de que es una cantidad muy pequeña, hay que tener en cuenta que este proceso es únicamente cualitativo y lo que interesa es la obtención de PEG puro ya que de este modo se podrá realizar el análisis mediante GPC.

En este caso, se añadirán aproximadamente 0.01 g de DNBC y 0.5 mL de solución catalizador para el análisis por derivatización mediante HPLC.

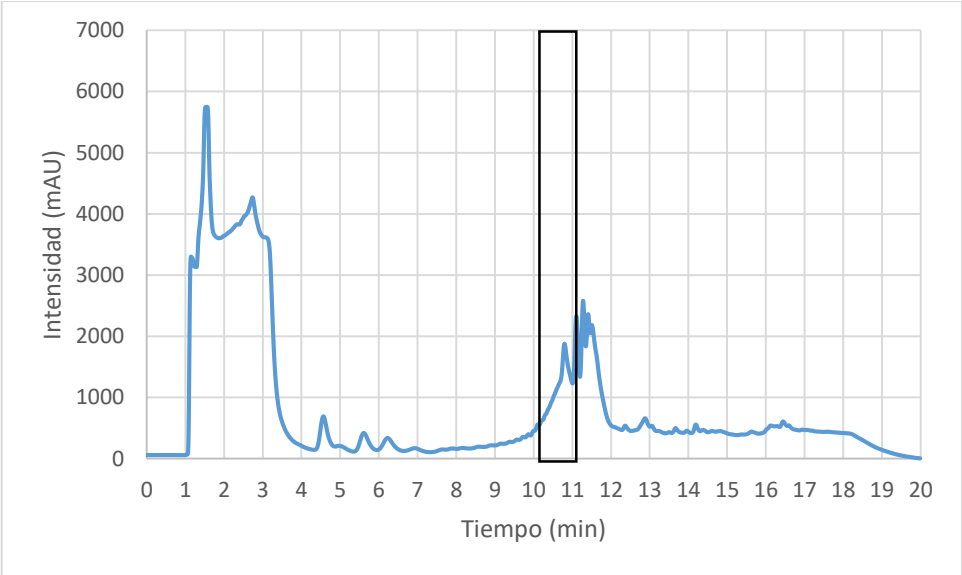


Figura 12: Cromatograma del experimento APD 1.4

Tras analizar el resultado obtenido, surgen varias hipótesis. Una de ellas es la posibilidad de que el pico señalado, obtenido justo antes del minuto 11 sea el etoxilado, y que los otros picos sean PEG separados por peso molecular, o bien, que el conjunto de picos desde el minuto 10 hasta el minuto 12 sea el etoxilado, habiéndolo separado en sus distintos pesos, y los picos más pequeños a partir del minuto 12 sean el PEG.

Comparando los tiempos de retención de esta figura con la figura 10, se puede aceptar que la primera hipótesis es la válida y que, por tanto, la cantidad de PEG obtenida es, mayor que la de etoxilado, pudiendo así mismo, llevar a cabo el análisis mediante GPC de esta fracción obtenida.

De todos modos, utilizando este procedimiento no ha sido posible separar completamente el PEG del mPEG debido a su similitud en cuanto a solubilidad. Ambas moléculas son anfóteras y aunque el PEG posee un grupo hidroxilo más que el mPEG, éste tiene muy poca influencia en una larga cadena etoxilada apolar. No obstante, esta diferencia ha posibilitado que en las condiciones llevadas a cabo en el estudio se haya podido separar una parte del PEG ya que es más polar y, por tanto, se disolverá mejor en disolventes polares, aunque la separación, no será total.

Pruebas de solubilidad de PEG y mPEG

Para tratar de resolver este problema, se llevan a cabo varios experimentos para determinar si hay algún disolvente con mayor afinidad para disolver uno de estos compuestos respecto del otro. Concretamente se han evaluado distintos disolventes. Primeramente se prueba con dietiléter, disolviendo 1 g de patrón de mPEG 1000 en 25 mL y lo mismo con 1 g de PEG 1000.

Se comprobó, que ambos compuestos son insolubles en dietiléter a temperatura ambiente y parcialmente solubles a temperatura 34.5ºC (temperatura de ebullición del éter). Por tanto en dietiléter tampoco se puede llevar a cabo la extracción.

Tras efectuar la misma prueba en hexano, ciclohexano, tolueno y tetrahidrofurano, se comprobó que en los 2 primeros, los compuestos de interés eran totalmente insolubles, y en los siguientes, solubles, imposibilitando así la separación mediante el procedimiento A, ya que en todas las condiciones estudiadas los dos compuestos se comportan de la misma manera.

Como última prueba de solubilidad se procedió a efectuar el procedimiento A, pero utilizando agua Milli Q fría, para comprobar si en estas condiciones, se producía la separación. Para ello, se desarrolla el mismo proceso de fraccionamiento en 3 fases producidas por 3 extracciones con cloroformo de la fase acuosa, y por último, la fase acuosa. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, se procederá únicamente al análisis de la fase acuosa, ya que es la que mejores resultados nos ha dado.

El resultado obtenido tras esta prueba se puede observar en la figura 13. El pico situado entre el minuto 9 y el 11 es el mPEG y, el del minuto 12, el PEG.

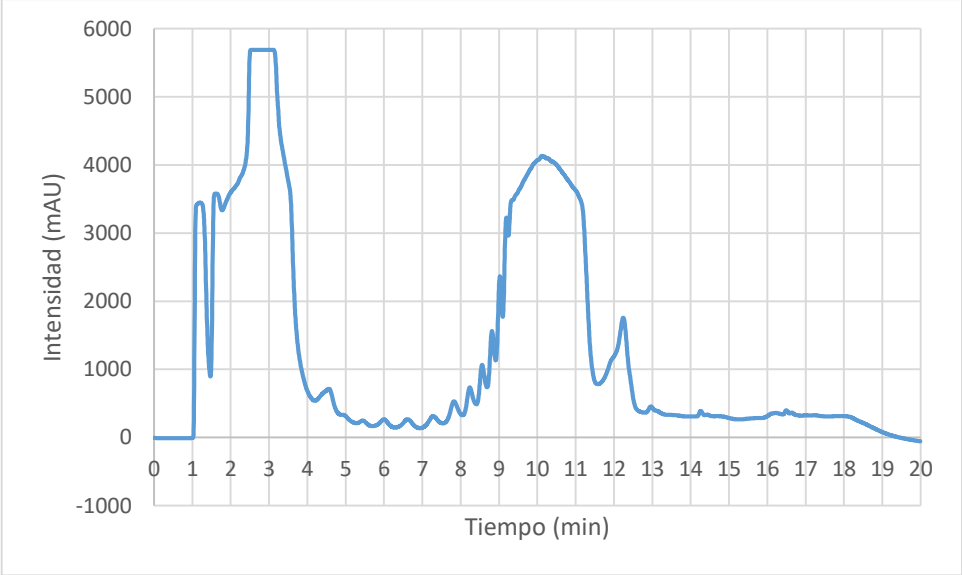
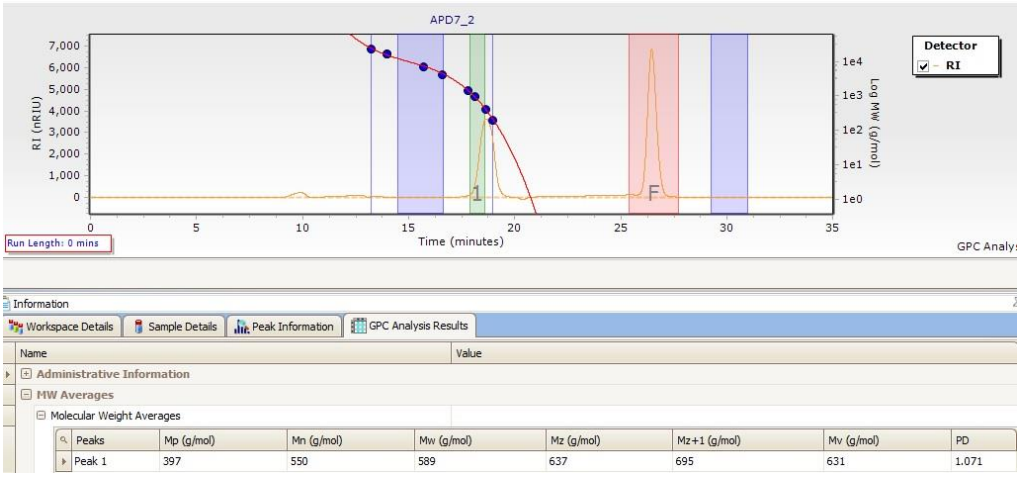


Figura 13: Cromatograma del experimento APD 6

Teniendo en cuenta que la cantidad de etoxilado obtenido supera con creces la cantidad de PEG, se concluye que mediante este procedimiento, la fracción más pura de PEG que se ha podido obtener es la que corresponde a la fracción APD 1.4 y es la única que se podrá analizar mediante cromatografía GPC para caracterizar así su peso molecular..

Análisis GPC de APD 1.4

Tras analizar la muestra obtenida en el experimento APD 1.4 mediante cromatografía GPC según las condiciones detalladas en el apartado 4.3.2 se obtuvo un peso molecular de 589 g/mol. En la siguiente se muestra la respuesta cromatográfica:



Peaks	Mp (g/mol)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	Mz (g/mol)	Mz+1 (g/mol)	Mv (g/mol)	PD
Peak 1	397	550	589	637	695	631	1.071

Figura 14: Cromatograma GPC del experimento APD 1.4

Este resultado podría concordar con la hipótesis formulada anteriormente, de que a diferencia de otros etoxilados, el polietilenglicol producido durante la producción de mPEG 1000, no duplica el peso molecular del etoxilado como normalmente sucede sino que es más bajo.

Aun así, no podemos verificarlo debido a que en la muestra, existe una cantidad significante de PEG que no se ha podido determinar ya que no se ha podido separar del mPEG, provocando así que la muestra analizada sea poco representativa de la real.

Siguiendo el procedimiento A, y a pesar de haber intentado desarrollar modificaciones para mejorar la extracción, no ha sido posible obtener la separación deseada entre ambos productos. Por ello se procede al desarrollo de un nuevo procedimiento de extracción con el objetivo de conseguir una fracción aún más pura que la obtenida mediante el procedimiento A.

5.2 Procedimiento B

Este nuevo procedimiento, está basado en el uso de una columna cromatográfica preparativa, la cual retendrá de forma distinta ambos productos, pudiendo así separar un producto del otro. Tras llevar a cabo el desarrollo de un nuevo procedimiento de extracción con el fin de lograr una completa separación entre el PEG y el mPEG, se obtuvo un primer resultado muy favorable en el experimento APD 10.

APD 10

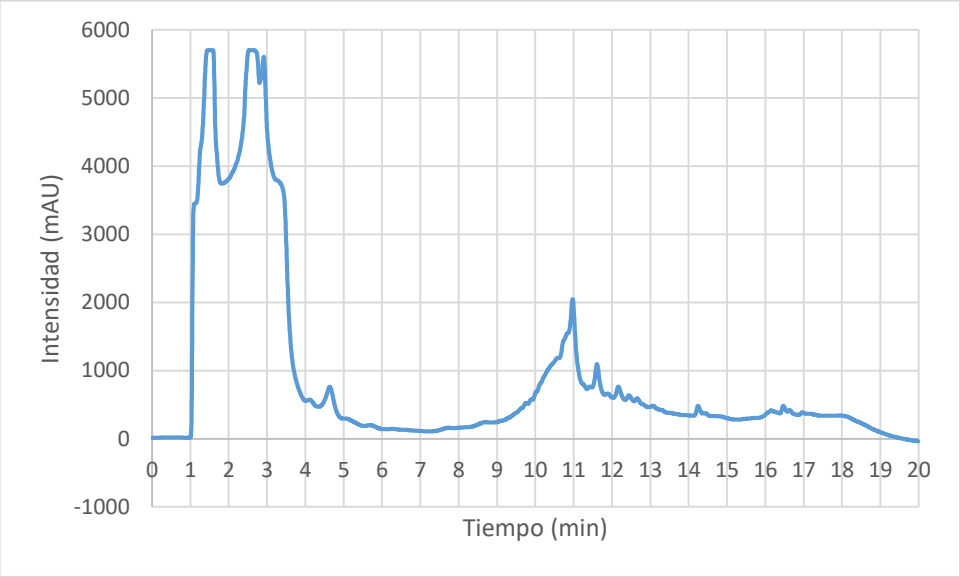


Figura 15: Cromatograma del experimento APD 10

En este caso, se utilizó una fase móvil 80:20 H_2O:MeOH para la separación cromatográfica. Como se puede observar, existe una cierta separación ya que el pico que aparecía de mPEG ha disminuido considerablemente en comparación con el que se podía observar en otros experimentos como por ejemplo el APD 1.2

Aun así, no se ha logrado una separación completa ya que sigue habiendo mayor cantidad de mPEG que de polietilenglicol.

Para ello, se desarrollan diversos cambios. El primero (APD 11.1), será bajar la polaridad de la fase móvil, pasando a 50:50 H_2O:MeOH. Teniendo en cuenta que la separación cromatográfica en columna preparativa se está produciendo mediante una fase estacionaria C18 de fase reversa, utilizar una fase móvil menos polar podría favorecer la retención del mPEG (menos polar que el PEG) y de este modo inducir una mejor separación.

Otra prueba que se lleva a cabo (APD 11.2) trata sobre el uso, únicamente del cartucho específico de intercambio aniónico para ver así que influencia tiene sobre nuestra muestra, y si es plenamente indispensable su uso.

Por último, cabe la posibilidad que el vacío aplicado para la extracción de la fase móvil que contiene nuestro producto desfavorezca la separación. Por este motivo, se realizará un nuevo experimento (APD 11.3) sin aplicar vacío de extracción. Únicamente se aplicará presión por la parte superior de la columna preparativa mediante un *septum* y

una jeringa para favorecer la extracción, pero sin efectuar la misma fuerza que ejercía la trompa de vacío.

Tras llevar a cabo el primer experimento, se pudo observar un resultado extremadamente curioso, ya que, aún no haber podido separar el PEG del mPEG, se puede ver, tras el pico producido por el mPEG, 2 picos separados, muy probablemente relacionados con dos grupos de PEG de distintos pesos moleculares, que han sido separados en 2 picos distintos.

APD 11.1

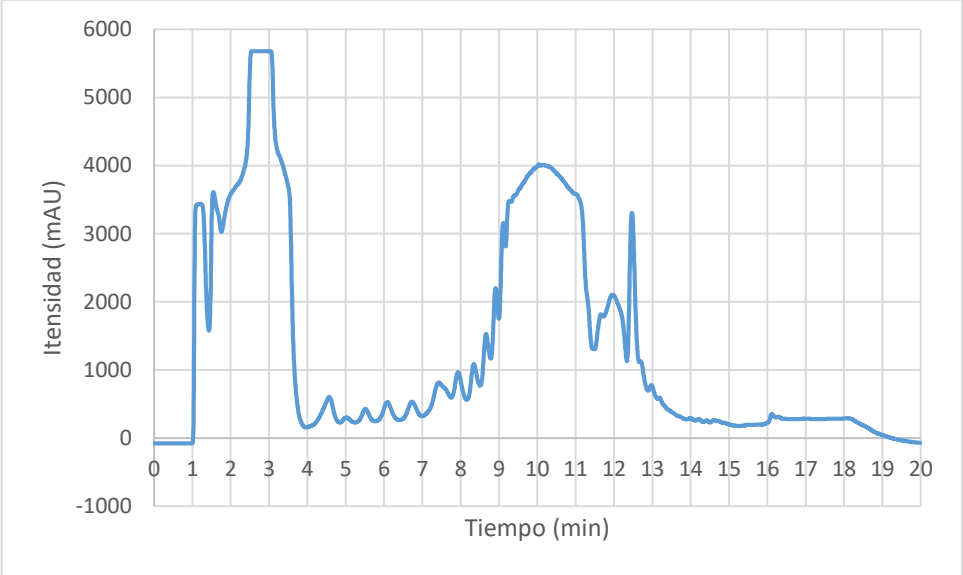


Figura 16: Cromatograma del experimento APD 11.1

Esto supone un gran avance en la investigación, debido a que el hecho de poder observar 2 picos distintos de PEG, puede llevar a pensar que durante la producción de mPEG se producen dos tipos de PEG:

1. Un grupo de polietilenglicol de mayor peso molecular producido por la etoxilación del agua que proviene del metanol y del óxido de etileno introducido al principio.
2. Un grupo de polietilenglicol de menor peso molecular producido por la etoxilación del agua que proviene del óxido de etileno que está siendo añadido continuamente en el reactor.

APD 11.2

Realizando el experimento APD 11.2 se pudo observar que el nivel de influencia que tiene la resina de intercambio iónico en nuestra muestra es prácticamente nula, por lo que descartaremos su uso en experimentos posteriores.

Seguidamente, el resultado obtenido en el experimento APD 11.3 aporta información muy relevante con respecto al uso o no de la trompa de vacío para la extracción, ya que si comparamos los resultados con el experimento 11.1, en el que sí hubo uso de trompa de vacío, podemos ver que la relación entre áreas de los picos son muy parecidas:

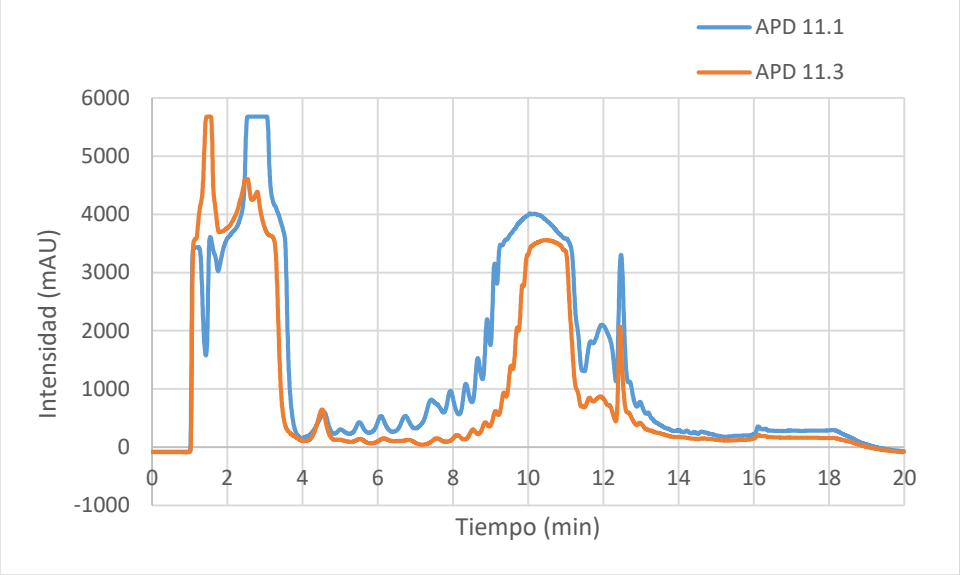


Figura 17: Cromatograma de comparación de los experimentos APD 11.1 y 11.3

Por este motivo, se puede afirmar que el uso de trompa de vacío para la extracción del producto no afecta a la separación y, por ello, se seguirá utilizando el vacío, ya que favorece la velocidad de extracción.

El desarrollo de este procedimiento ha sido de gran ayuda para poder afirmar la existencia de distintos grupos de PEG en un porcentaje elevado dentro de la muestra, pero la separación ha sido insuficiente para llevar a cabo un análisis mediante GPC debido a las elevadas concentraciones de mPEG obtenidas en todos los experimentos.

Por consiguiente, evalúa otro procedimiento de extracción (procedimiento C) para tratar de separar por completo ambos productos y de este modo poder ser capaz de utilizar la técnica de GPC para caracterizar el peso molecular del PEG.

5.3 Procedimiento C

En este procedimiento la variable que se considera es el aumento de la cantidad de fase estacionaria, es decir de sílice C18 con el fin de aumentar la calidad de la separación entre ambos compuestos.

En el transcurso del procedimiento APD 14.1, los primeros 100 mL de extracción se descartan por el hecho de que inicialmente se pensó que el producto necesitaría una cantidad de fase móvil más elevada para eluir. Tras estos 100 mL, se recogen aproximadamente 50 mL para el análisis según el procedimiento descrito en el apartado 4.3.1.

El resultado obtenido es muy favorable, debido a que pese no haber podido separar el mPEG 1000, se puede observar un doble pico situado hacia el minuto 11.50 aproximadamente.

APD 14.1

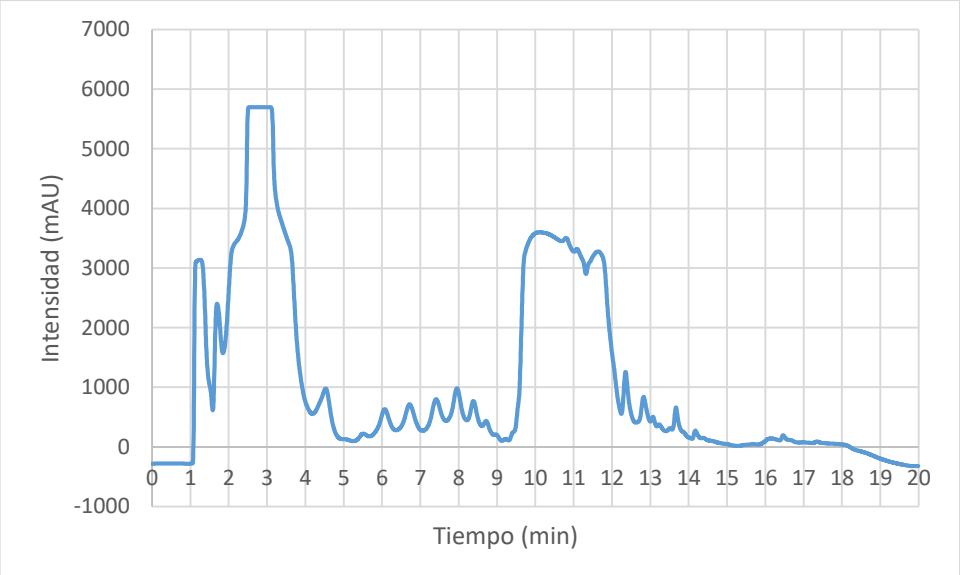


Figura 18: Cromatograma del experimento APD 14.1

Este doble pico puede significar la superposición entre el mPEG 1000 y el PEG, este último, se encuentra actualmente en la muestra a más concentración que al inicio, hecho que empeora la separación.

Por otro lado, se reducirá la cantidad de volumen descartado en el inicio de la extracción, ya que al contrario de lo que se imaginaba anteriormente, el producto eluye con facilidad. De este modo, se procurará obtener una fracción con menor cantidad de mPEG.

Es por ello que en el siguiente experimento que se lleva a cabo, se analizan los primeros 200 mL, fraccionados en 4 fases de 50 mL, para evaluar así el volumen de fase móvil requeridos para la mayor extracción de PEG, con el mínimo contenido de mPEG.

Tras comparar los resultados obtenidos por las fases APD 15.1, APD 15.3 y APD 15.4 en la figura 19 (descartamos la comparación con la fase 2 por su parecido a la fase 1 y así simplificar el cromatograma) se puede observar como la fase APD15.1, contiene varios picos situados a partir del minuto 11 los cuales ofrecen la señal de varios PEG que eluyen a distinto tiempo de retención.

La tercera fase, ofrece un conjunto de picos de mayor altura situados sobre el minuto 11.50, muy probablemente formados por PEG mayoritariamente y, posteriormente la fracción número 4, dónde aparecen ahora si los picos del mPEG y del PEG sobre los minutos 10 y 12, respectivamente.

APD 15.1 / 15.3 / 15.4

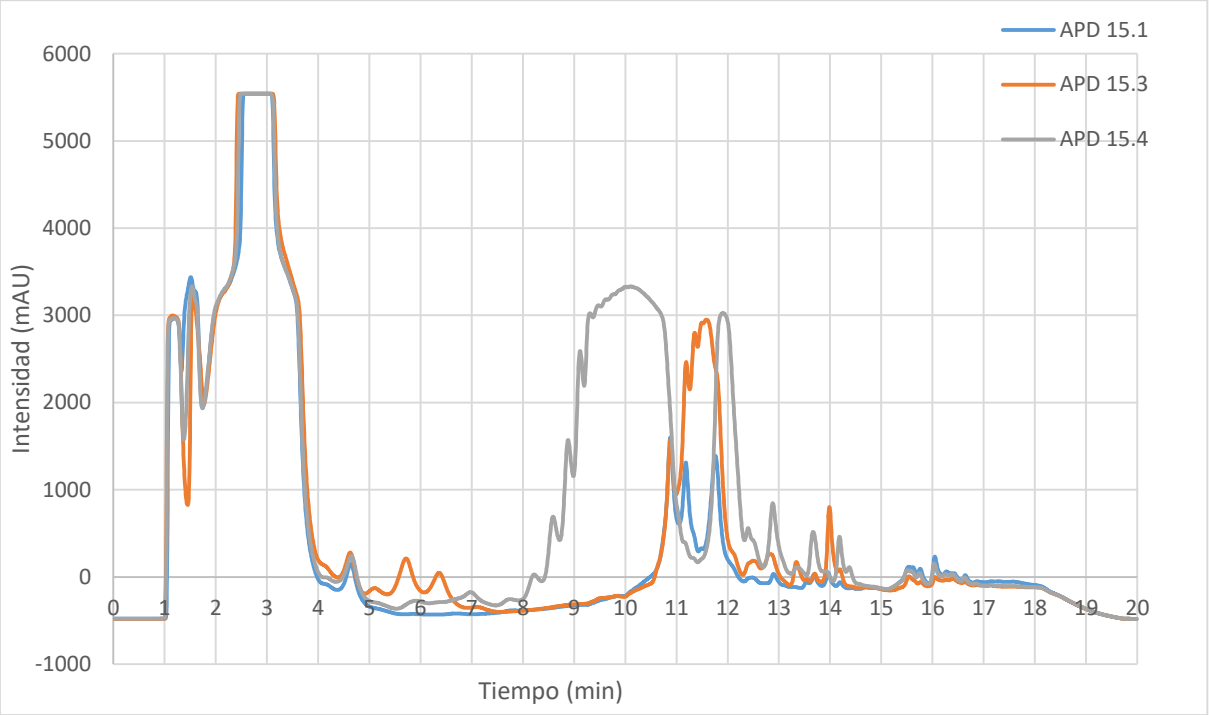


Figura 19: Cromatograma de comparación de los experimentos APD 15.1 / 15.3 / 15.4

Por tanto, se ha podido comprobar que existe una fase en la cual podemos obtener PEG en un elevado porcentaje (fase 3) aunque se esté descartando una parte elevada en las posteriores fases.

Con el objetivo de intentar mejorar los resultados, se evalúa como afecta en la respuesta una variación en la composición de la fase móvil utilizada, concretamente se utiliza en un porcentaje 60:40 H_2O:MeOH

A través de los resultados obtenidos con esta nueva composición de la fase móvil, se puede concluir que, tal y como sucedía para la anterior composición estudiada, tanto la fase APD 16.1 como la APD 16.2 son prácticamente idénticas, hecho por el cual se deduce que tienen la misma composición, y por lo tanto solo utilizaremos una de ellas para la comparación, en este caso la APD 16.2. El aumento de la polaridad de la fase móvil ha provocado una disminución drástica de la separación entre ambos productos ya que, en todas las fases, apreciamos una elevada cantidad de mPEG 1000.

APD 16.2 / 16.3 /16.4

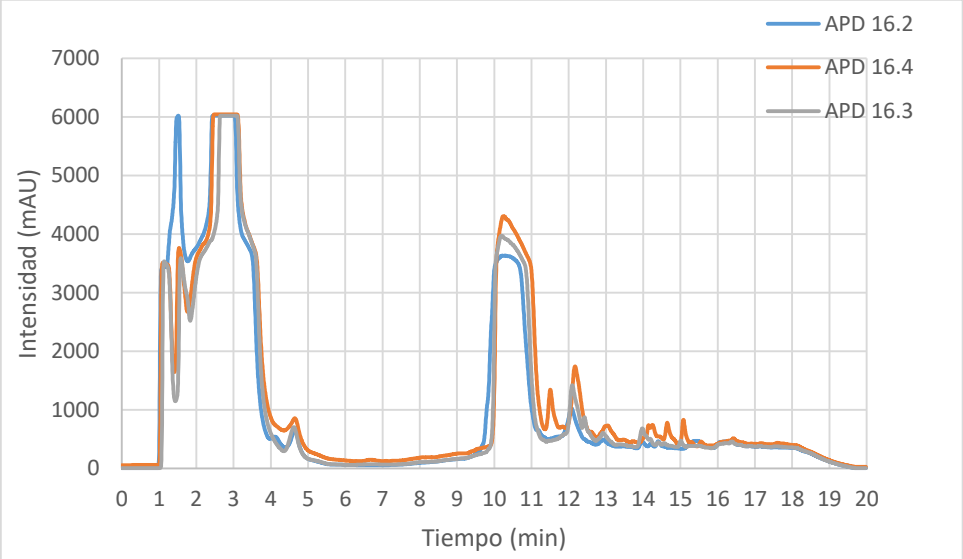


Figura 20: Cromatograma de comparación de los experimentos APD 16.2 / 16.3 / 16.4

Por ello se descartan estas nuevas condiciones ya que no suponen ninguna mejora en la respuesta. Por ello, para los siguientes apartados, se opta por utilizar la fase móvil cuya composición es 50:50 H_2O:MeOH.

La fase que mejores resultados ha logrado es la analizada en el apartado 15.3. Aun así, existe la posibilidad de que el pico obtenido en esta fracción esté parcialmente formado también por mPEG. Ante tal duda se lleva a cabo de nuevo el mismo experimento, pero, en este caso, aumentando el número de fracciones en el cual separamos la muestra (10 fracciones de 20 mL cada una, aproximadamente), para así hacer una selección de las que contengan un porcentaje de PEG más puro para su posterior análisis por GPC. Se descartaran los primeros 50 mL debido a que en el experimento APD 15, se ha observado que el primer volumen de extracción no contiene una cantidad de producto suficientemente apreciable como para tenerla en cuenta.

Tras la obtención de las 10 fases, se lleva a cabo el análisis de la 1, la 5 y la 10. Se efectúan únicamente esta 3 para conocer aproximadamente entre que fases se encuentra el mayor porcentaje de PEG y así, utilizar la menor cantidad de producto en la caracterización mediante el método descrito en el apartado 4.3.1, para posteriormente poder llevar a cabo el análisis mediante GPC, si es necesario.

APD 17.1 / 17.5 / 17.10

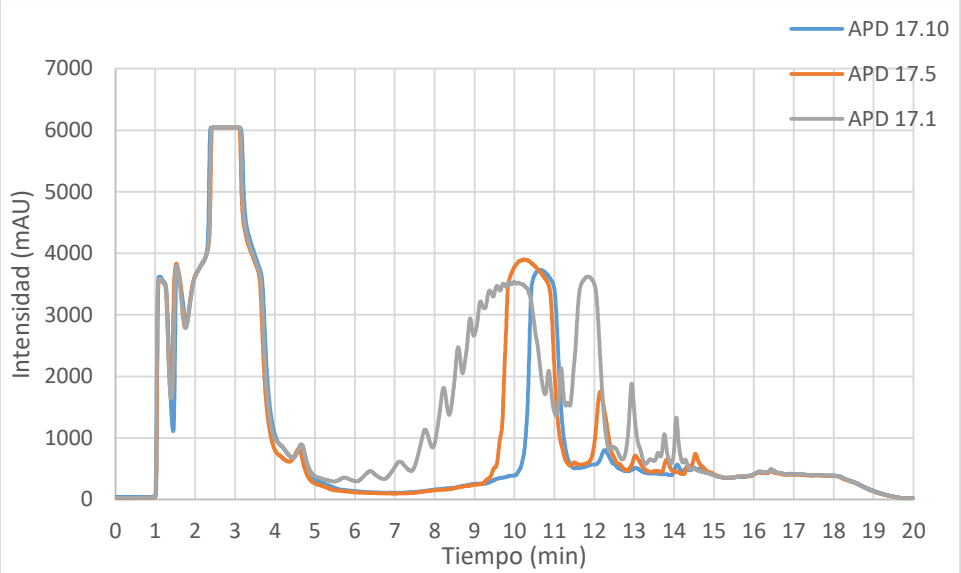


Figura 21: Cromatograma de comparación de los experimentos APD 17.1 / 17.5 / 17.10

Es fácilmente observable a través de la figura 21 que las fases APD 17.5 y APD 17.10 contienen una cantidad de mPEG elevada en comparación con la de PEG. Por lo que concierne a la fase 1, el porcentaje de PEG es considerablemente más elevado, aunque no lo suficiente.

Se llega así a la conclusión que el volumen descartado inicialmente es demasiado elevado. En el siguiente experimento, no descartaremos volumen de extracción para evitar este tipo de pérdidas que se han padecido.

Después de realizar de nuevo el experimento, siguiendo los pasos determinados en el apartado anterior, se observa que, analizando las primeras fases descartadas se encuentra una elevada cantidad de PEG, como se puede ver en el pico entre los minutos 11 y 12 aproximadamente, con respecto al pico de mPEG situado en el minuto 9 aproximadamente.

APD 18.1 / 18.2

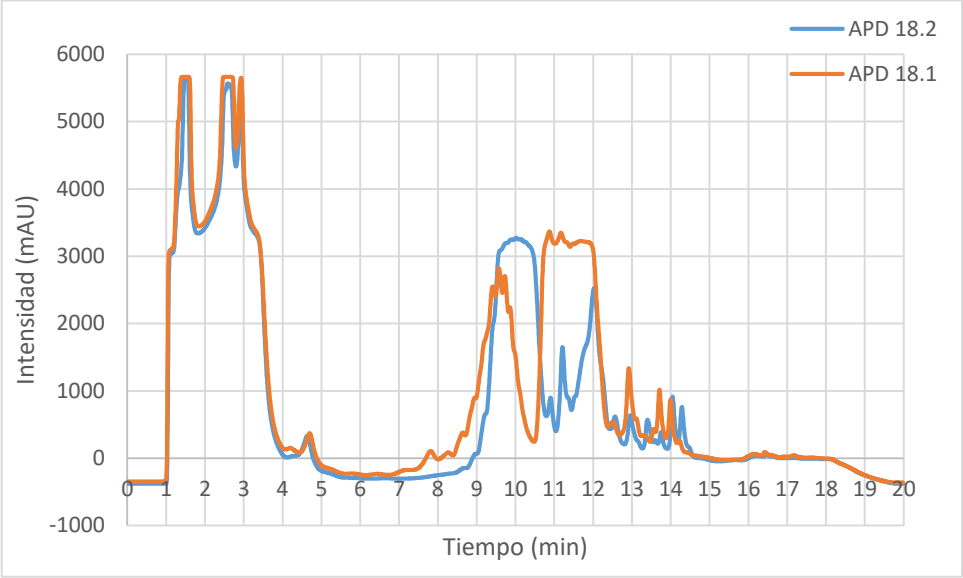


Figura 22: Cromatograma de comparación de los experimentos APD 18.1 / 18.2

Debido a la buena separación entre ambos picos, se puede afirmar también que la composición mayoritaria de la fracción correspondiente al análisis APD 18.0 es PEG, hecho que no se había podido afirmar hasta este instante, haciendo así posible el análisis de esta muestra por GPC, ya que aun no siendo PEG puro, es la mayor separación que se ha conseguido.

De todas formas, se ejecuta de nuevo el experimento en las mismas condiciones de separación, para tratar de conseguir mayor cantidad de producto de separación para el análisis.

En la siguiente figura se observa la comparación de las distintas fases de extracción de la misma muestra, en la cual se puede observar un leve desplazamiento en los picos correspondientes al PEG.

APD 19.1 – 19.10

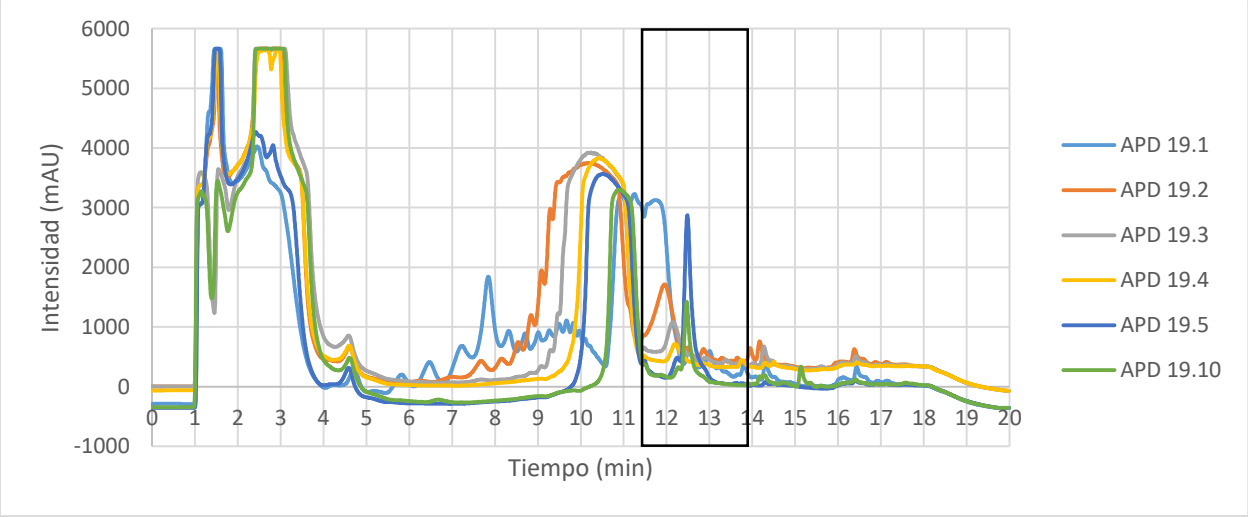


Figura 23: Cromatograma de comparación de los experimentos APD 19.2-19-10

En la tabla siguiente, se muestra numéricamente el ligero aumento en el tiempo de retención del pico del PEG a medida que aumenta la fase de extracción:

Tabla 4: Tiempo de retención del PEG en función de la fracción de extracción.

Fracción del experimento	Tiempo de retención del PEG (min)
APD 19.1	11.882
APD 19.2	11.959
APD 19.3	12.153
APD 19.4	12.206
APD 19.5	12.486
APD 19.10	12.468

Este hecho puede significar que a medida que avanza la extracción, se extraen PEG de distinto peso molecular. Esto provoca que, aunque se extraigan fracciones muy puras de PEG, no serán significativas de la cantidad total que hay en el producto, ya que los PEG de mayor peso molecular no se han podido separar del mPEG.

APD 20

Para comprobar si efectivamente los PEG de mayor peso molecular eluyen a un tiempo de retención ligeramente mayor que los de menor peso, se decide llevar a cabo el análisis, mediante el procedimiento detallado en el apartado 4.3.1, de distintos patrones de PEG de pesos moleculares entre 200 y 2000, para comprobar si realmente hay un cambio en los tiempos de retención asociado a los pesos moleculares del PEG analizado. Los resultados obtenidos a través de este estudio se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 5: Tiempo de retención de cada PEG en función de su peso molecular.

Patrón analizado	Tiempo de retención del PEG (min)
PEG 200	11.422
PEG 400	11.752
PEG 600	11.952
PEG 1000	12.128
PEG 1500	12.293
PEG 2000	12.355

A través de estos resultados, se puede concluir que la hipótesis formulada anteriormente (acerca de que a medida que avanzaban las fases de extracción, el peso molecular del PEG aumentaba) queda validada. De todas formas, se descarta la posibilidad de asignar un peso molecular al pico de PEG que forma parte del contenido de la muestra de mPEG, únicamente por su tiempo de retención, ya que es una variable muy sensible a pequeñas variaciones, de temperatura, presión o impurezas que puedan estar presentes en la muestra.

Uso de otros productos para la comparación de resultados: KBE2 y KBE7

Una vez detectado este problema, se quiso establecer un procedimiento para la extracción de PEG de dos productos distintos al mPEG para la comparación de resultados.

Esto se lleva a cabo mediante la extracción del PEG que contienen dos productos producidos en IQOXE los cuales son el KBE2 y el KBE7. Se utilizarán estos dos productos ya que, aunque estructuralmente son muy parecidos, el KBE2 contiene PEG

de un peso molecular alrededor de 600 g/mol, mientras que el PEG del KBE7, pesa alrededor de 1000 g/mol. Su producción se basa en la etoxilación mediante óxido de etileno de fracciones del alcohol C12-C16, dodecanol/tetradecanol, también nombrado *Lauryl-Cetyl Fatty Alcohol.*[12]

El número de cada producto, expresa el número de moles de óxido de etileno por cada mol de alcohol utilizado en la producción, por lo que explica que el PEG del KBE2 tenga un peso molecular inferior que el KBE7.

El objetivo de este procedimiento es comparar las separaciones que se llevaran a cabo para cada producto, y ver de este modo si el peso molecular afecta a la separación.

En las siguientes figuras, se muestran los cromatogramas del análisis de las muestras sin ningún tipo de tratamiento aplicado. En la primera se muestra el cromatograma referente al KBE2, en el cual el primer pico señalado corresponde al PEG, mientras que el suceso de picos señalados posteriormente corresponde al KBE2. Del mismo modo sucede en la figura 28, donde el primer pico señalado corresponde al PEG, mientras que los siguientes corresponden al KBE7.

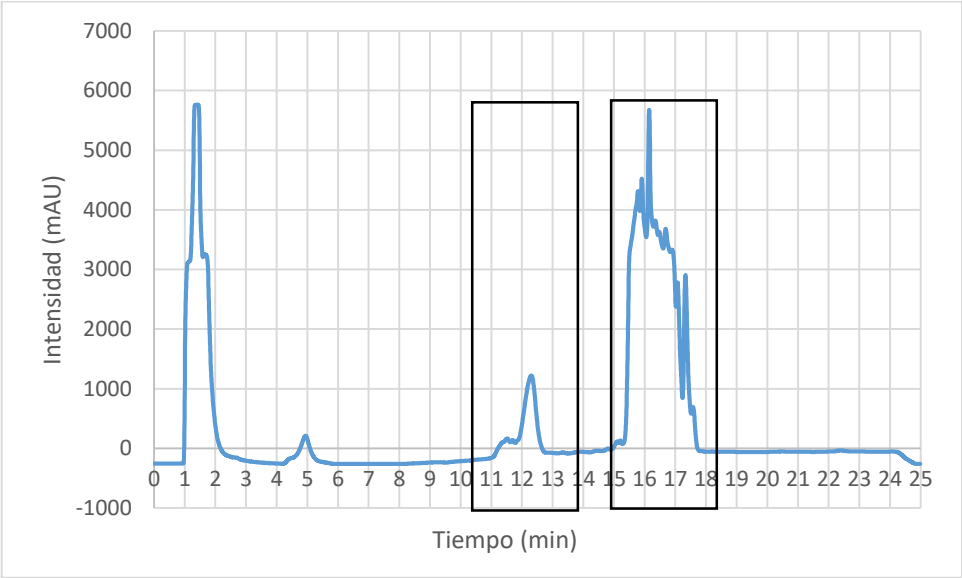


Figura 24: Cromatograma KBE2.

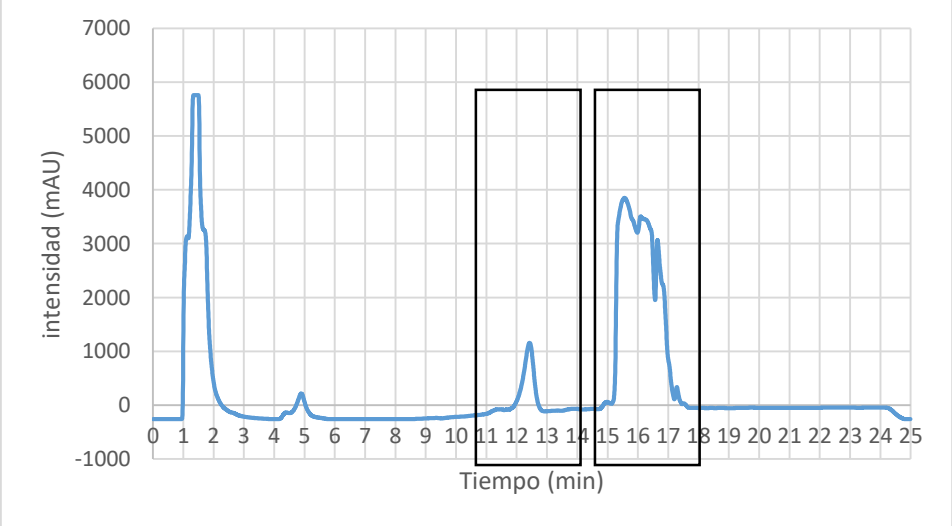


Figura 25: Cromatograma KBE7.

Seguidamente, se ejecutará el procedimiento de extracción descrito en el apartado 5.3 para el KBE2 y el KBE7, ya que es con el que mejores resultados se ha obtenido para el mPEG y así poderlos comparar.

APD 21

En el siguiente experimento, se efectúa la separación cromatográfica mediante el procedimiento de extracción C del producto KBE2, el cual como ya se ha mencionado anteriormente, también contiene PEG como subproducto.

Como se puede observar en la figura 26, ni en la primera fracción ni en la última, se observa contenido de otro compuesto que no sea PEG, este hecho, es fácilmente comprobable observando la figura 24 y comparando ambos cromatogramas.

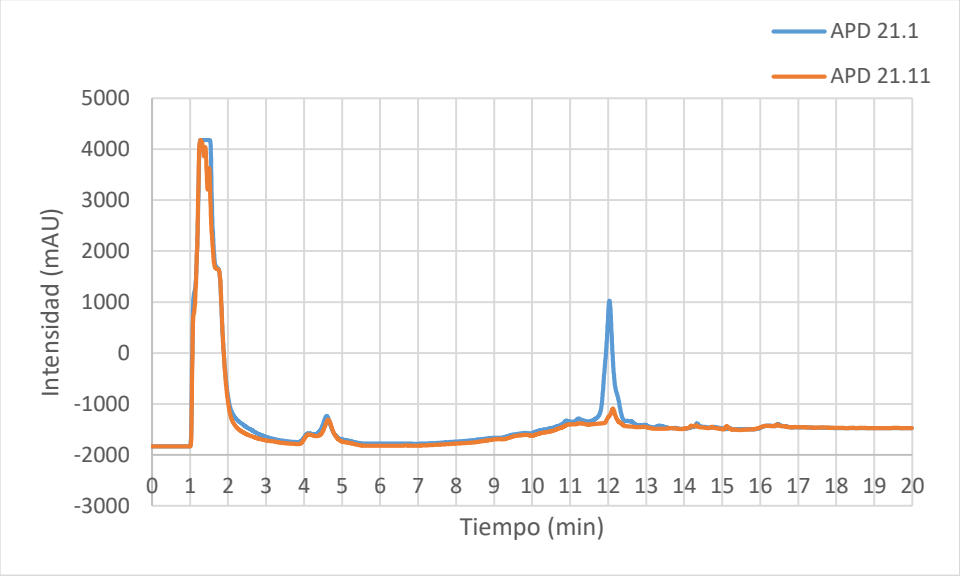


Figura 26: Cromatograma de comparación de los experimentos APD 21.1 / 21.11

De este modo, se puede asegurar que todas las fases de extracción contienen únicamente PEG. Así mismo, se efectúa la caracterización de todas las fases juntas mediante cromatografía GPC y el resultado es el siguiente:

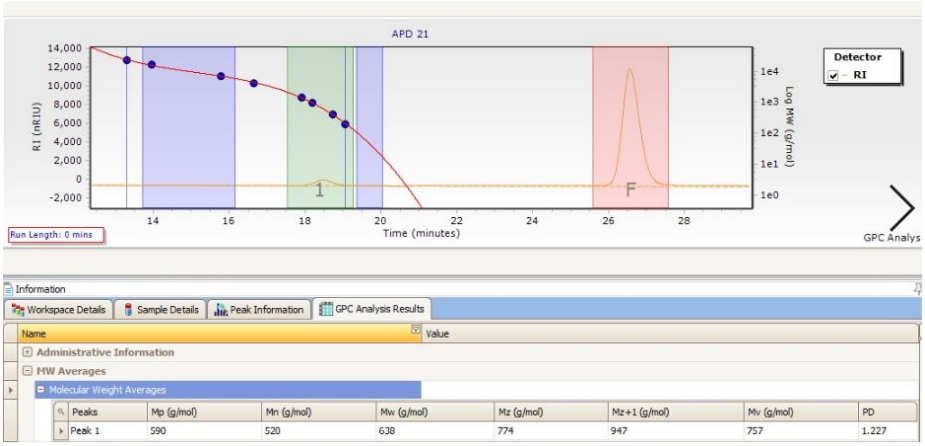


Figura 27: Cromatograma obtenido tras la caracterización mediante GPC

El peso molecular (MW) obtenido tras llevar a cabo la caracterización es de 638 g/mol, valor muy similar al esperado (600 g/mol). Este resultado indica que los polietilenglicoles de menor peso molecular, tienen mayor facilidad de separación de otros etoxilados que no los de mayor peso.

Para constatar aún más este hecho, se lleva a cabo la extracción de PEG en KBE7, cuyo peso molecular oscila los 1000 g/mol.

En la figura 28, se puede observar que, no solo la señal obtenida por el PEG es significativamente inferior que la mostrada anteriormente en la figura 27, sino que además, la zona entre los 14 y los 16 minutos, tiempo en el cual aparece el KBE7 aparecen algunos picos, también de mayor tamaño en comparación con el que se ha podido observar en la figura 27.

APD 23.1 / 23.10

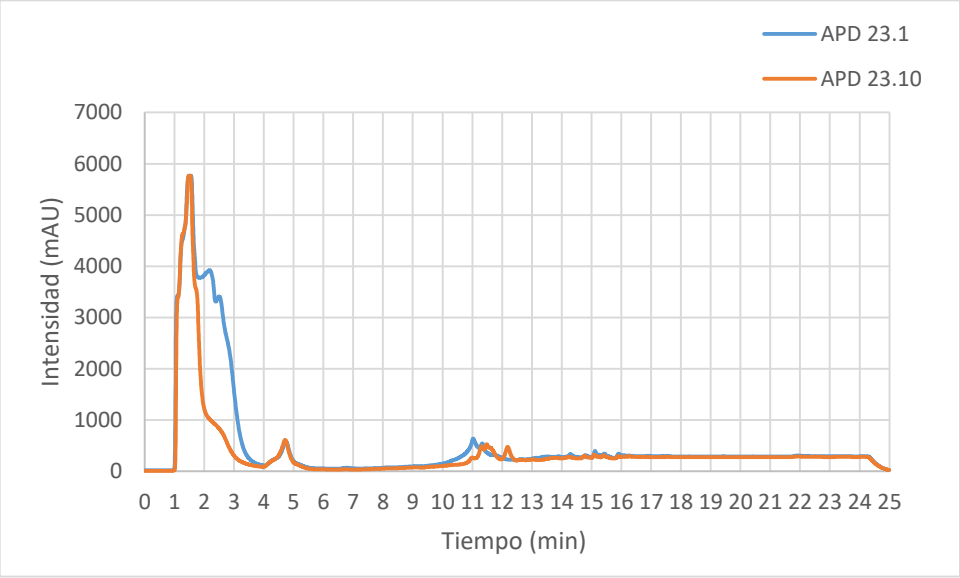


Figura 28: Cromatograma de comparación de los experimentos APD 23.1 / 23.10

Para comprobar si el peso molecular de la muestra obtenida es similar al esperado, aunque el proceso de extracción no haya sido tan bueno como para el KBE2, se decide llevar a cabo la caracterización mediante cromatografía GPC:

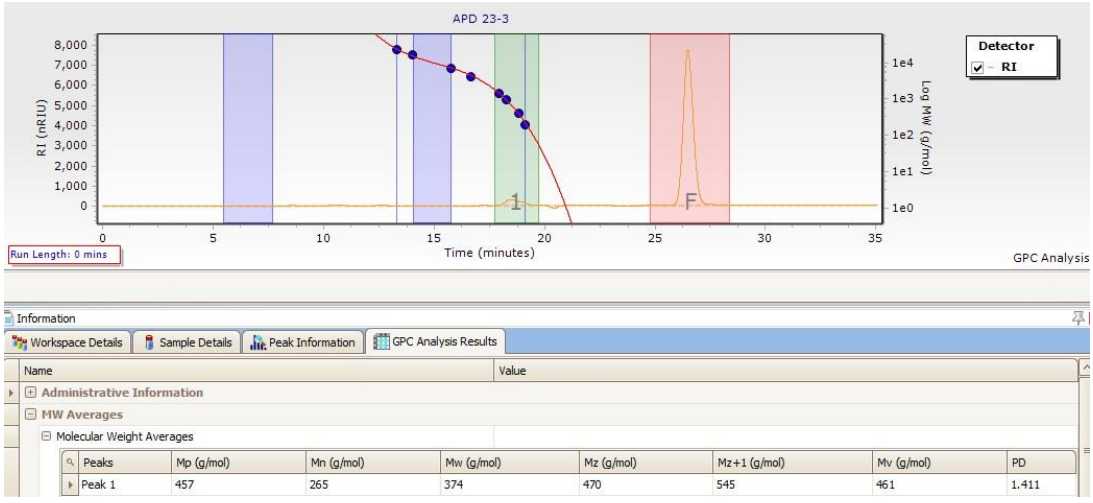


Figura 29: Cromatograma GPC obtenido de APD 23.1 – 23.10

El peso molecular obtenido tras el análisis es de 374 g/mol, un peso molecular mucho menor al esperado. De este modo, se confirma aún más la hipótesis formulada anteriormente acerca de que los PEG de menor peso molecular, tienen mayor facilidad para separarse de otro etoxilados que no los de mayor peso.

6. Conclusiones

Las conclusiones derivadas del trabajo experimental llevado a cabo son las siguientes:

- La separación de PEG de mPEG mediante extracciones con distintos disolventes, es problemática debido a que el PEG i el mPEG son productos de solubilidades muy parecidas, hecho que provoca una mala separación. Sin embargo, efectuando extracciones en diversas fases, se puede obtener una fracción con elevada pureza de PEG con un peso molecular menor al esperado. Aun así, no es una muestra representativa sobre la cual se puedan extraer conclusiones ya que la mayor parte del PEG ha quedado junto al mPEG.

- Por lo que concierne al segundo proceso de extracción, se comprobó que la fase móvil que permitía alcanzar una mejor separación era la compuesta por 50:50 H_2O:MeOH, también que se podía evitar el uso de resina de intercambio aniónico ya que su uso no afectaba al resultado y que la aplicación de vacío para la extracción estaba totalmente permitida. Además se observó la composición de 2 picos de PEG: un PEG de mayor peso molecular formado por la etoxilación del agua que contiene el MeOH y un PEG de menor peso molecular formado por el agua que contiene el OE que va entrando continuamente en el reactor.

- Con el último procedimiento de extracción, se ha podido confirmar que los PEG de menor peso molecular tienen mayor facilidad de separación que los de mayor peso molecular, y no únicamente en mPEG, debido a que con la comparación con otros productos como el KBE2 y el KBE7 se ha podido verificar este hecho. Sin embargo, se ha demostrado la formación de dos grupos de PEG perfectamente diferenciados, uno de menor y otro de mayor peso molecular, que confirma la importancia del agua que contiene el óxido de etileno, en la formación de PEG de menor peso molecular en las muestras de mPEG 1000.
  .

7. Bibliografía

[1] https://www.iqoxe.com/es/ (accedido 03 Mayo, 2019)

[2] http://www.estrochem.gr/en/product_categories/26/products/41 (accedido 10 Mayo, 2019)

[3] Barman, B. N., Champion, D. H., & Sjoberg, S. L. Identification and quantification of polyethylene glycol types in polyethylene glycol methyl ether and polyethylene glycol vinyl ether. *Journal of Chromatography A*, 1216 (**2009**) 6816–6823.

[4] Ionescu, M. (s. f.). Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes, 2nd Edition Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes, 2nd Edition (Vol. 1).

[5] Mori, S.; Barth, H. G. *Size exclusion chromatography*; Springer, 1999

[6] Andre M. Striegel, Wallace W. Yau, Joseph J. Kirkland, Donald D. Bly. *Modern Size Exclusion Liquid Cromatography;* John Wiley and son Eds. New Jersey, **2009.**

[7] https://todoenpolimeros.com/2018/08/22/cromatografia-por-permeacion-de-gel/(accedido 20 Mayo, 2019)

[8] http://www.insht.es/portal/site/Insht/ (accedido 25 Mayo, 2019).

[9] M. Schmitt, T. *Analysis of Surfactants*; Marcel Decker Eds. Switzarland, **2001.**

[10] UNE-EN 12139. Determinación del contenido total de polietilenglicol en agentes de superficie no iónicos (aductos OE) por HPLC/GPC, **1999**.

[11] Gu, A. (2009). Solubility Profiles of Poly (ethylene glycol)/ Solvent Systems. II. Comparison of Thermodynamic Parameters from Viscosity Measurements.

[12] https://es.scribd.com/doc/301683305/Wilmar-Oleo-Brochure (accedido 03 Junio, 2019)