

**Ivan Muñoz Pascal**

**DETERMINACIÓN DEL MONÓMERO RESIDUAL EN EL PVOH POR HS-GC.**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO.**

**Dirigido por la Dra. Margarita Negrete**

**Empresa Sekisui Specialty Chemicals Europe S.L.**

**Grado de Química**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Tarragona**

**2016**

### **Agradecimientos**

Gracias a todo el personal del laboratorio de control de calidad de Sekisui por la confianza y la ayuda que se me ha dado en todo momento, en especial a Margarita Negrete y Elena Llorens por su dedicación y paciencia conmigo; sin olvidar a Helena, Jesús, Mari, Sandra, Joan, Noelia y Natalia que siempre han estado ahí para hacerme las mañanas mas amenas.

También me gustaría agradecer de todo corazón a mi familia y mi pareja, que me han escuchado y animado, no solo en este tramo final de carrera, sino en la vida en general.

## **Índice general**

1. Introducción.....	7
1.1 Descripción de la empresa.....	7
1.2 El alcohol polivinílico (PVOH).....	7
1.3 Importancia de la optimización del método.....	8
1.4 Antecedentes.....	8
2. Objetivos.....	8
3. Fundamento teórico.....	9
3.1 Cromatografía de gases con detector FID.....	9
3.2 <i>Headspace</i> .....	10
3.3 <i>Multiple Headspace Extraction</i> (MHE).....	11
4. Parte experimental.....	12
4.1 Disolventes y patrón.....	12
4.2 Equipos y software.....	13
4.3 Tratamiento de muestra y gestión de residuos.....	13
4.4 Cromatografía y metodología.....	14
<b>5. Discusión de resultados.....</b>	<b>14</b>
5.1 Condiciones iniciales e identificación del pico.....	14
5.2 Detección del pico.....	16
5.3 Optimización de la separación cromatográfica.....	16
5.4 <i>Septum Blank</i> .....	18
5.5 Optimización de las condiciones del HS.....	22
5.6 Calibración.....	22
5.7 Análisis de muestras.....	25
5.8 Validación del método.....	27
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Referencias. ....</b>	<b>28</b>

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Precauciones y peligros de los compuestos utilizados durante la experimentación...	13
<b>Tabla 2.</b> Condiciones iniciales del <i>Headspace Sampler</i> .....	14
<b>Tabla 3.</b> Condiciones iniciales del cromatógrafo de gases.....	15
<b>Tabla 4.</b> Áreas obtenidas al calentar 1gr de muestra durante 30min a diferentes temperaturas en el HS.....	22
<b>Tabla 5.</b> Datos necesarios para la calibración.....	24
<b>Tabla 6.</b> Condiciones optimizadas para la determinación de VAM en PVOH por HS-GC.....	25
<b>Tabla 7.</b> Comparación de los datos obtenidos a partir del análisis de 4 o 2 extracciones múltiples.....	26

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la fase estacionaria; un copolisiloxano de polaridad media.....	9
<b>Figura 2.1.</b> Esquema de un vial al ser calentado, en el cual se forman el <i>headspace</i> y la <i>sample phase</i> .....	10
<b>Figura 2.1.</b> Inyección de los analitos en el cromatógrafo. A: calentamiento del vial HS. B: la aguja del cromatógrafo toma una alícuota del <i>headspace</i> del vial. C: inyección en la columna cromatográfica.....	10
<b>Figura 3.</b> Identificación del pico correspondiente al VAM (señal roja). Las condiciones del análisis están expuestas en las tablas 2 y 3.....	15
<b>Figura 4.</b> Detección del pico correspondiente al VAM, encuadrado en rojo, con una inyección tipo <i>splitless</i> .....	16
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas obtenidos con un flujo de la fase móvil constante de 4.8mL/min y temperaturas del horno de 60 y 50°C.....	17
<b>Figura 6.</b> Cromatogramas obtenidos con una temperatura de 50°C y con flujos de helio de 5.0 y 5.3mL/min.....	18
<b>Figura 7.</b> Cromatogramas obtenidos calentando 30min en el HS para la señal azul, y 45min para la señal roja.....	19
<b>Figura 8.</b> Cromatograma obtenido introduciendo en el HS un vial vacío, con una temperatura de calentamiento de 120°C.....	19
<b>Figura 9.</b> Cromatograma obtenido a partir de un vial sellado sin muestra calentando en el HS a 90°C durante 30min.....	20
<b>Figura 10.</b> Picos obtenidos a partir de un vial vacío utilizando septums de bolsas diferentes, calentandolos a 90°C durante 30min.....	21
<b>Figura 11.</b> Comparación de los cromatogramas obtenidos a partir de un vial vacío con un septum sin tratamiento (señal roja), y otro calentado durante 1h en una estufa a 150°C (señal azul).....	21
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas obtenidos a partir de una alícuota de VAM disuelto en los diferentes disolventes mencionados.....	23
<b>Figura 13.</b> Calibración por MHE. EL orden de las extracciones corresponde con el tamaño de los picos, siendo el pico más grande (rojo) la primera extracción y el pico azul la última.....	24
<b>Figura 14.</b> Recta en la que se representará el logaritmo neperiano de las áreas frente al número de extracción menos 1.....	24
<b>Figura 15.</b> Recta obtenida a partir del análisis de una muestra de PVOH de elevada viscosidad.....	26

**Abstract**

*In the present work an analytic method is developed for the determination of vinyl acetate in polyvinyl alcohol by HS-GC. The method is based on a multi-extraction in a headspace vial, using the un-dissolved sample followed by a chromatographic analysis.*

*The optimized conditions have been, mainly, the time and the temperature of the heating in the Headspace Sampler as well as the chromatographic separation.*

*Calibration was performed following the same method of multi-extractions, but using the TVT technique.*

**Resumen**

En el presente trabajo se desarrolla un método analítico para la determinación de acetato de vinilo en el alcohol polivinílico por HS-GC. El método se basa en una multiextracción en un vial headspace, utilizando la muestra sin disolver, con un posterior análisis cromatográfico.

Las condiciones que se han optimizado han sido principalmente el tiempo y la temperatura de calentamiento en el *Headspace Sampler*, además de la separación cromatográfica.

La calibración se hizo siguiendo el mismo método de multiextracciones, pero utilizando la técnica TVT.

## 1. Introducción

### 1.1 Descripción de la empresa

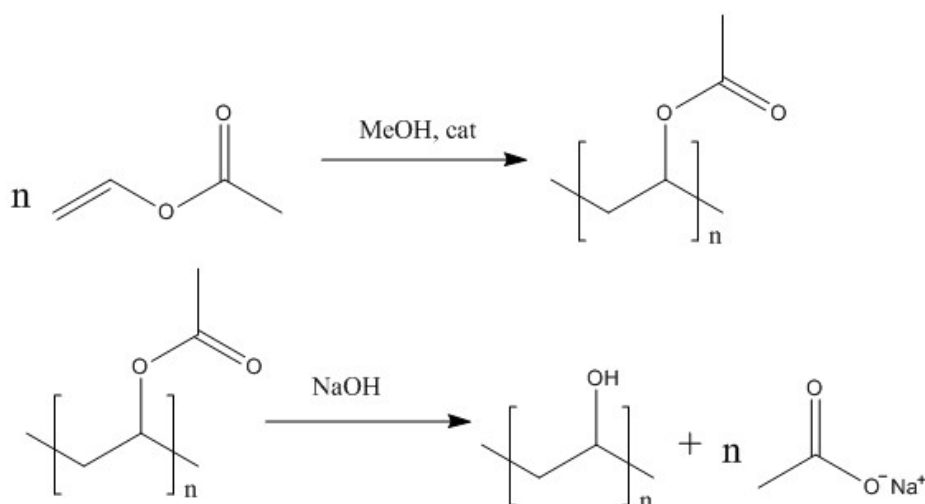
El lugar donde se ha realizado este trabajo de fin de grado es la empresa Sekisui Specialty Chemical Europe S.L., más concretamente en el laboratorio de control de calidad de la fábrica situada en La Canonja (Tarragona).

Esta multinacional de origen japonés, que se dedica a la producción y comercialización de una gran variedad de polímeros sintéticos, compró esta fábrica, productora de alcohol polivinílico, en el año 2009.

La política de la empresa se puede resumir en el siguiente lema: *Through prominence in technology and quality, Sekisui Chemical Group will contribute to improving the lives of the people of the world and the earth's environment, by continuing to open up new frontiers in residential and social infrastructure creation and chemical solutions* [1].

### 1.2 El alcohol polivinílico (PVOH).

El alcohol polivinílico (PVOH) se obtiene a partir de la hidrólisis del poliacetato de vinilo, producido previamente por una reacción de polimerización en cadena con el acetato de vinilo (VAM) como monómero, el metanol (MeOH) como disolvente y con la ayuda de un catalizador, tal como se indica en la reacción 1.



**Reacción 1.** Obtención de PVOH a partir de acetato de vinilo.

El producto final es un sólido blanco-amarillento (dependiendo del tipo), soluble en agua caliente, no tóxico, inodoro y ligeramente ácido.

Todo y que el PVOH se utiliza principalmente en adhesivos, controlando el peso molecular (o la viscosidad, que a efectos prácticos es lo mismo) y el grado de hidrólisis, se obtiene una gama de productos con diversos campos de aplicación, que van desde los ya mencionados adhesivos, hasta el ámbito industrial (siendo ampliamente utilizado en polimerizaciones en emulsión), pasando por aplicaciones más específicas como la utilización en la cimentación de pozos petrolíferos y el recubrimiento de semillas. También se utiliza como aditivo en alimentos, donde se conoce como E1203 [2], utilizado en suplementos alimenticios y en la creación de capsulas y comprimidos farmacéuticos.

Los más de 20 tipos diferentes de PVOH que se fabrican en Sekisui se pueden dividir en tres familias: totalmente hidrolizado (grado de hidrólisis superior a un 98%), parcialmente hidrolizado (grado de hidrólisis entre 87-89%) y un intermedio (con grados de hidrólisis superiores al 90%).

### 1.3 Importancia de la optimización del método.

El estudio se ha realizado ya que cuando el producto final va destinado a aplicaciones en la industria alimenticia, ha de cumplir ciertos requisitos, establecidos en el Reglamento sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos [3]. En este se establece que la máxima concentración de acetato de vinilo que puede contener un polímero que entre en contacto con alimentos es de 12mg de VAM por cada kilogramo de muestra.

### 1.4 Antecedentes.

Anteriormente en la empresa, se habían hecho múltiples pruebas para intentar cuantificar el VAM en el PVOH, todas ellas con HS-GC y con la muestra disuelta en agua.

Los últimos intentos, llevados a cabo por el centro tecnológico que tiene Sekisui en Houston (EEUU) no obtenían ninguna respuesta del equipo correspondiente al VAM.

Se conservaba, también, un procedimiento de hace varios años donde se describía un análisis para esta determinación en cuestión. Las principales desventajas, *a priori*, era que se trataba de una calibración de adiciones estándar, no recomendable para un análisis rutinario, y el análisis cromatográfico se llevaba a cabo con una columna que no se asemejaba en términos de polaridad con la que se dispone actualmente. Además, el método descrito era capaz de detectar cantidades inferiores a 12ppm, pero no de cuantificar.

En la bibliografía no se encontró un ejemplo de esta determinación exactamente, pero sí de otras en las cuales se cuantificaba el monómero residual de diferentes polímeros [4] [5]. En estos últimos, se observó la existencia de una metodología, menos utilizada, pero con notorias ventajas sobre la 'tradicional' (disolver la muestra, analizarla e interpolar/extrapolar en una recta de calibrado). Se trata de la *Multiple Headspace Extraction* (MHE) la cual permite el análisis de muestras, tanto líquidas como sólidas.

## 2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo es el desarrollo y optimización de un método de cromatografía de gases con inyector *headspace* para la detección y cuantificación del acetato de vinilo presente en el polivinil alcohol.

Es indispensable que el método tenga por lo menos un límite de detección y cuantificación igual o inferior a 12ppm, que es la concentración límite para la utilización del PVOH en aplicaciones en la industria alimenticia, pero además es muy importante que sea rápido, ya que el objetivo es que este se convierta en un análisis rutinario.

### 3. Fundamento teórico

#### 3.1 Cromatografía de gases con detector FID.

La cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) es una técnica analítica que permite separar y/o cuantificar compuestos volátiles. Es ampliamente utilizada en el ámbito industrial y académico.

Esta técnica se basa en la separación de los componentes de una muestra volátil, a través de las diferentes interacciones que tienen estos con la columna cromatográfica (fase estacionaria). La elución de los componentes se produce por un flujo de un gas inerte (fase móvil). De esta forma los analitos que interaccionen menos con la fase estacionaria llegarán antes al detector situado al final de la columna, y viceversa. El tiempo que tardan los analitos en llegar al detector se denomina tiempo de retención.

En este trabajo se utilizará helio como fase móvil, o gas portador. Las principales ventajas sobre el nitrógeno y el hidrogeno, que son los otros gases portadores más utilizados son, sobre el primero, la capacidad de poder trabajar con caudales grandes sin perder excesiva resolución y, sobre el segundo, la seguridad, ya que el hidrogeno es altamente explosivo en presencia de aire. Su principal desventaja es el precio, ya que es el gas más caro de los tres.

La columna cromatográfica utilizada es una columna capilar de polaridad media, con un 14% de cianopropil-fenilpolisiloxano y un 86% de dimetilpolisiloxano. En la figura 1 se puede observar la estructura química de la columna.

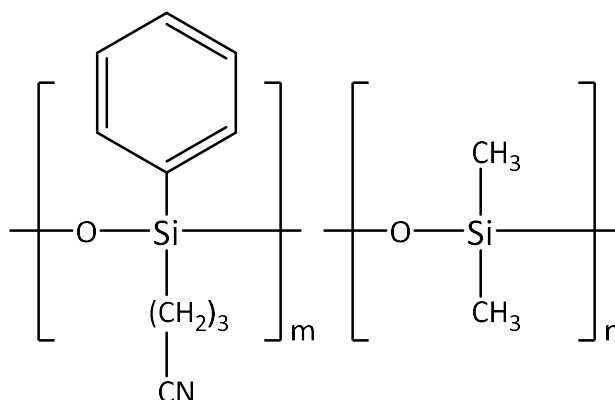


Figura1. Estructura química de la fase estacionaria; un copolisiloxano de polaridad media.

Para la detección de los analitos se dispone de un detector de ionización de llama (*Flameionization detector*, FID), uno de los más utilizados cuando se habla de cromatografía de gases por sus múltiples ventajas; gran sensibilidad, intervalo de linealidad elevado, poco ruido de fondo, fácil de utilizar y mantener.

El funcionamiento de este detector consiste en, con ayuda de una llama de hidrogeno/aire, pirolizar los compuestos orgánicos que llegan desde la columna cromatográfica produciendo iones y electrones. Estas especies son conductoras eléctricas, por lo que al establecer una diferencia de potencial al principio y al final del detector, se genera una corriente. De esta forma, con una calibración, se puede relacionar el valor de la corriente generada con la cantidad de un analito determinado.

### 3.2 Headspace.

La inyección directa en el cromatógrafo de gases tiene el gran inconveniente de estar limitada para muestras gaseosas o líquidas totalmente volátiles. Una muestra compleja necesita un tratamiento previo a la inyección en el cual se extraigan los analitos de interés eliminando los compuestos no volátiles, ya que estos pueden falsear el resultado o causar graves problemas en el equipo, como obstruir el portal de inyección o la columna cromatográfica. Normalmente estos tratamientos consisten en la extracción de los compuestos volátiles con ayuda de un disolvente o en la disolución de la totalidad de la muestra con una posterior precipitación de los compuestos no volátiles. Un típico ejemplo es la determinación de los compuestos de bajo peso molecular (monómero, disolventes, productos secundarios, etc.) de una muestra de polímero.

Esta metodología presenta varios problemas como son: la dilución de los analitos, clave en el análisis de trazas, el tiempo (disolver un polímero puede tardar varias horas o incluso días), el disolvente (elección, cantidad, toxicidad, posición y forma del pico en el cromatograma, etc.) y la disminución de la reproducibilidad por la excesiva manipulación de la muestra.

El muestreo por espacio de cabeza (*Headspace sampling*, HS) permite la inyección de los compuestos volátiles de una muestra, calentándola dentro de un vial sellado (figura 2.1) e inyectando los gases que esta genera en el cromatógrafo, dejando así los compuestos no volátiles en el fondo del vial (figura 2.2). Como se observa en la figura 2.1, al calentar la muestra se forman dos fases dentro del vial; una fase gaseosa llamada *headspace* y otra llamada *sample phase*. Si se calienta durante suficiente tiempo a una elevada temperatura, estas dos fases entran en el equilibrio. Al analizar componentes volátiles, es decir, compuestos con una elevada presión de vapor, el equilibrio de estos estará casi totalmente desplazado hacia la fase gaseosa, al contrario de lo que pasa con los componentes no volátiles.

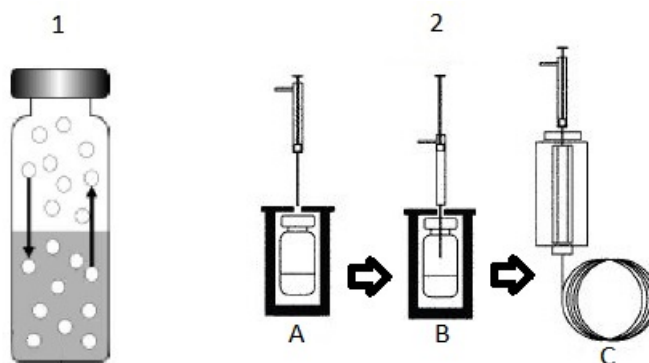


Figura 2.1. Esquema de un vial al ser calentado, en el cual se forman el *headspace* y la *sample phase*.

Figura 2.1. Inyección de los analitos en el cromatógrafo. A: calentamiento del vial HS. B: la aguja del cromatógrafo toma una alícuota del *headspace* del vial. C: inyección en la columna cromatográfica.

En el vial de inyección por *headspace* se pueden introducir tanto muestras líquidas como sólidas, disueltas o sin disolver. Esto último le otorga un importante *plus* a la técnica, ya que permite la inyección de los componentes volátiles de un sólido sin una manipulación previa ni una dilución del mismo.

### 3.3 Multiple Headspace Extraction(MHE).

La base de esta metodología reside en el equilibrio entre el *headspace* y la muestra. Cuando el vial alcanza el equilibrio, después de haberlo calentado a una temperatura y durante un tiempo determinado, la concentración de los compuestos volátiles en cada fase permanece constante (concentración *headspace* >> concentración muestra). Al hacerse el análisis cromatográfico y extraerse una alícuota, el sistema avanza a un nuevo equilibrio. Por cada extracción la concentración en el *headspace* va bajando, al igual que en la muestra, disminuyendo así la respuesta del equipo (el área del pico).

Si se hiciesen infinitas extracciones se eliminarían todos los componentes volátiles del vial. En este caso, la suma de cada una de las áreas (A) de un determinado pico sería proporcional a la cantidad del analito correspondiente ( $W_0$ ) presente en la muestra inicial (ec.1 y ec.2).

$$\sum_{i=1}^{i \rightarrow \infty} A_i = A_1 + A_2 + \dots + A_i \quad (1)$$

$$W_0 \propto \sum_{i=1}^{i \rightarrow \infty} A_i \quad (2)$$

Como es lógico, no es factible hacer infinitas extracciones del vial *headspace*.

Experimentalmente se ha comprobado que la disminución de la señal en cada extracción es exponencial. A partir de esta observación y el siguiente desarrollo matemático [6], se encuentra una sencilla ecuación para calcular la suma de las áreas con un número finito de extracciones.

Así, primero se estudia el caso de una extracción continua, en donde se supone un mecanismo cinético de primer orden, como muestra la ec.3, en donde se relaciona la variación de la concentración (C) con el tiempo (t):

$$-\frac{dC}{dt} = qC \quad (3)$$

La constante q indica como de rápido se hace la extracción.

Integrando la ec.3, se obtiene la relación exponencial de la concentración con el tiempo y una constante q, como muestra la ec.4, en donde  $C_0$  es la concentración inicial en el *headspace*:

$$C = C_0 \cdot e^{-qt} \quad (4)$$

En el caso del análisis MHE, la extracción no es continua, sino por etapas y la respuesta obtenida por el cromatógrafo es el área, que es proporcional a la concentración. De esta forma, la ec.4 se puede expresar en el caso estudiado como la ec.5, en donde i es el número de extracciones:

$$A_i = A_1 \cdot e^{-q(i-1)} \quad (5)$$

En el exponente se sustituye el tiempo por (i-1) ya que la primera extracción ( $A_1$ ) se lleva a cabo a tiempo cero.

Así, substituyendo la ec.5 en la ec.1 y extrayendo factor común, se obtiene:

$$\sum_{i=1}^{i \rightarrow \infty} A_i = A_1 [1 + e^{-q} + e^{-2q} + \dots + e^{-(i-1)q}] \quad (6)$$

Esta progresión geométrica decreciente converge en la siguiente expresión:

$$\sum_{i=1}^{i \rightarrow \infty} A_i = \frac{A_1}{1 - e^{-q}} \quad (7)$$

De esta forma, para obtener el valor del área total de un pico determinado, no se necesitan hacer infinitas extracciones, simplemente se necesita el área de la primera extracción, y la constante  $q$ .

El valor de  $q$  se consigue a partir de la recta descrita en la ec.8, obtenida al hacerse el logaritmo neperiano de la ec.5:

$$\ln(A_i) = \ln(A_1) - q(i - 1) \quad (8)$$

De esta forma, al representarse el  $\ln(A_i)$  sobre  $(i-1)$  se obtiene una recta con una pendiente con valor igual a  $q$  negativo.

Es importante mencionar que al trabajar con la suma total del área, es decir, con la cantidad total de analito presente en la muestra, se elimina el efecto matriz. De esta forma, para encontrar el factor de respuesta (constante que relaciona el área con la cantidad de analito) se puede realizar una calibración que conste de, simplemente, preparar un patrón, puede incluir patrón interno o no, y realizar el análisis MHE con una cantidad perfectamente conocida del analito de interés.

#### **4. Parte experimental**

##### **4.1 Disolventes y patrón.**

Los disolventes utilizados en la experimentación y el patrón están listados a continuación, y en la tabla 1 se puede observar su toxicidad y las precauciones que hay que tomar al manipularlos.

- Agua ultra pura (H<sub>2</sub>O Mili-Q): resistividad > 18.2 MΩ·cm (concentración iónica <1 µg/L) producida por un sistema MilliporeDirect® Q3 UV [7].
- Acetonitrilo (ACN)supergradiente para UHPLC de PanReac[8].
- Metanol (MeOH) para GC-ECD y GC-FID de SupraSolv®[9].
- Etanol absoluto (EtOH) para análisis de PanReac[8].
- Acetato de Vinilo (VAM) de CelaneseLtd[10].

Tabla 1. Precauciones y peligros de los compuestos utilizados durante la experimentación.

Compuesto (pureza)	Identificación de los peligros	Manipulación
H <sub>2</sub> O Mili-Q	-	-
CH <sub>3</sub> CN (ACN, 99.9%)	Muy inflamable. Toxico en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. Provoca irritación ocular grave.	Gafas de seguridad. Campana extractora. Guantes.
CH <sub>3</sub> OH (MeOH, 99.8%)	Muy inflamable. Toxico en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación. Provoca daños en los órganos.	Gafas de seguridad. Campana extractora. Guantes.
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH (EtOH, 99.8%)	Muy inflamable	Gafas de seguridad. Campana extractora. Guantes.
CH <sub>3</sub> COOCHCH <sub>2</sub> (VAM, 99.9%)	Extremadamente inflamable. Posible peligro de cáncer.	Gafas de seguridad. Campana extractora. Guantes.

#### 4.2 Equipos y software

- Balanza analítica modelo BP 301S de Sartorius[11].
- Viales de Headspace de 20mL de Agilent Technologies.
- Tapones de aluminio y septum de PTFE/silicona de 20mm de diámetro.
- Sellador y destaponador de aluminio.
- Sistema cromatográfico
  - *Headspace Sampler* G1888 de Agilent Technologies[12].
  - Cromatógrafo de Gases 6890 de Agilent Technologies con detector FID[13].
  - Columna capilar Varian CP-Sil 19 CB (25m x 0.53mm x 2,0µm). Polaridad media (14% cianopropil-fenil / 86% dimetilpolisiloxano)[14].
  - Helio como fase móvil.
  - Detector de ionización de llama de aire/hidrogeno.
  - Adquisición de datos con software *Agilent Chem Station*.
- Procesamiento de datos con *Microsoft Excel*.

#### 4.3 Tratamiento de muestra y gestión de residuos

Al utilizar la muestra sólida, el tratamiento de esta es nulo. Simplemente hay que homogeneizarla y pesarla.

Con la metodología utilizada se generan dos tipos de residuos: sólidos (PVOH) y líquidos (VAM y disolventes orgánicos). Los residuos sólidos, se introducen en un saco específico para cada tipo de producto, el cual posteriormente se lleva a planta para la recuperación del mismo. Los residuos líquidos en cambio, previo tratamiento en la Planta Depuradora de Ercros, son vertidos a través de emisario submarino.

#### 4.4 Cromatografía y metodología.

Todas las condiciones y parámetros optimizados de la cromatografía se encuentran en el siguiente apartado ya que para explicar un experimento (una prueba en el cromatógrafo), se tienen que analizar los datos del experimento previo.

Como se ha descrito en los antecedentes (apartado 1.4), se podía trabajar con la muestra disuelta y una calibración 'tradicional', o con la muestra sólida con el método MHE.

Valorando las ventajas y desventajas de las dos opciones, se optó por intentar una determinación por MHE. Tres son las razones principales:

1. Como ya se ha comentado antes, en general, el no tener que disolver la muestra conlleva no diluir el analito de interés, por lo que la respuesta del mismo será mayor, lo que da lugar a un límite de detección más elevado. Además, en este caso en particular, el tener que hacer la disolución acarrea un gran gasto de tiempo, ya que el PVOH solo es soluble en agua caliente, por lo que hay que calentar la mezcla a reflujo, y es muy viscoso, por lo que el hacer disoluciones muy concentradas es difícil.
2. El método que se conservaba en el laboratorio, describía una calibración por adiciones estándar ya que el efecto matriz era grande, seguramente debido a la gran viscosidad de la disolución. Por lo general, en los laboratorios de Sekisui se intenta evitar trabajar con este tipo de calibración, ya que conlleva una gran inversión de tiempo hacer cada análisis. El trabajar con MHE permite hacer una calibración eliminando el efecto matriz. De esta forma, el análisis finalmente consistiría en hacer un número determinado de extracciones en un mismo vial headspace. Aceptando el error que se comete, se puede simplificar el análisis haciendo únicamente dos extracciones.
3. La determinación del VAM en el PVOH se ha intentado numerosas ocasiones sin éxito. Para el laboratorio esta es una buena oportunidad de introducir una nueva forma de trabajar, ya que nunca se han analizado muestra sólidas sin disolver, y nunca se ha utilizado la metodología de las multiextracciones.

### 5. Discusión de resultados

#### 5.1. Condiciones iniciales e identificación del pico.

En un principio, al no disponer de ningún análisis previo de este tipo en el laboratorio, se empezó la experimentación con las condiciones utilizadas en un método de proceso ya validado. Estas condiciones están especificadas en las tablas 2 y 3. En este método se disuelve la muestra en agua y las concentraciones de los analitos estudiados son de 2 órdenes superiores a los esperados para el VAM.

Tabla 2. Condiciones iniciales del *Headspace Sampler*.

Temperaturas (°C)		Tiempos (min)	
<b>Horno</b>	90	<b>Calentamiento</b>	60
<b>Loop</b>	120	<b>Presurización</b>	2.00
<b>Transfer Line</b>	150	<b>Inyección</b>	0.50

Tabla 3. Condiciones iniciales del cromatógrafo de gases.

<b>Volumen de inyección</b>	1 $\mu$ L
<b>Tipo de inyección</b>	Split 17:1
<b>Flujo</b>	4.8mL/min durante 10min
<b>Temperatura</b>	40°C durante 10min
<b>Detector</b>	Temperatura 250°C
	Flujo H <sub>2</sub> 35mL/min
	Flujo Aire 350 mL/min

De los parámetros del HS, dos son importantísimos a la hora de optimizar un método de estas características; el tiempo y la temperatura a la cual calientas la muestra. Los otros parámetros no cambian, o no deberían cambiar, los resultados en el cromatograma. Eso sí, hay que procurar que la temperatura del *transfer line* sea lo suficientemente alta como para que no condense agua de las muestras acuosas, lo cual puede dar lugar a una baja reproducibilidad en las respuestas, y que el tiempo de inyección no sea excesivamente alto, ya que en algunos casos puede provocar picos con largas colas.

En cromatografía de gases, cuando no se dispone de diferentes fases móviles y estacionarias, como es el caso, los parámetros a tener en cuenta para mejorar la separación cromatográfica son, principalmente, el flujo de gas portador, y la temperatura en la columna.

Al disponerse de un inyector *split/splitless*, el tipo de inyección y la relación de *split* son condiciones que pueden servir para aumentar la sensibilidad o eliminar colas.

Cabe destacar que como muestra inicial para todas las pruebas se utilizó un tipo E325-LA (elevada viscosidad), ya que es uno de los más producidos en la actualidad por la empresa.

Para la identificación del pico correspondiente al VAM, se introdujeron 5 $\mu$ L de VAM puro en un vial, y se comparó el cromatograma obtenido (señal roja) con uno a partir de únicamente 1g de muestra (señal azul).

Al superponer los dos cromatogramas, como muestra la figura 3, se observó que el pico del VAM (6.45min) no aparecía en el cromatograma de la muestra.

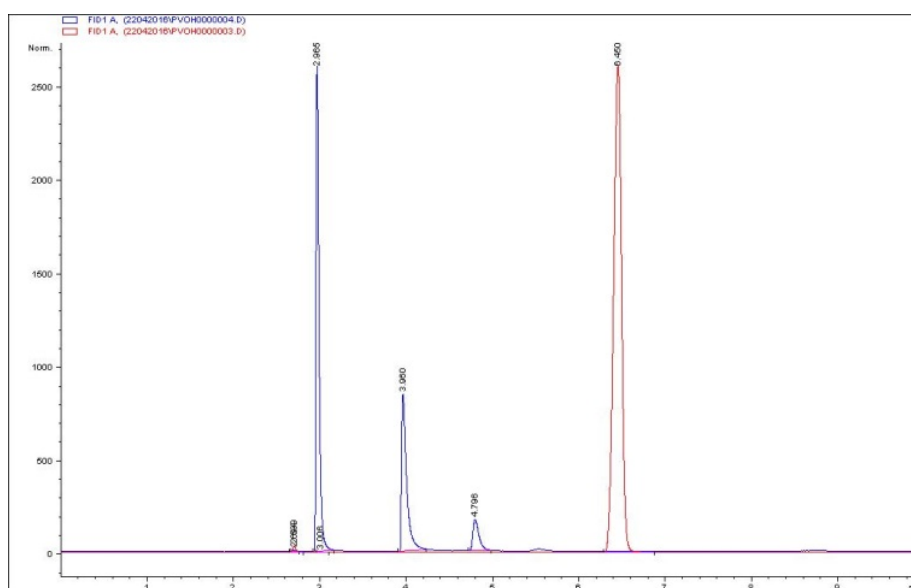


Figura 3. Identificación del pico correspondiente al VAM (señal roja). Las condiciones del análisis están expuestas en las tablas 2 y 3.

## 5.2 Detección del pico.

El primer parámetro que se cambió fue el tipo de inyección. Inicialmente la inyección era del tipo *split* con una división de flujo de 17 a 1; es decir, de la alícuota que se tomaba del *headspace*, un 5.5% se introducía en la columna cromatográfica y el resto se expulsaba fuera del sistema.

Cambiando el tipo de inyección a una tipo *splitless*, el 100% de la alícuota es introducida en la columna, por lo que se consigue aumentar considerablemente la sensibilidad.

De esta forma, se consiguió la detección de un pequeño pico (6.60min) con un área inferior a 1, centrado en la zona del VAM, tal y como se indica en la figura 4.

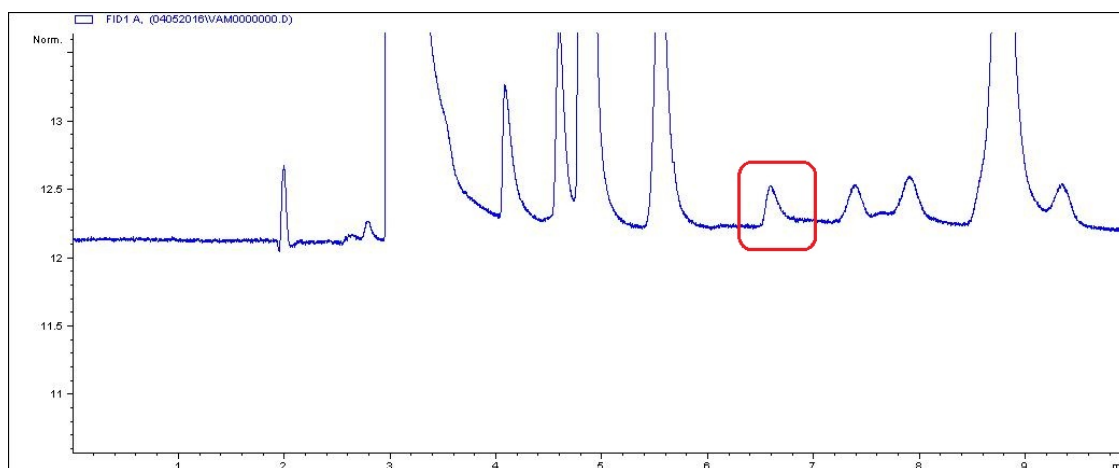


Figura4. Detección del pico correspondiente al VAM, encuadrado en rojo, con una inyección tipo *splitless*.

Es importante mencionar en este punto que, con la finalidad de obtener la mayor sensibilidad posible, y al disponerse de viales de HS de 20 y 10 mL, se optó por usar los segundos, en donde el *headspace* será menor y, por lo tanto, el analito se encontrará más concentrado.

La cantidad de muestra también puede aumentar la sensibilidad, pero se decidió no utilizar más de 1gr para no crear una sobrepresión dentro del vial.

Al no estar las condiciones del HS optimizadas, cabe la posibilidad que se estuviese trabajando en condiciones de no equilibrio en la prueba anterior. Con tal de aumentar el área del pico, se propuso que el siguiente paso de la experimentación fuese la optimización de estas condiciones.

Cuando se aumentó la temperatura en el HS, el pico del VAM aumento su área notablemente. Pero no fue el único. El aumento de la respuesta en el pico centrado en los 3.00min, que se le atribuye al metanol, impureza volátil mayoritaria en el producto final, vino acompañada por un incremento de la cola del mismo, que ya se le observa en menor medida en la figura 4. El solapamiento de la cola con el pico de interés es importante, por lo que antes de optimizar las condiciones del HS se optó por mejorar la separación cromatográfica.

## 5.3 Optimización de la separación cromatográfica.

Para optimizar las condiciones cromatográficas se tendrán en cuenta dos factores: la simetría del pico y el solapamiento de la cola del pico del metanol con el pico de interés. Los valores que se proporcionan referentes a la simetría siguen el siguiente criterio: a los picos totalmente simétricos se le asigna el valor 1 y a los totalmente asimétricos el valor 0.

La señal observada en la figura 4 tenía una simetría inferior a 0.6 y además, se observaba un desplazamiento en la línea base a cada lado del pico.

El primer parámetro que se cambió fue la temperatura del horno, analizándose muestras a 50 y 60°C. Al aumentar la temperatura, los tiempos de retención de los analitos deberían bajar y los picos, en teoría, se deberían estrechar aumentando así la simetría.

En la figura 5 se pueden observar los cromatogramas obtenidos, en donde el pico del VAM se encuentra encuadrado. Las simetrías que se obtuvieron fueron 0.765 y 0.656 para los análisis a 60°C y 50°C respectivamente.

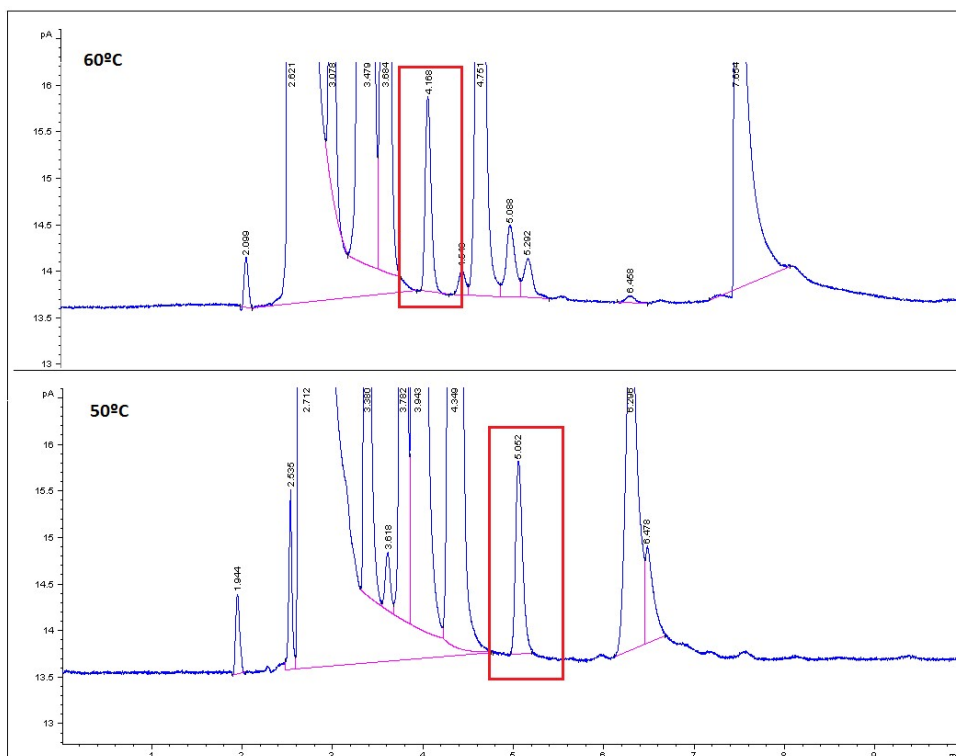


Figura 5. Cromatogramas obtenidos con un flujo de la fase móvil constante de 4.8mL/min y temperaturas del horno de 60 y 50°C.

De esta forma se mejoró la simetría y se eliminó el solapamiento con otros picos. El siguiente paso fue variar el flujo de la fase móvil. En la figura 7 se muestran las pruebas realizadas manteniendo la temperatura del horno a 50°C y cambiando el flujo a 5.0 y 5.3mL/min. No se incluyen en la figura los cromatogramas obtenidos con el horno a 60°C ya que la separación cromatográfica no era buena, y por lo tanto, estas condiciones quedaron descartadas.

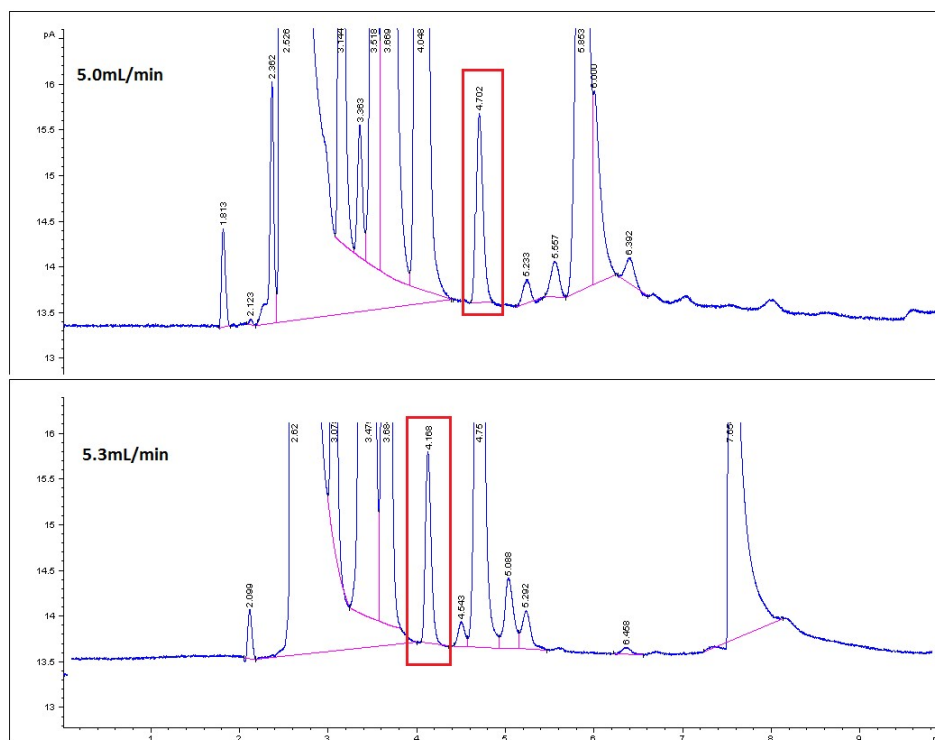


Figura 6. Cromatogramas obtenidos con una temperatura de 50°C y con flujos de helio de 5.0 y 5.3 mL/min.

Las simetrías obtenidas eran de 0.664 para el flujo de 5.0 mL/min, y 0.783 para el de 5.3 mL/min.

Entre todos los cromatogramas con una buena separación cromatográfica, es decir, sin solapamientos con el pico de interés, las condiciones que presentan una mejor simetría son con una temperatura del horno de 50°C y un flujo de 5.3 mL/min.

#### 5.4 SeptumBlank.

Mientras se optimizaba la separación cromatográfica se observó que había una baja reproducibilidad; análisis continuos de la misma muestra daban resultados con diferencias significativas.

Además, cuando se hicieron las primeras pruebas para la optimización de las condiciones del HS, algunos de los resultados no correspondían con los fundamentos teóricos de la técnica. Por ejemplo, en la figura 8 se pueden observar dos cromatogramas superpuestos; el azul corresponde a un análisis calentando la muestra durante 30 min y el rojo, cuya área es menor, tiene un tiempo de calentamiento 15 min mayor. Teóricamente, al aumentar el tiempo de calentamiento el área no debería disminuir, sino aumentar o permanecer constante, en el caso que las fases estén en equilibrio.

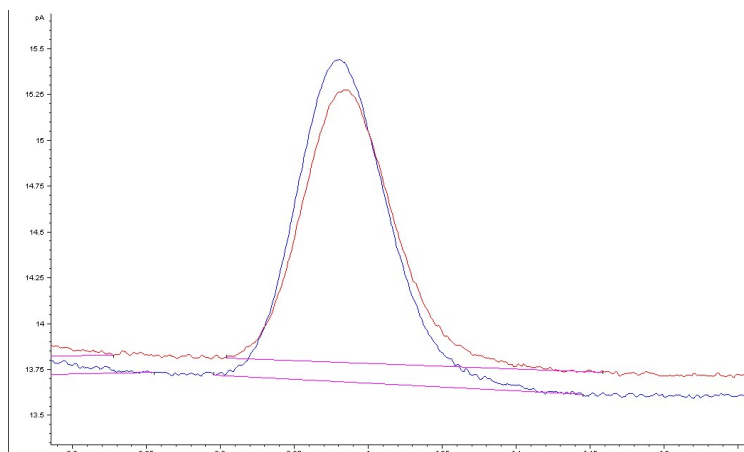


Figura 7. Cromatogramas obtenidos calentando 30min en el HS para la señal azul, y 45min para la señal roja.

En un principio se pensó que la fuente del error era el mal estado de los viales utilizados, que ya estaban llegando al final de su vida útil; teoría que fue descartada al observarse los mismos errores con viales totalmente nuevos.

Seguidamente se hizo el análisis de un vial sellado sin muestra. La figura 9 muestra el cromatograma obtenido. Como se puede observar, aparecen varios picos, uno de ellos centrado en el tiempo de retención del VAM (4.66min). Normalmente, el área de estos picos es despreciable en comparación con las áreas de los analitos que se suelen analizar. En el caso estudiado, el área del pico es del mismo orden que las áreas que se obtenían introduciendo muestra dentro del vial. Es decir, nuestros resultados se veían afectados significativamente por este pico.

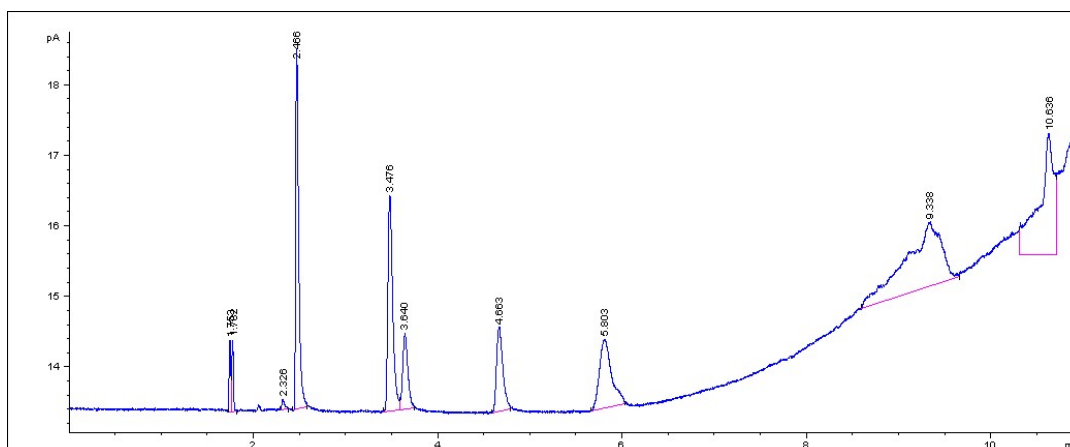


Figura 8. Cromatograma obtenido introduciendo en el HS un vial vacío, con una temperatura de calentamiento de 120°C.

El incremento progresivo de la línea base a partir del min. 6 es porque se incluyó una rampa de temperatura con un incremento de 20°C/min para limpiar la columna y evitar posibles fuentes de error.

Descartados los viales, la raíz del problema debía estar en el septum o en otra fuente de contaminación desconocida.

Si se tratase de siloxanos u otros compuestos liberados por el septum de PTFE/silicona al trabajar a altas temperaturas, se podría; o eliminar el pico bajando la temperatura o separar los picos cambiando las condiciones de la cromatografía.



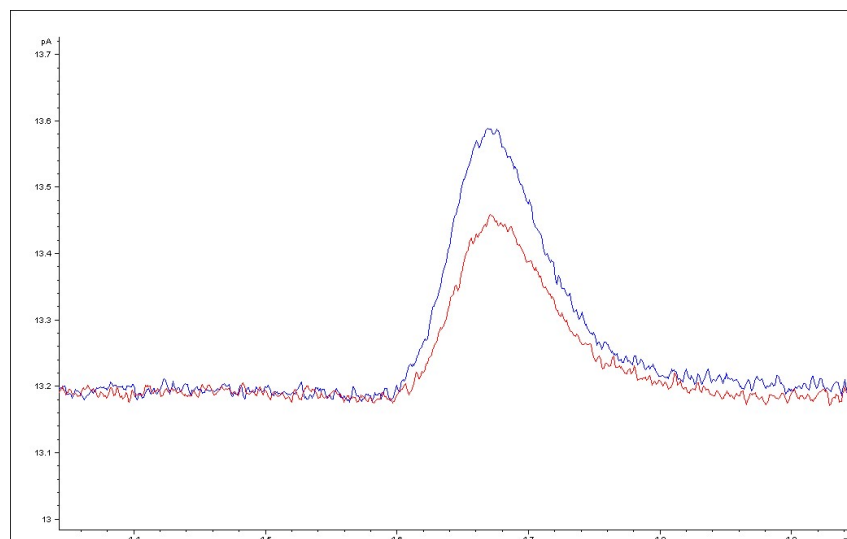


Figura 10. Picos obtenidos a partir de un vial vacío utilizando septums de bolsas diferentes, calentandolos a 90°C durante 30min.

La solución más lógica es cambiar el tipo de septum utilizado. En la página web del proveedor, se encontró un artículo [15] en donde se comparaba el blanco de diferentes septums, entre los cuales estaba el de PTFE/silicona utilizado, con un nuevo tipo de septums llamados *highperformanceseppta*. Estos últimos dan un blanco mucho más limpio.

Lamentablemente no se pudo disponer de estos septums durante la experimentación ya que tardaban mucho tiempo en llegar.

Al ser los septums estables hasta los 200°C y dar señal a temperaturas mucho más bajas, se pensó en introducir uno en una estufa a 150°C, y que así se eliminase todo aquel compuesto que daba señal en la zona del VAM dejando los septums en buen estado para su posterior utilización. Los resultados se muestran en la figura 12, en donde se puede observar que el cromatograma azul, que corresponde al septum que se introdujo en la estufa durante 1h, no contiene el pico que estaba causando los resultados incoherentes, aunque se puede intuir.

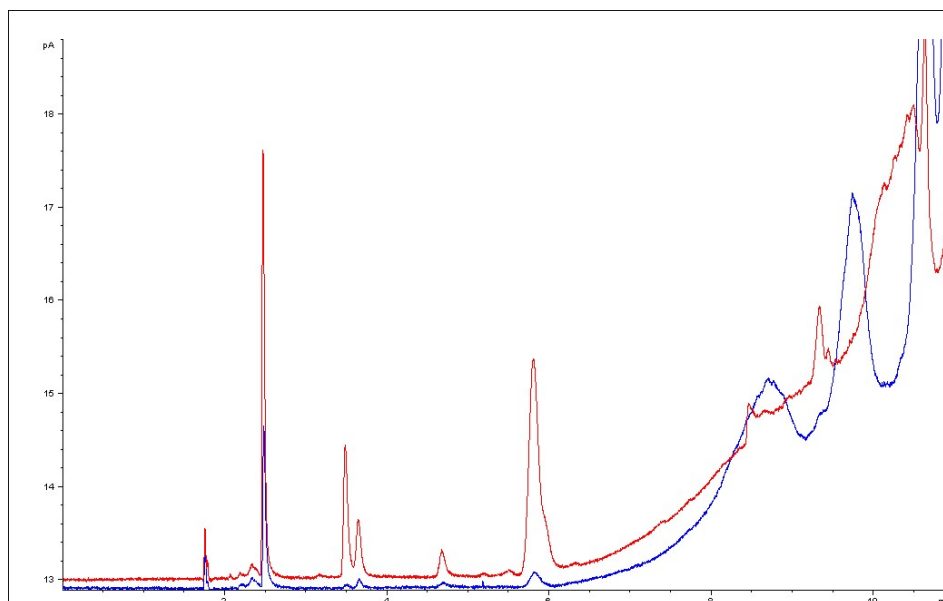


Figura 11. Comparación de los cromatogramas obtenidos a partir de un vial vacío con un septum sin tratamiento (señal roja), y otro calentado durante 1h en una estufa a 150°C (señal azul).

De esta forma, de aquí adelante, todo los septums utilizados estuvieron, como mínimo, 2h en una estufa a 150°C (aumentando el tiempo a 2h la línea base queda totalmente plana en la zona donde da señal el VAM). Con este tiempo de calentamiento, el septum pierde un 0,2% de su peso.

### 5.5 Optimización de las condiciones del HS.

La optimización de la condiciones del HS se basa en buscar un tiempo de calentamiento a una temperatura en donde las dos fases dentro del vial estén en equilibrio.

Al ser uno de los objetivos del trabajo desarrollar un método de análisis rápido, se buscará el tiempo mínimo posible de calentamiento.

De esta forma, se diseña un experimento en donde se calienta un gramo de muestra durante 30min a diferentes temperaturas. En teoría, al ir aumentando la temperatura el área de los picos debería ir creciendo. Los datos obtenidos están reflejados en la tabla 4 en donde se puede observar el aumento de las áreas hasta llegar a los 130°C. Seguidamente, al aumentarse la temperatura 10°C el área descende. Este descenso vino acompañado de un cambio de color en la muestra, que después de calentarse a 140°C adquirió un color más amarillento.

Tabla 4. Áreas obtenidas al calentar 1gr de muestra durante 30min a diferentes temperaturas en el HS.

Temperatura (°C)	Área
90	0.75
120	1.09
130	1.56
140	1.21

Interpretando los datos obtenidos, se supuso que 130°C era la temperatura límite a la que se podía calentar la muestra y que a temperaturas mayores esta sufría reacciones secundarias las cuales disminuían la concentración de VAM y provocaban un cambio de color.

El siguiente paso fue optimizar el tiempo de calentamiento. Así, se calentó un gramo de muestra a 130°C durante 45min y 1h. Las áreas obtenidas fueron 2.06 y 2.11 respectivamente, por lo que se supuso que calentando 45min la muestra ya se encontraba en equilibrio.

### 5.6 Calibración

Lo ideal en la calibración, es que la cantidad de patrón que se utilice sea parecida a la cantidad presente en las muestras. En este caso, al buscar concentraciones tan bajas, hay que diluir el VAM.

Se probaron 4 disolventes distintos: acetonitrilo, metanol, etanol y agua.

Las condiciones dentro del vial en este caso no son las convencionales, ya que una vez se calienta ya no hay dos fases, sino una. Esta técnica se llama *Total Vaporization Technique* (TVT). Para la calibración se pueden cambiar las condiciones del HS, pero no las de la cromatografía.

En este caso, al no haber matriz sólida, no se necesita un tiempo largo para equilibrar la muestra. Simplemente se necesita que la alícuota que se introduce en el vial se evapore totalmente. En nuestro caso, simplemente se redujo el tiempo de calentamiento de 45min a 20min, en comparación con las condiciones utilizadas para el análisis de muestras.

Así, se hicieron soluciones de aproximadamente 300ppm de VAM en los disolventes mencionados anteriormente. Seguidamente, una alícuota de 5µL de cada una de las soluciones se introdujo en un vial distinto. Al hacerse el correspondiente análisis cromatográfico, se obtuvieron los cromatogramas de la figura 13.

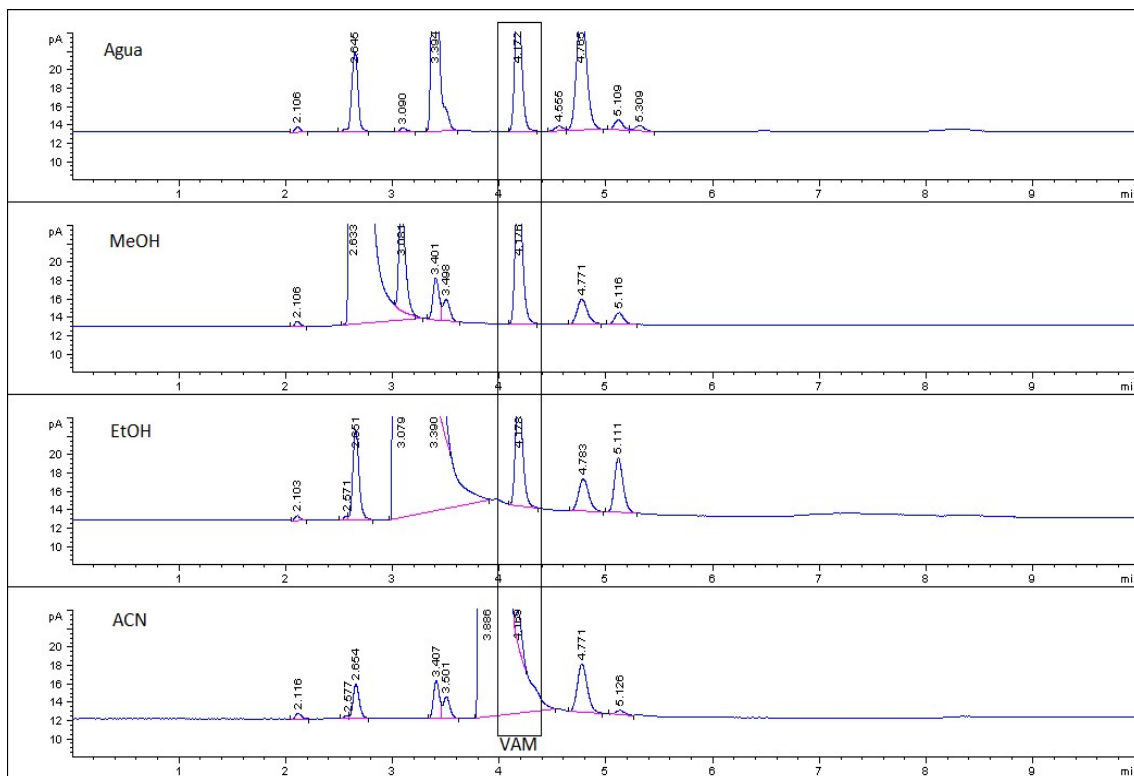


Figura 12. Cromatogramas obtenidos a partir de una alícuota de VAM disuelto en los diferentes disolventes mencionados.

El ACN quedó automáticamente descartado ya que los picos del disolvente y el analito se solapaban. De los otros tres, el agua y el MeOH eran los que ofrecían las mejores separaciones cromatográficas.

Finalmente se seleccionó el agua, que no es tóxica y es menos volátil que el MeOH, lo que ayuda a la hora de manipularla. El único inconveniente del agua, *a priori*, es la baja solubilidad del VAM en ella (2.5g/L a 20°C [10]), pero para los niveles en los que se trabajara es suficiente.

Para la calibración, se hizo una solución de 172,71ppm de VAM en H<sub>2</sub>O y se introdujo una alícuota de 0.0019gr en un vial headspace de 10mL, lo que equivale a  $3.28 \cdot 10^{-7}$ gr de VAM. La calibración MHE consta, en este caso, de 4 puntos. La disminución exponencial del pico se puede observar en la figura 14.

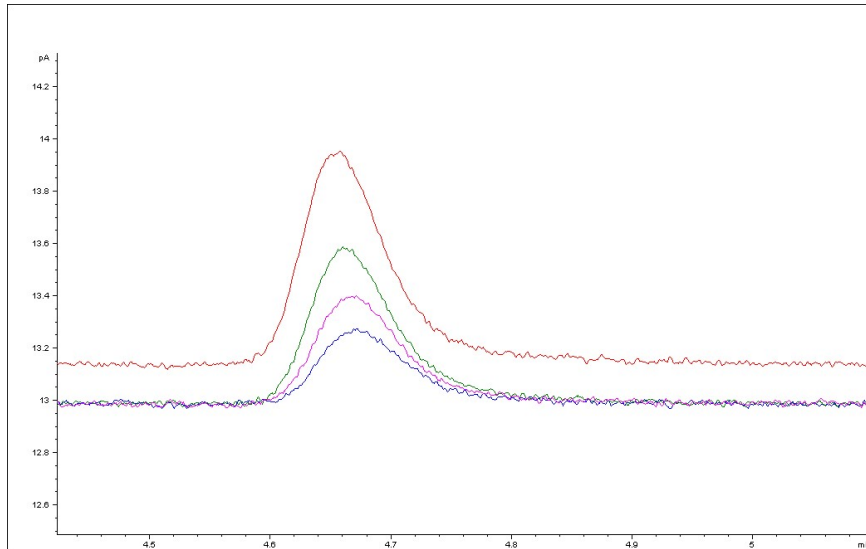


Figura 13. Calibración por MHE. EL orden de las extracciones corresponde con el tamaño de los picos, siendo el pico mas grande (rojo) la primera extracción y el pico azul la última.

Los datos de las áreas están expresados en la tabla 5, en donde se incluyen también los datos necesarios para la construcción de la recta (Figura 15) por la que se obtendrá el valor de la constante q.

Tabla 5. Datos necesarios para la calibración.

Nº de extracción (i)	Área del pico (A)	x = (i-1)	y = ln (A)
1	3,82447	0	1,3414
2	2,85116	1	1,0477
3	1,96668	2	0,6763
4	1,33939	3	0,2922

En la figura 15 se encuentra la recta representada con la ecuación obtenida y el coeficiente de correlación de la misma. Tal y como figura en la ec. 8 del apartado 3.3, el valor absoluto de la pendiente de esta recta (0.2905) corresponde a la constante q y la ordenada al origen es el logaritmo neperiano de  $A_1$ .

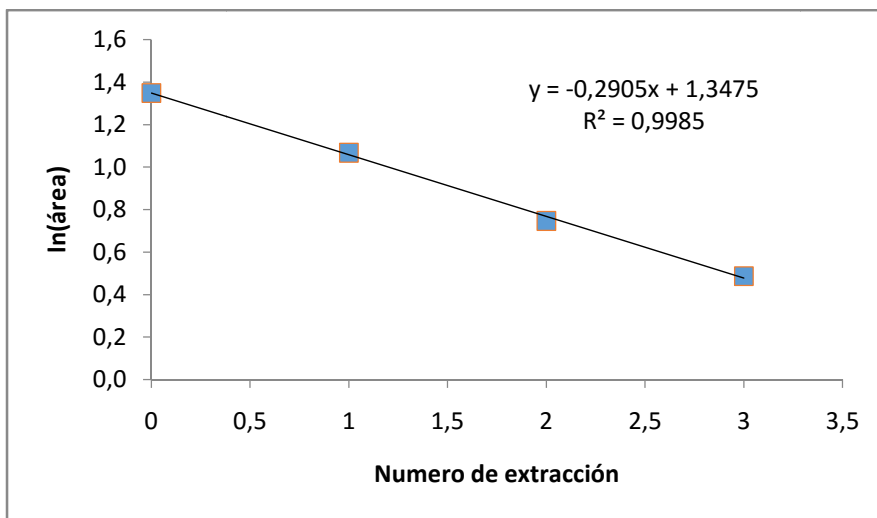


Figura 14. Recta en la que se representa el logaritmo neperiano de las áreas frente al número de extracción menos 1.

Con los valores de  $A_1$  y  $q$  obtenidos, para encontrar el sumatorio de las áreas simplemente habría que aplicar la ec. 7.

El resultado de aplicar esta ecuación da como resultado un área total de 15,26. Sabiendo la cantidad exacta de VAM en el vial, se obtiene un factor de respuesta de  $2.15 \cdot 10^{-8}$  gr de VAM por unidad de área.

A esta relación gramos/señal se le añade, además, un factor de corrección para compensar el hecho que al analizar muestras la fase *headspace* tiene un volumen menor que en el patrón.

En el patrón, el volumen que ocupa la fase gaseosa donde se encuentra el VAM es la totalidad del vial; en nuestro caso 11.9mL. Al analizar muestras, los gases generados se concentran en un volumen inferior, igual al volumen total menos el volumen de los compuestos no volátiles de la muestra. El volumen medio que ocupa el gramo de muestra que se utiliza para los análisis es de 1.49mL.

De esta forma, únicamente en la calibración, a la ec.7 se le añade el factor de corrección obteniendo la siguiente expresión (ec.9):

$$\sum_{i=1}^{\infty} A_i = \frac{A_1}{1-e^{-q}} \cdot \frac{V_{vial}}{V_{vial}-V_{muestra}} = \frac{A_1}{1-e^{-q}} \cdot 1.14 \quad (9)$$

El factor de respuesta corregido es  $2.46 \cdot 10^{-8}$  gr de VAM por unidad de área.

### 5.7 Análisis de muestras.

Finalmente, las condiciones para el análisis de las muestra son las expuestas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones optimizadas para la determinación de VAM en PVOH por HS-GC.

Condiciones del <i>Headspace Sampler</i>		
Temperaturas (°C)	Horno	130
	Loop	120
	Trans. Line	150
Tiempos (min)	Calentamiento	45
	Presurización	2.00
	Inyección	0.50
Condiciones de la cromatografía de gases		
Volumen de inyección	1µL	
Tipo de inyección	Splitless	
Flujo	5.3mL/min durante 11min	
Temperatura	50°C durante 6min Rampa de 20°C/min hasta 150°C	
Detector	Flujo H <sub>2</sub> 35mL/min Temperatura 250°C Flujo Aire 350 mL/min	

Así, el análisis simplemente consiste en pesar un gramo de muestra y introducirlo dentro de un vial HS de 10mL.

Se analizaron 3 muestras: una de elevada, otra de media y otra de baja viscosidad.

Los resultados para la muestra de elevada viscosidad, con la cual se han hecho todas las pruebas de optimización, se reflejan en el figura 16, en donde se grafica el logaritmo natural del área respecto el numero de extracción. También se incluye la formula de la recta obtenida y la constante de correlación, la cual da una idea de la linealidad de los resultados.

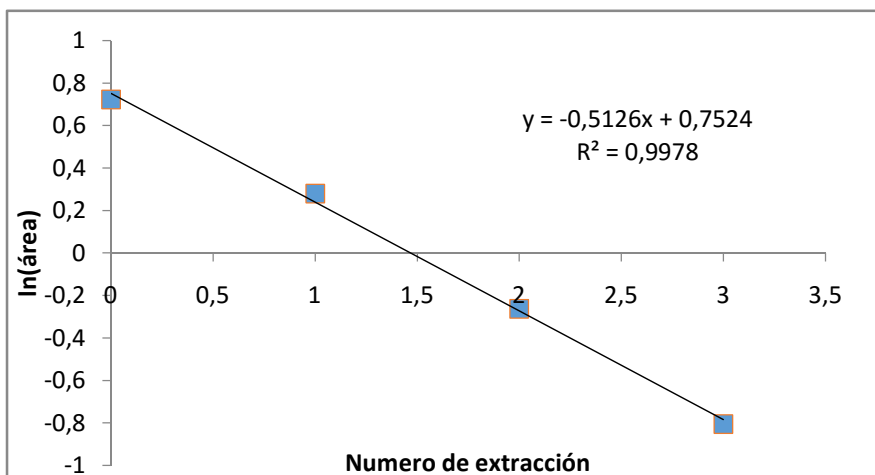


Figura 15. Recta obtenida a partir del análisis de una muestra de PVOH de elevada viscosidad.

A partir de la ecuación de la recta obtenida (ec.8) y la ec.7, se obtiene el área total, que en este caso es 5.29.

Al multiplicar el valor obtenido por el factor de respuesta encontrado en la calibración, y teniendo en cuenta que en este análisis se peso exactamente 1.0026gr de muestra, la concentración encontrada es de 129.7ppb de VAM.

De la misma forma, la muestra de viscosidad intermedia dio como resultado 222.0ppb y la de viscosidad baja 119.6ppb de VAM.

Con los resultados obtenidos se valoró la posibilidad de acortar el análisis y hacer simplemente dos pinchazos. Obviamente se cometerá un tanto por ciento de error, pero si este es pequeño, se puede asumir.

El cálculo con dos pinchazos consecutivos se puede simplificar significativamente. La constante q, o más bien su exponencial negativa, se puede obtener a partir de la ec.10.

$$e^{-q} = \frac{A_2}{A_1} \tag{10}$$

Substituyendo esta expresión en la ec.7 se obtiene:

$$\sum_{i=1}^{i \rightarrow \infty} A_i = \frac{A_1^2}{A_1 - A_2} \tag{11}$$

Los valores de concentración obtenidos finalmente, con el error cometido en comparación con los datos obtenidos a partir de 4 extracciones se encuentran en la tabla 7.

Tabla 7. Comparación de los datos obtenidos a partir del análisis de 4 o 2 extracciones múltiples.

	Conc. 4 extracciones	Conc. 2 extracciones	% error
Alta viscosidad	129.7ppb	141.0ppb	8.05%
Media viscosidad	222.0ppb	239.5ppb	7.29%
Baja viscosidad	119.6ppb	111.1ppb	7.11%

Como se observa, el error cometido está en torno al 8%, lo que, teniendo en cuenta los objetivos del método, es un error asumible.

### **5.8 Validación del método.**

No ha sido posible realizar una validación rigurosa del método desarrollado durante la estancia en la Sekisui.

Se intentaron corroborar los datos obtenidos con el método por adiciones estándar mencionado en los antecedentes al trabajo pero no se obtuvo el pico correspondiente al VAM, por lo que fue imposible obtener resultados.

Cualitativamente y *a priori*, el método parece presentar una elevada sensibilidad ya que las concentraciones obtenidas en las muestras son del orden de partes por billón.

También, el hecho que en el análisis se excluya cualquier efecto matriz, dota al método de una gran robustez.

Los límites de detección y cuantificación no han podido ser determinados con exactitud. Esto es a causa de que, por ejemplo, por definición, el límite de detección es la cantidad mínima de analito que se puede detectar en una muestra. En este caso, al no haber una correlación directa entre el área de un pico y la concentración, si no que se necesitan varios picos consecutivos para obtenerla, asociar el área del pico mínimo detectable con una concentración determinada sería erróneo.

Aún así, los datos obtenidos a partir de las muestras nos indican que los límites de detección y cuantificación se encuentran muy por debajo del umbral de 12 ppm de VAM marcados por la ley.

### **6. Conclusions.**

*Finally, taking into account that the optimization of the method for the determination of vinyl acetate in polyvinyl acetate was successful, the objectives of the present work are considered accomplished.*

*Although the method is pending for validation, the data obtained from the samples show that both the limit of detection and quantification are below 12 ppm, so the method is useful for determining if the product satisfies the standards for materials and plastic objects destined for food processing.*

*Assuming an error around the 8% in comparison with data obtained performing 4 multiple extractions, it is possible to reduce the time of analysis at its half (110 min). This time is called to be acceptable, considering the absence of manipulation of the sample.*

## **7. Referencias**

1. Sekisui. [En línea] [Fecha de consulta: 16/05/2016] <http://www.sekisui-sc.com>
2. Aditivos Alimentarios. [En línea] [Fecha de consulta: 16/05/2016]  
<http://www.aditivos-alimentarios.com/>
3. (R (UE) nº 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011
4. Gudat, Albert; Brillante, Susan. Multiple Headspace Extraction-Capillary Gas Chromatography for the Quantitative Determination of Volatiles in Solid Matrices. Agilent Technologies, 1996.
5. Meier, Ulrich. Determination of Monomers in Polymers by Multiple Headspace Extraction GC/MS. PerkinElmer, Inc.
6. Kolb, Bruno; Ettre, Leslie. Theoretical Background of HS-GC and Its Applications. In *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*, 2nd Ed; Wiley-VCH: New York, 2006.
7. Merck Millipore. [En línea] [Fecha de consulta: 22/05/2016]  
[http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Sistema-de-purificaci%C3%B3n-de-agua-Direct-Q,MM\\_NF-C9185](http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Sistema-de-purificaci%C3%B3n-de-agua-Direct-Q,MM_NF-C9185)
8. PanReac AppliChem. [En línea] [Fecha de consulta: 22/05/2016]  
[http://www.panreac.es/images/Catalogo2016/Spanish/panreac\\_CAS/index.html](http://www.panreac.es/images/Catalogo2016/Spanish/panreac_CAS/index.html)
9. Merck Millipore. [En línea] [Fecha de consulta: 22/05/2016]  
[http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Methanol,MDA\\_CHEM-106011](http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Methanol,MDA_CHEM-106011)
10. Celanese. [En línea] [Fecha de consulta: 22/05/2016]  
<https://www.celanese.com/intermediate-chemistry/products/Vinyl-Acetate.aspx>
11. Sartorius. [En línea] [Fecha de consulta: 22/05/2016]  
<http://sartorius.dataweigh.com/service/product/bp-301-s/>
12. Agilent Technologies [En línea] [Fecha de consulta: 22/05/2016]  
<https://www.agilent.com/en-us/products/gas-chromatography/sample-introduction/g1888-headspace-sampler>
13. Agilent Technologies [En línea] [Fecha de consulta: 22/05/2016]  
<http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1530-90010.pdf>
14. Agilent Technologies [En línea] [Fecha de consulta: 22/05/2016]  
<http://www.agilent.com/en-us/products/gas-chromatography/gc-columns/capillary/cp-sil-19-cb>
15. Agilent Technologies [En línea] [Fecha de consulta: 30/05/2016]  
<https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-9385EN.pdf>