

3006271  
1



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS  
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

“CONTRIBUCION AL DESARROLLO DE UNA  
METODOLOGIA ANALITICA POR HPLC PARA  
CUANTIFICACION DE TEEPOL HB-7”

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA:

SANDINO ARAICO SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ARNULFO GERMAN ROMERO USCANGA

Envío a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso si  
antece de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Sandino Araico Sanchez

MEXICO, D.F.

FECHA: 10 Abril 2003  
*[Signature]*

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

- I INTRODUCCIÓN.....1**
- II OBJETIVOS.....3**
- III GENERALIDADES Y PARTICULARIDADES**
  - III.1 Generalidades .....5**
    - III.1.1 Sobre Teepol HB7..... 5**
    - III.1.2 Análisis de Detergentes.....13**
    - III.1.3 Sobre la Cromatografía .....17**
      - III.1.3.1 Teoría General de la Cromatografía.....17**
      - III.1.3.2 Tipos de Separación.....18**
      - III.1.3.3 Teoría de los Platos.....20**
      - III.1.3.4 Teoría Cinética de la Cromatografía.....24**
    - III.1.4 Sobre HPLC.....28**
      - III.1.4.1 Historia .....28**
      - III.1.4.2 Clasificación .....29**
      - III.1.4.3 HPLC vs Cromatografía Tradicional ..31**
      - III.1.4.4 Instrumentación .....34**
  - III.2 Particularidades.....38**
    - III.2.1 Polaridad del Teepol HB7.....38**
    - III.2.2 Sistemas Cromatográficos Teóricamente Adecuados.....39**
    - III.2.3 Interacciones Micelares.....44**
      - III.2.3.1 Tiempo de retención como función de la concentración.....51**

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**IV ESTUDIO PROTOTIPO**

<b>IV.1</b>	Trabajo Previo.....	54
<b>IV.2</b>	Columna Nova-Pak C <sub>8</sub> de 3.9mm(ID) <sup>1</sup> x 75mm ova-Pak C <sub>8</sub> .....	56
<b>IV.3</b>	Columna Nova-Pak C <sub>8</sub> de 3.9mm(ID) x 150mm.....	60
<b>IV.4</b>	Optimización.....	64

**V METODOLOGÍA**

<b>V.1</b>	Metodología Estructurada.....	70
<b>V.2</b>	Protocolo de validación del método analítico cromatográfico para la cuantificación de materia activa en Teepol HB7.....	86
<b>V.2.1</b>	Objetivo.....	86
<b>V.2.2</b>	Diseño Experimental .....	87
<b>V.2.2.1</b>	Especificidad .....	87
<b>V.2.2.2</b>	Linealidad .....	89
<b>V.2.2.3</b>	Concentración Mínima Detectable .....	91
<b>V.2.2.4</b>	Concentración Mínima Cuantificable.....	92
<b>V.2.2.5</b>	Repetibilidad .....	93
<b>V.2.2.6</b>	Reproducibilidad .....	95

FALTA DE ORIGEN  
 TESIS CON

<sup>1</sup> ID significa para este caso diámetro interno (Internal Diameter). Este término es utilizado en la bibliografía de los proveedores de columnas cromatográficas para especificar el diámetro interno de las mismas. El otro parámetro especificado en milímetros corresponde a la longitud de la columna.

**V.3 Método analítico cromatográfico para la cuantificación de materia activa en Teepol HB7**

- Protocolo de Análisis- .....97
- V.3.1 Objetivo** .....97
- V.3.2 Procedimiento** .....98
- V.3.3 Método Cromatográfico** .....99
  - V.3.3.1** Parámetro del detector de arreglo de Diodos Waters 994.....101
  - V.3.3.2** Parámetros de la estación de trabajo de Waters Máxima .....106
  - V.3.3.3** Precauciones en la preparación de la muestra .....116
  - V.3.3.4** Precauciones en la preparación de los eluyentes .....117
  - V.3.3.5** Precauciones en la elución.....118

**VI RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS**

- VI.1 Estudio Estructurado**.....121
  - VI.1.1 Longitudes de onda** .....122
  - VI.1.2 Separación**.....123
    - VI.1.2.1** 2 Columna Nova-Pak C<sub>8</sub> de 3.9mm(ID) x150mm en serie.....124
    - VI.1.2.2** Columna Nova-Pak C<sub>18</sub> de 3.9mm(ID) x150mm.....129
    - VI.1.2.3** Columna Nova-Pak C<sub>18</sub> de 3.9mm(ID) x300mm.....132
    - VI.1.2.4** Discusión.....136
  - VI.1.3 Colapso**.....138
    - VI.1.3.1** Columna Nova-Pak C<sub>8</sub> de 3.9mm(ID) x75mm .....139
  - VI.1.4 Colapso Retardado**.....146
    - VI.1.4.1** Columna Nova-Pak C<sub>18</sub> de 3.9mm(ID) x150mm.....147

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

5

---

<b>VI.2 Validación del Método Analítico .....</b>	<b>155</b>
<b>VI.2.1 Especificidad .....</b>	<b>156</b>
<b>VI.2.1.1 Utilizando la técnica de</b> <b>espectrofotometría infrarroja por</b> <b>transformada de Fourier .....</b>	<b>156</b>
<b>VI.2.1.2 Utilización de la técnica de</b> <b>espectrofotometría UV/Vis por arreglo</b> <b>de Diodos .....</b>	<b>157</b>
<b>VI.2.2 Linearidad .....</b>	<b>164</b>
<b>VI.2.2.1 Concentración Mínima detectable..</b>	<b>171</b>
<b>VI.2.2.2 Concentración Mínima Cuantificable</b>	<b>172</b>
<b>VI.2.3 Repetibilidad .....</b>	<b>176</b>
<b>VI.2.3.1 Precisión .....</b>	<b>178</b>
<b>VI.2.3.2 Exactitud .....</b>	<b>180</b>
<b>VI.2.4 Reproducibilidad .....</b>	<b>184</b>
<b>VI.2.4.1 Precisión .....</b>	<b>186</b>
<b>VI.2.4.2 Exactitud .....</b>	<b>188</b>
<b>VII CONCLUSIONES</b>	
<b>VI.1 Conclusiones .....</b>	<b>193</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>197</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>237</b>

FALTA DE ORIGEN  
 TESIS CON

# INTRODUCCIÓN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

La química —desde sus orígenes— ha transformado notablemente la vida de las personas. El mundo ha presenciado grandes cambios en los materiales que se utilizan para proveernos —entre otras cosas— de comida, ropa, medicina, limpieza, salud, comodidad; se han introducido nuevos materiales en nuestras vidas y los materiales tradicionales se han ido perfeccionando.

La gran cantidad de nuevos productos químicos que en la actualidad sirven para los propósitos mencionados requiere también de investigación para el desarrollo de métodos analíticos que permitan identificar y medir las cantidades y concentraciones de éstos y los involucrados en su producción; de tal manera que ésta se lleve a cabo adecuadamente, las concentraciones en productos terminados puedan ser controladas y se facilite su identificación.

Para el caso de los agentes tensoactivos sus características anfífilas dificultan su aislamiento y la medición de sus concentraciones por los métodos analíticos convencionales; de ahí la búsqueda de métodos analíticos alternativos que permitan obtener mejores mediciones. Desgraciadamente estos métodos alternativos consumen muchos recursos y duran mucho tiempo, por lo que las nuevas tendencias requieren de métodos analíticos que sean más rápidos, más baratos o ambos —dependiendo de las necesidades de los procesos relacionados a éstos—, tendencia que va de la mano con los vertiginosos avances que tiene el análisis instrumental en todas sus modalidades.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## OBJETIVOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# CAPÍTULO I I

## OBJETIVO

Desarrollar un método analítico cromatográfico para la cuantificación de Teepol HB-7 en solución acuosa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# **GENERALIDADES Y PARTICULARIDADES**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# CAPÍTULO III

## GENERALIDADES Y PARTICULARIDADES

### III.1 GENERALIDADES

Adentrándonos en estas nuevas tendencias llegamos al objetivo de esta tesis de licenciatura, el cual es —utilizando la técnica cromatografía de líquidos de alta resolución— obtener un método analítico instrumental [cromatográfico] para la cuantificación de Teepol HB7<sup>a</sup>, que compita en precio, velocidad, exactitud y precisión con el método actualmente utilizado<sup>b</sup>. Para que el método analítico obtenido pueda reemplazar al método actual, éste necesita ser validado tomando en cuenta los parámetros de repetibilidad<sup>c</sup>, reproducibilidad<sup>d</sup>, concentración mínima detectable, concentración mínima cuantificable, linealidad del sistema, exactitud y precisión.

#### III.1.1 Generalidades sobre Teepol HB7<sup>e</sup>

Teepol HB7 es una solución de la sal de sodio de alquil sulfatos de cadena larga. El alcohol del cual provienen es una mezcla específica de alcoholes C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>12</sub> y C<sub>13</sub> especialmente seleccionados para proveer alta solubilidad combinada con buenas

<sup>a</sup> Actualmente el Teepol HB7 se conoce con el nombre comercial de Neodol HB7.

<sup>b</sup> El método actualmente utilizado se encuentra dentro del grupo de los métodos analíticos alternativos. Fue desarrollado por el M. en C. Arnulfo Germán Romero Uscanga.

<sup>c</sup> Repetibilidad es la característica que tiene un proceso de ejecutarse de manera idéntica a la última ocasión en que éste se haya llevado a cabo, independientemente de cuánto tiempo haya transcurrido en ese lapso.

<sup>d</sup> Reproducibilidad es la característica que tiene un proceso de ejecutarse de manera idéntica a la última ocasión en que éste se haya llevado a cabo, independientemente de qué persona lo haya puesto en práctica.

<sup>e</sup> Teepol HB7 es marca registrada de Shell Detergents.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

propiedades emulsificantes, solubilizantes y de actividad superficial, además de la simplicidad y estabilidad asociada a las sales de sodio.

El Teepol HB7 se prepara por sulfatación en un proceso  $SO_3$  de película delgada continua para asegurar un bajo color y el mínimo contenido de materia orgánica no sulfatada y sal orgánica. Contiene como mínimo un 40%w/w de sulfatos de alcoholes primarios (expresados como sales de sodio).

ESPECIFICACIONES DEL TEEPOL HB7	
DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN
Materia activa	> 40.0%
Acidos grasos libres	< 0.17%
Alcalinidad total	0.05 - 0.29%
Densidad a 25°C	1.030 - 1.075 g/ml
Solubilidad al 10%	totalmente soluble
Materia fija	40.0% mín
Humedad	60.0% max
pH al 5% a 25°C	7.0 - 8.5
Viscosidad Brookfield a 25°C	90.0 - 105.0 cps
Índice de refracción a 25°C	1.3860 - 1.4000

• Tabla 1.2<sup>o</sup>

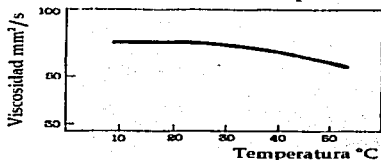
Teepol HB7 es un líquido amarillo pálido con una viscosidad excepcionalmente baja para un producto tan concentrado. Puede ser bombeado y manejado con facilidad. La exposición prolongada a temperaturas por debajo de 10°C pueden provocar la precipitación de componentes tensoactivos, pero estos se redissuelven rápidamente cuando el producto se calienta.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>1</sup> Fuente: Shell Detergents, Teepol HBZ, Technical Bulletin DI.3.1.2, Shell Chemical International Trading Company, London 1984.

<sup>2</sup> Fuente: Control de Calidad e Investigación, Fábrica de Billetes, Banco de México, Normas Bancario Para Analisis Químicos, Tensoactivo, Teepol HBZ, México 1996.

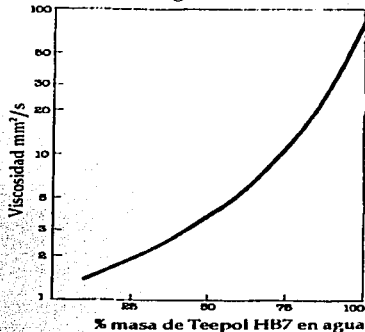
Viscosidad del Teepol HB7  
como función de la temperatura



• Figura 1.1'

La figura 1.1 muestra que la viscosidad del Teepol HB7 permanece constante en un intervalo dado de temperatura. El Teepol HB7 puede diluirse con agua sin problemas de formación de gel, la viscosidad decrece con la dilución como se muestra en la figura 1.2.

Viscosidad a 20°C de Teepol HB7  
diluido con agua



• Figura 1.2'

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En común con muchos otros alquilsulfatos primarios, el Teepol HB7 tiene una temperatura de precipitación que es casi independiente de la concentración [excepto en soluciones extremadamente diluidas]. El punto de precipitación del Teepol HB7 es remarcablemente bajo comparado con el de otros alquilsulfatos.

El Teepol HB7 es una solución muy ligeramente alcalina con un pH cercano a 8 [medido en una solución al 5% de materia activa]. Esta elección de pH ha sido diseñada para asegurar máxima estabilidad química, acoplada con suavidad para la piel; se incorpora un buffer al producto para mantener el pH en su punto óptimo.

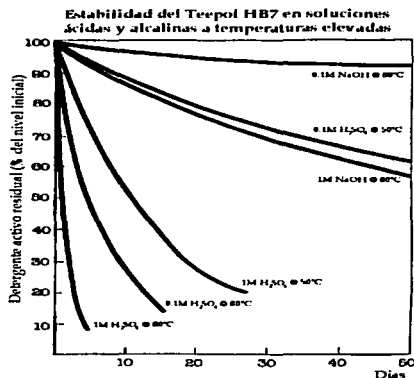
El Teepol HB7 es completamente estable durante su almacenaje a temperaturas de hasta 40°C. Debe ser evitada la exposición prolongada a temperaturas superiores a 40°C, aunque exposiciones cortas de unas cuantas horas no tienen efecto deteriorante.

Como con otros alquilsulfatos, el contacto con ácidos fuertes puede provocar la hidrólisis de los componentes activos del detergente. La velocidad de hidrólisis es mínima a temperatura ambiente, pero la exposición —en condiciones ácidas— a temperaturas elevadas causa una extensa descomposición del producto.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La tabla 1.2 muestra la estabilidad del Teepol HB7 al ser expuesto a un rango de temperaturas de almacenamiento bajo condiciones neutras, ácidas y alcalinas.

Los resultados son expresados como el porcentaje de pérdida de detergente activo en soluciones que inicialmente contuvieron 1 g de detergente activo por litro (0.1% w/v). Algunos de estos resultados son presentados gráficamente en la figura 1.3.



• Figura 1.3'

<b>% pérdida de detergente activo</b>													
Días	En agua			En solución de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>						En solución de NaOH			
	20°C	50°C	80°C	0.1M		1.0M		20°C	50°C	80°C	0.1M		1.0M
	20°C	50°C	80°C	20°C	50°C	80°C	20°C	50°C	80°C	20°C	80°C	20°C	80°C
1	0	0	0	0	1	10	0	4	65	0	0	0	2
2	0	0	0	0	3	25	0	11	83	0	1	0	3
3	0	0	0	0	4	35	0	17	89	0	1	0	5
7	0	0	1	0	9	62	1	35	-	0	2	0	9
10	0	0	1	1	12	73	1	49	-	0	3	0	13
14	0	0	2	1	16	83	1	60	-	0	4	0	17
30	0	1	4	2	28	-	2	83	-	0	6	0	30
60	0	-	-	3	43	-	5	-	-	0	-	0	-
120	0	-	-	4	-	-	12	-	-	0	-	0	-

• Tabla 1.2'

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



El método analítico que se utiliza en la actualidad para Teepol HB7 consiste en una titulación en la cual se coloca dentro de un embudo de separación una alícuota de la muestra, cloroformo y azul de metileno; de tal manera que mientras existe actividad detergente en el producto, el azul de metileno se mantiene en la fase clorofórmica, pero al titularlo con hexadecil-trimetil-amonio se llega a un punto de equivalencia en el que el azul de metileno regresa a la fase acuosa. Este método analítico depende de una continua agitación del embudo de separación para que se alcance el equilibrio entre el azul de metileno acuoso y el azul de metileno clorofórmico, por lo que para encontrar con precisión el punto de equivalencia se necesitaría mucho tiempo de agitación tras agitación y un excesivo cuidado al momento de efectuar dichas agitaciones. En la actualidad este método se lleva a cabo con muy pocas agitaciones, lo que proporciona una mayor rapidez al momento del análisis, pero también provoca una pérdida en la exactitud del punto final de la titulación [por lo general muy por encima del punto de equivalencia].

A continuación se muestra el procedimiento de la norma Banxico para la determinación de materia activa en muestras de Teepol HB7.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se pesa aproximadamente con precisión 1 g de muestra de tensoactivo, la cual se disuelve en agua destilada y se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 ml, llevando hasta la marca y se agita para homogeneizar la solución.

De esta solución se toman 10 ml los cuales se colocan en un embudo de separación y se les adicionan 15 ml de cloroformo y 25 ml de solución indicadora de azul de metileno, se agita vigorosamente y se remueve el tapón dejando separar las fases acuosa y orgánica.

Se observa la diferencia de coloración entre las dos fases, un color azul intenso aparece en la fase orgánica mientras que la fase acuosa permanece incolora.

Posteriormente se titula la solución con el reactivo de Hexadeciltrimetilamonio de concentración 0.004 M, agitando en cada adición y esperando la separación de las fases hasta que la coloración observada a contra luz sea intensa en la fase superior (fase acuosa) y se observe la decoloración de la fase inferior (fase orgánica).

Se toma el volumen en ml gastado de la solución titulante y se hacen los cálculos respectivos:

**CALCULOS:**

$$\frac{V_t \times M \times 266 \times 100}{V_m \times D \times 1000} = \%MA$$

Donde:

MA	materia activa
V <sub>t</sub>	volumen de titulación
M	molaridad del hexadecil-trimetil-amonio ( 0.004M)
266	peso molecular promedio del Teepol
V <sub>m</sub>	volumen de la muestra (10 ml)
D	densidad promedio del Teepol
1000	factor para convertir a litros

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A continuación se muestran las especificaciones de la solución de limpieza de acuerdo a la norma Banxico y el procedimiento para la determinación de materia activa en la misma.

ESPECIFICACIONES DE LA SOLUCIÓN DE LIMPIEZA TEEPOL HB7 - SOSA	
DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN
NaOH	0.70 - 0.9%
Teepol HB-7	0.16 - 0.2%

• Tabla 1.3<sup>h</sup>

Se toman 10 ml de muestra y se mezclan en un embudo de separación con 25 ml de solución indicadora de azul de metileno y 15 ml de cloroformo. Se titula con solución de Hexadeciltrimetilamonio 0.004 M, agitando constantemente, hasta el punto final en el que la fase azul pasa a la parte superior.

CALCULOS:

$$\frac{V_t \times M \times 266 \times 100}{V_m \times D \times 1000} = \%MA$$

Donde:

MA	materia activa
V <sub>t</sub>	volumen de titulación
M	molaridad del hexadecil-trimetil-amonio ( 0.004M)
266	peso molecular promedio del Teepol
V <sub>m</sub>	volumen de la muestra (10 ml)
D	densidad promedio del Teepol
1000	factor para convertir a litros

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>h</sup> Fuente: Control de Calidad e Investigación, Fábrica de Billetes, Banco de México, Normas Banxico Para Análisis Químicos: Solución de limpieza (Sosa - Teepol HB7), México 1996.

### III.1.2 Generalidades sobre Análisis de Detergentes

A principios de siglo, todo el análisis de agentes tensoactivos había estado limitado al de los jabones. Con la introducción de los alcoholes grasos sulfatados, sulfonatos de alquil naftaleno y otros agentes tensoactivos sintéticos —alrededor de 1930— se generó también la necesidad de tener técnicas de análisis y métodos analíticos adecuados para cada una de estas sustancias.

Desde el punto de vista de la química analítica moderna, los procedimientos para el análisis de agentes tensoactivos deben abarcar no solo métodos para reconocer la presencia de éstos, sino también para aislarlos de las numerosas formulaciones en donde se encuentran, separar mezclas de tensoactivos, identificar estructuras individuales [así como la composición de las mezclas] y para determinar cuantitativamente la cantidad de cada uno de los componentes tensoactivos presentes.

El análisis de una mezcla de surfactantes generalmente es un trabajo difícil y delicado.

Los detergentes se pueden encontrar en un vasto número de preparaciones (industriales y domésticas). De ellas las soluciones acuosas muy diluidas presentan problemas para su análisis, pero generalmente son suficientes ciertas características de soluciones de agentes tensoactivos [como podría ser la formación de espuma] para indicar su presencia. La identificación del tipo de carga de los tensoactivos puede hacerse utilizando indicadores cuyos colores o características de solubilidad cambien por la presencia de surfactantes de un tipo de carga determinado.

Es imposible hacer un análisis cuantitativo a menos que se disponga de información acerca de la naturaleza exacta de cada uno de los componentes de la mezcla y la identificación cualitativa de sus componentes se dificulta a menos que se disponga de un método para separarlos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Para tener una identificación confiable los tensoactivos deben ser aislados de mezclas con otras sustancias.

Debido a la gran variedad de combinaciones posibles con otras sustancias no tensoactivas es difícil idear un método riguroso que sea general para el aislamiento de los tensoactivos. Sin embargo, comparten características que les permiten ser aislados por métodos de extracción [bajo condiciones apropiadas de pH, concentración de electrolitos y temperatura] mediante la selección adecuada de solventes. Los tensoactivos deben —por estos métodos— ser liberados de sales inorgánicas y otros materiales insolubles, ser concentrados (cuando se encuentran en soluciones acuosas diluidas) y separados de aceites orgánicos o solventes inmiscibles con el agua. En los últimos años han sido también utilizados otros métodos para estos propósitos [particularmente adsorción selectiva y cromatografía].

Una vez que un agente tensoactivo ha sido detectado y aislado y su tipo de carga ha sido identificado, se puede proceder a determinar la naturaleza y la cantidad de los surfactantes presentes. Es una práctica común el uso de mezclas de tensoactivos en lugar de sustancias individuales, por lo que al aislamiento sigue normalmente la separación de la mezcla de surfactantes presente.

Desafortunadamente, las propiedades fisicoquímicas tan similares que tienen los agentes tensoactivos hacen que éstos no sean separables por los métodos convencionales: su baja volatilidad obstaculiza la separación por destilación fraccionada, su tendencia a emulsificar líquidos inmiscibles dificulta las extracciones líquido-líquido y sus propiedades de solubilidad les dan un comportamiento impredecible en extracciones líquido-sólido y cristalizaciones.

Son utilizados ya sea métodos cromatográficos o métodos de extracción líquido-líquido acoplados con modificación de los componentes.

Los procedimientos comúnmente utilizados en la actualidad emplean:

- \* **intercambio iónico** para la separación de surfactantes iónicos y no iónicos,
- \* **extracción líquido-líquido o cromatografía** para separar diferentes tipos de surfactantes iónicos o no iónicos, y
- \* **cromatografía** para separar surfactantes individuales de la misma clase o de clases parecidas.

Sea cual sea el tipo de mezcla que se pretenda separar, siempre es necesario tener un mínimo conocimiento acerca de las características de la mezcla y el tipo de componentes que se encuentran en esta, para poder seleccionar de entre tantos el método óptimo para la separación de cada una de ellas.

Después de que han sido separados los surfactantes se puede iniciar el análisis estructural y la identificación de los surfactantes presentes por métodos instrumentales y/o químicos.

Los métodos utilizados para determinar el contenido de surfactantes en composiciones varían desde métodos generales como pesar el material soluble en ciertos solventes hasta aquellos métodos sensibles y específicos como la espectrofotometría. Ambos métodos (instrumental y químico) se utilizan y pueden estar basados en estructuras tan generalizadas como la carga de la parte tensoactiva de la molécula o en un grupo funcional específico de la misma. Los métodos cromatográficos también se emplean y en ellos el análisis está basado en fenómenos tan variados como respuestas a estos puedan ser obtenidas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

Los métodos cuantitativos pueden usarse ya sea para determinar exactamente o simplemente para estimar el contenido de surfactantes en una composición; dicha distinción se fundamenta en la información disponible con respecto a la estructura de cada analito en cuestión, de ahí que si la estructura exacta del surfactante o su peso molecular pueden obtenerse o son conocidos puede hacerse una determinación cuantitativa y por el contrario si ninguno de estos dos parámetros está disponible solo es posible una estimación.

### III.1.3 Generalidades sobre Cromatografía

#### III.1.3.1 TEORÍA GENERAL DE LA CROMATOGRAFÍA

El término cromatografía es el que se aplica generalmente a los procesos fisicoquímicos de separación en los cuales los componentes a ser separados están distribuidos entre una fase estacionaria y una fase móvil. La clasificación de los distintos tipos de cromatografía puede depender del estado de agregación de estas dos fases:

Fase móvil	Fase estacionaria	
	líquida	sólida
gaseosa <sup>i</sup>	GLC	GSC
líquida <sup>j</sup>	LLC	LSC (HPLC)

<sup>k</sup>Tabla 1.4

En cualquier caso el proceso de separación puede ser descrito utilizando la misma teoría general.

Los componentes de la muestra son acarreados por una fase móvil a través de una fase estacionaria. Los diferentes componentes son retardados por la fase estacionaria en base a interacciones como:

- + Adsorción superficial
- + Solubilidad relativa
- + Carga

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>i</sup> Cromatografía de gases.

<sup>j</sup> Cromatografía de líquidos.

<sup>k</sup> G = gas, L = líquido, S = sólido, C = cromatografía, HPLC = Cromatografía de líquidos de alta resolución.

<sup>l</sup> Fuente: Markus Laubli - Peter Bruttel - Roland Dörig, *Ion Chromatography: Theory, Columns and Eluents. Metrohm Monograph 50143.*



### III.1.3.2 TIPOS DE SEPARACIÓN



• <sup>m</sup> Figura 1.1

**Análisis frontal.** Se agrega la muestra continuamente al inicio de la columna y se van monitoreando los componentes conforme vayan saliendo. Proporciona una medida general de como son retenidas las diferentes sustancias. Pueden

utilizarse aproximaciones para evaluar la retención relativa. No es útil como un método de separación.



**Análisis de desplazamiento.** Los materiales se mueven a través de la columna al ser desplazados por un soluto retenido más fuertemente. No es posible alcanzar una resolución completa y no tiene efecto alargar o acortar la columna.

• <sup>m</sup> Figura 1.2



**Elución.** Un soluto se distribuye entre las dos fases (equilibrio). La separación está basada en la retención relativa. Hacer la columna más larga incrementa el grado de separación. Muchos tipos de atracciones competitivas pueden ser utilizados.

• <sup>m</sup> Figura 1.3

Dos aproximaciones pueden ser tomadas en cuenta para explicar el proceso de separación.

- **Teoría de los platos** propuesta en 1941 por Martin y Synge. Basada en una analogía con la destilación y la extracción a contracorriente.
- **Teoría cinética.** Explica la dinámica de una separación. 1956, J. J. Van Deemter.

Cada una tiene sus propias ventajas y limitaciones.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

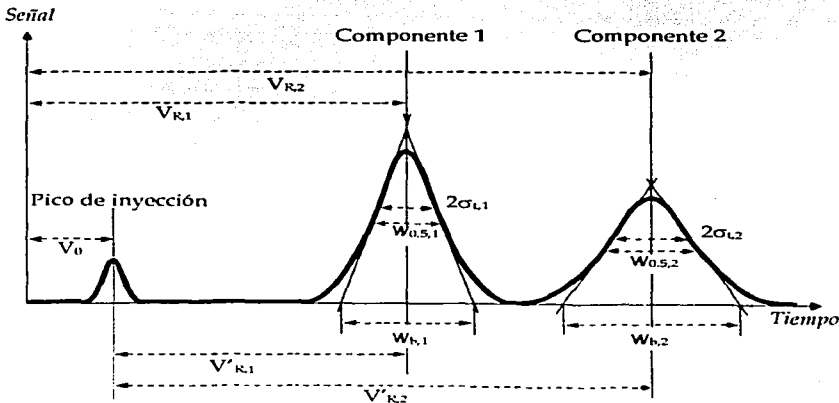
### III.1.3.3 TEORÍA DE LOS PLATOS

En una destilación los platos actuales existen cuando el vapor pasa a través de una fase líquida. Durante esta mezcla se llega al equilibrio entre las fases. La altura de un plato se mide con frecuencia. En una columna empacada, los platos no pueden ser observados [son llamados platos teóricos].

Si el plato puede ser observado podemos medir su altura. Si no puede ser directamente observado, podemos calcular la altura equivalente a un plato teórico (HETP). Este concepto se extiende para explicar el proceso cromatográfico.

#### Características cromatográficas

La curva de elución (señal vs tiempo) que resulta de una separación cromatográfica es llamada cromatograma y tiene una apariencia similar a la siguiente:



• Figura 1.4

$V_0^n$	volumen muerto
$V_R^n$	volumen de retención
$V'_R^n$	volumen de retención neto
$\sigma_t$	desviación estándar
$W_{0.5}$	ancho del pico a la mitad de la altura
$W_b$	ancho del pico en la base

Con la información obtenida del cromatograma se calculan los siguientes parámetros que individualmente son medidas de la separación de los componentes dentro de una columna.

**Factor de capacidad  $k'$**  es una función del tiempo de retención<sup>o</sup> que, en contraste con éste, no depende del flujo del eluyente ni de la longitud de la columna. Valores bajos de  $k'$  significan que la sustancia está siendo eluída cerca del pico de inyección y consecuentemente, la separación es muy deficiente. Óptimamente, el factor de capacidad debe tener valores entre 1 y 5; valores más altos solo dan lugar al ensanchamiento del pico, menor detección y mayores tiempos de análisis.

$$k' = \frac{V'_R}{V_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{V_R}{V_0} - 1$$

El factor de capacidad es dependiente de la fuerza del eluyente por lo que cualquier cambio en ésta proporcionará valores distintos de  $k'$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>n</sup> Los parámetros  $V_0$ ,  $V_R$  y  $V'_R$ —de volumen— pueden ser convertidos en parámetros de tiempo  $t_0$ ,  $t_R$  y  $t'_R$  utilizando una velocidad de flujo constante.  
o El tiempo de retención siempre será el mismo para una misma sustancia en un mismo sistema cromatográfico.

**Selectividad  $\alpha$**  es una medida de la eficiencia de la separación en un sistema cromatográfico.

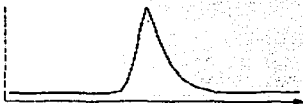
$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

La manera más efectiva de mejorar la separación involucra un incremento en la selectividad por el uso de una columna más adecuada para la separación o por el cambio de composición en el eluyente.

### Mecanismo de separación de los componentes

El volumen de la fase móvil es proporcional a la longitud de la columna, por lo que la retención se incrementa con el uso de columnas más largas. Sin embargo, los picos se van ensanchando mientras viajan a través de la columna en un incremento proporcional a la raíz cuadrada de la longitud de la misma; por lo que no basta el alargar la columna para obtener una mejor separación.

De acuerdo a la teoría de los platos, una columna cromatográfica es matemáticamente equivalente a una columna de platos. La longitud total se divide en  $N$  segmentos, cada uno representando una etapa de equilibrio o plato teórico. Se establece un equilibrio en cada plato teórico mientras la fase móvil va pasando de uno a otro. El pico producido por un analito al ir emergiendo de la columna puede ser utilizado para determinar —en base a sus parámetros— el número de platos teóricos en ésta.



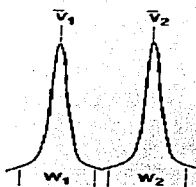
• <sup>m</sup> Figura 1.5

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2 = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$



Si  $N$  es un número grande, la distribución de Poisson se aproxima a una distribución gaussiana, este es el caso de la mayoría de las columnas. A mayor número de platos teóricos mejor retención y mayores tiempos de retención.

• <sup>m</sup> Figura 1.6



Resolución es una medida de que tan completamente están separados dos picos vecinos, uno del otro.

$$R = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{W_{0,1} + W_{0,2}} = \frac{1.177(t_{R,2} - t_{R,1})}{W_{0,5,1} + W_{0,5,2}}$$

Una resolución con valor de 1.5 es óptima para análisis cuantitativo [valores superiores sólo incrementan el tiempo de análisis].

• <sup>m</sup> Figura 1.7

Asimismo, puede ser vista la resolución como dependiente de los parámetros  $k'$  [de la última sustancia eluída],  $\alpha$  y  $N$  en un sistema cromatográfico.<sup>p</sup>

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k'_2}{1 + k'_2}$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### III.1.3.4 TEORÍA CINÉTICA DE LA CROMATOGRFÍA

La teoría de los platos teóricos no toma en cuenta los conceptos de difusión del soluto y rutas de flujo, la teoría cinética los explica y puede ser usada para predecir el efecto en factores del desempeño de una columna como:

- Propiedades de las fases
- Difusividades del soluto
- Coeficientes de partición
- Espesor y viscosidad de las fases
- Tamaño de partícula del empaque
- Porosidad del empaque
- Velocidades de flujo

Van deemter propuso una ecuación parcial diferencial para una isoterma lineal, resultado de una función de la concentración de eluyente. Está basada en una distribución gaussiana similar a la de la teoría de los platos. Intentaba con ello explicar la dinámica de un proceso de separación.

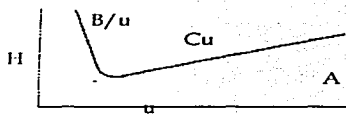
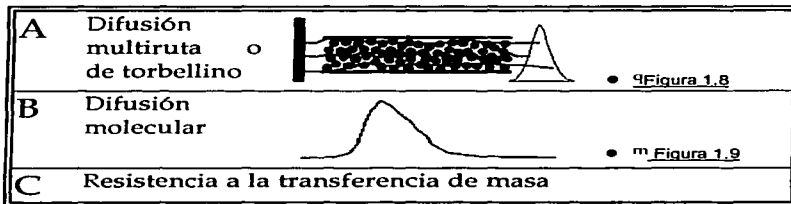
$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_g}{u} + \frac{8}{\pi^2} \frac{kd_f^2}{(1+k)^2 D_l} u$$

$\lambda$	factor característico del empaque
$d_p$	diámetro de la partícula
$\gamma$	factor para la irregularidad de los espacios interpartícula
$D_g$	coeficiente de difusión del compuesto en gas
$D_l$	coeficiente de difusión del compuesto en líquido
$u$	velocidad linear del gas
$k$	razón de capacidad
$d_f$	Grosor de la capa efectiva en la fase estacionaria
$H$	altura de un plato teórico (HETP)

La ecuación consta de tres términos básicos:

$2\lambda d_p$	Término relacionado al empaque: A
$\frac{2\gamma D_E}{u}$	Término de la fase móvil: B
$\frac{8}{\pi^2} \frac{kd^2}{(1+k)^2 D_i} u$	Término de la fase estacionaria: C

$$H = A + B / u + Cu$$



Nótese que A, B y C son constantes pero el efecto de B y C es dependiente de la velocidad de la fase móvil.

● m Figura 1.10

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

\* q Fuente: Dr. Yuri Kazakevich and Prof. H.M. McNair, Basic Liquid Chromatography.  
[http://hplc.chem.vt.edu/my\\_home/book/content/index.html](http://hplc.chem.vt.edu/my_home/book/content/index.html) 1995.



No es necesario calcular  $H$  en cada combinación de columna—eluyente para poder utilizar esta relación. El entendimiento de los efectos de cada término debe ayudar a seleccionar las columnas apropiadas y flujos óptimos.

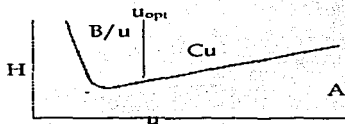
Una vez empacada la columna no hay manera de reducir el término  $A$ . Su efecto puede ser reducido por la utilización de:

- ➔ Empaque de tamaño regular.
- ➔ Empaque con tamaño de partícula pequeño.
- ➔ No permitiendo que haya empaque suelto o espacio muerto en la columna.

La difusión molecular representa el ensanchamiento del pico debido a su difusión en la fase móvil. La difusión reversa es más significativa que hacia adelante debido al flujo de la fase móvil.

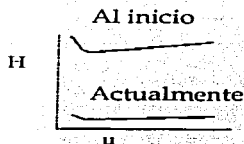
El efecto del término  $B$  es dependiente del flujo; se debe mantener el flujo tan alto como sea posible dentro de los límites impuestos por el instrumento y por el término  $C$ .

Toma tiempo el que un soluto alcance el equilibrio entre las fases móvil y estacionaria. Las fases viscosas tienen términos  $C$  mayores. Se puede minimizar el efecto del término  $C$  utilizando fases móviles menos viscosas y manteniendo el flujo tan lento como sea posible —dentro de los límites impuestos por el efecto del término  $B$ —.



La velocidad óptima es función de la ecuación de Van Deemter y de condiciones prácticas.

• <sup>m</sup> Figura 1.11



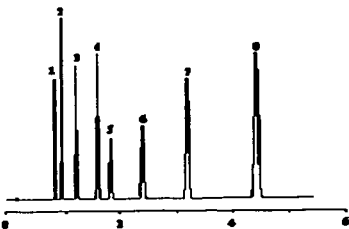
En sus inicios la cromatografía de líquidos dependía de empaques irregulares; actualmente los empaques han mejorado bastante por lo que el término A es muy bajo. Los términos B y C son bajos debido a que los líquidos se difunden mucho más lentamente que los gases.

- <sup>m</sup> Figura 1.12

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### III.1.4 Generalidades sobre HPLC

#### III.1.4.1 HISTORIA

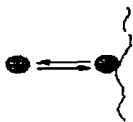


• 9 Figura 1.13

La cromatografía de líquidos fue descubierta por primera vez en 1903 por M. S. Tswett, quien utilizó una columna de gis para separar los pigmentos de las hojas verdes. Sólo hasta 1960 se comenzó a poner más énfasis en el desarrollo de este tipo de cromatografía hasta llegar a la cromatografía de líquidos de alta resolución, la cual ha llegado a ser en la actualidad la técnica analítica más ampliamente usada.

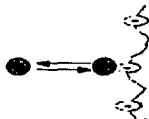
### III.1.4.2 CLASIFICACIÓN

Existen muchas formas de clasificar la cromatografía de líquidos (LC); si la clasificación está basada en la naturaleza de la fase estacionaria y el proceso de separación pueden especificarse tres modos:



En la **cromatografía de adsorción<sup>s</sup>** la fase estacionaria es un adsorbente y la separación está basada en repetidos pasos de adsorción—desorción.

• <sup>m</sup> Figura 1.14



• <sup>m</sup> Figura 1.15

En la **cromatografía de intercambio iónico (IC)** la fase estacionaria tiene una superficie con carga iónica opuesta a la de los iones de la muestra. Mientras más fuerte sea la carga en la muestra, más fuerte será su atracción hacia la superficie iónica y por lo tanto tomará más tiempo su elución. La fase móvil es un buffer acuoso donde ambos pH y fuerza iónica son usados para controlar el tiempo de elución.



• <sup>m</sup> Figura 1.16

En la **cromatografía de exclusión molecular (SEC)<sup>t</sup>** la columna es llenada con un material con tamaño de poros precisamente controlado y la muestra simplemente es filtrada de acuerdo a su tamaño molecular —solvatada—. Las moléculas más grandes salen rápidamente de la columna, mientras que las pequeñas penetran dentro de los poros de las partículas del empaque y son eluidas posteriormente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

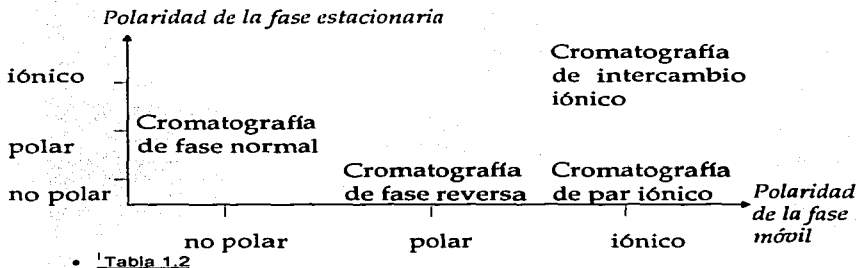
<sup>s</sup> Ya sea fase normal o fase reversa.

<sup>t</sup> También llamada de filtración en gel o de permeación en gel.

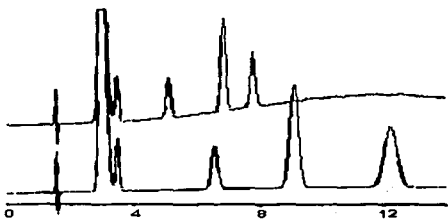
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

30

Con base en la polaridad de las fases móvil y estacionaria se puede hacer una distinción similar entre los diferentes tipos:



Existen dos tipos de elución:



• Figura 1.17

»»**Gradiente** en la que la composición —y la fuerza— va cambiando durante la corrida.

»»**Isocrática** en la que una composición constante del eluyente es bombeada a través de la columna durante todo el análisis.

### III.1.4.3 HPLC VS CROMATOGRAFÍA TRADICIONAL

Como punto de comparación entre la utilización de HPLC y la cromatografía tradicional pueden citarse los siguientes ejemplos:

- Columnas reutilizables de diámetro pequeño (2-8 mm), en acero inoxidable<sup>u</sup>.
- Empaques de columna con tamaño de partícula muy pequeño (3, 4, 5, 6, 10 y 15  $\mu\text{m}$ <sup>v</sup>).
- El continuo desarrollo de nuevos materiales para ser utilizados como fases estacionarias.
- Presión de entrada relativamente alta.
- Flujo controlado de la fase móvil.
- Introducción precisa de la muestra sin la necesidad de grandes cantidades.
- Detectores de flujo continuo capaces de manejar flujos lentos y de detectar muy pequeñas cantidades.
- Calibración automática de los instrumentos.
- Análisis rápido.
- Alta resolución.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

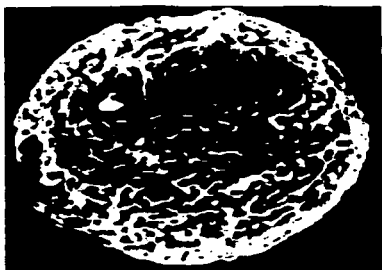
---

<sup>u</sup> Actualmente comienzan también a utilizarse columnas capilares para HPLC.

<sup>v</sup> Pueden encontrarse en el empaque partículas de un mismo tamaño o combinaciones de dos tamaños.



• Figura 1.18



• Figura 1.19

Los empaques modernos para HPLC son partículas pequeñas y rígidas con gran superficie de contacto. Sus principales parámetros son los siguientes:

- Tamaño de partícula: 3, 4, 5, 6, 10 y 15  $\mu\text{m}^w$ .
- Forma esférica<sup>x</sup>.
- Distribución del tamaño de partícula tan estrecha como sea posible (usualmente 10% del promedio).
- Tamaño de poro: 70 a 300 Å.
- Superficie de contacto: 50 a 250  $\text{m}^2/\text{g}$ .
- Densidad de fase enlazada<sup>y</sup>: 1 a 5 sitios de adsorción por cada  $\text{nm}^2$ .



• Figura 1.20

<sup>w</sup> Pueden encontrarse en el empaque partículas de un mismo tamaño o combinaciones de dos tamaños.

<sup>x</sup> No necesariamente porque todavía se siguen utilizando empaques con partículas de forma irregular.

<sup>y</sup> Únicamente para empaques de fase enlazada.

Entre la gran variedad de solventes utilizados en HPLC se encuentran las siguientes propiedades comunes:

- >> Pureza<sup>a</sup>.
- >> Compatibilidad con el detector.
- >> Solubilidad de la muestra.
- >> Baja viscosidad<sup>aa</sup>.
- >> Baja absorbancia<sup>bb</sup>.
- >> Reactividad nula<sup>cc</sup>.
- >> Precio razonable<sup>dd</sup>.

Cada modo de HPLC tiene sus propios requerimientos de solventes: Para fase normal deben ser no polares, para fase reversa se usa generalmente una mezcla de agua con un solvente orgánico polar como acetonitrilo, para IC se utilizan soluciones buffer acuosas con fuerza iónica controlada y para SEC los eluyentes tienen que disolver los polímeros y suprimir toda posible interacción entre las moléculas de la muestra y la superficie del material de empaque.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>a</sup> Debe ser mayor a 99.99% [el agua debe tener una resistencia hasta de 18MΩ].

<sup>aa</sup> Los que son miscibles con el agua deben también presentar baja viscosidad en todas las proporciones de la mezcla.

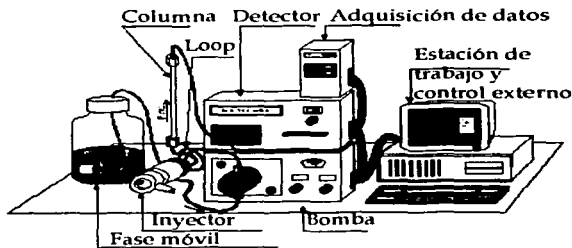
<sup>bb</sup> En la longitud de onda que se pretenda utilizar.

<sup>cc</sup> El eluyente en ningún momento debe reaccionar con la muestra —ni siquiera debe inducir su cristalización—.

<sup>dd</sup> Por lo general el precio de los solventes grado HPLC es muy elevado.



### III.1.4.4 INSTRUMENTACIÓN.



• <sup>9</sup> Figura 1.21

columna, ya que es ahí donde ocurre la separación.

En un sistema moderno de HPLC la instrumentación incluye una bomba, un inyector, una columna, un detector y un integrador o un sistema para el manejo de datos; siendo la parte más importante la

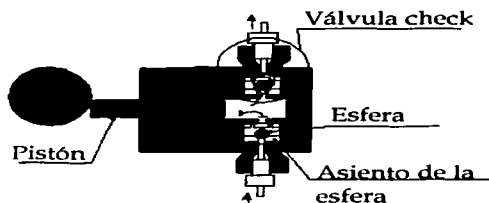
Los solventes que van a ser utilizados como eluyentes [que generalmente se encuentran en frascos de vidrio<sup>ee</sup> con tapones especiales] son llevados a la bomba a través de tubería de teflón. Estos solventes deben estar libres de aire disuelto<sup>ff</sup> y partículas<sup>gg</sup> por lo que es recomendable filtrarlos al vacío por membranas con porosidad de  $0.45\mu\text{m}$  o menor y degasificarlos con vacío<sup>hh</sup>, ultrasonificación y un constante burbujeo de helio.

<sup>ee</sup> También son utilizados frascos de policarbonato [para eluyentes polares] y polipropileno [para eluyentes no polares].

<sup>ff</sup> El aire disuelto puede provocar variaciones en la separación y en grandes cantidades puede formar burbujas que son depositadas en la bomba y provocan un flujo discontinuo e inexacto del solvente.

<sup>gg</sup> Las partículas que se encuentren en el solvente tienen un efecto abrasivo sobre las partes de la bomba además de depositarse a la entrada de la columna provocando un incremento en la presión por la obstrucción de los poros del empaque.

<sup>hh</sup> El vacío puede ser el mismo de la filtración y se obtienen óptimos resultados con vacío y ultrasonificación simultáneos.



4 Figura 1.22

una bomba —siendo mejor la que proporcione un flujo más constante y exacto—.

Una característica adicional de algunas bombas para cromatografía es la capacidad de tener un control electrónico externo, muy útil cuando se pretende tener gradientes controlados pero superflua cuando son utilizados métodos isocráticos.

Tres parámetros principales distinguen a las bombas para HPLC del resto de las bombas:

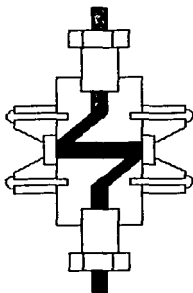
- ☞ Velocidad de flujo: 0.01 a 10 ml/min
- ☞ Velocidad de flujo estable (variación no mayor a 1%ii)
- ☞ Presión máxima hasta 6000 psi

El empaquado de una columna con partículas de diámetro pequeño requiere gran habilidad y equipo especializado por lo que es recomendable la utilización de columnas preempacadas a menos que se sea un cromatografista experto. Por lo general una columna de HPLC tiene un tiempo de duración muy largo a menos que sean utilizadas de una manera destructiva como podría ser el uso de eluyentes altamente ácidos o básicos o la inyección continua de muestras contaminadas biológicamente o muestras crudas.

ii No siempre es necesario un tamaño de partícula muy pequeño y —en separaciones sencillas— puede significar un ahorro el uso de partículas más grandes, lo que a su vez es menos demandante de presión podría ser suficiente el uso de una bomba no muy potente.

jj La variación en el flujo para SEC debe ser menor a 0.2%.

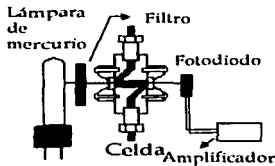
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



• <sup>9</sup> Figura 1.23  
pasando por la celda. Son también utilizados detectores de conductividad, electroquímicos<sup>ll</sup>, de electrolítica y de espectrometría de masas<sup>nn</sup>.

Actualmente los detectores más utilizados son ópticos: Hacen pasar un haz de luz a través de una celda de flujo continuo y volumen pequeño. Son monitoreadas —y mandadas al integrador (o computadora) como cambios en el voltaje de salida— las variaciones en la intensidad de la luz causadas por absorbanancia UV/<sup>kk</sup>vis, emisión de fluorescencia<sup>ll</sup> o cambio en el índice de refracción<sup>mm</sup>

—dependiendo del tipo de detector utilizado— de los componentes de la muestra al ir



• <sup>9</sup> Figura 1.24



• <sup>oo</sup> Figura 1.25

kk El detector que más avance ha tenido en los últimos años es el de arreglo de diodos, capaz de monitorear simultáneamente varias longitudes de onda desde 190 hasta 800 nm.

ll Los detectores de fluorescencia y electroquímicos son bastante sensibles (hasta  $10^{-15}$  M) pero también son muy selectivos.

mm El detector de índice de refracción es universal pero es el menos sensible.

nn El detector de espectrometría de masas es el más poderoso —puesto que permite detectar, cuantificar e identificar los componentes conforme van emergiendo de la columna— pero a la vez es el más caro y complicado.

oo Fuente: Rheodyne\_homepage. <http://www.rheodyne.com/index.html> 1996.

La introducción de la muestra en la columna puede llevarse a cabo de varias maneras —desde el uso de una válvula de inyección hasta inyectores automáticos con automuestreadores y controlados por un microprocesador—.

Las muestras líquidas pueden ser inyectadas directamente y las muestras sólidas solo necesitan disolverse en el solvente adecuado<sup>pp</sup>. El tamaño de la muestra puede variar desde nanogramos hasta 2 mg diluidos en 2 ml de solvente.

Como la señal producida por el detector es electrónica pueden ser utilizadas técnicas modernas de adquisición de datos para el almacenamiento digital de los cromatogramas y su posterior análisis ya sea por medio de un sencillo integrador o por medio de aplicaciones "inteligentes" en microcomputadoras, las cuales llevan acabo —además de la integración— análisis más complejos de los cromatogramas e inclusive llegan a automatizar el método desde el control de inyectores y bombas hasta el análisis cuantitativo de los componentes presentes en cada uno de los cromatogramas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

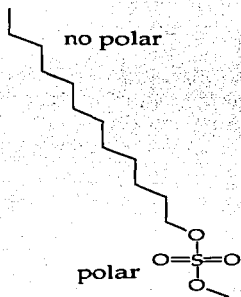
---

<sup>pp</sup> El solvente que contiene la muestra debe ser miscible con el eluyente y de preferencia ser el mismo eluyente el solvente para evitar interferencia en el sistema.

## III.2 PARTICULARIDADES

### III.2.1 Polaridad del Teepol HB7

La principal diferencia que presenta el análisis cromatográfico de detergentes con respecto a otras sustancias —polares o no polares— radica en las características anfífilas exclusivas de las primeras; de ahí que al tratar de hacer un análisis cromatográfico, sea cual sea el sistema utilizado, lo primero que se debe esperar son resultados inesperados.



Por ser una mezcla de alquilsulfatos  $C_9$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{11}$ ,  $C_{12}^{mm}$  y  $C_{13}$ ; el Teepol HB7 tiene una parte polar (sulfato) y una parte no polar. Esta característica común en todos los detergentes hace que se comporten de una manera diferente que las sustancias aniónicas, las polares y las no polares —en sus respectivos sistemas cromatográficos— por lo que los tiempos de retención pueden asimismo variar dependiendo de una multitud de factores además de los ya conocidos para sistemas cromatográficos ordinarios como son la afinidad simultánea hacia las fases polar y no polar o la concentración micelar crítica de los componentes individuales y de la mezcla tanto en la fase estacionaria como en la fase móvil.

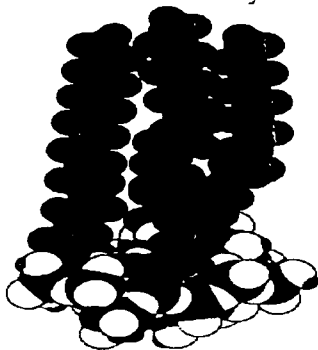
- mm Figura 2.1 Partes polar y no polar de un alquilsulfato.

mm En la figura 2.1 se muestra un alquilsulfato  $C_{12}$  (dodecilsulfato) por ser el más representativo de los componentes de Teepol HB7, haciendo notar que no es el único de los componentes presentes y que éstos no necesariamente tienen que ser lineales y saturados, es decir, no se descarta la posible presencia de cualquier tipo de isómeros estructurales —ya sea saturados o no saturados— en cualquier proporción dentro de la formulación; siempre y cuando sean alquilsulfatos  $C_9$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{11}$ ,  $C_{12}$  ó  $C_{13}$ .

### III.2.2 Sistemas cromatográficos teóricamente adecuados

De entre las fases estacionarias más recomendables para la separación de los componentes del Teepol HB7 se encuentran la de fase reversa y la de intercambio aniónico, cada una de ellas con diferente afinidad hacia los componentes de la mezcla.

El primer sistema cromatográfico que sería recomendable utilizar para el análisis del Teepol HB7 es la fase reversa, en la que las cadenas de 9 a 13 átomos de carbono de los componentes de la muestra son las que son afines a la fase estacionaria (no polar) y al utilizar una fase móvil polar, éstas van siendo eluidas de acuerdo a su polaridad, de tal manera que las moléculas más polares van a ser las primeras en salir de la columna y las menos polares van a tener una mayor retención por la fase estacionaria.

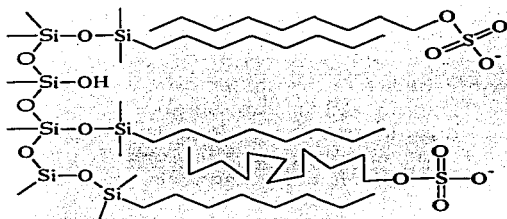


En la actualidad, las columnas de fase reversa tienen un empaque formado por una base de sílica y grupos no polares [principalmente  $C_8$  y  $C_{18}$ ] unidos a ésta base por enlaces covalentes; de tal manera que al tener una suficiente densidad de moléculas no polares enlazadas a la base de sílica, la polaridad de ésta es enmascarada por la no polaridad de los grupos que se encuentran en toda la superficie de las partículas, obteniendo de esta manera una fase reversa virtual cuyo comportamiento —en la mayoría de los casos— es equiparable al de las fases reversas tradicionales.

- <sup>m</sup> Figura 2.2 Moléculas  $C_{18}$  que son enlazadas a la base de sílica.

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Con la tecnología más reciente las partículas de sílica<sup>nn</sup> tienen un tamaño controlado, forma esférica y métodos especiales para obtener un empaque lo más compacto y uniforme posible; por lo que el término A de la ecuación de Van deemter en todas las columnas de sílica o de fase enlazada<sup>oo</sup> que utilicen esta tecnología deben ser notablemente superiores en su desempeño con respecto a columnas que lleven en su interior empaques ordinarios<sup>pp</sup>.



• *Figura 2.3 Teepol HB7 en una columna Nova-Pak C<sub>8</sub>*

de manera que, al pasar un eluyente polar por éste sistema las moléculas con cadenas de 9 átomos de carbono [al ser las menos fuertemente retenidas por la fase estacionaria] serán las primeras en ser desprendidas de la fase estacionaria y ser arrastradas por la fase móvil hasta el fin de la columna, las moléculas de 13 átomos de carbono [las más fuertemente retenidas por la fase estacionaria] tardarán mas tiempo en ser arrastradas por la fase móvil y serán las últimas en salir de la columna.

Puede ser utilizada para la separación una columna Nova-Pak<sup>qq</sup> C<sub>8</sub> (partículas esféricas de sílica con diámetros de 4 µm y con grupos C<sub>8</sub> enlazados) en cuya superficie serán adsorbidas las cadenas de 9 a 13 átomos de carbono del Teepol HB7,

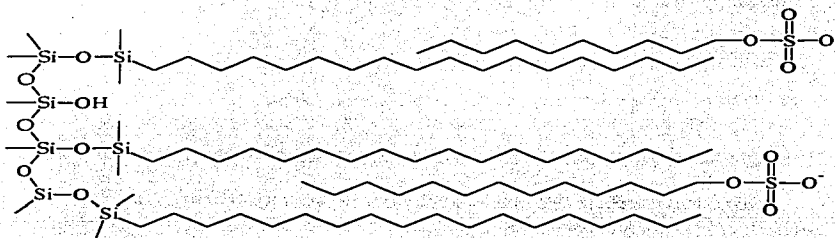
nn Últimamente se utiliza también la alúmina para la fabricación de micropartículas esféricas de tamaño controlado con distribución uniforme que sirvan como base para la elaboración de empaques de fase enlazada<sup>oo</sup>.

oo Con el término Fase Enlazada han sido llamadas todas las moléculas que son enlazadas covalentemente a una base de sílica<sup>nn</sup> (independientemente de su polaridad) para de esta manera modificar las propiedades cromatográficas de la base (imponiendo las suyas) conservando —sin embargo— las propiedades de partícula del empaque.

pp Las especificaciones detalladas de los empaques cromatográficos se encuentran en el Capítulo I, bajo el subtítulo "HPLC vs cromatografía tradicional". Página 25.

qq Nova-Pak es una marca registrada de Waters Corporation.

Al utilizar una columna Nova-Pak  $C_{18}$  (partículas esféricas de sílica con diámetros de  $4\ \mu\text{m}$  y con grupos  $C_{18}$  enlazados) de una manera similar a la anterior se tendrá una mayor retención de las moléculas del tensoactivo en la fase estacionaria, con lo cual se puede tener una mejor resolución pero al mismo tiempo se incrementa el tiempo de análisis (parámetros que deben ser evaluados experimentalmente). El orden de elución de los diferentes componentes de la mezcla debe ser el mismo que en la columna  $C_8$  para un sistema de fase reversa.



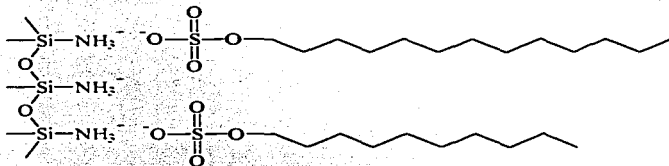
• Figura 2.4 Teepol HB7 en una columna Nova-Pak  $C_{18}$

Un intercambiador aniónico fuerte podría proporcionar una interacción suficientemente fuerte entre los grupos  $-R^+$  de la resina aniónica y los grupos sulfato de los componentes del Teepol HB7. Una interacción similar resultaría de la utilización de la columna  $\mu\text{Bondapak NH}_2$  en medio ácido. Aunque se podría esperar una mejor separación entre los diferentes componentes anfífilos al pasar por una columna con intercambiador aniónico fuerte, al carecer de este último tipo de columna, las mejores opciones disponibles para la separación —por su parte polar— de los componentes del Teepol HB7 son las dos siguientes:



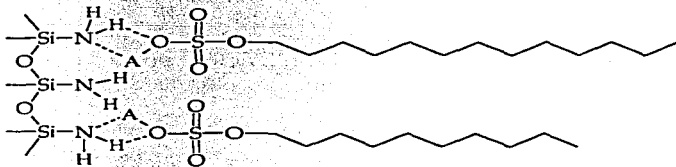
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La primera opción de este tipo puede ser la que tiene como fase estacionaria una columna  $\mu$ Bondapak<sup>rr</sup> NH<sub>2</sub> (partículas de sílica con un tamaño de 10  $\mu$ m y forma irregular, con grupos NH<sub>2</sub> enlazados a su superficie) [intercambiador aniónico débil] y una fase móvil ácida —provoca la protonación de los grupos amino de la fase estacionaria por lo que la vuelve intercambiador aniónico fuerte (virtual)—.



• Figura 2.5 Teepol HB7 en una columna  $\mu$ Bondapak NH<sub>2</sub> [en medio ácido]

Una variación de este sistema —recomendada por algunas fuentes bibliográficas— es el utilizar una fase móvil no polar de modo que el equilibrio se establezca entre un intercambiador aniónico débil y una fase móvil no polar que no sea muy afín al Teepol HB7.



• Figura 2.6 Teepol HB7 en una columna  $\mu$ Bondapak NH<sub>2</sub> [en medio no polar]

En esta última variación del sistema de intercambio aniónico para la separación de los componentes del Teepol HB7 se tiene una interacción muy débil entre éstos y la fase estacionaria y, a la vez, una interacción muy fuerte entre los mismos y la fase móvil por lo que sería de esperarse que los componentes de la mezcla salgan muy rápido de la columna y por lo tanto no tengan una muy buena resolución. Todo lo anterior dependiendo de la fuerza del eluyente y de las variaciones en el sistema podrían resultar experimentalmente en una buena separación.

Por último podría ser tomado como criterio de separación cromatográfica el tamaño de las moléculas de Teepol HB7; al pasar las moléculas de la mezcla por un gel de porosidad constante las más pequeñas se van atascando en los poros por impedimento estérico mientras que las moléculas de mayor tamaño fluyen por la parte externa de los mismos poros, de tal manera que se obtiene un orden de elución que comienza con las moléculas de mayor volumen y termina al ser eluidas las de menor tamaño<sup>ss</sup>. Al ser moléculas pequeñas y muy parecidas, cuyos pesos moleculares podrían variar entre 246.29 y 302.4<sup>tt</sup> por lo que su diferencia es menor a una unidad logarítmica se tendrían dos problemas: el primero de ellos, un tiempo de retención exageradamente largo por el tamaño tan pequeño de las moléculas y el segundo, una separación muy pobre al haber tantas moléculas distintas dentro de una misma unidad logarítmica de peso molecular. Es, por lo tanto, no recomendable la utilización de este sistema para el análisis del Teepol HB7.

Tomando en cuenta las consideraciones sobre los sistemas cromatográficos ideales para la separación de los componentes del Teepol HB7 es necesario probar cada uno de ellos experimentalmente con diferentes tipos de fases móviles para determinar cual es el más adecuado.

---

<sup>ss</sup> Una molécula de alquilsulfato solo puede tener un mayor peso molecular al incrementar el tamaño de su cadena de átomos de carbono, condición que asimismo le hace ocupar un mayor volumen.

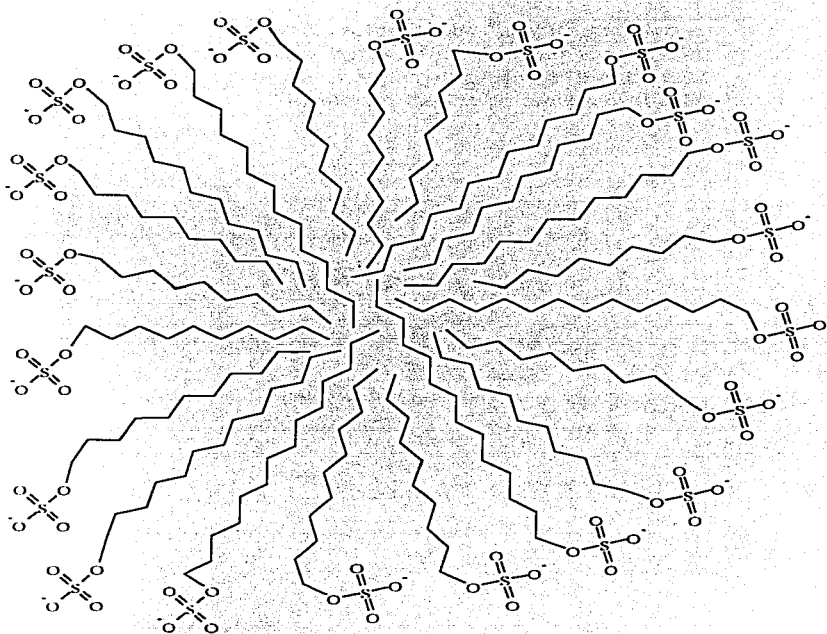
<sup>tt</sup> Estos pesos moleculares fueron calculados despreciando posibles insaturaciones.

### III.2.3 Interacciones micelares

Debe hacerse notar el hecho de que al ser un agente tensoactivo, al rebasar una concentración micelar crítica el Teepol HB7 tenderá a la formación de micelas y aunque la concentración del tensoactivo sea inferior, existe la posibilidad de que al haber una mayor concentración en las cercanías de la superficie de la fase estacionaria, esta sea suficiente para la formación de micelas cuyas propiedades serían definitivamente distintas a las de las moléculas libres, lo que a la vez puede dar lugar a un sin número de combinaciones posibles entre las concentraciones de micelas y moléculas libres, cada una con distintas propiedades cromatográficas [por lo tanto distintos tiempos de retención], de ahí que ésta sea una variable más a tomar en cuenta en el desarrollo del método ya sea minimizando la posibilidad de alcanzar la concentración micelar crítica [minimizando la concentración del tensoactivo en la muestra] o eliminando el resto de las variables que pudieren interferir en los cromatogramas [volviéndose con ello un sistema constante en el que se tendría siempre la misma proporción de micelas y moléculas libres].

Si la fase móvil es polar, muy seguramente han de formarse micelas polares para proteger las partes no polares [de cada una de las moléculas del Teepol HB7] de las interacciones hidrofóbicas que estas puedan tener hacia la fase móvil. Si la fase estacionaria es no polar puede haber dos tipos de equilibrio termodinámico: uno entre las moléculas unidas a la fase estacionaria [ya sea por puentes de hidrógeno o por enlaces iónicos o dipolo—dipolo] y las moléculas solvatadas en la fase móvil, el otro equilibrio será entonces el formado por las micelas en la fase estacionaria y las micelas en la fase móvil. Las micelas —polares— formadas tienen por lo tanto tiempos de retención mucho menores que las moléculas libres, las cuales a su vez tienden a formar micelas.

Si las fases móvil y estacionaria son ambas polares, las micelas que se forman son obviamente polares pero, a diferencia del sistema anterior, éstas tienen tiempos de retención mayores que las moléculas libres.



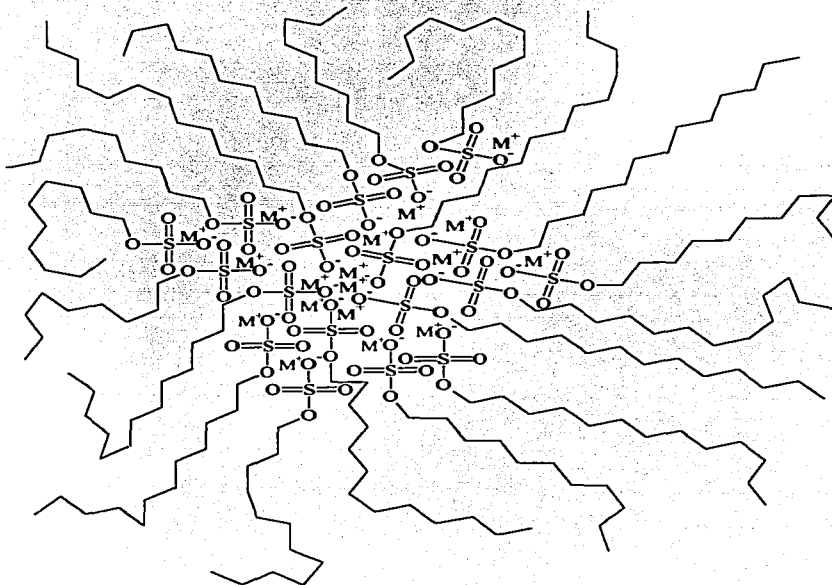
• *Figura 2.7 Micela (polar) de Teepol HB7*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

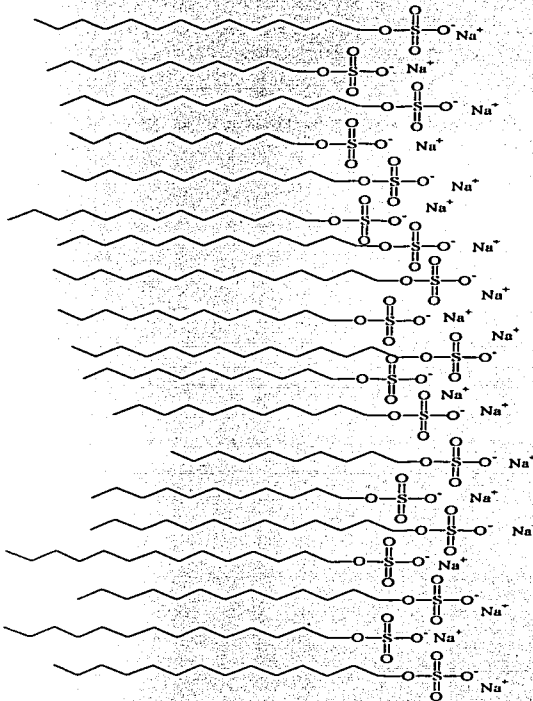
En ambos casos la presencia de micelas en el sistema y el equilibrio entre moléculas libres y moléculas que forman micelas dan lugar a un ensanchamiento de los picos por el hecho de que una misma molécula pueda tener velocidades distintas al estar libre y al formar parte de una micela.

De una manera similar, al cambiar la fase móvil a no polar se formarían micelas no polares con tiempos de retención distintos a los de las moléculas libres [menores para fases estacionarias polares y mayores para fases estacionarias no polares].



• Figura 2.8 Micela (no polar) de Teepol HB7

Existe una consideración mas a tomarse en cuenta: la posibilidad de la formación de una monocapa del tensoactivo en la interfase polar—no polar.



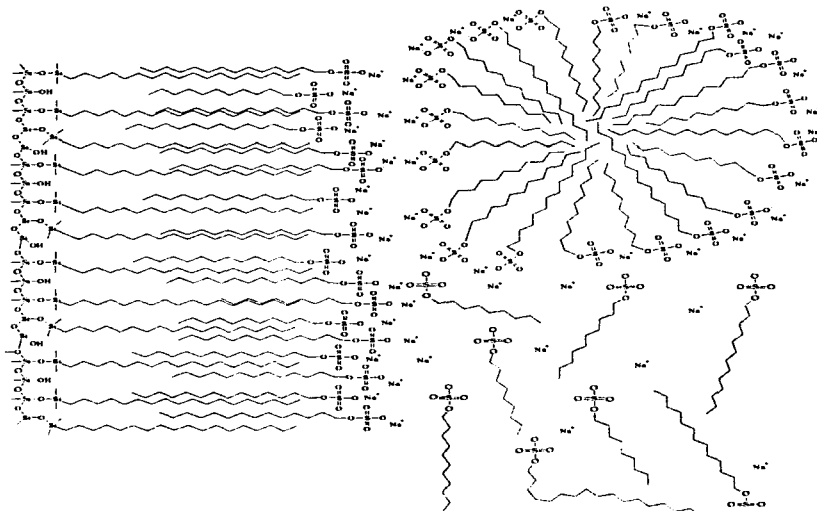
• Figura 2.9 Monocapa de Teepol HB7

micelas y las moléculas libres. Un equilibrio similar se encontraría al tener una fase móvil no polar y una fase estacionaria polar.

En el caso de que se tenga una fase móvil polar y una fase estacionaria no polar, al tenerse concentraciones mayores del tensoactivo en las cercanías de la fase estacionaria, no solo se podría llegar a la concentración micelar crítica, sino que también podría formarse una monocapa del tensoactivo orientando sus partes no polares hacia la fase estacionaria no polar y sus partes polares hacia la fase móvil polar. Puede entonces hablarse de un equilibrio entre las moléculas en la monocapa y las moléculas en la fase móvil y otro equilibrio entre las moléculas que se encuentran formando

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Podría incluso existir en algún momento una región de intercambio en la que coexistan moléculas formando una monocapa [o multicapas de una manera similar al fenómeno de solvatación], micelas y moléculas libres, teniendo un equilibrio compuesto en el que intervengan los equilibrios entre moléculas libres y moléculas formando micelas, moléculas en la fase móvil y moléculas en la fase estacionaria, moléculas entre una y otra capa del tensoactivo que se encuentren rodeando a la fase estacionaria, moléculas protonadas y moléculas no protonadas, etc.



• *Figura 2.10 Equilibrio del Teepol HB7 en una columna Nova-Pak C<sub>18</sub> con fase móvil polar*

Resulta de utilidad hacer notar el hecho de que al formarse una monocapa del tensoactivo sobre la fase estacionaria se formaría un sistema líquido—líquido con características de polaridad opuestas a las de la fase estacionaria original (una fase estacionaria no polar cambiaría a polar y viceversa). Si bien una fase estacionaria enlazada es considerada como un sistema líquido—líquido basándose en sus características de fluidez virtual, ésta fluidez se vería incrementada al tener una monocapa de moléculas que pudieran fluir libremente en la interfase formada entre la fase móvil y la fase estacionaria, no obteniendo con ello una concentración definida de la muestra en la fase estacionaria sino, como en la cromatografía sólido—líquido, únicamente una concentración de la muestra en la superficie de la fase estacionaria —ó si acaso, una ligera penetración de la muestra en ésta—.

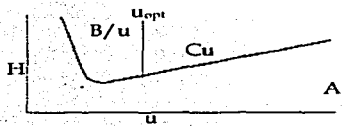
Al tomar en cuenta el flujo de la muestra a través de la columna cromatográfica puede llegar a esperarse la aparición de cualquiera de las consideraciones ya mencionadas en cualquier etapa del proceso cromatográfico o una combinación de las mismas y cuya duración debiera ser únicamente el tiempo que tardara la muestra en pasar por la zona de la columna en donde se presente la interacción; pero como al ir avanzando la muestra por la columna entra a nuevas zonas en las cuales se vuelve a presentar el mismo fenómeno, la duración del fenómeno sería la integración de las diferenciales de tiempo que toma a la muestra pasar por una zona de tamaño diferencial [siempre y cuando se mantengan las condiciones que propicien dicho fenómeno]. Dependiendo del desplazamiento del equilibrio que se tenga (hacia soluto solvatado, hacia micelas o hacia una monocapa interfásial) podría en algún momento obtenerse cierta reproducibilidad y repetibilidad en eluciones que fueran llevadas a cabo bajo las mismas circunstancias (en una función con variables dependientes del empaque de la columna, de las propiedades de la fase móvil y de las propiedades de la fase estacionaria).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Si se tiene una función con variables dependientes de las características del empaque, las características de la fase estacionaria y las características de la fase móvil el problema de encontrar un sistema cromatográfico ideal puede ser resuelto de una manera similar a como es resuelto el problema de la ecuación de Van deemter  $H = A + B/u + Cu$ : Experimentalmente debe obtenerse un



empaque ideal que minimice la variable  $A$  y un flujo óptimo en el que la suma de  $B/u$  y  $Cu$  sea también mínima y de esta manera el sistema cromatográfico tenga el máximo número de platos teóricos posible.

• Figura 2.11 Velocidad óptima

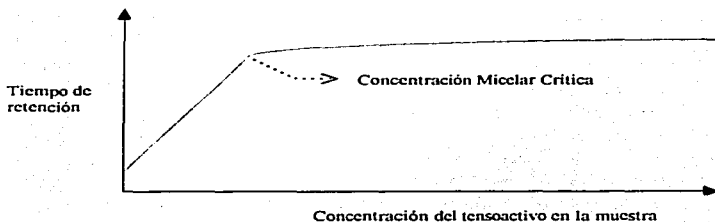
### III.2.3.1 TIEMPO DE RETENCIÓN COMO FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

Con base en el modelo de la figura 2.10, al no tener el detergente una concentración superior a la micelar crítica, sus moléculas se encuentran en estado libre. Como ya fue explicado con anterioridad, en la superficie del adsorbente se forma una monocapa de las moléculas del tensoactivo que actúa como una segunda fase estacionaria [equivalente a la cromatografía líquido - líquido] temporal y en sus cercanías una mayor concentración de tensoactivo, de tal manera que se puede alcanzar la concentración micelar crítica.

El efecto que tiene el hecho de que se alcance la concentración micelar crítica en las cercanías de la fase estacionaria tiene que ver con el hecho de que las micelas son retenidas con más fuerza [por la monocapa de tensoactivo en la fase estacionaria] que las moléculas libres; por esto, una muestra con una concentración muy baja del tensoactivo [que no sea suficiente para formar micelas en las cercanías de la fase estacionaria] tendrá un tiempo de retención mínimo ya que el único equilibrio involucrado es el de la cromatografía tradicional: moléculas adsorbidas vs moléculas libres. Al ir incrementando la concentración del tensoactivo en las muestras se va incrementando también la frecuencia con que se forman micelas, por lo que también se va incrementando el tiempo de retención hasta llegar a un punto de equilibrio en que sea alcanzada la concentración micelar crítica en la muestra y se encuentren micelas en una proporción mucho mayor que las moléculas libres para que de esta manera la mayor concentración del tensoactivo en las cercanías de la fase estacionaria no afecte significativamente el equilibrio micelar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



• Figura 2.12 Concentración vs  $t_r$

Se puede observar que para concentraciones bajas el incremento tiene una pendiente muy elevada por la sensibilidad que se tiene en estas concentraciones a la variación en los tiempos de retención por la presencia de micelas cercanas a la fase estacionaria, por el contrario, al rebasar la concentración micelar crítica en la muestra, el incremento en los tiempos de retención tiende a nulificarse dado que la concentración micelar cerca de la fase estacionaria ya no es afectada significativamente por la concentración del tensioactivo.

SZ-A

Capítulo IV

---

## **ESTUDIO PROTOTIPO**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CAPÍTULO IV

### ESTUDIO PROTOTIPO

El hecho de analizar un detergente —como ya se ha discutido— no incluye únicamente el hecho ortodoxo de detectar, aislar, separar, identificar y cuantificar los componentes de la mezcla de tensoactivos; sino que involucra, además, toda la problemática generada por el comportamiento anfifílico de éstos y su tendencia a la formación de micelas, las cuales además de perturbar el equilibrio del sistema cromatográfico acarrear en su interior sustancias contaminantes cuya presencia de ninguna manera es deseable en el momento que pasan por el detector las sustancias tensoactivas que se desea cuantificar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IV.1 Trabajo Previo

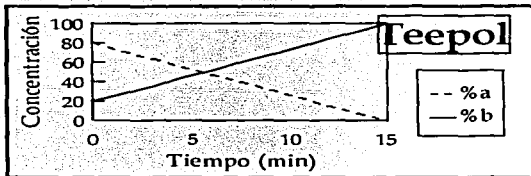
Con base en las especificaciones puede manejarse la muestra de Teepol HB7 como si fuera una solución del detergente puro despreciando la presencia de aditivos por estar en muy bajas concentraciones. Lo anterior simplifica el hecho de detectar y aislar el tensoactivo previo a su cuantificación [como lo indicaría el paradigma para el análisis de detergentes].

Tomando en cuenta lo anterior, el siguiente paso en el paradigma para el análisis de detergentes es la separación de los componentes de la mezcla de tensoactivos [alquilsulfatos], para lo cual se habían llevado a cabo previamente algunos intentos de separar los componentes del Teepol HB7, con resultados no muy convincentes.

El método inicial consistió en una elución gradiente de una inyección de 20 $\mu$ l de Teepol al 2.5%, utilizando acetonitrilo-agua, incrementándose la concentración del acetonitrilo linealmente durante 15 minutos desde 20% hasta 100%, con un flujo de 1ml/min.

Nombre:	Teepol	
Tiempo (min)	% a <sup>uw</sup>	% b <sup>uw</sup>
0	80	20
15	0	100

• Tabla 3.1



• Gráfica 3.1

<sup>uw</sup> Por convención, cuando se tienen sistemas con más de un eluyente, para referirse a cada uno de ellos se utilizan letras del alfabeto, cuyo orden creciente corresponde a un incremento en su fuerza según el tipo específico de cromatografía en que se vean involucrados. Para este caso particular %a corresponde al porcentaje de agua (solvente débil) en la composición del eluyente y %b corresponde al porcentaje de acetonitrilo (solvente fuerte) en la composición del mismo eluyente.

Con este gradiente se obtuvo una separación<sup>vv</sup> no satisfactoria de los componentes del Teepol HB7 con la utilización de una columna Nova-Pak C<sub>8</sub><sup>qq,ww</sup> de 3.9mm de diámetro por 75mm de largo, ya que se pudo observar en el cromatograma resultante una pendiente muy pronunciada que —además de una mala separación de los componentes— dificultaba la integración de los picos obtenidos.

Las condiciones finales al término del gradiente eran distintas de las iniciales, por lo que se necesitaba un ajuste manual en el flujo de las bombas del cromatógrafo para volver a llegar a las condiciones iniciales y poder inyectar una nueva muestra.

Por otro lado, se requirieron ajustes<sup>xx</sup> en la forma del gradiente para obtener una mejor separación de los componentes.

Por la enorme posibilidad de combinaciones que se pueden presentar en un gradiente para tratar de separar los picos y ante la carencia de métodos para el desarrollo de eluciones gradientes se recurre a hacer aproximaciones sucesivas a un sistema gradiente ideal por el método de prueba y error. Se llega al “gradiente ideal” cuando ya no es posible obtener una mejor separación haciendo modificaciones al gradiente y esta separación es satisfactoria.

<sup>vv</sup> Si la separación no es buena, los componentes de la mezcla se eluyen juntos en un determinado tiempo, por lo que el cromatograma muestra picos sobrepuestos que son difíciles de integrar.

<sup>qq</sup> Nova-Pak es marca registrada de Waters Corporation.

<sup>ww</sup> El término C<sub>8</sub> en una columna significa que ésta es de fase reversa enlazada cuyos grupos funcionales son cadenas de ocho átomos de carbono.

<sup>xx</sup> Estos ajustes se logran usualmente alargando el tiempo que dura el gradiente para de esta manera separar los picos lo más posible —sin que éstos lleguen a achatars—, al mismo tiempo que se incrementa la fuerza del eluyente para afinar los picos —sin que éstos se peguen nuevamente—.

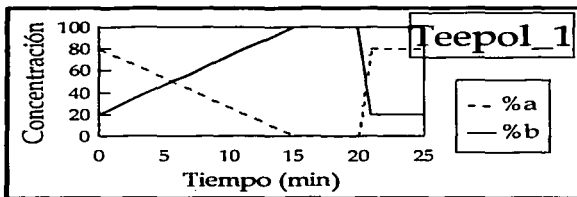
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IV.2 Columna Nova-Pak C<sub>8</sub> de 3.9mm(ID)<sup>\*\*</sup> x 75mm

Siendo Nova-Pak C<sub>8</sub> de 3.9mm (ID) por 75mm el tipo de columna que se utilizó para esta separación, fue conveniente seguir empleando ese mismo tipo de columna para la separación — haciendo los ajustes pertinentes—. El primer ajuste que se le hizo al gradiente fue regresarlo a las condiciones iniciales al término de la elución:

Nombre:	Teepol_1	
Tiempo (min)	%a	%b
0	80	20
15	0	100
20	0	100
21	80	20
25	80	20

• Tabla 3.2



• Gráfica 3.2

De esta manera se alcanzó a observar

— en el cromatograma — el final del gradiente con algunos picos que no se observaban en el gradiente anterior y posteriormente el regreso a las condiciones iniciales de elución.

Posteriormente se realizaron los ajustes en la longitud del tiempo del gradiente y en la fuerza del disolvente:

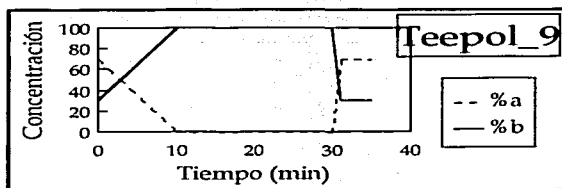
El cromatograma Teepol\_9 muestra todos los picos producidos por el Teepol HB7 y una prolongación de la elución con 100% de acetonitrilo, lo que demuestra que no hay mas componentes que sean eluidos después de que se alcanza la concentración de 100% de acetonitrilo.

\*\* ID significa para este caso diámetro interno (Internal Diameter). Este término es utilizado en la bibliografía de los proveedores de columnas cromatográficas para especificar el diámetro interno de las mismas. El otro parámetro especificado en milímetros corresponde a la longitud de la columna.

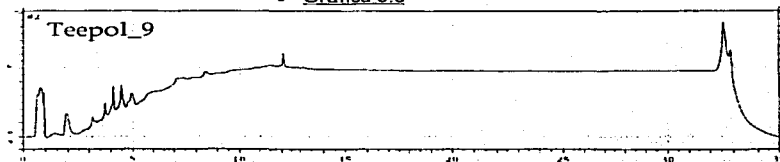


Nombre:	Teepol_9	
Tiempo (min)	%a	%b
0	70	30
10	0	100
30	0	100
31	70	30
35	70	30

• Tabla 3.3



• Gráfica 3.3



• Cromatograma 3.1

Se hicieron repeticiones de distintos gradientes para tratar de obtener primero la mayor selectividad<sup>zz</sup> y posteriormente la mayor resolución<sup>aaa</sup>.

También se hicieron gradientes con pendiente cóncava, de tal modo que los picos se encontrasen perfectamente bien separados y pudiera entonces trazarse una línea recta muy cercana a sus bases, lo que facilitaría la integración<sup>bbb</sup>.

<sup>zz</sup> Selectividad:  $\alpha = \frac{K'_2}{K'_1}$  Ver capítulo 1 página 16.

<sup>aaa</sup> Resolución:  $R = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K'_2}{1 + K'_2}$  Ver capítulo 1 página 17.

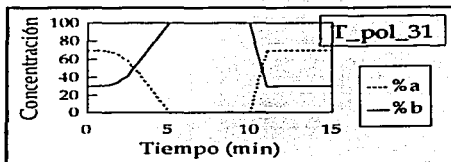
<sup>bbb</sup> Véase la línea recta dibujada en la base de los picos del cromatograma 3.7.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

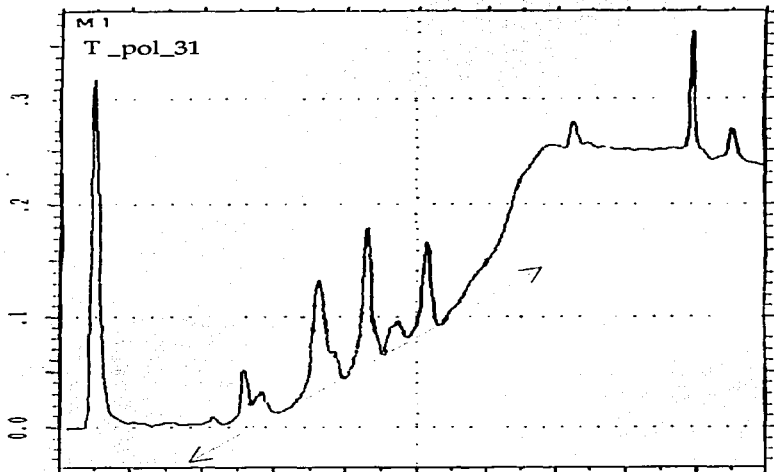
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Nombre: T_pol_31			
Tiempo (min)	%a	%b	curva
0	70	30	
3	45	55	-5
5	0	100	
10	0	100	
11	70	30	
15	70	30	

• Tabla 3.4



• Gráfica 3.4



• Cromatograma 3.2

Pudo entonces encontrarse el gradiente ideal<sup>ccc</sup> para la columna Nova-pak C<sub>8</sub> de 3.9mm (ID) x 75mm, correspondiente al gradiente T\_pol\_31, con un flujo de eluyente igual a 1.2 ml/min.

No obstante el gradiente ideal, la resolución no fue suficiente en esta columna como para poder separar todos los componentes de la mezcla de tensoactivos<sup>ddd</sup> del Teepol HB7, puesto que algunos de los picos que se lograron separar eran dobletes [conjuntos de dos o más picos que se encontraban colapsados], lo cual indicó —después de llegar a un punto cercano a la  $u_{opt}$ <sup>ccc</sup>— que el número de platos teóricos en la columna utilizada fue insuficiente.

---

<sup>ccc</sup> El segundo grupo de picos se ha pasado por alto en un intento de primero obtener la máxima separación en el primer grupo de picos para que los cambios en esta zona del gradiente puedan entonces mantenerse constantes y no afecten los cambios que se lleven a cabo en la segunda parte del gradiente.

<sup>ddd</sup> La mezcla de tensoactivos del Teepol HB7 corresponde a alquilsulfatos de 9 a 13 átomos de carbono.

<sup>ccc</sup>  $u_{opt}$  es la velocidad óptima en donde un sistema cromatográfico isocrático proporciona una mejor separación. Para el caso de las eluciones gradientes el término  $u_{opt}$  equivaldría al punto en el cual la fuerza del eluyente es suficiente para obtener una máxima separación de los picos, sin que estos se achaten. Estaríamos hablando de las mismas consecuencias, pero en la cromatografía isocrática provocadas por la velocidad del eluyente y en la cromatografía gradiente por la fuerza del mismo.

### IV.3 Columna Nova-Pak C<sub>8</sub> de 3.9mm(ID) x 150mm

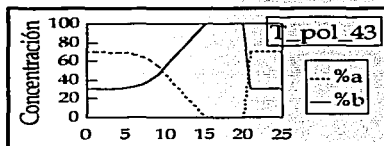
Con el fin de incrementar el número de platos teóricos se colocaron en serie dos columnas Nova-Pak C<sub>8</sub> de 3.9mm ID x 7.5mm, esperando un incremento en el número de platos teóricos casi del doble. De esta manera se esperaba una mejor separación de los picos —incluyendo los que aún se encontraban traslapados— sin que éstos perdieran tanta altura como en las separaciones anteriores en las que se empleaba un número menor de platos teóricos. Se realizaron algunas eluciones con estas dos columnas para probar el incremento en el número de platos teóricos.

Para evitar el volumen muerto que se forma en la unión entre las dos columnas<sup>fff</sup> éstas se reemplazaron por una única columna Nova-Pak C<sub>8</sub> 3.9mm ID x 15cm para ser utilizada en los siguientes gradientes.

El cromatograma T\_pol\_43 es el gradiente ideal para este tipo de columna.

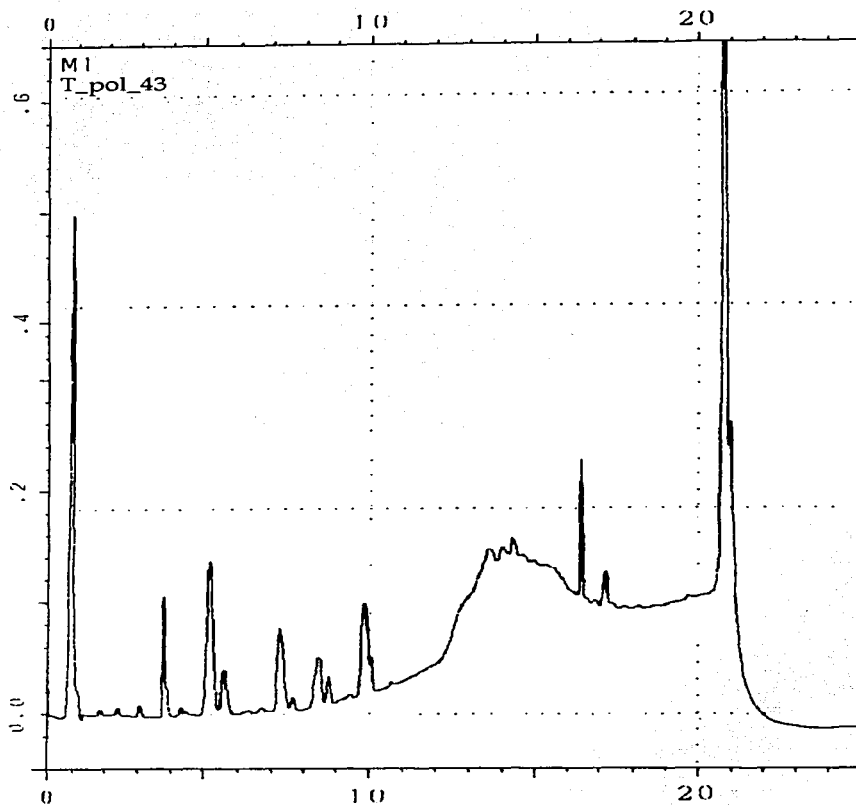
Nombre:	T_pol_43		
Tiempo (min)	%a	%b	curva
0	70	30	
10	45	55	-7
15	0	100	
20	0	100	
21	70	30	
25	70	30	

• Tabla 3.5



• Gráfica 3.5

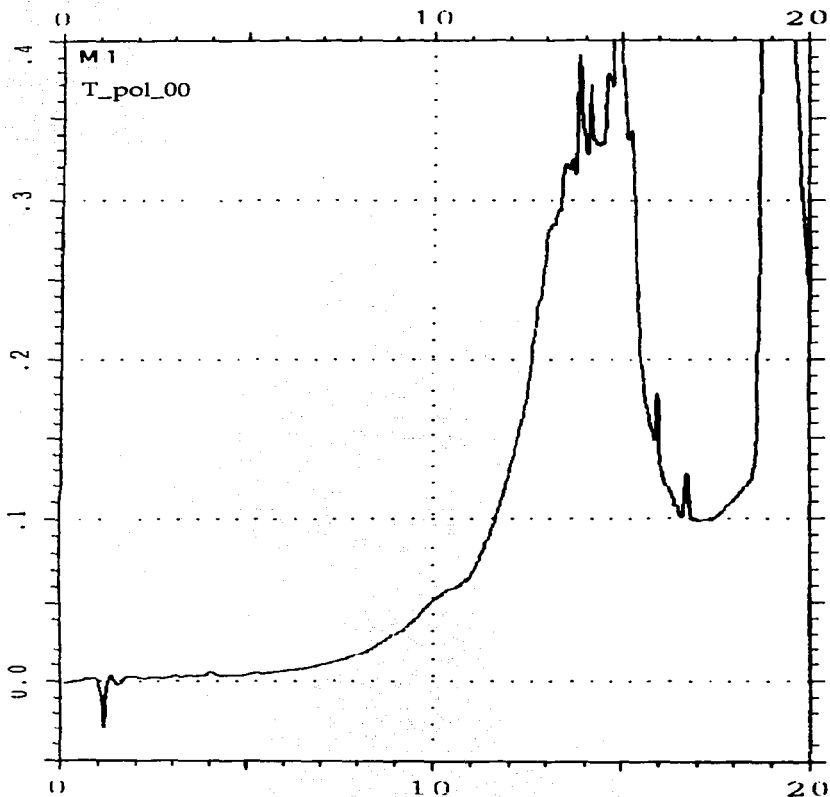
<sup>fff</sup> El volumen muerto entre las dos columnas permite la difusión en los componentes de la mezcla que van siendo separados, de modo que los picos vuelven a achatarse y a traslaparse en sus extremos [se revierte parcialmente la separación].



• Cromatograma 3.3

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



• Cromatograma 3.4

El cromatograma T\_pol\_00 corresponde a una inyección de agua. Los picos correspondientes al segundo grupo – grupo que no se había tomado en cuenta – aparecen independientemente de la presencia o ausencia de Teepol HB7, por lo tanto estos picos no pertenecen al Teepol HB7 sino al sistema de elución y no deben ser tomados en cuenta en resultados posteriores.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### IV.4 Optimización

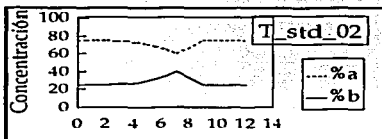
Tomando en cuenta que el segundo grupo de picos de los anteriores cromatogramas no corresponde al Teepol HB7 sino a ruido presente en el sistema cromatográfico, se decidió recortar el gradiente de modo que éste no llegue a una concentración de 100% acetonitrilo, sino únicamente a la concentración suficiente para la elución del primer grupo de picos (grupo de interés [por contener Teepol HB7]), concentración que es aproximada al 50% de acetonitrilo.

Fue reducida la concentración del Teepol utilizada de 2.5% a 1% por comodidad al momento de hacer las diluciones.

Después de una serie de pruebas con diferentes gradientes cuya concentración de acetonitrilo no excede el 50% se llegó a un nuevo gradiente ideal.

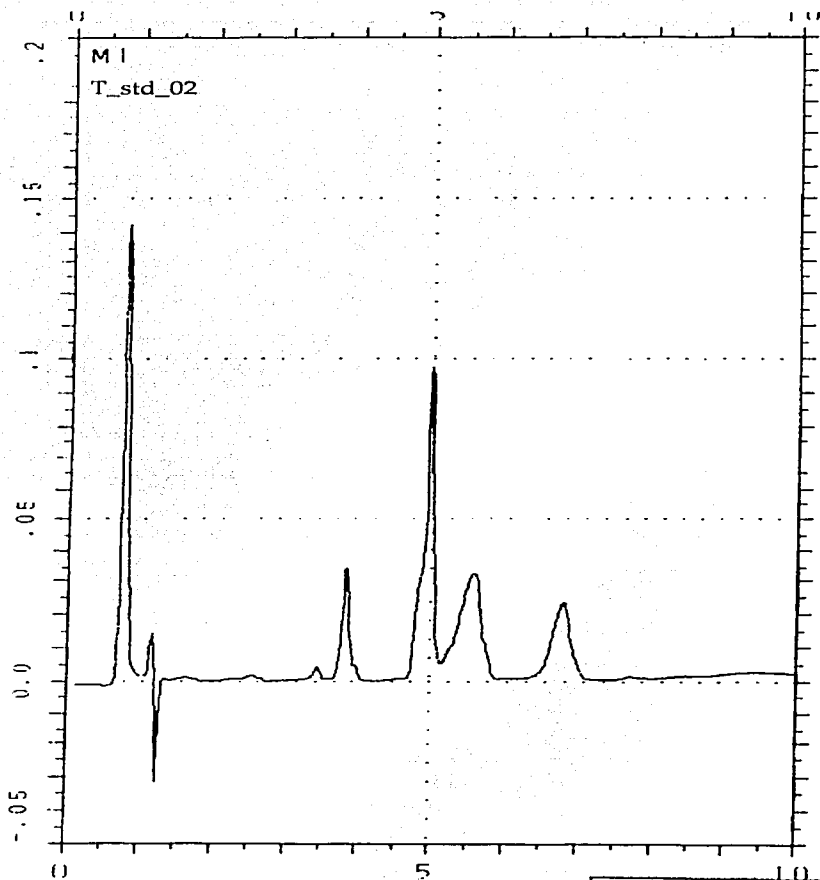
Nombre:	T_std_02		
Tiempo (min)	%a	%b	curva
0	75	25	
7	60	40	-5
9	75	25	
12	75	25	

• Tabla 3.6



• Gráfica 3.6



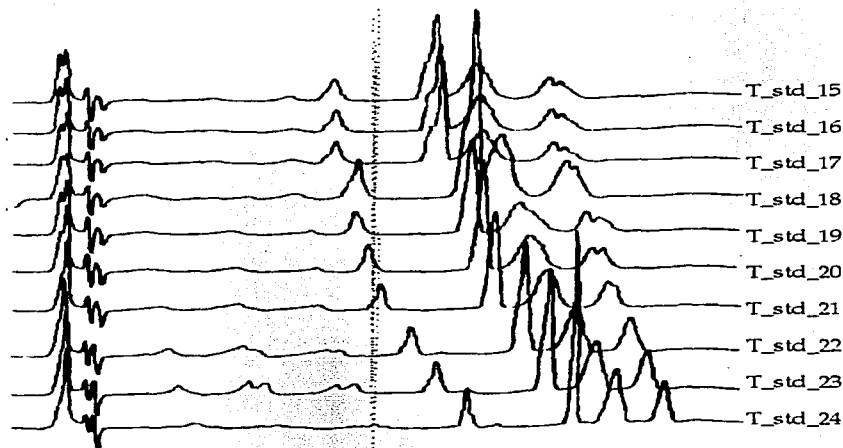


• Cromatograma 3.5

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Con base en este gradiente ideal fueron hechas pruebas de repetibilidad.

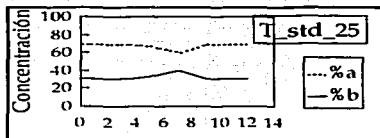


• Cromatograma 3.6

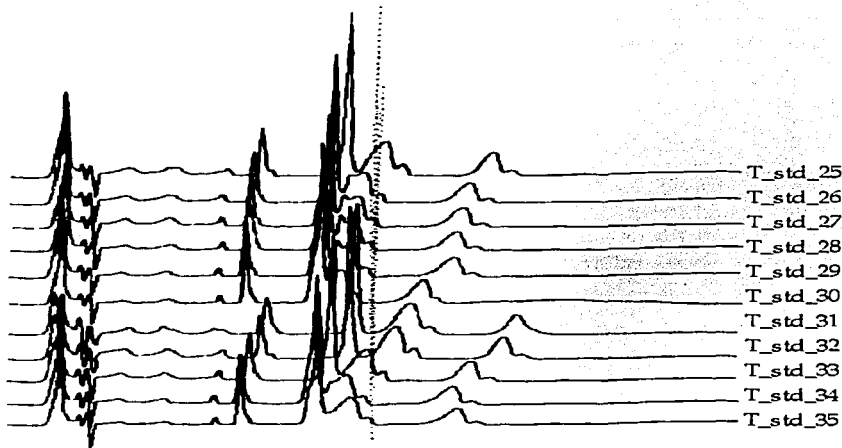
Los cromatogramas T\_std\_15 a T\_std\_24 muestran la no repetibilidad de los tiempos de retención con la utilización del gradiente T\_std\_02. Con base en este resultado negativo se modificó el gradiente anterior para tratar de mejorar la repetibilidad al aumentar la fuerza del gradiente.

Nombre:	T_std_25	
Tiempo (min)	%a	%b curva
0	70	30
7	60	40 -5
9	70	30
12	70	30

• Tabla 3.7



• Gráfica 3.7

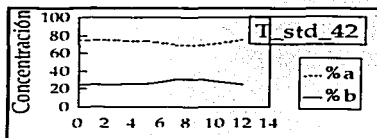


• Cromatograma 3.7

En los cromatogramas T\_std\_25 a T\_std\_35 tampoco se observan tiempos de retención repetibles. Tuvieron que hacerse varias series de eluciones más para descartar las variables que pudiesen ocasionar la variabilidad en los tiempos de retención hasta quedar como última variable las válvulas check de las bombas; por lo que éstas fueron primero lavadas y luego —al no ser suficiente la mejoría— cambiadas obteniéndose así tiempos de retención aceptablemente repetibles.

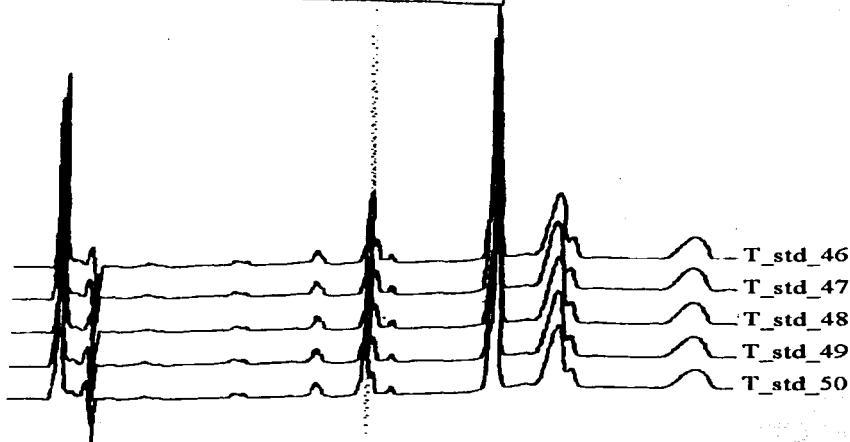
Nombre:	T_std_42	
Tiempo (min)	%a	%b curva
0	75	25
5	70	30 -5
7	70	30
9	75	25
12	75	25

• Tabla 3.8



• Gráfica 3.8

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

• Cromatograma 3.8

Una vez obtenida la repetibilidad en los tiempos de retención se trazó una curva de calibración tomando como estándar una muestra arbitraria de Teepol HB7 para ser tomada como referencia su concentración de tensoactivo una vez calculada ésta. No se empleó esta curva de calibración puesto que se presentó el efecto de la variación del tiempo de retención como función de la concentración del agente tensoactivo.

# METODOLOGÍA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CAPÍTULO V

### METODOLOGÍA

Con base en la información obtenida después de estudiar el desarrollo del método prototipo es como fue desarrollada la metodología a seguir para el desarrollo del método definitivo.

El método de prueba y error —además de ser demasiado lento— no explora todas las posibilidades que pudiesen existir en el desarrollo de un método. Se necesita por lo tanto una nueva estructura que facilite la exploración de todas las posibilidades y que a la vez ayude a detectar los caminos que no son convenientes para poder abandonarlos a tiempo, evitando pérdidas de tiempo que se dieran al estar trabajando por un camino que no lleva al objetivo buscado.

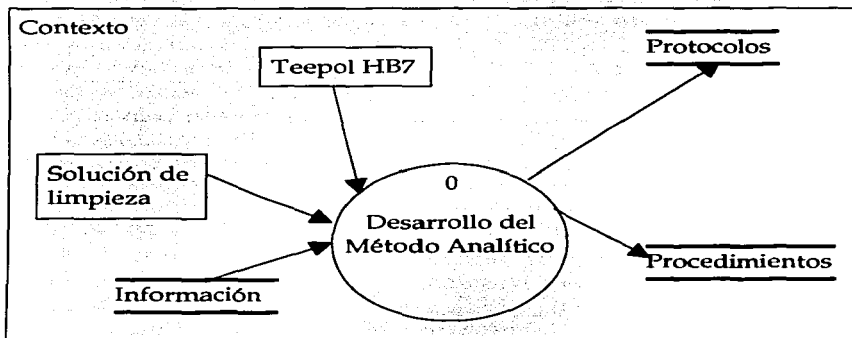
Como una ayuda que facilitase la elaboración de una metodología adecuada se utilizaron diagramas de flujo de datos<sup>222</sup> (DFD) haciendo las respectivas adaptaciones. La ventaja que tiene la utilización de herramientas gráficas es una visión más completa del proceso que se trata de definir y una mejor comprensión de éste; lo que a la vez facilita a terceros su estudio y entendimiento.

---

<sup>222</sup> Los diagramas de flujo de datos son una herramienta de modelaje utilizada principalmente en la fase análisis del desarrollo de sistemas de información; sin embargo se ha demostrado que este modelo es extrapolable a cualquier otro proceso. Una explicación general de estos diagramas se encuentra en el apéndice 1.

## V.1 Metodología estructurada

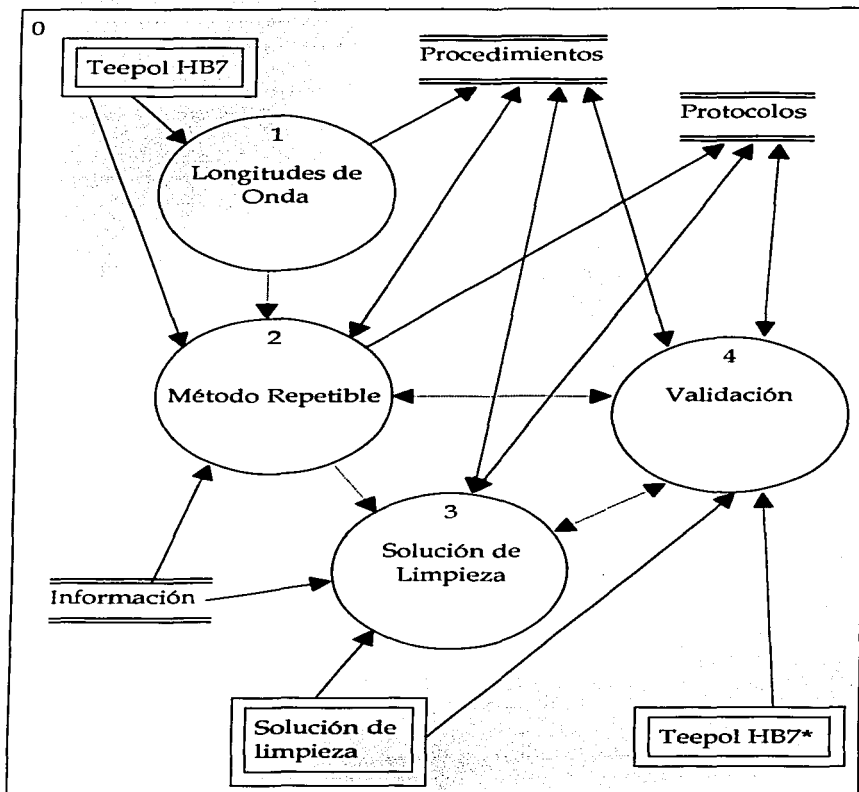
En el contexto de todo el desarrollo del método analítico se encuentran como muestras Teepol HB7 y solución de limpieza. Con la utilización de estas muestras y la información correspondiente se le está dando material al proceso de desarrollo, el cual después de llevarse a cabo producirá los protocolos y procedimientos que sean los más indicados para la determinación cromatográfica de materia activa en Teepol HB7 y en solución de limpieza.



• Diagrama 4.1

De ahí que al tomar al desarrollo como un proceso, éste se divida en subprocesos.

Primero se deben buscar longitudes de onda para máximos y mínimos, luego encontrar un método repetible a simple vista y validarlo, luego adaptar el método para su uso con solución de limpieza y validarlo.



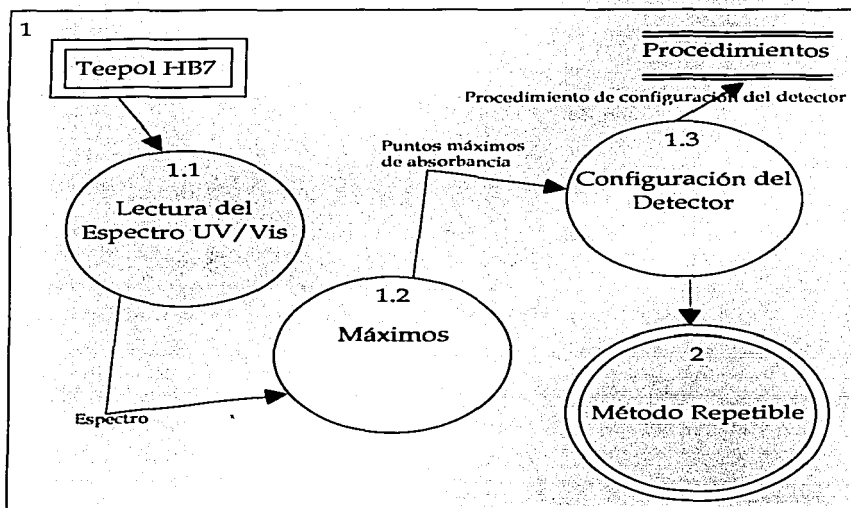
• Diagrama 4.2

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El proceso para determinar las longitudes de onda en que se van a hacer las lecturas del detector es muy sencillo.



• Diagrama 4.3

Comenzando con la lectura del espectro de absorbancia UV/Vis del Teepol HB7, en el cual se deben detectar los puntos en donde se encuentren las longitudes de onda que presenten máximos de absorbancia, ya que son estas longitudes de onda las que posteriormente deben introducirse al detector para que en ellas lleve a cabo sus lecturas. El procedimiento para ajustar las longitudes de onda en las que estará leyendo el detector debe ser documentado.

Una vez terminado este proceso, el control pasa al proceso 2 "Método Repetible" en el cual se deben obtener todos los métodos que tengan una buena separación y sean repetibles a simple vista.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

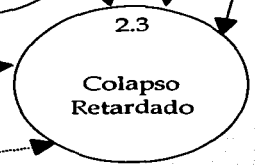
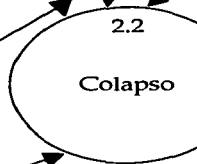
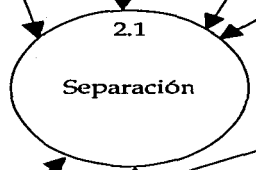
74

2

Teepol HB7

Procedimientos

Protocolos



Información



Protocolos\*

Procedimientos\*



• Diagrama 4.4

El primer paso es obtener una satisfactoria separación de los componentes del Teepol HB7, una vez obtenida ésta deben hacerse pruebas de repetibilidad de los tiempos de retención.

El proceso para obtener esta separación correspondiente al "gradiente ideal" del estudio prototipo ha sido optimizado para llegar a éste en el menor tiempo posible.

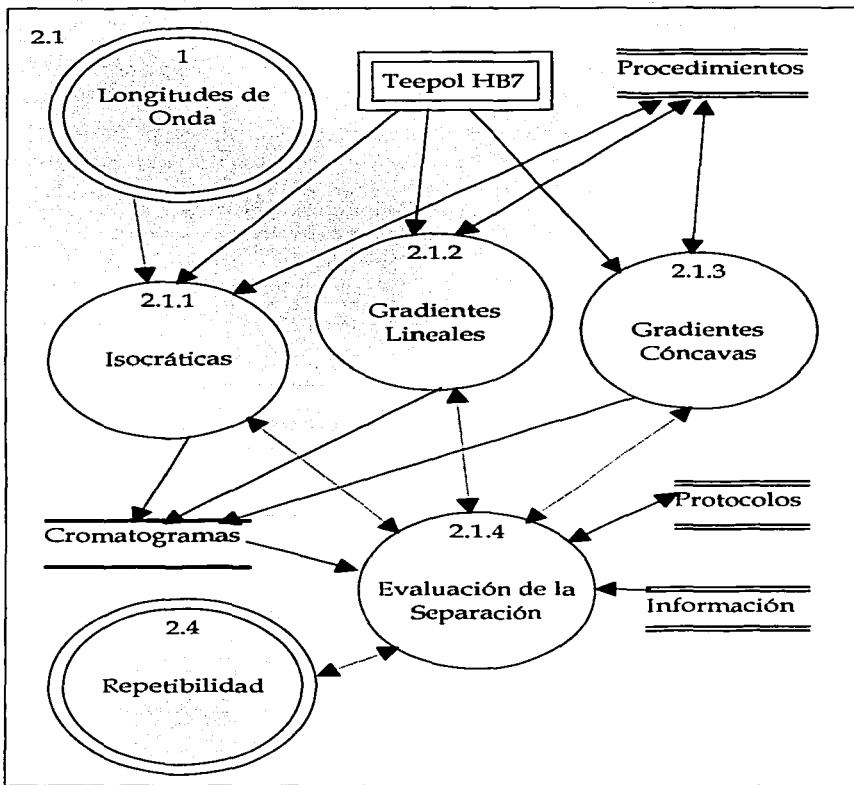
Como primer paso debe hacerse una serie de eluciones isocráticas partiendo de la más fuerte (0%a, 100%b) y debilitándolas (%a' > %a, %b' < %b) hasta obtener la máxima selectividad [evitando que quede mucho tiempo entre el tiempo muerto y el primer pico de tensoactivo] sin darle mucha importancia al hecho de que los últimos picos se achaten excesivamente. Un proceso de evaluación con base en la información obtenida del estudio prototipo y en información bibliográfica es el soporte para tomar la decisión de hasta qué punto deba o no seguir la disminución en la fuerza del eluyente para poder pasar al segundo paso.

El segundo paso es elevar gradualmente la pendiente del gradiente (%a<sub>inicio</sub> < %a<sub>final</sub>, %b<sub>inicio</sub> > %b<sub>final</sub>) hasta disminuir al máximo el ancho de los últimos picos [evitando que éstos lleguen a colapsarse] sin darle mucha importancia al hecho de que los primeros picos se traslapen. El mismo proceso de evaluación debe ser utilizado para tomar la decisión de hasta qué punto deba o no seguir el incremento en la pendiente del gradiente para poder continuar con el tercer paso.

El proceso final para la obtención del "gradiente ideal" consiste en un incremento en la concavidad<sup>hhh</sup> y ajustes menores en la fuerza del eluyente al inicio y al final del gradiente hasta obtener la máxima resolución en todos los puntos del gradiente ("gradiente ideal").

<sup>hhh</sup> En la estación de trabajo MAXIMA de Waters se designa la curvatura del gradiente por medio de números positivos para gradientes convexos (mayor pendiente al inicio y menor pendiente al final) y números negativos para gradientes cóncavos (menor pendiente al inicio y mayor pendiente al final), de manera que el cero corresponde a un gradiente lineal y entre mayor sea la diferencia desde el cero [ya sea negativa o positiva] es mayor la diferencia entre la pendiente al inicio y al final del gradiente sea el gradiente cóncavo o convexo.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



• Diagrama 4.5

Una vez obtenido el "gradiente ideal" se ejecuta el proceso en el cual se hacen 5 o mas eluciones idénticas con el fin de probar que sus tiempos de retención sean repetibles a simple vista.

Independientemente del resultado obtenido, se procede a una evaluación general, la cual es un proceso meramente intelectual en el cual se estudia la conveniencia de los protocolos y procedimientos resultantes del proceso de separación y —con base en la información [empírica y bibliográfica] disponible— se hacen mejoras a todas las condiciones cromatográficas no tomadas en cuenta durante los procesos anteriores, con el fin de mejorar los resultados obtenidos en éstos.

Entre todas las condiciones no tomadas en cuenta durante los procesos anteriores son dignas de mencionarse:

- Condiciones en la operación de las bombas y válvulas check del cromatógrafo.
- Dilución, preparación y dilución de las muestras.
- Tamaño del loop.
- Condiciones en el manejo y pureza de los solventes.
- Degradación de la columna.

Dependiendo de la conveniencia de los procedimientos y protocolos obtenidos y de los cambios aplicados a los mismos, se tomarán las siguientes decisiones:

Regresar al proceso de separación en caso de que los tiempos de retención, la altura o área de los picos hayan resultado irrepetibles y se hayan efectuado mejoras a las condiciones ya mencionadas, de tal manera que tengan que llevarse a cabo ajustes menores a la forma del gradiente para mejorar aún más la separación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<p style="text-align: center;">TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>
--

☑ Ir al proceso de colapso<sup>iii</sup> con el fin de minimizar la duración del análisis siempre y cuando se asegure que la muestra no contenga contaminantes que puedan interferir en el tamaño de los picos obtenidos.

☑ Ir al proceso de colapso retardado<sup>iii</sup> con el fin de obtener un tiempo de elución corto —aunque no tanto como en el proceso de colapso— pero en el que se espere que únicamente sean integrados picos que correspondan a alquilsulfatos contenidos en el Teepol HB7.

☑ Ir al proceso de validación cuando —de acuerdo con los protocolos y procedimientos actualizados— se decida que ya no es posible obtener mejoras apreciables a simple vista y sea entonces necesario validar el método analítico para ya sea aprobarlo o proponer pequeños ajustes que lleven a la aprobación del método para su utilización oficial en las normas Banxico.

☑ Ir al proceso de solución de limpieza cuando se considere que la separación obtenida es adecuada para los propósitos del mismo tomando en cuenta únicamente el hecho de que los protocolos y procedimientos se presten para que sea posible distinguir cuando se estén cuantificando únicamente alquilsulfatos o cuando existan impurezas que estén provocando interferencias en la integración. Dada la casi nula resolución del proceso de colapso se dificulta esta distinción por lo que debe evitarse pasar al proceso de solución de limpieza cuando se esté utilizando el colapso.

---

<sup>iii</sup> El proceso de colapso es un proceso similar al de separación, pero cuyo propósito es mantener todos los picos colapsados en las cercanías del punto de inyección —sin que lleguen a traslaparse con éste—.

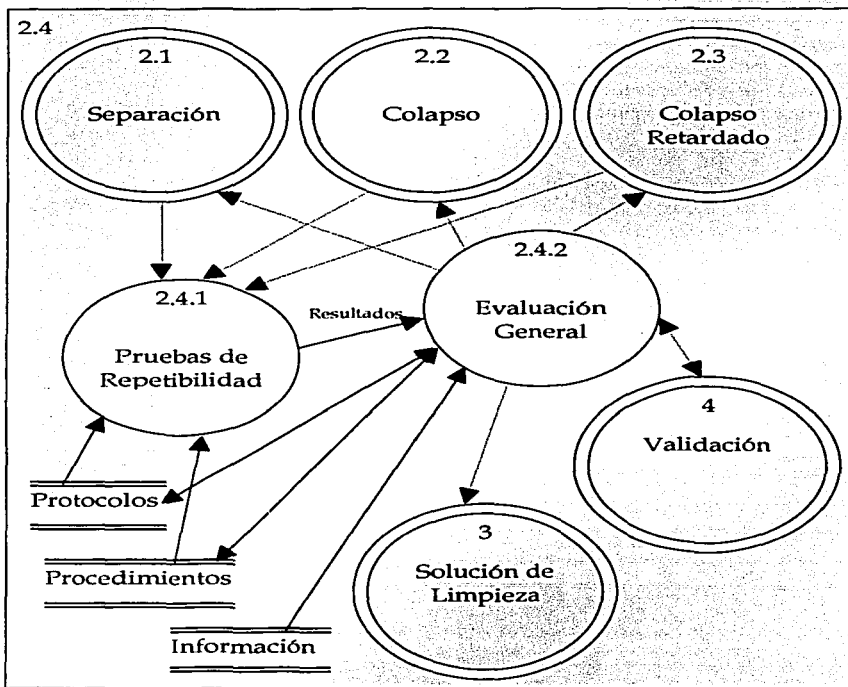
<sup>iii</sup> El proceso de colapso retardado es un proceso similar al de separación, pero cuyo propósito es mantener colapsados los picos que se encuentren formando dobletes, tripletes, etc. con el fin de facilitar la integración en el caso de que los procesos de separación y colapso no presenten cromatogramas apropiados para la misma.

Se vuelve a ejecutar el proceso de repetibilidad después de llevar a cabo los procesos de colapso , de colapso retardado o de separación hasta que —como ya se ha mencionado— las condiciones justifiquen la iniciación del proceso de validación o del proceso de solución de limpieza —haciendo notar que no son las mismas condiciones las que puedan disparar uno u otro de estos dos procesos [el proceso de solución de limpieza presenta menos requisitos que el proceso de validación y después de éste es necesario llegar también al proceso de validación] y cada uno de ellos puede ejecutarse sin la necesidad de que el otro se ejecute—.

ESTA TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



• Diagrama 4.6

El poder regresar de la validación a éste proceso de repetibilidad nos da la posibilidad de poder llevar a cabo cuantas revalidaciones sean necesarias con el fin de tener al método analítico siempre operando en condiciones óptimas por lo que siempre se estarían obteniendo resultados con la máxima exactitud y precisión posible.

Cabe hacer el comentario de que parte del objetivo de esta investigación es —además de obtener mayor exactitud y precisión que con el método tradicional— aminorar el tiempo de análisis; ésto es lo que le da razón de ser a la existencia de los procesos de colapso y colapso retardado, los cuales tienen por objetivo proporcionar al método analítico menores tiempos de análisis y es entonces parte importante del proceso de evaluación general el optar por el colapso o el colapso retardado cuando el proceso de separación esté proporcionando cromatogramas con un tiempo de elución excesivo.

El proceso de solución de limpieza se lleva a cabo por el método de prueba y error puesto que resulta extremadamente sencillo tomar la decisión de si un procedimiento es o no adecuado por el único hecho de ejecutar el procedimiento y observar en el cromatograma resultante la presencia o ausencia de picos del Teepol HB7 y de sustancias desconocidas que puedan causar interferencia o ruido en el momento de la integración. Se decide que un procedimiento es adecuado para la cuantificación de alquilsulfatos del Teepol HB7 en solución de limpieza cuando se encuentran presentes todos sus picos y los picos formados por sustancias contaminantes se encuentran ausentes o de otra manera se encuentran presentes pero sin presentar interferencias significativas en la integración de los picos correspondientes al Teepol HB7.

Los procedimientos que van a ser puestos a prueba durante el proceso de solución de limpieza son:

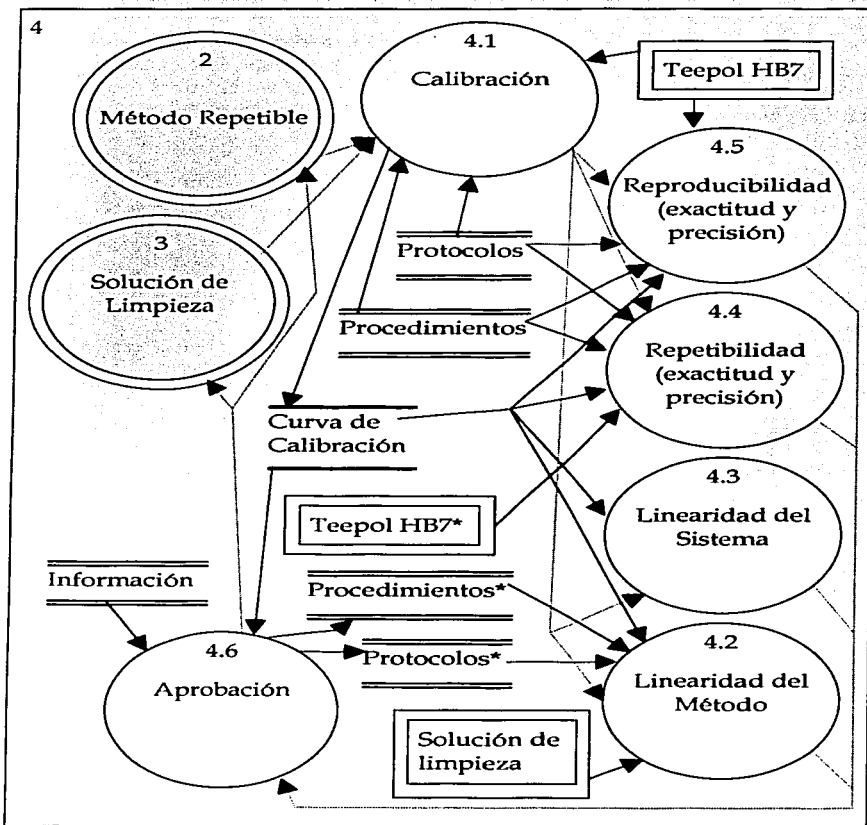
- ☒ Inyección de la muestra tal cual.
- ☒ Extracción en fase sólida abarcando todas sus modalidades.
- ☒ Extracción líquido — líquido.
- ☒ Adición de estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

Como un parámetro más a tomar en cuenta para decidir la conveniencia de los protocolos resultantes antes de entrar al proceso de validación se debe tomar en cuenta el tiempo de ejecución [sumando el tiempo de los procedimientos de preparación de la muestra con el tiempo de análisis cromatográfico] y compararlo con el tiempo de ejecución del método actualmente utilizado.

El proceso de validación se define en el siguiente diagrama:



• Diagrama 4.7

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Una vez finalizados los procesos método repetible o solución de limpieza se ejecuta el primer subproceso del proceso de validación, el cual consiste en la elaboración de una curva de calibración, la cual ha de servir como una ayuda para calcular los parámetros de reproducibilidad (exactitud y precisión), repetibilidad (exactitud y precisión), linealidad del sistema y linealidad del método<sup>kkk</sup>; además de —en caso de ser aprobado el método— ser la curva de calibración utilizada como referencia para las determinaciones de materia activa en Teepol HB7 y/o en solución de limpieza. Una vez calculados los parámetros de validación se ejecuta un proceso de aprobación (intelectual) cuyo propósito es —con base en la información recopilada— decidir si los protocolos y procedimientos que arrojan cada uno de estos parámetros superan a los del método utilizado actualmente, de modo que puedan en cualquier momento reemplazarlo.

La curva de calibración debe hacerse siguiendo al pie de la letra los protocolos y procedimientos y con un número de muestras suficiente, distribuidas de tal manera que exista una mayor cantidad de puntos en la región que se encuentra dentro de las especificaciones para solución de limpieza y a la vez se abarquen las concentraciones máximas y mínimas que haya presentado la solución de limpieza en los últimos dos años. De esta manera, al tomar como referencia la concentración esperada en la solución de limpieza, en caso de que sean utilizados los mismos procedimientos cromatográficos tanto para Teepol HB7 como para solución de limpieza, la misma curva de calibración podrá ser utilizada para llevar a cabo ambas determinaciones.

En caso de que el proceso de aprobación de un resultado positivo, la curva de calibración será anexada al conjunto de protocolos y procedimientos.

---

<sup>kkk</sup> En caso de que difieran los procedimientos cromatográficos utilizados para Teepol HB7 o solución de limpieza [provenientes de los procesos método repetible y solución de limpieza respectivamente] tendrán que hacerse dos curvas de calibración: una para Teepol HB7 y la otra para solución de limpieza, dada una con sus respectivos procedimientos cromatográficos.

En caso de que el proceso de aprobación de un resultado negativo se deberán repetir los procesos método repetible o solución de limpieza con modificaciones a los protocolos y procedimientos de manera que al término de la nueva ejecución de estos procesos, la nueva validación resulte en una reducción de los parámetros de un aprobación hasta finalmente llegar a la aprobación del método o a su no aprobación definitiva.

En el proceso reproducibilidad y precisión se deben inyectar muestras iguales por diferentes personas, en el proceso repetibilidad y exactitud deben inyectarse muestras iguales por la misma persona, pero en distintos días. Para el proceso linealidad del sistema se obtiene la información de la curva de calibración para comprobar su linealidad. En el proceso linealidad del método se utiliza solución de limpieza y son comparados los resultados de la concentración teórica de la solución de limpieza contra la concentración por el cromatógrafo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**V.2 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO  
CROMATOGRAFICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MATERIA  
ACTIVA EN  
TEEPOL HB7**

**V.2.1 Objetivo:**

- Determinar la especificidad del método analítico para la cuantificación de materia activa (alquilsulfatos) en Teepol HB7.
- Determinar la linealidad del sistema concentración—detector, de acuerdo con la ley de Beer.
- Determinar la concentración mínima detectable y la concentración mínima cuantificable en muestras de Teepol HB7.
- Determinar la repetibilidad del método analítico, tomando en cuenta localización y dispersión de los resultados.
- Determinar la reproducibilidad del método analítico, tomando en cuenta localización y dispersión de los resultados.

## V.2.2 Diseño experimental:

### V.2.2.1 ESPECIFICIDAD

1. Utilizando la técnica de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier.
  - Se utilizará un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier de la marca Nicolet, modelo 710.
  - La manera de operar el espectrofotómetro se encuentra explicada en los manuales del mismo espectrofotómetro P/N 269-781201, P/N 269-721903, P/N 269-759002, P/N 269-772604, P/N 269-760501 y P/N 269-781901.
  - Se utilizará laurilsulfato de sodio grado reactivo como estándar de referencia para la presencia de alquilsulfatos.
  - Se utilizará una muestra de Teepol HB7 de lote más reciente que se encuentre disponible, cuya concentración de materia activa sea conocida.
  - Se usará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3.
  - Preparar una solución acuosa de Teepol HB7 con una concentración de tensoactivo de aproximadamente 0.8% w/v.
  - Preparar una solución acuosa de 5000 ppm laurilsulfato de sodio.
  - Inyectar en el cromatógrafo el volumen completo del loop de cada una de las soluciones preparadas y recolectar a la salida del detector la fase móvil entre los 5:30 y 9:00 minutos.
  - Leer los espectros infrarrojos de absorbancia para cada una de las muestras obtenidas.
  - Comparar los espectros obtenidos y —con base en su similitud y la correspondencia de grupos funcionales importantes (indicados por picos de absorbancia a una longitud de onda conocida)— determinar la presencia de alquilsulfatos en los picos de Teepol HB7 eluidos entre los 5:30 y 9:00 min.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

2. Utilizando la técnica de espectrofotometría UV/Vis por arreglo de diodos.
- Se empleará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3.
  - Se utilizará un detector de arreglo de diodos Waters 994.
  - En el manual de operación del detector de arreglo de diodos Waters 994 [manual número 31083, revisión 1] se explica la manera de utilizarlo.
  - Preparar una solución acuosa de Teepol HB7 con una concentración de tensoactivo de aproximadamente 0.8% w/v.
  - Preparar una solución acuosa de 5000 ppm laurilsulfato de sodio.
  - Inyectar el volumen completo del loop de cada una de las soluciones preparadas y ejecutar el procedimiento de elución indicado en el protocolo de análisis cromatográfico (apéndice 3).
  - En el detector de arreglo de diodos Waters 994, leer los espectros [entre 190 nm y 280 nm] obtenidos para todos los picos de cada una de las soluciones inyectadas.
  - Comparar los espectros obtenidos y —con base en su similitud y la correspondencia de grupos funcionales importantes (indicados por picos de absorbancia a una longitud de onda conocida)— determinar la presencia de alquilsulfatos en los picos de Teepol HB7 eluidos entre los 5:30 y 9:00 min.

### V.2.2.2 LINEARIDAD

Se generará una curva de calibración para materia activa en Teepol HB7, a partir de la cual serán automáticamente calculadas la pendiente y la desviación estándar.

- Se utilizará la estación de trabajo Waters Maxima para generar la curva de calibración.
- En la estación de trabajo Waters Maxima se empleará el método T\_C18150.mth\*\*, ubicado en el directorio c:\max\data1\teepol\metodos.
- Se utilizará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3.
- Se utilizará una muestra de Teepol HB7, de lote más reciente que se tenga disponible y cuya concentración sea conocida.
- Preparar soluciones volumétricas de Teepol HB7 con una concentración de materia activa —conocida con al menos cuatro cifras significativas de exactitud— aproximada de:
 

✦ 0.4%	✦ 0.3%	✦ 0.2%
✦ 0.18%	✦ 0.16%	✦ 0.12%
✦ 0.08%	✦ 0.04%	✦ 0.02%
✦ 0.01%	✦ 0.006%	✦ 0.004%
- En la estación de trabajo Waters Maxima ir a la ventana Sample Queue\*\* e insertar el mayor número de repeticiones posibles de las soluciones preparadas en el punto anterior [incluyendo sus respectivas concentraciones] seleccionando el tipo STND (estándar) en el campo Type. Un mayor número de repeticiones debe haber entre más cercana sea la concentración de la solución a 0.18%.
- Ejecutar el método\*\*.
- Inyectar en el cromatógrafo el volumen completo del loop de cada una de las muestras solicitadas por la estación de trabajo Waters Maxima.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

\*\* Para la utilización de la estación de trabajo Waters Maxima, referirse al manual de referencia. Waters Dynamic Solutions Division of Millipore, Maxima 820 Chromatography Workstation Reference Manual, Manual number 34764. Dynamic Solutions Division of Millipore. EUA 1990.

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

- Al término del total de inyecciones programadas, la estación de trabajo Waters Maxima calculará automáticamente el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), los cuales serán incluidos en el reporte de calibración.
- Para los siguientes cálculos utilizar la hoja de cálculo Lotus 123.
- Calcular el coeficiente de variación de la siguiente manera:

Calcular para cada inyección el factor F:

$$F = \frac{\text{Resp}}{\text{Conc}}$$

donde:

Resp = Respuesta del detector

Conc = Concentración de la muestra inyectada

Calcular la desviación estándar de los factores F ( $S_F$ ).

Calcular el promedio de los factores F ( $\bar{F}$ ).

Calcular el coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{S_F}{\bar{F}} \times 100$$

**Criterios de aceptación:**

Variable	Criterio
$r$	>0.99
$r^2$	>0.98
CV	≤1.8%

### V.2.2.3 CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE

- Se empleará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3, el cual incluye el método T\_C18150.mth para la estación de trabajo Waters Maxima, ubicado en el directorio c:\max\data1\teepol\metodos.
- Se usarán las soluciones preparadas en el inciso anterior.
- En la estación de trabajo Waters Maxima ir a la ventana Sample Queue\*\* e insertar una repetición de cada una de las muestras, indicando UNKN (concentración desconocida) en el campo Type.
- Ejecutar el método\*\*. [inyectar las muestras que solicite la estación de trabajo Waters Maxima].
- La estación de trabajo Waters Maxima generará una impresión de cada cromatograma obtenido.
- Observar en cada cromatograma los picos correspondientes a alquilsulfatos.
- La concentración mínima detectable será la concentración mínima en cuyo cromatograma resultante puedan distinguirse a simple vista los picos formados por alquilsulfatos del ruido asociado a la línea base.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

## V.2.2.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE

- Se usará el método ejecutado en el criterio anterior.
- La estación de trabajo Waters Maxima generará un reporte de concentración para cada muestra inyectada.
- La estación de trabajo Waters Maxima calculará el porcentaje de desviación:

$$\% \text{desviación} = \frac{C_0 - C_1}{C_n} \times 100$$

donde:

$C_0$  = Concentración real

$C_1$  = Concentración calculada por la estación de trabajo Waters Maxima

- Calcular el valor absoluto del %desviación (| %desviación |)
- Para cada concentración calcular el promedio del | %desviación | ( $\frac{|\% \text{desviación}_i|}{n}$ )
- La concentración mínima cuantificable será la concentración mínima en la cual el %desviación sea menor a 1.8%

### V.2.2.5 REPETIBILIDAD

Se considera la repetibilidad como la capacidad que tiene un proceso de no cambiar independientemente del día y la hora en que éste se lleve a cabo.

- Se utilizará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3, el cual incluye el método T\_C18150.mth para la estación de trabajo Waters Maxima, ubicado en el directorio c:\max\data1\teepol\metodos.
- Se usará una muestra de Teepol HB7, de lote más reciente que se tenga disponible y cuya concentración sea conocida.
- Preparar cada día —durante cinco días distintos— soluciones volumétricas de Teepol HB7 con una concentración de materia activa —conocida con al menos cuatro cifras significativas de exactitud— aproximada de:
  - ◊ 0.2%
  - ◊ 0.18%
  - ◊ 0.16%
- En la estación de trabajo Waters Maxima ir a la ventana Sample Queue\*\* e insertar —cada día— una repetición de cada solución preparada.
- Ejecutar el método\*\*.
- Inyectar en el cromatógrafo el volumen completo del loop de cada una de las muestras solicitadas por la estación de trabajo Waters Maxima.
- Al término de cada elución, la estación de trabajo Waters Maxima generará un reporte de concentración de la solución inyectada.
- Para los siguientes cálculos utilizar la hoja de cálculo Lotus 123.

#### Precisión

- Para cada una de las concentraciones utilizadas calcular el promedio ( $\bar{C}$ ) y la desviación estándar ( $s$ ) de las concentraciones recuperadas en cada una de las eluciones.
- Calcular el coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{C}}$$

- Criterios de aceptación:

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Variable	Criterio
CV	$\leq 1.8\%$

*Para poder afirmar la precisión en la repetibilidad del método se debe cumplir con los criterios de aceptación para todas las concentraciones en cuestión.*

### Exactitud

- Para cada una de las eluciones calcular el porcentaje recuperado (C%):

$$C\% = \frac{C}{C_0} \times 100$$

donde:

$C_0$  = Concentración inyectada

C = Concentración recuperada

- Calcular los promedios ( $\overline{C\%}$ ) para cada uno de los días.
- Calcular los promedios ( $\overline{C\%}$ ) para cada una de las concentraciones.
- Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
$\overline{C\%}$	$95\% \leq \overline{C\%}_{día} \leq 105\%$

*Para poder afirmar la exactitud en la repetibilidad del método se debe cumplir con los criterios de aceptación para todas las concentraciones y para todos los días en cuestión.*

### V.2.2.6 REPRODUCIBILIDAD

Se considera la reproducibilidad como la capacidad que tiene un proceso de no cambiar independientemente de la persona que lo lleve a cabo.

- Se usará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3, el cual incluye el método T\_C18150.mth para la estación de trabajo Waters Maxima, ubicado en el directorio c:\max\data1\teepol\metodos.
- Se utilizará una muestra de Teepol HB7, de lote más reciente que se tenga disponible y cuya concentración sea conocida.
- Preparar cada persona — cinco personas distintas— soluciones volumétricas de Teepol HB7 con una concentración de materia activa —conocida con al menos cuatro cifras significativas de exactitud— aproximada de:
  - ◊ 0.2%
  - ◊ 0.18%
  - ◊ 0.16%
- En la estación de trabajo Waters Maxima ir a la ventana Sample Queue<sup>^^</sup> e insertar —para cada persona— una repetición de cada solución preparada.
- Ejecutar el método<sup>^^</sup>.
- Inyectar en el cromatógrafo el volumen completo del loop de cada una de las muestras solicitadas por la estación de trabajo Waters Maxima —cada persona debe inyectar cada una de las concentraciones preparadas—.
- Al término de cada elución, la estación de trabajo Waters Maxima generará un reporte de concentración de la solución inyectada.
- Para los siguientes cálculos utilizar la hoja de cálculo Lotus 123.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### Precisión

- Para cada una de las concentraciones utilizadas calcular el promedio ( $\bar{C}$ ) y la desviación estándar (s) de las concentraciones recuperadas en cada una de las eluciones.
- Calcular el coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{C}}$$

- Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
CV	$\leq 1.8\%$

### Exactitud

- Para cada una de las eluciones calcular el porcentaje recuperado (C%):

$$C\% = \frac{C}{C_0} \times 100$$

donde:

$C_0$  = Concentración inyectada

C = Concentración recuperada

- Calcular los promedios ( $\bar{C}\%$ ) para cada uno de los días.
- Calcular los promedios ( $\bar{C}\%$ ) para cada una de las concentraciones.
- Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
$\bar{C}\%$	$95\% \leq \bar{C}\%_{\text{día}} \leq 105\%$

*Para poder afirmar la exactitud en la reproducibilidad del método se debe cumplir con los criterios de aceptación para todas las concentraciones y personas en cuestión.*

## V.3 MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MATERIA ACTIVA EN TEEPOL HB7

### —PROTOCOLO DE ANÁLISIS—

#### V.3.1 Objetivo

- Determinar la concentración de materia activa en una muestra de Teepol HB7.

ESPECIFICACIONES DEL TEEPOL HB7	
DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN
Materia activa	> 40.0%
Ácidos grasos libres	< 0.17%
Alcalinidad total	0.05 - 0.29%
Densidad a 25°C	1.030 - 1.075 g/ml
Solubilidad al 10%	totalmente soluble
Materia fija	40.0% min
Humedad	60.0% max
pH al 5% a 25°C	7.0 - 8.5
Viscosidad Brookfield a 25°C	90.0 - 105.0 cps
Índice de refracción a 25°C	1.3860 - 1.4000

- Tabla 1.2<sup>m mmm</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>m</sup> Fuente: Shell Deterpents, Teepol HB7, Technical Bulletin DI.3.1.2, Shell Chemical Internacional Trading Company, London 1984.

<sup>mmm</sup> Fuente: Control de Calidad e Investigación, Fábrica de Billetes, Banco de México, Normas Bancas Para Análisis Químicos, Tensactivo Teepol HB7, México 1996.

### V.3.2 Procedimiento

Se pesan aproximadamente con precisión de cuatro cifras decimales 0.11 g de muestra de Teepol HB7, la cual se disuelve en agua grado HPLC y se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml, llevando hasta la marca y se agita para homogeneizar la solución.

Se pone la solución en un baño ultrasónico durante 5 minutos.

De esta solución se toman 10 ml los cuales se filtran utilizando una membrana Millipore de tipo GV con porosidad de 0.22  $\mu\text{m}$  en el dispositivo para la filtración de muestras.

En la ventana Sample Queue de la estación de trabajo Waters MAXIMA se inserta la información sobre la muestra a analizar, seleccionando el tipo UNKN (desconocido) en el campo Type. Se ejecuta el método.

Se inyectan en el loop 2.5 ml de la solución preparada cuando la estación de trabajo Waters MAXIMA lo solicita.

La estación de trabajo Waters MAXIMA genera un reporte de la concentración encontrada en la solución.

Con la concentración reportada se realizan los siguientes cálculos:

$$\%MA = \frac{C_{dil} \times 250}{W_m}$$

Donde:

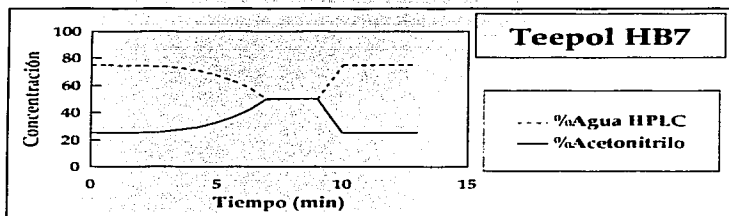
MA	materia activa
C <sub>dil</sub>	concentración de la dilución reportada por la estación de trabajo Waters MAXIMA
W <sub>m</sub>	Peso de la muestra
250	Factor de dilución

### V.3.3 Método Cromatográfico

El método cromatográfico para la determinación cuantitativa de materia activa en Teepol HB7 consiste en una elución gradiente que comienza con una mezcla de  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  25:75 y durante 7 minutos incrementa su concentración hasta  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  50:50 con una concavidad igual a -5 (de acuerdo con la escala utilizada por la estación de trabajo Waters MAXIMA) y la mantiene constante hasta llegar a los 9 minutos de elución, en donde comienza a regresar las concentraciones a su estado original terminando a los 10 minutos y mantiene esta concentración (original) hasta los 13 minutos de elución para equilibrar la columna.

#### Teepol HB7

Tiempo (min)	% Agua HPLC	% Acetonitrilo	Tipo de curva <sup>***</sup>
0	75	25	
7	50	50	-5
9	50	50	
10	75	25	
13	75	25	



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

\*\*\* Según los tipos de curvatura utilizados por la estación de trabajo Waters MAXIMA.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

El flujo de la mezcla de solventes durante toda la elución se mantiene en 1.2 ml/min.

Se utiliza una columna Nova-Pak  $C_{18}$  de 3.9 mm ID x 150 mm. Este tipo de columna tiene un empaque formado por partículas esféricas de 6  $\mu$ m de diámetro.

El volumen del loop utilizado para inyectar la muestra es de 231.15968  $\mu$ l.

La muestra inyectada tiene un factor de dilución igual a 250, pero el resultado de la integración reporta la concentración real de la misma.

Se utiliza un detector UV/Vis de arreglo de diodos tomando lecturas a una longitud de onda de 224 nm con una precisión de 0.5 aufs 20 puntos por segundo.

Se integran todos los picos encontrados entre 5.5 y 9 minutos y sus áreas son sumadas, ya que en esta región se encuentran los tiempos de retención de los alquilsulfatos  $C_9$  a  $C_{13}$ .

V.3.3.1 PARÁMETROS DEL DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS WATERS  
994

## MEASUREMENT CONDITIONS

< FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : Oct/17/96 >

-----

KEY LOCK : ON  
 INTERVAL : FAST  
 TIME CONSTANT : 0.1 sec  
 MEASUREMENT TIME : 13.00 min  
 DISPLAY TIME : 5.00 min  
 WAVELENGTH RANGE : 190 --- 650 nm  
 WAVELENGTH : 195 203 224 254 nm  
 BAND WIDTH : 3 F 5 F nm

## CII: 1 CHROMATOGRAM CONDITIONS

< FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : Oct/17/96 >

TIME	AUFS	WAVELENGTH	W. PLOT	EVENT	THRESHOLD
[min]	[AU]	[nm]			

-----

INITIAL 0.500 224 OFF ON

## CII: 2 CHROMATOGRAM CONDITIONS

< FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : Oct/17/96 >

TIME	AUFS	WAVELENGTH	W. PLOT	EVENT	THRESHOLD
[min]	[AU]	[nm]			

-----

INITIAL 1.500 196 OFF ON

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

## CH: 3 CHROMATOGRAM CONDITIONS

&lt; FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 &gt;

TIME	AUFS	WAVELENGTH	W.PLOT	EVENT	THRESHOLD
(min)	(AU)	(nm)			

---

INITIAL	2.000	203		OFF	OFF
---------	-------	-----	--	-----	-----

## CH: 4 CHROMATOGRAM CONDITIONS

&lt; FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 &gt;

TIME	AUFS	WAVELENGTH	W.PLOT	EVENT	THRESHOLD
(min)	(AU)	(nm)			

---

INITIAL	2.000	254		OFF	xxx
---------	-------	-----	--	-----	-----

## SPECTRUM CONDITIONS &lt; MONITOR: M1 &gt;

&lt; FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 &gt;

TIME	HEIGHT	SLOPE	NOISE	MODE	MONITOR WAVE.
(min)	(AU)	(AU/min)	(AU)		(nm)

---

INITIAL	0.001	0.001	0.001	P/S/V	224
---------	-------	-------	-------	-------	-----

## ANALYSIS MENU

&lt; FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 1GCM1 DATE : Oct/17/86 &gt;

===== &lt; INTEGRATOR &gt; ===== PLOT : OFF

TIME RANGE	:	5.50	---	9.00	min
WAVELENGTH	:	MJ			
SMOOTHING	:	15		points	
SLOPE	:	0.001		AU/min	
DRIFT	:	0.001		AU/min	
HIGHT	:	0.001		AU	
WIDTH	:	0.10		min	
TIME DOUBLE	:	10		min	
MINIMUM AREA	:	5.0E-04		AU*min	
MINUS PEAK	:	OFF			
PAPER SPEED	:	20.0		mm/min	
BASELINE CORRECT	:	OFF			
CALIBRATION	:	OFF			

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

## ANALYSIS MENU

< FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : Oct/17/96 >

=====  
 < SPECTRUM INDEX >==== PLOT : OFF

TIME RANGE : 5.00 --- 9.00 min  
 WAVELENGTH RANGE : 190 --- 280 nm  
 SPECTRUM CORRECT : ON  
 SPECTRUM SCALE : AUTO SCALE  
 BASELINE CORRECT : OFF  
 CHROMATOGRAM : M1

## ANALYSIS MENU

< FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : Oct/17/96 >

=====  
 < CHROMATOGRAM >==== PLOT : ON

TIME RANGE : 0.00 --- 30.00 min  
 SCALE M1 : AUTO SCALE  
 M2 : AUTO SCALE  
 PLOT SPEED : 5.0 min/min  
 BASELINE CORRECT : OFF  
 CHROMATOGRAM : M1 & M2

## STORED

< FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : Oct/17/96 >

-----  
 M1 : ON M2 : ON

## MEASUREMENT COMMENT

&lt; FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : 02/17/96 &gt;

SAMPLE NAME : TEEPOL-HB7  
COLUMN : 3.9mmID\* 15.0cm  
PACKING MATERIAL : NOVA-PAK C18  
MOBILE PHASE : ACETONITRILLO - AGUA  
FLOW RATE : 1.20 ml/min  
PRESSURE : 3000.0 PSI  
TEMPERATURE : 25.0 C  
INJECTION VOLUME : 231.10 µl

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

V.3.3.2 PARÁMETROS DE LA ESTACIÓN DE TRABAJO WATERS MAXIMA

## MAXIMA 620 METHOD REPORT

Printed: 21-001-1996 19:16

Tecpol HB7 NovaPak C18 3.9 \* 15

```

-----
| Data Acquisition |
-----

```

Channel: 2 Delay: 0.0 min  
 Trigger: External P1 Duration: 13.00 min  
 Rate: 20.00 points/sec

## Channel Parameters

Channel ID:	994 @ 224	994 @ 195 nm
Detect Peaks:	Yes	Yes
A/D Type:	WD24	WD24
Slot No:	16	16
Channel No:	0	1
Range (volts):	0-1.00	0-1.00
Resolution:	22-bit	22-bit
x-Axis Units:	minutes	minutes
x-Axis Start:	0.000	0.000
x-Axis End:	13.000	13.000
y-Axis Units:	volts	volts
y-Axis Min:	0.000	0.000
y-Axis Max:	1.000	1.000
Expansion:	1.00	1.00
Offset:	0.00%	0.00%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

## MAXIMA 920 METHOD REPORT

Printed: 21-OCT-1986 19:16

Toopol HBZ NovaPak C18 3.9 \* 15

```

-----
# Peak Integration Parameters #
-----

```

Channel 1  
 Channel 2  
 Channel 3  
 Channel 8

## Detection Parameters:

Baseline Points: 12  
 Filter Window (in Points): 25  
 Integration Sensitivity (Coarse): 50.00 microvolt/sec  
 Integration Sensitivity (Fine): 1000 microvolt/sec<sup>2</sup>  
 Detect Negative Peaks: No  
 Skim Ratio: 8.000

## Rejection Criteria

Minimum Area: 100000 microvolt-sec  
 Minimum Height: 10000 microvolt  
 Minimum Width: 10.00 sec

## MAXIMA B20 METHOD REPORT

Printed: 21-OCT-1996 19:16

Toepol HBZ NovaPak C18 3.9 \* 15

```
-----  
|| Peak Integration Parameters ||  
-----
```

Channel 4  
Channel 5  
Channel 6  
Channel 7

Detection Parameters

Baseline Points: 12  
Filter Window (in Points): 25  
Integration Sensitivity (Coarse): 5.00E+07 microvolt/sec  
Integration Sensitivity (Fine): 1.00E+09 microvolt/sec#  
Detect Negative Peaks: No  
Spike Ratio: 8.000

Rejection Criteria

Minimum Area: 1.00E+11 microvolt-sec  
Minimum Height: 1.00E+10 microvolt  
Minimum Width: 10.00 sec

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## MAXIMA G20 METHOD REPORT

Printed: 21-OCT-1996 19:14

Temp of Inj NovaPak C18 3.9 + 15

```

-----
| Operating Conditions Liquid Chromatography |
|-----|

```

Operator ID: Sandino

Injection Method: Loop                      Sample Size: 231.15960  
 Solvent Flow: Gradient                      Flow Rate:

Composition: 0.0% Aqua HPLC  
 0.0% Acetonitrilo  
 100.0%

Column:                      Name: Nova-Pak C18  
 Length: 150 mm                      Packing Name: Nova-Pak C18  
 Diameter: 3.8 mm                      Packing Type: Fase Enlazada  
 Void Volume: 0.0 min                      Functionality: Fase Reversa  
 Particle Size: 4 microm

## Detectors

Detector N	Name	Type	Sensitivity	Comment
1	Waters 994	Arreglo Diodos	0.2	724 aa
2	Waters 994	Arreglo Diodos	0.5	195 aa

## Comments

Strip part Comment

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN





## MAXIMA 820 METHOD REPORT

Printed 21-01-1996 19:16

1ccpol 107 NovaPak C18 5-V # 15

```

-----H
H Sample Queue H
-----H

```

## Queue Parameters

File Path: D:\MAXIMA\1A\1TEEPOL Raw Sample Weight: 1.000  
 Starting Index: 1 Volume of Extract: 1.000

## Stringhart Parameters

Scaling: Fit to highest valid peak x-axis limits: 0.0-665.6  
 Peak Labels: Names, retention times y-axis limits: 0.0-1.000  
 Regions: 0  
 Options: baselines, starts/ends, maxima, grids, emphasized print mode

## Sample Queue Table

R	S	Mass	Area	Source	File	Mass	Index	Vol	Area	% Dilution	
F	1	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	051	2	1	2
F	2	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	054	2	2	2
R	3	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	055	2	3	2
R	4	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	056	2	4	2
F	5	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	057	2	5	2
R	6	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	059	2	6	2
R	7	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	060	2	7	2
R	8	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	061	2	8	2
R	9	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	062	2	9	2
R	10	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	063	2	10	2
R	11	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	064	2	11	2
R	12	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	065	2	12	2
R	13	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	066	2	13	2
R	14	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	067	2	14	2
R	15	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	068	2	15	2
R	16	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	069	2	16	2
R	17	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	070	2	17	2
R	18	2	1	ASINDE	PFDC	2	1	071	2	18	2

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Component	1000129	1000130	1000131	1000132	1000133	1000134	1000135
Alquil Sulfatos	4.131E-02	1.657E-01	1.857E-01	2.666E-01	2.479E-01	2.479E-01	2.479E-01

Component
Alquil Sulfatos

En este método cromatográfico se deben tomar precauciones en la preparación de la muestra, la preparación de los eluyentes y la elución para asegurar que éste siempre se lleve a cabo en las mismas condiciones.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## V.3.3.3 PRECAUCIONES EN LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- ➔ El material utilizado para la dilución de la muestra debe encontrarse completamente limpio y ser enjuagado tres veces con agua destilada para evitar la presencia de sustancias contaminantes que puedan generar ruido en la línea base, reduciendo la precisión de la integración. En el momento de llevar a cabo la dilución el material debe estar completamente seco.
- ➔ El material utilizado para la filtración de la muestra y para recibir la muestra filtrada debe encontrarse completamente limpio y ser enjuagado tres veces con agua bidestilada y tres veces con agua grado HPLC para evitar la presencia de partículas que puedan formar depósitos a la entrada de la columna cromatográfica. En el momento de llevar a cabo la filtración el material debe estar completamente seco.
- ➔ El dispositivo para la filtración de las muestras debe ser ensamblado utilizando las pinzas incluidas con el mismo para evitar tocar las partes con las manos y que de esa manera puedan contaminarse.
- ➔ Las muestras deben ser desechadas diez horas después de haber sido preparadas para evitar la degradación durante su uso.

#### V.3.3.4 PRECAUCIONES EN LA PREPARACIÓN DE LOS ELUYENTES

- El agua grado HPLC debe filtrarse por triplicado en el dispositivo para la filtración de solventes, utilizando una membrana Millipore de tipo HA con porosidad de  $0.45 \mu\text{m}$ .
- Después de filtrada el agua debe usarse dentro de las primeras 24 horas, por lo que se recomienda filtrar 250 ml a la vez y utilizarlos hasta que se terminen.
- Una vez que se ha terminado el agua de un recipiente, éste se debe escurrir y poner a secar 2 horas a  $120^\circ\text{C}$  y una vez seco mantenerse cerrado hasta que se vuelva a utilizar; para de esta manera evitar el crecimiento bacteriano que produce metabolitos y partículas.
- Después de diez veces de utilizar el mismo recipiente en el procedimiento anterior éste debe lavarse, sanitizarse y, posteriormente, enjuagarse tres veces con agua bidestilada y tres veces con agua grado HPLC.
- El acetonitrilo grado HPLC debe filtrarse por triplicado en el dispositivo para la filtración de solventes, utilizando una membrana Millipore de tipo FH con porosidad de  $0.45 \mu\text{m}$ .
- El acetonitrilo debe filtrarse en cantidades de 900 ml y colocarse en un frasco de vidrio color ambar.
- El material utilizado para la filtración del agua grado HPLC debe ponerse a secar 2 horas a  $120^\circ\text{C}$  cada vez que se deja de utilizar y la membrana filtrante debe reemplazarse.
- Después de diez veces de utilizar el mismo dispositivo para filtrar agua, éste debe lavarse, sanitizarse y, posteriormente, enjuagarse tres veces con agua bidestilada y tres veces con agua grado HPLC.

<p style="text-align: center;">TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>
--

- En el dispositivo utilizado para la filtración de acetonitrilo la membrana debe reemplazarse cada cinco veces que éste sea utilizado.
- Para reemplazar las membranas en el dispositivo para la filtración de solventes deben utilizarse las pinzas incluidas con el mismo para evitar daños o contaminación en la membrana.

#### V.3.3.5 PRECAUCIONES EN LA ELUCIÓN

- El agua grado HPLC para ser utilizada en la elución debe pasar la siguiente prueba de pureza:
  - Utilizando un detector UV a 250 nm, 0.02 aufs<sup>ooo</sup>, una columna de fase reversa C<sub>18</sub> con tamaño de partícula en el empaque de 10 µm, se corre una elución gradiente de 100% agua a 100% acetonitrilo, a 2 ml/min durante 20 minutos, después de 40 min de pasar agua a través de la columna. El incremento en la línea base no debe ser mayor a 0.12 au.
- El acetonitrilo grado HPLC para ser utilizado en la elución debe pasar la siguiente prueba de pureza:
  - Utilizando un detector UV a 210 nm, 0.02 au<sup>ooo</sup>, una columna de fase reversa C<sub>18</sub> con tamaño de partícula en el empaque de 10 µm, se corre una elución gradiente de 100% acetonitrilo a 100% agua, a 2 ml/min durante 20 minutos, después de 40 min de pasar acetonitrilo a través de la columna. El incremento en la línea base no debe ser mayor a 0.12 au.

---

<sup>ooo</sup> aufs = unidades de absorbancia correspondientes a la escala completa de la respuesta del detector. [absorbance units (corresponding to) full scale].

- Para asegurar que en todas las inyecciones se llena el 100% del loop de! inyector con la muestra por analizar es necesario que se inyecte en cada ocasión un mínimo de diez veces el volumen del mismo. Siendo el volumen del loop que se utiliza en este método de 231.2  $\mu$ l el volumen a inyectarse en éste debe ser mayor a 2.312 ml.
- El filtro de entrada de la bomba que se introduce en el agua debe reemplazarse cada semana.
- El filtro de entrada de la bomba que se introduce en el acetonitrilo debe reemplazarse cada seis meses.
- Las mangueras y las válvulas check del cromatógrafo deben reemplazarse cada seis meses.
- La columna cromatográfica debe reemplazarse cuando ésta ya no sea capaz de pasar la prueba de resolución incluida con la documentación de la misma.
- Antes de iniciar una nueva elución se debe equilibrar la columna con CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 25:75 durante por lo menos cinco minutos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CAPÍTULO VI

# RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

### VI.1 ESTUDIO ESTRUCTURADO

Con base en la metodología estructurada que fue planteada en el capítulo V es como se lleva a cabo este estudio.

En éste capítulo se toman en cuenta los procesos Longitudes de onda y Método Repetible<sup>III</sup>.

El proceso Validación se toma en cuenta en el capítulo 6.

El proceso Solución de limpieza y el proceso Validación para el caso específico de la solución de limpieza no serán tomados en cuenta durante el desarrollo de este estudio.

En toda ocasión —aunque no se mencione— se sigue paso a paso la metodología estructurada desarrollada en el capítulo 4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

<sup>III</sup> Ver diagrama cero, capítulo 4, página 67.

### VI.1.1 Longitudes de onda

Para leer el espectro UV/Vis del Teepol HB7 fue colocada agua grado HPLC en una celda de cuarzo y esta última en el portaceldas del espectrofotómetro. Fue entonces leído el espectro del agua desde 190 nm hasta 800 nm, para ser utilizado como blanco. Posteriormente fue agregada a la celda [gota por gota] una solución de Teepol HB7 1%w/v y leído el espectro —en el mismo rango— en cada ocasión.

De los espectros resultantes del proceso anterior fueron calculados por el espectrofotómetro los puntos máximos de absorbancia, obteniéndose los siguientes resultados, los cuales fueron clasificados con respecto a la intensidad de la absorbancia presentada.

Muy fuerte	Fuerte	Débil	Muy débil
203 nm	223 nm	239 nm	245 nm
208 nm	224 nm	240 nm	280 nm

El conjunto de longitudes de onda obtenido fue introducido al detector y éste último fue programado para hacer las primeras lecturas a 224 nm y 239 nm.

## VI.1.2 Separación

Por tener disponibles varias columnas de fase reversa y dadas las características del Teepol HB7 estudiadas en el capítulo 2, es recomendable el uso de este tipo de columnas para intentar la separación de los componentes del Teepol.

La segunda opción sería la utilización de columnas de intercambio aniónico mas, a falta de este tipo de columnas, se utilizó una columna  $\mu$ Bondapak  $\text{NH}_2^{\text{mmmm,nnn}}$  por ser un intercambiador aniónico débil en medio ácido.

La segunda opción no tuvo resultados positivos pues en todos los casos (con todos los diferentes eluyentes utilizados) resultó tener tiempos de retención muy cortos. Estos tiempos de retención tan cortos se debieron a la muy débil interacción entre el Teepol HB7 y la fase estacionaria dadas las características débilmente aniónicas del Teepol HB7 y de intercambiador aniónico débil por parte de la fase estacionaria  $\mu$ Bondapak  $\text{NH}_2$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

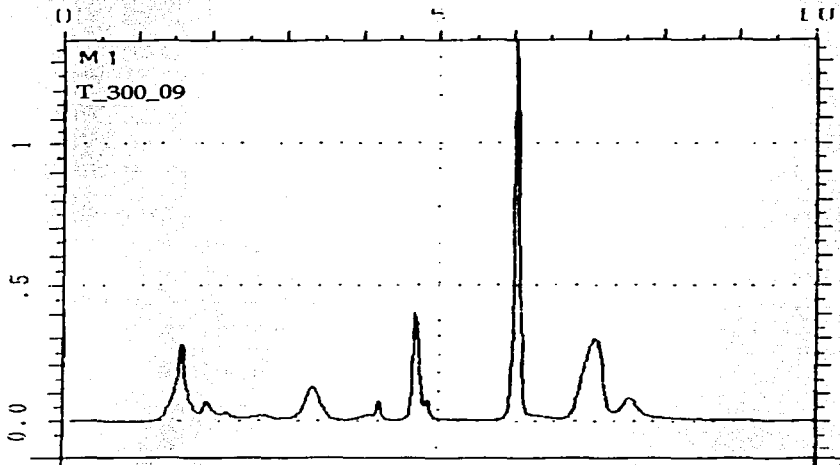
<sup>mmmm</sup>  $\mu$ Bondapak es una marca registrada de Waters Corporation.

<sup>nnn</sup> La columna  $\mu$ Bondapak  $\text{NH}_2$  tiene un empaque formado por una base de silica gel con un tamaño de partícula de  $10 \mu\text{m}$  y forma irregular, con grupos  $\text{NH}_2$  enlazados. Esta columna está considerada como columna de fase normal y en condiciones ácidas como un intercambiador aniónico débil.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

VI.1.2.1 COLUMNAS NOVA-PAK C<sub>8</sub> (3.9 mm ID x 150 mm) EN SERIE

Puesto que en el método prototipo fueron obtenidos muy buenos resultados con el uso de una columna Nova-Pak C<sub>8</sub> de 3.9 mm por 15 cm, se propone el uso de una columna del mismo tipo, pero con el doble de platos teóricos, por lo que —al carecer de una columna C<sub>8</sub> de 3.9 mm x 300 mm— se tomó la decisión de utilizar dos columnas de 150 mm en serie, con lo que se alcanza aproximadamente el doble de platos teóricos [restando la pérdida de platos teóricos que se genera en la unión entre las dos columnas].

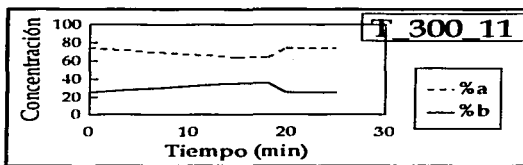


• Cromatograma 5.1

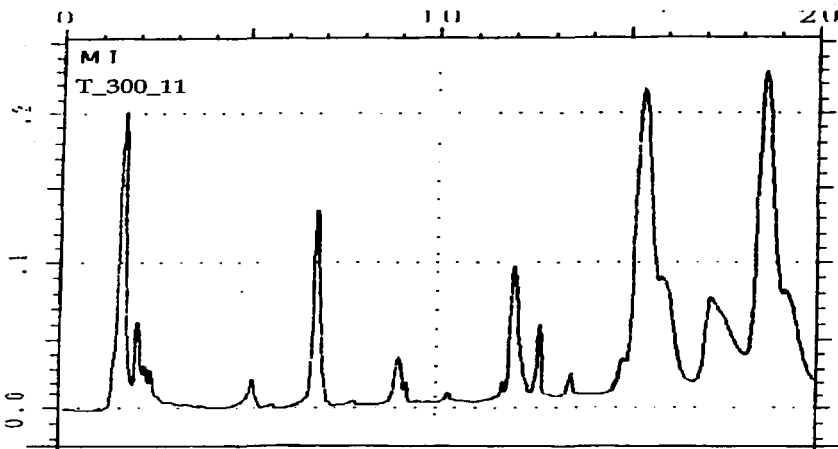
Con una elución isocrática cuya fuerza en el eluyente fue 35% de acetonitrilo se obtuvo la mejor separación isocrática en el cromatograma T\_300\_09. Puede observarse en el cromatograma T\_300\_11 como mejora la separación al utilizar una elución gradiente lineal.

Nombre:	T_300_11	
Tiempo (min)	%a	%b
0	75	25
15	65	35
18	65	35
20	75	25
25	75	25

• Tabla 5.1



• Gráfica 5.1



• Cromatograma 5.2

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

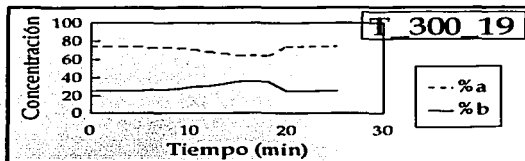
126

Puede observarse en la elución T\_300\_11 como los picos que antes eran dobletes se separan y los picos que antes correspondían a un componente de la mezcla ahora forman dobletes o tripletes.

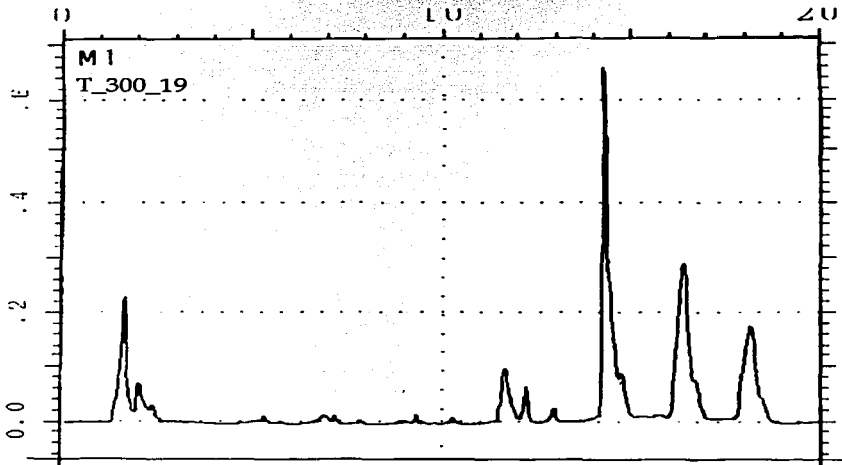
Esta separación es llevada al máximo posible —sin que lleguen a achatarsse los picos— en la elución T\_300\_19 [con la utilización de un gradiente cóncavo].

Nombre: T_300_19			
Tiempo (min)	%a	%b	curva
0	75	25	
15	65	35	-3
18	65	35	
20	75	25	
25	75	25	

• Tabla 5.2



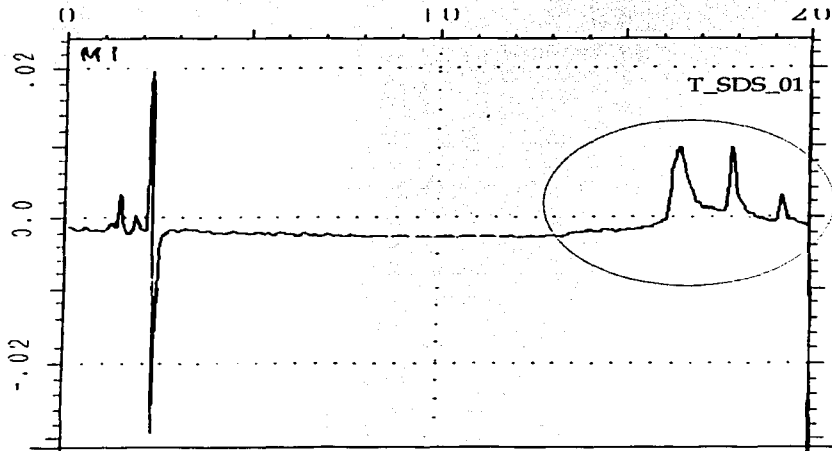
• Gráfica 5.2



• Cromatograma 5.3

El acercar las bases de los picos a la línea base facilita la integración de los mismos, se obtuvo también repetibilidad en los tiempos de retención por lo que la elución T\_300\_19 es candidata a ser el método analítico final.

Fue también hecha una inyección de 300 ppm laurilsulfato de sodio —utilizando el mismo gradiente— para confirmar que el tiempo de retención de éste (alquilsulfato lineal de 12 átomos de carbono) se encuentra dentro del intervalo de tiempos de retención correspondiente a los componentes del Teepol HB7 resultante de la elución T\_300\_19.



• Cromatograma 5.4

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

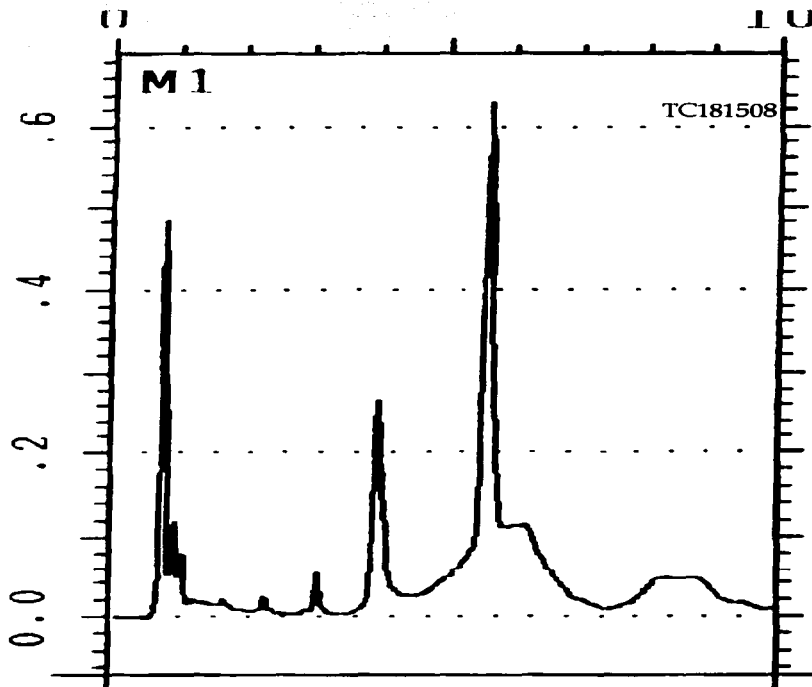


**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

La muestra de laurilsulfato de sodio al ser eluída forma 3 picos cuyos tiempos de retención si se encuentran dentro del intervalo definido para los componentes del Teepol HB7; de ahí se confirma la presunción de la identidad de los picos encontrados en el Teepol HB7 [alquilsulfatos de 9 a 13 átomos de carbono].

VI.1.2.2. COLUMNA NOVA-PAK C<sub>18</sub> (3.9 mm ID x 150 mm)

Por tener una mayor afinidad hacia la parte no polar de los alquilsulfatos se propuso la utilización de la fase estacionaria C<sub>18</sub>, ya que de esta manera se llega a tener un mayor control sobre la separación de los picos con la utilización de eluciones gradientes.



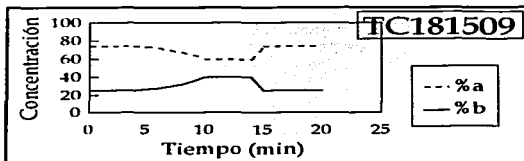
• Cromatograma 5.5

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

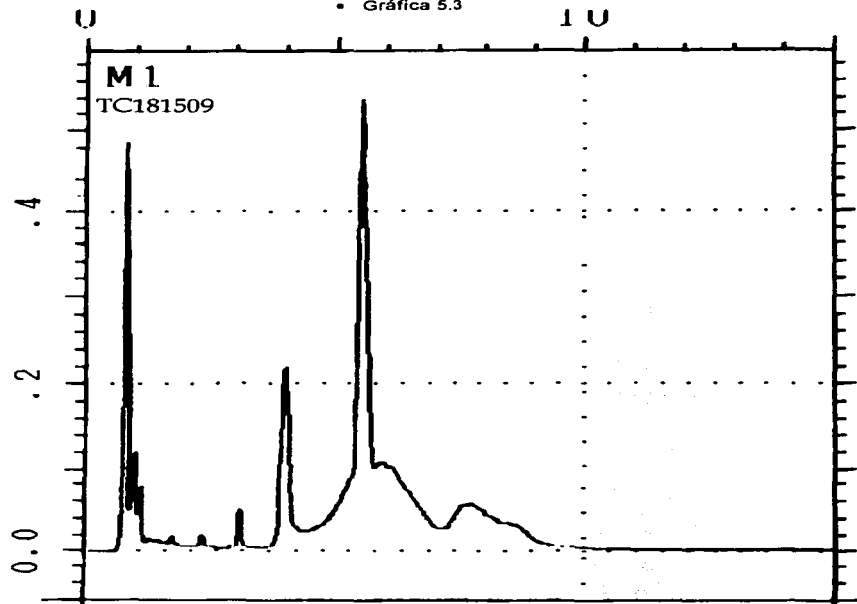
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Nombre: TC181509			
Tiempo (min)	% a	% b	curva
0	75	25	
10	60	40	-5
14	60	40	
15	75	25	
20	75	25	

- Tabla 5.3



- Gráfica 5.3



- Cromatograma 5.6

La elución TC181508 es isocrática con una fuerza de 30% acetonitrilo. Con base en esta elución se realizó la elución TC181509, la cual es gradiente cóncava [el paso por la gradiente lineal fue saltado] y puede observarse que hay una notable disminución en los tiempos de retención por el incremento en la fuerza al final del gradiente.

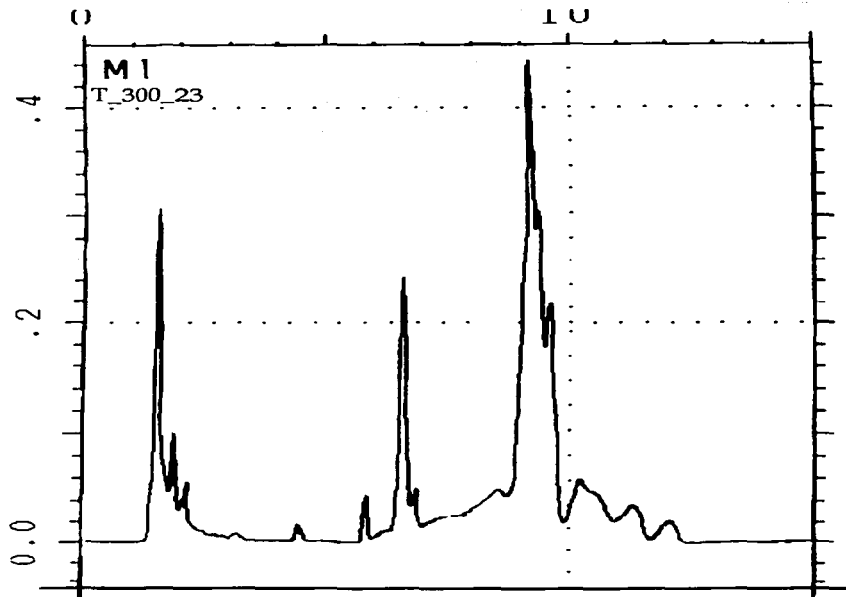
Puesto que la tendencia es incrementar la separación de los picos y en este caso los picos que se obtuvieron fueron muy pocos, se toma la opción de dejar a un lado las pruebas con esta columna e incrementar el número de platos teóricos al doble (con el uso de una columna del doble de longitud).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## VI.1.2.3 COLUMNA NOVA-PAK C<sub>18</sub> (3.9 mm ID x 300 mm)

Nuevamente se efectuó una serie de eluciones isocráticas [disminuyendo cada vez la fuerza del eluyente] hasta obtener con una fuerza de 30% acetonitrilo el cromatograma T\_300\_23.



• Cromatograma 5.7

Con base en esta elución isocrática se hicieron eluciones gradientes lineales, de las cuales se obtuvo la elución T\_300\_27 como base para hacer eluciones cóncavas y obtener así el "gradiente ideal".

Nombre:	T_300_27	
Tiempo (min)	%a	%b
0	75	25
20	60	40
24	60	40
25	75	25
30	75	25

• Tabla 5.4

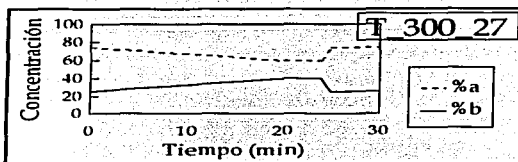
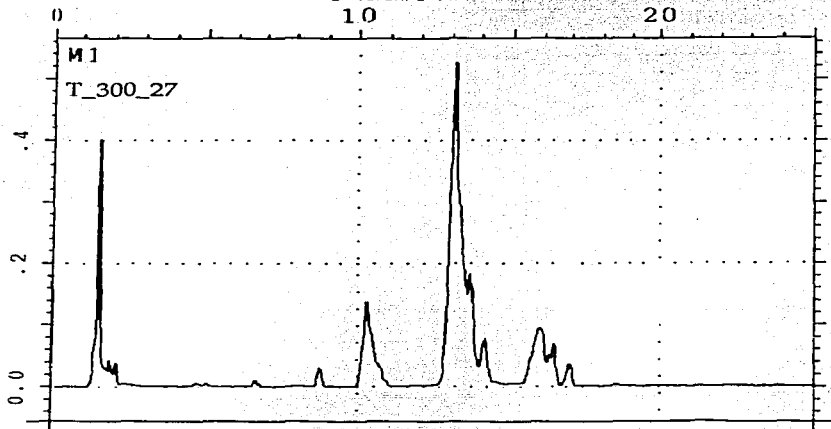


Gráfico 5.4



• Cromatograma 5.8

En esta ocasión no se eligió la mejor separación de los gradientes lineales como punto de partida para las pruebas con gradientes cóncavos puesto que en el momento que se le da la curvatura cóncava al gradiente se incrementan los tiempos de retención por lo que —según las estimaciones— al darle la curvatura al gradiente se deben los últimos picos y el incremento en los tiempos de retención debe separar los dobletes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

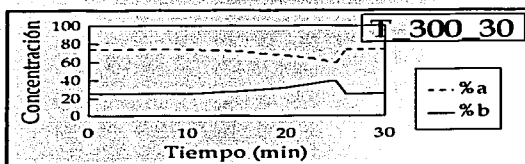
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Tiene más sentido llevar a cabo los ajustes finales sobre el gradiente curvo que sobre el lineal puesto que de tal manera se evita redundancia en éstos y por lo tanto se llega en un número menor de pasos al "gradiente ideal".

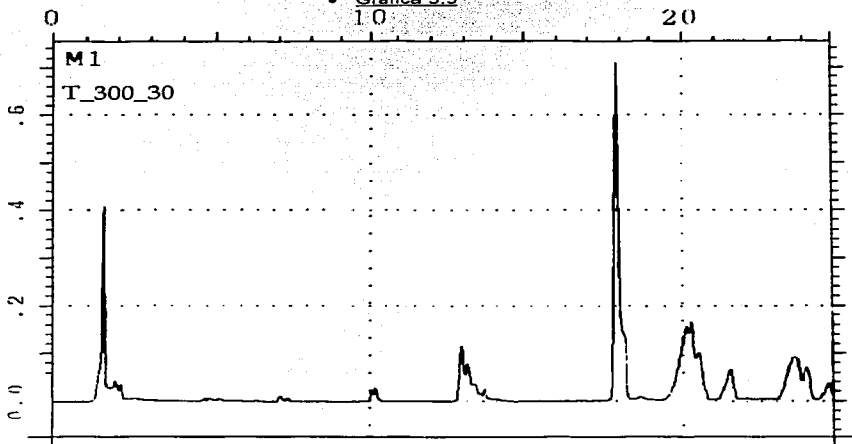
Siguiendo esta tendencia fue como se llegó al gradiente T\_300\_30, el cual presentó tiempos de retención muy grandes con una separación de los picos aún incompleta.

Nombre:	T_300_30	
Tiempo (min)	%a	%b curva
0	75	25
25	60	40
26	75	25
30	75	25

• Tabla 5.5

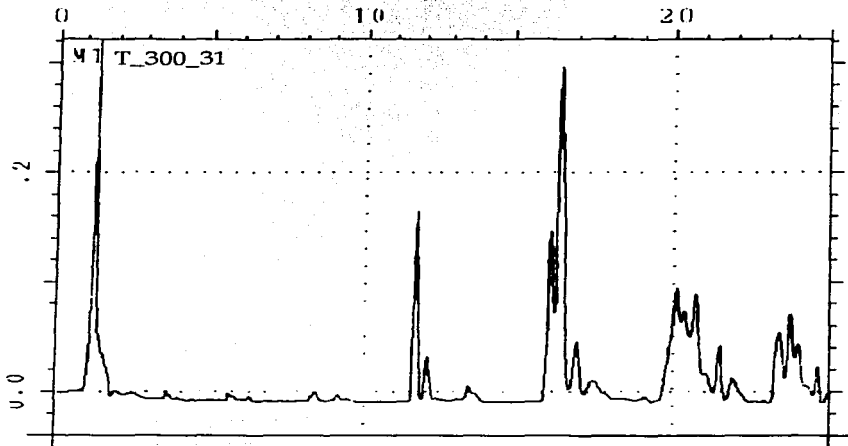


• Gráfica 5.5



• Cromatograma 5.9

Tomando como base el gradiente T\_300\_30 fue hecho el gradiente T\_300\_31, con una diferencia en el flujo del eluyente, el cual aumentó [de 1.2 ml/mín en T\_300\_30 a 1.4 ml/mín en T\_300\_31], de tal manera que al incrementar la magnitud del parámetro  $u$  [ecuación de Van deemter] éste se acerque a su valor  $u_{opt}$  por lo que asimismo se incremente el número de platos teóricos.



• Cromatograma 5.10

A raíz de este incremento en el número de platos teóricos se presentó un incremento en la presión dentro de la columna, la cual llegó a ser cercana a las 6000 psi<sup>∞</sup> (límite máximo de presión para las bombas utilizadas<sup>PPP</sup>) por lo que de seguir esta tendencia de incrementar el término  $u$  sería sobrepasada la presión máxima y al ser mantenido el mismo flujo las bombas trabajarían muy forzadas.

<sup>∞</sup> El término psi es la abreviación en inglés de libras por pulgada cuadrada.

<sup>PPP</sup> Fueron utilizadas durante todo el desarrollo de esta investigación dos bombas Waters 510 controladas externamente desde la estación de trabajo Waters Maxima



## VI.1.2.4 DISCUSIÓN

Dada la similitud que tienen entre sí los componentes del Teepol HB7 es indudable el hecho de que para lograr una completa separación de todos ellos se necesita un incremento en el número de platos teóricos incrementando ya sea la longitud de la columna utilizada, la velocidad en el flujo de la fase móvil (término  $u$ ) o el número de átomos de carbono en la cadena de la fase estacionaria.

De todas las columnas de fase reversa enlazada disponibles en el mercado, la menos polar es la  $C_{18}$  [dadas las condiciones de su fabricación] por lo que no es posible tener una columna de fase enlazada con menor polaridad. Inclusive la posibilidad de conseguir una columna capilar [donde el término A de Van deemter es nulo] para cromatografía de líquidos, tampoco existe pues éstas todavía no se encuentran en el mercado. De lo anterior que tengan que descartarse estas posibilidades como variables de la presente investigación.

La alta presión característica de la cromatografía de líquidos de alta resolución [muchas veces mal llamada cromatografía de líquidos de alta presión] tiene un límite, el cual está impuesto por las características del empaque de la columna y por las características de las bombas que son utilizadas. En ambos casos (para las columnas y bombas utilizadas) la presión límite es 6000 psi, por lo que al ser rebasado este límite podrían dañarse el empaque de la columna y las bombas. La consideración anterior debe tomarse en cuenta al intentar un incremento en el número de platos teóricos puesto que al aumentar la longitud de la columna se incrementa la presión y ésta también crece al incrementar el flujo del eluyente [el cual —por estar compuesto de dos solventes distintos— tiene mayor viscosidad que cada solvente por separado].

Tomando en cuenta las consideraciones anteriores no es posible continuar incrementando el número de platos teóricos con los recursos disponibles a fin de alcanzar la completa separación de los componentes alquilsulfatos del Teepol HB7 y poder de esta manera cuantificar cada uno por separado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **VI.1.3 Colapso**

Partiendo del hecho de que no es necesaria una completa separación de todos los alquilsulfatos presentes en el Teepol HB7 para poder cuantificarlos con completa exactitud, puesto que no se dispone de los estándares para cada uno de ellos —en el caso de que fuera posible la completa separación de los mismos— y, dada la similitud entre ellos, presentan asimismo características muy similares de absorbancia; el hecho de colapsarlos en un solo pico [haciendo uso de la ley de Beer] daría como resultado la suma de sus absorbancias en cada punto del tiempo de retención donde el pico contenga dos o más componentes.

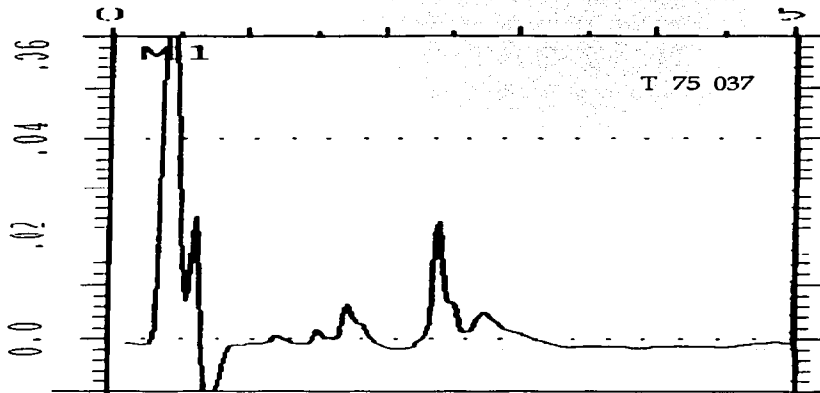
A diferencia de los intentos por separar todos los componentes del Teepol HB7 —en donde se llegaba a los 25 minutos de elución gradiente sin que el componente alquilsulfato menos polar hubiera emergido de la columna—, cuando se utiliza el colapso para eluir juntos todos los componentes alquilsulfatos del Teepol HB7 se esperan tiempos de elución menores a los 5 minutos.

### VI.1.3.1 COLUMNA NOVA-PAK C<sub>8</sub> (3.9 mm ID x 75 mm)

El colapso de los componentes del Teepol HB7 —siendo una técnica que requiere un mínimo de platos teóricos— no requiere la utilización de columnas muy largas por lo que fue electa para éste propósito la columna Nova-Pak C<sub>8</sub> de 3.9 mm ID por 75 mm.

Al utilizar esta técnica, lo que se pretende es colapsar en el menor número posible de picos todos los alquilsulfatos; puesto que se desea cuantificar alquilsulfatos, no componentes individuales. La deficiencia de esta técnica se encuentra en el hecho de que —por estar muy cerca del punto de inyección— puede haber componentes contaminantes que queden enmascarados dentro del grupo de picos colapsados y —por lo tanto— interfieran en la cuantificación.

El primer colapso satisfactorio se observa en el cromatograma T\_75\_037 y consiste en una elución isocrática con una fuerza de 30% acetonitrilo.



• Cromatograma 5.11

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

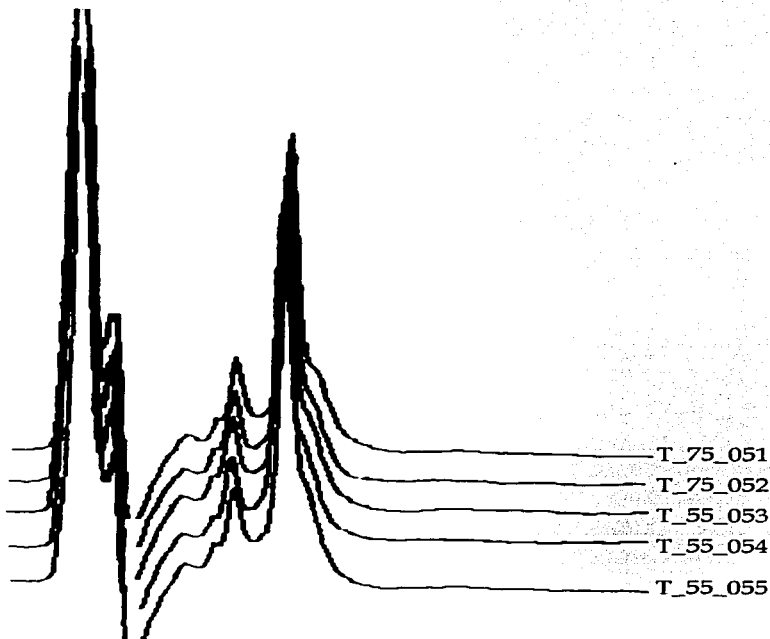
TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

T\_75\_047

T\_75\_048

T\_75\_049

En los cromatogramas T\_75\_047, T\_75\_048 y T\_75\_049 se observa una aparente repetibilidad en los tiempos de retención y en el área para una elución isocrática cuya fuerza es 28%  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Puede también observarse que los picos se encuentran colapsados a una considerable distancia del punto de inyección, lo que —además de facilitar su integración— disminuye la probabilidad de tener sustancias contaminantes que se incluyan dentro del grupo de picos colapsados al momento de la integración.



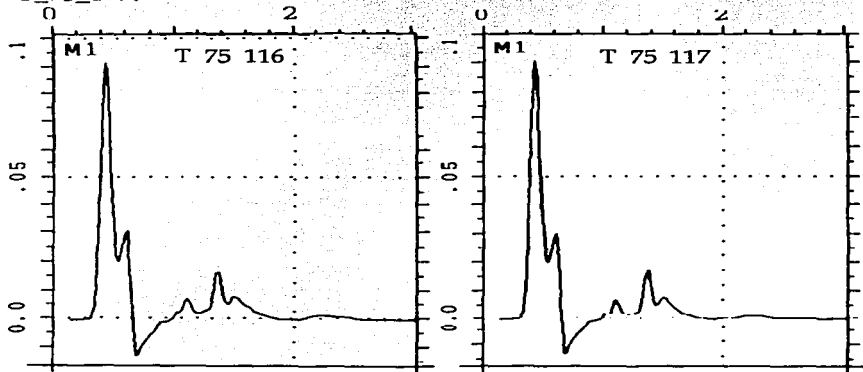
Cromatograma 5.13

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En los cromatogramas , T\_75\_052, T\_75\_053, T\_75\_054 y T\_75\_055 (elución isocrática con una fuerza de  $\text{CH}_3\text{CN}$  35%) se tiene un colapso máximo de los alquilsulfatos, de tal manera que el grupo de picos resultante pueda ser integrado. De esta manera también se alcanza una aparente repetibilidad en los tiempos de retención y en el área de los picos. El inconveniente de tener los picos colapsados en un tiempo de retención tan corto es —como ya se ha comentado— la posibilidad de enmascarar contaminantes, los cuales pueden interferir con la exactitud y precisión de las mediciones.

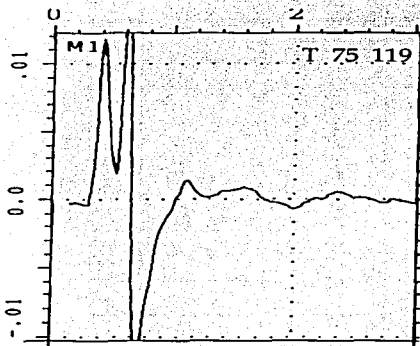
Al disminuir la concentración de las muestras de Teepol HB7 de 10% a 1% se mantienen las características mencionadas en el párrafo anterior, como lo muestran los cromatogramas T\_75\_116 y T\_75\_117.



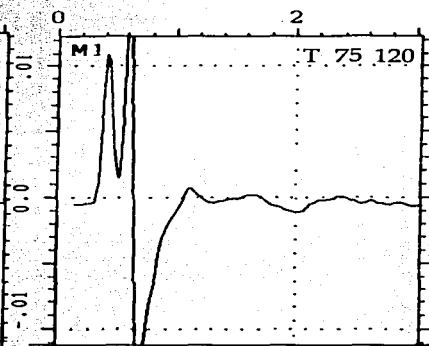
• Cromatograma 5.14

• Cromatograma 5.15

Al disminuir la concentración de las muestras de Teepol HB7 a 0.1% se pierde la capacidad de integrar los picos de alquilsulfatos, puesto que éstos se pierden dentro del ruido de la línea base.



• Cromatograma 5.16



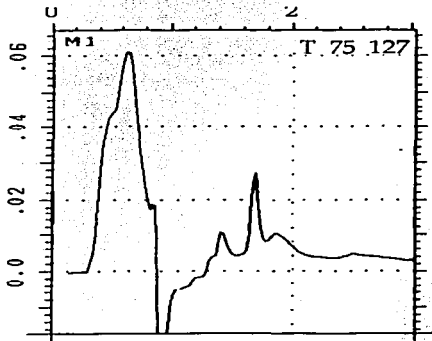
• Cromatograma 5.17

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

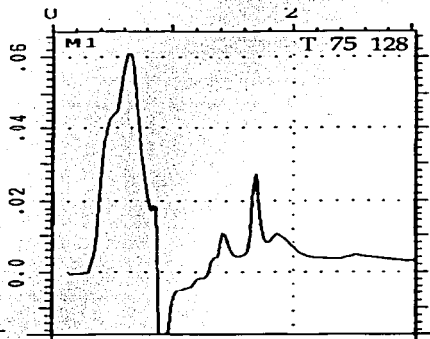


# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La solución fue elaborada para elaborar un nuevo loop con un volumen aproximadamente diez veces mayor que el actual (de 20 $\mu$ l a 200 $\mu$ l).



• Cromatograma 5.18



• Cromatograma 5.19

Se recupera de esta manera la capacidad de integrar los picos formados por ailsulfatos.

Para los propósitos de esta etapa tan temprana de la investigación se considera irrelevante la capacidad del nuevo loop utilizado puesto que no es su propósito medir la exactitud de la integración, sino únicamente observar la separación —en este nuevo loop— de los componentes del Teepol HB7 utilizando concentraciones similares a las que se tendrían en la solución de limpieza y utilizando los mismos procedimientos para la búsqueda del "gradiente ideal". Posteriormente, cuando sea relevante conocer la capacidad del nuevo loop, serán realizadas las mediciones pertinentes.

A pesar de las ventajas que presentaron el poco tiempo de elución y la aparente repetibilidad de las áreas de los picos y de los tiempos de retención, se considera inadecuado el colapso para la cuantificación de Teepol HB7 dada la potencial inexactitud ocasionada por sustancias contaminantes que sean eluidas en los mismos tiempos de retención que los alquilsulfatos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### VI.1.4 Colapso retardado

Obedece la utilización de esta técnica a la necesidad de mantener las ventajas del colapso (tiempos de elución muy cortos, facilidad para la integración de los picos, repetibilidad en los tiempos de retención y la integración simultánea de varios componentes como consecuencia de la ley de Beer), evitando al mismo tiempo la potencial inexactitud causada por sustancias extrañas a los alquilsulfatos, las cuales sean coeluidas.

Su fundamento consiste en que al iniciar la elución con una fuerza un poco menor a la utilizada para eluir los componentes y una pendiente casi igual a cero, serán eluidos la mayoría de los componentes contaminantes de tal manera que éstos ya no puedan interferir con la integración de los alquilsulfatos; inmediatamente después se debe elevar violentamente la fuerza del eluyente hasta que esta sea un poco mayor a la necesaria para eluir el último de los alquilsulfatos, para de esta manera lograr que éstos sean eluidos en el intervalo de tiempo más corto posible; lo cual significa que al ser eluidos los alquilsulfatos, éstos estarían colapsados, obteniendo así las ventajas del colapso sin sus desventajas [sin incluir en las desventajas la falta de selectividad puesto que —como se mencionó en la descripción del colapso<sup>999</sup>— ésta no es aplicable para este caso en particular].

---

<sup>999</sup> Ver colapso en la página 94.

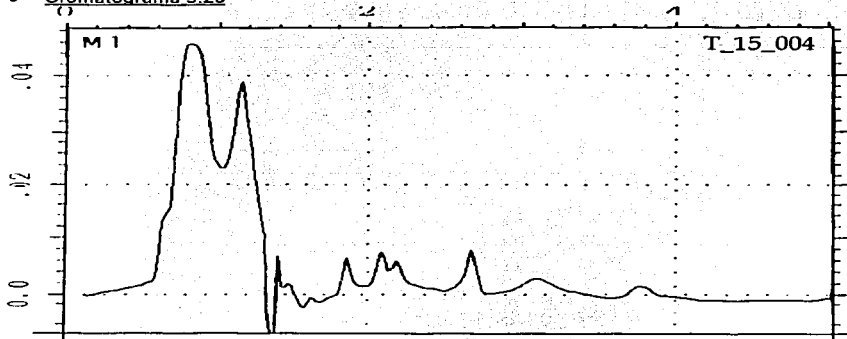
#### VI.1.4.1 COLUMNA NOVA-PAK $C_{18}$ (3.9 mm ID x 150 mm)

Para poder mantener los alquilsulfatos retenidos en la columna durante el tiempo en el cual la pendiente del gradiente es cercana a cero, se necesita un mayor número de platos teóricos que para el colapso sencillo; sin embargo este número de platos teóricos no debe ser excesivo, puesto que ocasionaría problemas de alta presión en la columna y tiempos de retención mayores de lo planeado, además de incrementar la selectividad, la cual es inversamente proporcional al colapso.

Una columna con un número de platos teóricos intermedio (adecuado a las características especificadas en el párrafo anterior) es la Nova-Pak  $C_{18}$  [con una longitud intermedia y la menor polaridad disponible] puesto que —sin provocar problemas de alta presión— debe retener los alquilsulfatos suficientemente para darles tiempo de salir a los componentes que tienen una polaridad mayor y su número de platos teóricos debe mantener un colapso aceptable.

La primera separación isocrática (T\_15\_004) comienza con la fuerza del eluyente que presentó el mejor colapso ( $CH_3CN$  35%).

- Cromatograma 5.20



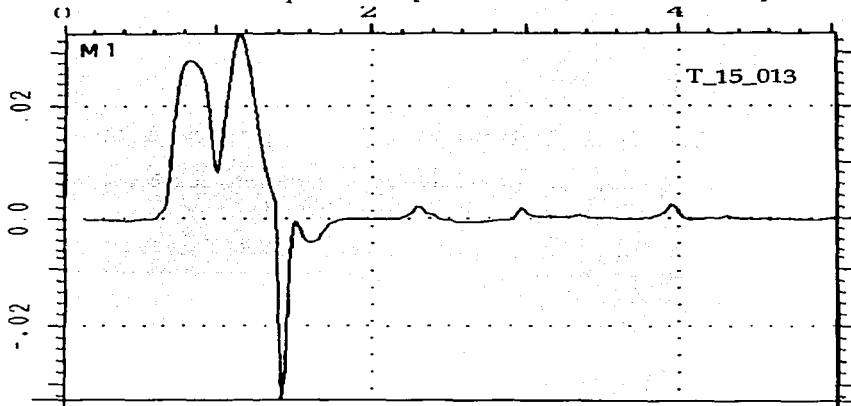
Se observa en el cromatograma T\_15\_004 —como era de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

esperarse— una mayor separación que con la utilización de la columna de 3.9 x 75 mm. Debe tomarse en cuenta esta separación de los picos para determinar la fuerza del eluyente al final del gradiente de colapso retardado, la cual debe ser mayor que ésta (35%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) para poder colapsar nuevamente los picos.

Posteriormente se utilizó una elución isocrática (T\_15\_013) cuya fuerza es  $\text{CH}_3\text{CN}$  30% para poder observar en el cromatograma resultante una distancia —a partir del punto de inyección— lo suficientemente grande para aislar el grupo de alquilsulfatos del resto de las sustancias presentes [en este caso, contaminantes].



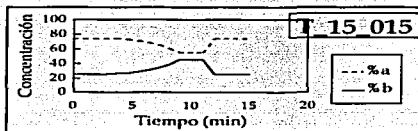
• Cromatograma 5.21

De manera similar al cromatograma anterior, se debe tomar en cuenta esta separación de los picos para determinar la fuerza del eluyente al inicio del gradiente de colapso retardado, la cual debe ser menor que ésta para poder mantener una distancia (tiempo) suficiente entre el punto de inyección y el grupo de alquilsulfatos.

Es importante señalar la necesidad de la utilización de agua cuyo frasco haya sido recientemente abierto y ésta haya sido recientemente filtrada, puesto que el crecimiento bacteriano produce sustancias generadoras de ruido en la línea base cuando se emplean eluciones gradientes.

El cromatograma T\_15\_015 corresponde a una elución en la que el agua tenía más de tres días de haber sido filtrada, mientras que el cromatograma T\_15\_018 corresponde a una elución con agua filtrada el mismo día. Para ambos casos el frasco de donde se obtuvo el agua tenía más de un mes de haberse abierto. El mismo gradiente es utilizado en ambos casos.

Nombre: T 15 015			
Tiempo (min)	%a	%b	curva
0	75	25	
9	55	45	-5
11	55	45	
12	75	25	
15	75	25	

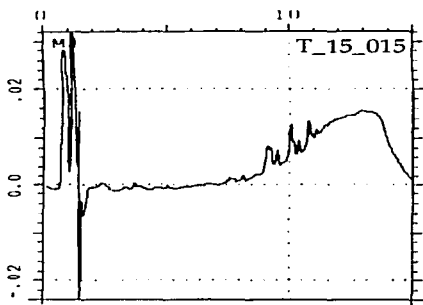


• Tabla 5.6

• Gráfica 5.6

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



• Cromatograma 5.22

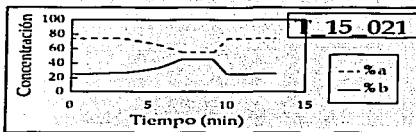


• Cromatograma 5.23

Se incorporó en el protocolo un procedimiento para mantener el agua HPLC siempre en óptimas condiciones de uso.

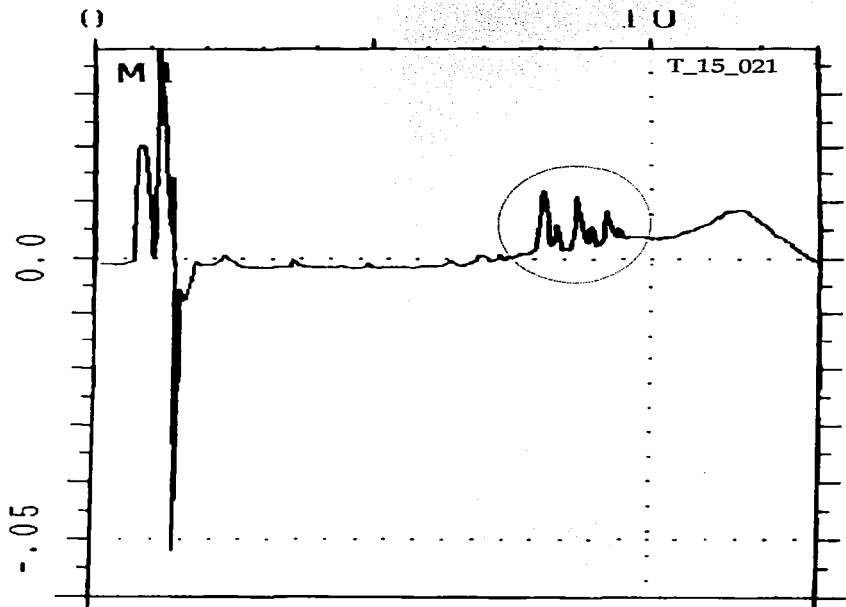
Se incrementó ligeramente la pendiente del gradiente, con el fin de colapsar un poco más el grupo de alquilsulfatos.

Nombre: T_15_021			
Tiempo (min)	%a	%b	curva
0	75	25	
7	55	45	-5
9	55	45	
10	75	25	
13	75	25	



• Tabla 5.7

• Gráfica 5.7



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



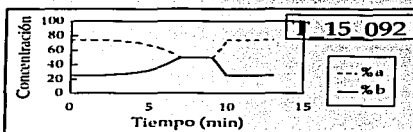
TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

- Cromatograma 5.24

Con el fin de colapsar aún más el grupo de alquilsulfatos se elevó la fuerza del eluyente al final del gradiente de 45% a 50%  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Se observa repetibilidad en los tiempos de retención y en el área de los picos.

Nombre:	T_15_092		
Tiempo (min)	%a	%b	curva
0	75	25	
7	50	50	-5
9	50	50	
10	75	25	
13	75	25	

• Tabla 5.8



• Gráfica 5.8



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

Una vez que se llegó a la mejor opción para el análisis cromatográfico de alquilsulfatos en el Teepol HB7 —dada su lejanía del punto de inyección, el colapso de los alquilsulfatos en un intervalo muy corto de tiempo y la aparente repetibilidad de los tiempos de retención y de las áreas de los picos— se concluye esta primera parte del estudio estructurado, para continuar con la validación, en la cual se debe demostrar que el presente método analítico realmente sirve para cuantificar la concentración de tensoactivos en el Teepol HB7 y supera al método analítico utilizado actualmente.

## **VI.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

En este capítulo se describe el proceso de validación, mediante el cual se deben conocer los límites de operación del método analítico, entre los cuales se encuentran:

- Especificidad
- Linearidad
- Concentración mínima detectable
- Concentración mínima cuantificable
- Repetibilidad
- Reproducibilidad

Para los propósitos de mantener la documentación necesaria, ésta validación se llevó a cabo de acuerdo con lo establecido en el protocolo de validación especificado en el apéndice II y el protocolo de análisis especificado en el apéndice III.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI.2.1 Especificidad

VI.2.1.1 UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER<sup>\*\*\*</sup>

Se emplearon las siguientes soluciones:

- #1 Laurilsulfato de sodio grado reactivo 5000 ppm
- #2 Teepol HB7 (concentración de materia activa = 0.8262%)
- #3 Agua grado HPLC —como blanco—

Para cada caso se recolectó a la salida del detector la fase móvil entre los 5:30 y los 9:00 minutos de elución.

Para cada una de las tres soluciones recolectadas se leyó el espectro de absorbancia infrarrojo desde una longitud de onda de 800 nm hasta una longitud de onda de 3500 nm.

A los espectros de las soluciones #1 y #2 les fue restado algebraicamente el espectro de la solución #3 (blanco) para de esta manera obtener únicamente los espectros de los alquilsulfatos sin que éstos incluyan el espectro del eluyente.

Al llevar a cabo la comparación de los espectros #1 y #2 se encontró una perfecta correspondencia entre las bandas de absorbancia de ambos, por lo cual quedó demostrado —mediante la técnica de espectrofotometría infrarroja— que las sustancias eluidas [entre los 5:30 y 9:00 minutos] de una solución de Teepol HB7 son alquilsulfatos puesto que presentan el mismo espectro de absorbancia infrarrojo que las sustancias eluidas [en el mismo tiempo] de una solución de laurilsulfato de sodio (alquilsulfato  $C_{12}$ ).

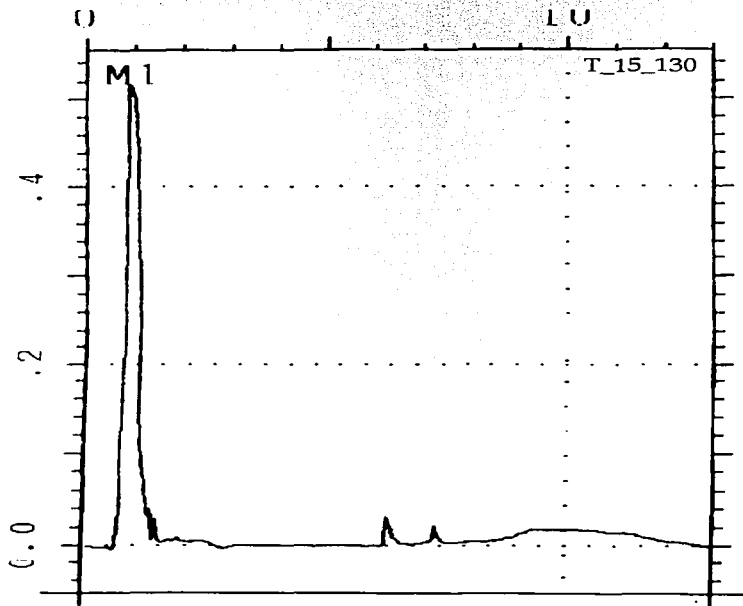
<sup>\*\*\*</sup> Los espectros de absorción infrarroja obtenidos en el espectrofotómetro Nicolet 710 no se imprimieron, por lo que el único testimonio que se tiene de la especificidad del método analítico para la cuantificación de alquilsulfatos (en el caso de esta técnica) es la interpretación de los resultados.

### VI.2.1.2 UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV/VIS POR ARREGLO DE DIODOS.

Se emplearon las siguientes soluciones:

- #1 Laurilsulfato de sodio grado reactivo 5000 ppm
- #2 Teepol HB7 (concentración de materia activa = 0.8262%)

La solución # 1 produjo el siguiente cromatograma:

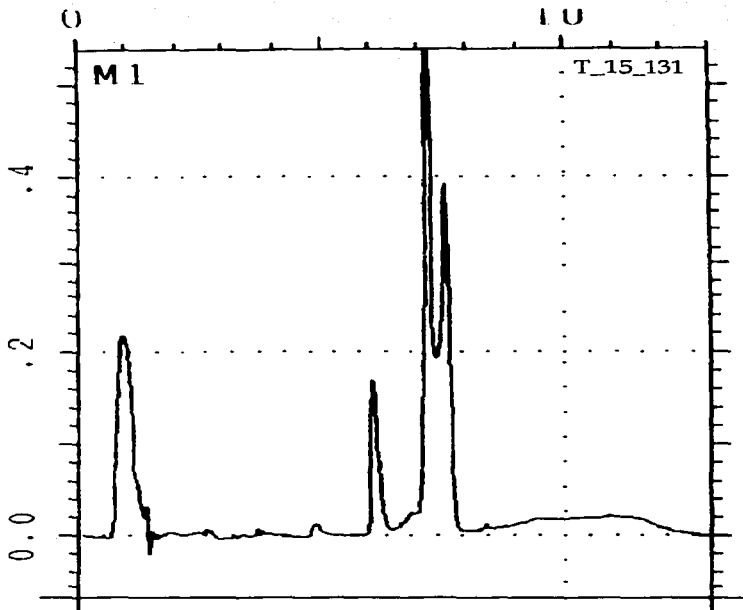


• Cromatograma 6.1 Laurilsulfato de sodio 5000 ppm

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La solución #2 produjo el siguiente cromatograma:

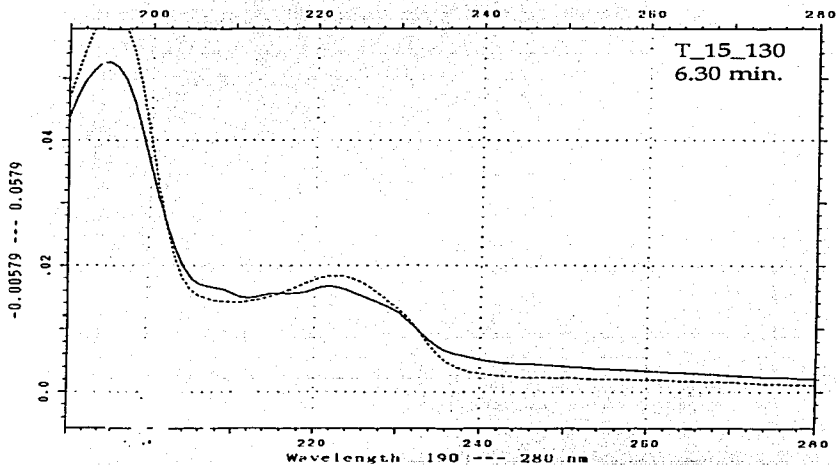


- Cromatograma 6.2 Teepol HB7 0.8262% materia activa

En el detector de arreglo de diodos Waters 994 se leyeron los espectros [entre 190 nm y 280 nm] para cada uno de los picos obtenidos de cada una de las dos soluciones (#1 y #2).

De la solución #1 se obtuvieron los siguientes espectros:

El primero a los 6.30 minutos de elución



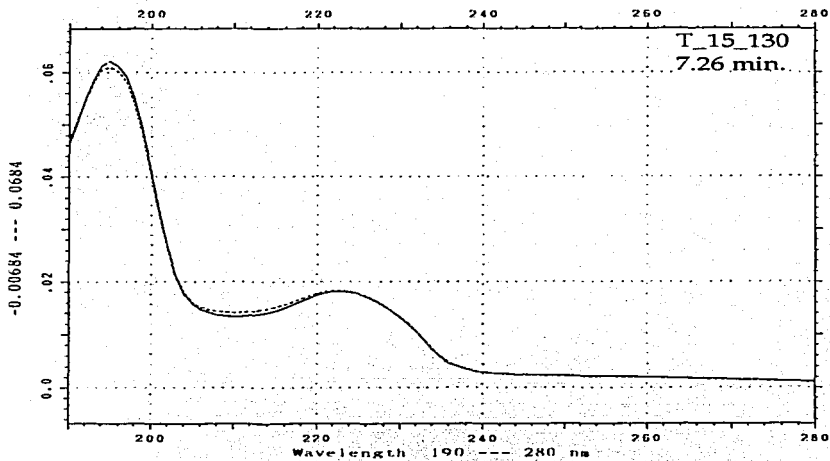
- Espectro 6.1 Primer pico de laurilsulfato de sodio a los 6.30 minutos de elución.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El segundo a los 7.26 minutos de elución

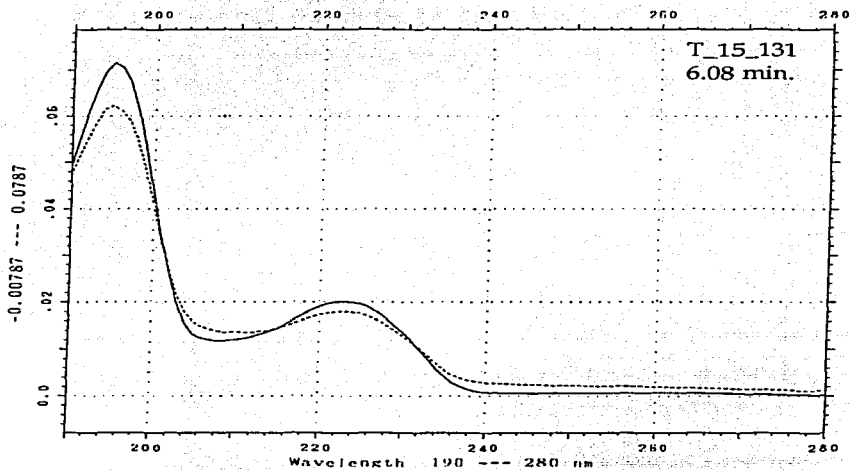


- Espectro 6.2 Segundo pico de laurilsulfato de sodio a los 7.26 minutos de elución.

UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MEXICO

De la solución #2 se obtuvieron los siguientes espectros:

El primero a los 6.08 minutos de elución



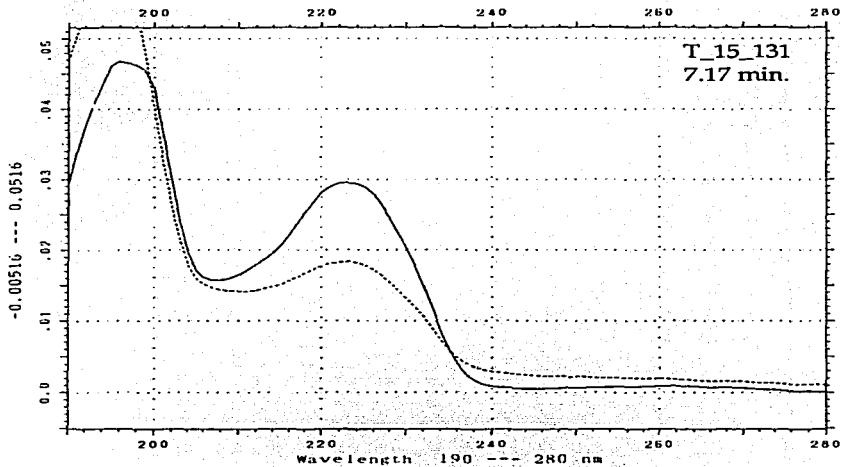
• Espectro 6.3 Primer pico de Teepol HB7 a los 6.08 minutos de elución.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

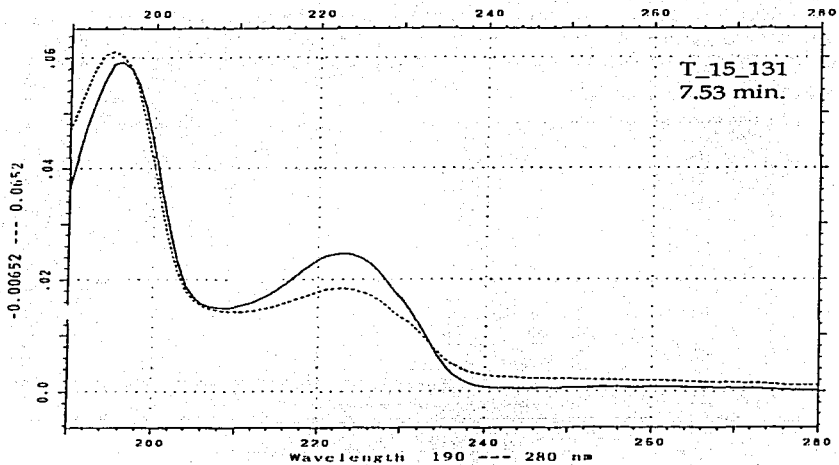
162

El segundo a los 7.17 minutos de elución



- Espectro 6.4 Segundo pico de Teepol HB7 a los 7.17 minutos de elución.

El tercero a los 7.53 minutos de elución



- Espectro 6.5 Tercer pico de Teepol HB7 a los 7.53 minutos de elución.

Dada la perfecta correspondencia entre las bandas de absorbancia UV del Laurilsulfato de sodio y las del Teepol HB7, y la proporcional intensidad de las mismas queda demostrado que los componentes eluidos entre los 5:30 y los 9:00 minutos de una solución de Teepol HB7 pertenecen a la misma familia que los correspondientes componentes del Laurilsulfato de sodio.

Queda demostrado que los componentes del Teepol HB7 eluidos entre los 5:30 y los 9:00 minutos son alquilsulfatos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI.2.2 Linearidad

Para validar la linealidad de la respuesta del detector con respecto a la concentración de la muestra [de acuerdo con la ley de Beer] fue generada una curva de calibración con las soluciones que se muestran en la siguiente tabla<sup>sss</sup>:

<b>Muestra</b>	<b>Concentración</b>
T_V_053	0.413100
T_V_054	0.413100
T_V_055	0.309825
T_V_056	0.309825
T_V_057	0.309825
T_V_060	0.206550
T_V_061	0.206550
T_V_062	0.206550
T_V_063	0.206550
T_V_064	0.206550
T_V_065	0.185895
T_V_066	0.185895
T_V_067	0.185895
T_V_068	0.185895
T_V_069	0.185895
T_V_070	0.165240
T_V_071	0.165240
T_V_072	0.165240
T_V_073	0.165240
T_V_074	0.165240
T_V_075	0.123930
T_V_076	0.123930
T_V_077	0.123930
T_V_078	0.082620
T_V_079	0.082620
T_V_084	0.165240
T_V_085	0.185895
T_V_086	0.206550
T_V_094	0.247860

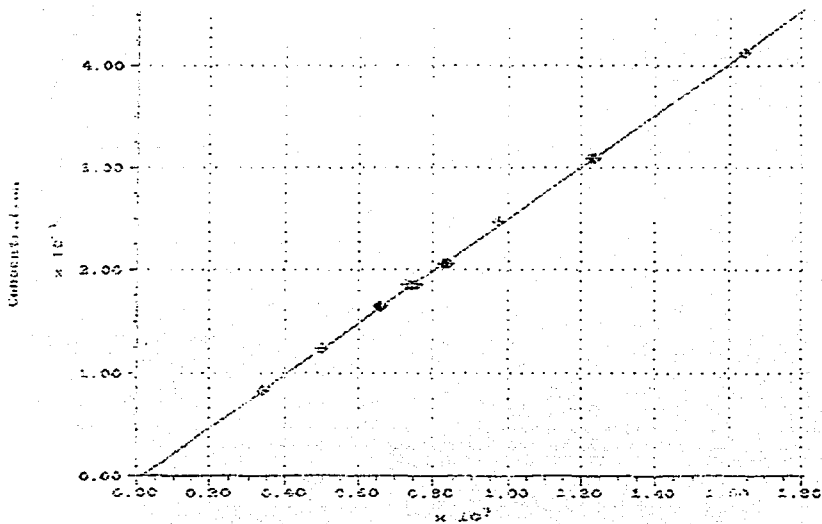
<sup>sss</sup> Las soluciones de la curva de calibración fueron preparadas a partir de una muestra de Teepol HB7 cuya concentración de materia activa fue igual a 41.31%.

Las diluciones de Teepol HB7, según la curva de calibración, se inyectaron en el cromatógrafo de acuerdo con lo que indica el protocolo de validación. Al ejecutar el método, la estación de trabajo Waters Maxima generó el siguiente reporte:

Alquil Sulfatos Calibration Report							
Quant Basis: Area Curve Type: Linear Y-axis Label: Concentration		Rejection Tolerance: None Weighting: None		Printed: 22-Oct-06 07:58:04 AM Internal Standard: None Forced Through Origin: No			
Corr. Coef. (r): 0.9997582				Coef. Of Determination (r**2): 0.9995165			
Equation: Conc = -3.413026E-003 + 2.534976E-08 * R							
Sample	File Name	Valid	Concentration	Response	Calc'd Concentration	% Deviation	Response Factor
Teepol1	T V 053	Y	4.131000E-001	1.6434211E+007	4.131895E-001	-2.17E-002	2.513659E-008
Teepol2	T V 054	Y	4.131000E-001	1.6423288E+007	4.129126E-001	4.54E-002	2.515331E-008
Teepol3	T V 055	Y	3.098250E-001	1.2401476E+007	3.1046657E-001	-3.67E-001	2.498251E-008
Teepol4	T V 056	Y	3.098250E-001	1.2359965E+007	3.098931E-001	-2.20E-002	2.506904E-008
Teepol5	T V 057	Y	3.098250E-001	1.2249288E+007	3.071022E-001	8.87E-001	2.529335E-008
Teepol7	T V 060	Y	2.065500E-001	8.4217370E+006	2.100752E-001	-1.68E+000	2.452582E-008
Teepol8	T V 061	Y	2.065500E-001	8.3727880E+006	2.088344E-001	-1.09E+000	2.466920E-008
Teepol9	T V 062	Y	2.065500E-001	8.2833075E+006	2.076507E-001	-5.19E-003	2.493632E-008
Teepol10	T V 063	Y	2.065500E-001	8.3023830E+006	2.074444E-001	-2.41E-001	2.487740E-008
Teepol11	T V 064	Y	2.065500E-001	8.3616305E+006	2.085520E-001	-9.60E-001	2.470206E-008
Teepol12	T V 065	Y	1.858950E-001	7.6237400E+006	1.898366E-001	-2.08E+000	2.438490E-008
Teepol13	T V 066	Y	1.858950E-001	7.4827200E+006	1.856009E-001	1.58E-001	2.493136E-008
Teepol14	T V 067	Y	1.858950E-001	7.5071840E+006	1.868915E-001	-5.33E-001	2.476228E-008
Teepol15	T V 068	Y	1.858950E-001	7.3359530E+006	1.825308E-001	1.83E+000	2.534027E-008
Teepol16	T V 069	Y	1.858950E-001	7.4481960E+006	1.853913E-001	2.72E-001	2.495903E-008
Teepol17	T V 070	Y	1.652400E-001	6.6167415E+006	1.641100E-001	5.61E-001	2.497302E-008
Teepol18	T V 071	Y	1.652400E-001	6.6016835E+006	1.630857E-001	9.35E-002	2.485939E-008
Teepol19	T V 072	Y	1.652400E-001	6.6203355E+006	1.644355E-001	5.08E-001	2.496014E-008
Teepol20	T V 073	Y	1.652400E-001	6.6262260E+006	1.6426121E-001	4.12E-001	2.493570E-008
Teepol21	T V 074	Y	1.652400E-001	6.6212360E+006	1.6315120E-001	4.40E-001	2.494370E-008
Teepol22	T V 075	Y	1.239300E-001	4.9313600E+006	1.2331887E-001	5.95E-001	2.481307E-008
Teepol23	T V 076	Y	1.239300E-001	4.9228835E+006	1.2313460E-001	6.30E-001	2.482133E-008
Teepol24	T V 077	Y	1.239300E-001	4.9202260E+006	1.2281800E-001	6.62E-002	2.468649E-008
Teepol25	T V 078	Y	8.262000E-002	3.3110617E+006	8.3161411E-002	-5.88E-001	2.420630E-008
Teepol26	T V 079	Y	8.262000E-002	3.3003525E+006	8.2611020E-002	9.27E-003	2.434617E-008
Teepol30	T V 084	Y	1.652400E-001	6.6263730E+006	1.6443271E-001	1.11E+000	2.510466E-008
Teepol31	T V 085	Y	1.858950E-001	7.4871230E+006	1.8635295E-001	-2.60E-001	2.482900E-008
Teepol32	T V 086	Y	2.065500E-001	8.3743635E+006	2.0883740E-001	-1.12E+000	2.466976E-008
Teepol35	T V 094	Y	2.478900E-001	9.7714200E+006	2.4777210E-001	1.68E+000	2.541869E-008

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

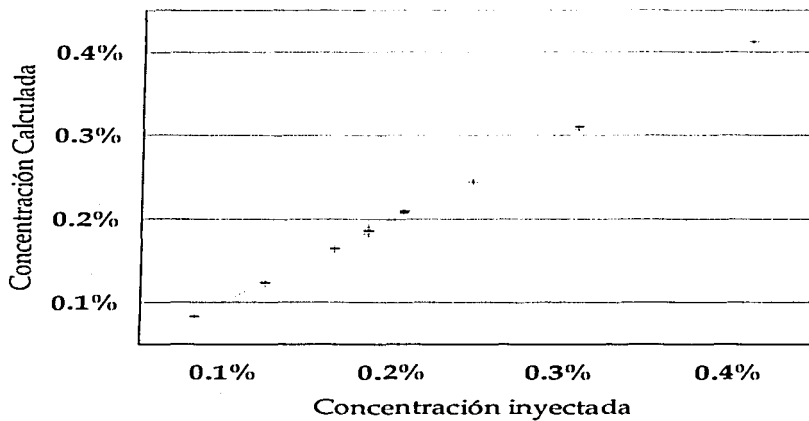
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Señal Sulfatos Peak Response

- Gráfica 6.1 Reporte de calibración de alquilsulfatos en Teepol HB7.

## Linealidad

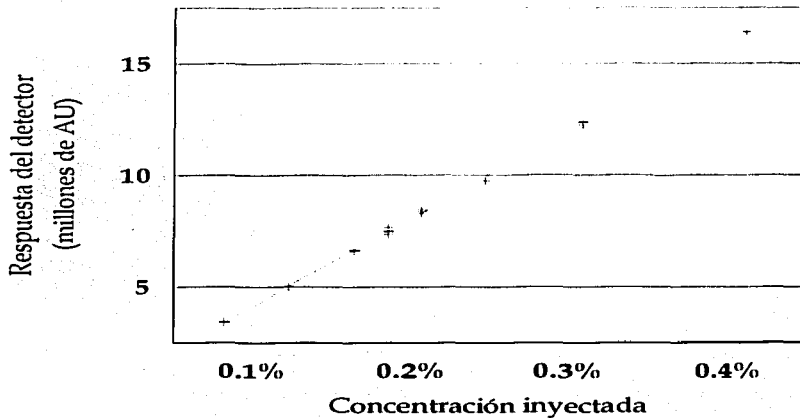


• Gráfica 6.2 Concentración calculada vs concentración inyectada.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

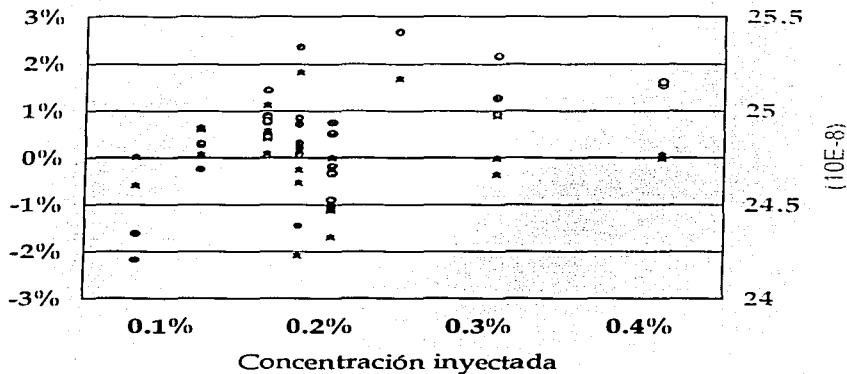


## Linearidad



- Gráfica 6.3 Respuesta del detector vs concentración inyectada.

## Linealidad



\* % Desviación    o Factor de respuesta

- Gráfica 6.4 Comparación del porcentaje de desviación con el factor de respuesta.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Con la información proporcionada por el reporte anterior se llevaron a cabo los cálculos del coeficiente de variación (F).

<b>Muestra</b>	<b>Concentración</b>	<b>Respuesta</b>	<b>F</b>
Teepol1	4.131000E-001	1.6434211E+007	39782645.8484628
Teepol2	4.131000E-001	1.6423288E+007	39756204.3088841
Teepol3	3.098250E-001	1.2401676E+007	40028002.9048656
Teepol4	3.098250E-001	1.2359365E+007	39891438.7154039
Teepol5	3.098250E-001	1.2249268E+007	39536086.5004438
Teepol7	2.065500E-001	8.4217370E+006	40773357.5405471
Teepol8	2.065500E-001	8.3727880E+006	40536373.7593803
Teepol9	2.065500E-001	8.2830975E+006	40102142.3384168
Teepol10	2.065500E-001	8.3023830E+006	40195511.9825708
Teepol11	2.065500E-001	8.3616505E+006	40482452.1907528
Teepol12	1.858950E-001	7.6233640E+006	41008978.1866107
Teepol13	1.858950E-001	7.4562720E+006	40110126.6844186
Teepol14	1.858950E-001	7.5071840E+006	40384001.7214019
Teepol15	1.858950E-001	7.3359530E+006	39462884.9619409
Teepol16	1.858950E-001	7.4480060E+006	40065660.7224508
Teepol17	1.652400E-001	6.6167415E+006	40043218.9542484
Teepol18	1.652400E-001	6.6469855E+006	40226249.6974098
Teepol19	1.652400E-001	6.6201555E+006	40063879.8111837
Teepol20	1.652400E-001	6.6262960E+006	40101040.9101912
Teepol21	1.652400E-001	6.6245190E+006	40090286.8554829
Teepol22	1.239300E-001	4.9945460E+006	40301347.5348987
Teepol23	1.239300E-001	4.9928835E+006	40287932.7039458
Teepol24	1.239300E-001	5.0202360E+006	40508641.9753086
Teepol25	8.262000E-002	3.4131617E+006	41311567.4170903
Teepol26	8.262000E-002	3.3935525E+006	41074225.3691600
Teepol30	1.652400E-001	6.5815740E+006	39830392.1568627
Teepol31	1.858950E-001	7.4870125E+006	40275491.5409236
Teepol32	2.065500E-001	8.3745655E+006	40544979.4238683
Teepol35	2.478600E-001	9.7510910E+006	39341124.0216251

Se calculó el promedio y la desviación estándar de los factores:

F 40210905.0599569  
 $S_F$  459037.134491903

Se calculó el coeficiente de variación:

CV 0.0114157374425532 = 1.14157374425532%

### Criterios de aceptación:

Variable	Criterio	Resultado	
r	>0.99	<b>0.9997582</b>	<input checked="" type="checkbox"/>
r <sup>2</sup>	>0.98	<b>0.9995165</b>	<input checked="" type="checkbox"/>
CV	≤1.8%	<b>1.14157374425532</b>	<input checked="" type="checkbox"/>

Al haber cumplido con los tres criterios de aceptación para linealidad queda demostrado que el método es lineal de acuerdo con la ley de Beer.

### VI.2.2.1 Concentración mínima detectable

Se prepararon soluciones de Teepol HB7 con las siguientes concentraciones de materia activa:

- 0.4131%
- 0.185895%
- 0.082622%
- 0.04131%
- 0.0102275%
- 0.309825%
- 0.16524%
- 0.061965%
- 0.0309825%
- 0.0061965%
- 0.20655%
- 0.12393%
- 0.516375%
- 0.02065%
- 0.004134%

En las concentraciones por debajo de 0.0102275% los picos generados por alquilsulfatos se pierden dentro del ruido de la línea base, por lo que la concentración mínima detectable es 0.0102275%.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### **VI.2.2.2 Concentración mínima cuantificable**

Se prepararon soluciones de Teepol HB7 con las siguientes concentraciones de materia activa:

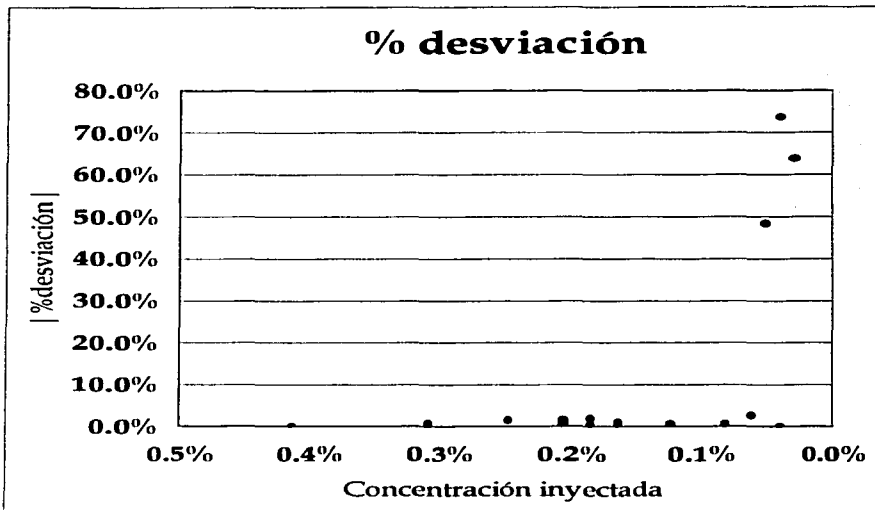
- 0.4131%
- 0.309825%
- 0.20655%
- 0.185895%
- 0.16524%
- 0.12393%
- 0.08262%
- 0.061965%
- 0.516375%
- 0.04131%
- 0.0309825%
- 0.02065%
- 0.0102275%
- 0.0061965%
- 0.004134%

Se llevaron a cabo los cálculos del porcentaje de desviación absoluto.

Muestra	Concentración	Concentración Calculada	% Desviación	% Desviación
T_V_053	0.413100	0.413190	-0.0217	<b>0.0217</b>
T_V_054	0.413100	0.412913	0.0454	<b>0.0454</b>
T_V_056	0.309825	0.309893	-0.0220	<b>0.0220</b>
T_V_055	0.309825	0.310966	-0.3670	<b>0.3670</b>
T_V_057	0.309825	0.307102	0.8870	<b>0.8870</b>
T_V_094	0.247860	0.243774	1.6800	<b>1.6800</b>
T_V_062	0.206550	0.206561	-0.0052	<b>0.0052</b>
T_V_063	0.206550	0.207050	-0.2410	<b>0.2410</b>
T_V_064	0.206550	0.208552	-0.9600	<b>0.9600</b>
T_V_061	0.206550	0.208834	-1.0900	<b>1.0900</b>
T_V_086	0.206550	0.208879	-1.1200	<b>1.1200</b>
T_V_060	0.206550	0.210075	-1.6800	<b>1.6800</b>
T_V_066	0.185895	0.185601	0.1580	<b>0.1580</b>
T_V_085	0.185895	0.186380	-0.2600	<b>0.2600</b>
T_V_069	0.185895	0.185391	0.2720	<b>0.2720</b>
T_V_067	0.185895	0.186892	-0.5330	<b>0.5330</b>
T_V_068	0.185895	0.182551	1.8300	<b>1.8300</b>
T_V_065	0.185895	0.189837	-2.0800	<b>2.0800</b>
T_V_071	0.165240	0.165086	0.0935	<b>0.0935</b>
T_V_073	0.165240	0.164561	0.4120	<b>0.4120</b>
T_V_074	0.165240	0.164516	0.4400	<b>0.4400</b>
T_V_072	0.165240	0.164406	0.5080	<b>0.5080</b>
T_V_070	0.165240	0.164319	0.5610	<b>0.5610</b>
T_V_084	0.165240	0.163428	1.1100	<b>1.1100</b>
T_V_077	0.123930	0.123848	0.0662	<b>0.0662</b>
T_V_075	0.123930	0.123197	0.5950	<b>0.5950</b>
T_V_076	0.123930	0.123155	0.6300	<b>0.6300</b>
T_V_079	0.082620	0.082612	0.0098	<b>0.0098</b>
T_V_078	0.082620	0.083109	-0.5880	<b>0.5880</b>
T_V_100	0.061965	0.060182	2.8778	<b>2.8778</b>
T_V_101	0.051638	0.026620	48.4475	<b>48.4475</b>
T_V_080	0.041310	0.041310	0.0000	<b>0.0000</b>
T_V_083	0.041310	0.041310	0.0000	<b>0.0000</b>
T_V_102	0.041310	0.010856	73.7198	<b>73.7198</b>
T_V_103	0.030983	0.011193	63.8719	<b>63.8719</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



- Gráfica 6.5 Incremento del porcentaje de desviación.

Se observó un notorio incremento de la desviación —hasta de un 80%— para concentraciones inferiores a 0.08%.

Se calculó el promedio de los porcentajes de desviación absolutos.

Concentración	% desviación
0.413100	0.0336
0.309825	0.4253
0.247860	1.6800
0.206550	0.8494
0.185895	0.8555
0.165240	0.5208
0.123930	0.4304
0.082620	0.2989
0.061965	2.8778
0.051638	48.4475
0.041310	24.5733
0.030983	63.8719

La concentración mínima cuantificable es 0.082620 puesto que el promedio de porcentajes de desviación absolutos de concentraciones inferiores es mayor a 1.8%.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### VI.2.3 Repetibilidad

De acuerdo con el protocolo de validación especificado en el apéndice II se llevaron a cabo durante cinco días una elución de cada una de las siguientes concentraciones:

+ 0.2004%                      + 0.18036%                      + 0.16032%

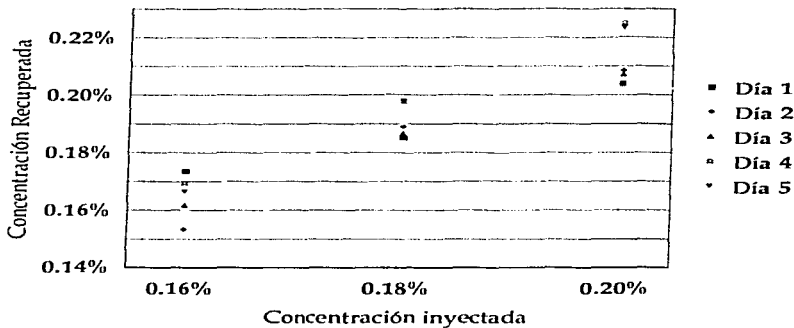
Estas eluciones se llevaron a cabo de acuerdo con la siguiente tabla:

<b>Eluciones</b>			
<b>Concentración inyectada</b>			
	<b>0.2004%</b>	<b>0.18036%</b>	<b>0.16032%</b>
Día 1	T V 125	T V 124	T V 130
Día 2	T V 136	T V 135	T V 128
Día 3	T V 149	T V 147	T V 146
Día 4	T V 156	T V 155	T V 154
Día 5	T V 167	T V 166	T V 165

La estación de trabajo Waters Maxima generó un reporte de concentración para cada una de las eluciones anteriores. Las concentraciones calculadas se incluyen en la siguiente tabla:

<b>Concentración Recuperada</b>			
<b>Concentración inyectada</b>			
	<b>0.2004%</b>	<b>0.18036%</b>	<b>0.16032%</b>
Día 1	0.20415	0.18514	0.17356
Día 2	0.20865	0.18929	0.15325
Día 3	0.20725	0.18685	0.16176
Día 4	0.22517	0.19764	0.16939
Día 5	0.22363	0.19794	0.16639

## Repetibilidad



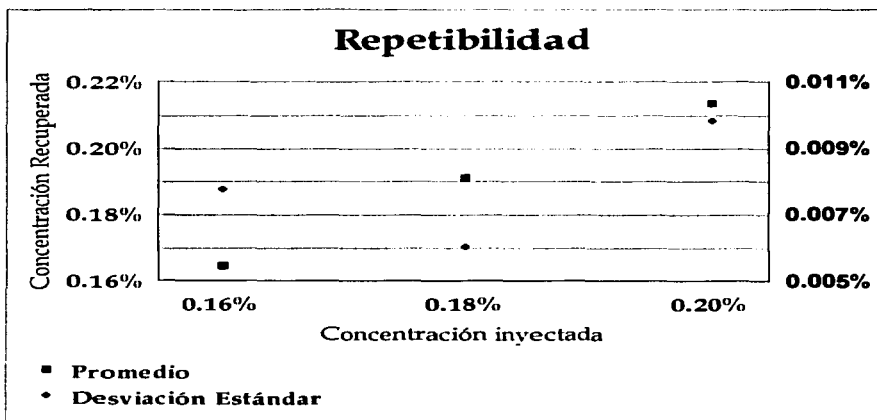
- Gráfica 6.6 Concentración recuperada en la repetibilidad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### VI.2.3.1 PRECISIÓN

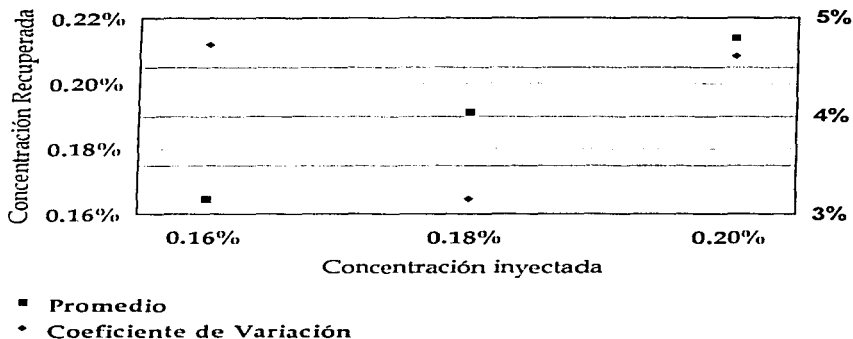
Para determinar la precisión en la repetibilidad del método analítico se llevaron a cabo los cálculos de promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Concentración Recuperada			
Concentración inyectada			
	0.2004%	0.18036%	0.16032%
C	0.21377	0.19137	0.16487
s	0.00985	0.00604	0.00779
CV	4.60957%	3.15651%	4.72777%



- Gráfica 6.7 Promedio y desviación estándar de la concentración recuperada en la repetibilidad.

## Repetibilidad



- Gráfica 6.8 Promedio y coeficiente de variación de la concentración recuperada en la repetibilidad.

### Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
CV	$\leq 1.8\%$
Concentración	Resultado
0.16032%	4.72777% <input checked="" type="checkbox"/>
0.18036%	3.15651% <input checked="" type="checkbox"/>
0.2004%	4.60957% <input checked="" type="checkbox"/>

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Al no satisfacer ninguno de los criterios de aceptación se encuentra que el método no es repetible por falta de precisión en la repetibilidad.

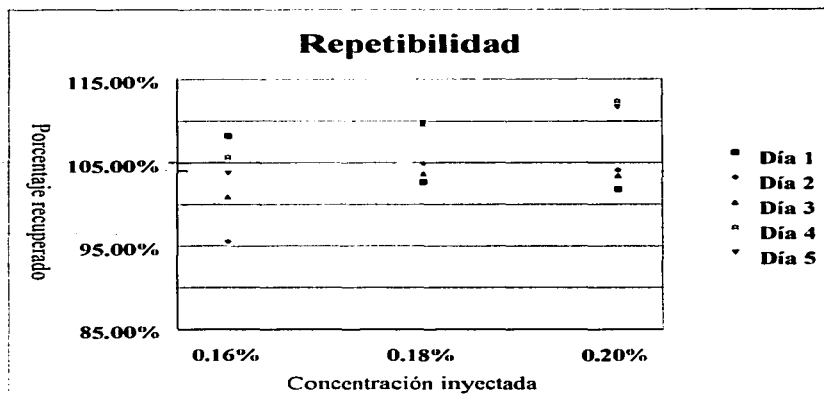
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## VI.2.3.2 EXACTITUD

Para detrerminar la exactitud en la repetibilidad del método analítico se llevaron a cabo los cálculos de porcentaje recuperado.

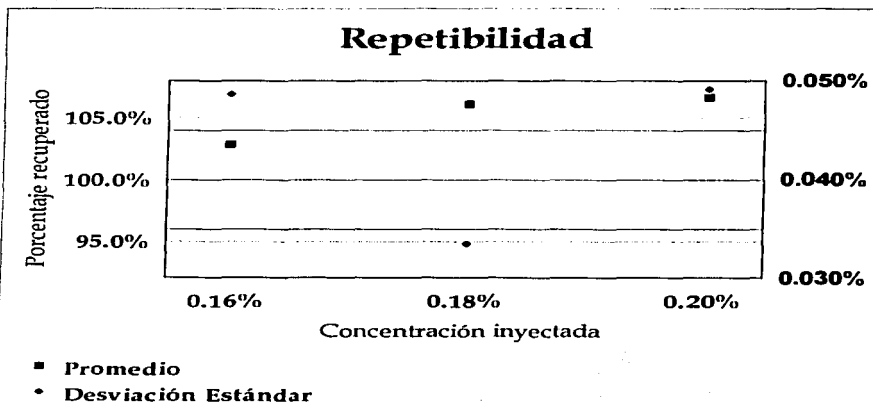
Porcentaje recuperado			
Concentración inyectada			
	0.2004%	0.18036%	0.16032%
Día 1	1.01871	1.02653	1.08261
Día 2	1.04117	1.04953	0.95590
Día 3	1.03421	1.03597	1.00895
Día 4	1.12360	1.09579	1.05655
Día 5	1.11593	1.09747	1.03785

- Gráfica 6.9 Porcentaje recuperado en la repetibilidad.



Posteriormente se calcularon los promedios para cada una de las concentraciones.

Porcentaje recuperado			
Concentración inyectada			
	0.2004%	0.18036%	0.16032%
Promedio	106.67244%	106.10572%	102.83713%



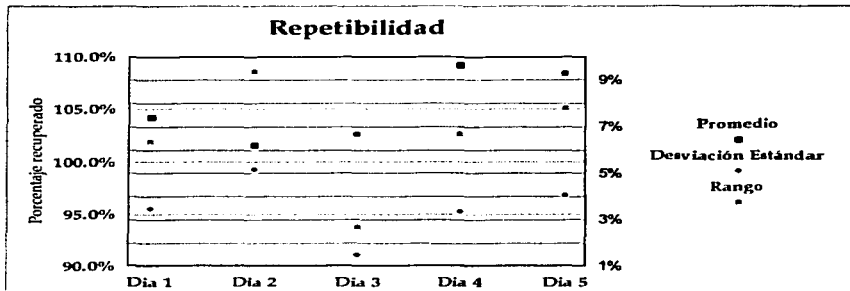
- Gráfica 6.10 Promedio y desviación estándar del porcentaje recuperado en la repetibilidad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Posteriormente se calcularon los promedios para cada uno de los días.

Porcentaje recuperado	
	Promedio
Día 1	104.26182%
Día 2	101.55322%
Día 3	102.63747%
Día 4	109.19789%
Día 5	108.37510%



- Gráfica 6.11 Promedio, rango y desviación estándar del porcentaje diario recuperado en la repetibilidad.

**Criterios de aceptación:**

Variable	Criterio	
$\bar{C}\%$	$95\% \leq C\%_{\text{dia}} \leq 105\%$	
Concentración	Resultado	
0.16032%	102.83713%	<input checked="" type="checkbox"/>
0.18036%	106.10572%	<input type="checkbox"/>
0.2004%	106.67244%	<input type="checkbox"/>
Día	Resultado	
Día 1	104.26182%	<input checked="" type="checkbox"/>
Día 2	101.55322%	<input checked="" type="checkbox"/>
Día 3	102.63747%	<input checked="" type="checkbox"/>
Día 4	109.19789%	<input type="checkbox"/>
Día 5	108.37510%	<input type="checkbox"/>

Al no satisfacer todos los criterios de aceptación se encuentra que el método no es repetible por falta de exactitud en la repetibilidad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### VI.2.4 Reproducibilidad

De acuerdo con el protocolo de validación especificado en el apéndice II cinco personas llevaron a cabo una elución de cada una de las siguientes concentraciones:

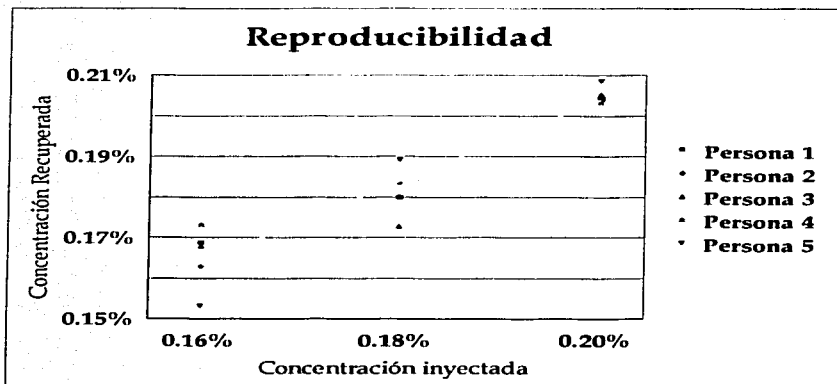
+ 0.2004%                      + 0.18036%                      + 0.16032%

Estas eluciones se llevaron a cabo de acuerdo con la siguiente tabla:

Eluciones			
Concentración inyectada			
	0.2004%	0.18036%	0.16032%
Persona 1	T V 123	T V 109	T V 108
Persona 2	T V 133	T V 132	T V 131
Persona 3	T V 119	T V 118	T V 148
Persona 4	T V 122	T V 121	T V 120
Persona 5	T V 136	T V 135	T V 128

La estación de trabajo Waters Maxima generó un reporte de concentración para cada una de las eluciones anteriores. Las concentraciones calculadas se incluyen en la siguiente tabla:

Concentración Recuperada			
Concentración inyectada			
	0.2004%	0.18036%	0.16032%
Persona 1	0.20438	0.17984	0.16876
Persona 2	0.20491	0.18345	0.16303
Persona 3	0.20544	0.17287	0.16802
Persona 4	0.20329	0.18014	0.17322
Persona 5	0.20865	0.18929	0.15325



- Gráfica 6.12 Concentración recuperada en la reproducibilidad.

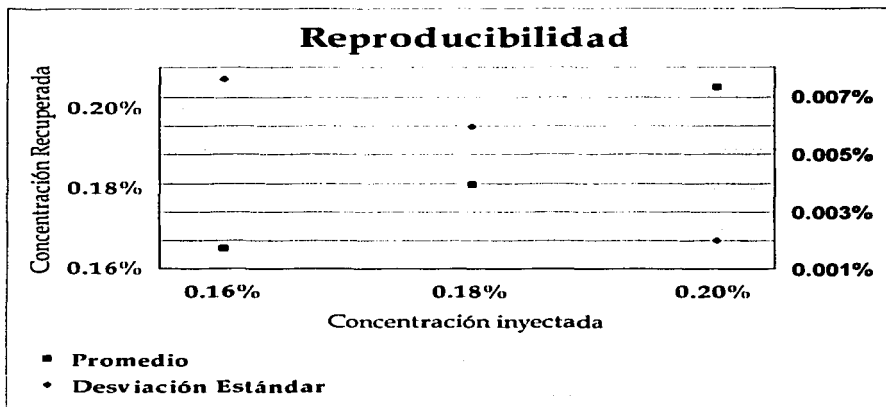
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## VI.2.4.1 PRECISIÓN

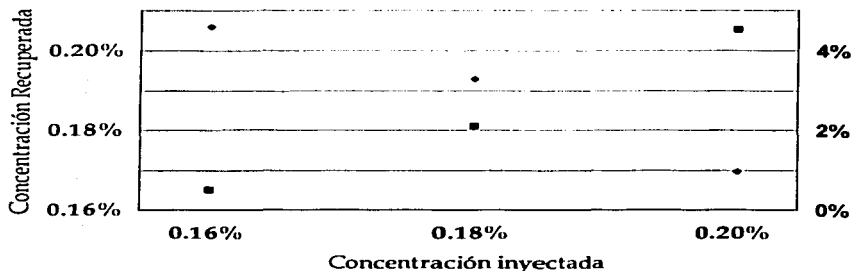
Para detrerminar la precisión en la reproducibilidad del método analítico se llevaron a cabo los cálculos de promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

Concentración Recuperada			
Concentración inyectada			
	0.2004%	0.18036%	0.16032%
C	0.20533	0.18112	0.16525
s	0.00202	0.00598	0.00762
CV	0.98230%	3.29920%	4.61305%



- Gráfica 6.13 Promedio y desviación estándar de la concentración recuperada en la reproducibilidad.

## Reproducibilidad



- Promedio
- ♦ Coeficiente de Variación

- Gráfica 6.14 Promedio y coeficiente de variación de la concentración recuperada en la reproducibilidad.

### Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
CV	$\leq 1.8\%$
Concentración	Resultado
0.16032%	4.61305% <input type="checkbox"/>
0.18036%	3.29920% <input type="checkbox"/>
0.2004%	0.98230% <input checked="" type="checkbox"/>

Al no satisfacer todos los criterios de aceptación se encuentra que el método no es reproducible por falta de precisión en la reproducibilidad.

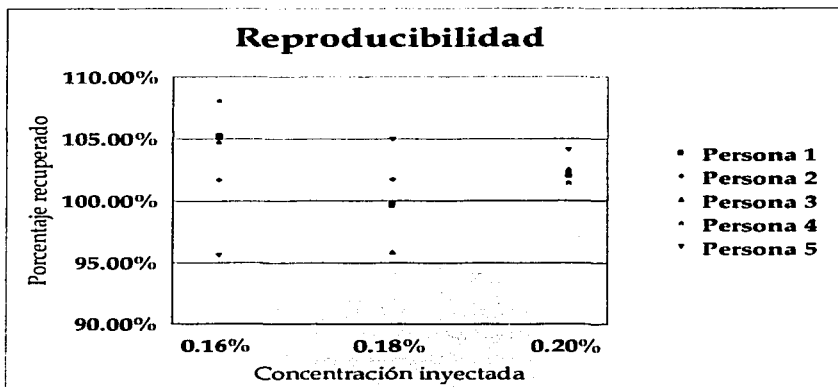
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## VI.2.4.2. EXACTITUD

Para detreminar la exactitud en la reproducibilidad del método analítico se llevaron a cabo los cálculos de porcentaje recuperado.

<b>Porcentaje recuperado</b>			
Concentración inyectada			
	0.2004%	0.18036%	0.16032%
<b>Persona 1</b>	1.01984	0.99709	1.05266
<b>Persona 2</b>	1.02248	1.01715	1.01688
<b>Persona 3</b>	1.02516	0.95850	1.04800
<b>Persona 4</b>	1.01444	0.99880	1.08046
<b>Persona 5</b>	1.04117	1.04953	0.95590

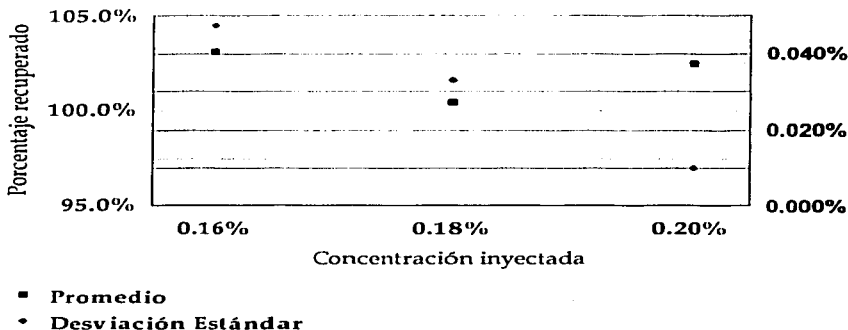


• Gráfica 6.15 Porcentaje recuperado en la reproducibilidad.

Posteriormente se calcularon los promedios para cada una de las concentraciones.

Porcentaje recuperado			
Concentración inyectada			
	0.2004%	0.18036%	0.16032%
Promedio	102.46191%	100.42144%	103.07788%

### Reproducibilidad



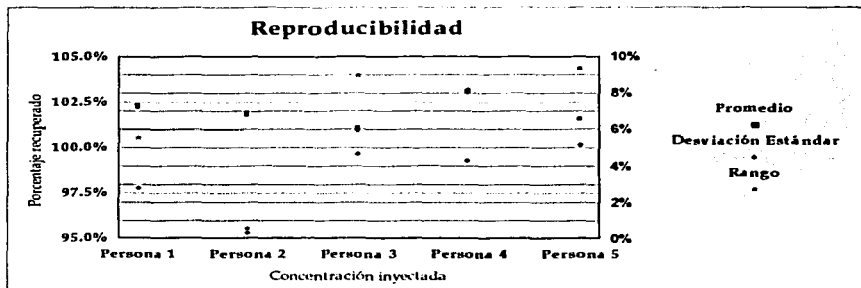
- Gráfica 6.16 Promedio y desviación estándar del porcentaje recuperado en la reproducibilidad.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Posteriormente se calcularon los promedios para cada uno de los días.

Porcentaje recuperado	
	Promedio
Día 1	102.31987%
Día 2	101.88354%
Día 3	101.05523%
Día 4	103.12352%
Día 5	101.55322%



- Gráfica 6.17 Promedio, rango y desviación estándar del porcentaje diario recuperado en la reproducibilidad.

**Criterios de aceptación:**

Variable	Criterio	
C%	$95\% \leq C\%_{\text{da}} \leq 105\%$	
Concentración	Resultado	
0.16032%	103.07788%	<input checked="" type="checkbox"/>
0.18036%	100.42144%	<input checked="" type="checkbox"/>
0.2004%	102.46191%	<input checked="" type="checkbox"/>
Día	Resultado	
Día 1	102.31987%	<input checked="" type="checkbox"/>
Día 2	101.88354%	<input checked="" type="checkbox"/>
Día 3	101.05523%	<input checked="" type="checkbox"/>
Día 4	103.12352%	<input checked="" type="checkbox"/>
Día 5	101.55322%	<input checked="" type="checkbox"/>

Al satisfacer todos los criterios de aceptación se encuentra que el método podría ser reproducible por su exactitud en la reproducibilidad, sin embargo al no tener precisión el método es no reproducible.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# CONCLUSIONES

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

- ⊗ *El Teepol HB7 es una mezcla de alquil sulfatos<sup>∇</sup> cuyos tiempos de retención se encuentran entre los 5:30 y los 9:00 minutos.*
- ⊗ *En el análisis cromatográfico de detergentes se debe tener un especial cuidado con los tiempos de retención, ya que estos varían con la concentración.*
- ⊗ *El mejor tipo de elución para la separación de los componentes del Teepol HB7 consiste en un gradiente cóncavo de acetónitrilo-agua.*
- ⊗ *Un método analítico cromatográfico, para poder reemplazar a un método volumétrico, debe ser más exacto y preciso y, al mismo tiempo, debe ocupar un tiempo de ejecución mucho menor debido al mayor costo de los reactivos que éste utiliza.*
- ⊗ *Dada la similitud que tienen entre sí los componentes del Teepol HB7 es indudable el hecho de que para lograr una completa separación de todos ellos se necesita un incremento en el número de platos teóricos incrementando ya sea la longitud de la columna utilizada, la velocidad en el flujo de la fase móvil o el número de átomos de carbono en las cadenas enlazadas a la fase estacionaria de sílica.*

<sup>∇</sup> Como quedó demostrado en la parte de especificidad de la validación del método analítico.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

- ⊗ *No es necesaria una completa separación de todos los alquilsulfatos presentes en el Teepol HB7 para poder cuantificarlos.*
- ⊗ *Resulta indispensable tener un especial cuidado en la manipulación y el almacenamiento del agua HPLC, ya que su pureza se pierde con gran facilidad.*
- ⊗ *El método analítico cromatográfico obtenido, es lineal de acuerdo con la ley de Beer, con un coeficiente de variación menor a 1.8%.*
- ⊗ *Para este método la concentración mínima detectable es 0.0102275% y es cuantificable el intervalo de concentraciones entre 0.4131% y 0.08262% con una desviación menor a 1.8%.*
- ⊗ *El método no es repetible, puesto que no cumplió con los criterios de exactitud y precisión para la repetibilidad<sup>⊗</sup>.*
- ⊗ *El método no es reproducible, puesto que no cumplió con los criterios de precisión para la reproducibilidad<sup>⊗</sup>.*
- ⊗ *La falta de repetibilidad y reproducibilidad que presenta este método analítico es atribuible a la manera de preparar las diluciones a partir de las muestras de teepol HB7 (w/v). Por lo anterior, se recomienda una modificación al protocolo de análisis cromatográfico de tal manera que las diluciones de Teepol HB7 sean preparadas w/w y su concentración sea calculada con una precisión de cuatro cifras decimales.*

---

<sup>⊗</sup> La confiabilidad de ambas determinaciones estadísticas (exactitud y precisión) es de 95%.

- ⊗ *Se debe hacer notar el riesgo que existe —al momento de realizar la inyección de la muestra en el loop<sup>6</sup> del cromatógrafo— de no llenar el volumen completo de éste con la muestra, por lo que se recomienda inyectar 2.5 ml de la dilución en cada ocasión.*
- ⊗ *Se recomienda modificar las precauciones en la preparación de los eluyentes en el protocolo de análisis cromatográfico para que el agua HPLC se utilice en las primeras 8 horas después de ser filtrada, en lugar de las primeras 24 horas como se establece actualmente.*
- ⊗ *Se recomienda volver a validar el método analítico cromatográfico tomando en cuenta las recomendaciones de los párrafos anteriores.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

<sup>6</sup> En el manual del loop se recomienda inyectar 10 veces el volumen del mismo (siendo el volumen del loop utilizado 231.15<sup>ml</sup>) el volumen inyectado debe superar los 2.3 ml].

196

# APÉNDICE

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APÉNDICE

### DIAGRAMA DE FLUJO DE DATOS

Se propone el uso de modelos porque:

- Es más barato
- Permiten enfocar aspectos críticos
- Permiten validar información, comunicarnos y organizar ideas.

Se deben utilizar herramientas gráficas y textuales.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Componentes



**Proceso:** Es la parte principal del DFD. Representa desde un metaproceso [en donde se encuentra todo lo que esté al alcance del proyecto] hasta procesos [divisibles en subprocesos] y subprocesos [procesos atómicos que al no poder dividirse más deben ser especificados\*].



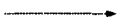
**Terminador:** Representa las fuentes o destinos de la información. Puede ser cualquier ente físico.



**Almacén de Datos:** Representa datos\* almacenados a lo largo del tiempo que son compartidos por procesos y terminadores.



**Flujo de datos:** Representa los datos por medio de los cuales se comunican los procesos, terminadores y almacenes de datos.



**Flujo de control:** Representa el orden en que se llevan a cabo los procesos\*, indicando qué proceso se ejecuta al término de otro.

\* La especificación de un proceso consiste en una definición detallada de todo lo que en éste se lleva a cabo.

\* Estos datos se encuentran disponibles para ser accedidos en cualquier momento.

\* Se puede prescindir del uso de los flujos de control cuando los flujos de datos en el diagrama indiquen una única manera de dar continuidad a los procesos y ésta concuerde con la manera en que serían colocados los flujos de control.

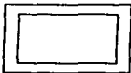
## Jerarquía

El primer diagrama que se hace es el diagrama de contexto que corresponde al máximo nivel. En este diagrama existe un solo proceso (proceso de contexto) cuyo nombre describe la función principal o el propósito del proyecto.

Al proceso de contexto se le asigna el número cero\* y éste se conecta con terminadores y almacenes de datos por medio de flujos de datos.

El segundo diagrama de flujo de datos en la jerarquía es el diagrama cero, que corresponde a un nivel inmediatamente inferior al diagrama de contexto. En el diagrama cero se incluyen los procesos principales (metaprocesos) del proyecto, los cuales se comunican por medio de flujos de datos con los terminadores y almacenes de datos que les correspondan del diagrama de contexto y con almacenes de datos que por ser utilizados de manera local en el proceso cero no aparecieron en el diagrama de contexto. En el diagrama cero se utilizan por primera vez flujos de control para darle un orden a la ejecución de los procesos. Se utilizan números enteros sucesivos (comenzando con el 1) para ser asignados a los procesos del diagrama cero sin tener relación alguna el orden de la numeración de los procesos con el orden de ejecución de los mismos.

Para identificar los terminadores y almacenes de datos que son externos al proceso cero (de contexto) éstos son dibujados con una doble línea.



Terminador externo



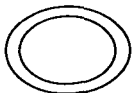
Almacén de datos externo

\* El número del proceso se escribe en la parte superior del círculo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



De una manera similar al diagrama cero, incluyendo además de terminadores y almacenes de datos externos, procesos externos; los cuales corresponden a todos los procesos del diagrama cero que se están uniendo —por medio de flujos de datos o de control— al proceso correspondiente al diagrama en cuestión [El diagrama 1 corresponderá al proceso 1, el diagrama 2 al proceso 2 y sucesivamente].



Proceso externo

Se utilizará la notación  $x.y$  para identificar a los procesos en cada diagrama, de tal manera que los procesos del diagrama 1 se numerarán 1.1, 1.2 y sucesivamente; los procesos del diagrama 1.2 se numerarán entonces 1.2.1, 1.2.2 y sucesivamente, etc.

Cada proceso es subproceso de un proceso de nivel superior (exceptuando el proceso de contexto, que corresponde al máximo nivel) y a su vez debe dividirse en subprocesos (dentro de un diagrama de nivel inferior) tantas veces como sea necesario hasta que los subprocesos resultantes sean procesos atómicos, momento en el cual estos procesos deben especificarse.

## APÉNDICE II

### PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MATERIA ACTIVA EN TEEPOL HB7

#### Objetivo:

- Determinar la especificidad del método analítico para la cuantificación de materia activa (alquilsulfatos) en Teepol HB7.
- Determinar la linealidad del sistema concentración—detector, de acuerdo con la ley de Beer.
- Determinar la concentración mínima detectable y la concentración mínima cuantificable en muestras de Teepol HB7.
- Determinar la repetibilidad del método analítico, tomando en cuenta localización y dispersión de los resultados.
- Determinar la reproducibilidad del método analítico, tomando en cuenta localización y dispersión de los resultados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Diseño experimental:**

## ESPECIFICIDAD

1. Utilizando la técnica de espectrofotometría infrarroja por transformada de Fourier.
  - Se utilizará un espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier de la marca Nicolet, modelo 710.
  - La manera de operar el espectrofotómetro se encuentra explicada en los manuales del mismo espectrofotómetro P/N 269-781201, P/N 269-721903, P/N 269-759002, P/N 269-772604, P/N 269-760501 y P/N 269-781901.
  - Se utilizará laurilsulfato de sodio grado reactivo como estándar de referencia para la presencia de alquilsulfatos.
  - Se utilizará una muestra de Teepol HB7 de lote más reciente que se encuentre disponible, cuya concentración de materia activa sea conocida.
  - Se usará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3.
  - Preparar una solución acuosa de Teepol HB7 con una concentración de tensoactivo de aproximadamente 0.8% w/v.
  - Preparar una solución acuosa de 5000 ppm laurilsulfato de sodio.
  - Inyectar en el cromatógrafo el volumen completo del loop de cada una de las soluciones preparadas y recolectar a la salida del detector la fase móvil entre los 5:30 y 9:00 minutos.
  - Leer los espectros infrarrojos de absorbancia para cada una de las muestras obtenidas.
  - Comparar los espectros obtenidos y —con base en su similitud y la correspondencia de grupos funcionales importantes (indicados por picos de absorbancia a una longitud de onda conocida)— determinar la presencia de alquilsulfatos en los picos de Teepol HB7 eludidos entre los 5:30 y 9:00 min.

2. Utilizando la técnica de espectrofotometría UV/Vis por arreglo de diodos.

- Se empleará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3.
- Se utilizará un detector de arreglo de diodos Waters 994.
- En el manual de operación del detector de arreglo de diodos Waters 994 [manual número 31083, revisión 1] se explica la manera de utilizarlo.
- Preparar una solución acuosa de Teepol HB7 con una concentración de tensoactivo de aproximadamente 0.8% w/v.
- Preparar una solución acuosa de 5000 ppm laurilsulfato de sodio.
- Inyectar el volumen completo del loop de cada una de las soluciones preparadas y ejecutar el procedimiento de elución indicado en el protocolo de análisis cromatográfico (apéndice 3).
- En el detector de arreglo de diodos Waters 994, leer los espectros [entre 190 nm y 280 nm] obtenidos para todos los picos de cada una de las soluciones inyectadas.
- Comparar los espectros obtenidos y —con base en su similitud y la correspondencia de grupos funcionales importantes (indicados por picos de absorbancia a una longitud de onda conocida)— determinar la presencia de alquilsulfatos en los picos de Teepol HB7 eluidos entre los 5:30 y 9:00 min.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<p style="text-align: center;">TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>
--

## LINEARIDAD

Se generará una curva de calibración para materia activa en Teepol HB7, a partir de la cual serán automáticamente calculadas la pendiente y la desviación estándar.

- Se utilizará la estación de trabajo Waters Maxima para generar la curva de calibración.
- En la estación de trabajo Waters Maxima se empleará el método T\_C18150.mth<sup>\*\*</sup>, ubicado en el directorio c:\max\data1\teepol\metodos.
- Se utilizará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3.
- Se utilizará una muestra de Teepol HB7, de lote más reciente que se tenga disponible y cuya concentración sea conocida.
- Preparar soluciones volumétricas de Teepol HB7 con una concentración de materia activa —conocida con al menos cuatro cifras significativas de exactitud— aproximada de:
 

◊ 0.4%	◊ 0.3%	◊ 0.2%
◊ 0.18%	◊ 0.16%	◊ 0.12%
◊ 0.08%	◊ 0.04%	◊ 0.02%
◊ 0.01%	◊ 0.006%	◊ 0.004%
- En la estación de trabajo Waters Maxima ir a la ventana Sample Queue<sup>\*\*</sup> e insertar el mayor número de repeticiones posibles de las soluciones preparadas en el punto anterior [incluyendo sus respectivas concentraciones] seleccionando el tipo STND (estándar) en el campo Type. Un mayor número de repeticiones debe haber entre más cercana sea la concentración de la solución a 0.18%.
- Ejecutar el método<sup>\*\*</sup>.
- Inyectar en el cromatógrafo el volumen completo del loop de cada una de las muestras solicitadas por la estación de trabajo Waters Maxima.

<sup>\*\*</sup> Para la utilización de la estación de trabajo Waters Maxima, referirse al manual de referencia. Waters Dynamic Solutions Division of Millipore, Maxima 830 Chromatography Workstation Reference Manual. Manual number 34764. Dynamic Solutions Division of Millipore. EUA 1990.

- Al término del total de inyecciones programadas, la estación de trabajo Waters Maxima calculará automáticamente el coeficiente de correlación ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), los cuales serán incluidos en el reporte de calibración.
- Para los siguientes cálculos utilizar la hoja de cálculo Lotus 123.
- Calcular el coeficiente de variación de la siguiente manera:

Calcular para cada inyección el factor F:

$$F = \frac{\text{Resp}}{\text{Conc}}$$

donde:

Resp = Respuesta del detector

Conc = Concentración de la muestra inyectada

Calcular la desviación estándar de los factores F ( $S_f$ ).

Calcular el promedio de los factores F ( $\bar{F}$ ).

Calcular el coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{S_f}{\bar{F}} \times 100$$

- Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
r	>0.99
r <sup>2</sup>	>0.98
CV	≤1.8%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONCENTRACIÓN MÍNIMA DETECTABLE

- Se empleará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3, el cual incluye el método T\_C18150.mth para la estación de trabajo Waters Maxima, ubicado en el directorio c:\max\data1\teepol\metodos.
- Se usarán las soluciones preparadas en el inciso anterior.
- En la estación de trabajo Waters Maxima ir a la ventana Sample Queue\*\* e insertar una repetición de cada una de las muestras, indicando UNKN (concentración desconocida) en el campo Type.
- Ejecutar el método\*\*. [inyectar las muestras que solicite la estación de trabajo Waters Maxima].
- La estación de trabajo Waters Maxima generará una impresión de cada cromatograma obtenido.
- Observar en cada cromatograma los picos correspondientes a alquilsulfatos.
- La concentración mínima detectable será la concentración mínima en cuyo cromatograma resultante puedan distinguirse a simple vista los picos formados por alquilsulfatos del ruido asociado a la línea base.

## CONCENTRACIÓN MÍNIMA CUANTIFICABLE

- Se usará el método ejecutado en el criterio anterior.
- La estación de trabajo Waters Maxima generará un reporte de concentración para cada muestra inyectada.
- La estación de trabajo Waters Maxima calculará el porcentaje de desviación:

$$\% \text{desviación} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

donde:

$C_0$  = Concentración real

$C_1$  = Concentración calculada por la estación de trabajo Waters Maxima

- Calcular el valor absoluto del %desviación (| %desviación |)
- Para cada concentración calcular el promedio del | %desviación | ( $\overline{|\% \text{desviación}|}$ )
- La concentración mínima cuantificable será la concentración mínima en la cual el  $\overline{|\% \text{desviación}|}$  sea menor a 1.8%

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## REPETIBILIDAD

Se considera la repetibilidad como la capacidad que tiene un proceso de no cambiar independientemente del día y la hora en que éste se lleve a cabo.

- Se utilizará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3, el cual incluye el método T\_C18150.mth para la estación de trabajo Waters Maxima, ubicado en el directorio c:\max\data1\teepol\metodos.
- Se usará una muestra de Teepol HB7, de lote más reciente que se tenga disponible y cuya concentración sea conocida.
- Preparar cada día —durante cinco días distintos— soluciones volumétricas de Teepol HB7 con una concentración de materia activa —conocida con al menos cuatro cifras significativas de exactitud— aproximada de:
  - ◊ 0.2%
  - ◊ 0.18%
  - ◊ 0.16%
- En la estación de trabajo Waters Maxima ir a la ventana Sample Queue\*\* e insertar —cada día— una repetición de cada solución preparada.
- Ejecutar el método\*\*.
- Inyectar en el cromatógrafo el volumen completo del loop de cada una de las muestras solicitadas por la estación de trabajo Waters Maxima.
- Al término de cada elución, la estación de trabajo Waters Maxima generará un reporte de concentración de la solución inyectada.
- Para los siguientes cálculos utilizar la hoja de cálculo Lotus 123.

### Precisión

- Para cada una de las concentraciones utilizadas calcular el promedio ( $\bar{C}$ ) y la desviación estándar ( $s$ ) de las concentraciones recuperadas en cada una de las eluciones.
- Calcular el coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{C}}$$

- Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
CV	$\leq 1.8\%$

*Para poder afirmar la precisión en la repetibilidad del método se debe cumplir con los criterios de aceptación para todas las concentraciones en cuestión.*

### Exactitud

- Para cada una de las eluciones calcular el porcentaje recuperado (C%):

$$C\% = \frac{C}{C_0} \times 100$$

donde:

$C_0$  = Concentración inyectada

C = Concentración recuperada

- Calcular los promedios ( $\overline{C\%}$ ) para cada uno de los días.
- Calcular los promedios ( $\overline{C\%}$ ) para cada una de las concentraciones.
- Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
$\overline{C\%}$	$95\% \leq C\%_{dL} \leq 105\%$

*Para poder afirmar la exactitud en la repetibilidad del método se debe cumplir con los criterios de aceptación para todas las concentraciones y para todos los días en cuestión.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REPRODUCIBILIDAD

Se considera la reproducibilidad como la capacidad que tiene un proceso de no cambiar independientemente de la persona que lo lleve a cabo.

- Se usará el protocolo de análisis cromatográfico especificado en el apéndice 3, el cual incluye el método T\_C18150.mth para la estación de trabajo Waters Maxima, ubicado en el directorio c:\max\data1\teepol\metodos.
- Se utilizará una muestra de Teepol HB7, de lote más reciente que se tenga disponible y cuya concentración sea conocida.
- Preparar cada persona — cinco personas distintas— soluciones volumétricas de Teepol HB7 con una concentración de materia activa —conocida con al menos cuatro cifras significativas de exactitud— aproximada de:
  - ◊ 0.2%
  - ◊ 0.18%
  - ◊ 0.16%
- En la estación de trabajo Waters Maxima ir a la ventana Sample Queue\*\* e insertar —para cada persona— una repetición de cada solución preparada.
- Ejecutar el método\*\*.
- Inyectar en el cromatógrafo el volumen completo del loop de cada una de las muestras solicitadas por la estación de trabajo Waters Maxima —cada persona debe inyectar cada una de las concentraciones preparadas—.
- Al término de cada elución, la estación de trabajo Waters Maxima generará un reporte de concentración de la solución inyectada.
- Para los siguientes cálculos utilizar la hoja de cálculo Lotus 123.

### Precisión

- Para cada una de las concentraciones utilizadas calcular el promedio ( $\bar{C}$ ) y la desviación estándar ( $s$ ) de las concentraciones recuperadas en cada una de las eluciones.
- Calcular el coeficiente de variación (CV):

$$CV = \frac{s}{\bar{C}}$$

- Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
CV	$\leq 1.8\%$

### Exactitud

- Para cada una de las eluciones calcular el porcentaje recuperado (C%):

$$C\% = \frac{C}{C_0} \times 100$$

donde:

$C_0$  = Concentración inyectada

$C$  = Concentración recuperada

- Calcular los promedios ( $\overline{C\%}$ ) para cada uno de los días.
- Calcular los promedios ( $\overline{C\%}$ ) para cada una de las concentraciones.
- Criterios de aceptación:

Variable	Criterio
$\overline{C\%}$	$95\% \leq \overline{C\%}_{dia} \leq 105\%$

*Para poder afirmar la exactitud en la reproducibilidad del método se debe cumplir con los criterios de aceptación para todas las concentraciones y personas en cuestión.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

212

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## APÉNDICE III

# MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE MATERIA ACTIVA EN TEEPOL HB7

### —PROTOCOLO DE ANÁLISIS—

#### Objetivo:

- Determinar la concentración de materia activa en una muestra de Teepol HB7.

ESPECIFICACIONES DEL TEEPOL HB7	
DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN
Materia activa	> 40.0%
Acidos grasos libres	< 0.17%
Alcalinidad total	0.05 - 0.29%
Densidad a 25°C	1.030 - 1.075 g/ml
Solubilidad al 10%	totalmente soluble
Materia fija	40.0% min
Humedad	60.0% max
pH al 5% a 25°C	7.0 - 8.5
Viscosidad Brookfield a 25°C	90.0 - 105.0 cps
Índice de refracción a 25°C	1.3860 - 1.4000

• Tabla 1.2<sup>5</sup>

<sup>5</sup> Fuente: Shell Detergents, Teepol HB7. Technical Bulletin DI.3.1.2. *Shell Chemical International Trading Company*. London 1984.

<sup>6</sup> Fuente: Control de Calidad e Investigación, Fábrica de Billetes, Banco de México. Normas Bancario Para Análisis Químicos: Tensioactivo Teepol HB7. México 1996.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Procedimiento

Se pesan aproximadamente con precisión de cuatro cifras decimales 0.11 g de muestra de Teepol HB7, la cual se disuelve en agua grado HPLC y se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml, llevando hasta la marca y se agita para homogeneizar la solución.

Se pone la solución en un baño ultrasónico durante 5 minutos.

De esta solución se toman 10 ml los cuales se filtran utilizando una membrana Millipore de tipo GV con porosidad de 0.22  $\mu\text{m}$  en el dispositivo para la filtración de muestras.

En la ventana Sample Queue de la estación de trabajo Waters MAXIMA se inserta la información sobre la muestra a analizar, seleccionando el tipo UNKN (desconocido) en el campo Type. Se ejecuta el método.

Se inyectan en el loop 2.5 ml de la solución preparada cuando la estación de trabajo Waters MAXIMA lo solicita.

La estación de trabajo Waters MAXIMA genera un reporte de la concentración encontrada en la solución.

Con la concentración reportada se realizan los siguientes cálculos:

$$\%MA = \frac{C_{dil} \times 250}{W_m}$$

Donde:

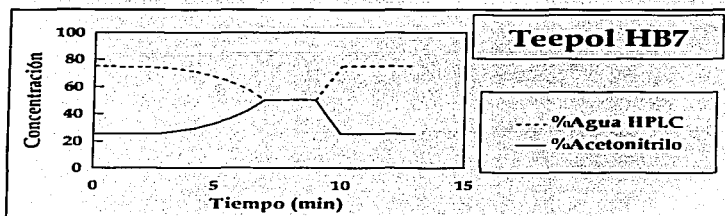
MA	materia activa
C <sub>dil</sub>	concentración de la dilución reportada por la estación de trabajo Waters MAXIMA
W <sub>m</sub>	Peso de la muestra
250	Factor de dilución

## Método Cromatográfico

El método cromatográfico para la determinación cuantitativa de materia activa en Teepol HB7 consiste en una elución gradiente que comienza con una mezcla de  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  25:75 y durante 7 minutos incrementa su concentración hasta  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  50:50 con una concavidad igual a  $-5$  (de acuerdo con la escala utilizada por la estación de trabajo Waters MAXIMA) y la mantiene constante hasta llegar a los 9 minutos de elución, en donde comienza a regresar las concentraciones a su estado original terminando a los 10 minutos y mantiene esta concentración (original) hasta los 13 minutos de elución para equilibrar la columna.

### Teepol HB7

Tiempo (min)	% Agua HPLC	% Acetonitrilo	Tipo de curva <sup>††</sup>
0	75	25	
7	50	50	-5
9	50	50	
10	75	25	
13	75	25	



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<sup>††</sup> Según los tipos de curvatura utilizados por la estación de trabajo Waters MAXIMA.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

El flujo de la mezcla de solventes durante toda la elución se mantiene en 1.2 ml/min.

Se utiliza una columna Nova-Pak  $C_{18}$  de 3.9 mm ID x 150 mm. Este tipo de columna tiene un empaque formado por partículas esféricas de 6  $\mu\text{m}$  de diámetro.

El volumen del loop utilizado para inyectar la muestra es de 231.15968  $\mu\text{l}$ .

La muestra inyectada tiene un factor de dilución igual a 250, pero el resultado de la integración reporta la concentración real de la misma.

Se utiliza un detector UV/Vis de arreglo de diodos tomando lecturas a una longitud de onda de 224 nm con una precisión de 0.5 a  $\pm$  20 puntos por segundo.

Se integran todos los picos encontrados entre 5.5 y 9 minutos y sus áreas son sumadas, ya que en esta región se encuentran los tiempos de retención de los alquilsulfatos  $C_9$  a  $C_{13}$ .

## PARÁMETROS DEL DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS WATERS 994

## MEASUREMENT CONDITIONS

&lt; FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 &gt;

```

-----
KEY LOCK           : ON
INTERVAL           : FAST
TIME CONSTANT      : 0.1          sec
MEASUREMENT TIME   : 13.00       min
DISPLAY TIME       : 5.00        min
WAVELENGTH RANGE   : 190 --- 650 nm
WAVELENGTH         : 195 203 224 254      nm
BAND WIDTH         : 3 F 5 F          nm
  
```

## CH: 1 CHROMATOGRAM CONDITIONS

&lt; FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 &gt;

```

-----
TIME      AUPS      WAVELENGTH      W.PLOT      EVENT      THRESHOLD
[min]    [AU]      [nm]
  
```

```

-----
INITIAL    0.500    224                OFF        ON
  
```

## CH: 2 CHROMATOGRAM CONDITIONS

&lt; FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 &gt;

```

-----
TIME      AUPS      WAVELENGTH      W.PLOT      EVENT      THRESHOLD
[min]    [AU]      [nm]
  
```

```

-----
INITIAL    1.500    195                OFF        ON
  
```

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

## CH: 3 CHROMATOGRAM CONDITIONS

< FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CMI DATE :061/17/96 >

TIME	AUFS	WAVELENGTH	W.PLOT	EVENT	THRESHOLD
[min]	[AU]	[nm]			

-----

INITIAL	2.000	203		OFF	OFF
---------	-------	-----	--	-----	-----

## CH: 4 CHROMATOGRAM CONDITIONS

< FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 16CMI DATE :061/17/96 >

TIME	AUFS	WAVELENGTH	W.PLOT	EVENT	THRESHOLD
[min]	[AU]	[nm]			

-----

INITIAL	2.000	254		OFF	xxx
---------	-------	-----	--	-----	-----

## SPECTRUM CONDITIONS &lt; MONITOR: M1 &gt;

< FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 16CMI DATE :061/17/96 >

TIME	HEIGHT	SLOPE	NOISE	MODE	MONITOR WAVE.
[min]	[AU]	[AU/min]	[AU]		[nm]

-----

INITIAL	0.001	0.001	0.001	P/S/V	224
---------	-------	-------	-------	-------	-----

## ANALYSIS MENU

&lt; FILE No. : C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : 06/17/86 &gt;

===== &lt; INTEGRATOR &gt; ===== PLOT : OFF

TIME RANGE : 5.50 --- 9.00 min  
WAVELENGTH : M1  
SMOOTHING : 15 points  
SLOPE : 0.001 AU/min  
DRIFT : 0.001 AU/min  
HEIGHT : 0.001 AU  
WIDTH : 0.10 min  
TIME DOUBLE : 15 min  
MINIMUM AREA : 5.0E-04 AU\*min  
MINUS PEAK : OFF  
PAPER SPEED : 20.0 mm/min  
BASELINE CORRECT : OFF  
CALIBRATION : OFF

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

## ANALYSIS MENU

< FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 >  
 =====< SPECTRUM INDEX >==== PLOT : OFF

TIME RANGE : 5.00 --- 9.00 min  
 WAVELENGTH RANGE : 190 --- 280 nm  
 SPECTRUM CORRECT : ON  
 SPECTRUM SCALE : AUTO SCALE  
 BASELINE CORRECT : OFF  
 CHROMATOGRAM : M1

## ANALYSIS MENU

< FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 >  
 =====< CHROMATOGRAM >===== PLOT : ON

TIME RANGE : 0.00 --- 30.00 min  
 SCALE M1 : AUTO SCALE  
 M2 : AUTO SCALE  
 PLOT SPEED : 5.0 min/min  
 BASELINE CORRECT : OFF  
 CHROMATOGRAM : M1 & M2

## STORED

< FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE :Oct/17/96 >

-----  
 M1 : ON M2 : ON

## MEASUREMENT COMMENT

&lt; FILE No.: C FILE NAME: T POL C18 15CM1 DATE : Oct/17/96 &gt;

-----

SAMPLE NAME : TEEPOL-HB7  
COLUMN : 3.9mmID\* 15.0cm  
PACKING MATERIAL : NOVA-PAK C18  
MOBILE PHASE : ACETONITRILE - AGUA  
FLOW RATE : 1.20 ml/min  
PRESSURE : 3000.0 PSI  
TEMPERATURE : 25.0 C  
INJECTION VOLUME : 231.16  $\mu$ l

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

PARÁMETROS DE LA ESTACIÓN DE TRABAJO WATERS MAXIMA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## MAXIMA 820 METHOD REPORT

Printed: 21-OCT-1996 19:16

Tempol HBZ NovaPak C18 3.9 \* 15

```

-----
n Data Acquisition n
-----

```

Channels: 2  
 Trigger: External HI

Delay: 0.0 min  
 Duration: 13.00 min  
 Rate: 20.00 points/sec

## Channel Parameters

Channel ID:	994 @ 224	994 @ 195 nm
Detect Peaks:	Yes	Yes
A/D Type:	WD24	WD24
Slot #:	16	16
Channel #:	0	1
Range (volts):	0-1.00	0-1.00
Resolution:	22-bit	22-bit
x-Axis Units:	minutes	minutes
x-Axis Start:	0.000	0.000
x-Axis End:	13.000	13.000
y-Axis Units:	volts	volts
y-Axis Min:	0.000	0.000
y-Axis Max:	1.000	1.000
Expansion:	1.00	1.00
Offset:	0.002	0.002

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



## MAXIMA B20 METHOD REPORT

Printed: 21-OCT-1996 19:16

Teopol 100 NovaPak C18 3.9 \* 15

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

```

-----
# Peak Integration Parameters #
-----

```

Channel 1  
Channel 2  
Channel 3  
Channel 8

Detection Parameters

Baseline Points: -12  
Filter Window (in Points): 25  
Integration Sensitivity (Coarse): 50.00 microvolt/sec  
Integration Sensitivity (Fine): 1000 microvolt/sec<sup>2</sup>  
Detect Negative Peaks: No  
Skim Ratio: 8.000

Rejection Criteria

Minimum Area: 100000 microvolt-sec  
Minimum Height: 10000 microvolt  
Minimum Width: 10.00 sec

## MAXIMA 820 METHOD REPORT

Printed: 21-DEC-1996 19:18

Tecpol IBZ Novafak CIB 3.9 \* 15

```

-----
||
|| Peak Integration Parameters ||
||
-----

```

Channel 4  
 Channel 5  
 Channel 6  
 Channel 7

Detection Parameters

Baseline Points: 12  
 Filter Window (in Points): 25  
 Integration Sensitivity (Coarse): 5.00E+07 microvolt/sec  
 Integration Sensitivity (Fine): 1.00E+09 microvolt/sec<sup>2</sup>  
 Detect Negative Peaks: No  
 Skim Ratio: 8.000

Rejection Criteria

Minimum Area: 1.00E+11 microvolt-sec  
 Minimum Height: 1.00E+10 microvolt  
 Minimum Width: 10.00 sec

TEC CON  
 FALLA DE ORIGEN



## MAXIMA Q20 METHOD REPORT

Printed: 21-OCT-1996 19:16

Loop1 1017 NovaPak C18 3.9 x 15

```

-----#
# Operating Conditions: Liquid Chromatography #
#-----#

```

Operator ID: Sandino

Injection Method: Loop                      Sample Size: 231.15960  
 Solvent Flow: Gradient                      Flow Rate:

Composition: 0.0% Aqua HPLC  
 0.0% Acetonitrilo  
 100.0%

Column\_1

Name: Nova-Pak C18  
 Length: 150 mm                      Packing Name: Nova-Pak C18  
 Diameter: 3.8 mm                      Packing Type: Fase Enlazada  
 Void Volume: 0.0 min                      Functionality: Fase Reversa  
 Particle Size: 4 microm

## Detectors

Detector #	Name	Type	Sensitivity	Comment
1	Waters 994	Arreglo Diodos	0.2	221 ns
2	Waters 994	Arreglo Diodos	0.5	195 ns

## Comments

Strip out Comment

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



## MAXIMA 8320 METHOD (REV. 02)

Printed: 21-01-1996 19:14

Teepol 017 NovaPak C18 5.9 # 13

```

-----
" Sample Name "
-----

```

## Queue Parameters

File Path: D:\MAX804161\TEEPOL Raw Sample Weights: 1.000  
 Starting Index: 1 Volume of Extract: 1.000

## Stripchart Parameters

Scaling: Fit to highest valid peak x-Axis limits: 0.0-665.6  
 Peak Labels: Name, retention times y-Axis limits: 0.0-1.000  
 Regions: 0  
 Options: baselines, starts/ends, maxima, grids, emphasized print mode

## Sample Queue Table

#	S	R	Area	StripSource	File	Mass	Retention	Volume	Sample	Dilution	
1	R	Teepol1		ASINDR	PFDC	R	1	0.53	R	1	R
2	R	Teepol2		ASINDR	PFDC	R	1	0.54	R	2	R
3	R	Teepol3		ASINDR	PFDC	R	1	0.55	R	3	R
4	R	Teepol4		ASINDR	PFDC	R	1	0.56	R	4	R
5	R	Teepol5		ASINDR	PFDC	R	1	0.57	R	5	R
6	R	Teepol6		ASINDR	PFDC	R	1	0.57	R	6	R
7	R	Teepol7		ASINDR	PFDC	R	1	0.60	R	7	R
8	R	Teepol8		ASINDR	PFDC	R	1	0.61	R	8	R
9	R	Teepol9		ASINDR	PFDC	R	1	0.62	R	9	R
10	R	Teepol10		ASINDR	PFDC	R	1	0.63	R	10	R
11	R	Teepol11		ASINDR	PFDC	R	1	0.64	R	11	R
12	R	Teepol12		ASINDR	PFDC	R	1	0.65	R	12	R
13	R	Teepol13		ASINDR	PFDC	R	1	0.66	R	13	R
14	R	Teepol14		ASINDR	PFDC	R	1	0.67	R	14	R
15	R	Teepol15		ASINDR	PFDC	R	1	0.68	R	15	R
16	R	Teepol16		ASINDR	PFDC	R	1	0.69	R	16	R
17	R	Teepol17		ASINDR	PFDC	R	1	0.70	R	17	R
18	R	Teepol18		ASINDR	PFDC	R	1	0.71	R	18	R

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



Componente	Tempo129	Tempo130	Tempo131	Tempo132	Tempo133	Tempo134	Tempo135
Alcance	4.131E-02	1.657E-01	1.857E-01	2.666E-01	2.491E-01	2.427E-01	2.477E-01

Componente  
Alcance

En este método cromatográfico se deben tomar precauciones en la preparación de la muestra, la preparación de los eluyentes y la elución para asegurar que éste siempre se lleve a cabo en las mismas condiciones.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### PRECAUCIONES EN LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- El material utilizado para la dilución de la muestra debe encontrarse completamente limpio y ser enjuagado tres veces con agua destilada para evitar la presencia de sustancias contaminantes que puedan generar ruido en la línea base, reduciendo la precisión de la integración. En el momento de llevar a cabo la dilución el material debe estar completamente seco.
- El material utilizado para la filtración de la muestra y para recibir la muestra filtrada debe encontrarse completamente limpio y ser enjuagado tres veces con agua bidestilada y tres veces con agua grado HPLC para evitar la presencia de partículas que puedan formar depósitos a la entrada de la columna cromatográfica. En el momento de llevar a cabo la filtración el material debe estar completamente seco.
- El dispositivo para la filtración de las muestras debe ser ensamblado utilizando las pinzas incluidas con el mismo para evitar tocar las partes con las manos y que de esa manera puedan contaminarse.
- Las muestras deben ser desechadas diez horas después de haber sido preparadas para evitar la degradación durante su uso.

## PRECAUCIONES EN LA PREPARACIÓN DE LOS ELUYENTES

- El agua grado HPLC debe filtrarse por triplicado en el dispositivo para la filtración de solventes, utilizando una membrana Millipore de tipo HA con porosidad de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Después de filtrada el agua debe usarse dentro de las primeras 24 horas, por lo que se recomienda filtrar 250 ml a la vez y utilizarlos hasta que se terminen.
- Una vez que se ha terminado el agua de un recipiente, éste se debe escurrir y poner a secar 2 horas a 120°C y una vez seco mantenerse cerrado hasta que se vuelva a utilizar; para de esta manera evitar el crecimiento bacteriano que produce metabolitos y partículas.
- Después de diez veces de utilizar el mismo recipiente en el procedimiento anterior éste debe lavarse, sanitizarse y, posteriormente, enjuagarse tres veces con agua bidestilada y tres veces con agua grado HPLC.
- El acetonitrilo grado HPLC debe filtrarse por triplicado en el dispositivo para la filtración de solventes, utilizando una membrana Millipore de tipo FH con porosidad de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- El acetonitrilo debe filtrarse en cantidades de 900 ml y colocarse en un frasco de vidrio color ambar.
- El material utilizado para la filtración del agua grado HPLC debe ponerse a secar 2 horas a 120°C cada vez que se deja de utilizar y la membrana filtrante debe reemplazarse.
- Después de diez veces de utilizar el mismo dispositivo para filtrar agua, éste debe lavarse, sanitizarse y, posteriormente, enjuagarse tres veces con agua bidestilada y tres veces con agua grado HPLC.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

- En el dispositivo utilizado para la filtración de acetonitrilo la membrana debe reemplazarse cada cinco veces que éste sea utilizado.
- Para reemplazar las membranas en el dispositivo para la filtración de solventes deben utilizarse las pinzas incluidas con el mismo para evitar daños o contaminación en la membrana.

## PRECAUCIONES EN LA ELUCIÓN

- El agua grado HPLC para ser utilizada en la elución debe pasar la siguiente prueba de pureza:  
Utilizando un detector UV a 250 nm, 0.02 aufs<sup>††</sup>, una columna de fase reversa C<sub>18</sub> con tamaño de partícula en el empaque de 10 μm, se corre una elución gradiente de 100% agua a 100% acetonitrilo, a 2 ml/min durante 20 minutos, después de 40 min de pasar agua a través de la columna. El incremento en la línea base no debe ser mayor a 0.12 au.
- El acetonitrilo grado HPLC para ser utilizado en la elución debe pasar la siguiente prueba de pureza:  
Utilizando un detector UV a 210 nm, 0.02 au<sup>††</sup>, una columna de fase reversa C<sub>18</sub> con tamaño de partícula en el empaque de 10 μm, se corre una elución gradiente de 100% acetonitrilo a 100% agua, a 2 ml/min durante 20 minutos, después de 40 min de pasar acetonitrilo a través de la columna. El incremento en la línea base no debe ser mayor a 0.12 au.
- Para asegurar que en todas las inyecciones se llena el 100% del loop del inyector con la muestra por analizar es necesario que se inyecte en cada ocasión un mínimo de diez veces el volumen del mismo. Siendo el volumen del loop que se utiliza en este método de 231.2 μl el volumen a inyectarse en éste debe ser mayor a 2.312 ml.
- El filtro de entrada de la bomba que se introduce en el agua debe reemplazarse cada semana.
- El filtro de entrada de la bomba que se introduce en el acetonitrilo debe reemplazarse cada seis meses.

<sup>††</sup> aufs = unidades de absorbancia correspondientes a la escala completa de la respuesta del detector. [absorbance units (corresponding to) full scale].

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

- Las mangueras y las válvulas check del cromatógrafo deben reemplazarse cada seis meses.
- La columna cromatográfica debe reemplazarse cuando ésta ya no sea capaz de pasar la prueba de resolución incluida con la documentación de la misma.
- Antes de iniciar una nueva elución se debe equilibrar la columna con CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 25:75 durante por lo menos cinco minutos.

236-A

# BIBLIOGRAFÍA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## BIBLIOGRAFÍA

1. Chrompack International. Choosing a stationary phase.  
<http://www.chrompack.com/hplc/index.html> 1996.
2. Chrompack International. HPLC - column selection guide -.  
<http://www.chrompack.com/cat-hplc/index.htm> 1997.
3. Control de Calidad e Investigación, Fábrica de Billetes, Banco de México. Normas Banxico Para Análisis Químicos : Solución de limpieza (Sosa - Teepol HB7). México 1996.
4. Control de Calidad e Investigación, Fábrica de Billetes, Banco de México. Normas Banxico Para Análisis Químicos : Tensoactivo Teepol HB7. México 1996.
5. Dr. Yuri Kazakevich and Prof. H. M. McNair. Basic Liquid Chromatography.  
[http://hplc.chem.vt.edu/my\\_home/book/content/index.html](http://hplc.chem.vt.edu/my_home/book/content/index.html) 1995.  
[http://hplc.chem.vt.edu/my\\_home/book/content/gen\\_fram.html](http://hplc.chem.vt.edu/my_home/book/content/gen_fram.html) 1997, 1998.
6. DU@ Series 7000 Spectrophotometer Operating Instructions. Manual 514500C. *Beckman Instruments Inc.* EUA 1991.
7. Dorsey, John G. ; Cooper, William T. Retention Mechanisms of Bonded-Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 66(17), 1994
8. Dolan, John W. & Snyder, Lloyd R. Troubleshooting I.C. Systems, a comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separations. *Humana Press.* EUA 1989. ISBN 0-89603-151-9.
9. Dynamic Solutions Division of Millipore, Maxima 820 Chromatography Workstation Start-up guide. Manual number 34759. *Waters Dynamic Solutions Division of Millipore.* EUA 1989.
10. E. Heffmann. Fundamentals, and applications of chromatography and related differential migration methods. *Journal of Chromatography Library-Volume 51 A Chromatography 5ª edition.* *Elsevier Publishing Company.* Amsterdam 1992.

<p style="text-align: center;">TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>
--

11. ELANCO. Manual de validación. México **1995**.
12. Fornstedt, T. and Guiochon, G. Comparison between Experimental and Theoretical Profiles of High Concentration Elution Bands and Large System Peaks in Nonlinear Chromatography. *Analytical Chemistry*, 66(17), **1994**.
13. Fornstedt, T. and Guiochon, G. Theoretical Study of High-Concentration Elution Profiles and Large System Peaks in Nonlinear Chromatography. *Analytical Chemistry*, 66(13), **1994**.
14. Furman, W. B. ; Layloff, T. P. ; Tetzlaff, R. F. Validation of Computerized Liquid Chromatographic Systems. *Journal of AOAC International*, 77(5), **1994**.
15. James K. Hardy and The University of Akron. Chemical Separations. <http://odin.chemistry.uakron.edu/chemsep/index.html> **1995**.  
<http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/index.html> **1997, 1998**.
16. Lederer, Edgar. Michael Lederer. Chromatography : A review of principles and applications. Second edition. *Elsevier Publishing Company*. Amsterdam **1987**.
17. Levine, Ira N. Fisicoquímica. Primera edición, *McGraw-Hill*. México **1984**.
18. Markus Läubli - Peter Bruttel - Roland Dörig. Ion Chromatography : Theory, Columns and Eluents. Metrohm Monograph 50143. *Metrohm*.
19. Nicolet. 710 Easy Operation. P/N 269-781901. *Technical Publications Department Nicolet Analytical Instruments EUA* **1988**.
20. Nicolet. FT/IR Theory. P/N 269-721903. *Technical Publications Department Nicolet Analytical Instruments EUA* **1986**.
21. Nicolet. Glossary of Nicolet Terms. P/N 269-759002. *Technical Publications Department Nicolet Analytical Instruments EUA* **1990**.
22. Nicolet. Introduction to the 710 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer. P/N 269-781201. *Technical Publications Department Nicolet Analytical Instruments EUA* **1990**.
23. Nicolet Instrument Corporation. Nicolet Instrument Corporation World-Wide Web Site. <http://www.nicolet.com/> **1997**.



24. Nicolet. NICOS User's Manual. P/N 269-760501. *Technical Publications Department Nicolet Analytical Instruments* EUA **1996**.
25. Nicolet. SX FT/IR Advanced Operations. P/N 269-772604. *Technical Publications Department Nicolet Analytical Instruments* EUA **1992**.
26. Phase Separations. Spherisorb Particle Engineering for Chromatographic Quality.  
<http://www.phasesep.co.uk/phasesep/index.html> **1996**.
27. Rheodyne Incorporated. Operating Instructions for Model 7125 Syringe Loading Sample Injector.
28. Rosen, Milton J. & Goldsmith, Henry A. Systematic analysis of surface-active agents. Second edition, *Wiley Interscience*. New York **1972**.
29. Rheodyne - homepage. <http://www.rheodyne.com/> **1996, 1997**.
30. Shell Method Series. Anionic active matter in detergents. Methylene blue indicator method. SMS 425-76.
31. Shell Method Series. Anionic active matter in detergents. Potentiometric titration method. SMS 2557-80.
32. Snyder, L. R. & Kirkland J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2<sup>nd</sup> Edition, a *Wiley-Interscience publication*, John Wiley & Sons. EUA **1979**. ISBN 0-471-03822-9.
33. Silica Analytical Column Care and Use Manual. 1<sup>st</sup> Edition. *Waters Publications*. EUA **1989**.
34. Shell Detergents. Teepol HB7. Technical Bulletin DI.3.1.2. *Shell Chemical Internacional Trading Company*. London **1984**.
35. Timothy J. Bahowick and Robert E. Synovec. Correlation of Quantitative Analysis Precision to Retention Time Precision and Chromatographic Resolution for Rapid, Short-Column Analysis. *Analytical Chemistry*, 67(3), **1995**.
36. Taylor, John K. Validation of Analytical Methods. *Analytical Chemistry*, 55(6), **1983**.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN
------------------------------

37. Varian. HPLC Products.  
<http://www.varian.com/chroma/hplc.html> 1997.  
<http://www.varian.com/inst/csb/products/hplc.html> 1998.
38. Varian. Varian Chromatography Product Information.  
<http://www.varian.com/inst/chromo/index.html> 1996.  
<http://www.varian.com/inst/csb/index.html> 1998.
39. Waters Division of Millipore. Waters 410 Differential Refractometer Operator's Manual. Manual number 70240. Revision E. *Millipore Corporation Waters Chromatography Division Publications PB.* EUA 1988.
40. Waters Division of Millipore. Waters 431 Conductivity Detector Operator's Manual. Manual number 07702. Revision B. *Millipore Corporation Waters Chromatography Division Publications PB.* EUA 1989.
41. Waters Division of Millipore. Waters 600E Multisolvent Delivery System Operator's Manual. Manual number 62771. 1<sup>st</sup> edition. *Millipore Corporation Waters Chromatography Division Publications PB.* EUA 1989.
42. Waters Division of Millipore. Waters 994 Programmable Photodiode Array Detector Operator's Manual. Manual number 31083. Revision 1. *Millipore Corporation Waters Chromatography Division Publications PB.* EUA 1990.
43. Waters Corporation. Waters Corporation Home Page.  
<http://www.waters.com/> 1995-1997.
44. Waters Division of Millipore. Waters Model 510 HPLC Pump Operator's Manual. Manual number 21065. Revision 2. *Millipore Corporation Waters Chromatography Division Publications DC.* EUA 1990.
45. Waters Dynamic Solutions Division of Millipore. Maxima 820 Chromatography Workstation Reference Manual. Manual number 34764. *Dynamic Solutions Division of Millipore.* EUA 1990.
46. Yourdon, E. Modern Structured Analysis. *Prentice Hall* 1989.