



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**ANÁLISIS DE COMPUESTOS RESIDUALES
EN TENSIOACTIVOS CATIONICOS POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
EFICACIA Y ELECTROFORESIS CAPILAR**





UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**ANÁLISIS DE COMPUESTOS RESIDUALES EN TENSIOACTIVOS
CATIÓNICOS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
EFICACIA Y ELECTROFORESIS CAPILAR**

Memoria presentada por
María del Carmen Prieto Blanco
para optar al grado de *Doctora en Química*
Septiembre, 2002



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Campus da Zapateira, s/n.
15071 A Coruña
España - Spain
Teléfono 981 16 70 00
Fax 981 16 70 65

SOLEDAD MUNIATEGUI LORENZO, Profesora Titular y Directora del Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña.

AUTORIZA a Dña. María del Carmen Prieto Blanco a presentar el trabajo titulado "*Análisis de compuestos residuales en tensioactivos catiónicos por cromatografía de líquidos de alta eficacia y electroforesis capilar*" para optar al grado de Doctora en Química.

A Coruña, Septiembre de 2002



Fdo. Soledad Muniategui Lorenzo



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

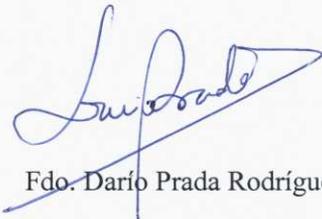
Campus da Zapateira, s/n.
15071 A Coruña
España - Spain
Teléfono 981 16 70 00
Fax 981 16 70 65

DARÍO PRADA RODRÍGUEZ, Catedrático y **PURIFICACIÓN LÓPEZ MAHÍA**, Profesora Titular, del Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña.

CERTIFICAN

Que la presente memoria titulada "*Análisis de compuestos residuales en tensioactivos catiónicos por cromatografía de líquidos de alta eficacia y electroforesis capilar*", se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de A Coruña.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman la presente en A Coruña, Septiembre de 2002.



Fdo. Darío Prada Rodríguez



Fdo. Purificación López Mahía

A miña nai, Maruja e as miñas avoas, Rita e Andrea

AGRADECIMIENTOS

Al final de la realización de esta Tesis Doctoral y al principio de su presentación quiero hacer mención especial a todos los trabajadores de ROBUSA S.A. y ARTEIXO QUÍMICA S.L. con los que he compartido o comparto un lugar común y un proyecto de empresa, seguramente *polifacético*, que se ha ido modelando durante estos años, en ocasiones, con muchas dificultades para todos.

Agradecer a los directores de la Tesis, Darío Prada Rodríguez y Purificación López Mahía, la posibilidad de continuar en la Universidad y de haber mantenido el propósito de Tesis durante tanto tiempo, sometido a fluctuaciones de un trabajo compartido. En especial a Puri, por haber sido receptiva a una línea nueva, no escatimar el tiempo para atenderme y facilitarme todos los medios cuando fue necesario.

A Juan Enrique Rodríguez Burón, co-fundador de ROBUSA S.A. y administrador único de ARTEIXO QUÍMICA S.L., su confianza, gracias a la cual he podido desarrollar mi labor profesional en la industria, su tolerancia con mi forma de trabajo y que siga manteniendo el gusto por la Química.

Agradecer a la dirección de CROMOGENIA UNITS, empresa matriz de ARTEIXO QUÍMICA S.L., en la persona de José Luis Cabestany, por las facilidades dadas para la finalización de la Tesis. A sus responsables técnicos, Juan Palacín, Director de Calidad, por su apoyo, su confianza y sus gestiones en todo momento, a Antonio Guixá, Director Técnico por haber encontrado un interlocutor válido con el que me he sentido valorada y a Ignacio Ferrer, Director Administrativo por su receptividad ante los problemas. Asimismo recordar a Antonio Torrelles, del departamento de Investigación, que ha impulsado siempre la dotación del laboratorio y con el que he aprendido Química.

“...la ciencia nunca ha sido neutra. El que piense que lo es no conoce nada de Arquímedes, Galileo o Einstein. La ciencia siempre incide en el saber tecnológico y por tanto en la economía de las ciudades y los países. Esto influye en la competencia entre las naciones, en la propia lucha de los sectores de la población por su bienestar...” (J. PÉREZ MERCADER)

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. INVESTIGACIÓN EN LA PEQUEÑA Y MEDIANA EMPRESA (PYME)	3
2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA QUÍMICA INDUSTRIAL Y EL PAPEL DE LA QUÍMICA ANALÍTICA EN UN SISTEMA PRODUCTIVO	12
3. TENSIOACTIVO: PROPIEDADES, CLASIFICACIÓN, VÍAS DE SÍNTESIS. QUÍMICA INDUSTRIAL DE LOS TENSIOACTIVOS	17
4. TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS: PROPIEDADES Y QUÍMICA ANALÍTICA	28
5. NUEVAS TENDENCIAS EN LA QUÍMICA ANALÍTICA DE LOS TENSIOACTIVOS: ANÁLISIS DE COMPONENTES RESIDUALES	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	44
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	51
III. ANÁLISIS DE DIMETILAMINOPROPILAMINA (DMPA) RESIDUAL EN ALQUILAMIDOAMINAS PRECURSORAS DE TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS	55
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	57
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA AMINAS POR HPLC. DERIVATIZACIÓN QUÍMICA Y AGENTES DERIVATIZANTES	59
3. AMIDOAMINAS: SÍNTESIS, MÉTODOS DE ANÁLISIS, APLICACIONES Y DERIVADOS	87
4. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS	92
5. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN	93
5.1. Consideraciones previas	94
5.2. Elección del agente derivatizante.....	95
5.3. Efecto del exceso de agente derivatizante.....	98
5.4. Efecto de la temperatura	101
5.5. Efecto de las condiciones del medio: disolvente y pH.....	103
6. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	105
6.1. Selección de las condiciones cromatográficas.....	105
6.2. Análisis cualitativo: análisis espectral.....	111
6.3. Análisis cuantitativo: precisión, rango lineal, límites de detección y cuantificación	112
7. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE DMPA EN MUESTRAS DE ALQUILAMIDOAMINAS	115
8. CONCLUSIONES.....	119
9. BIBLIOGRAFÍA.....	120

IV. ANÁLISIS DEL AGENTE CUATERNIZANTE RESIDUAL Y SUS DERIVADOS EN UN TENSIOACTIVO CATIONICO DE CADENA ALQUÍLICA LARGA: CLORURO DE BENZALCONIO (BAK).....: 129

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	131
2. TOXICIDAD DEL AGENTE CUATERNIZANTE Y DEL BAK. APLICACIONES BIOLÓGICAS DEL BAK	134
3. TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA DETERMINACIÓN DEL BAK	141
4. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS.....	150
5. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	151
5.1. Consideraciones previas	151
5.2. Identificación de los productos residuales y selección de las condiciones de elución en isocrático	152
5.3. Separación de impurezas y selección de las condiciones de elución en gradiente	158
5.4. Análisis cuantitativo: Precisión y rango lineal del cloruro de bencilo y derivados. Límite de detección del cloruro de bencilo	164
6. APLICACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO EN LA SÍNTESIS DEL BAK	165
6.1. Consideraciones previas.....	166
6.2. Síntesis en disolución acuosa al 50% y en presencia de catalizador inorgánico.....	167
6.3. Síntesis en disolución acuosa al 50% y con exceso de la alquildimetilamina	173
6.4. Efecto de la cadena alquímica en la velocidad de la síntesis	176
6.5. Efecto del disolvente. Síntesis en medio alcohólico	180
6.6. Efecto de la concentración. Síntesis al 50% y 80% en medio alcohólico	183
7. CONCLUSIONES.....	186
8. BIBLIOGRAFÍA	187

V. ANÁLISIS DEL AGENTE CUATERNIZANTE RESIDUAL Y SUS DERIVADOS EN UN COMPUESTO CATIONICO DE CADENA ALQUÍLICA CORTA: CLORURO DE TRIETILBENCILAMONIO (TEBA).....: 195

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	197
2. APLICACIONES INDUSTRIALES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL TEBA	199
3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS.....	203
4. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA. MECANISMOS EN LA SEPARACIÓN DE COMPUESTOS CUATERNARIOS	204
4.1. Consideraciones previas	205
4.2. Efecto del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil	206
4.3. Efecto del pH de la fase acuosa en la fase móvil.....	207
4.4. Efecto de la naturaleza y la concentración del tampón	208
4.5. Efecto de la concentración del cuaternario	215
4.6. Condiciones finales de separación	221

5. ANÁLISIS CUANTITATIVO: PRECISIÓN Y RANGO LINEAL.....	221
6. APLICACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO A MUESTRAS COMERCIALES Y A UNA SÍNTESIS DE TEBA.....	224
6.1. Consideraciones previas.....	225
6.2. Síntesis de TEBA al 50% en medio acuoso con exceso de amina	225
7. CONCLUSIONES.....	232
8. BIBLIOGRAFÍA.....	234

VI. SEPARACIÓN INDIVIDUAL Y SIMULTÁNEA DE LA SERIE HOMÓLOGA DEL CLORURO DE BENZALCONIO (BAK) Y DE COCOAMIDOPROPILBENCILAMONIO (BAA) POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE)..... 239

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	241
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS CUATERNARIOS POR CE.....	243
3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS.....	254
4. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL CLORURO DE BENZALCONIO (BAK).....	255
4.1. Consideraciones previas	257
4.2. Efecto del modificador orgánico como aditivo en el electrólito portador.....	259
4.3. Efecto del modificador orgánico en la preparación de la muestra	262
4.4. Efecto de la longitud del capilar, la temperatura y el voltaje.....	263
4.5. Mejora de la sensibilidad con técnicas de inyección de campo amplificado	268
5. SEPARACIÓN SIMULTÁNEA DE BAK Y DE BAA	271
5.1. Efecto de la longitud del capilar, el voltaje y la temperatura.....	273
5.2. Efecto del pH y la concentración del electrolito	275
5.3. Mejora de la sensibilidad con técnicas de preconcentración con campo amplificado	281
6. ASPECTOS CUANTITATIVOS EN EL ANÁLISIS DEL BAK Y BAA	283
7. APLICACIÓN A MUESTRAS INDUSTRIALES Y PRODUCTOS FORMULADOS	285
8. ESTUDIO ANALÍTICO COMPARATIVO PARA BAA Y BAK POR HPLC Y CE.....	287
9. CONCLUSIONES.....	294
10. BIBLIOGRAFÍA.....	295

VII. DETERMINACIÓN DE ALQUILBENCENOS COMO IMPUREZAS EN CLORURO DE BENCILO Y CLORURO DE BENZALCONIO (BAK) 299

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	301
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS ALQUILBENCENOS OBJETO DE ESTUDIO. TOXICIDAD DEL CLORO Y DICLOROTOLUENOS	303
3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS	311
4. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	312
4.1. Consideraciones previas	314
4.2. Separación de seis alquilbencenos con columna Lichospher-C ₁₈	315

CAPÍTULO I

Introducción

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. INVESTIGACIÓN EN LA PEQUEÑA Y MEDIANA EMPRESA (PYME).....	3
2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA QUÍMICA INDUSTRIAL Y EL PAPEL DE LA QUÍMICA ANALÍTICA EN UN SISTEMA PRODUCTIVO.....	12
3. TENSIOACTIVO: PROPIEDADES, CLASIFICACIÓN, VÍAS DE SÍNTESIS. QUÍMICA INDUSTRIAL DE LOS TENSIOACTIVOS.....	17
4. TENSIOACTIVOS CATIONICOS: PROPIEDADES Y QUÍMICA ANALÍTICA	28
5. NUEVAS TENDENCIAS EN LA QUÍMICA ANALÍTICA DE LOS TENSIOACTIVOS: ANÁLISIS DE COMPONENTES RESIDUALES.....	39
6. BIBLIOGRAFÍA	44

“Investigación, Empresa, Química Industrial, Química Analítica y Tensioactivos” son los cinco conceptos que forman el soporte estructural de esta introducción ya que ellos explican el por qué, el dónde y el con qué se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral. Sus interrelaciones conducen al examen de la investigación en la empresa, de la Química Industrial como un sector crucial en el desarrollo económico, del papel de la Química Analítica en los procesos productivos, la química y las tendencias a las que se dirige el análisis de los tensioactivos.

1. INVESTIGACIÓN EN LA PEQUEÑA Y MEDIANA EMPRESA (PYME)

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el marco de una PYME, un tipo de empresa que, por sus dimensiones, es representativa del tejido empresarial gallego y español. El acrónimo PYME define a una empresa que emplea menos de 250 trabajadores. En España, el 99,8% de las empresas son PYME, emplean más del 80% del total de los trabajadores y generan el 70% del producto interior bruto (PIB) (INE, 1995). Debido a las dificultades para llevar a cabo tareas de investigación por parte de las PYME, parece ineludible analizar el estado actual del binomio investigación-empresa.

Se utilizará para esta revisión, el término de innovación, sustituyendo al de investigación cuando se quiera introducir una acepción de tipo económico y empresarial. En el libro verde de la Fundación COTEC, 1997 se denomina innovación a la transformación de ideas o conocimientos en productos, nuevos o mejorados, que son valorados en el mercado. Otros autores recogen en la definición una acepción temporal y espacial al inscribir el proceso “*en un determinado período de tiempo y lugar*” (XUNTA DE GALICIA, 1999). Pese a que el

origen de la innovación puede ser comercial, gerencial o tecnológico, es en este último donde se realiza una conversión más profunda. La tecnología constituye un instrumento para la innovación, pero es ésta la que aporta a las empresas la rentabilidad y el crecimiento perseguido. Sin embargo, la creación de riqueza y la generación de conocimientos científicos y tecnológicos parecen tener en sociedades desarrolladas, una interdependencia cada vez más unívoca, sin intervención de otras variables.

La noción de innovación en Europa, ha ido evolucionando desde un modelo lineal en la post-guerra, que la consideraba como una secuencia encadenada de etapas (conocimiento, invención, desarrollo, innovación que se producía en la empresa) hasta los años 80 en los que se piensa que la innovación no es fruto de un sistema aislado, la empresa, sino también de agentes exteriores: otras empresas, clientes y proveedores, instituciones educativas que proporcionan personal cualificado y conocimiento, las administraciones públicas con sus políticas de apoyo. En el primer modelo los resultados conseguidos dependían exclusivamente del dinero invertido por la empresa, en el más avanzado, el éxito de la innovación es menos predecible y dependiente del funcionamiento del sistema innovador que constituye la empresa y los agentes exteriores en un entorno geográfico.

Las empresas vistas como agentes innovadores han permitido a PAVITT (1984), en el Reino Unido, basándose en un estudio sobre 2000 procesos innovadores en empresas, establecer una clasificación de sectores industriales, en la que se evalúa la competitividad, alta o baja y el origen de la tecnología, exógena o endógena, como dos parámetros que inciden en la innovación. Así altos niveles de competitividad y/o tecnologías procedentes de los proveedores pueden

impulsar la innovación, pero sectores con tecnología generada internamente y baja competitividad se sitúan en puestos de cabeza de empresas innovadoras.

Los indicadores usados por PAVITT para evaluar el origen de la tecnología son: el tipo de innovación, de producto o proceso; la investigación básica, aplicada o de desarrollo y la posición en la cadena de comercialización. Finalmente, la clasificación recoge cuatro tipos de sectores: los sectores dominados por los proveedores con ejemplos representativos en las industrias tradicionales (textil, confección, transformación de madera, etc.) poseen una tecnología exógena sobre todo en los equipos, suministrada por los proveedores y una alta intensidad competitiva. También los sectores intensivos en escala como el del automóvil y el siderúrgico trabajan con tecnología exógena procedente de otros sectores, pero muchas veces, muy sofisticada en sus procesos productivos aunque la competitividad es baja.

Los sectores de proveedores especializados (componentes de electrónica, de informática...) y basados en la ciencia, el electrónico, el químico (plásticos, barnices, pinturas, fertilizantes, tensioactivos...) tienen tecnología endógena, los primeros con alta competitividad innovan en el producto, sobre todo en el diseño; los segundos con baja competitividad, lo hacen en el proceso pero a su vez repercute en el producto. Los sectores basados en la ciencia, en el que se encuadra la PYME en la que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, presentan una diversificación alta y una gran variedad de productos que se presentan en mercados diferentes.

Cualquier análisis sobre la empresa tiene que partir del entorno geográfico en el que se genera. La innovación en España, con una industrialización retardada, en mercados protegidos y aislada de la investigación realizada en los centros públicos

presenta perfiles muy débiles: está propiciada por los proveedores o la competencia y no abre mercados, se basa más en el proceso que en el producto y recurre poco a la tecnología. Según una encuesta del Instituto Nacional de Estadística (INE, 1997), sólo el 11% de las empresas españolas se pueden considerar innovadoras, frente a un 25% del resto de las europeas; y de las innovaciones españolas sólo un 6% tiene base científica.

Los recursos que la empresa dedica a I+D, a pesar de que hubo una mejora en los años 80 siguen siendo escasos y según el CÍRCULO DE EMPRESARIOS (1995) con una financiación dificultosa. Mientras en Japón y Estados Unidos los sistemas de financiación capital-riesgo se dedican a proyectos de innovación, en España lo hacen en actividades consolidadas. La financiación en las PYME es más crítica porque además del desconocimiento del funcionamiento del capital-riesgo, no actúan eficazmente, como en Estados Unidos segundos mercados de valores para empresas medianas *National Asociation of Securities Dealers Automated Quotations* (NASDAQ). El equivalente europeo *European Asociation of Securities Dealers Automated Quotations* (EASDAQ) tiene una participación de empresas reducida, el *Neuer Markt* cuenta con 339 empresas frente a las 4632 de USA. En España, el Nuevo Mercado no presenta buenas perspectivas “*desde su creación ha perdido un 70% de su valor inicial*” (HERNANSANZ, 2001).

Los programas de fomento a la innovación, desde las administraciones tanto en el ámbito estatal o comunitario, hacia las empresas contemplan nuevos instrumentos financieros y fiscales (PENACHO, 2001). En España, el PROFIT (Programa de Fomento o Innovación Tecnológica) del 2000 considera las siguientes medidas de carácter financiero: capital-riesgo, subvenciones (ayudas no retornables), créditos (ayudas retornables) y reafianzamiento de avales y entre los

incentivos que afectan directamente a las PYME, se encuentra la Ley 6/2000 de 13 de diciembre con un tratamiento fiscal específico. Dado que las PYME acuden con poca frecuencia a los programas de innovación de las administraciones estatales y europeas, las autonómicas y locales podrían jugar un papel importante con políticas más personalizadas y directas (BRAVO JUEGA, 2001).

El esfuerzo en términos económicos en I+D expresado como porcentaje respecto al volumen de ventas (FUNDACION COTEC, 1998) es mayor en las PYME que en las grandes empresas. Por ello, parece muy importante que la cooperación con el sistema público de I+D se incremente con respecto al estado actual. La encuesta del Círculo de Empresarios (1995), revela que la colaboración entre empresa y centros de investigación públicos es muy escasa. En parte motivada por la falta de demanda de tecnología y conocimientos científicos de la empresa y en parte por la rigidez y la falta de orientación de las universidades a una investigación aplicada. La creación de los centros tecnológicos parece empezar a paliar este último aspecto.

En cuanto al capital humano, las empresas españolas presentan un déficit de personal técnico cualificado (MINER, 1997) si bien existe un importante incremento en los últimos años de titulados en Ingenierías y Ciencias Experimentales aunque aún alejado de la media europea. A las empresas no se incorporan los doctores que salen de las universidades o si lo hacen es en muy pequeño número. También es de resaltar que la formación impartida en las universidades no está orientada a la empresa ya que sólo las ingenierías tienen en sus currícula, estudios empresariales, careciendo de ellos las experimentales.

Por otra parte, uno de los indicadores sobre el trabajo de los investigadores, las publicaciones en I+D, presentan un aumento importante en España en los

últimos años, pero fundamentalmente debido a la investigación realizada en las universidades y no en la empresa, que sigue teniendo una contribución muy pequeña en el total de publicaciones. El personal técnico en cualquier puesto, dentro de la empresa está gravado con trabajos administrativos y poco aprovechado en su formación, por lo que las tareas de investigación, se ven impedidas no sólo por la financiación, sino por falta de tiempo, ambiente de trabajo y apoyo necesarios.

La demanda de la sociedad española de productos basados en avances tecnológicos es pequeña y no constituye un acicate para la innovación. Pero esta demanda está muy directamente relacionada con los niveles de renta y formación de la población. En España, los desequilibrios entre comunidades autónomas en lo que se refiere al grado de desarrollo dificultan evaluaciones en conjunto. Por esta misma razón, de los estudios comparativos entre las empresas españolas y la media de empresas europeas, habría que pasar a la consideración de las comunidades autónomas porque ya solamente la historia de su industrialización marca acusadas diferencias (PESTAÑA, 2001).

Galicia, que en términos de riqueza posee un producto interior bruto (PIB) per cápita que representa un 83% de la media española, y es inferior al 75% de la media europea, mantiene una economía con un fuerte peso del sector primario, agricultura, ganadería y pesca, solamente esta última genera el 25% del valor bruto añadido gallego. La industria se orienta mayoritariamente a actividades tradicionales, muchas de ellas de productos transformados del sector primario, agroalimentarios, forestales y de construcción naval. Los sectores de proveedores especializados y basados en la ciencia no constituyen el grueso de la actividad productiva. Sin embargo la estructura empresarial reproduce miméticamente la

media española, el 99,98% de las empresas son PYME que dan trabajo al 87,3% de los trabajadores. Un dato indicativo de la micronización del tejido empresarial es que el 98,2% de las empresas gallegas tienen menos de 20 trabajadores (XUNTA DE GALICIA, 1999).

El gasto de I+D en Galicia, el 0,54% en 1996 del producto interior bruto era aún mas bajo que la media española (0,92%) (CARNEIRO, 2001). Aunque como característica diferenciadora, de las tres entidades que desarrollan tareas de investigación, empresa, universidad y administración; son las tres universidades gallegas las que soportan la mayoría del peso investigador (sobre un 55%), en cuanto al gasto, a los recursos humanos y el número de investigadores empleados. El bajo gasto realizado por las empresas está unido a que las PYME de menos de 20 empleados, mayoritarias en el tejido empresarial sólo realizan el 2,75% del gasto. La innovación por sectores industriales, recae en el automóvil, la construcción naval y el químico, este último con un 11,7%.

Parece prematuro todavía analizar la repercusión del entorno tecnológico, parques, centros y laboratorios en la innovación en Galicia, ya que la mayoría han nacido en la década de los 90. En general, los laboratorios de ensayo y medida están orientados al sector primario, sobre todo al agroalimentario quedando desatendidas las empresas industriales.

Con respecto al entorno financiero, existen sociedades de capital riesgo como la Sociedad para el Desarrollo Industrial de Galicia, SODIGA, de garantía recíproca, y organismos públicos como el Instituto Gallego de Desarrollo Económico (IGAPE) capaces de canalizar las iniciativas innovadoras pero su origen es mayoritariamente público sin existir implicación de las entidades financieras del país. A pesar de estas entidades especializadas, que se adecuan a

las características propias de la innovación: riesgo elevado, proyectos complejos, se detecta en la Estrategia para la Innovación de Galicia (XUNTA DE GALICIA, 1999) una falta de técnicos o de un comité interdisciplinario en el sistema financiero que pudiera evaluar los proyectos innovadores con criterios de viabilidad técnica y no sólo financiera. Por otra parte, la falta de capitalización de las PYME, la negativa de los empresarios a aceptar socios de capital riesgo que asuman algún control sobre la empresa, la ausencia de formación en gestión de proyectos innovadores, dificultan el acceso a la financiación.

Si se estudia de forma específica el sector químico en Galicia (SOENGAS NOVOA, 1999), los datos económicos indican que aunque sus exportaciones en 1996 representaban un 3,5%, la balanza exterior era deficitaria en 9000 millones de pesetas (Mpts) (equivalente a 54 millones de euros).

A excepción de dos grandes empresas, el grupo petroquímico Repsol con 1000 trabajadores y una facturación de 274000 Mpts (aproximadamente 1645 millones de euros) y la empresa de obtención de aluminio, Inespal, 3300 trabajadores y 168638 Mpts facturados (1012 millones de euros), el resto del sector está muy fragmentado: existen 303 empresas que emplean a 8000 trabajadores. Como en el resto del tejido productivo gallego, estas PYME no sólo son menores de 250 trabajadores sino que entre un 70-80% (según las provincias) no alcanzan los 25. Los productos que fabrican, orgánicos e inorgánicos, abarcan la gama característica de las industrias químicas: caucho, pirotécnicos, detergentes, farmacéuticos, colas, gelatinas, pigmentos, pinturas, barnices, etc. siendo la transformación de plásticos (automóvil, transformación de polipropileno, fabricación de contenedores de poliéster para líquidos) la que ocupa un mayor número de empresas. Su destino son otras industrias existentes en el país: el sector

del automóvil y sus componentes, las industrias conserveras, de alimentación, madera, papel.

La dinámica de las PYME del sector químico de Galicia no parece incorporar la innovación ya que las inversiones están dedicadas a la compra y no a la generación de tecnología y nuevos equipos. Sus actividades de I+D, principalmente, comprenden el desarrollo de productos y adaptación de los existentes a nuestro mercado, sin una investigación propiamente dicha.

Cuando se analiza la formación de los trabajadores, los datos son muy preocupantes para un sector basado en la ciencia, el 42% no tiene estudios, el 26% con estudios primarios y un 15% con formación profesional aunque la fuente consultada no explica si ésta es específica para el sector. Un análisis de género refleja que la incorporación de la mujer es aún escasa, hay un 20% de mujeres frente a un 80% de hombres. Sin embargo, las mujeres aportan una mayor formación, constituyen el 50% de los titulados medios y el 37% de los licenciados superiores.

Sumándose al pobre volumen de inversión en I+D y a la deficitaria cualificación del personal, otros factores como que las inversiones no son de capital autóctono y por tanto la toma de decisiones se realiza en puntos alejados de la producción y, que tampoco existe un subsector de química básica estructurado, debilitan la industria química gallega.

Las oportunidades cara al futuro, según el estudio de SOENGAS NOVOA (1999) se encuentran en el hecho de que muchas de las empresas son suministradoras de cadenas empresariales en plena expansión, en la apertura a mercados internacionales y en un desarrollo industrial de los productos del mar. Otros aspectos que pueden generar expectativas favorables son la incipiente industria de

tratamiento de residuos y sobre todo que Galicia es zona objetivo 1 para recibir los fondos de la Unión Europea.

2. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DE LA QUÍMICA INDUSTRIAL Y EL PAPEL DE LA QUÍMICA ANALÍTICA EN UN SISTEMA PRODUCTIVO

En la revisión histórica por la Química Industrial, se analizan los procesos más representativos por su repercusión social y económica, aunque no todos, así como las dificultades específicas que la explotación de los procesos químicos conlleva, el papel de la investigación y el de la Química Analítica en su desarrollo, las empresas y los países implicados.

El paso de la Química de los laboratorios a los centros de trabajo como una finalidad de rentabilidad económica marca el comienzo de la Química Industrial y ya se realiza en Europa en el siglo XIX. En este siglo, la Química estaba estableciendo aún sus principios básicos, cuando paralelamente nace una industria aplicada a productos manufacturados, orientada fundamentalmente a la industria textil: la industria de los álcalis y la de los colorantes. Basada más en el empirismo que en bases científicas, los principales problemas a los que se enfrenta son de ingeniería química: diseño y construcción de chimeneas, torres de absorción, conducciones, etc..

La industria de los álcalis se desarrolló en Gran Bretaña con un proceso ideado en Francia, el proceso Leblanc, que producía sosa para la fabricación de jabón, vidrio y papel y con sus productos secundarios (cloro en cal viva) suministraban blanqueantes para las telas de algodón. Era un proceso deficiente en cuanto al consumo de materias primas y energía, así en 1863 Inglaterra consumía

1,76 millones de toneladas de materias primas para producir 0,28 millones de toneladas de productos como jabón y blanqueantes (BROCK, 1998).

Las condiciones de trabajo en las fábricas con escapes de gases y humos eran infrahumanas y las emisiones al medio ambiente provocaron la aparición de normativas legales como la ley de los álcalis en Inglaterra en 1863 obligando a los fabricantes a absorber el 95% del cloruro de hidrógeno producido. Con todo fue un sector económico muy floreciente que en 1880 empleaba a 40.000 personas y producía a 2,5 millones de libras esterlinas anuales. A finales de siglo un proceso alternativo menos contaminante, el proceso Solvay, con una torre de carbonatación, materias primas más accesibles, menos consumo de combustible pero con la desventaja de que no producía cloro para los procesos de blanqueo empieza a coexistir con el proceso Leblanc. La pugna origina en 1890 la creación de una compañía grande, por asociación de los pequeños productores que ya cuenta con un laboratorio de investigación, la *United Alkali Company*. Paulatinamente y ya entrado el siglo XX todos los fabricantes adoptan el proceso Solvay y se forma la *Imperial Chemical Industries* (ICI).

El surgimiento de la Química Industrial en el siglo XIX o como BROCK en 1998 la denomina: "*Química aplicada a los oficios y a los productos manufacturados*", trae la primera conexión con la Química Analítica. Surgen los primeros controles de calidad ante la necesidad de verificar la pureza de los productos fabricados recogándose históricamente en Francia (1820) tasaciones de álcali según la pureza. La determinación analítica se realizaba con un alcalímetro, el precursor de la bureta, inventado por DESCROIZILLES en 1806, haciendo uso de una disolución de ácido sulfúrico patrón.

La otra industria floreciente en el siglo pasado cuyos productos se usaron en la industrial textil es la de los colorantes, ejemplo de aplicación industrial de los avances de la época en Química Orgánica experimental, y del conocimiento de la obtención del benceno y sus derivados a partir del alquitrán de hulla. Tanto los descubrimientos teóricos del siglo XIX (Hofmann, Baeyer) como los procesos industriales (*Badische Anilin und Soda Fabrik, BASF*) fueron realizados por químicos alemanes con aportaciones de ingleses y franceses de forma que los colorantes naturales que se obtenían de plantas o de insectos, se sustituyeron por colorantes sintéticos, la alizarina a partir del antraceno, índigo a partir del ácido antranílico, fucsina, púrpura de anilina, etc.

La industria de los colorantes además de reportar grandes beneficios, estableció una conexión con la producción de fármacos y productos para la fotografía y extendió la creación de los laboratorios de investigación en las empresas. Un ejemplo representativo fue la empresa alemana Bayer cuyos principios estuvieron en la producción de alizarina e índigo y que posteriormente se dedicó a la industria farmacéutica con un producto revolucionario en su época, la aspirina. Posiblemente debido a esta evolución Bayer crea la primera estructura de departamento de investigación y desarrollo en una empresa a principios del siglo XX.

Los objetivos de la industria del siglo XX, como en parte lo había sido en el XIX, estaban en la sustitución de los productos naturales por otros sintéticos más baratos, pero también el de crear otros nuevos, que paliaran carencias con las que se enfrentaba la sociedad. Es el caso de la producción de fertilizantes para conseguir una agricultura más eficaz que provea a una cada vez creciente población. En la última mitad del XIX, se comenzaron a fabricar productos

fosfatados para la agricultura pero fueron los derivados nitrogenados los que iniciaron la Química Agrícola. *BASF* llevó a cabo su fabricación a partir de un proceso, el de Haber-Bosch que combinó química orgánica, termodinámica de las reacciones e ingeniería para fijar el nitrógeno del aire, transformándolo en amoníaco, mediante un catalizador a presión de 200 atm y una temperatura de 500°C. Se trataba de uno de los procesos menos contaminantes que la Química Industrial había ideado hasta entonces aunque el amoníaco producido, fue usado en fines menos loables que los agrícolas ya que convertido en ácido nítrico se empleó en la industria de explosivos de la I Guerra Mundial (PERUTZ, 1997).

Si se pretendiera resumir algunas de las características generales que definieron a la industria química en el siglo XX, sería necesario acudir al cambio de la producción por lotes a la de un flujo continuo, el control del proceso con supervisión instrumental, el aprovechamiento de los catalizadores, los productos petroquímicos como materias primas de los restantes elaborados por la industria química y el cambio de la innovación que bascula, sobre todo después de la segunda Guerra Mundial, de las empresas alemanas a las americanas. No obstante la producción por lotes no se abandonó en sectores de especialidades y empresas pequeñas; el control del proceso en planta y automatizado (medidas de pH, temperaturas) coexistió con análisis en laboratorio de control, que aunque instrumentalizados formaban parte del tiempo de proceso.

La industria de derivados del petróleo se desarrolló a principios de siglo estimulada por la investigación que trataba de aumentar la eficacia en la producción de gasolina para la incipiente industria del automóvil en Estados Unidos. Se comenzó con la destilación fraccionada a vacío, el craqueo térmico y el craqueo catalítico permitiendo la obtención de una variedad de productos que a

su vez iniciaban la síntesis de otros muchos, por ejemplo: a partir del etileno, se obtiene el óxido de etileno que permite la síntesis de tensioactivos, o el etanol del que se fabrica etilbenceno, después estireno y finalmente poliestireno.

Durante la segunda Guerra Mundial, los cortes de comunicación terrestres y marítimos que impedían los suministros, y los racionamientos de productos obtenidos de fuentes naturales (grasas, caucho, etc) impulsaron algunas industrias químicas cuyas materias primas eran de origen petroquímico y que se desarrollarían en la segunda mitad del siglo. Concretamente, en los detergentes sintéticos o tensioactivos, la situación creada por la guerra sería clave para el desarrollo de su industria.

La Química Analítica aplicada al proceso industrial sufrió fuertes avances parejos a la adopción de los principios ópticos y del conocimiento de la estructura de la materia estudiados por la Química Física. A partir de los años 20 se diseñaron instrumentos cuantitativos para el análisis de destilaciones fraccionadas en la petroquímica y la compañía *Down* desarrolló tecnología para aplicar el control automático a sus procesos. En los años 40, la aparición de la espectroscopía de infrarrojo (IR) fue una importante ayuda para los procesos de la Química Orgánica. Fruto de las demandas de la industria, a finales de los años 50, nace la cromatografía de líquidos, concretamente de los trabajos que Waters realiza para la compañía *Down*.

De la gran variedad de compuestos que sintetizó la industria química a lo largo del siglo XX, posiblemente sean los polímeros, unos de los que más han repercutido en las condiciones de vida cotidiana de las sociedades. A pesar de que los primeros polímeros datan de finales del siglo XIX, el celuloide en 1877, o de principios del XX, la baquelita en 1910, no será hasta los años 30 que la

producción de nuevos polímeros esté basada en una comprensión de las reacciones y de la estructura del compuesto y no en pruebas de ensayo y error. La aparición de los rayos X en los años 20, permitió impulsar la investigación en torno a estos compuestos.

En los años 30, los estudios de polimerización realizados por Carothers en la empresa americana Du Pont fructificaron en una fibra sintética, la poliamida de nombre comercial, nailon, que proporciona millonarios beneficios comerciales (BROCK, 1998). La compañía había seguido el modelo de innovación de las empresas alemanas creando un departamento de investigación, con personal contratado proveniente de las universidades.

3. TENSIOACTIVO: PROPIEDADES, CLASIFICACIÓN Y VÍAS DE SÍNTESIS. QUÍMICA INDUSTRIAL DE LOS TENSIOACTIVOS

Los tensioactivos son un grupo de compuestos orgánicos obtenidos por síntesis química y caracterizados por un comportamiento específico en disolución que los hace especialmente adecuados para su uso en un amplio espectro de actividades humanas.

Las distintas denominaciones usadas para nombrarlos: tensioactivo, agente activo superficialmente con su contracción proveniente del inglés (surfactante) hacen referencia a su capacidad de alterar las propiedades de un líquido cuando se disuelven en él; más concretamente a la disminución de la tensión superficial. Esta magnitud, debida a la atracción mutua de las moléculas de una sustancia que tienden a agruparse, mide el coste energético de la creación de una superficie (interfase) y es por tanto una energía por unidad de superficie cuyo valor depende de la naturaleza de las sustancias situadas a uno y otro lado de la interfase.

A pesar de que en alguna bibliografía el término tensioactivo es sinónimo de detergente, la IUPAC (International Union Pure Applied Chemistry) define el detergente como un surfactante o mezcla de surfactantes; la acepción más ampliamente aceptada es aquella que lo considera como una mezcla de componentes principales (los tensioactivos) y de otros generalmente complementarios (coadyuvantes de lavado). Éstos últimos pueden actuar como ablandantes (agentes quelatantes, zeolitas...), agentes de blanqueo (perboratos y percarbonatos), inhibidores de espuma (siliconas), protectores de fibras (fosfonatos), azulantes ópticos (estilbenos), enzimas (proteasas y amilasas), agentes antideposición (celulosas), colorantes, perfumes, etc. (MILWISKY Y GABRIEL, 1982; SCHWEIKER, 1981; NEIDITCH, 1981, CHENEVAL, 1993).

Los tensioactivos presentan una propiedad claramente diferenciadora en disolución, con respecto a la mayoría de los compuestos caracterizados, por su tendencia a maximizar la interacción soluto-disolvente concentrándose más en el seno de la disolución que en la interfase. La causa de este comportamiento reside en la composición molecular de los tensioactivos que constan de una parte hidrofóbica compuesta por cadenas alquílicas y otra hidrofílica formada por un grupo iónico o altamente hidrofílico. Los altos pesos moleculares favorecen el que cada una de las partes pueda actuar independientemente.

En agua, los tensioactivos forman agregados microscópicos llamados micelas, en las que la parte hidrofílica de la molécula está orientada hacia el agua y la parte hidrofóbica tiene un contacto mínimo con ésta. En sistemas agua-tensioactivo-grasa, es la parte hidrofóbica o liposoluble la que interacciona con la grasa, estableciéndose así un puente entre dos fases inmiscibles, el agua y la grasa.

Este mecanismo explica de forma general la acción detergente, es decir, la dispersión de materias grasas que se lleva a cabo en el lavado.

Explicaciones más específicas tienen en cuenta el tipo de material al que está fijado la grasa, sugiriéndose dos tipos de mecanismos, de disolución y de encapsulación. Si se toma como referencia la limpieza de tejidos, en fibras polares como el algodón, el surfactante actuaría encapsulando la grasa al introducirse una capa del mismo entre la fibra y la mancha, y posteriormente dejándola en suspensión dentro de la micela del surfactante. Para fibras menos polares como las sintéticas, la mancha se separaría del tejido no en un todo, sino dispersada en muy pequeño porcentaje de moléculas que se incorporarán a las micelas del tensioactivo (KARABORNI y col., 1996). Cuando la acción detergente se aplica sobre el cuerpo humano, en la piel o en el pelo, mecanismos similares a los modelizados para las fibras explican el lavado: etapa de separación de la grasa, formación de la micela y suspensión en el agua.

Pero conviene recordar que los tensioactivos no ejercen funciones de limpieza de forma exclusiva. Otros componentes, que los acompañan en las formulaciones detergentes, como los agentes blanqueadores se encargarían de lavar restos de sustancias con color (vino, café...), y por ejemplo, las enzimas actuarían sobre las proteínas. Tampoco la limpieza es su única función, otras propiedades como la formación de espuma, la solubilización de compuestos como las fragancias, la emulsificación y la acción acondicionadora o suavizante justifican su presencia. Incluso contribuyen a proporcionar a los productos, sobre todo los cosméticos, características secundarias en cuanto a su función pero posiblemente importantes en lo que respecta a las expectativas o ideas que el producto crea en el consumidor. Son ejemplos los efectos de perlado y opacidad

de los estearatos de glicoles que producen en geles, champús, etc. o el aumento de viscosidad y la espuma originados por las amidas y que dotan al producto final de características muy apreciadas por los consumidores en el mercado de cosméticos (SCHUELLER Y ROMANOWSKI, 1994).

La clasificación más habitual de los tensioactivos es la que toma como criterio la carga del grupo iónico. De esta forma existen:

- *Aniónicos*. Presentan carga negativa, tales como las sales de ácidos grasos (los jabones tradicionales); los alquilbencenosulfonatos lineales (LAS); los sulfatos de alcohol graso que constituyen los surfactantes primarios, las bases detergentes de todas las formulaciones, con la producción más alta de los tensioactivos fabricados en el mercado. En 1993 de una producción mundial de 7,2 millones de toneladas, los aniónicos supusieron el 55% (DI CORCIA, 1998).
- *Catiónicos*. Presentan carga positiva al disponer de un grupo funcional con un átomo de nitrógeno cargado positivamente, es decir con cuatro enlaces covalentes. Si se establecen enlaces con cuatro radicales alquílicos se trata de un compuesto cuaternario (QUAT) y presentará, a diferencia de otros catiónicos, carga positiva independientemente del pH del medio en que se encuentre. Los radicales que constituyen la parte hidrofóbica pueden contener grupos cíclicos o aromáticos pero si algunos de los radicales es un átomo de nitrógeno, como en el caso de las aminas grasas o los óxidos de aminas su carácter catiónico está restringido a determinados rangos de pH. En cuanto al contraíón del átomo de nitrógeno, las especies más habituales son los halógenos, cloruro y bromuro, el metilsulfato y algún ácido carboxílico como el acético. Su naturaleza afectará a propiedades del

tensioactivo catiónico como la estabilidad térmica, a los equilibrios en agua, en el comportamiento micelar, o la viscosidad.

- *No iónicos*. Carecen de carga en el grupo funcional, tales como los alcoholes etoxilados, alquilfenoles etoxilados, ésteres de ácidos grasos y de poliglicoles, que forman parte de los productos de limpieza doméstica y se emplean como emulsionantes y agentes humectantes en aplicaciones industriales.
- *Anfotéricos*. Presentan carga positiva y negativa a la vez en la molécula, ejemplos de éstos son las carboxi- y sulfobetainas, muy usados en cosmética, en champús, limpiadores faciales, etc., ya que actúan como bases lavantes menos irritantes y agresivas que los aniónicos.

En relación con las posibles vías de síntesis de los tensioactivos (figura I-1), hay que tener en cuenta que la parte funcional de la molécula de los tensioactivos determinará su reactividad y también sus propiedades pero la hidrofóbica tiene características propias que condicionan un comportamiento u otro en el tensioactivo. De tal manera que la vía de síntesis comienza por la definición y obtención de las materias primas que aportarán la cadena grasa. Atendiendo a sus características fisico-químicas se pueden clasificar en grasas, aceites o ceras.

Químicamente se trata de cadenas alquílicas hidrocarbonadas cuyo número de átomos de carbono se extiende en el rango de C_6 (caproico) a C_{34} (gédico) aunque las más habituales se encuentran entre C_{12} (laúrico) y C_{18} (esteárico). Los compuestos que poseen estas cadenas son de origen natural, triglicéridos o derivados de la industria del petróleo. La ruta sintética ofrece dos posibilidades: la polimerización de alquenos catalizada por metales (proceso Ziegler) o craqueo catalítico de compuestos de alto peso molecular. La formación de α -olefinas

produce una mezcla de cadenas de distinta longitud que son fácilmente purificadas para producir la cadena de interés mediante destilación fraccionada. El siguiente paso es la transformación de alcoholes a partir de los cuáles se originan fundamentalmente tensioactivos aniónicos: sulfatos, fosfatos, carboxilatos, sulfosuccinatos que a su vez pueden estar etoxilados (con n átomos de óxido de etileno en la molécula).

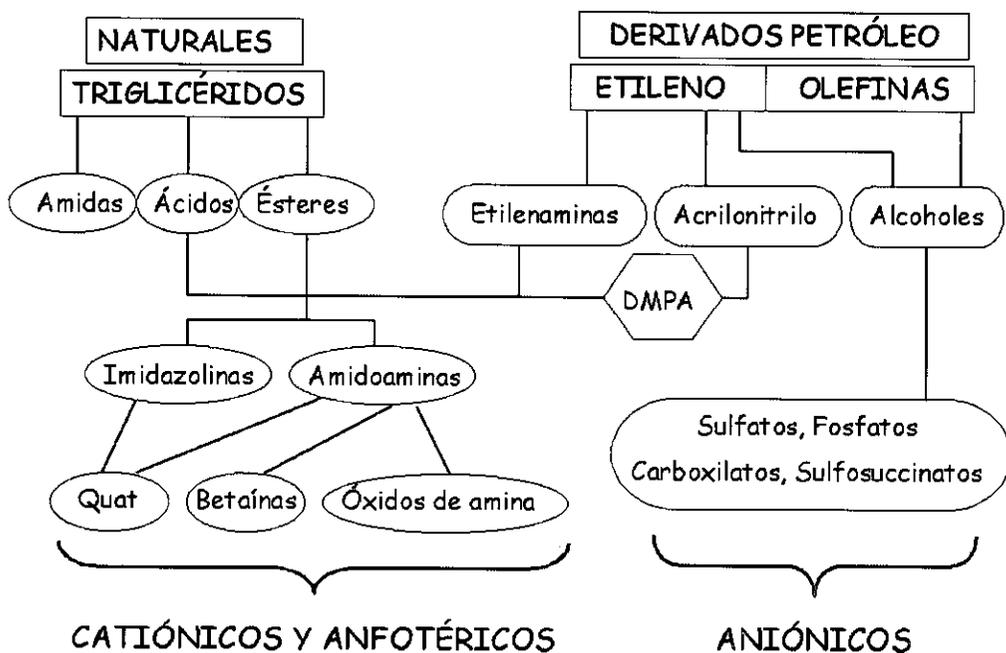


Figura I-1. Diagrama de flujo de la síntesis de algunos de los tensioactivos más representativos.

Los compuestos de origen natural, los triglicéridos extraídos a partir de plantas o animales, son ésteres de glicerina cuya cadena alquílica es una mezcla de

homólogos con un número variable de átomos de carbono y que pueden poseer dobles enlaces o insaturaciones.

Los triglicéridos de origen vegetal se clasifican en tres grupos según la longitud de la cadena, en el primero con cadenas menores de C_{18} se encuentran el aceite de coco, de palma y de babasú con C_{12} como cadena mayoritaria. Los transformados del aceite de coco, sobre todo anfotéricos, son muy utilizados en formulaciones de higiene personal. El segundo grupo que engloba a los triglicéridos ricos en cadenas C_{18} insaturadas, es más numeroso siendo el aceite de oliva, de cacahuete, de girasol ejemplos representativos. El tercer grupo contiene a los que poseen longitud de cadena mayor de C_{18} .

Los triglicéridos de origen animal son susceptibles de la misma clasificación que los aceites de origen vegetal. Se citará el sebo con cadenas C_{18} insaturadas por ser el que posee más aplicaciones; comparativamente con el aceite de oliva su grado de insaturación es menor.

El primer paso en la ruta de síntesis de los tensioactivos a partir de los triglicéridos es la transformación en ácidos grasos, ésteres metílicos o amidas. De éstos se obtienen los compuestos cuaternarios, las betaínas, sulfobetaínas, fosfobetaínas y anfotéricos en general, y óxidos de amina.

Pero antes de su introducción en la industria de la producción de tensioactivos, las grasas y aceites sufren un proceso de refinado después de la extracción de la fuente natural. Aunque para la obtención de los aceites vírgenes o crudos pueden efectuarse procesos de filtración a través de gel de sílice o arcillas para eliminación del color, de extracción con disolventes o calentamiento, eliminación de ácidos grasos con medios acuosos alcalinos, desodorización y eliminación de compuestos con oxígeno con corrientes de vapor; el proceso de

refino propiamente dicho tanto para grasas y aceites puede incluir la *winterización* o enfriamiento para separar por cristalización los componentes de las ceras sólidas (O'LENICK, 2000). Un triglicérido con poco color, desodorizado, con un contenido bajo en ácidos grasos y productos que puedan producir oxidación es el usado para comenzar la producción de tensioactivos primordialmente, catiónicos y anfotéricos.

Puede ocurrir que las materias primas que contribuyen con la cadena grasa a la estructura del tensioactivo también lleven el grupo que dará la funcionalidad, es el caso de las aminas grasas en la producción de tensioactivos catiónicos. La ruta sintética pasa por la introducción de un grupo nitrogenado en la cadena grasa (figura I-2): se forma la sal amónica de los ácidos grasos, se deshidrata para la producción de amidas y en una subsiguiente deshidratación se forman los nitrilos. Las aminas primarias se obtienen por hidrogenación catalítica del grupo nitrilo, primero para formar una imina y en la siguiente hidrogenación resulta la amina. Si bien las aminas grasas se comportan como catiónicos en bastantes aplicaciones y pueden estar clasificadas como tal, químicamente se transforman en catiónicos o cuaternarios por posterior reacción con un agente alquilante.

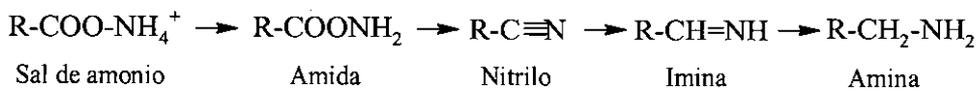


Figura I-2. Una de las posibles vías de síntesis para la obtención de aminas grasas primarias.

Otra vía de síntesis para los tensioactivos catiónicos es la reacción del derivado graso con aminas alifáticas de cadena corta, poliaminas como las de la serie de las etilenaminas o aminas hidroxiladas (mono, di y trietanolamina) para la formación de amidas, ésteres o imidazolininas o reacción con aminas aromáticas

(piridina, isoquinoleína). La última etapa de alquilación o hidrogenación de grupos amino terciarios es común a la ruta de formación a partir de aminas grasas.

Si se quiere ubicar a los tensioactivos en el desarrollo de la Química, desde la síntesis de los primeros compuestos de este grupo, el estudio de sus propiedades diferenciadoras y su incorporación a la Química Industrial, se recorre un largo camino desde mediados del siglo XIX hasta el XX.

Como en otras ocasiones en la historia de la Ciencia, entre las primeras ideas o planteamientos teóricos hasta su comprobación experimental o su aplicación, puede existir un intervalo de tiempo extenso hasta que las condiciones, en muchos casos tecnológicas, permiten dar el salto. Para los tensioactivos, desde que en 1836, DUMAS Y PELIGOT sintetizan el laurilsulfato sódico (SLS) habría de transcurrir un siglo, hasta que en 1930, se dispone de la tecnología para ensayar la síntesis en el ámbito industrial, produciendo al principio un SLS bastante impuro.

Las condiciones fueron creadas por el desarrollo de la petroquímica y por la situación económica durante la segunda Guerra Mundial. En este último período, en los años de la guerra, se interrumpen suministros y hay problemas de transporte, que provoca una escasez de grasas y aceites como el aceite de coco y palma. En Alemania se sintetizan ácidos grasos a partir de coque de carbón y de petróleo y se fabrican jabones con estos ácidos. Pero no sólo jabones, sino que se producen los detergentes sintéticos como alcohol laúrico y mirístico sulfonados y neutralizados con trietanolamina que comienzan a ser vistos, por la industria, como sustitutivos de los jabones.

Aunque en los primeros años se polemiza sobre cuál de los dos productos, jabones o detergentes sintéticos (con bases lavantes de aniónicos SLS) poseen propiedades más beneficiosas, el hecho es que la mayoría del mercado lo

acapararon los detergentes sintéticos dejando una pequeña parcela a los jabones que se mantiene hasta la actualidad. También es verdad, que se venden formulaciones que son mezclas de jabones y de sintéticos y que los jabones han evolucionado en la presentación de formulaciones como las de naturaleza líquida (jabones de potasio) (PRICE, 1995).

Son pues los años 30-40 cuando tiene lugar el nacimiento y desarrollo de la industria de la detergencia, con la aparición de productos que no sólo presentaban competencia directa con los jabones sino que aportaban nuevas propiedades. Así en 1947 ya se valoraban las cualidades bactericidas y tensioactivas de los compuestos catiónicos, aunque su alto coste no posibilitó su salida al mercado hasta entrados los años 50. También de la década de los 40, los tensioactivos no iónicos como los ésteres de ácidos grasos con glicoles y poliglicoles aparecen en el catálogo de la compañía Glyco.

Otro aspecto interesante de la Química Industrial de los tensioactivos es como consiguió crear productos específicos que produjeron cambios en los hábitos de higiene. Son prototipos de estos cambios los baños de espuma pero especialmente los champús y acondicionadores que se incluyeron de forma regular, varias veces por semana, en la higiene personal.

La revisión desde finales de los 40 hasta nuestros días de los nuevos tipos de tensioactivos y formulaciones, ya sólo en el campo de la cosmética, sería muy larga y alejada del carácter general de esta introducción. Simplemente se comentan las formulaciones de champús porque dieron lugar al desarrollo de tensioactivos catiónicos para el mercado de los productos de higiene personal.

Los champús deben además de poseer cualidades de lavado, incluir acondicionadores que tienen un efecto sustantivo sobre el cabello, lubricándolo y

creando una capa de protección por la interacción entre la carga positiva del tensioactivo y las proteínas del pelo. Así, los tensioactivos catiónicos son los que desempeñan esta función acondicionadora; si su cadena alquílica es corta tienen mayor poder bactericida y si es cadena larga, mayor poder acondicionador y menor irritabilidad por la baja solubilidad (NAN ZHANG, 1998). Los tensioactivos presentes en sus formulaciones tendrán una baja irritabilidad y serán no tóxicos por el riesgo potencial sobre los ojos; así se combinan tensioactivos anfóteros como la cocoamidopropilbetaína con otros de naturaleza aniónica.

Inicialmente el acondicionador estaba separado del champú en las formulaciones por la incompatibilidad de la mayoría de los catiónicos con los aniónicos. En los años 50, se usa como acondicionador el cloruro de dimetilbencilstearylamonio (cloruro de esteralconio) pero ya se proponen polipropoxicuaternarios para usar como acondicionadores en champús aniónicos. Seguidamente, en los años 60, 70 y 80 se proponen como acondicionadores, derivados catiónicos celulósicos, condensados de proteínas, cuaternarios monoméricos y poliméricos.

La importancia cuantitativa de los tensioactivos en la industria actual es grande al ser producidos por millones de toneladas en todo el mundo con el consiguiente impacto económico, no sólo para usos detergentes sino en numerosas aplicaciones que abarcan a muchos sectores de la industria. En Europa, se usan 70000 toneladas anualmente de tensioactivos catiónicos (CROSS Y SINGER, 1994) que representan menos del 10% de total de los tensioactivos (PORTER, 1991). Se trata de un mercado cambiante que además de investigar en nuevos compuestos (poliméricos, bio-surfactantes) oferta numerosas formulaciones y marcas según las diversas aplicaciones. NAN ZHANG (1998) hace una estimación de lanzamientos o

relanzamientos anuales de 300 marcas de productos capilares en el mercado japonés.

4. TENSIOACTIVOS CATIONICOS: PROPIEDADES Y QUÍMICA ANALÍTICA

Los tensioactivos catiónicos son los compuestos objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, así pues para comprender mejor su Química se profundiza en el estudio de sus propiedades y aplicaciones.

Además de disminuir la tensión superficial, los compuestos catiónicos poseen otra cualidad que los diferencia de los otros tipos de surfactantes, que es la sustantividad o capacidad de un compuesto para adsorberse a superficies orgánicas e inorgánicas.

El origen de la capacidad biocida de algunos compuestos catiónicos sobre todo cuaternarios, con numerosas aplicaciones en productos farmacéuticos, se encuentra en su disposición para la adsorción en organismos vivos. Se adsorben a las paredes de las células inhibiendo las funciones metabólicas y si la concentración del cuaternario es suficientemente grande provocan la muerte de la célula por rotura de la membrana (CHALMERS Y BATHE, 1979). Sus funciones acondicionadoras en el pelo y la piel que permite su uso en cosmética o de suavizante en tejidos como el algodón o la lana son otros ejemplos de adsorción a superficies orgánicas. Los tensioactivos catiónicos empleados en mayor amplitud como suavizantes son las sales de dialquildimetilamonio y las imidazolinicas con cadenas alquílicas largas (C_{18}) constituyendo el 66% de la producción de catiónicos (CROSS Y SINGER, 1994). La adsorción al tejido aumenta su hidrofobicidad y por tanto su facilidad de secado, disminuyendo su electricidad

estática. En el pelo, la carga positiva del catiónico interacciona con la carga negativa resultado del daño producido a la estructura de la proteína, creando una capa de protección que lo lubrica (NAN ZHANG, 1998).

La adsorción a superficies inorgánicas de metales o minerales silíceos da lugar a un conjunto de aplicaciones principalmente industriales que se apartan de las relacionadas con la detergencia y las aplicaciones farmacéuticas. Las aminas primarias son usadas como aditivo en el asfaltado de carreteras. Se adsorben en la superficie de la piedra desplazando al agua ocluida y sirven de puente entre ésta y el material bituminoso ayudando a una mayor cohesión entre los dos.

Las sales de alquilquinolinio e isoquinolinio, y las de trialquilbencilamonio se emplean como inhibidores de la corrosión, por ejemplo en baños de galvanizado contribuyendo a limpiar la superficie del metal y protegiéndola de la corrosión una vez terminado el tratamiento. En síntesis orgánica en dos fases, los compuestos cuaternarios actúan como catalizadores acelerando las reacciones.

En metalurgia, las aminas grasas, amidoaminas se usan en procesos de flotación de minerales y las sales cuaternarias de trialquilamonio y trialquilaminas metiladas en la extracción con disolventes de metales. En el primer proceso, el mecanismo es similar a los descritos en otras aplicaciones, adsorción a la superficie del mineral y su separación de éste, por flotación de los otros minerales que no adsorbe el tensioactivo. En el segundo actúa como un catalizador de transferencia de fase separando en disolventes como el queroseno, cualquier metal que sea capaz de formar un complejo con carga negativa. El cobalto es separado del níquel en una disolución rica en iones cloruros debido a que forma el complejo CoCl_4^- que es extraído por sales de trialquilamonio quedando el níquel en la

disolución. También se aplica este proceso de extracción en la producción de wolframio, uranio, molibdeno y vanadio.

En la tabla I-1 se resumen las aplicaciones más usuales de los tensioactivos citados anteriormente. Hay que reseñar que no se ha pretendido recoger todos los compuestos catiónicos del mercado, sino solamente los que se fabrican en mayor cantidad, detallando sus usos más extendidos para crear una visión general de la Química Aplicada de estos compuestos.

Tabla I-1. Aplicaciones más usuales de los principales tensioactivos catiónicos.

COMPUESTO	APLICACIONES
Cloruro de dialquildimetilamonio	Arcillas organofílicas
Bromuro de alquiltrimetilamonio	Catalizadores de transferencia de fase, bactericidas
Ionenos	Bactericidas, funguicidas
Metilsulfato de dialquilmetilimidazolinio	Suavizantes textiles
Óxidos de alquildimetilamina	Espumantes, antiestáticos
Cloruros de alquilquinolinio e isoquinolinio	Inhibidores de corrosión
Cloruros de alquilpiridinio	Suavizantes concentrados
Alquilamidas y alquilamidoaminas	Lubricantes, champús, componentes de detergentes
Cloruro de alquilbencildimetilamonio	Antibacteriano

La Química Analítica de los tensioactivos presenta dificultades en cuanto a que son productos que en su mayoría poseen cadenas homólogas e isómeros posicionales en su parte hidrófoba e incluso, cuando se trata de los etoxilados, en el grupo hidrofílico. Los pesos moleculares alcanzan valores superiores a los 200 sin contar con los de naturaleza polimérica y sobre todo con grupos sulfonatos, sulfatos y fosfatos que hacen de ellos compuestos poco volátiles, obstaculizando el empleo de algunas técnicas como la cromatografía de gases. Sin embargo se ha desarrollado un conjunto extenso de métodos de análisis que han permitido el

control en los procesos de fabricación y en los productos terminados y formulaciones.

Una forma estructurada de acercarse a su Química Analítica es seguir tres vías de diferenciación: tipo de tensioactivo, técnica de análisis empleada y matriz que lo contiene. Pueden ser usadas correlativamente pero el orden y la extensión en cada uno de ellos depende de la cantidad y calidad de la información que se necesite. Atendiendo a la naturaleza de los tensioactivos se hará hincapié únicamente en los compuestos catiónicos objeto de este trabajo. Las técnicas empleadas para su análisis van desde métodos volumétricos y potenciométricos hasta las técnicas cromatográficas, espectrometría de masas y la espectroscopía molecular.

La parcela que los métodos volumétricos mantienen, además de importante, está fundamentada en dos hechos: especificidad y rapidez con que suministran información química en análisis de rutina al igual que ocurre para otros muchos compuestos técnicos. Los análisis volumétricos para tensioactivos catiónicos están basados en una reacción específica ácido-base (figura I-3), reacción del tensioactivo catiónico susceptible de analizar con un tensioactivo aniónico (disolución valorante), comúnmente el laurilsulfato sódico.



Figura I-3. Reacción ácido-base típica de los análisis volumétricos de tensioactivos catiónicos.

Con esta reacción se obtiene una sensibilidad nada habitual en los análisis volumétricos puesto que el rango de concentración de las disoluciones valorantes varía entre 10^{-2} a 10^{-6} M muy alejada de concentraciones de 1 a 10^{-2} M utilizadas

en las volumetrías tradicionales. La principal limitación que presentaban, la obtención de patrones primarios, ha sido resuelta con la purificación de un SLS sintetizado a partir de la sulfonación del alcohol graso que ha sido previamente sometido a una destilación fraccionada para maximizar el contenido en el homólogo C₁₂.

Esta reacción ácido-base tiene la particularidad de que se produce en un sistema de dos fases, acuosa y clorofórmica y por tanto necesita de un indicador de transferencia de fase eficaz. La búsqueda del indicador que proporcionase una buena repetibilidad y reproducibilidad preocupó a los químicos analíticos, desde los años 50 en los que se propusieron el azul de bromofenol y el azul de metileno hasta los años 70 en los que se empleó un indicador mixto que contiene azul de disulfina y bromuro de dimidio.

De los primeros métodos planteados el más extendido ha sido el de EPTON, 1948 con indicador azul de metileno en medio ácido para evitar las interferencias de los jabones. El azul de metileno con naturaleza catiónica interacciona con el tensioactivo aniónico que sirve de valorante dando un compuesto de color azul que es más soluble en la fase orgánica pero en presencia del tensioactivo catiónico el catión del indicador es desplazado por éste. El punto final se visualiza cuando la intensidad del color azul del indicador es igual en la fase acuosa y en la clorofórmica. Además una visualización dificultosa con desviaciones entre operadores de hasta un 5%, está fuertemente influido por la longitud de la cadena del compuesto catiónico y por los equilibrios de reparto en la extracción de las sales en las dos fases.

El indicador mixto, cuando se aplica a compuestos catiónicos, tiene como base las reacciones del catiónico con azul de disulfina, para dar una sal soluble en

cloroformo de color azul y la del aniónico valorante con el bromuro de dimidio que rinde un compuesto de color rosa. En el punto final, el primer exceso del SLS de la disolución valorante (que ya ha reaccionado con todo el catiónico desplazando al indicador aniónico), da una sal soluble de color rosa en cloroformo con el indicador catiónico. Así la visualización del punto final se efectúa por el cambio de color de azul a rosa de la fase clorofórmica y el resultado de la valoración del catiónico se expresa como *materia activa catiónica*.

Pese a que con este método no se pueden valorar compuestos catiónicos de cadena corta la amplia aceptación queda ratificada al estar incluido en las normas internacionales *Organization for Standardization* (ISO) y *American Society for Testing and Materials* (ASTM) que sirven como referencia a la industria de tensioactivos. Se diferencian las dos normas en la precisión requerida para un mismo laboratorio y entre laboratorios: según norma ISO es de 1,5% y 3% (relativo) respectivamente y para la ASTM, <1% (absoluto) en ambos casos.

La otra disolución valorante alternativa al SLS, es el tetrafenilborato sódico (STPB) que al interaccionar más fuertemente con los compuestos cuaternarios permiten valorar incluso los de bajo peso molecular que presentan dificultades con SLS. Las principales desventajas son las de no encontrarse purificado como patrón primario y que sus disoluciones sólo son estables si se mantienen entre pH 9-10. Las valoraciones pueden tener lugar en una fase, con indicadores como la tetrabromofluoresceína o en dos fases con azul de bromofenol o naranja de metilo. Para este último caso, CROSS (1965) valora, en un amplio rango de pH de 3 a 13, tres grupos de cuaternarios: las sales de tetralquilamonio con los derivados bencílicos, un grupo donde el nitrógeno cuaternario está incluido en el grupo

aromático: piridina alquilada, quinoleína, isoquinoleína alquiladas y sales de bisguanidinio y un grupo de aminas no cuaternarias.

Las potenciometrías con electrodos selectivos de iones son la alternativa a las valoraciones en dos fases que aportan ventajas tales como un tiempo de análisis más corto y evitar el uso de disolventes peligrosos como el cloroformo. Se podría hablar de una variante automatizada de las volumetrías en fase acuosa y orgánica al estar fundamentadas en la misma reacción ácido-base. El electrodo consta de un material sensor, generalmente de una sal con parte aniónica y catiónica como el dodecilsulfato de tetrabutilamonio o de hexadeciltrimetilamonio, y de una membrana por la que se produce el intercambio de iones. Se han ensayado distintos materiales para la membrana: cloruro de polivinilo, nailon y silicona.

Estas potenciometrías son utilizadas para el cálculo de la concentración micelar crítica, además de la determinación principal de tensioactivos (catiónicos y aniónicos) en procesos de control industrial. Pero existen aplicaciones en matrices diversas, como el análisis de hexadecilpiridinio en matrices farmacéuticas (DOWLE y col.,1984; SHOUKRY y col.,1987). En el primero se compara, con buena correlación, los resultados obtenidos con la volumetría en dos fases y las potenciometría con electrodo selectivo para sales cuaternarias alquílicas, de alquilbenceno en patrones y en muestras reales (líquidos y polvo de lavado).

Para el análisis de catiónicos también se han utilizado otras técnicas instrumentales como las cromatográficas. La cromatografía de capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) ha sido empleada para la separación de distintos QUAT. MANGOLD y KAMMERECK, 1962 logran separar alquiltrimetil-dialquildimetil- y trialquilmetilamonio; MICHELSEN (1978) realizan análisis

cuantitativo con densitometría en cloruro de cetilpiridinio y miristildimetilbencilamonio; MATISSEK (1982) analizan formulaciones: champús, jabones y productos para el baño y OSBURN (1982) en matrices medioambientales de diestearildimetilamonio. Por último ARMSTRONG y STINE (1983) llevan a cabo una separación de catiónicos de otros tensioactivos aniónicos y no iónicos.

Cuando se emplea la cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) y para salvar la baja volatilidad de los compuestos, el análisis por GC ha recurrido a procesos de degradación o derivatización (conversión en otro componente mediante reacción química). Se han convertido compuestos cuaternarios (alquilbencildimetil, alquiltrimetil y dialquildimetilamonio) en sus aminas terciarias de partida (WARRINGTON, 1961) o en alquilaminas y olefinas (mediante la degradación de Hofmann) o en ácidos grasos, para aquellos compuestos catiónicos con grupo imidazol (TAKANO y TSUJI, 1983) o en ésteres metílicos para las amidas grasas (FRISINA y col., 1979) y en 1-olefinas, para los óxidos de amina (DEVINSKY y GORROD, 1989). Aunque algunos compuestos catiónicos se transformen en aminas, éstas también pueden presentar problemas de separación al adsorberse en la columna siendo más acusados en las aminas primarias que en las terciarias. De este modo algunos autores han propuesto, en la determinación de aminas grasas, soluciones para minimizar los efectos de adsorción mediante el empleo de fases estacionarias modificadas y sustituyendo el nitrógeno por el amoníaco como gas portador (ABDEL-REHIM, 1990). Si se trata de aminas primarias grasas pueden ser convertidas en dimetilaminas terciarias que son separadas más fácilmente (METCALFE y MARTIN, 1972).

En resumen, los métodos de análisis por GC de compuestos catiónicos posibilitan la separación de la serie homóloga y algunos de ellos son aplicados a

matrices de productos formulados: productos textiles comerciales (SUZUKI y col., 1986), productos capilares (SUZUKI y col., 1987) y de limpieza bucal (CHRISTOFIDES y CRIDDIE, 1982).

En el análisis por cromatografía de líquidos de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), es inevitable clasificar a los tensioactivos catiónicos en aromáticos, que pueden ser detectados con detector de ultravioleta o fluorescencia y no aromáticos que deben de ser determinados por detectores menos universales. Así, KAWASE y col. (1983) separan y detectan en UV la serie homologa de sales de imidazolina directamente y la comparan con los resultados obtenidos por GC con pretratamiento. LINARES y col. (1991) analizan cetilpiridinio en una formulación farmacéutica mediante detector de fotodiodos. En lo que respecta a la bibliografía de los tensioactivos catiónicos de alquilbencilamonio (BAA) que es bastante extensa y sobre todo para el cloruro de benzalconio (BAK) se detalla en el capítulo IV de esta Tesis Doctoral dedicado a su estudio.

Con respecto a los no aromáticos, también se usa la detección UV con modificaciones en la fase móvil que permitan que el catiónico sea detectado en ese intervalo del espectro: empleando un reactivo de par iónico aromático (LARSON y PFEIFFER, 1983) o gracias a detección indirecta (HELBOE, 1983) e incluso con transformación del analito mediante reacción después de la separación o reacción post-columna (KANESATO y col., 1987). NAKAMURA y MORIKAWA (1982) logran la detección simultánea de catiónicos no aromáticos (alquiltrimetilamonio) y aromáticos (alquilpiridinio y alquilbencildimetilamonio) junto a la serie homóloga de cada uno de ellos utilizando un detector de índice de refracción. CAESAR y col. (1989) usando también este detector determinan

dialquilmetilamonio en una formulación hidratante para la piel y JASPERSE (1988) analiza esteramida y oleamida a una concentración de 1000 mg L^{-1} en un nitrilo graso.

La detección conductimétrica ha sido aplicada en muestras ambientales por WEE y KENNEDY, en 1982 en aguas de río, separando mezclas de aromáticos (cloruro de esteralconio y hexadecilpiridinio) y no aromáticos (disebodimetilamonio y dodecildimetilamonio) y por GERIKE y col. (1994) al estudiar disebodimetilamonio en aguas de río, aguas residuales, suelos y sedimentos.

La fase estacionaria más frecuentemente empleada en la separación de cuaternarios es una gel de sílice funcionalizada con un grupo ciano que presenta interacción con el grupo funcional del QUAT aunque funcionalización con C_{18} y gel de sílice en fase normal también son válidas.

Asimismo se han empleado otras técnicas instrumentales como la espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS) que permite la caracterización de estructuras y de pesos moleculares. Para el análisis de compuestos como los tensioactivos catiónicos los modos más usados de producción de iones gaseosos son la ionización por electronebulización (*Electrospray*, ESI), ionización por termonebulización (*Thermospray*, TS) y bombardeo con átomos rápidos (*Fast Atom Bombardment*, FAB). NAN ZHANG (1998), en una revisión sobre la aplicación de MS a tensioactivos recoge el análisis de algunas sales de alquiltrimetilamonio y de un anfótero, la cocoamidopropilbetaína determinada conjuntamente con el catiónico a partir del cuál se forma, la amidoamina grasa.

La unión de técnicas cromatográficas y espectrométricas hace posible la separación, identificación y en ocasiones la cuantificación de compuestos

englobando una gran parte de los objetivos analíticos. El principal inconveniente técnico, la compatibilización del alto vacío necesario en MS con los eluyentes líquidos del HPLC, está siendo resuelto con diseño de nuevas interfases (DI CORCIA, 1998). Así LAWRENCE (1992) analiza un tensioactivo catiónico patrón: el dibodimetilamonio y una muestra comercial de un suavizante que lo contiene, en fase normal y con cloroformo, metanol, hexano y ácido acético como fase móvil. La espectrometría empleada, la de bombardeo con átomos rápidos, átomos de alta energía de argón o xenón, es muy adecuada para compuestos polares de alto peso molecular. Los resultados obtenidos permiten elucidar la composición de la serie homóloga y también se encuentran señales correspondientes a la presencia de trisebometilamonio.

Pero no solamente la espectrometría de masas puede ser acoplada con técnicas de separación como las cromatográficas sino que en la espectrometría de tándem (MS/MS) se acoplan dos espectrómetros resultando muy útil para la interpretación de espectros en mezclas complejas. El primer espectrómetro, con una fuente de iones que produce iones moleculares o iones moleculares protonados, tiene la función de separador de iones de los distintos compuestos de una mezcla. En el segundo se produce la fragmentación de los iones progenitores en iones hijos. Es habitual en la espectrometría en tándem, que los instrumentos lleven un filtro de masas de triple cuadrupolo entre las fuentes de iones y la detección. KALINOSKI (1994) en un resumen sobre espectrometría de masas aplicada a tensioactivos catiónicos, presenta el análisis de una imidazolina de sebo en tándem, con fuente de iones de bombardeo con átomos rápidos y triple cuadrupolo. El estudio de las señales masa/carga (m/z) obtenidas y su posterior descomposición indica la presencia de moléculas con dos cadenas alquílicas de

diferente longitud y de otras con idénticas cadenas alquílicas. También, LYON y col. (1984) recogen análisis de MS/MS con FAB para distintos tensioactivos catiónicos: aminas, óxidos de amina, cuaternarios etoxilados así como el estudio de los mecanismos de descomposición.

Una técnica espectroscópica como la resonancia magnética nuclear (*Resonance Magnetic Nuclear*, RMN) es también una herramienta útil en el análisis de QUAT usando la resonancia de dos núcleos: la de protón y la de carbono 13 (^{13}C). En la aplicación del RMN de carbono 13 a los QUAT se mide el desplazamiento químico del carbono en α al grupo funcional del catiónico, sea cuaternario, amino, imidazolina o amidoamina. Al ser el desplazamiento químico normalmente independiente de la longitud de la cadena alquílica que poseen los QUAT ($\text{C}_{12}\text{-C}_{22}$) resulta sencillo caracterizar muestras complejas. METCALFE (1984) realiza análisis cuantitativo de mezclas que poseen desde uno a tres grupos alquílicos de cadena larga: cloruro de sebotrimetil-, disebodimetil y trisebometilamonio. Las aminas pueden ser determinadas por RMN de protón y de ^{13}C y cuando poseen grupos etoxilados es posible el cálculo del número de moles de óxido de etileno con ^{13}C (MOZAYENI, 1979 ; MOZAYENI y col., 1984).

¿EC?

5. NUEVAS TENDENCIAS EN LA QUÍMICA ANALÍTICA DE LOS TENSIOACTIVOS: ANÁLISIS DE COMPONENTES RESIDUALES

La aplicación de la Química Orgánica de síntesis a escala industrial intensiva ha acarreado a lo largo de los años, problemas para la salud humana y el medio ambiente. Así en los primeros tiempos con el uso masivo de tensioactivos, se revelaron los peligros como la acumulación de espumas en cauces de ríos provocadas por la baja biodegradabilidad de los alquilbencenosulfonatos, lo que

motivó el estudio y la sustitución por otros productos más biodegradables. En la actualidad, la evolución de la Química Industrial de los tensioactivos tendrá que estar condicionada por la creciente concienciación de la sociedad demandando productos verdes para el medio ambiente y naturales para los productos cosméticos de contacto directo con el cuerpo humano.

En esta situación se refuerza el papel de la Química Analítica en dos vertientes: la información sobre la composición y calidad de los productos y en el análisis de los efectos que la producción y el ciclo de consumo de éstos, provocan en el entorno. El análisis de los componentes mayoritarios es una línea bien desarrollada y que va en crecimiento con el nacimiento de nuevas técnicas analíticas (electroforesis capilar o espectrometría en tándem). El término “componentes mayoritarios” se refiere, en este estudio en concreto, a los componentes tensioactivos que se encuentran en mayor proporción en las mezclas o formulaciones, coexistiendo con otros componentes minoritarios no necesariamente de naturaleza tensioactiva: secuestrantes, blanqueantes, colorantes, perfumes, etc.

Una nueva línea de investigación basada en el análisis de los componentes residuales de los tensioactivos parece acorde con los problemas sanitarios y medioambientales y las demandas existentes de la sociedad al sector industrial. Los residuales en los tensioactivos serían aquellos compuestos no deseables por su toxicidad o su inadecuación al producto final, fruto de reacciones secundarias o de reacciones cuya conversión no alcanza el 100%, provenientes fundamentalmente de las materias primas, del proceso y de las características de la planta donde se fabrican.

Los metales a concentraciones muy bajas, del orden de partes por millón, son unos de los residuales de naturaleza inorgánica que pueden encontrarse en los tensioactivos. Se originan por desgaste y ataque de las aleaciones de reactores, conducciones, destiladores, etc. donde se lleva a cabo la reacción de síntesis. Aunque también las materias primas pueden ser las responsables de su presencia en el tensioactivo. Es un ejemplo representativo, el mercurio aportado por el hidróxido de sodio usado como agente neutralizante. La presencia de metales puede provocar turbidez, precipitaciones y color a las disoluciones del tensioactivo. La técnica analítica, más habitualmente empleada para la detección de metales es la espectroscopía de absorción atómica en sus distintos tipos: de llama, de cámara de grafito para matrices más complejas o con generación de hidruros. PARDHAN Y OTAWAY (1975) determinan metales en jabones en polvo con altos niveles de fosfato con espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito. Otras impurezas inorgánicas que pueden hallarse en los tensioactivos pero que no suelen causar problemas de toxicidad son los cloruros, carbonatos y sulfatos.

Las impurezas de tipo orgánico son las más preocupantes y seguramente más difíciles de clasificar porque, en algunos casos se encuentran solamente en una reacción y en un producto en particular. Algunas de las más conocidas son: el 1,4 dioxano subproducto de la sulfatación de alcoholes etoxilados, las tetralinas, producto secundario en la alquilación del benceno para producir alquilbenceno lineal, óxido de etileno compuesto residual, a pesar de su alta reactividad, obtenido después de la etoxilación de tensioactivos no iónicos; las sultonas y sulfonas productos intermedios de síntesis en la sulfonación de olefinas y en la sulfonación de alquilbenceno con trióxido de azufre respectivamente.

Para los tensioactivos catiónicos, los compuestos residuales orgánicos más específicos son las aminas que no han reaccionado en los procesos de amidación, cuaternización, etc., las impurezas aromáticas procedentes de los agentes cuaternizantes y las nitrosaminas. Las dos primeras se examinarán en los capítulos siguientes. Las nitrosaminas son los productos de nitrosación de aminas secundarias y han sido caracterizadas como tóxicas y carcinogénicas.

De las aminas usadas en la síntesis de tensioactivos catiónicos es la dietanolamina, una amina secundaria empleada en la síntesis de dietanolamida de coco una de las más examinadas como posible precursor de nitrosaminas (DIALLO y col., 1996). Los métodos ensayados para su análisis han sido diversos: colorimétricos, polarográficos y cromatográficos (GC con detectores específicos, GC-MS y HPLC) (PORTER, 1991).

El estudio de los componentes residuales permitiría conocer detalladamente la composición del producto y no únicamente en lo que se refiere a su componente mayoritario. Desde un punto de vista del ciclo productivo, se puede analizar el componente residual y monitorizarlo en el proceso o en las materias primas. Esto afecta a cuestiones como los atributos que definirán la calidad del producto y de las materias primas, pautas sobre el mantenimiento preventivo de las máquinas o la mejora de procesos. Si se detecta y cuantifica el producto residual, es posible evitar su presencia en el componente mayoritario o cuando menos mantenerlo de una forma regular en límites tolerables.

La necesidad de tener controlados y minimizados posibles factores de riesgo, se pone de manifiesto en el estudio de RIEGER (1997) sobre la potencial irritación en la piel de los cuaternarios. Así, se citan las experiencias de Draize en un test de los años cincuenta, muy controvertido hoy día por la utilización de animales (se

ensaya en los ojos de los conejos) y refiriéndose a las pruebas con lauril sulfato sódico (SLS) dice “*diferentes lotes del mismo grado comercial provocan diferentes niveles de daño en el ojo*”. Por lo tanto, será preciso asumir la investigación de residuales con algún nivel de toxicidad, en cada proceso y asegurar su control, aunque su uso final no sea estrictamente farmacéutico (ZIMAN, 1999).

Siguiendo con un enfoque industrial, cuando se investigue sobre nuevos métodos analíticos de compuestos residuales, se debe procurar la consecución de métodos que sean rápidos, que no impliquen el uso de técnicas con instrumentación cara y que puedan adaptarse con facilidad al conjunto de métodos empleados para fijar las especificaciones de calidad del producto; amén de las características propiamente analíticas de precisión, reproducibilidad y exactitud.

Por último, desde el marco de un sistema de calidad implantado en la empresa, el estudio de los productos residuales significará una retroalimentación en la que se consideran las demandas de los clientes: productos poco agresivos en su utilización y con el medio ambiente, englobados en el concepto tan ambiguo y poco riguroso como productos naturales o productos verdes. Y no sólo eso, cuando un sistema de gestión de la calidad total (*Total Quality Management, TQM*) en el cual no sólo se persigue el mantenimiento de los estándares de calidad establecidos sino también la mejora, es aplicado a una empresa química, resulta factible que uno de sus objetivos de esta mejora esté dirigido a la obtención de un producto libre de potenciales componentes tóxicos (HOYLE, 1998).

6. BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-REHIM, M.; ASAN, M.; EHRSSON, H. (1990). Capillary gas chromatography of amines with ammonia as carrier gas. *J. High Res. Chrom.* **13**, 252.
- ARMSTRONG, D.W.; STINE, G.Y. (1983). Separation and quantitation of anionic, cationic and noionic surfactants by TLC. *J. Liq. Chromatogr.* **6**, 23.
- BRAVO JUEGA, A. (2001). *Innovación en pequeñas empresas españolas* en Medidas de apoyo a las PYMES Fundación Universidad de A Coruña, A Coruña.
- BROCK, W.H. (1998). *Historia de la Química*. Ed. Alianza Editorial Madrid.
- CAESAR, R.; WEIGHTMAN, H.; MINTZ, G.R. (1989). High-performance liquid chromatographic determination of alkylamidopropyl-N,N-dimethyl-N-(2,3-dihydroxypropyl)ammonium chlorides in aqueous solutions and cosmetic formulations. *J. Chromatogr.* **478**, 191.
- CARNEIRO M. La Voz de Galicia 25 julio del 2001. El futuro ya está aquí.
- CHALMERS, L.; BATHE, P. (1979). *Chemical specialites domestic and industrial* Vol (2) Ed. George Godwin, London.
- CHENEVAL, J.P. (1993). La toxicidad de los detergentes. *Mundo Científico* **33**, 216-223.
- CHRISTOFIDES, A.; CRIDDIE, W.J. (1982). Analysis of quaternary ammonium compounds by pyrolysis gas chromatography. *Anal. Proc.* **19**, 314.
- CÍRCULO DE EMPRESARIOS (1995). *Actitud y comportamiento de las grandes empresas españolas ante la innovación*. Madrid.
- CROSS, J.T. (1965). The identification and determination of cationic surface-active agents with sodium tetraphenylboron. *Analyst* **90**, 315.
- CROSS, J.; SINGER, E. (1994). *Cationic surfactants. Analytical and biological evaluation* (Surfactants Science series, Vol. 53), Marcel Dekker, New York.

- DEVINSKY, F.; GORROD, J.W. (1989). Pyrolysis gas-liquid chromatography of N, N-dimethylalkylamine N-oxides and their mixtures. *J. Chromatogr.* **466**, 347.
- DIALLO, S.; ZHOU, J.Y.; DAUPHIN, CH.; PROGNON, P.; HAMON, M. (1996). Determination of N-nitrosodiethanolamine as nitrite in ethanolamine derivative raw materials by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after alkaline denitrosation. *J. Chromatogr. A*, **721**, 75.
- DI CORCIA, A. (1998). Characterization of surfactants and their biointermediates by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **794**, 165.
- DOWLE, C.J.; COOKSEY, B.G.; OTTAWAY, J.M.; CAMPBELL, W.C. (1984). Development of ion-selective electrodes for use in the titration of ionic surfactants in mixed solvent systems. *Analyst* **112**, 1299.
- EPTON, S. R. (1948). New method for the rapid titrimetric analysis of sodium alkyl sulfates and related compounds. *Trans. Faraday Soc.* **44**, 226.
- FRISINA, G.; BUSI, P.; SEVINI, F. (1979). Gas chromatographic analysis of fatty acid amides in polyolefins. *J. Chromatogr.* **173**, 190.
- FUNDACIÓN COTEC PARA LA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA. 1997. *Documento para el debate sobre el sistema español de innovación. Libro verde.* Madrid.
- FUNDACIÓN COTEC PARA LA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA. 1998. Informe COTEC 1998. *Tecnología e innovación en España.* Madrid.
- GERIKE, P.; KLOTZ, H.; KOOIJMAN, J.G.A.; MATTHIJS, E.; WATERS, J. (1994). The determination of dihardenedtallowdimethyl ammonium compounds (DHTDMAC) in environmental matrices using trace enrichment techniques and HPLC with conductimetric detection. *Water Research* **28**, (1), 147.
- HELBOE, P. (1983). Separation and quantitative determination of long-chain alkyltrimethylammonium ions by reversed-phase ion-pair liquid chromatography using ultraviolet-absorbing counter ions. *J. Chromatogr.* **261**, 117.

HERNANSANZ, C. EL PAIS, 22 de abril 2001. Sección negocios. "Europa necesita su Nasdaq".

HOYLE, D. (1998). ISO 9000 Manual de sistemas de calidad. Ed. Paraninfo.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (INE). (1995). *Indicadores y proyecciones de gasto en I+D 1980-1995*. INE, Madrid en *El sistema español de innovación. Diagnóstico y recomendaciones*. COTEC Madrid, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (INE). (1997). *Encuesta sobre innovación tecnológica en las empresas 1994*. INE, Madrid en *El sistema español de innovación. Diagnóstico y recomendaciones*. COTEC Madrid, 1998.

JASPERSE, J.L. (1988). The determination of fatty amides by high performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**, 1804.

KALINOSKI, H.T. (1994). *Mass Spectrometry of cationic surfactants in Cationic surfactants: Analytical and biological evaluation*, Surfactant Science Series, Vol 53, Marcel Dekker, New York.

KANESATO, M.; NAKAMURA, K.; NAKATA, O.; MORIKAWA, Y. (1987). Analysis of ionic surfactants by HPLC with ion-pair extraction detector. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **64**, 434.

KARABORNI, S.; ESSELINK, K.; SMIT, B. (1996). El baile molecular del aceite y el jabón. *Mundo científico* **167**, 354.

KAWASE, J.; TAKAO, Y.; TSUJI, K. (1983). Homologous distribution analysis of imidazoline type cationic surfactants by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **262**, 408.

LARSON, J.R.; PFEIFFER, C.D. (1983). Determination of alkyl quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with indirect photometric detection. *Analytical Chemistry* **55**, 393.

LAWRENCE, D.L. (1992). The application of normal phase liquid chromatography/mass spectrometry by using coaxial continuous flow fast atom bombardment. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **3**, 575.

LINARES, P.; GUTIERREZ, M.C.; LAZARO, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D.; VALCARCEL, V. (1991). Determination of benzocaine, dextromethorphan and cetylpyridinium ion by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr.* **558**, 147.

LYON, P.A.; CROW, F.W.; TOMER, K.B.; GROSS, M.L. (1984). Analysis of cationic surfactants by mass spectrometry/mass spectrometry with fast atom bombardment. *Anal. Chem.* **56** (13), 2278.

MATISSEK, R. (1982). Thin layer chromatographic studies for identifying surfactants in shampoos, bubble bath preparations and soaps. *Tenside Deterg.* **19**, 57.

MANGOLD, H.K.; KAMMERECK, R. (1962). Analyzing industrial aliphatic lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **39**, 201.

METCALFE, L.D.; MARTIN, R.J. (1972). Gas chromatography of positional isomers of long chain amines and related compounds. *Anal. Chem.* **44**, 403.

METCALFE, L.D. (1984). Analysis of cationic surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **61**, 363.

MICHELSEN, E.R. (1978). Quantitative determination of quaternary ammonium bases (QAB) in water and waste water by thin-layer chromatographic. *Tenside Deterg.* **15**, 169.

MILWISKY, B.M.; GABRIEL, D.M. (1982). *Detergents analysis. A handbook for cost-effective quality control* Ed. Jhon Wiley and son, New York.

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGÍA (MINER). 1997. *Informe sobre la industria española 1996-1997. MINER. Madrid, en El sistema español de innovación. Diagnóstico y recomendaciones.* COTEC Madrid, 1998.

MOZAYENI, F. (1979). Qualitative and relative quantitative determination of primary, secondary, tertiary aliphatic amines by H-NMR. *Appl. Spectrosc.* **33**, 520.

MOZAYENI, F.; PLANK, C.; GRAY, L. (1984). Mixture analysis of fatty amines and their derivatives by carbon-13 NMR. *Appl. Spectrosc.* **38**, 518.

- NAKAMURA, K.; MORIKAWA, Y. (1982). Separation of surfactant mixtures and their homologous by high performance liquid chromatographic. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **59**, 64.
- NAN ZHANG. (1998). MS analysis of hair-care surfactants. *Cosmetics & Toiletries* **113**, 35.
- NEIDITCH, O.W. (1981). Minor additives in heavy-duty laundry detergents. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 162.
- O'LENICK, A.J. (2000). Triglycerides: A primary ingredient for making surfactants. *Cosmetics & Toiletries* **115** (9), 57.
- OSBURN, Q.W. (1982). Analytical method for a cationic fabric softener in waters and wastes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **59**, 453.
- PARDHAN, S.I.; OTAWAY, J.M. (1975). Determination of trace elements in soaps and phosphate materials by carbon furnace atomic-absorption. *Proc. Analyst. Div. Chem. Soc.* **12**, 291.
- PAVITT, K. (1984). *Sectoral patterns of technical change: towards a taxonomy and a theory*. Research Policy, vol 13 n°6, en FUNDACIÓN COTEC PARA LA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA. Documento para el debate sobre el sistema español de innovación. Libro verde. Madrid, 1997.
- PENACHO, J.L. (2001). *La innovación en la empresa* en Medidas de apoyo a las PYMES Fundación Universidade da Coruña, A Coruña.
- PESTAÑA, A. (2001). Veinticinco años de ciencia y técnica en España: institucionalización e infraestructuras. *Investigación y Ciencia*. **28**, 70-77.
- PERUTZ, M.F. (1997). El gabinete del doctor Fritz Haber. *Mundo científico* **180**, 564.
- PORTER, M.R. (1991). *Recent developments in the analysis of surfactants* (Critical reports on applied chemistry vol 32 Elsevier Science, England.
- PRICE, S.N.C. (1995). 50 years of surfactants. Cosmetic cleansing and emulsions. *Cosmetics & Toiletries* **110**, 49.

- SOENGAS NOVOA, A.M. (1999). El sector químico en Galicia. Presente y perspectivas de futuro. *Química e Industria* **46** (6), 47.
- RIEGER, M.M. (1997). The skin irritation potential of quaternaries. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **48**, 307.
- SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. (1994). Surfactant Science. *Cosmetics & Toiletries*. **109**, 33.
- SCHWEIKER, G.C. (1981). Detergent builders. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 170.
- SHOUKRY, A.F.; BADAWY, S.S.; ISSA, Y.M. (1987). Performance characteristic and regeneration of a tetraphenylboron (III) selective electrode. *Anal. Chem.* **59**, 1078.
- SUZUKI, S.; SAKAI, M.; IKEDA, K.; MORI, K.; AMEMIYA, T.; WATANABE, Y. (1986). Analysis of alkyltrimethyl- and dialkyldimethylammonium compounds by gas chromatography. *J. Chromatogr.* **362**, 227.
- SUZUKI, S.; MORI, K.; AMEMIYA, T.; WATANABE Y. (1987). Gas chromatographic method for the determination of 3-(trimethoxisilyl)propyloctadecyldimethylammonium chloride. *J. Chromatogr.* **387**, 379.
- TAKANO, S.; TSUJI, K. (1983). Analysis of cationic and amphoteric surfactants: III. Structural analysis of imidazolium cationic surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60**, 870.
- WARRINGTON, H.P. Jr (1961). Determination of homolog distribution of mixed alkylbenzyltrimethylammonium chlorides. *Anal. Chem.* **33**, 1898.
- WEE, V.T.; KENNEDY, J.M. (1982). Determination of trace levels of quaternary ammonium compounds in river water by liquid chromatography with conductometric detection. *Anal. Chem.* **54**, 1631.
- XUNTA DE GALICIA (1999). Estrategia gallega de innovación.
- ZIMAN J. (1999). La ciencia como ética. *El cultural*.

CAPÍTULO II

Justificación y objetivos

CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO II

Justificación y objetivos

En ocasiones, puede parecer que entre la ciencia básica y la aplicada se ha producido una escisión, dejando por un lado una ciencia básica recluida en el mundo académico, poco sostenible en términos económicos por la sociedad que la genera, y por otro una ciencia aplicada dominada por las pautas del mercado en la que se han perdido los criterios científicos. Aunque ésta es, sin duda, una expresión maximalista, resulta vital que se produzca una realimentación entre las dos.

Desde un laboratorio industrial, esta Tesis Doctoral nace con el ánimo de llevar a cabo una *“investigación híbrida”* (ZIMAN, 1999) que contemple aspectos referidos al ámbito de la Química Analítica y su incidencia en la Química Industrial gestionada con un sistema de calidad.

Los tensioactivos catiónicos, productos de síntesis industrial son el objeto de estudio que se enfoca intentando paliar algunos de los vacíos encontrados en la bibliografía, pero también integrándose en las nuevas tendencias que surgen, empleando en cualquier caso, medios técnicos que no supongan costes económicos elevados. Así el objetivo final será realizar un desarrollo de métodos orientados fundamentalmente al análisis de productos residuales indeseables por su irritabilidad o toxicidad.

En una visión más precisa y detallada del objetivo principal, se puede desglosar en los siguientes objetivos parciales:

- Aplicación de nuevas técnicas de separación como la electroforesis capilar al análisis de tensioactivos.
- Elaboración de métodos que permitan compatibilizar el análisis de residuales y compuestos principales de la matriz con características químicas muy diferentes entre sí, para de este modo lograr en un

determinado problema analítico el mayor número de respuestas en el menor número de operaciones sencillas.

- Obtención de métodos que requieran tiempos de análisis cortos sin menoscabo de parámetros analíticos como la sensibilidad, precisión, selectividad y límites de detección.

Algunos de los objetivos están directamente relacionados con aspectos industriales:

- Desarrollo de un control de proceso selectivo mediante la sustitución de métodos volumétricos por instrumentales con el fin de asegurar una calidad final del producto.
- Mejora de procesos gracias a la información analítica conseguida por la aplicación de los diferentes métodos desarrollados al estudio de cinética de formación de subproductos o de eliminación de residuales.
- Selección de materias primas adecuadas para lograr mejorar la calidad del producto final por medio de métodos que permitan diferenciar los distintos grados de pureza de los productos existentes en el mercado.

Específicamente, los compuestos sobre los que recaen los objetivos propuestos son los productos residuales amínicos como dimetilaminopropilamina (DMPA) en alquilamidoaminas, cloruro de bencilo y sus derivados en cloruro de benzalconio y trietilbencilamonio, alquilbencilados en cloruro de bencilo. La técnica usada para su análisis es la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), mientras que una nueva técnica de separación: la electroforesis capilar (CE) se aplica a dos tensioactivos catiónicos: el cloruro de benzalconio (BAK) y el de alquilbencildimetilamonio (BAA).

CAPÍTULO III

**Análisis de dimetilaminopropilamina (DMPA)
residual en alquilamidoaminas precursoras de
tensioactivos**

CAPÍTULO III. ANÁLISIS DE DIMETILAMINOPROPILAMINA (DMPA) RESIDUAL EN ALQUILAMIDOAMINAS PRECURSORAS DE TENSIOACTIVOS CATIONICOS

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	57
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA AMINAS POR HPLC. DERIVATIZACIÓN QUÍMICA Y AGENTES DERIVATIZANTES.....	59
3. AMIDOAMINAS: SÍNTESIS, MÉTODOS DE ANÁLISIS, APLICACIONES Y DERIVADOS	87
4. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS	92
5. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN	93
5.1. Consideraciones previas.....	94
5.2. Elección del agente derivatizante.....	95
5.3. Efecto del exceso de agente derivatizante	98
5.4. Efecto de la temperatura	101
5.5. Efecto de las condiciones del medio: disolvente y pH.....	103
6. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	105
6.1. Selección de las condiciones cromatográficas.....	105
6.2. Análisis cualitativo: análisis espectral	111
6.3. Análisis cuantitativo: precisión, rango lineal, límites de detección y cuantificación	112
7. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE DMPA EN MUESTRAS DE ALQUILAMIDOAMINAS.....	115
8. CONCLUSIONES	119
9. BIBLIOGRAFÍA	120

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Las alquilamidoaminas, consideradas como tensioactivos catiónicos, son productos intermedios de síntesis para otros tensioactivos, algunos de ellos como la cocoamidopropilbetaína (CAPB) intervienen en una amplia variedad de formulaciones para el cuidado personal. Además de este valor cualitativo, las miles de toneladas por año que se procesan en Europa, Estados Unidos y Japón motivan que la CAPB esté clasificada como el tensioactivo más importante de los llamados secundarios. La síntesis de las alquilamidoaminas transcurre a través de la reacción de un ácido graso o de un ester graso con poliaminas. El tipo de amidoamina que se estudia, la alquilamidopropilamina (cadena alquílica tipo coco o undecilénica) se forma por reacción de aceite de coco o ácido undecilénico con dimetilaminopropilamina (DMPA). La amidación se produce por el grupo primario (figura III-1), quedando el terciario como potencial centro activo para la reacción con monocloroacetato sódico, peróxido de hidrógeno y cloruro de bencilo formando una betaína, un óxido de alquilamidoamina, y un cuaternario respectivamente. De estos derivados, el más conocido en el mundo de la cosmética es la cocoamidopropilbetaína.

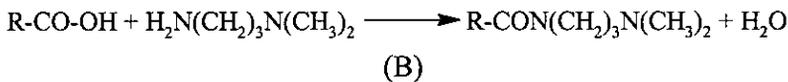
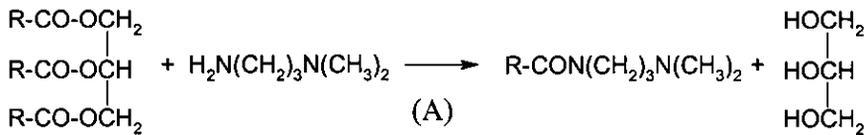


Figura III-1. (A) Reacción de formación de cocoamidopropildimetilamina (CAPA), (B) Reacción de formación de undecilamidopropildimetilamina (UAPA).

Para establecer un método de análisis de la DMPA en la síntesis de alquilamidoaminas puede describirse ésta en dos fases de acabado de la reacción: una primera, al final de la reacción de amidación, en la que los niveles de amina pueden llegar hasta un 1% puesto que se trabaja con un exceso de amina durante la formación de la amida; y una segunda fase de eliminación de los productos secundarios como la glicerina donde la DMPA quedaría a niveles inferiores de un 0,1%.

La determinación de la DMPA residual en alquilamidoaminas y derivados tiene un particular interés ya que la legislación relativa al manejo de sustancias industriales peligrosas estableció en julio de 1980 que los productos con nivel de aminas entre 1-10% serán considerados irritantes y con más de un 10% como corrosivos (WINKLER y col., 1988). Igualmente, estudios sobre las posibles impurezas contaminantes responsables de que la cocoamidopropilbetaína pueda producir reacciones de dermatitis de contacto alérgicas señalan como uno de las posibles causantes de las mismas a la DMPA (PIGATTO y col., 1995; DE GROOT y col., 1995; FOWLER y col. 1997).

La versatilidad de la cromatografía como técnica de separación puede posibilitar la determinación de una amina alifática de cadena corta en una matriz tensioactiva con grupos funcionales amino. Concretamente en este estudio, se emplea HPLC con detector de UV-visible, por ser la instrumentación disponible. Además se intentará que el método pueda ser aplicable como un método de rutina, sensible y extrapolable para los tensioactivos en los que la cocoamidoamina es usada como materia prima.

Después de todo lo expuesto, los objetivos que se proponen son los siguientes:

1. Desarrollo de un método de análisis para la determinación de DMPA por HPLC con detector de UV visible que incluya las siguientes características:
 - Tratamiento de la muestra sencillo y rápido para su detección en UV-visible.
 - Tiempo de análisis corto con el fin de que pueda ser usado como un método de rutina en el control de calidad industrial del producto final elaborado.
 - Detección de la DMPA con buena sensibilidad, un rango de linealidad adecuado y un límite de detección aceptable para la posterior aplicación.
2. Análisis de DMPA residual en precursores de tensioactivos catiónicos, las alquilamidoaminas.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE AMINAS POR HPLC. DERIVATIZACIÓN QUÍMICA Y AGENTES DERIVATIZANTES

En la Química Analítica, especialmente en el análisis orgánico, la determinación de aminas y sus derivados no es un problema secundario, posiblemente debido a que su presencia se extiende a una variedad amplia de matrices. Esta heterogeneidad ocasiona múltiples variantes analíticas para una misma cuestión y no se localiza en una sola área, sino que se extiende por sectores claves del desarrollo socioeconómico y en los que la interacción entre ciencia y sociedad es más patente: industrial, biomédico, farmacéutico, medioambiental y alimentario.

¿Por qué las aminas están presentes en matrices tan heterogéneas? La causa parece radicar en que se pueden originar en el medio natural como productos de la actividad microbiológica, actividad de descomposición de alimentos, etc. o como fruto de la intervención de la actividad económica en el entorno. Además en el organismo humano las aminas desempeñan un papel importante en el crecimiento y diferenciación celular. Su concentración será dependiente de la dieta o incluso actuar como un indicador de la presencia o evolución de enfermedades como el cáncer, la insuficiencia renal, la artritis reumatoide etc.

Es, en relación con el origen antropogénico, donde se puede explicar la amplitud y diversidad de matrices tan diferentes que contienen aminas. Así en la producción industrial se emplean como materias primas e intermedios en síntesis de colorantes, pesticidas, plásticos, tensioactivos, fármacos, inhibidores de corrosión, emulgentes, etc. En el ciclo del consumo humano, las aminas pasarán, en el caso más óptimo, a formar parte de residuos de incineración, o de plantas de tratamiento y directamente al medio ambiente en las aguas o al aire en aquellos puntos que delaten una actividad humana más incontrolada.

En resumen, desde el punto de vista analítico, el origen de la formación o producción de las aminas implicará matrices tan diversas como suero, orina, tejidos biológicos, antibióticos, muestras ambientales (aire, aguas subterráneas, de ríos y de mar), polímeros (resinas epoxi), tensioactivos, alimentos (pescado, vino y queso).

En este capítulo solamente se mencionarán aquellos métodos analíticos por HPLC, dado la extensa bibliografía encontrada para los compuestos objeto de estudio.

Algunas de las aminas alifáticas, aquellas con características físico-químicas de volatilidad y bajo peso molecular, se adaptan más a los requerimientos de una técnica como la cromatografía de gases que a la cromatografía de líquidos. Aunque la determinación a niveles bajos en GC presenta problemas de adsorción y descomposición en columna, en HPLC, la detección constituye un impedimento importante sobre todo cuando se realiza con un detector universal, como el UV-visible pero incluso para aminas con grupos aromáticos en las que la detección es posible, se encuentran problemas de separación y resolución. La solución que se recoge en un gran número de trabajos publicados, ha sido la derivatización, operación en la que a través de una reacción química o por un método físico se transforma el analito en otro compuesto o grupo de compuestos más accesibles, que éste, para el análisis por la técnica elegida (GC, HPLC o CE). Concretamente la derivatización que implica reacción, denominada derivatización química, consiste en una alteración de la estructura por un reagrupamiento de los átomos o por la adición de otra molécula. Los objetivos perseguidos afectan a dos de los aspectos fundamentales del análisis cromatográfico: la separación y la detección. En la cromatografía de gases, la derivatización intenta mejorar la separación, mientras que en cromatografía de líquidos, por la versatilidad de mecanismos que entran en juego, variables que pueden ser usadas, etc., es un recurso que se usa fundamentalmente para facilitar la detección.

Cuando la dificultad a resolver, se refiere a la separación, normalmente se trata de mejorar la resolución de compuestos que presentaban problemas de elución, colas, picos anchos, de tal forma que la parte de la molécula añadida, evita interacciones indeseadas entre el analito y la fase estacionaria o de la separación de analitos en una matriz compleja o con compuestos difícilmente diferenciables cromatográficamente.

Atendiendo a la detección, la derivatización asegura o aumenta la sensibilidad en la región ultravioleta, en fluorescencia o en un sistema electroquímico mediante los nuevos grupos funcionales y/o anillos aromáticos añadidos para compuestos que eran invisibles a los detectores espectroscópicos o presentaban baja absorción. Son casos paradigmáticos las aminas alifáticas de interés en este trabajo o la cuantificación de componentes muy diluidos en la matriz.

El agente derivatizante o reactivo usado para la derivatización del compuesto puede producir solamente cambios en las propiedades cromatográficas o la detección al analito. Pero obviamente ambas características pueden ser adquiridas en una sola derivatización. Aunque los casos más frecuentes son las adiciones de una parte de molécula con detectabilidad en UV o fluorescencia, algunos reactivos como el orto-ftaldialdehído (OPA) no presentan las características de detectabilidad que posee el derivado. También otras opciones son posibles, la derivatización puede ser única o existir varias reacciones secuenciales, obteniéndose uno o múltiples derivados respectivamente.

Una vez definido el por qué es necesaria la derivatización, con qué reactivos se lleva a cabo y qué tipo de derivados se producen, falta por explicar donde y cuando se realiza. Estas dos últimas preguntas generan dos clasificaciones muy utilizadas en la derivatización: ¿cuándo se realiza?. Si es antes de que se efectúe la separación se denomina derivatización precolumna y si es después de la separación, derivatización post-columna; ¿Dónde? puede que sea fuera del sistema cromatográfico y se habla entonces de derivatización *off-line* o dentro del sistema, en la llamada derivatización *on-line*.

La derivatización post-columna o continua tiene lugar, normalmente dentro del sistema cromatográfico si bien algunos autores como KRULL y col. (1994) mencionan el tipo de derivatización post-columna fuera del sistema o discontinua lo que implica que las etapas de inyección, separación, derivatización no están incluidas en el sistema cromatográfico. Si se centra la atención en las *on-line*, que son las que disfrutan de mayor entidad bibliográfica, se caracterizan primordialmente frente a las pre-columna (*on y off-line*) en que no afectan a la separación. Una de sus ventajas es que no necesitan un derivado estable ni conversiones del 100%, solo que la derivatización sea reproducible. Sin embargo la cinética de la reacción, que es la variable principal y que condiciona el diseño del montaje, tiene que ser muy rápida para que sea posible detectar el derivado en tiempo real, si bien el empleo de reactores en el sistema posibilita la ampliación de los tiempos de reacción. Existen tres tipos generales de reactores: *abiertos*, aplicados a reacciones muy rápidas, inferiores a 20s, *empaquetados*, con material inerte o que intervenga en la derivatización, para reacciones con tiempos entre 0,5 y 4 min y los *segmentados* para reacciones muy lentas, alrededor de 20 min. Otra clasificación de reactores puede establecerse en función de la fuente energética que desencadene la reacción: fotoquímicos, electroquímicos, térmicos o quimioluminiscentes que están dando buenos resultados en aplicaciones particulares (VALCÁRCEL y GÓMEZ, 1990).

En cuanto a los condicionantes que el agente derivatizante plantea en el sistema, se incluye el uso de bombas adicionales para su introducción, los disolventes de reacción han de ser miscibles con la fase móvil y un control exhaustivo tanto del exceso del agente derivatizante, ya que puede interferir en la detección, como de la eficiencia de mezclado de éste con el eluyente. Se precisan

para esta último requisito, diseños adecuados de los puntos de confluencia, entre el eluyente de la separación y el reactivo.

Con la automatización, aspecto muy favorable en la derivatización post-columna, se accede a través de los reactores post-columna a un control de la reacción con extracciones, ajuste de pH, adición de disolventes orgánicos, reacciones de hidrólisis básicas y reacciones previas a la considerada como de derivatización.

La derivatización pre-columna, interviene en la separación pudiendo mejorar la especificidad del analito y su comportamiento cromatográfico. Exhibe como ventaja frente a la post-columna que la cinética de la reacción no tiene unos límites tan estrechos y las condiciones pueden ser optimizadas según criterios donde la prioridad no sea necesariamente la velocidad de reacción. Los rendimientos no tienen que ser del 100%.

En la derivatización llevada a cabo fuera del sistema en discontinuo o *off-line*, aunque es importante que los disolventes de la reacción sean miscibles con la fase móvil, no es determinante porque se pueden introducir etapas de evaporación o extracción. El exceso de agente derivatizante ha de ser eliminado o separado del resto de componentes de la matriz. En general permite un espectro más amplio de derivatización pero requiere manipulaciones manuales que consumen tiempo de los operadores en el análisis. La mayoría de las aplicaciones usan derivatización precolumna en discontinuo, seguramente por la flexibilidad de condiciones de derivatización y de la cinética.

La derivatización pre-columna, dentro del sistema exige la compatibilidad del agente derivatizante y de los disolventes de la reacción con la fase móvil y no permiten derivados que precipiten o generen gases, no obstante se admiten etapas

de extracción que suelen ser automatizadas dentro del sistema. Esta derivatización elimina la dilución (que ocurre en un sistema *off-line*) ya que toda la muestra que se derivatiza está en el sistema y es separada y detectada.

Pese a que se está examinando la cromatografía de líquidos, el medio en que tiene lugar a la reacción no es obligatoriamente líquido. En los comienzos de la aplicación de esta técnica se trabajó en un medio líquido homogéneo pero en los últimos años conjuntamente con los disolventes habituales cobra importancia los medios heterogéneos donde el agente derivatizante es un sólido. Así habrá que distinguir reacción en fase heterogénea (reactivo sólido, analito líquido o gaseoso) y en fase homogénea (reactivo y analito líquidos).

En fase heterogénea, se trabaja con un exceso de agente derivatizante muy grande (en relación miles de veces superior al analito), que favorece la reacción (cinéticas más rápidas y rendimientos más altos), pero con la ventaja de que no es preciso eliminarlo como ocurría en fase homogénea. En la separación cromatográfica no hay picos del agente derivatizante lo que facilita el tiempo de optimización del método y posteriormente también el tiempo de análisis. Las concentraciones altas del reactivo que podrían provocar insolubilidades en fase líquida proporcionan una fácil detección en niveles de trazas del analito. Tampoco, la solubilidad del agente derivatizante constituye una dificultad a remediar para obtener los resultados perseguidos.

Algunas características del agente derivatizante que deben ser consideradas para su elección como la estabilidad en el tiempo del derivado formado parece que son mejoradas en fase sólida. Otras como la buena selectividad, con formación de menos subproductos, la posibilidad de que el reactivo puede ser usado muchas veces y después regenerado (lo que abarata el coste del análisis) deben ser

considerados desde un cierto relativismo o quizá desde una visión menos generalista (comparativa reactivo a reactivo). También, en fase líquida homogénea hay agentes baratos (salicilaldehído) y selectivos sin subproductos (muchos agentes de aminas primarias). Los reactivos en fase sólida, los soportes funcionalizados, no se comercializan por ahora, lo que requiere una etapa de preparación y un control de reproducibilidad que dificulta la puesta a punto de métodos.

Para revisar el análisis de aminas que hacen uso de la derivatización en HPLC, se tomará como hilo conductor, el tipo de agente derivatizante. Como es necesario convertir las aminas en compuestos detectables, el agente derivatizante debe poseer un grupo cromóforo junto a un grupo funcional que propicie una reacción de una forma rápida y cuantitativa con las aminas. La química de estos compuestos, sobre todo las aminas primarias y secundarias no tanto las terciarias, indica que formarán derivados con cloruros de ácidos, aldehídos y cetonas, cloroformiatos, isocianatos y tiocianatos. Se estudiará pues el análisis de aminas según el grupo funcional del agente derivatizante, sin menoscabo de analizar otras orientaciones como el medio de reacción o el tipo de detección (UV, fluorescente y electroquímica).

Los *cloruros de ácidos* será el primer grupo a examinar ya que constituye un grupo extenso de agentes derivatizantes que reaccionan con aminas primarias y secundarias formando amidas o sulfonamidas (si se trata del cloruro de sulfonilo) pero también pueden acilar algunos grupos alcohol e imidazol. De este grupo, el cloruro de dansilo (cloruro de 5-dimetilaminonaftalen-sulfonilo) uno de los agentes más comúnmente empleados proporciona derivados fluorescentes, ésteres sulfónicos con fenoles, y sulfonamidas con aminas primarias y secundarias. La

derivatización tiene lugar en un medio mixto, generalmente de agua-acetona con catalizador bicarbonato o carbonato e incluso borato, a temperatura ambiente o entre 30-60°C (BUSTO y col., 1994).

Los principales inconvenientes de este reactivo son tiempos largos en la etapa de derivatización, del orden de horas, unido a la necesidad de una etapa de extracción después de la formación del derivado y antes de su introducción en el sistema cromatográfico. HENRIKS-ECKERMAN y LAJOKI (1985) describen una aplicación típica en cuanto estudia cuatro de los miembros de la serie de aminas alifáticas, etilendiamina (EDA), dietilentriamina (DETA), trietilentretamina (TETA) y tetraetilenpentamina (TEPA) con un tiempo de reacción de dos horas y etapa de extracción.

La anilina y sus derivados (metil y cloro derivados) incluidos en el programa alemán sobre aguas 1985-89, previo enriquecimiento de la matriz en fase sólida, se analizan con dos métodos de derivatización con cloruro de dansilo a 45°C en tiempos largos desde 1 a 16 horas (GEERDINK, 1988).

Pero los tiempos se han ido acortando a valores menores de media hora en algunas aplicaciones. De este modo, BIONDI y col., en 1986 sistematizan un método de rutina para determinación de taurina (el ácido 2-aminoetanosulfónico) en una formulación farmacéutica, con un tiempo de 10 min a temperatura de 40°C, e incluso sin extracción, pero con un pretratamiento de la matriz. PRICE y col. (1992) presentan un método con tiempos de 15 min y etapa de extracción; con posterior separación en gradiente de 25 aminas pertenecientes a una muestra biológica.

GENNARO y col. (1988) realizan un estudio de la separación de los derivados dansilados de series de mono- di- y poliaminas, con distintas fases estacionarias y

mezclas de agua/metanol; sin descuidar optimizar algunas de las variables en la reacción como la cantidad de agente derivatizante, el tiempo y la temperatura (20 min a 60°C).

BUSTO y col. (1994) emplean en el análisis de aminas biogénicas en vinos, la derivatización con cloruro de dansilo (65°C, 25min) combinada con extracción en fase sólida para eliminar interferencias y como preconcentración.

SMITH y col. (1991) encuentran que el cloruro de dansilo es mejor agente que el sulfonato de naftoquinona (NQS) (90min a 55°C) para una matriz de aguas industriales que podía contener aminas de bajo peso molecular con otras que poseían grupos hidroxilo (2-amino-2-metilpropanol) y aminas con impedimentos estéricos como la hexandiamina.

En los últimos trabajos publicados que emplean cloruro de dansilo, se han obtenido buenos resultados con muestras de agua medioambientales (COBO y SILVA, 1999). En un sistema automatizado de extracción-derivatización mediante dansilación y análisis por HPLC con detección quimioluminiscente se analizan una serie de aminas primarias, desde la metil a la heptilamina. Los límites de detección son inferiores a los nanogramos.

Otro cloruro de ácido, el cloruro de benzoílo muestra las desventajas típicas de los cloruros de ácido: tiempos largos, etapas de extracción con disolventes orgánicos, formación de productos de degradación: ácido y anhídrido benzoico, benzoato de metilo (WATANABE y col., 1990). Su reacción con las aminas primarias y secundarias para la formación del derivado amídico transcurre a través de la reacción de Schotten-Baumann. Con la modificación de las condiciones de esta reacción, SOLON y col. (1987) consigue que, este agente derivatizante sea selectivo de grupos aminos cuando hay alcoholes presentes pero con extracción y

tiempos de reacción de cuatro horas. MORLEY y col. (1997) con cloruro de dinitro benzoílo (cloruro de benzoílo sustituido por dos grupos nitro que aumentan su absorbancia) determina aminas residuales en compuestos amínicos de carácter farmacéutico. Logran tiempos de derivatización de 25 min obteniendo un derivado soluble y estable en la mezcla de dilución y un exceso de reactivo hidrolizado que permite la inyección en el sistema sin extracción.

El cloruro de dabsilo (cloruro de 4-dimetilaminoazobenceno-4'-sulfonilo) necesita también tiempos de reacción largos, una hora, en LAMARRE y col. (1989), que cuantifican morfolina y sus productos amínicos de degradación en las aguas del ciclo térmico de una planta nuclear a niveles de concentración de ng mL^{-1} .

El cloruro de m-toluido es usado por CHEN y FARQUHARSON (1979) para el análisis de amoníaco, aminas aromáticas (bencilamina, anilina...), poliaminas (DETA, TETA), aminas hidroxiladas (monoetanolamina, MEA) con tiempos de reacción relativamente cortos, 10 minutos. El exceso de reactivo se destruye con etilendiamina (EDA) sin embargo necesita una extracción previa al análisis cromatográfico.

El cloruro de 2-naftalenosulfonilo, un agente derivatizante con una estructura química muy similar a la del cloruro de dansilo, ha sido aplicado en el campo biomédico (TSUJI y JENKINS, 1985) en el análisis de un antibiótico (espectomicina) y sus productos de degradación. Los compuestos analizados son multifuncionales con grupos amino secundarios e hidroxilos en la molécula que forman grupos ésteres y amidas con el agente derivatizante. Las variables que intervienen en la reacción (pH, catalizador, relación de reactivo, temperatura) son examinados detalladamente y finalmente optimizados para un tiempo de 20 min. En este caso,

también es preciso una extracción antes del análisis cromatográfico: la separación se realiza en fase normal y la cuantificación con patrón interno.

Como conclusión los cloruros de ácidos se han aplicado con éxito a la cuantificación y separación de aminas alifáticas y aromáticas con límites de detección del orden de nanogramos, sobre todo cuando el reactivo es fluorescente. La formación de derivados es siempre superior a los 10 min y con algunas matrices después de la derivatización, hay una etapa de extracción que como mínimo aumenta el tiempo de análisis. Por todo ello no parecen los reactivos más adecuados para un control de rutina.

Los *isocianatos e isotiocianato* de estructuras ($\text{RN}=\text{C}=\text{O}$ y $\text{RN}=\text{C}=\text{S}$) reaccionan con nucleófilos como las aminas por el carbono del grupo carbonilo para dar ureas y tioureas. Un isocianato con un grupo cromóforo como el fenilisocianato que rinde N,N-ureas sustituidas con las aminas, también sufriría adición con agua y alcoholes dando difenilureas y feniluretanos, respectivamente. En el estudio de estos agentes como formadores de derivados de aminas, es la reacción con agua la más problemática porque puede interferir en la derivatización al consumir grandes cantidades de agente derivatizante. Por ello, estos agentes derivatizantes, los isocianatos no parecen recomendables para una matriz que contenga agua como disolvente, ni para su introducción en el sistema cromatográfico, con una fase móvil cuya composición incluya agua. Por otra parte, el ataque de los alcoholes ha sido aprovechado para la destrucción del agente derivatizante aunque también se han utilizado aminas para este fin. Por último, hay que tener en cuenta en estas derivatizaciones que el reactivo no es inocuo sino que está considerado como irritante para los ojos y el aparato respiratorio.

El fenilisocianato es examinado por BJORKQVIST (1981) con 10 aminas alifáticas y una aromática usando dimetilformamida (DMF) con doble función, como disolvente de las muestras y como catalizador. El exceso de fenilisocianato es destruido con metanol. ANDERSSON y col. (1984) proponen, además del fenil-, el naftilisocianato en una determinación de aminas (n-propil- y alilamina) en aire sustituyendo la DMF por dioxano para eliminar impurezas y el exceso de agente derivatizante se elimina por reacción con butilamina.

Contrariamente al fenilisocianato, el fenilisotiocianato puede ser usado en muestras acuosas, el exceso no tiene que ser destruido y los derivados (las feniltioureas) son estables en un amplio rango de pH. SAHASRABUDDHEY y col. (1999) optimizan un método para aminas alifáticas primarias, secundarias y amoníaco en muestras medioambientales. La derivatización se realiza en un tiempo de 15 min a 40°C y las recuperaciones obtenidas en muestras de agua de ríos son buenas.

KLEIDERNIGG y col. (1996) proponen un isotiocianato, el diaminociclohexano basado en 3,5 dinitrobenzoil isocianato (DDITC) para la separación enantiomérica de compuestos farmacéuticos con aminas primarias, secundarias y aminoalcoholes o aminas con grupos hidroxilos en la molécula. Se describe la síntesis del reactivo en dos etapas y la separación en fase inversa de los derivados. Otro agente derivatizante usado en el análisis quiral de fármacos, el 2,3,4,6 tetra-benzoil-gluco arabinopiranosil isotiocianato (GITC) es comparado con el anterior presentando mejores parámetros cromatográficos excepto para aminas secundarias con grupos terbutilo.

La cloroetilnitrosourea es un agente antitumoral que en condiciones fisiológicas se descompone en un cloruro de alquilo y otro derivado con un grupo

isocianato. Esta particularidad es aprovechada por VANDENABEELE y col. (1998) para derivatizar aminas biogénicas (histamina, cadaverina..) con el isocianato, en condiciones medias de tiempo y temperatura (15 min, 75°C). Los derivados obtenidos son muy estables lo que puede ser ventajoso en análisis de control de calidad, para separar la derivatización de la medida cromatográfica. La optimización de la reacción está basada en análisis matricial (dos niveles por cada parámetro). Se hacen ocho experimentos con dos niveles para pH, temperatura, relación molar y tiempo encontrándose el pH como parámetro crítico de todos los que se optimizaron.

En el grupo de agentes derivatizantes, existen *agentes selectivos para aminas primarias* que son aquellos con grupos funcionales como aldehídos o cetonas que presentan una reacción cuantitativa y rápida formando derivados imínicos (C=N) solamente con las aminas primarias y no con las secundarias ni terciarias.

El *orto-ftaldialdehído (OPA)* en presencia de un alquilisotiol como el etanotiol y el mercaptotiol o sulfito forma con las aminas primarias, N-alquiltio-isoindoles y sulfonatos de N-alquiltio-isoindoles respectivamente. Estos derivados tienen la ventaja de que pueden ser detectados por absorción ultravioleta, fluorescente y electroquímica pero el mayor inconveniente es su inestabilidad. JACOBS (1987) usa el OPA-sulfito para una separación de alquilaminas (n=1-8) obteniendo también derivados más estables que los formados con tiol y evitando los malos olores de éstos. Ambos se hidrolizan a pH bajos, lo que restringe las condiciones cromatográficas a ensayar. MENTASTI y col. (1991) en una comparativa del OPA con otro agente derivatizante, el *4-cloro-7-nitro-benzofurazano* predice por cálculo computacional el comportamiento cromatográfico de aminas previo estudio de una serie homóloga. Además, aplica

las condiciones optimizadas a una muestra real, determinando con OPA aminas biogénicas en queso.

En los productos industriales, el análisis de aminas en resinas epoxi ha tenido una fuerte demanda: poliaminas del tipo $H_2N(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2NH_2$ y dimetilaminopropilamina, la amina objeto de estudio en este trabajo, han sido determinadas por HPLC, con agentes derivatizantes de aminas primarias como el *salicilaldehído* (SA). Esto ha permitido operar de forma selectiva con respecto a los grupos secundarios en los materiales poliméricos. BAUER y RITCHER (1981) determinan amina libre (DMPA y dietilentriamina) de las poliamidas en resinas epoxi por separación en cromatografía de gel permeación, con tiempos de retención de 16 horas y columnas de alto coste. WINKLER y col. (1988) con un quelato del salicilaldehído, el difenilboro-salicilaldehído o 2,2-difenil-1-oxa-3-oxonia-2-boratonaftaleno (DOOB) establecen un método de rutina para poliaminas con detección fluorescente y UV. Igualmente, con este reactivo SÁNCHEZ-RODAS y col. (1996) analizan dos aminas biogénicas y monoetanolamina, en vinos. Por la naturaleza de esta matriz se precisa una extracción de las aminas en un tiempo de hasta dos horas.

Otro aldehído usado es el *1-pirenoaldehído* (PyA), (ADACHI y ICHINOSE 1990). Es un aldehído aromático con características fluorescentes, que requiere condiciones de reacción extremas (130°C a reflujo) y tiempos de reacción largos (1 h) pero que sirvió para el estudio del papel fisiológico de las fenolaminas.

Asimismo, se describe el empleo de *acetilacetona*, que al igual que los aldehídos forma bases de Schiff con las aminas, por NISHIKAWA (1987) para la determinación de diaminas alifáticas a niveles de $ng\ mL^{-1}$ en muestras medioambientales de aguas. Pero el exceso de acetilacetona precisa de una etapa

de extracción siendo el tiempo de derivatización de una noche. Todo ello no es óbice para que el método sea calificado como método de rutina.

Hasta este momento los agentes derivatizantes se clasificaban según el grupo funcional que intervenía en la reacción con la amina. Otros criterios como el medio en el cuál tiene lugar la reacción permite englobar un número de aplicaciones muy específicas: la determinación de aminas alifáticas volátiles en aire. Este análisis cobra importancia en el campo de higiene y salud ya que estos compuestos pueden presentar efectos tóxicos por exposición, inhalación, ingestión o contacto. Alguna legislación como la americana (The American Conference of Governmental Industrial Hygienists) establece un valor límite umbral de $5-10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (JEDRZEJCZAK y GAIND, 1990).

El principal problema, que se ha tenido que resolver para el análisis de aminas en aire, ha sido conseguir un método de muestreo eficaz y no supeditado a su potencial adsorción en superficies sólidas y/o a su alta reactividad, sobre todo en reacciones de descomposición y oxidación. Esta cuestión fue resuelta con una derivatización en fase sólida que tiene lugar en la mayoría de los métodos, en el momento de hacer el muestreo, atrapando y estabilizando de esta forma la amina. Después, el derivado de la amina puede ser transportado desde el punto de muestreo hasta el laboratorio o almacenado sin pérdidas si fuese necesario. Antes de la inyección en el sistema cromatográfico, el derivado es eluído con un disolvente. La eficacia de la fase sólida en matrices de aire no resta valor al uso de este medio en matrices líquidas o susceptibles de solubilizarse.

Químicamente, el *reactivo en fase sólida* es un soporte inorgánico (sílice, alúmina...) o sino un polímero (poliestireno) al que están adsorbidos o unidos, mediante enlace covalente, compuestos funcionalizados con los grupos que dan

una reacción cuantitativa y rápida con el analito. Aunque en HPLC estos reactivos no son específicos para aminas, cuando se han aplicado a su análisis, los soportes se funcionalizan con los grupos comentados para la fase líquida (aldehídos, isocionatos, cloruros de ácido, etc.)

Se han recogido los siguientes trabajos bibliográficos ilustrativos de derivatización con reactivos sólidos de aminas en matrices líquidas o en aire. ANDERSSON y col. (1985), determinan etildiamina en aire con naftilisocianato adsorbido en Amberlita. El método presenta interferencias con agua y alcoholes.

CHOU y col. (1986) y JEDRZEJCZAK y GAÑID (1990) utilizan un anhídrido polimérico con un grupo o-acetilsalicil que condiciona una detección de tipo electroquímico en modo oxidativo o en UV. Los autores citados en primer lugar llevan a cabo la reacción de aminas primarias y secundarias en medio líquido en condiciones medias de tiempo y temperatura (20 min a 60°C) y realizando la detección con los dos modos posibles. Los segundos utilizan únicamente la detección ultravioleta, proponen una aplicación específica para la n-butilamina con UV (220nm) en aire con el que consiguen un límite de detección de 1µg. En general, los anhídridos poliméricos tienen la ventaja frente a otros agentes sólidos que son muy estables, selectivos y rinden escasos subproductos y además no se ven afectados por otros compuestos que contenga el aire muestreado.

GAO y col. (1989) empleando 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC) en soporte polimérico efectúan la derivatización dentro del sistema cromatográfico. La muestra de aminas volátiles (metil-, dimetil-, dietil-amina y cadaverina) en aire es adsorbida previamente en gel de sílice y después eluída y neutralizada en un tiempo de al menos una hora, en una etapa que los autores consideran de muestreo. Más tarde la derivatización se inyecta en una columna de reacción y

desde este momento hasta la cuantificación sólo transcurren 30 min. La automatización en columna representa una de las ventajas y la hidrólisis gradual del reactivo uno de los inconvenientes.

SIMON Y LEMACON (1987) plantean un procedimiento de determinación de 16 aminas (primarias, secundarias y poliaminas) en aire a distintas concentraciones, usando gel de sílice funcionalizado con m-toluilo. La separación propuesta de las aminas tiene lugar en dos modos, fase inversa con gradiente y fase normal.

Otro reactivo en fase sólida para determinar muestras de aminas: sílice que contiene un cloruro de ácido, el 3,5 dinitrobenzoilo (DNB-Cl) es sintetizado por ZHOU y col. (1991) en un proceso de cuatro etapas, optimizando la derivatización de aminas primarias y secundarias y finalmente aplican a la determinación de histamina en muestras de pescado.

Uno de los trabajos más completos encontrados en la bibliografía analítica para reactivos sólidos es el de BOURQUE y KRULL (1991a). Al igual que los anteriores emplean DNB-Cl sobre dos polímeros: poliestireno funcionalizado con benzofenona que rinde un reactivo polimérico benzofenona-DNB y etilvinilbenceno con un benzotriazol del que se obtiene un benzotriazol-DNB. La derivatización se ensaya fuera y dentro del sistema y la separación se realiza en fase inversa y normal con columnas C₁₈ y ciano, respectivamente. Se optimizó la derivatización considerando los parámetros de tiempo, temperatura, concentración del catalizador, pH y rangos de concentración para aminas, aminoácidos, aminas con grupos hidroxilos (etanolamina), ésteres metílicos de los aminoácidos y enantiómeros de la anfetamina. Este último compuesto fue cuantificado en muestras de orina.

En otro trabajo, BOURQUE y KRULL (1991b) emplean polímeros funcionalizados con los mismos reactivos del estudio anterior pero consideran que la selectividad no sólo es función del grupo químico sino también de la estructura física del polímero. El polímero examinado es poliestireno de dos tipos: macro y microporoso que poseen diferencias en características importantes de su estructura como el reticulado, el área superficial y la porosidad. La cinética de la derivatización es examinada frente a las distintas características físicas del sustrato y del disolvente empleado, con las muestras de cuatro aminas de distinto impedimento estérico. De los disolventes orgánicos el acetonitrilo es el más efectivo y cuando el medio es acuoso los polímeros microporosos reducen su eficacia en la derivatización mientras los macroporosos se ven menos afectados. El polímero con hidroxibenzotriazol-DNB con las características físicas optimizadas derivatiza nucleófilos débiles como alcoholes, tioles y fenoles en condiciones muy difíciles de mejorar en la bibliografía existente: temperatura ambiente y tiempo menor de 30 s.

La importancia del *9-fluorenilmetilclorofornato (FMOC)*, otro agente derivatizante radica en las numerosas matrices a las que ha sido aplicado. Reacciona con aminas primarias y secundarias a través del grupo clorformato ($-\text{CH}_2\text{-O-CO-Cl}$) para dar carbamatos con liberación de una molécula de ácido clorhídrico. También puede reaccionar con alcoholes (FMOC-OR) (liberando una molécula de ácido clorhídrico) aunque al ser menos nucleófilos que las aminas es necesario un medio básico adecuado que aumente su reactividad. Con agua, se obtiene un producto de hidrólisis, FMOC-OH, con liberación de ácido clorhídrico y dióxido de carbono. En su reacción con aminas se consiguen, en medio acuoso tamponado y a temperatura ambiente, derivados que absorben en UV y fluorescencia con sensibilidad alta y que presentan buena estabilidad (el tiempo de

derivatización es excelente, menor de 2 min). El exceso de reactivo constituye el principal inconveniente al formar productos de degradación (FMOC-OH y otros) que pueden causar interferencias y complicar la optimización de la derivatización y de la separación. Las soluciones aportadas en la bibliografía para este problema han sido: extracción con un disolvente orgánico y derivatización del exceso con un aminoácido.

Aunque es conocido desde los años 80, ha sido en los últimos años cuando han aumentado las publicaciones aplicadas a Química Clínica, Medioambiental e Industrial. Así, WICKSTOM y BETNER (1991), analizan tres aminas (putrescina, espermina y espermidina) y sus formas acetiladas en una aplicación clínica para pacientes con artritis reumatoide. En la reacción de derivatización encuentran que el pH es una de las variables críticas y que el ajuste de la concentración del FMOC es importante para el control de los productos de degradación. Debido a que en las extracciones se transfiere la mayor parte del producto de hidrólisis formado (FMOC-OH) proponen la eliminación del exceso derivatizándolo con un aminoácido, la glicina que eluye cerca del volumen muerto y no interfiere en la separación. Aunque la mejora es importante una pequeña parte de FMOC permanece sin derivatizar.

En química industrial, RODRÍGUEZ y col. (1996), determinan dimetilamina, con buenas recuperaciones, en aguas subterráneas cercanas a fábricas donde se producen efluentes con aminas. Estos autores eliminan el exceso de reactivo mediante una extracción con hexano previa acidificación con ácido acético. No obstante, en el cromatograma con detección fluorescente se atribuyen hasta tres picos a productos de degradación. Uno de ellos interfiere con el de la DMA y es por tanto necesaria una cuidadosa optimización de la separación. Se chequean

once posibles interferencias, aminas primarias, secundarias y aromáticas, aminoácidos y aminas biogénicas.

Con dos de las técnicas cromatográficas principales, GC/MS y HPLC, PIETSCH y col. (1996) derivatizan con *cloroformatos* aminas alifáticas (propil-, pentil-, hexil-, heptil y octil-aminas) y aromáticas (pirrolidina, morfolina, piperidina y piperazina) en medio acuoso para determinación en aguas de ríos y plantas de aguas residuales. La derivatización en cromatografía de líquidos se realiza con FMOC a temperatura ambiente en un tiempo: 10 min de reacción y 10 min para una extracción con ciclohexano de una muestra de 0,5 L. La separación se lleva a cabo en gradiente (agua/acetonitrilo), con columna termostaticada, en 40min, cuantificando con un patrón interno. La comparativa de las dos técnicas indica que los resultados obtenidos para los límites de detección y los rangos de linealidad son similares para ambas y que HPLC es más adecuada para aguas altamente contaminadas pero que GC/MS permite la identificación de todos los picos.

FAULKNER y col. (1991), proponen un agente derivatizante basado en las propiedades cromóforas del grupo antraceno y funcionalizado con un cloroformato obteniendo el 2-(9-antril) *etilcloroformato* (AEOC). La reacción de derivatización es rápida y a temperaturas bajas (36°C, 5 min) pero no tanto como el FMOC, sin embargo los derivados de aminas tienen una absorbancia mayor que los formados con él. La derivatización, que es dependiente del pH, produce tres productos debidos al exceso de agente derivatizante (AEOC sin reaccionar, el producto de hidrólisis y un producto de condensación de ambos) que no impiden la separación cuando se hace un gradiente. La optimización posibilita una aplicación muy

interesante en el campo biomédico: un análisis de aminas biogénicas en tejidos y fluidos de enfermos de cáncer.

CAMPÍS-FALCÓ y col. (1997) plantean una alternativa intermedia entre los reactivos poliméricos y las derivatizaciones en medio homogéneo líquido que ya había sido ensayada en el análisis farmacéutico. Se trata del uso de FMOC como agente derivatizante en cartucho y discos de extracción en fase sólida para el análisis de aminas y aminoácidos. Se estudia la cinética de la reacción en los soportes con las variables que intervienen: concentración del FMOC, pH, relación agente derivatizante/amina y tipo de material del soporte. Como desventaja, en comparación con los reactivos poliméricos, está la presencia de picos no identificados provocados por el material del soporte que pueden complicar la separación. Además, los rendimientos de los derivados para un grupo de aminas tienen valores bastante irregulares (44-169%). El método fue aplicado a una muestra real de feniletilamina en orina.

En la clasificación de agentes derivatizantes según el grupo funcional se ha encontrado reactivos que permitan detección fluorescente además de UV o electroquímica. Pero la fluorescencia es una propiedad que ofrece por lo general una sensibilidad elevada y un rango de linealidad más amplio y por tanto límites de detección más bajos. Sus limitaciones radican en que el número de reactivos a elegir es menor y además el medio de reacción tiene parámetros (pH, disolvente..) que influyen en la detección. Se usan dos longitudes de onda, de emisión y excitación a excepción de la detección quimioluminiscente que usa solamente la de emisión aumentando de esta manera, la sensibilidad. Por todas estas razones estos reactivos son muy adecuados en el análisis de trazas.

Además de los reactivos fluorescentes ya revisados (FMOC, cloruro de dansilo...) existe otro tipo de agentes derivatizantes utilizados por las ventajas que aporta la detección fluorogénica, los *halogenonitrobenzofuranos* y *luminarinas*. Los primeros tienen la desventaja de que causan hipersensibilidad y algunos de sus derivados son muy tóxicos y las segundas forman derivados en tiempos de reacción muy largos, que pueden ser superiores a una hora.

TOD y col. (1992) trabajan con *luminarina 1* y *2* cuya estructura es una quinolizino-cumarina y su grupo funcional, un éster de N-hidroxisuccinimida con él que reaccionan aminas primarias y secundarias. Las condiciones de derivatización van desde los 20 a los 180 minutos a temperaturas entre 50°C y 80°C, para relaciones molares luminarina/aminas de 10/1. Los límites de detección alcanzan los 100 fmol inyectados. Con una detección quimioluminiscente mediante una derivatización post-columna se rebajan estos límites de detección. Se aplica a la determinación de histamina y se compara con un método que usa OPA y mercaptoetanol que es más rápido pero menos sensible.

La *luminarina 9* es otro agente derivatizante fluorescente con estructura de quimilizino-cumarina pero con un grupo funcional tiocarbamato que es usado por ZHOU y col. (1994) para la determinación de N-nitrosoaminas de dimetilamina, isopirrolidina, prolina, dietanolamina. Al poseer estos compuestos una elevada toxicidad en distintas matrices: alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos, es prioritario en la optimización del método que los valores de sensibilidad sean los más altos posible. Los límites de detección están entre 0,4 y 1,0 pmol. El procedimiento de derivatización va precedido de una etapa de desnitrosación y finalmente se realiza una identificación de los derivados con la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

En el grupo de los *halogenobenzonitrofurazanos*, un agente derivatizante clásico es el cloruro de NBD (4-cloro-7-nitrobenzo-2,2,3-oxadiazol), compuesto no fluorescente que rinde derivados amínicos que sí lo son. Se emplea sobre todo en el análisis de aminoácidos secundarios, sustituyendo al derivatizante clásico de estos compuestos, el OPA, que no reacciona con grupos amino secundarios. Fue propuesto por GHOSH y WHITEHOUSE (1968) como “nuevo reactivo fluorogénico para aminoácidos y otras aminas” con medidas fluorimétricas de sus derivados en aminoácidos como la glicina, cisteína y aminas como la dimetilamina y la bencilamina. En 1973, FAGER y col., aplican el cloruro de NBD para la detección de aminoácidos con grupo terminal en péptidos con técnica fluorimétrica y con cromatografía de capa fina.

En HPLC, es interesante la mejora de JOHNSON y col. (1982) que trabajan con derivados del cloruro de NBD, los éteres formados con metanol y etilenglicol. Estos reaccionan con aminoácidos (alanina y prolina) observándose reacciones más rápidas con los éteres que con el cloruro y además con mejores rendimientos, menos reacciones secundarias y, lo más importante, es que los éteres posibilitan la reacción en medio acuoso o en mezclas de agua/acetronitrilo. A pesar de esto, los tiempos de reacción alcanzan los 50 minutos a 50°C pero las sensibilidades son del orden de pmol mL^{-1} .

Otro halogenobenzonitrofurazano, el fluoruro de NBD (7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol) es propuesto por WATANABE y IMAI (1982) como sustitutivo del cloruro, con un tiempo de derivatización bueno, 5 min a 60°C y límites de detección de fmoles. Separan ocho aminoácidos en 30 minutos, entre ellos la alanina, que es derivatizada más rápidamente por el fluoruro que por el

cloruro. Se apunta la posibilidad de determinación de los aminoácidos en fluidos biológicos.

Las *2-acil-3 oxazolonas*, otro tipo de agentes fluorescentes, acilan aminas al igual que alcoholes y tioles rindiendo amidas y ésteres en presencia de un catalizador. TAKADATE y col. (1989) sintetizan dos reactivos, acil-oxazolona con un grupo cumarina cuya diferencia en uno de los sustituyentes (dimetilamino frente un metoxi) les confiere distintas propiedades fluorescentes. La derivatización de una mezcla de aminas primarias se lleva a cabo en cloroformo a temperatura ambiente durante 90 minutos y la separación en fase inversa. El límite de detección para la bencilamina es de 19fmol/100 μ L.

Una oxoquinoxalina funcionalizada con un cloruro de carbonilo el *cloruro de 2-carbonilo 3,4 dihidro-6,7 dimetoxi 4 metil 3 -oxoquinoxalinas DMEQ-COCl*, es otro de los reactivos fluorescentes que reacciona con aminas y alcoholes. ISHIDA y col. (1989) lo aplican a la determinación de aminas primarias y secundarias en un tiempo de derivatización excelente, 30 s, a temperatura ambiente y con una estabilidad del derivado también muy buena (120 h). La concentración del DMEQ-COCl, la cantidad de catalizador y el pH son las variables optimizadas en la derivatización y la relación agua/acetonitrilo en la separación de n-butilamina, ciclohexilamina y hexilamina. Se comprueban los tiempos de retención y límites de detección de aminas biogénicas (del orden fmol) además de chequear posibles interferencias de compuestos biológicos.

MERALI y col. (1996) usan el *carbamato de N-hidroxisuccinimidil 6 aminoquinoilo* un agente derivatizante difundido para el análisis de aminoácidos que se vende comercialmente con el nombre AccQ.Fluor[®]. La derivatización de aminas biogénicas (espermina, putrescina y espermidina) se efectúa en una sola

etapa a 55°C en 20 min y el derivado formado es tan estable que puede ser analizado en tejidos biológicos 24 h después de su formación y separados en fase inversa en 40 min. Es un método entre 40 a 60 veces más sensible que los que utilizan el cloruro de dansilo y el ortodifitaldehído.

Se han propuesto otros reactivos para la derivatización de aminas como la *9-isotiocianoacridina* (SINSHEIMER y col., 1971 y DE LEENHEER y col., 1973) con detección fluorescente y el p-cloranil (SMITH y DAVIS, 1984) con detección en el visible que han sido aplicados en la cromatografía de capa fina y no en HPLC.

Pese a que como se ha podido comprobar las referencias bibliográficas de análisis de aminas con derivatización son muy extensas, existen algunos casos sin derivatización como la cromatografía iónica. Esta técnica que se destina en sus comienzos, en los años 70, para el análisis de aniones inorgánicos, se ha ido ampliando a principios de los 80 para cationes inorgánicos y orgánicos, y posteriormente al campo bioquímico. El mecanismo de interacción está basado en fuerzas electrostáticas y la separación cromatográfica es función de las distintas afinidades del analito por el material cambiador y a los equilibrios ácido-base y de complejos que se produzcan en la fase móvil. Pero otro tipo de interacciones como las hidrofóbicas, de exclusión etc. pueden intervenir en la separación. El modo específico de detección es el conductimétrico aunque no el único, puesto que la introducción de otros mecanismos distintos al puramente iónico: pares iónicos, exclusión iónica propició el uso de otros modos de detección como el fotométrico (UV, visible), fluorimétrico y amperométrico.

En la mayoría de los casos, la determinación de aminas se enmarca en el análisis orgánico, pero también aquí como prueba de lo endeble que, en Química, es la clasificación orgánico e inorgánico, hay muestras que contienen aminas e

iones inorgánicos (cationes y aniones) que necesitan ser separados y cuantificados simultáneamente y a las que se aplica de un modo preferencial la cromatografía iónica. La técnica más empleada es la cromatografía de cambio iónico con resinas intercambiadoras en las que se juega con mecanismos de cambio iónico, partición y también fases ligadas no polares. Otro tipo de cromatografía iónica, basada en la formación de pares iónicos con un reactivo disuelto en la fase móvil, ha dado buenos resultados en el análisis de aminas.

La cromatografía de pares iónicos tiene variables propias en la separación, además de las consideradas para la optimización en fase inversa, relacionadas, como era de esperar, con el mecanismo de interacción como son la longitud de la cadena de reactivo de par iónico y la naturaleza de la parte aniónica y catiónica de éste. Una de las ventajas que aporta la ausencia de pretratamiento o derivatización de la muestra, la hace particularmente útil para matrices medioambientales pero se emplea también para muestras industriales y alimentarias.

El mecanismo de retención para cromatografía de par iónico puede ser explicado a modo de una funcionalización dinámica de la fase estacionaria con el reactivo iónico. Así se propone un modelo de adsorción iónica de doble capa combinado con interacciones electrostáticas. La fase estacionaria apolar adsorbe el catión del reactivo y éste a su vez atrae al anión formando una bicapa eléctrica que está en equilibrio dinámico con el reactivo iónico que circula en la fase móvil. Los iones de la muestra no poseen normalmente absorción en UV pero la interacción con el reactivo las transforma en especies absorbentes a la longitud de onda óptima para la parte cromófora del reactivo.

A principios de los 90, se publican tres artículos de cromatografía en fase inversa con reactivo de interacción iónica. Así GENNARO y MARENGO (1988)

ensayan dos reactivos el salicilato de hexil y octilamina a una concentración de 0,005M en la separación de diaminas, poliaminas y aminas primarias de cadena corta. La retención explicada como una competición entre el ión de la muestra y el del reactivo por el anión salicilato es menor, al aumentar la cadena de la amina que forma la sal del reactivo, no siendo capaz de separar aminas con cadena alifática más larga que la del reactivo. La comparación con otros reactivos como el salicilato de sodio o el cloruro de octilamina sugiere que predominan las propiedades de afinidad sobre las fuerzas electrostáticas. En un estudio particular para la serie $(\text{CH}_3\text{-CH}_2)_n\text{-NH}_2$ ($n=1\text{-}5$) se observa que a pesar de sus semejanzas estructurales no presentan ninguna relación predecible en la retención.

En muestras ambientales (aguas de un lago), GENNARO y BERTOLO (1990a) analizan simultáneamente aminas alifáticas, aromáticas, nitritos y nitratos. Para conseguir la separación estudian el mecanismo de retención y ensayan diferentes reactivos de par iónico (ortofosfato de octil y butilamina y salicilato de octil y butilamina) en dos modos de detección: UV y conductimétrica. Los límites de detección para las especies amínicas y aniones se encuentran entre 0,1 y 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

GENNARO y BERTOLO (1990b) para muestras similares (contienen aminas y aniones) y con reactivos de par iónico: salicilato y ortofosfato de octilamina, consiguen límites de detección para las aminas alifáticas de 50 ng mL^{-1} . Se examinan aspectos sobre el mecanismo de la retención al conseguir mejoras en la retención de los aniones con cambios en la naturaleza del anión del reactivo, siendo estas mejoras insignificantes para las aminas.

Otros autores sin hacer uso de los reactivos de par iónico, han empleado la cromatografía de cambio iónico sin derivatización para la separación de mezclas

de aminas e incluso en matrices con cationes y aminas (VIALLE y col., 1991 y KROL y col., 1992). Los primeros separan una mezcla de 12 aminas, primarias, secundarias y terciarias con fase estacionaria de intercambio iónico y detección conductimétrica. Optimizan la separación usando la metodología quimiométrica para el estudio de las variables que influyen en la separación: naturaleza y cantidad del disolvente añadido a la fase acuosa, la naturaleza y la cantidad del catión del eluyente y la naturaleza del anión enlazado al catión eluyente y pH. Se aplica un diseño de experiencias factorial para la variación simultánea de estas variables después un estudio previo exploratorio para definir las variables experimentales y revisar las variables cuantitativas y cualitativas.

KROL y col. (1992) realizan una comparación entre columnas comerciales de intercambio iónico y una columna de resina intercambiadora de poli (butadieno-ácido maleico) sobre soporte de gel de sílice. El eluyente empleado contiene un agente complejante AEDT y ácido nítrico y así logran la separación de una mezcla de aminas (alquilaminas, alcanolaminas) y cationes de metales alcalinos y alcalinotérreos con detección conductimétrica. La retención tiene las características del mecanismo de intercambio iónico para alcanolaminas y alquilaminas de cadena corta y mezcla de interacción hidrofóbica y de intercambio iónico para aminas de cadena más larga. El método se aplica a muestras reales de una formulación farmacéutica y en aguas tratadas de una refinería de petróleo.

3. AMIDOAMINAS: SÍNTESIS, MÉTODOS DE ANÁLISIS, APLICACIONES Y DERIVADOS

Una de las vías de síntesis de las alquilamidoaminas tiene lugar mediante la reacción de desplazamiento nucleofílico del éster de un triglicérido por una

poliamina formando la alquilamidoamina y liberando la glicerina que era parte constituyente del triglicérido (figura III-1, pág.57). Las condiciones de reacción son más extremas que cuando la reacción se lleva a cabo con un ácido o un anhídrido, necesiándose temperaturas de 180°C y bajas presiones.

Para el caso particular de la síntesis de cocoamidopropildimetilamina (CAPA), la glicerina constituye un 9%, la amidoamina un 90-91% además de la DMPA residual. El aceite de coco sin reaccionar también puede estar presente aunque la reacción se produce con un exceso de DMPA que es destilado al final de la reacción y reciclado. La presencia de la glicerina en la amidoamina es tolerada e incluso puede ser beneficiosa en ciertas formulaciones. Si los requerimientos del posterior uso de la amidoamina lo estableciesen, puede ser reducida hasta valores de un 1% por separación en fase acuosa.

La composición alquílica de la CAPA es la responsable del carácter hidrofóbico de la amidoamina y sus cadenas principales están determinadas por el aceite de coco encontrándose los siguientes intervalos, $C_8 = 6-9\%$, $C_{10} = 5-7\%$, $C_{12} = 42-53\%$, $C_{14} = 14-21\%$, $C_{16} = 8-11\%$, C_{18} (esteárico), $=2-5\%$ y C_{18} (oleico) $=5-9\%$. Otra característica del aceite de coco es la insaturación en sus cadenas alquílicas que expresada como índice de yodo en $\text{mgI}_2/100\text{g}$ se encuentra entre 8-10. Si se trata por hidrogenación, para reducir la insaturación, se producen pequeños cambios en propiedades fisico-químicas como el punto de fusión o la solubilidad de la amidoamina procesada con un aceite de coco refinado (con insaturación) o hidrogenado. En el aceite de coco hidrogenado se reduce la cadena oleica a porcentajes menores de un 1% y se aumenta la esteárica (10-14%).

La CAPA sintetizada con aceite de coco refinado es un líquido viscoso a temperatura ambiente (20°C) que presenta un color de amarillo a anaranjado, cuya

intensidad depende de la pureza de las materias primas en cuanto a metales libres y productos de oxidación, así como de las condiciones de reacción. Otro factor a tener en cuenta, debido a que las poliaminas atacan ciertos metales formando quelatos, es la naturaleza de los materiales del reactor, condensador y el empleo de atmósfera de nitrógeno que preserva el color (FLOYD, 1990).

Con respecto a la síntesis a partir de un ácido graso como en el caso de la undecilamidopropildimetilamina (UAPA), se genera agua con la amidoamina que es separada sin dificultad de la amida. En las actuales formulaciones de tensioactivos se requieren compuestos con cadena undecilénica por sus posibles ventajas desde un punto de vista dermatológico.

Los métodos de análisis más habituales en el proceso de control industrial de las amidoaminas son los volumétricos que están basados en el carácter de base débil de las amidoaminas producido por el grupo amino (*Official Methods AOCS, 1973*). Estos métodos distinguen grupos amino primarios, secundarios y terciarios en tres determinaciones distintas. La basicidad total, debido a todos los grupos amino se valoran con un ácido (clorhídrico o perclórico) y se expresa como índice de amina total. La reacción con salicilaldehído, que reacciona con los grupos primarios y la posterior valoración con ácido clorhídrico permite obtener la basicidad de los grupos secundarios y terciarios. Por último, a partir de la reacción con fenilisocianato (reacciona con aminas primarias y secundarias) y valoración con ácido clorhídrico o bien de la reacción con anhídrido acético y valoración con ácido perclórico se conoce el índice de amina terciaria de los compuestos.

En el análisis volumétrico de la CAPA, vía determinación de índice de amina total con ácido perclórico e índice de amina terciaria por reacción previa con anhídrido acético, no sólo se valora la aminoamida sino también la DMPA

residual. Pero por cálculo indirecto se obtiene la DMPA libre ya que la diferencia entre el índice de amina total y terciaria indica los grupos primarios y éstos sólo pertenecen a la poliamina.

$$\% DMPA = (I_{Total} - I_{Terciaria})10^{-1} PM_{DMPA}$$

$$\% CAPA = (2I_{Terciaria} - I_{Total})10^{-1} PM_{CAPA}$$

donde I_{Total} y $I_{Terciaria}$ están expresados en meq g^{-1} .

Si se valora el índice de amina total con ácido clorhídrico y la terciaria, previa reacción con salicilaldehído, se llega al mismo resultado también por cálculo indirecto.

La glicerina liberada en la reacción de amidación con aceites grasos puede ser determinada por un método clásico volumétrico como es la valoración yodométrica. Los grupos hidroxilo de la glicerina reaccionan con peryodato sódico ($NaIO_4$) reduciéndose éste a yodato que libera yodo libre en presencia de ioduro. El yodo libre es valorado con tiosulfato sódico.

Los métodos volumétricos son útiles para el control de fabricación de la amidoaminas pero para conseguir una mayor selectividad y sensibilidad hay que trabajar con técnicas instrumentales. GRÜNING y col. (1997) investigadores de la *Th. Goldschmidt*, una de las compañías europeas que más se han distinguido por la investigación analítica en el campo de los tensioactivos, presentan un artículo muy completo sobre el análisis de cocoamidopropilbetaínas (CAPB). Uno de los métodos propuestos es el análisis por HPLC de ácidos libres en betaínas, procedentes de la síntesis de CAPA, en fase inversa, previa derivatización con 3-bromoacetofenona. Con respecto al análisis de amidoamina,

presentan un método semicuantitativo en capa fina y otro cuantitativo por HPLC. En este último, con una columna de intercambio iónico y eluyente tampón fosfato 0,02 M separan la CAPA en un sólo pico cromatográfico, sin distinguir los componentes de la serie homóloga de su cadena alquílica.

También, uno de los objetivos de este trabajo, el análisis de DMPA residual en amidoaminas es citado de forma breve en el artículo de GRÜNING y col., que fue coetáneo en publicación, 1997, con el de PRIETO y col. (que forma parte de la investigación ahora presentada en esta Tesis Doctoral). Se trata de un método por HPLC en fase inversa y derivatización con fenilisotiocianato con él que se detectan valores de DMPA entre 5 y 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en betaínas. En el apartado 7 de este capítulo, se comparan ambos métodos.

A pesar de que se ha resaltado en las alquilamidoaminas, su función de materias primas para tensioactivos secundarios, especialmente de las que son objeto este trabajo (CAPA y UAPA), conviene recordar que genéricamente son utilizadas en otras múltiples aplicaciones: agentes de flotación, emulsionantes en asfalto, aditivos para lubricantes y aceites, inhibidores de corrosión, aditivos de polímeros, textiles, etc. FLOYD (1990) recoge el uso de la amida esteárica y oleica de DMPA, la primera como inhibidora de oxidación de aceites incluso a altas temperaturas y en presencia de metales, y la segunda en formulaciones para el tratamiento de superficies metálicas con objeto de mejorar la resistencia a la corrosión.

En cuanto a las aplicaciones de los derivados tensioactivos de las alquilamidoaminas, los cuaternarios pueden ser usados como acondicionadores de cabello o suavizantes textiles, los óxidos de amina como estabilizadores de espuma, dispersantes y las betaínas como el complemento de tensioactivos

aniónicos para mejorar el comportamiento de las formulaciones (FLOYD, 1990; GRÜNING y col., 1997).

4. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS

- Cromatógrafo de líquidos Hitachi-Merck (Tokyo, Japan) equipado con un controlador de gradiente L-500, bomba 655A-12, detector de longitud de onda variable 655A, integrador cromatográfico D-2000 e inyector Reodyne con bucle de 20 μ L.
- Cromatógrafo de líquidos Waters equipado de sistema de gradiente cuaternario modelo W600MSDS, controlador de gradiente modelo WAT62700, inyector universal U6K modelo WAT062011, detector ultravioleta-visible con red de diodos modelo 991, con sistema de tratamiento de datos PDA.
- Columnas de sílice funcionalizada con cianopropildimetil son una LiChrospher-CN y Lichrosorb-CN de Merck, de dimensiones, 125 mm x 4,0 mm x 5 μ m y LiChrosorb-CN de 250 mm x 4 mm x 5 μ m.
- Jeringa Hamilton de 20 μ L.
- Matraces aforados de 10, 25 y 50 mL y pipetas de doble aforo 1, 2, 5 y 10 mL.
- Tubos de ensayo de vidrio Pyrex y tapón roscado.
- Filtros para filtrado de disolventes de 0,2 μ m de MSI Separations.
- Baño de glicerina.
- Termómetro de control de temperatura con escala de 0-180°C.

- Material fungible de uso corriente en laboratorio.
- Acetonitrilo y metanol (Merck) y agua (Scharlau) de calidad cromatográfica.
- Acetato sódico de BDH y ácido acético glacial de Panreac, ambos calidad para análisis.
- Salicilaldehído, para análisis, de Merck y dimetilaminopropilamina, >99%, de Aldrich.

5. REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN

Se ha optado para la determinación de la DMPA por la cromatografía de líquidos de alta eficacia con derivatización pre-columna off-line. Las razones están basadas en la naturaleza orgánica de la matriz, sin iones inorgánicos y en la instrumentación (HPLC-UV) disponible que impedía considerar otro modo de detección como pudiera ser el conductimétrico. Otra posibilidad como el uso de una cromatografía iónica con reactivo que presentase absorción ultravioleta implicaría un tiempo de acondicionamiento más largo que la fase inversa. Además debido a la utilización del equipo para métodos de rutina en fase inversa, el método iónico tendría que ser intercalado; habría por tanto que extremar las condiciones de limpieza del sistema cromatográfico y se aumentarían los tiempos de análisis en las jornadas de trabajo.

5.1. Consideraciones previas

Preparación de disoluciones patrón y muestra de alquilamidoaminas

Se preparan disoluciones concentradas de salicilaldehído (0,02 M) y dimetilaminopropilamina (0,08 M) en acetonitrilo o metanol. Estas disoluciones se diluyen a una concentración de $4 \cdot 10^{-3}$ M. Las muestras, amidoamina de cadena coco y undecilénica, se prepara en acetonitrilo o metanol a una concentración de 40 mg mL⁻¹.

con fe frecuencia 7

Procedimiento de derivatización

Se derivatizan muestras de alquilamidoaminas con DMPA residual de un máximo de 1% de la siguiente forma: en un tubo de vidrio Pyrex se mezclan 1 mL de amidoamina (40 mg mL⁻¹) y 2 mL de salicilaldehído (0,02 M). A continuación se introduce el tubo de vidrio en un baño de glicerina termostatzado a 60°C durante 4 min. Se enfría y se diluye hasta 10 mL en un matraz aforado antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

Condiciones cromatográficas

La separación del exceso de salicilaldehído, el derivado de DMPA, y un pico posiblemente de alquilamidoaminas se lleva a cabo en una columna ciano usando las siguientes condiciones isocráticas: 80% de metanol y 20% de fase acuosa y flujo de 0,8 mL min⁻¹. El eluyente acuoso se prepara con un 0,1M de acetato sódico ajustado a pH=5 con ácido acético. El volumen inyectado en el sistema es de 20 µL y la detección se realiza en el máximo de absorción del derivado, 218 nm.

5.2. Elección del agente derivatizante

A lo largo de la revisión de los agentes derivatizantes, algunos de los investigadores han justificado en cada caso, la elección del reactivo con argumentos que, en una primera estimación, pueden ser contradictorios o rebatibles cuando son comparados con los de otros autores. Por ejemplo, los que utilizan reactivos sólidos explican las ventajas de trabajar sin una etapa de eliminación de reactivo, pero la preparación de un reactivo sólido patrón reproducible puede conllevar problemas tan costosos como la eliminación del agente derivatizante.

En una lectura más profunda, lo que subyace en la elección parece que son los objetivos perseguidos en el desarrollo del método analítico. Es obvio que el objetivo principal es el análisis de aminas, pero con diferentes prioridades: sensibilidad (se emplea detección fluorescente), aplicabilidad (reactivos sólidos en aire), simultaneidad con el análisis de otros compuestos (cromatografía iónica), selectividad (de ahí la utilidad de muchos agentes selectivos de aminas primarias) etc.,

En general, todos los autores buscan una derivatización con una cinética rápida, derivados estables, sin productos de degradación, una derivatización con pocas etapas, con disolventes compatibles con los de la separación y con reactivos que no sean tóxicos.

Una vez elegida la técnica de derivatización, hay que seleccionar un reactivo que transforme la amina en un derivado que absorba en el UV-visible y que se pueda separar cromatográficamente. En el análisis de tensioactivos, existe un método volumétrico tradicional y estandarizado en normas internacionales

(*Method Tf 2a-64 T ACS, 1973*) que usa el salicilaldehído como agente selectivo para las aminas primarias en mezclas que contienen primarias, secundarias y terciarias de productos grasos precursores de tensioactivos. El salicilaldehído es un compuesto con un grupo aromático, con un grupo funcional aldehído, que permite la detección en UV-visible y que actúa como agente selectivo de aminas primarias. Es en consecuencia un potencial agente derivatizante que ya ha sido aplicado por BAUER y RITCHER en 1981 para el análisis de DMPA en resinas, además es barato y no tóxico.

Inicialmente, la matriz, la alquilamidoamina, va a contener DMPA en valores altos, hasta un 1% por lo que la sensibilidad no será el parámetro más crítico. El estado líquido de la matriz con buena solubilidad en los disolventes usados en fase inversa (acetonitrilo y metanol) facilita la detección en fase homogénea. Por otra parte, los reactivos sólidos implicarían un trabajo de síntesis y caracterización que excede los recursos de un laboratorio de control de proceso de una planta industrial.

El método a desarrollar debe aplicarse como de rutina, por consiguiente tanto el tiempo parcial de derivatización como el total del análisis (derivatización y separación) se fijan como parámetros prioritarios. Los cloruros de ácido con un uso muy extendido en la bibliografía no serían los más adecuados por su cinética lenta y su derivatización con varias etapas. El FMOC, uno de los reactivos con cinéticas más rápidas, da lugar a productos de degradación que pueden ocasionar tiempos de separación largos. El fenilisotiocianato posee tiempos de derivatización medios y el OPA-sulfito, con derivados estables, presenta una reacción de derivatización que se realiza con medios tamponados muy dependiente del pH.

Finalmente se ha elegido el salicilaldehído como agente derivatizante para desarrollar un método de rutina que posibilite la determinación de DMPA en alquilamidoaminas y su posterior aplicación a óxidos de amina y betaínas. La reacción del salicilaldehído tiene lugar a través del grupo primario de la DMPA con una adición nucleófila al grupo carbonilo rindiendo en principio una α -hidroxilamina. Ésta sufre una deshidratación espontánea de una molécula de agua y forma una imina, $(R_1-N=CH-R_2)$ llamada también base de Schiff (figura III-2), en honor al químico alemán Hugo Schiff que en 1864 descubrió esta reacción de especial importancia en procesos biológicos. La alquilamidoamina posee un grupo amino terciario que no reaccionará con el salicilaldehído, así que éste será selectivo con la amina residual de la matriz.

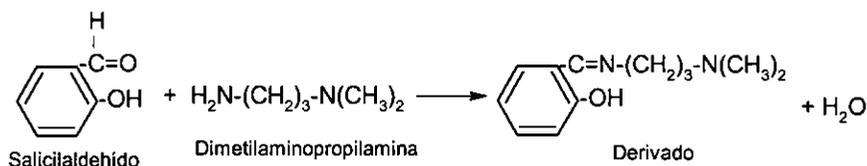


Figura III-2. Reacción de derivatización entre la DMPA y el SA.

En todos los procesos de derivatización precolumna, se intenta que la reacción cuantitativa se desarrolle lo más rápidamente posible para que esta etapa no grave en demasía el tiempo total del análisis. Para ello se optimiza la reacción seleccionando las condiciones que aceleran su cinética. Así se ensayan los factores propios de las derivatizaciones homogéneas como: el exceso de uno de los reactivos, el agente derivatizante, la temperatura, el pH y el disolvente del medio de reacción.

5.3. Efecto del exceso de agente derivatizante

Para evaluar la efectividad de los factores ensayados en la cinética, se usa como criterio general en toda la bibliografía analítica, la estabilización del pico del derivado en el tiempo. También se pueden usar otras estrategias como la medida cuantitativa del agente derivatizante consumido, cuando el exceso añadido es pequeño y se cuantifica en un rango lineal, e incluso la determinación del derivado frente a un patrón puro comercial o sintetizado, purificado y analizado en el laboratorio de análisis. Esto además permite estimar el rendimiento de la reacción que por otra parte no tiene que ser del 100%. En el trabajo que aquí se presenta se utiliza la estabilización del derivado con seguimiento cualitativo del agente derivatizante para los excesos más pequeños.

El efecto del exceso de reactivo en la cinética se determina comparando una relación equimolar de SA/DMPA 1:1 frente a excesos de 2:1 y 10:1. En la figura III-3 se representa el área del derivado frente al tiempo para las distintas relaciones molares. Se consigue un notable aumento en la velocidad de reacción con 80 min frente a 15 min, cuando el exceso del reactivo pasa de 1 a 10.

Se se de seguir el segun. cualitativo

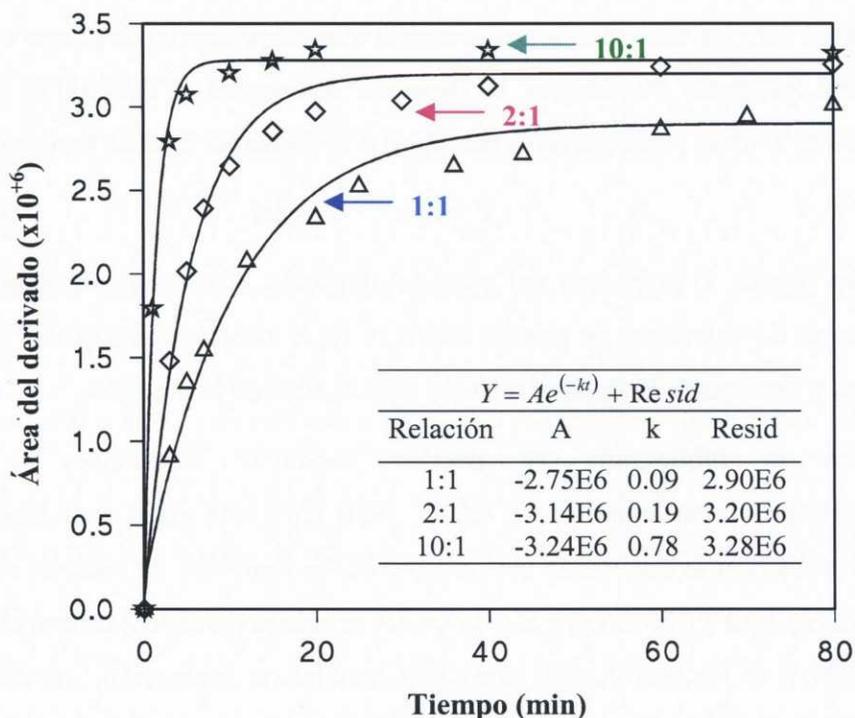


Figura III-3. Influencia del exceso de reactivo (SA) en el tiempo de derivatización de DMPA en acetonitrilo y a temperatura ambiente.

Además, de la información de tipo cinético, la gráfica proporciona una medida de la sensibilidad, indicada por los valores de área a los que tiende a estabilizarse el derivado. Se observa que se obtiene una mejora muy significativa de la relación equimolar 10:1 frente a las otras dos ensayadas. Por otra parte, en la relación 1:1 aún al final de la cinética, sobre 80 min detectan valores residuales de salicilaldehído. De las dos relaciones con exceso la 2:1, presenta rendimientos ligeramente más bajos y mayores tiempos de derivatización que los obtenidos en la relación 10:1.

Los resultados experimentales resultantes del seguimiento de la cinética se ajustaron para los tres casos a una ecuación monoexponencial de primer orden con residual, producto de integrar la ecuación diferencial $d[Y]/dt=k[Y]$ entre los límites de $Y=0$ (al principio de la reacción) e $Y=Resid$ (al final de la reacción)

$$Y = A e^{(-kt)} + Resid$$

en donde, Y es el área del pico del derivado, A es una constante, k es la constante de velocidad de primer orden, e es la función inversa del logaritmo natural y finalmente $Resid$ es el área del pico al final de la reacción.

En la bibliografía se pueden encontrar relaciones de agente derivatizante/amina superiores a 250:1, pero para este estudio el límite viene determinado por la separación cromatográfica del derivado. Se prueban relaciones molares de 50:1 y 100:1, pero el pico de SA se solapa parcialmente con el pico del derivado y es necesario, para conseguir una buena separación, incrementar el porcentaje de metanol en la fase móvil al 90%. En estas condiciones los picos se ensanchan demasiado y se pierde resolución así que *se eligió la relación 10:1 para la optimización del resto de las variables consideradas.*

En la figura III-4 se muestran los cromatogramas correspondientes a las relaciones agente derivatizante/amina ensayadas.

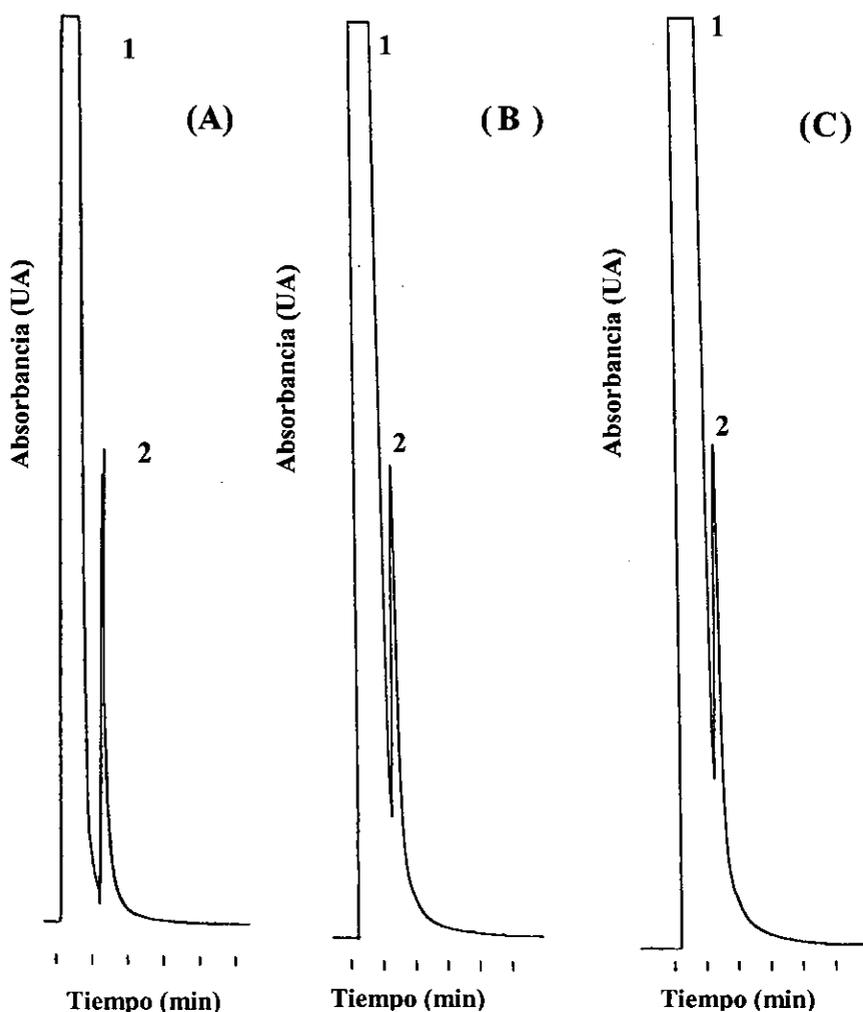


Figura III-4. Cromatogramas obtenidos de la derivatización de DMPA en acetonitrilo con exceso de agente derivatizante para las relaciones molares: (A) 10:1, (B) 50:1 y (C) 100:1. 1. Salicilaldehído, 2. Derivado de DMPA.

5.4. Efecto de la temperatura

Con objeto de acortar el tiempo de derivatización se examina, manteniendo la relación SA/DMPA en 10:1, el efecto de la temperatura sobre la velocidad de

reacción a 22°C (temperatura ambiente), 40, 60 y 80°C (figura III-5). Los resultados, ajustados como en el apartado anterior a una ecuación cinética de primer orden muestran que a las temperaturas más altas ensayadas, la constante de velocidad es superior al triple de la que rige la ecuación a temperatura ambiente. Consecuentemente, la estabilización del pico cromatográfico a partir de 60°C se lleva a cabo más rápidamente, aproximadamente en 3 min.

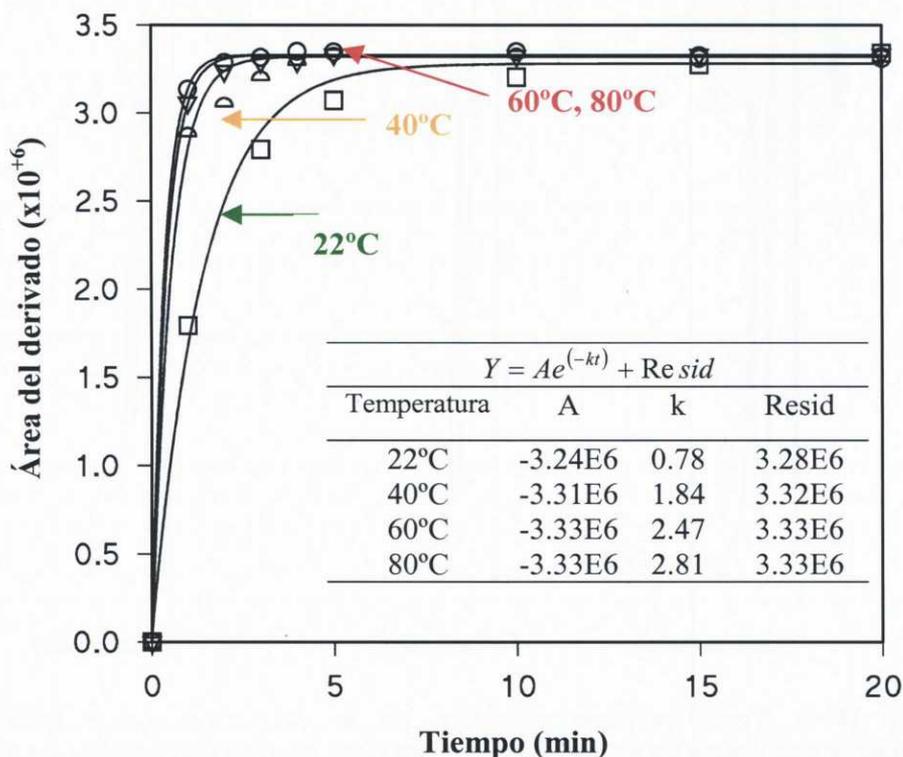


Figura III-5. Influencia de la temperatura en el tiempo de derivatización de DMPA para la relación 10:1 en acetonitrilo.

El aumento de la temperatura de 60°C a 80°C apenas afecta a la mejora del tiempo de derivatización, en un proceso en el que, además del estudio de la

cinética, es necesario un cierto margen de seguridad con respecto al tiempo elegido. En lo que se refiere a la sensibilidad, en los ensayos realizados no se contemplaron aumentos notables en el área del pico comparativamente con la obtenida a temperatura ambiente.

Así finalmente, para relación 10:1, se elige 60°C como temperatura de reacción y un tiempo de reacción de 4 min, condiciones que se adoptan como finales cuando el disolvente empleado es acetonitrilo.

5.5. Efecto de las condiciones del medio: disolvente y pH

Se evalúa el efecto del disolvente en la cinética debido a las características de solubilidad de las matrices en las que se pretende aplicar el método. Solamente, la cocoamidopropilamina muestra diferencias de solubilidad cuando la cadena alquílica está hidrogenada o presenta su insaturación natural (7-10 cg I₂/100g), o también si posee la glicerina liberada en la reacción o si ésta fue parcialmente eliminada. Para el caso en el que se produzcan menos manipulaciones (cadena insaturada y glicerina en la matriz) el acetonitrilo es un buen disolvente que al mismo tiempo es compatible con las fases móvil y estacionaria usadas en la separación cromatográfica.

Pero en amidoaminas con menos subproductos para mantener las concentraciones de trabajo sería necesario buscar un sustituto para el acetonitrilo así como para las cocoamidobetaínas que no son solubles en éste. Teniendo en cuenta que el primer requisito a cumplir por el disolvente de la derivatización es que no presente incompatibilidad con el sistema cromatográfico (problemas de miscibilidad, solubilidad..), parece que el disolvente orgánico de la fase móvil puede ser un buen candidato. El metanol solubiliza las betaínas y las amidoaminas

purificadas así que se probó cómo afectaba su presencia a la reacción de formación de la base de Schiff.

A partir de la relación molar 10:1 seleccionada, se examina la velocidad de reacción en medio metanol a temperatura ambiente y a 60°C (el metanol tiene un punto de ebullición a 64,5°C). Los datos experimentales representados en la figura III-6, ajustados a una ecuación monoexponencial con residual, indican un tiempo de derivatización de 3 min a 60°C y 15 min a temperatura ambiente. Por lo tanto si la derivatización transcurre en metanol, las condiciones finales serán 10:1, 60°C y 4 min.

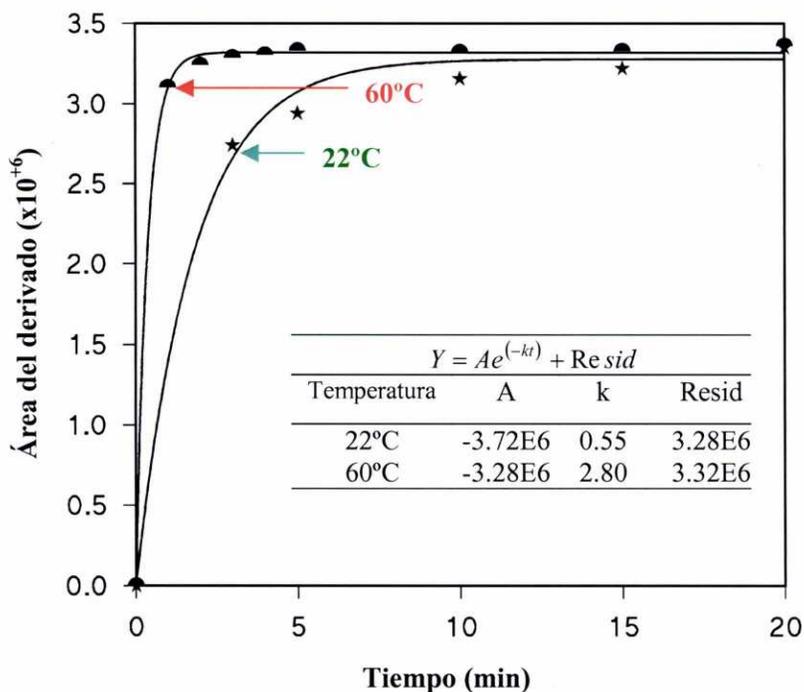


Figura III-6. Influencia del disolvente (metanol) en la reacción de derivatización de DMPA para la relación 10:1 a diferentes temperaturas.

La formación de bases de Schiff para la determinación de aminas por HPLC, tiene lugar en un medio de reacción en los que, normalmente, se asegura un pH básico con distintas sales: hidrógenofosfato de dipotasio (NISHIKAWA, 1987), hidróxido potásico (BAUER Y RITCHER, 1981) o tampón fosfato a pH=10 (MENTASTI y col., 1991). La amidoamina con un carácter básico, proporcionado por el grupo amino terciario del final de la cadena, no requiere este incremento del pH con sales, simplificándose de esta forma la derivatización. En una posterior adaptación del método a otras matrices con pH ligeramente ácidos como las betainas podría ser revisado la utilización de tampones y medios acuoso/orgánicos para el ajuste de pH.

6. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

6.1. Selección de las condiciones cromatográficas

La búsqueda que se plantea en la separación cromatográfica es la diferenciación entre el derivado y el exceso de agente derivatizante, así como otros picos originados por absorción de componentes de la matriz o incluso de derivados formados con el SA por otros compuestos distintos de la DMPA.

Se elige una fase estacionaria funcionalizada con un grupo cianopropil que proporciona buenos resultados cuando se analizan matrices que contengan grupos amínicos. Así, se ensaya una cromatografía en fase inversa porque, aunque la sílice con grupos ciano ofrece la posibilidad de separaciones en fase normal con disolventes apróticos, se piensa en un método que pueda analizar DMPA en medios acuosos. Se inicia la separación con una columna ciano Lichrosorb® de longitud 125 mm x 4 mm x 5 µm con partícula de forma irregular.

Una fase móvil de metanol/agua eluye separados el SA y la base de Schiff en las muestras derivatizadas de DMPA patrón, una vez realizado el ajuste de la relación metanol/agua. Se ensaya la fase acuosa con un tampón habitual en las separaciones cromatográficas, acetato sódico a una concentración de 0,1 M y pH=5.

El porcentaje de fase acuosa en la fase móvil es el parámetro crítico en la optimización si bien en un margen limitado. Cuando se trabaja con mezclas en metanol de cantidades crecientes del tampón desde 0-25%, el derivado muestra un comportamiento caracterizado por una disminución del factor de capacidad y un aumento de la resolución en el derivado. El exceso de agente derivatizante no se ve apenas afectado por la concentración del tampón y eluye cercano al volumen muerto. El efecto contrapuesto en la base de Schiff entre factor de capacidad y resolución es el condicionante que limita la separación. Así se consigue un pico bien resuelto cuando el tiempo de retención en la columna es bajo y por tanto la selectividad con el exceso de salicilaldehído es pequeña. El aspecto positivo de estas características cromatográficas es que la separación tiene lugar en un tiempo total excelente, inferior a los 5 min.

Para estudiar el problema de la separación al completo hay que plantearlo no solamente con los patrones puros de DMPA sino también en las muestras de amidoamina. La matriz derivatizada exhibe los picos del salicilaldehído, el derivado y un tercer pico que no se corresponde a ningún compuesto derivatizado puesto que también aparece en el blanco. Posiblemente se trate de la amidoamina, sin separar los homólogos de la cadena alquílica, que presenta absorción originada por el grupo amida a longitudes de onda bajas en UV. El orden de elución para las condiciones estudiadas: exceso de salicilaldehído, pico del blanco y derivado

requiere que se encuentre una selectividad adecuada de este último no sólo con el salicilaldehído sino también con el pico de la matriz (figura III-7).

El pico del derivado no posee una buena resolución para cantidades de tampón inferiores al 10%, es entre 10 y 20% donde se logra un pico estrecho más apropiado para cuantificar. ADACHI Y ICHINOSE, 1990 separando en mezclas agua/metanol aminas derivatizadas con pirenoaldehído apuntan el hecho conocido de la hidrólisis de bases de Schiff y no recomiendan cantidades grandes de agua en la fase móvil. En su caso no utilizan más del 15% de agua sin tamponar; para la DMPA con valores del 20% no se ha observado evolución ni descomposición del derivado y valores mayores no se consideran porque no aportan la selectividad conveniente del derivado con los otros picos.

La retirada del mercado de la columna Lichrosorb por el fabricante nos obligó a buscar otra fase estacionaria para reemplazarla. Se ensayaron dos tipos funcionalizados con cianopropil, en la primera (Lichrospher[®]) de las mismas dimensiones pero con partícula esférica, los compuestos tienen un comportamiento cromatográfico similar. No obstante fue necesario un ajuste del flujo a $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.

Diferencias en las características de tipo físico relacionadas con el relleno de la columna como el grado de recubrimiento y el área específica entre Lichrosorb[®] y Lichospher[®] y que presentan valores más favorables para esta última quizá podría explicar un mayor número de platos teóricos. Esto representa para una misma concentración de derivado valores más altos de áreas y alturas en el relleno esférico que en el irregular.

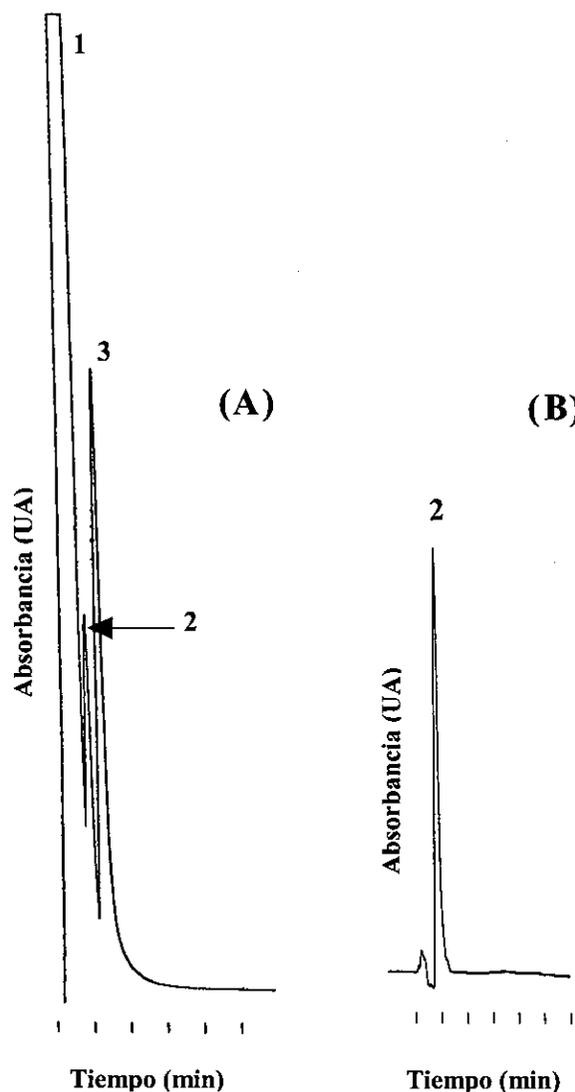


Figura III-7. Cromatogramas de amidoamina de coco: (A) Derivatizada en las condiciones optimizadas y (B) Sin derivatizar. 1. Exceso de SA, 2. Amidoamina de coco, 3. Derivado de DMPA.

El segundo ensayo consistió en la adaptación de las condiciones anteriormente seleccionadas a una columna Lichrosorb-CN[®] de 250x4 mm lo que supuso aumentar el flujo hasta 1,5 mL min⁻¹ para lograr retenciones parecidas a las

conseguidas con otras 2 columnas y así mantener los tiempos de análisis (tabla III-1).

Tabla III-1. Tiempos de retención del SA, matriz y DMPA con diferentes columnas cromatográficas.

Columna	Dimensiones y forma partícula	Flujo (mL min ⁻¹)	Tiempo de retención (min)		
			SA	Matriz	DMPA
Lichrosorb®	125x4x5µm irregular	1,0	1,3	1,9	2,3
Lichrospher®	125x4x5µm esférica	0,8	1,6	2,0	2,4-2,5
Lichrosorb®	250x4x5µm irregular	1,5	1,9	2,0	2,7

Se observó, con respecto a Lichrospher® 125x4mm y para una concentración de derivado constante, áreas y alturas más bajas (figura III-8). Aunque el análisis con las dos columnas disponibles comercialmente es viable, se ha seleccionado la Lichrospher® 125 x 4mm para el análisis cuantitativo.

DOLAN en 1994, estudiando las variables que afectan a la separación, considera entre otros, el flujo y la longitud de la columna, como factores para mejorar la separación. La longitud de la columna es directamente proporcional al número de platos teóricos y, flujos bajos en la mayoría de las condiciones, aumentan el número de platos y por tanto la resolución. En la separación de la DMPA, la forma de la partícula, esférica o irregular es el factor determinante ya que un aumento en la longitud no compensa el efecto de la forma de la partícula ni posiblemente los efectos del flujo.

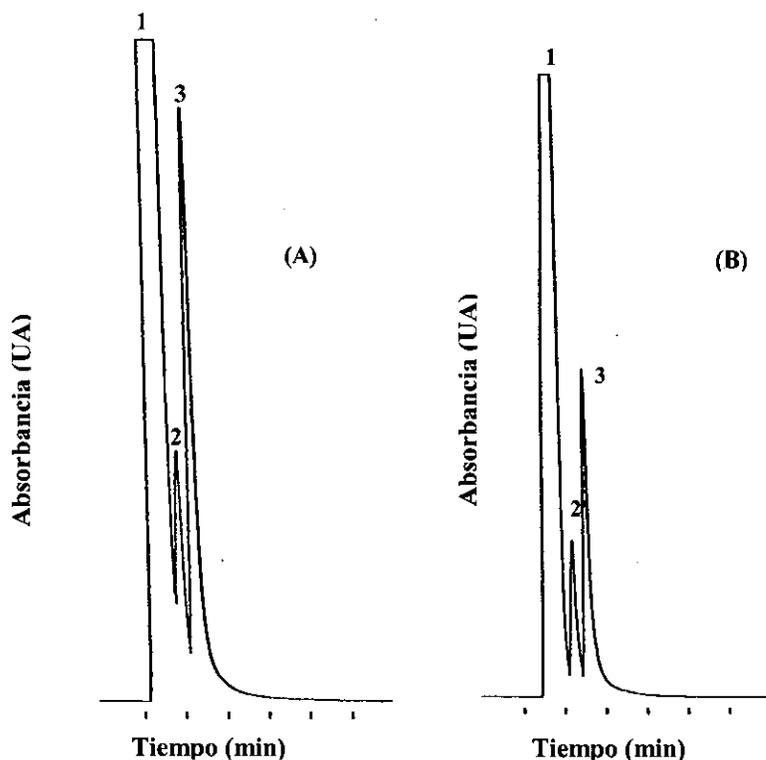


Figura III-8. Influencia de la longitud de la columna y de la forma de la partícula de la fase estacionaria en la separación cromatográfica. Cromatograma de la amidoamina de coco derivatizada: (A) Lichrospher-CN (125x4mm) y (B) Lichrosorb-CN (250x4mm). 1. Salicilaldehído, 2. Amiodamina de coco.

Por otra parte una disminución de la concentración del tampón produce retenciones mayores del derivado con picos más ensanchados. El mismo efecto se encuentra cuando se aumenta el pH por encima de 5; pH más bajos de este valor no parecen recomendables porque podrían hidrolizar la base de Schiff.

6.2. Análisis cualitativo: análisis espectral

El análisis espectral de disoluciones patrón y muestras ha sido llevado a cabo en un detector de fotodiodos, con el fin de hallar la longitud de onda de máxima absorción del derivado. Igualmente, se realiza el análisis de la homogeneidad espectral de los picos para verificar la pureza y detectar coeluciones de los compuestos separados. Los espectros de absorción del salicilaldehído y del derivado muestran tres máximos comunes situados entre 210-230 nm, 250-270 nm y 300-340 nm. El agente derivatizante presenta su mayor absorción en zona de 250-270 nm mientras que el derivado de la DMPA la tiene entre 210-230 nm. En esta última banda, la longitud de máxima absorción es de 218 nm y por tanto se elige como longitud de onda de trabajo. Además la base de Schiff presenta una cuarta banda de absorbancia aunque menos intensa en torno a los 420nm, posiblemente relacionada con el color amarillo que toman las disoluciones cuando se forma el derivado (figura III-9).

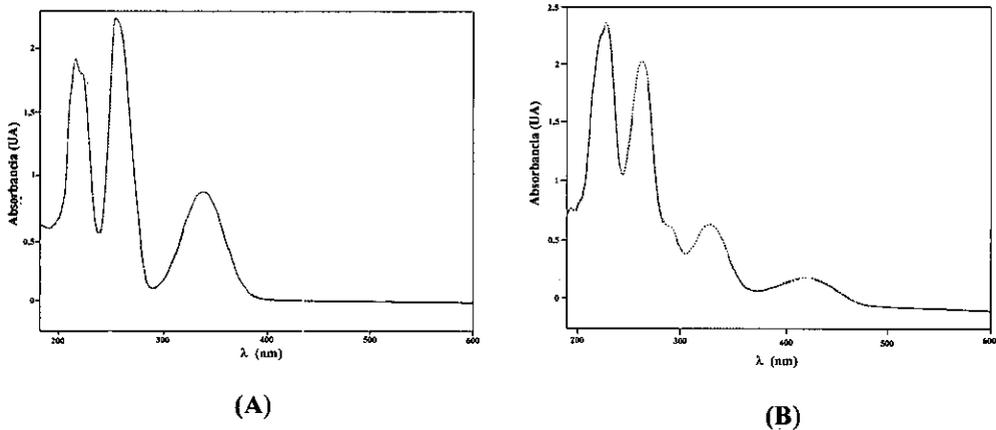


Figura III-9. Espectros de absorción UV-vis (190-600 nm): (A) Salicilaldehído, (B) Derivado de DMPA patrón recogidos a distintos tiempos bajo el área del pico para verificar la pureza.

En muestras reales, el pico correspondiente a la matriz registra un espectro con absorción a longitudes bajas del visible y en 250nm ya no absorbe (figura III-10). Esto podría ser empleado si se necesitase mejorar la selectividad entre el derivado y el pico de la matriz. A la longitud de onda de trabajo, 218 nm, el pico de la matriz no presenta un máximo de absorción del pico, sino que está desplazado para la matriz de cadena coco entre 206 y 209 nm y para la undecilénica entre 209-212nm.

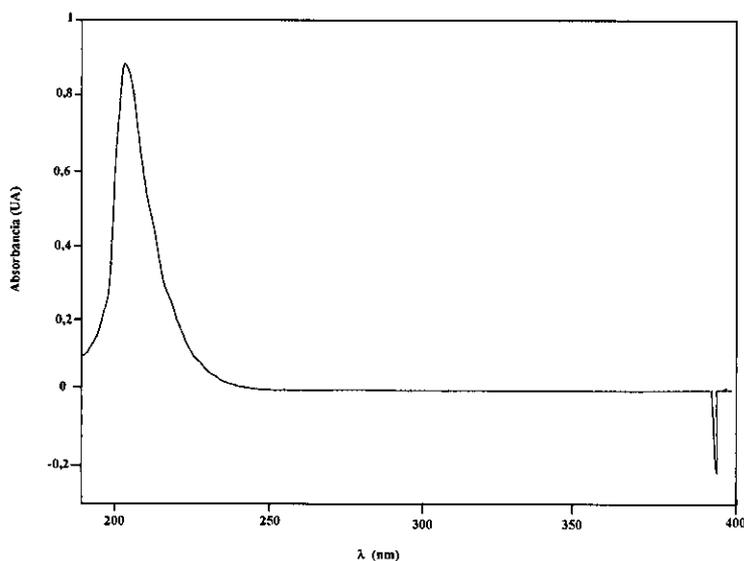


Figura III-10. Espectro de absorción UV (190-400 nm) del pico posiblemente debido a la amidoamina de coco.

6.3. Análisis cuantitativo: Precisión, rango lineal, límites de detección y cuantificación

La precisión del método no sólo debe referirse a la relacionada con la preparación e inyección en el sistema cromatográfico sino que debe incluir la

etapa de derivatización. Así, para una concentración de $33,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DMPA derivatizada (0,84% en la muestra) y 10 derivatizaciones diferentes, se obtuvo una desviación estándar relativa de 1,30%, por lo que se considera satisfactorio.

Pese a que, en principio, el rango lineal fue estudiado desde las proximidades del límite de cuantificación ($0,6 \mu\text{g mL}^{-1}$) hasta cerca de los niveles más altos donde la señal del detector comienza a estar saturada ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), posteriormente se trabajó en un rango de $0,6$ a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ adaptado a las concentraciones de DMPA en las muestras. En este intervalo, con 10 niveles de concentración, se construye la recta de calibrado que es ajustada por mínimos cuadrados. El coeficiente de correlación es de 0,9991 (cada punto de la regresión fue la media de dos inyecciones a cada nivel de concentración del patrón, concentraciones referidas a las disoluciones inyectadas en $20 \mu\text{L}$).

Otros dos importantes parámetros analíticos para posteriores estudios de la DMPA en formulaciones son el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC). Una definición habitual del límite de detección lo considera como la concentración del analito que da una señal igual a la del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco, es decir:

$$Y = Y_B + 3 \times S_B \quad (1)$$

siendo, Y = señal del límite de detección, Y_B = señal media del blanco y S_B = desviación estándar de la señal del blanco.

Basada en esta definición, MILLER y MILLER (1988) proponen un procedimiento en el cuál el límite de detección es calculado a partir de una sección de la recta de regresión cercana al origen. Cada punto de la recta, y aquí se

incluye el blanco, presenta una variación normalmente distribuida en la dirección de y (medidas experimentales) con una desviación estándar, $S_{y/x}$ definida como:

$$S_{y/x} = \left(\frac{\sum_i (y_i - y_i^*)^2}{n - 2} \right)^{1/2} \quad (2)$$

siendo $(n-2)$ los grados de libertad, y_i son las señales y -experimentales, y_i^* = las señales y -obtenidas en la regresión.

Al retomar la expresión (1) y asumiendo la desviación del blanco como la desviación estándar de la recta $S_{y/x} = S_B$ y la señal del blanco como la ordenada en el origen, se puede calcular la señal del límite de detección Y . Con este valor calculado y llevado a la recta de regresión se obtiene la concentración del límite de detección. Para el límite de cuantificación, el procedimiento de MILLER y MILLER, es análogo al seguido para el límite de detección, a excepción de la expresión general tomada como punto de partida, que está definida como la concentración del analito que da una señal igual a la del blanco más 10 veces la desviación estándar de este blanco:

$$Y = Y_B + 10 \times S_B \quad (3)$$

Siguiendo el procedimiento descrito se obtiene un límite de detección de $0,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ y un límite de cuantificación de $0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En la Tabla III-2 se ofrece un resumen de los parámetros obtenidos para el análisis cuantitativo .

Tabla III-2. Parámetros para el análisis cuantitativo de DMPA.

	DMPA
Rango lineal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,60-50
Recta de calibrado, coeficiente de correlación	[Área]=26736+60694,1[DMPA] r=0,9991
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,13
LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,40
%RSD (n=10)*	1,30

(*) Calculado para una concentración de 33,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

7. APLICACIÓN DEL MÉTODO A LA DETERMINACIÓN DE DMPA EN MUESTRAS DE ALQUILAMIDOAMINAS

En la aplicación del método a las matrices de alquilamidoaminas es necesario tener en cuenta la concentración y la solubilidad de la matriz. La primera está limitada por la separación, tal y como se ha visto en la discusión previa, ya que un pico posiblemente de amidoamina eluye entre el exceso de agente derivatizante y la DMPA. Para rellenos Lichrospher CN, se empleó una concentración de muestra de 40 mg mL^{-1} diluida a 4 mg mL^{-1} antes de inyectar y en Lichrosorb CN debido al menor número de platos se aumentó hasta 80 mg mL^{-1} y 8 mg mL^{-1} respectivamente. Si se refiere el límite de detección 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a la concentración en la muestra supone un límite de detección de DMPA de 32,5 y 16,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Concentraciones más altas de muestra provocan el solapamiento del pico de la amidoamina con el del derivado.

Las muestras, atendiendo a la solubilidad de la amidoamina, se pueden dividir en dos grupos. Aquellas como la amidoamina de cadena coco, que contiene la glicerina formada como subproducto, y la amidoamina undecilénica son

solubles en acetonitrilo a la concentración de trabajo. Otro grupo formado por amidoamina de coco, en la que la glicerina fue parcialmente eliminada, debe ser disuelta en metanol para las concentraciones ensayadas. También el óxido de amidoamina y la cocoamidopropilbetaina son solubles solamente en metanol.

Ensayo de la exactitud. Principalmente debido a que en la determinación de DMPA, está implicada una reacción de derivatización, es necesario verificar si la matriz interfiere en el análisis. Al no disponer de materiales de referencia certificados el ensayo de la exactitud del método se realiza por medio de la recuperación analítica. Para ello a una muestra de amidoamina se adicionan cantidades exactamente conocidas de DMPA. Se calcula la DMPA encontrada como la diferencia entre el valor obtenido de la muestra con la adición y el inicialmente cuantificado en la matriz. El cociente entre el valor encontrado y el añadido expresado en tanto por cien es lo que se denomina recuperación analítica expresada en porcentaje.

El ensayo debe realizarse a distintos niveles de concentración dentro del intervalo de cuantificación. En este caso concreto se hizo a 4 niveles de concentración (con tres réplicas y dos inyecciones para cada una). Los resultados se reflejan en la tabla III-3. Los valores de recuperación cercanos al 100% indican que la matriz no interfiere en la determinación de la DMPA en el intervalo estudiado. La cantidad de amina añadida esta referida a la recta de calibrado y no a la concentración en la matriz (4 mg mL^{-1}).

Tabla III-3. Resultados del ensayo de la recuperación analítica.

Cantidad de DMPA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		%Recuperación (RSD, %), n=6
Añadida	Encontrada	
13,33	13,32	99,90 (1,93)
23,60	22,90	97,05 (1,02)
30,83	31,00	100,54 (1,12)
40,14	40,55	101,03 (1,17)

Una vez comprobada la exactitud del método se aplica a la determinación de DMPA libre en lotes de fabricación de amidoaminas de cadena coco y undecilénica. En este caso, un lote de fabricación, corresponde a una reacción individual del aceite de coco o ácido undecilénico con DMPA. Cada muestra representativa de un lote se disuelve y derivatiza tres veces y cada una de las derivatizaciones se inyectan por duplicado (n=6). La DMPA libre cuantificada tanto en amidoamina de coco con glicerina (todos los lotes cuyo número de identificación termina en 92) como en undecilénica (159/93) se encuentra por debajo del 1% pero en niveles superiores a los $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los valores obtenidos así como el coeficiente de variación (porcentaje de la desviación estándar relativo) se indican en la tabla III-4.

Tabla III-4. Contenido de DMPA libre en muestras procedentes de lotes de fabricación de amidoamina de coco y undecilénica.

Muestra	n°	DMPA libre (%)	RSD% (n=6)
Amidoamina de coco	218/92	0,36	1,23
	268/92	0,48	0,78
	311/92	0,70	0,83
	397/92	0,93	0,71
Undecilénica	159/93	0,97	0,96

A raíz de la publicación de este capítulo, (PRIETO y col. 1997), investigadores de Goldschmidt (GRÜNING y col. 1997; KEUNE, 1999) que también se habían planteado la determinación de DMPA en cocoamidoaminas y cocoamidopropilbetaínas por HPLC, se pusieron en contacto con nosotros para confrontar los métodos. El desarrollado por Goldschmidt está orientado, como el propuesto aquí, hacia la derivatización de la DMPA y la separación del derivado en fase inversa con detección en UV a 254 nm. El agente derivatizante es un agente clásico, propuesto por Edman en 1950 para la determinación de péptidos, el fenilisotiocianato.

El tiempo de derivatización es de 30 min con una etapa posterior de ajuste de pH, el pico del derivado eluye a los 12 min y el tiempo de análisis total para la betaína alcanza los 30 min. En resumen, la etapa de derivatización es lenta, el derivado tiene que ser analizado inmediatamente después de ser formado (no es estable) y el tiempo de análisis es largo (mínimo de 12 min), sin embargo el límite de detección en la matriz es muy bueno, de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que posibilita la determinación de la DMPA en niveles bajos, entre 10 y $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Se intenta comprobar si el método propuesto en este capítulo es válido para el mismo intervalo de amina. La concentración de DMPA en las muestras de trabajo es superior a los $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la relación agente derivatizante/DMPA, 10:1 está referida para asegurar que la reacción tiene lugar cuando la amina se encuentra en su límite superior, el 1%. Pero si la muestra contiene solamente $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, la relación agente derivatizante/DMPA sería 100/1 y el pico del derivado estaría parcialmente solapado. Por lo que, habría que adaptar el exceso de agente derivatizante a un nuevo intervalo de concentración con valores menores o iguales

a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, con el mismo criterio que para $1000\text{-}10000 \mu\text{g mL}^{-1}$, es decir, relación 10/1 para el nivel superior de concentración.

La obtención de un límite de cuantificación y de detección más bajos en las muestras pasa por el aumento de la concentración de las mismas. Para este fin parece más adecuado el relleno Lichrosorb ya que al trabajar con concentraciones más altas permite un límite de detección de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de cuantificación de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (en Lichrospher® el límite de cuantificación es de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Sin embargo una medida más eficaz debe de orientarse a una mejora de la resolución de los picos. Se han realizado pruebas con DMPA patrón derivatizada y separada en las condiciones optimizadas sustituyendo el acetato sódico por acetato de trietilamina consiguiendo una disminución del ancho de los picos.

Desgraciadamente el no disponer de muestras de amidoaminas purificadas, con niveles de DMPA de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, ha impedido verificar si con la adaptación del exceso de agente derivatizante o un aumento de la concentración de la matriz, propiciado por una mejor resolución, es posible cuantificar a niveles de concentración de DMPA en el rango de $10\text{-}1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

8. CONCLUSIONES

- El método propuesto para la determinación de DMPA por HPLC permite la detección en ultravioleta, después de una etapa de derivatización, con las siguientes ventajas relacionadas con el agente derivatizante usado, el salicilaldehído: reacción rápida, en una sola etapa, con derivados estables y sin que sea necesaria la eliminación del exceso de agente derivatizante antes del análisis cromatográfico.

- El método puede ser usado en análisis de rutina puesto que el tiempo total de análisis es inferior a los 10 min.
- La cuantificación de la DMPA puede realizarse con buena sensibilidad en un rango de linealidad amplio y con un límite de detección aceptable.
- La aplicación del método a las muestras de amidoaminas con niveles superiores a los 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presenta buena exactitud y precisión sin interferencias de la matriz.

9. BIBLIOGRAFÍA

ADACHI, K.; ICHINOSE, N. (1990). Fluorescence high-performance liquid chromatography determination of primary aromatic amines by formation of Schiff base. *Fresenius J. Anal. Chem.* **338**, 265.

ANDERSSON, K.; HALLGREN, C.; LEVIN, J-O., NILSSON, C-A. (1984). Determination of aliphatic amines in air by reversed-phase high-performance liquid chromatography using 1-naphthyl isocyanate derivatives. *J. Chromatogr.* **312**, 482.

ANDERSSON, K.; HALLGREN, C.; LEVIN, J-O., NILSSON, C-A. (1985). Determination of ethylenediamine in air reagent-coated adsorbent tubes and high-performance liquid chromatography on the 1-naphthylisothiourea derivative. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **46** (4), 225.

BAUER P.; RITCHER. M. (1981). Quantitative analysis of free amine in polyaminoamide and polyamine hardeners by means of gel permeation chromatography. *J. Chromatogr.* **203**, 343.

BIONDI, A.; NEGRI, A.; IOPPOLO, A. (1986). High-performance liquid chromatographic determination of taurine in formulations as the dansyl derivative. *J. Chromatogr.* **369**, 431.

- BJORKQVIST, B. (1981). Separation and determination of aliphatic and aromatic amines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **204**, 109.
- BOURQUE, A.J.; KRULL, I.S. (1991). Solid-phase reagent containing the 3,5-dinitrophenyl tag for improved derivatization of chiral and achiral amines, amino alcohols and amino acids in high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **537**, 123.
- BOURQUE, A.J.; KRULL, I.S. (1991). A polymeric reagent for derivatization of weak nucleophiles in HPLC-UV. *J. Chromatogr. Sci.* **29**, 489.
- BUSTO, O.; VALERO, Y.; GUASCH, J.; BORRULL, F. (1994). Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. *Chromatographia* **38**, 571.
- CAMPÍS-FALCÓ, P, HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R, SEVILLANO-CABEZA, A, TRÜMPLER I. (1997). Derivatization of amines in solid-phase extraction supports with 9-fluorenylmethylchloroformate for liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **344**, 125.
- COBO, M.; SILVA, M. (1999). Continuous solid-phase extraction and dansylation of low-molecular-mass amines couple on-line with liquid chromatography and peroxyolate chemiluminescence-based detection. *J. Chromatogr.* **848**, 105.
- CHEN, C.M.; FARQUHARSON, R. A. (1979). Analysis of trace quantities of ammonia and amines in aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic derivatives. *J. Chromatogr.* **178**, 358.
- CHOU, T-Y; COLGAN, S.; KAO, D.M. ; KRULL, I.S.; DORSCHER, C.; BIDLINGMEYER, B. (1986). Pre-chromatographic derivatization of primary and secondary amines with a polymeric anhydride for improved high-performance liquid chromatographic detection. *J. Chromatogr.* **367**, 335.
- De GROOT, A.C.; van der WALLE, H.B.; WEYLAND, J.W. (1995). Contact allergy to cocamidopropyl betaine. *Contact Dermatitis* **33**, 419.

De LEENHEER, A.; SINSHEIMER J.E. y BURCKHALTER J.H. (1973). Fluorometric determination of primary and secondary aliphatic amines by reaction with 9-isothiocyanatoacridine. *J. Pharm. Sci.* **32**, 1370.

DOLAN LC. J. (1994). Obtaining separations, Part. I: A look at retention. Troubleshooting. *LC-CG Int.* **7** (6) 332.

FAGER, R.S.; KUTIN, C.B.; ABRAHAMSON E.W. (1973). The use of NBD Chloride (7 chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) in detecting amino acids and as an N-terminal reagent. *Anal. Biochem.* **53**, 290.

FAULKNER, A.J.; VEENING, H.; BECKER., H-D. (1991). 2-(9-Anthryl)ethyl chloroformate: A precolumn derivatizing reagent for polyamines determined by liquid chromatography and fluorescence detection. *Anal. Chem.* **63**, 292.

FLOYD, E.F. (1990). In *Cationic surfactants: organic chemistry*. Surfactant Science Series, Vol 34, Marcel Dekker, New York.

FOWLER, J.F.; FOWLER, L.M.; HUNTER, J.E (1997). Allergy to cocamidopropylbetaine may be due to amidoamine: a patch test and product use test study. *Contact Dermatitis* **37** (6), 276.

GAO, C.X.; KRULL, I.S. y TRAINOR, T.M. (1989). Determination of volatile amines in air by on-line solid-phase derivatization and high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **463**, 192.

GEERDINK, B. (1998). Determination of aniline derivatives by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **445**, 273.

GENNARO, M.C.; BERTOLO, P. (1990a). Simultaneous determination of nitrites, nitrates and amines by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. Application to lagoon water. *J. Chromatogr. A* **509**, 147.

GENNARO, M.C.; BERTOLO, P.L. (1990b). Separation of n-containing species by means of new versatile ion interaction RP-HPLC methodology. *J. Liq. Chromatogr.* **13** (10), 2059.

GENNARO, M.C.; MARENGO, E. (1988). Separation of aliphatic and aromatic amines by the ion interaction reagent RP-HPLC technique. *Chromatographia*, **25**, 603.

GENNARO, M.C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; PORTA, V. (1988). Aliphatic monoamines, diamines, polyamines: An HPLC method for their identification and separation by a dansylation reaction; the study of separation factors in homologous series. *Chromatographia* **25**, 117.

GHOSH, P.B.; WHITEHOUSE, M.W. (1968). 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines. *Biochem. J.* **108**, 155.

GRÜNING, B.; KÄSEBORN, D.; LEIDREITER, H.I. (1997). Cocoamidopropyl Betaine. Methods for producing CAPB and new analytical methods for determining purity and side-products. *Cosmetic & Toiletries* **112**, 67.

HENRIKS-ECKERMAN, M.L.; LAIJOKI, T. (1985). Ion-pair high performance liquid chromatographic determination of dansylated aliphatic polyamines with fluorescence and ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **333**, 220.

ISHIDA, J.; YAMAGUCHI, M.; IWATA, T.; NAKAMURA, M. (1989). 3,4-dihydro-6,7-dimethyl-3-oxoquinoxaline-2-carbonyl chloride as a sensitive fluorescence derivatization reagent for amines in liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **223**, 319.

KEUNE, S. (1999). Determination of dimethylaminopropyl amine content in fatty acid amidopropylbetaines by HPLC. Method E SM 1035 Th. GOLDSCHMIDT AG *Comunicación confidencial*.

KLEIDERNIGG, O.P.; POSCH, K.; LINDNER, W. (1996). Synthesis and application of a new isothiocyanate as a chiral derivatizing agent for the indirect resolution of chiral amino alcohols and amines. *J. Chromatogr A* **729**, 33.

- KROL, J.; ALDEN, P.G.; MORAWSKI, J.; JACKSON, P.E. (1992). Ion chromatography of alkylamines and alkanolamines using conductivity detection. *J. Chromatogr.* **626**, 165.
- KRULL, I.S.; DEYL, Z. y LINGEMAN, H. (1994). Review. General strategies and selection of derivatization reactions for liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **659**, 1.
- JACOBS, W.A.(1987). O-Phthaldialdehyde-sulfite derivatization of primary amines for liquid chromatography -electrochemistry. *J. Chromatogr.* **392**, 435.
- JEDRZEJCZAK, K.; GAÑID, V.S. (1990). Polymers with reactive functions as sampling and derivatising agents. Part 1. Effective sampling and simultaneous derivatisation of an airborne amine. *Analyst* **115**, 1359.
- JOHNSON, L.; LAGERVIST, S.; LINDROTH, P.; AHNOFF, M., MARTISSON, K. (1982). Derivatization of secondary amino acids with 7-nitro -4-benzofurazanyl ethers. *Anal. Chem.* **54**, 942.
- LAMARRE, C.; GILBERT, R.; GENDRON, A. (1989). Liquid chromatographic determination of morpholine and its thermal breakdown products in steam-water cycles at nuclear power plants. *J. Chromatogr.* **467**, 249.
- MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; ABOLLINO, O.; PORTA, V. (1991). Chromatographic behaviour of homologous amines: Comparison of derivatizing agents, columns and mobile phases. *Chromatographia.* **31**, 41.
- MERALI, S.; ALLEN B.; CLARKSON, Jr. (1996). Polyamine analysis using N-hydroxysuccinimidyl-6-aminoquinoylcarbamate. *J. Chromatogr. B* **675**, 321.
- MILLER, J.C. y. MILLER, J.N. (1988). *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd ed. Ellis Horwood Limited, Chichester, England.
- MORLEY, J.; ELROD Jr. L.; LINTON, C.; SHAFFER, D.; KROGH, S. (1997). Determination of residual amines used in bulk drug synthesis by pre-column derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **766**, 77.

- NISHIKAWA, Y. (1987). Liquid chromatographic determination of aliphatic diamines in water via derivatization with acetylacetone. *J. Chromatogr.* **392**, 345.
- PIETSCH, J.; HAMPEL, S.; SCHMIDT, W.; BRAUSCH, H.J.; WORCH, E. (1996). Determination of aliphatic and alicyclic amines in water by gas and liquid chromatography after derivatization by chloroformates. *Fresenius J. Anal. Chem.* **355**, 164.
- PIGATTO, P.D.; BIGARDI, A.S.; CUSANO, F. (1995). Contact dermatitis to cocamidopropylbetaine is caused by residual amines: relevance, clinical characteristics, and review of literature. *Am. J. Contact Dermatitis.* **6** (1), 13.
- PRICE, P.J.; FIRMIN, J.L.; GRAY, D.O. (1992). Screening for amines by dansylation and automated high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **598**, 51.
- PRIETO BLANCO, M.C.; LÓPEZ MAHÍA, P.; PRADA RODRÍGUEZ, D. (1997). Determination of dimethylaminopropylamine in alkylaminoamides by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **35**, 265.
- RODRÍGUEZ LOPEZ, M.; GONZALEZ ALVAREZ, M.J.; MIRANDA ORDIERES, A.J.; TUÑÓN BLANCO, P. (1996). Determination de dimethylamine in groundwater by liquid chromatography and precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate. *J. Chromatogr.* **721**, 231.
- SAHASRABUDDHEY, B.; JAIN, A.; VERMA, K.K. (1999). Determination of ammonia and aliphatic amines in environmental aqueous samples utilizing pre-column derivatization to their phenylthioureas and high performance liquid chromatography. *Analyst* **124**, 1017.
- SÁNCHEZ-RODAS, D.; HOHAUS, E.; WENCLAWIAK, B. (1996). High-performance liquid chromatographic determination of primary amines in aqueous solutions after extration and derivatization with 2,2-diphenyl-1-oxa-3-oxonia-2-boratanaphthalene (DOOB). *Fresenius J Anal Chem.* **355**, 187.

SIMON, P.; LEMACON, C. (1987). Determination of aliphatic primary and secondary amines and polyamines in air by high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **59**, 480.

SINSHEIMER, E.; HONG, D.D.; STEWART, J.T.; FINK, M.L; BURCKHALTER, J.H. (1971). Fluorescent analysis of primary aliphatic amines by reaction with 9-isothiocyanatoacridine. *J. Pharm. Sci.* **60**, 141.

SMITH, E.; DAVIS, W.R. (1984). Spectrophotometric determination of amines with p-chloranil. *Anal. Chem.* **56**, 2345.

SMITH, R.L.; SMART, A.U.; HANCOCK, F.E.; TWIGG, M.V. (1991). High-performance liquid chromatographic determination of low levels of primary and secondary amines in aqueous solutions including 2-amino-2methylpropanol by precolumn derivatization to sulfonamides. *J. Chromatogr.* **547**, 447.

SOLON BARREIRA; PAZ PARENTE, J.; DE ALENCAR, J.W. (1987). Separation and determination of aliphatic amines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.* **398**, 381.

TAKADATE, A.; YAGASHIRO, I.; IRIKURA, M.; FUJINO, H.; GOYA, S. (1989). 3-(7-Methoxycoumarin-3-carbonyl) and 3-(7-dimethylaminocoumarin-3-carbonyl) 2-oxalazones a new fluorescent labeling reagents for high-performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 373.

TOD, M.; LEGENDRE, J-Y; CHALOM, J., KOUWATLI, H.; POULOU, M.; FARINOTTI, R.; MAHUZIER, G. (1992). Primary and secondary amine derivatization with luminarins 1 y 2. Separation by liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection *J. Chromatogr.* **594**, 386.

TSUJI, K.; JENKINS, K.M. (1985). Derivatization of secondary amines with 2-naphthalene-sulfonyl chloride for high-performance liquid chromatographic analysis of spectinomycin. *J. Chromatogr.* **333**, 365.

VALCÁRCEL CASES, M. y GOMEZ HENS, A. (1990). *Técnicas analíticas de separación*. Ed. Reverté, Barcelona. España.

VANDENABEELE, O.; GARRELLY, L.; GHELFENSTEIN, M.; COMMEYRAS, A.; MION, L. (1998). Use of 2-chloroethylnitrosourea, a new type of pre-column derivatizing agent for the measurement of biogenic amines, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A* **795**, 239.

VIALLE, J.; NAVARRO, P.; NGUYETT, T.T.; LANTERI, P.; LONGERAY, R. (1991). Experimental design for the optimization of the separation of aliphatic amines by ion chromatography. *J. Chromatogr.* **549**, 159.

WATANABE, Y.; IMAI, K. (1982). High-performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal. Biochem.* **116**, 471.

WATANABE, Y.; SAITO, T.; SATO, S.; NAGASE, S.; UEDA, S.; TOMITA, M. (1990). Investigation of interfering products in the high-performance liquid chromatographic determination of polyamines as benzoyl derivatives. *J. Chromatogr.* **518**, 264.

WINKLER, E.; HOHAUS, E.; FELBER, E. (1988). Quantitative determination of free primary amines in polymeric amine hardeners. High-performance liquid chromatographic separation of ethylenediamine and triethylenetetramine after derivatization with salicylaldehyde-diphenylmethane by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **436**, 447.

WICKSTOM, K.; BETNER, Y. (1991). Analysis of polyamines and their acetylated forms with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reverse phase HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* **14**(4) 675.

ZHOU, F.X.; WAHLBERG, J.; KRULL, I.S. (1991). Silica based 3,5-dinitrobenzoyl (DNB) reagent for off-line derivatization of amine nucleophiles in HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* **14** (7), 1325.

ZHOU, Z. Y.; DAUPHIN, C.; PROGNON, P.; HAMON, M. (1994). Luminarin 9: a new fluorescent reagent for the precolumn derivatization of main volatile and non-volatile N-nitrosamines in RP-HPLC. *Chromatographia* **39**, 185.

Primary, secondary, and tertiary amine values of fatty amines. Potentiometric method. Method Tf 2b-64, 2a-64 y 1b-64 T. Official and Tentative Methods of the American. Oil Chemists' Society. Champaign, IL, 1973.

CAPÍTULO IV

**Análisis del agente cuaternizante residual
y sus derivados en un tensioactivo catiónico
de cadena alquílica larga: cloruro de
benzalconio (BAK)**

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DEL AGENTE CUATERNIZANTE RESIDUAL Y SUS DERIVADOS EN UN TENSIOACTIVO CATIÓNICO DE CADENA ALQUÍLICA LARGA: CLORURO DE BENZALCONIO (BAK)

1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	131
2.	TOXICIDAD DEL AGENTE CUATERNIZANTE Y DEL BAK. APLICACIONES BIOLÓGICAS DEL BAK	134
3.	TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA DETERMINACIÓN DEL BAK	141
4.	INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS	150
5.	SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....	151
	5.1. Consideraciones previas.....	151
	5.2. Identificación de los productos residuales y selección de las condiciones de elución en isocrático	152
	5.3. Separación de impurezas y selección de las condiciones de elución en gradiente	158
	5.4. Análisis cuantitativo: Precisión y rango lineal del cloruro de bencilo y derivados. Límite de detección del cloruro de bencilo.....	164
6.	APLICACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO EN LA SÍNTESIS DEL BAK	165
	6.1. Consideraciones previas.....	166
	6.2. Síntesis en disolución acuosa al 50% y en presencia de catalizador inorgánico.....	167
	6.3. Síntesis en disolución acuosa al 50% y con exceso de la alquildimetilamina	173
	6.4. Efecto de la cadena alquímica en la velocidad de síntesis.....	176
	6.5. Efecto del disolvente. Síntesis en medio alcohólico.....	180
	6.6. Efecto de la concentración. Síntesis al 50% y 80% en medio alcohólico	183
7.	CONCLUSIONES	186
8.	BIBLIOGRAFÍA	187

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

El cloruro de benzalconio (BAK) está definido en la farmacopea americana y europea como “una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2RCl]$, en los que el grupo R lo constituyen cadenas alquílicas cuya longitud varía de C_8 a C_{18} formando una serie homóloga y donde las cadenas con 12 y 14 átomos de carbono son las predominantes”. Comercialmente, se presenta como un polvo amarillento que contiene al menos un 95% de BAK o en disolución acuosa o alcohólica a concentraciones del 50% o mayores.

La síntesis del BAK se produce por la sustitución nucleófila de la alquildimetilamina por el cloruro de bencilo, de forma que el átomo de nitrógeno queda cargado positivamente formando un compuesto cuaternario que constituye el grupo funcional de la molécula (figura IV-1).

En el proceso de síntesis industrial, la efectividad de la reacción de cuaternización es medida por los porcentajes de amina libre y del cuaternario formado. Su determinación está reglamentada por diversas normas: norma UNE: 55712:1982 para la determinación de amina libre y acidez libre en cloruros de amonio cuaternario, y norma ISO 2871-2:1990 para la determinación de materia activa en cuaternarios de bajo peso molecular.

Las especificaciones comerciales de estos parámetros se encuentran en valores sobre 1% para la amina libre y para la materia activa (medida de los catiónicos existentes en la disolución) a una concentración que oscila entre 49-51% y 79-81%, respectivamente. La acidez libre es consecuencia de una reacción secundaria, simultánea con la cuaternización, posiblemente la sustitución nucleófila del cloruro de bencilo por un grupo hidroxilo del disolvente para formar

alcohol bencílico y ácido clorhídrico en presencia de un compuesto básico como es la amina alifática. El ácido generado en esta reacción es neutralizado por la amina, expresándose comúnmente la acidez libre como amina clorhidratada.

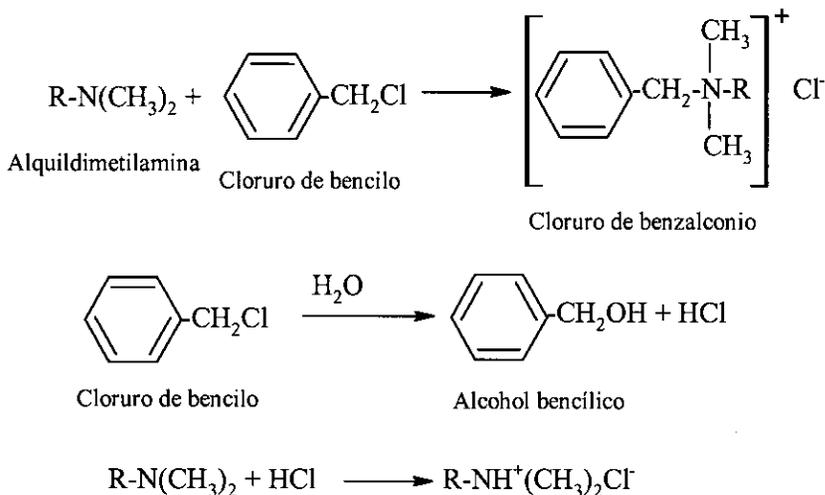


Figura IV-1. Reacción de formación de BAK y reacción secundaria del agente cuaternizante.

El agente cuaternizante, cloruro de bencilo, está considerado como un producto tóxico, y posiblemente cancerígeno y mutágeno por lo que resulta obligatorio conocer en el BAK sintetizado si posee cloruro de bencilo residual, y si es así a qué niveles se encuentra para poder estudiar las condiciones de su eliminación. Por otra parte las numerosas aplicaciones farmacológicas del BAK (desinfectantes orales, de piel, espermicidas...) refuerzan esta necesidad (CHALMERS y BATHE, 1979, HERRERO y col., 2000).

El análisis de un haluro de alquilo como el cloruro de bencilo implica el uso de técnicas instrumentales para conseguir una determinación selectiva. La técnica se seleccionará en función del equipamiento disponible en el laboratorio y de las

características de los compuestos principales de la matriz. La cromatografía de líquidos es una técnica de amplia difusión tanto en investigación como en control de rutina de los procesos en la Química Industrial y el cloruro de benzalconio es una matriz apropiada para ser analizada por cromatografía. De hecho, el análisis del cloruro de benzalconio por HPLC se encuentra estandarizado en la farmacopea americana para la medida de su capacidad antibacteriana (USP, 1995). Aunque ésta viene determinada por la amina de partida y no influenciada por el proceso de formación del cuaternario, sería importante disponer de estos datos en el producto final junto con los productos residuales de la síntesis. Si además se consigue en una misma determinación analizar varios compuestos, supondrá un ahorro de tiempo, de medios y de coste desde el enfoque de una planta industrial.

Por ello los objetivos planteados en el análisis del BAK por HPLC se indican en los siguientes puntos:

1. Determinación de cloruro de bencilo en cloruro de benzalconio en disolución alcohólica ó acuosa.
2. Determinación conjunta de la serie homóloga del cloruro de benzalconio y de los residuales originados por el agente cuaternizante.
3. Establecimiento de las mejores condiciones de síntesis que aseguren la eliminación del cloruro de bencilo residual en el producto final.
4. Estudio de posibles reacciones secundarias y subproductos formados como consecuencia de éstas.

2. TOXICIDAD DEL AGENTE CUATERNIZANTE Y DEL BAK. APLICACIONES BIOLÓGICAS DEL BAK

Se incluye este apartado sobre toxicidad, que en principio podría parecer alejado de los objetivos analíticos, para recoger de forma sucinta la información toxicológica del cloruro de bencilo así como la existente sobre el cloruro de benzalconio. BAK es uno de los tensioactivos catiónicos más estudiados en este aspecto, posiblemente, debido al gran número de aplicaciones en cosmética y en formulaciones farmacéuticas. DROBECK (1994) menciona la participación del BAK en 83 formulaciones cosméticas en 1986.

SAX (1980), recoge 15 datos de toxicidad referentes a cloruro de bencilo, de los cuales se destaca, dosis letal cincuenta vía oral en ratas (oral-rat $LD_{50}=1231$ mg kg^{-1}), concentración letal cincuenta por inhalación en ratas (inh-rat $LC_{50}=150$ ppm/2h) y la concentración tóxica letal más baja publicada por inhalación en humanos (inh-hmm $TCL_0=16$ ppm/1M). El valor de toxicidad acuática (TLm96) es de 10-1ppm. Además está considerado como un posible agente tumorigeno.

Los valores de toxicidad equivalentes para el alcohol bencílico (posible derivado) son oral-rat $LD_{50}=1230$ mg kg^{-1} , inh-rat $LC_{50}=1000$ ppm/8h, no hay datos para el TCL_0 de inhalación en humanos y el TLm96 está en el intervalo 1000-100 ppm, es decir 100 veces menor que el cloruro de bencilo.

En la guía de riesgos químicos NIOSH, (MACKISON y col., 1981; INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO, 1986), el límite de exposición admisible (PEL) para el cloruro de bencilo o valor medio promediado en el tiempo para un turno de trabajo es 1ppm (5 mg m^{-3}). En cuanto al límite IPVS que es la concentración inmediatamente peligrosa para la vida y la salud es de 10 mg L^{-1} y

representa el máximo nivel de concentración al que un sujeto expuesto, un tiempo de 30 min, puede escapar sin síntomas graves ni efectos irreversibles para la salud.

Según la Conferencia de Higienistas Industriales Gubernamentales Americanos el TLV-TLWA ó valor límite admisible/media ponderada en el tiempo es de 20 mg L⁻¹.

También la XUNTA de GALICIA (2000) recoge un Valor Límite Ambiental-Exposición diaria (VLA-ED) para el cloruro de bencilo de 1 ppm o 5,3 mg m⁻³. Se considera Exposición Diaria (ED) como la concentración media del agente químico en la zona de respiración del trabajador, medida o calculada de forma ponderada con respecto al tiempo y referida a una jornada estándar de 8 h.

El cloruro de benzalconio forma parte de formulaciones que entran en contacto con el cuerpo (en disoluciones de lentes de contacto, anticonceptivos vaginales, pastillas para tratamiento de infecciones bucales y de garganta, nebulizadores nasales, etc.) y existe entonces, riesgo potencial de ser absorbidas, inhaladas ó accidentalmente ingeridas. De este modo, se han realizado estudios de los efectos sistémicos por inhalación, ingestión oral o sobre la función reproductora. Son también amplias las investigaciones sobre toxicidad ocular con el estudio de los efectos citotóxicos *in vitro* y las referidas a dermatitis irritante.

Los efectos sistémicos por inhalación se han estudiado fundamentalmente en animales aunque existen experiencias con pacientes asmáticos que han inhalado una disolución que contenía BAK como antiséptico (BEASLEY y col., 1986 y ZHANG y col., 1990) causándoles broncoconstricción. Se han encontrado situaciones de correlación en pacientes con una mayor sensibilidad a la histamina y con efectos bronquiales provocados por el BAK, si bien la acción de este último era dependiente de la concentración (COLEMAN y col., 1981).

Se han registrado casos de efectos corrosivos en el tracto gastro-intestinal al emplearlo, como agente germicida en una administración oral, a una concentración superior a la recomendada. El BAK presenta efectos corrosivos por encima del 1% (DHILLON y col., 1982). Debido a que también es un agente espermicida y un efectivo anticonceptivo vaginal fueron precisos estudios en animales sobre la posible absorción espontánea o sobre malformaciones congénitas. Pese a que a determinadas concentraciones presente efectos abortivos no se observaron defectos congénitos (BUTTAR, 1985).

La toxicidad ocular de los tensioactivos catiónicos ha sido medida por el test de Draize llevada a cabo con conejos (DRAIZE y col. 1944). Se han establecido las concentraciones a partir de las cuales se produce irritación, en el caso del BAK es de 0,5%. La concentración en disoluciones oftalmológicas varía en el rango de 0,004-0,02%, su uso más corriente es en la esterilización de lentes de contacto aunque puede ir en formulaciones más específicas como el tratamiento del glaucoma. El método de Draize está parcialmente sustituido por otras técnicas como la microscopía electrónica de barrido, que por su alta resolución ayuda a comprender los efectos citotóxicos a nivel celular y con la que se ha establecido la concentración de 0,01% de BAK como límite máximo para que no se produzcan daños a nivel celular. No obstante, las dosis máximas y tiempo de exposición deben ser revisadas en cada formulación y aplicación en particular.

El poder irritante de los tensioactivos catiónicos, en la llamada dermatitis irritante está basado en su poder de penetración al reducir la tensión superficial y eliminar lípidos y/o aminoácidos. Esta propiedad puede ser empleada para ayudar a la penetración de un medicamento a través de la piel pero evidentemente con límites estrechos. RIEGER (1997) aporta otras características (bajo peso molecular

y solubilidad en lípidos) para que un compuesto tenga un alto poder irritante, por lo que la solubilidad en agua y alto peso molecular posibilitarían que el poder irritante en la piel fuera menor. Así en el BAK, el homólogo de cadena más larga (C₁₈, cloruro de esteralconio) tiene una concentración máxima de tolerancia en los test realizados, mayor que el cloruro de lauralconio C₁₂.

El BAK es usado en formulaciones dérmicas a concentraciones menores o iguales a 0,1%. Los experimentos de poder irritante realizados con cloruro de benzalconio han estado en función de la concentración y del tiempo de exposición, sin embargo otros factores como las distintas localizaciones de la piel en el cuerpo humano se han revelado como variables a tener en cuenta. RIEGER (1997) al examinar la validez de los test existentes para evaluar la irritación de la piel por contacto directo o accidental comenta el hecho de que en algunos de ellos las concentraciones están poco ajustadas a las existentes en las formulaciones comerciales.

Investigaciones con BAK parecen sugerir que hay una contribución genética en la dermatitis irritante provocada por productos químicos (HOLST y MOLLER, 1975). También aquí con el uso de la microscopía electrónica se ha comprobado la especificidad en la irritación del producto químico comparando BAK y lauril sulfato sódico (WILLIS y col., 1989). Otros estudios no han encontrado evidencia de respuesta cancerígena en el BAK (STEUBACK, 1977).

Por último, otro aspecto a considerar, puesto que el BAK puede ser usado en grandes cantidades en las actividades higiénicas de los centros sanitarios, es su toxicidad medioambiental, o más bien su toxicidad en las aguas. La datos de toxicidad en peces es alto (concentración letal LC₀=0,5 mg L⁻¹ y LC₁₀₀=2-5 mg L⁻¹ y aún más elevado para las dafnias LC₀=0,1 mg L⁻¹ y LC₁₀₀=1 mg L⁻¹).

En cuanto a las aplicaciones biológicas, el cloruro de benzalconio posee propiedades antibacterianas que dan una orientación específica al campo de sus aplicaciones. En el ámbito sanitario, además de ser un popular antiséptico en formulaciones de tratamiento de la piel y oftalmológicas, es usado en etapas de desinfección y limpieza.

Es un agente antibacteriano cuya actividad abarca numerosos microorganismos, bacterias, hongos y virus a excepción de las bacterias Gram-negativas donde su eficacia es escasa. Tiene las ventajas añadidas de actividad estática, poder de detergencia, poco olor, toxicidad e irritabilidad también muy baja para el ser humano, sin efectos corrosivos para materiales sintéticos (plásticos, cerámicos) y metales, moderada tolerancia en los suelos y efectividad en un amplio rango de pH. Las desventajas, ligadas no estrictamente a su actividad bacteriana, son su moderado coste, la formación de espumas como limpiador sanitario, la formación de películas indeseables sobre las superficies y su reducida actividad en aguas duras.

Al examinar el proceso de síntesis del BAK, se describe la estructura química de la molécula, con el grupo funcional cuaternario y las cadenas alquílicas confiriéndole ambos las propiedades tensioactivas (figura IV-1). Pero en la química del compuesto ¿qué es lo que condiciona su actividad biológica? Fue DOMAGK (1935) el que establece que la actividad bacteriana de los compuestos de amonio cuaternario está relacionada con la estructura y el tamaño de los radicales unidos al átomo de nitrógeno.

CUTLER y col., 1966 determinan que las cadenas con un número de átomos de carbono entre 12 y 16 muestran la mayor actividad bactericida. La medida de esta actividad se realiza mediante test sobre bacterias: *Staphylococcus aureus*,

Salmonella typhosa, *Pseudomonas aeruginosa* donde se cuantifica la concentración mínima en mg L^{-1} que mata las bacterias en un tiempo establecido. Se requiere una concentración de las cadenas cortas, de C_8 a C_{11} , que puede llegar a ser 10-100 mayor que para las cadenas C_{12} a C_{16} y, a partir de C_{16} - C_{19} la concentración mínima vuelve a aumentar del orden de 10 veces más, aunque este incremento depende de la bacteria. En general, las cadenas más cortas son menos bactericidas, las más largas presentan un comportamiento irregular, y entre el grupo C_{12} - C_{16} es el C_{14} el de mayor poder bactericida en algunos de los test realizados; sin embargo JONO y col. (1986) indica que es el homólogo C_{12} el más efectivo. La composición de la cadena alquílica depende de la fuente natural de la que es extraída y de la posterior purificación.

Los intentos de establecer modelos de la acción de los cuaternarios sobre los microorganismos (no sólo el BAK) han pasado por considerar aspectos como la desnaturalización de las proteínas, los efectos en las reacciones metabólicas y la estimulación en las reacciones de glicólisis, los efectos en la membrana celular y en el sistema enzimático. Las condiciones más propicias para la acción antibacteriana se dan con un aumento de la temperatura, en un rango de pH amplio (3-10) dependiendo del organismo sobre el que actúe y la adición de un agente quelatante, como el EDTA, para mejorar la acción en aguas duras.

Para no resultar muy prolijos en la enumeración de la actividad antibacteriana, en la tabla IV-1 se recoge la concentración mínima, expresada en mg L^{-1} , de BAK para inhibir la acción de bacterias, hongos y algas (PETROCCI, 1983). En cuanto a sus propiedades antivirales ha resultado efectivo con virus lipofílicos como el *Pseudorabies* y (él) de la gastroenteritis (TGEV). Otros casos

estudiados han sido los del virus de la hepatitis A y el más espectacular por las esperanzas que despertó puntualmente, el de la inmunodeficiencia adquirida.

Si se revisa más concretamente las aplicaciones del BAK en el campo sanitario lo encontramos como desinfectante de instrumental dental (CRAWFORD, 1983) o como antiséptico para la piel en alcoholes, apósitos, etc., usados por humanos y animales (NAKASHIMA y col., 1987). También es empleado en la industria en los lavados y tratamiento de textiles, para la limpieza de los equipos de la transformación de lácteos (KROG Y MARSHALL, 1940). Inclusive se han estudiado los efectos inhibitorios sobre cepas de cultivos para iniciar la fermentación (GUIRGUIS Y HICKEY, 1987).

Tabla IV-1. Concentración mínima de cloruro de benzalconio necesaria para inhibir la acción de bacterias, hongos y algas.

		BAK (mg L ⁻¹)
Bacterias	<i>Escherichia coli</i>	200
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	300
	<i>Bacillus subtilis</i>	3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4
Hongos	<i>Aspergillus niger</i>	300
	<i>Chaetomium globosum</i>	30
	<i>Myrothecium verrucaria</i>	300
	<i>Trichoderma viridae</i>	200
Algas	<i>Anabaena cylindrica</i>	1
	<i>Chlorella vulgaris</i>	1
	<i>Oscillatoria tenuis</i>	0,6
	<i>Stigeoclonium sp.</i>	0,7

3. TÉCNICAS ANALÍTICAS APLICADAS A LA DETERMINACIÓN DEL BAK

Se inicia este apartado con la revisión de los métodos analíticos incluidos en las farmacopeas americana y europea. De las dos farmacopeas consultadas, es la americana (USP, 1995) la única que establece una especificación para el contenido de los homólogos con mayor poder antibacteriano; individualmente el $C_{12}H_{25}$, será mayor del 40%, expresado sobre la base anhidra, el $C_{14}H_{29}$ >20% y la suma de ambos representará como mínimo el 70% del total. La determinación de los homólogos se lleva a cabo por HPLC, con una columna ciano como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo y tampón acetato; se especifican parámetros cromatográficos como la resolución, la eficacia y se aplica un peso molecular medio para el compuesto de 360. El resto de la analítica consta de dos ensayos de identificación, una determinación de agua, de residuo seco, una prueba de solubilidad, un análisis cualitativo de aminas extrañas y un análisis cuantitativo del cloruro de benzalconio con una volumetría por extracción en dos fases orgánica y acuosa.

La farmacopea europea propone hasta cuatro procedimientos de identificación, uno de ellos basado en la espectroscopía. Tiene análisis comunes con la USP: determinación de agua, cenizas sulfatadas, prueba de solubilidad y análisis cuantitativo de cloruro de benzalconio. En la prueba cualitativa de aminas introduce las sales de aminas y la acidez que no eran consideradas en la farmacopea americana. También el peso molecular es ligeramente inferior 354 y no hay ninguna referencia a la composición de las cadenas alquílicas. En ambas se consideran separadamente el BAK en disolución y el sólido con las rectificaciones

de concentración pertinentes. Otras farmacopeas como la británica y la española son análogas a ésta.

Algunos análisis volumétricos específicos de los QUAT revisados en la introducción han sido aplicados al análisis del BAK. Seguramente el método más extendido es el recogido por las normas ASTM, e ISO aunque se han ensayado variantes como la propuesta por UNO y col. (1960), valoración en una fase con tetrafenilborato sódico (STPB) como disolución valorante e indicador naranja de metilo a pH=3. También con STPB pero en una valoración en dos fases y con azul de bromofenol, PATEL y ANDERSON (1958) valoraron además de BAK, cloruro de benzetonio y cetilpiridinio. Asimismo el BAK puede sustituir al STPB en el método de Epton para el análisis de tensioactivos aniónicos (EPTON, 1948).

Una opción a los métodos volumétricos clásicos, para el análisis de rutina en una planta industrial, son las potenciometrías con electrodos selectivos de iones. No obstante, la aplicación al BAK sólo está documentada para la evaluación de la concentración micelar crítica de los homólogos, cloruro de tetradecilbencilamonio y para el bromuro de dodecilbencilamonio (QIAN y col., 1988). Más recientemente, CAMPANELLA y col., 1998 fabricaron un electrodo sensible a los tensioactivos catiónicos con el que determinaron BAK en cinco formulaciones comerciales: dos desinfectantes (0,2 y 4% de BAK) y tres colirios (0,01% BAK).

Una segunda alternativa lo constituyen los métodos electroquímicos, polarográficos y tensamétricos (basados en el comportamiento de adsorción entre la superficie de la disolución y el electrodo metálico). BOSS (1982) con una tensametría de pulsos para la determinación de punto final y con dodecilsulfato

sódico como valorante cuantifica BAK en una mezcla de tensioactivos catiónicos entre los que se encuentra el cloruro de benzetonio (Hyamine® 1622).

Pese a que, en un primer acercamiento, la cromatografía de gases no parece la más adecuada para el análisis del compuesto objeto de estudio, debido a la baja volatilidad de éste, la bibliografía cuenta con un amplio número de referencias. El problema de su análisis ha sido resuelto por dos vías: con degradación mediante hidrogenación obteniendo la alquilamina y tolueno (WARRINGTON, 1961) o por degradación de Hofmann rindiendo también la dimetilalquilamina (TAKANO y col., 1977) y, vía derivatización a tricloroetilcarbamatos y cianamidas (ABIDI, 1980).

El análisis por degradación puede tener lugar en la columna (METCALFE, 1963), en la célula de inyección (TAKANO y col., 1977b) o después de un tedioso proceso de degradación con otros tensioactivos catiónicos (al menos 1 h) fuera del sistema cromatográfico (TAKANO y col., 1977a) con metóxido sódico o terbutóxido de potásico (SUZUKI y col., 1989).

Pero la pirólisis sin tratamiento previo también ha sido ensayada con éxito (CYBULSKI, 1984) con una inyección a 250°C, la temperatura del detector de ionización de llama (FID) a 350°C y un gradiente de temperatura de 100 a 280 en 8°C min⁻¹. De los productos resultantes, dimetilalquilaminas y bencilmetilaminas se determinó la distribución de las cadenas alquílicas con buena exactitud pero fue necesario un tratamiento previo de silanización de la columna. Asimismo, NG y col. (1986) cuantifican el porcentaje de las cadenas alquílicas por cromatografía de gases capilar con FID y un programa de temperatura que mantiene la temperatura a 100°C durante 2 minutos y después realiza un aumento lineal a 10°C min⁻¹ hasta 280°C.

La cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas se ha aplicado para la elaboración de un método de rutina que permita la determinación de BAK en matrices medioambientales: agua de ríos y efluentes industriales (DING Y LIAO, 2001). El pretratamiento de las muestras se realiza con extracción en fase sólida usando laurilsulfato sódico como contraión y su análisis cromatográfico con degradación de Hofmann optimizada en función del tratamiento previo. Los resultados de las muestras fueron compatibles con los obtenidos mediante HPLC.

La cromatografía de capa fina, ha resultado ser una técnica muy efectiva para el análisis de cloruro de benzalconio. De ZEEUW y col. (1976) consiguen límites de detección del orden de ng con gel de sílice 60, eluyendo con NaBr e NaI y utilizando agente revelador iodoplatinato y el reactivo de Dragendorff. MICHELSEN (1978) determina, entre otros catiónicos, el cloruro de miristilbencildimetilamonio, desarrollando con una mezcla de acetato de etilo/ácido acético/agua y revelando con el reactivo de Dragendorff en una cuantificación densitométrica a 525 nm para un rango de concentración entre 0,002 a 1 mg L⁻¹.

Al ser el HPLC, una de las técnicas usadas para el análisis del BAK en esta Tesis Doctoral y sobre todo por contar con una amplia bibliografía, se intenta realizar un exhaustivo resumen de las ventajas, limitaciones, objetivos y matrices en las que se determina BAK. La bibliografía en electroforesis capilar, una técnica nueva que tiene su desarrollo en los años 90, conjuntamente con un análisis comparativo con HPLC se examina en el capítulo VI cuando se presenten los resultados obtenidos al aplicarlas a compuestos cuaternarios, entre ellos el BAK.

El primer problema planteado para el BAK en HPLC es resolver su naturaleza multicomponente, es decir la cadena homóloga. La buena solubilidad

en agua y disolventes orgánicos así como su absorción en UV por el grupo bencilo, que forma parte de su molécula, hacen que la cromatografía de líquidos sea una de las técnicas de elección para su análisis.

NAKAE y col. (1977) con una columna de gel poliestireno-divinilbenceno de 50 cm termostalizada y con una fase móvil de 0,1 M de HClO₄ en metanol separan la cadena homóloga de C₈ a C₁₈ con tiempos de elución entre 10-30 min estableciendo una relación lineal entre el factor de capacidad y el número de carbonos de las cadenas alquílicas. ABIDI (1985) elabora uno de los artículos más extensos sobre la separación de homólogos (C₈ a C₁₈) chequeando tres tipos de fase estacionaria (octadecilsilano, fenilpropilsilano y cianopropilsilano) y mezclas de fase móvil (agua/THF, agua/metanol y agua/acetonitrilo), variando la concentración del tampón (0,01 a 0,25 M), el pH del tampón de 2 a 6 y distintos contraiones: dihidrógeno fosfato, (metano-, propano-, butano-, hexano-, octano- y dimetilciclohexano-) sulfonato y perclorato. Los valores recogidos constituyen una valiosa información sobre la selectividad del compuesto. En un trabajo posterior, ABIDI (1986) elimina el tampón usando una columna de gel de sílice enlazada con ciclodextrina y mezclas agua/acetonitrilo y agua/metanol como fases móviles, verificando que la adición de algunos tampones mejora la resolución.

La aplicación del análisis del BAK a muestras reales se ha llevado a cabo en un número bastante considerable de formulaciones farmacéuticas donde el BAK se encuentra a bajas concentraciones (50-100 mg L⁻¹).

Los principales problemas asociados a estas matrices son las interferencias presentadas por principios activos de altos coeficientes de extinción y/o la baja solubilidad de los excipientes de la formulación en los eluyentes ensayados en la separación cromatográfica. MEYER (1980) determina en una preparación oftálmica

experimental, que presentaba una concentración de BAK de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, el porcentaje de los tres homólogos principales (C_{12} , C_{14} , C_{16}) con las condiciones cromatográficas propuestas por la USP, en menos de 13 min. Encuentra diferencias en la cadena dependiendo de las fuentes comerciales.

Sin embargo MARSH y TAKAHASHI (1983) y AMBRUS y col. (1987) trabajando con formulaciones oftálmicas que contienen BAK a concentraciones de $40\text{-}50 \mu\text{g mL}^{-1}$ encuentran problemas de interferencias con alcaloides, alcoholes poliméricos, esteroides en suspensión, antibióticos y aminas fisiológicamente activas que resuelven por distintas vías. Los primeros complejan BAK con naranja de metilo y lo extraen con dicloroetano obteniendo recuperaciones aceptables. Las condiciones cromatográficas son similares a las de Meyer (1980) a excepción del tampón. Los segundos resuelven el problema con dos condiciones de separación que tienen en común una fase móvil compuesta por agua/acetonitrilo a pH ácido y se diferencian en un segundo modificador orgánico, en un caso con isopropanol y en el otro con tetrahidrofurano, lo que le permite primero disolver la muestra y después separarla en una columna ciano a una longitud de onda en la que BAK es más sensible, 214 nm.

Otros dos autores estudian este tipo de preparaciones, así GÓMEZ- GOMAR y col. (1990), con columna ciano, detección a 215 nm y una fase móvil con agua-acetonitrilo y trietilamina presenta una optimización de la separación muy interesante al estar basada en los modelos de mecanismos cromatográficos para compuestos cuaternarios. El método se ensaya para 21 excipientes y 26 ingredientes activos comunes en los colirios, encontrándose tres interferencias a la que se les dan soluciones particulares. ELROD y col. (1992) con unas condiciones cromatográficas similares a las de AMBRUS y col. (1987), ensaya dos

procedimientos para solventar las interferencias de los excipientes: la extracción en fase sólida con cartuchos C₁₈ o un sistema de precolumna automatizado en el equipo cromatográfico. Las recuperaciones analíticas obtenidas son muy buenas y además en ambos casos se consigue concentrar la muestra, con la mejora en la sensibilidad del método.

Algunos trabajos (PARKIN, 1993), abordan las bajas concentraciones de BAK en las muestras, con técnicas específicas de preconcentración como *salting-out*, consistente en una extracción en acetona y acetonitrilo con altos contenidos de electrolitos inertes, en este caso NaCl. Sin embargo el método no se aplica a ninguna matriz real.

Un estudio biomédico para controlar la absorción de BAK en sangre realizado por BLEAU y DESAULNIERS (1989) consigue resolver el inconveniente de la dilución con una previa extracción en fase sólida, y una posterior con disolventes orgánicos con indicador azul de bromofenol. Se usa BAK marcado como patrón, obteniendo un límite de detección muy bajo (0,005 µg mL⁻¹). La aplicación puede ser importante desde el punto toxicológico. Analíticamente la pureza del BAK patrón es determinada por un análisis por GC-MS.

En otro tipo de matriz, un producto cosmético, se determina BAK por análisis directo con una columna de fase inversa y diluyendo la muestra en una mezcla THF/agua (BETTERO y col., 1990).

En el ámbito medioambiental, LEVSEN y col. (1993) determinan BAK junto a un compuesto imidazolínico sin separación de los homólogos en aguas residuales. El sistema cromatográfico: columna diol, fase móvil: metanol/agua 0,25mM HCl/THF y detector conductimétrico no es el habitual en la bibliografía. El

pretratamiento de la muestra consiste en etapas de extracción con cloroformo y agua y fraccionamiento en columna de alúmina.

Otro trabajo, realizado en la fuente de la emisión es el KÜMMERER y col. (1997) que determinan BAK en los efluentes de cinco hospitales europeos. Es preciso una extracción con fase sólida y una derivatización postcolumna con un reactivo de par iónico fluorescente, para medir concentraciones en un rango 0,05-6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en tiempos de elución menores de los 5 min. Los resultados obtenidos permiten evaluar los hábitos higiénicos sanitarios de los distintos hospitales chequeados.

En los últimos años NORBERG y col. (2000) y FERRER y FURLONG (2001) automatizan conjuntamente el pretratamiento de la muestra con la separación. En el primero de ellos el objetivo del método es obtener un sistema de detección de tensioactivos catiónicos en matrices ambientales de aguas de ríos y residuales y en esta ocasión, el BAK es usado como un compuesto catiónico representativo. Para ello se propone, una extracción líquido-líquido con membrana microporosa conectada en línea a un sistema cromatográfico, separando los homólogos en fase normal y consiguiendo límites de detección del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$.

Finalmente, FERRER Y FURLONG (2001) combinan extracción en fase sólida *on-line* con cromatografía de líquidos y espectrometría de masas con interfase de electronebulización (*Electrospray, ESI*). Debido a la complejidad de la matriz se emplea una variante con espectrometría de tandem, LC/MS/MS que posibilita la confirmación inequívoca de los tres homólogos del BAK encontrados (C_{12} , C_{14} y C_{16}) después de aislar y fragmentar cada ión molecular. Los límites de detección son muy buenos, del orden de partes por trillón (ng L^{-1}). Seguidamente se aplica el método optimizado al análisis de efluentes procedentes de las plantas de

tratamiento de aguas y de los ríos donde se evacuaban. El estudio permite concluir que el BAK no se degrada en su totalidad. Se cuantifica en concentraciones de $\mu\text{g L}^{-1}$ a la salida de planta, pero no llega a los ríos, lo que parece indicar que queda retenido en sedimentos y lodos.

Otra orientación del análisis de BAK por HPLC fue el desarrollo de métodos para la separación de tensioactivos. NAKAMURA Y MORIKAWA (1982) con una columna C_{18} , fase móvil agua/metanol pero con un refractómetro diferencial (no el habitual UV) separa hasta tres tensioactivos catiónicos distintos: BAK, cloruro de alquiltrimetilamonio y cloruro de alquilpiridinio, así como con sus correspondientes homólogos.

El trabajo de KAWAKAMI y col. (1998) usando la técnica de espectrometría de masas describe una determinación de trazas de BAK en la piel. El límite de cuantificación $1,2 \text{ ng L}^{-1}$ y el rango de lineal $5\text{-}100 \text{ ng L}^{-1}$ son excelentes.

El análisis de los compuestos residuales cloruro de bencilo y los derivados, alcohol bencílico y benzaldehído, constituyen uno de los objetivos de la investigación de esta Tesis Doctoral y, no se ha encontrado en la bibliografía consultada ningún método por HPLC en el cual el cloruro de bencilo fuera determinado en BAK. Hay un artículo, que estudia las características de retención de compuestos policíclicos aromáticos clorados, que incluye el cloruro de bencilo como aromático clorometilado (NILSSON Y COLMSJÖ, 1991). Los posibles subproductos del cloruro de bencilo: alcohol bencílico y benzaldehído han sido determinados por HPLC en una crema farmacéutica por GORMAND y col. (1986). Otros trabajos que hacen referencia al análisis de cloruro de bencilo y sus derivados en diversas matrices y con distintas técnicas serán comentados en el capítulo VII.

4. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS

- Cromatógrafo de líquidos Hitachi-Merck (Tokyo, Japan) equipado con un controlador de gradiente L-500, bomba 655A-12, detector de longitud de onda variable 655A, integrador cromatográfico D-2000 e inyector *Reodyne* con bucle de 20 μL .
- Cromatógrafo de líquidos Waters equipado de sistema de gradiente cuaternario modelo W600MSDS, controlador de gradiente modelo WAT62700, inyector universal U6K modelo WAT062011, detector ultravioleta-visible con red de diodos modelo 991, con sistema de tratamiento de datos PDA.
- Columnas cianopropildimetilsílice LiChrosorb[®], 250 mm x 4 mm x 5 μm y Lichrospher[®], 250 mm x 4 mm x 5 μm (Merck).
- Jeringa Hamilton de 20 μL .
- Matraces aforados de 10, 25 y 50 mL y pipetas de doble aforo 1, 2, 5 y 10 mL.
- Filtros para el filtrado de disolventes de 0,2 μm de MSI Separations.
- Matraz reactor cilíndrico con tapa y capacidad de 0,5 kg.
- Termómetro de control de temperatura con escala de 0-180°C.
- Material fungible de uso corriente en laboratorio.
- Acetonitrilo (Merck) y agua (Scharlau) de calidad para cromatografía.
- Acetato sódico de BDH y ácido acético glacial de Panreac, ambos calidad para análisis.

- Cloruro de bencilo y benzaldehído, para síntesis, de Merck, y alcohol bencílico y tolueno, para análisis, de Panreac.
- Laurimiristildimetilamina, laurildimetilamina, miristildimetilamina; cloruro de bencilo y alcohol isopropílico de distintas fuentes comerciales y de grado técnico.

5. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

5.1. Consideraciones previas

Preparación de disoluciones patrón y muestra de BAK

Se preparan disoluciones concentradas de cloruro de bencilo (3 mg mL^{-1}), benzaldehído (2 mg mL^{-1}) y alcohol bencílico (2 mg mL^{-1}) en acetonitrilo. A partir de las mismas se obtienen las disoluciones de trabajo diluyendo convenientemente con fase móvil. La disolución de BAK se diluye en fase móvil a una concentración final de 10 mg mL^{-1} sobre la base anhidra a excepción de la primera muestra de la cinética (1 mg mL^{-1}).

Condiciones cromatográficas

La separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna ciano con una elución isocrática y en gradiente a flujo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; el volumen de inyección es de $20 \mu\text{L}$ y la detección a 220 nm .

La fase móvil para la elución isocrática consiste en un 45% de tampón acetato ($\text{pH}=5$) y 55% de acetonitrilo (*condiciones A*).

La elución en gradiente comienza con tampón acetato-acetonitrilo (55/45, v/v) hasta los 2,5 min, seguido de una elución lineal hasta 40/60 (hasta el minuto

3) y manteniendo esta proporción hasta el minuto 12. Finalmente, en un tiempo de 3 min se vuelve a condiciones iniciales empleando un gradiente lineal. Varios minutos fueron precisos para la estabilización de la fase móvil (*condiciones B*).

5.2. Identificación de los productos residuales y selección de las condiciones de elución en isocrático

El objetivo inicial de la separación cromatográfica persigue la separación de cloruro de bencilo de los homólogos del BAK en un período corto (razonable) de tiempo. La estrategia adoptada en esta investigación ha sido tomar como punto de partida unas condiciones cromatográficas descritas en la bibliografía para la separación de los homólogos del BAK y adaptarlas para la separación del cloruro de bencilo. Las condiciones elegidas fueron las aconsejadas por la USP (1995) y utilizadas en controles farmacéuticos de rutina y en muchos de los artículos publicados.

Se prueba una columna ciano de longitud 250 mm con las mezclas de tampón/acetonitrilo descritas anteriormente. La USP recomienda entre un 40 a 60% de acetonitrilo que se adaptarán a los requerimientos del sistema cromatográfico. Ensayado el cloruro de bencilo y el cloruro de benzalconio entre 45% y 55% se observó que, el primero eluyó entre 4-2 min y los homólogos (C_{12} , C_{14} y C_{16}) entre 9-25 min y 6-11 min, respectivamente. Con el flujo de trabajo recomendado 2 mL min^{-1} , las presiones del trabajo en el sistema son mayores de 300 bar que, por experiencia, son perjudiciales para la vida media de los fungibles (juntas, filtros...) por lo que se decide bajarlo a $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. En resumen, el cloruro de bencilo se separa de los homólogos y eluye al principio del cromatograma y además el aumento del acetonitrilo en la mezcla provoca una

disminución de la retención en todos los compuestos de interés (figura IV-2). La relación adoptada en función del menor tiempo de elución ha sido 45% de tampón acetato sódico 0,1M a pH=5 y un 55% de acetonitrilo.

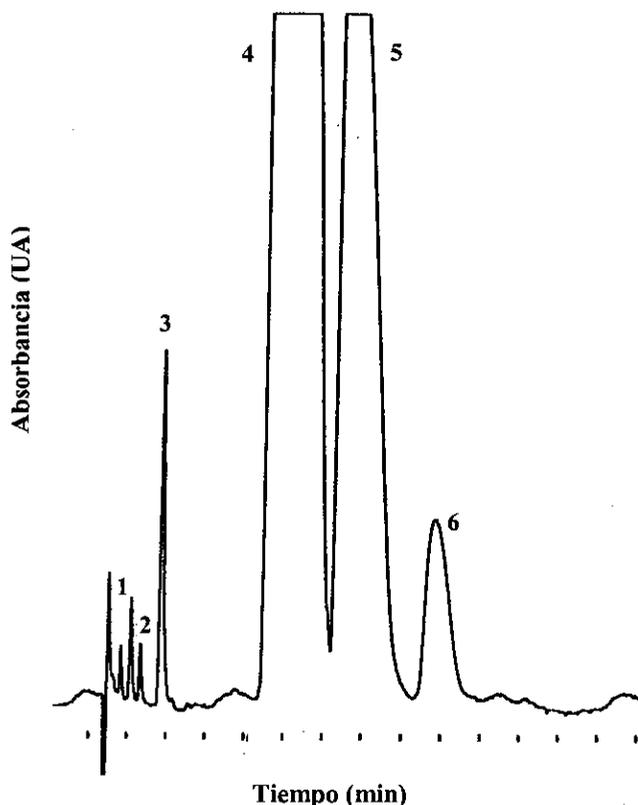


Figura IV-2. Cromatograma de BAK durante una síntesis en elución isocrática. 1. Alcohol bencílico, 2. Benzaldehído, 3. Cloruro de bencilo, 4. Homólogo C₁₂, 5. Homólogo C₁₄, 6. Homólogo C₁₆.

Como la intención es la cuantificación de los productos residuales, la sensibilidad es el parámetro a ajustar en un primer momento. Se intenta, por tanto trabajar en los máximos de absorción de los compuestos a determinar o cercanos a ellos y aumentar la concentración de la muestra inyectada, dentro del límite

impuesto por la solubilidad en los disolventes de la fase móvil y la saturación en el detector. La concentración recomendada por el método de la USP es de 4 mg mL^{-1} en agua; pero se pueden alcanzar los 10 mg mL^{-1} sobre la base anhidra sin menoscabo de la separación de los homólogos (las muestras de trabajo son disoluciones del 50% y del 80%). A concentraciones mayores la separación de las cadenas es parcial.

La farmacopea americana (USP, 1995) propone una longitud de 254 nm , sin embargo la bibliografía consultada revela que este compuesto presenta un máximo de absorción sobre $210\text{-}220 \text{ nm}$. En este último intervalo aumenta también la absorción del cloruro de bencilo.

Al aumentar la concentración de la muestra y detectar el BAK a una longitud de onda más baja en el espectro, los cromatogramas correspondientes presentan nuevos picos en una zona próxima al cloruro de bencilo. Por otra parte, la acidez libre, que se valora volumétricamente, conduce a pensar en la presencia de derivados del cloruro de bencilo como el alcohol bencílico. Sin embargo, conjuntamente con éstos pueden existir compuestos residuales procedentes de impurezas de las materias primas. El cloruro de bencilo comercial puede contener un máximo de benzaldehído de un $0,1\%$, lo que supondría para una disolución de BAK al 50% , un máximo de $0,02\%$. Por ello se inyectan disoluciones patrón de alcohol bencílico y benzaldehído, en las mismas condiciones, observando que los tiempos de retención coinciden con el primer pico después del volumen muerto a $1,9 \text{ min}$ y con otro de los picos $2,2 \text{ min}$, respectivamente, encontrados en las muestras de BAK.

Otro parámetro a optimizar es el disolvente utilizado para solubilizar las muestras. Aunque el método inicial recomienda agua, tanto el cloruro de bencilo

como los derivados poseen una solubilidad alta en acetonitrilo pero no en agua. Sin embargo la serie homóloga del BAK presenta una pobre resolución cromatográfica cuando se disuelve la muestra en acetonitrilo que mejora notablemente al hacerlo en la fase móvil (figura IV-3). Por otra parte, teniendo en cuenta que los primeros picos de las impurezas eluyen con un factor de capacidad bajo, es decir, están cercanos al tiempo muerto parece que la fase móvil es la elección más acertada ya que se eliminarían picos de absorción producidos por el disolvente.

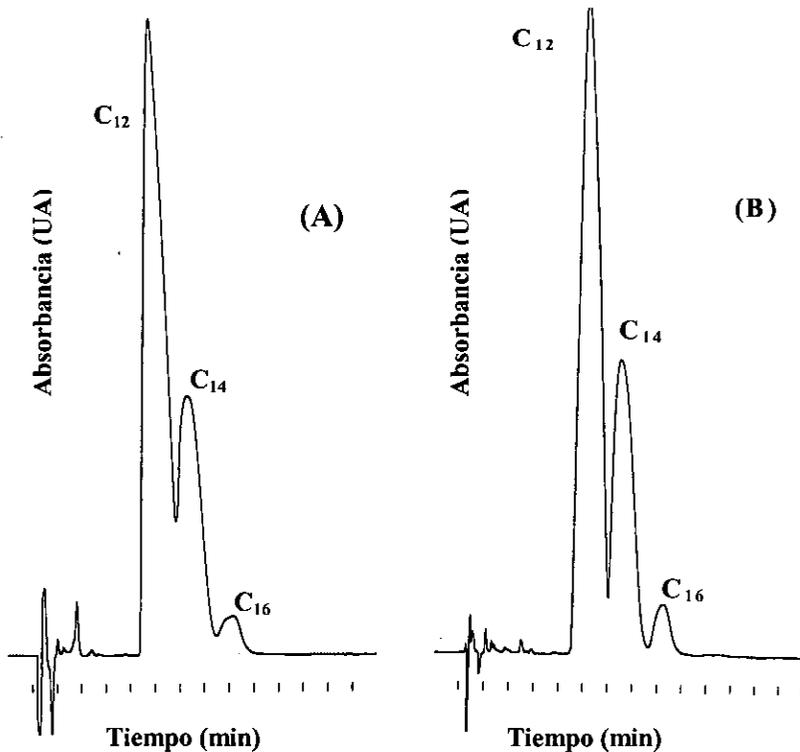


Figura IV-3. Cromatogramas de cloruro de benzalconio al 50% en agua disuelto en: (A) Acetonitrilo y (B) Fase móvil (45% de eluyente acuoso/55% acetonitrilo). La concentración de la disolución inyectada es de 10 mg mL^{-1} sobre la base anhidra.

El siguiente ajuste de condiciones tendrá que ir a una confirmación de los residuales mediante un análisis de pureza de pico con un detector de fotodiodos y la elección de la longitud de onda de trabajo en función de los máximos de absorción. Los residuales presentes en las muestras se confirman como alcohol bencílico y benzaldehído. Los espectros de absorción muestran las siguientes características en el intervalo de 200-380 nm (figura IV-4):

- El alcohol bencílico tiene un máximo entre 210-220nm, la absorción entre 220-270 es muy baja y a partir de 270 no absorbe.
- El benzaldehído exhibe la máxima absorción entre 245-250nm, con otros dos máximos pequeños sobre 210nm y 280nm y a partir de 300 no absorbe.
- El cloruro de bencilo presenta un máximo sobre 220nm y no absorbe a partir de 240nm.
- Los homólogos del BAK poseen dos máximos, el mayor sobre 220nm y otro sobre 260nm. Como era de esperar no se aprecian diferencias entre los espectros de las tres cadenas alquílicas (C_{12} , C_{14} y C_{16}).

A la vista de los datos espectroscópicos de todos los compuestos se elige una longitud de onda de compromiso de 220 nm cercana a los máximos del cloruro de bencilo, cloruro de benzalconio y alcohol bencílico y algo más distanciada de la óptima para el benzaldehído.

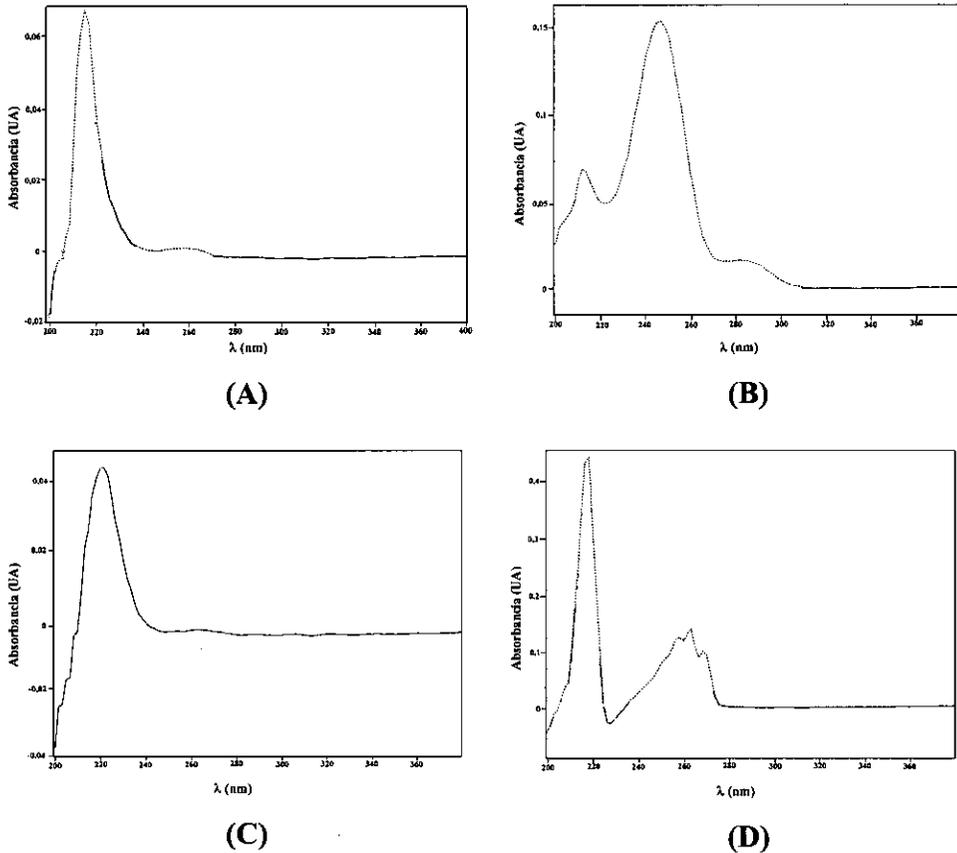


Figura IV-4. Espectro de absorción UV del alcohol bencílico en BAK en el intervalo UV, 200-380 nm : (A) Alcohol bencílico, (B) Benzaldehído, (C) Cloruro de bencilo, (D) homólogo C₁₂.

El método de separación en isocrático puesto a punto se aplica a muestras de BAK sintetizadas con cloruro de bencilo de distintos proveedores pero también con alquildimetilamina de diferentes lotes y en algunos aparece una impureza que con un tiempo de elución ligeramente superior al cloruro de bencilo queda parcialmente solapada con éste, y dificulta su cuantificación.

Aunque fue posible separarla modificando las condiciones isocráticas, los propósitos iniciales de la optimización: separación de cloruro de bencilo y homólogos en un período corto de tiempo, no se podían cumplir en su totalidad puesto que los tiempos de análisis eran demasiado largos.

5.3. Separación de impurezas y selección de las condiciones de elución en gradiente

El cloruro de bencilo con un 45% de tampón acetato/ 55%acetonitrilo eluye en 2,7 min y la impureza sobre 2,9 min. Si se disminuye el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil, la retención del cloruro de bencilo es mayor (3,6 min para 45% de acetonitrilo) y el de la impureza no identificada también (3,9-4,0 min). Sin embargo el incremento sufrido por ambos compuestos no es igual por lo que la selectividad entre los dos aumenta y para un 60% de tampón acetato/40%acetonitrilo, a la concentración de los residuales, tenemos una buena separación. No obstante, en estas condiciones se retrasa la elución de los homólogos y se empobrece su resolución y para una correcta separación del cloruro de bencilo el tiempo de análisis ha aumentado en 10 min.

Por ello se estudian otros parámetros que influyen en la separación de cadena homóloga del BAK como pH y la concentración de tampón. Ninguno de los dos debería tener efectos apreciables en la separación del cloruro de bencilo y la impureza, por lo que pueden ser factores a considerar para resolver tiempos de análisis mayores a causa del retraso de los homólogos.

Si se disminuye el pH de la fase móvil hasta pH=4 con ácido acético, a la longitud de onda de trabajo, la línea de base es más inestable y empeora la

separación de los residuales. Con pH mayores del inicial, pH=7, la retención es mayor para los homólogos del BAK.

En lo que respecta a la concentración de tampón, se ensayan 0,06 y 0,12M para la relación optimizada de 55%agua-45%acetonitrilo (tabla IV-2). La tendencia es que al aumentar la concentración del tampón disminuya la retención y mejore la resolución, no obstante la inicial 0,1 M está muy cercana en el límite de los valores de concentración de tampón recomendables para trabajar en HPLC ya que un uso continuado puede producir problemas de precipitaciones y obstrucciones en el sistema cromatográfico.

Tabla IV-2. Variación del factor de capacidad en función de la concentración del tampón acetato sódico con una relación tampón agua/acetonitrilo de 55/45 y pH=5.

Factor de capacidad (k)	Concentración de tampón		
	0,06 M	0,10 M	0,12 M
Cloruro de bencilo	1,5	1,4	1,4
Impureza	1,6	1,6	1,6
Homólogo C ₁₂	7,0	5,9	5,2
Homólogo C ₁₄	11,5	9,8	8,2
Homólogo C ₁₆	17,9	15,3	12,5

En resumen, el parámetro que juega un papel decisivo en el objetivo planteado es la relación agua/acetonitrilo y por los efectos contrapuestos expuestos con anterioridad parece necesario el empleo de una elución en gradiente.

En la elución en gradiente se toma como punto de partida la etapa isocrática optimizada para el cloruro de bencilo y la impureza. Se toma 55/45 como primera etapa (común para los tres gradientes ensayados) porque aunque la

selectividad es menor que en 60/40, es suficiente y tiene la ventaja de que los homólogos presentan menores tiempos de retención. La segunda etapa del gradiente, que se construye con elución isocrática, deberá incluir un aumento de la cantidad de acetonitrilo para eluir el BAK más rápidamente, así se ensayan relaciones de 50/50 a 40/60 siendo necesaria esta última para que el C₁₆ eluya en un tiempo menor de 15 min. El resumen de los gradientes ensayados se recoge en la tabla IV-3.

Tabla IV-3. Gradientes 1, 2 y 3 ensayados para columna Lichrosorb® con los porcentajes de la fase A (CH₃COONa 0,1M, pH=5) y de B (acetonitrilo).

t (min)	A (%)	CH ₃ CN (%)
0	55 (1, 2, 3)*	45 (1, 2, 3)
2,5	55 (1, 2, 3)	45 (1, 2, 3)
5,5	50 (1), 45 (2), 40 (3)	50 (1), 55 (2), 60 (3)
12	50 (1), 45 (2), 40 (3)	50 (1), 55 (2), 60 (3)
15	55 (1, 2, 3)	45 (1, 2, 3)

*Entre paréntesis se indica el número de gradiente o gradientes.

Los gradientes programados con las dos etapas isocráticas producen una caída en la señal de la línea de base desde el minuto 5 (tiempo en el que ya han eluido los residuales) hasta el minuto 20. Por ello se ha realizado una compensación del blanco en todos los cromatogramas. Al no afectar a los compuestos que se cuantifican no se ha observado ningún problema de reproducibilidad.

Los factores de capacidad obtenidos para todos los compuestos en las distintas condiciones ensayadas se muestran en la tabla IV-4. Los otros residuales estudiados, benzaldehído y alcohol bencílico sufren aumentos en la retención más pequeños que el cloruro de bencilo que no afectan a la separación ya conseguida.

Tabla IV-4. Variación de los factores de capacidad en función de dos eluciones isocráticas y tres en gradiente.

Factor de capacidad (k)	Isocrático*		Gradiente		
	55%A/45%B	60%A/40%B	1	2	3
Cloruro de bencilo	1,4	1,8	1,5	1,5	1,5
Impureza	1,6	2,1	1,6	1,7	1,6
Homólogo C ₁₂	5,9	8,5	5,4	5,4	5,2
Homólogo C ₁₄	9,8	15,7	7,9	7,5	6,7
Homólogo C ₁₆	15,4	n.m.#	11,7	9,7	8,1

*Fase A:CH₃COONa 0,1M, pH=5 y de B: Acetonitrilo.

#n.m. = no medido

Pese a que en el gradiente 3 los tiempos de análisis ya son equiparables a las condiciones isocráticas, entre la primera parte del cromatograma donde eluyen los residuales y la segunda donde eluyen los homólogos hay un intervalo de cinco minutos. Para solucionarlo se acorta el tiempo de introducción de la segunda etapa isocrática al minuto 3. El intervalo de este último gradiente (3min) daría un margen de confianza en el caso de que algunas muestras presentaran niveles de los homólogos de las cadenas más bajas (C₈-C₁₀) o para otras impurezas relacionadas con la cuaternización.

En este punto, parece obligado preguntarse ¿cuál es el mecanismo de interacción del cuaternario con las fases estacionaria y móvil en la separación? GÓMEZ-GOMAR y col. (1990) ya habían detectado este aumento de la retención con la disminución del acetonitrilo de la fase móvil. La justificación apuntaba a que al aumentar la polaridad de la fase móvil por la disminución de acetonitrilo, se producía un aumento de la interacción hidrofóbica entre los BAK y el grupo cianopropil de la fase estacionaria. Estos autores a su vez hacen referencia al

trabajo teórico de KIEL y col. (1985) en el que se discute un mecanismo de interacción de cuaternarios basado en contribuciones hidrofóbicas e iónicas.

Se ha probado a disminuir la longitud de la columna de 250 a 125 mm para estudiar a continuación su influencia en la separación. Con la longitud de la columna, se ha incluido otra variante: la forma de la partícula que constituye la fase estacionaria. En la columna de trabajo, Lichrosorb[®], el relleno de sílice funcionalizada es irregular; en la Lichrospher[®], es esférica.

Para una separación semejante de la impureza y del cloruro de bencilo en Lichrospher[®] se ajusta el flujo a 1 mL min⁻¹ y las condiciones isocráticas a tampón/acetonitrilo 60:40 y se ensayaron tres gradientes (tabla IV-5).

Tabla IV-5. Gradientes 1, 2 y 3 ensayados para columna Lichrospher con los porcentajes de la fase acuosa A (CH₃COONa 0,1M, pH=5) y de B (acetonitrilo).

<u>Gradiente 1</u>			<u>Gradiente 2, 3</u>		
t (min)	A(%)	B(%)	t (min)	A(%)	B(%)
0	60	40	0	60 (2, 3)	40 (2, 3)
15	55	45	2,5	60 (2, 3)	60 (2, 3)
20	60	40	5,5	55 (2), 45 (3)	45 (2), 55 (3)
			12	55 (2), 45 (3)	45 (2), 55 (3)
			15	60 (2, 3)	40 (2, 3)

Para el gradiente 1, los tres homólogos eluyen entre 8 y 20 min e introduciendo una etapa isocrática desde el minuto 5 el tiempo total sólo se acorta 3 minutos (gradiente 2). En el gradiente 3, manteniendo la primera etapa y aumentando, como ya se había hecho en Lichrosorb, 15 unidades la proporción de acetonitrilo se consigue una separación en 13 minutos equivalente a la obtenida con la columna de trabajo.

La comparación de los resultados obtenidos en muestras de síntesis de laboratorio indican que los picos de la serie homologa son más anchos y están peor resueltos en Lichrospher que en Lichrosorb, sobre todo para C_{12} y C_{14} (figura IV-4).

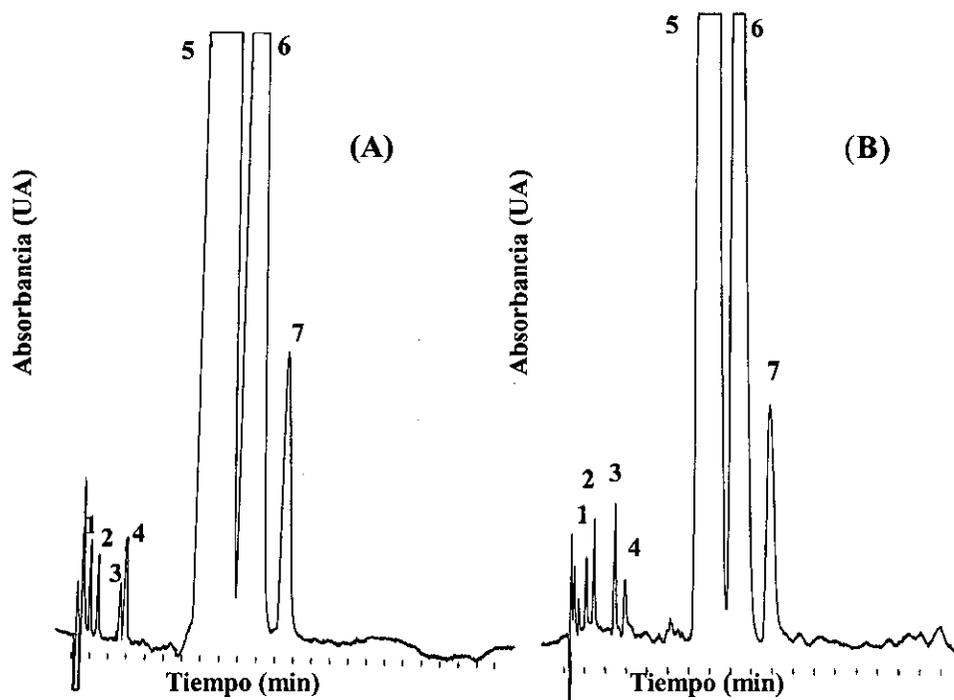


Figura IV-5. Cromatogramas de BAK procedentes de síntesis en elución en gradiente: (A) Lichrospher-CN 125x4mm, (B) Lichrosorb-CN 250x4mm. 1. Alcohol bencílico, 2. Benzaldehído, 3. Cloruro de bencilo, 4. Impureza no identificada, 5. Homólogo C_{12} , 6. Homólogo C_{14} , 7. Homólogo C_{16} .

Por tanto el gradiente 3 en Lichrospher (125 mm) será válido pero se elige Lichrosorb (250 mm) debido a la mejor resolución de los picos.

5.4. Análisis cuantitativo: Precisión, rango lineal y límite de detección y cuantificación

La precisión para cloruro de bencilo se evalúa a dos concentraciones, elegidas entre los niveles más habituales en las muestras, resultando los siguientes coeficientes de variación (10 repeticiones) de 0,23% y 1,6% para concentraciones de $28 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. La precisión para los compuestos derivados se ha realizado a una única concentración y los resultados de 1,8% a $9,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el benzadehído y de 1,7% a $3,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el alcohol bencílico, indican que son satisfactorios.

Para la cuantificación, se utiliza el método del patrón externo con patrones comerciales de los tres compuestos a cuantificar. Así, se establece el rango lineal entre concentraciones conocidas de patrones y las alturas de los picos resultantes en el cromatograma. Se elige la altura en vez del área como medida del pico cromatográfico al conseguir en el cromatograma, picos agudos y estrechos del cloruro de bencilo y derivados, no observando merma ni valores anormales de la precisión para esta técnica.

Los rangos de concentración están referidos a las disoluciones introducidas en el sistema cromatográfico con $20 \mu\text{L}$ de inyección. Los puntos experimentales que son la media de al menos dos inyecciones por cada patrón, se ajustan mediante regresión por mínimos cuadrados obteniéndose las ecuaciones que se indican en las tabla IV-6, con coeficientes de regresión $>0,9980$. La linealidad se estudia, tanto en régimen isocrático como en gradiente, para todos los compuestos y a cinco niveles de concentración.

Tabla IV-6. Parámetros del análisis cuantitativo en los dos modos de elución optimizados: isocrático y gradiente.

Compuesto	Elución	Rango lineal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$y = a + b x$
Cloruro de bencilo	Isocrática	0,9-70	$a=2019,5; b=1370$
	Gradiente	0,4-70	$a=930, b=1112$
Benzaldehído	Isocrática	0,8-60	$a=762, b=637$
	Gradiente	0,8-10	$a=101, b=638$
Alcohol bencílico	Isocrática	0,8-60	$a=2560, b=324$
	Gradiente	0,8-10	$a=2908, b=176$

Las condiciones de elución son las descritas en el apartado de condiciones cromatográficas (condiciones A y B).

Además se calcula el límite de detección y cuantificación para el cloruro de bencilo con el método propuesto por MILLER y MILLER, 1988 que emplea la parte de la recta de calibración cercana al origen. El límite de detección y cuantificación se recogen en la tabla IV-7 mostrándose también la concentración que representarían referidas a una muestra de BAK.

Tabla IV-7. Parámetros para el análisis cuantitativo del cloruro de bencilo (CIB).

	CIB	CIB en BAK
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,076	3,8
LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	12,5

6. APLICACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO EN LA SÍNTESIS DEL BAK

Los dos primeros objetivos marcados al comienzo del trabajo: la determinación de cloruro de bencilo residual y el análisis conjunto de éste con la serie homóloga del cloruro de benzalconio están cumplidos. Se intenta ahora establecer las condiciones de síntesis más favorables para la eliminación del

cloruro de bencilo en el menor tiempo posible y el estudio de los subproductos formados. Con este propósito se realiza un seguimiento de la cinética del alcohol bencílico, benzaldehído y cloruro de bencilo considerando los siguientes parámetros de la reacción: presencia de un catalizador inorgánico, exceso de la amina terciaria, longitud de la cadena alifática de la amina y disolvente en el que se lleva a cabo la reacción.

La reacción transcurre en dos etapas, en la primera tiene lugar la formación del cuaternario en más de un 90%, en una mezcla no homogénea producto de la insolubilidad de los reactivos en agua. Es una etapa muy rápida que tiene lugar aproximadamente de 20 a 45 min desde que comienza el calentamiento hasta que se alcanza los 80°C. La segunda etapa en la que se realiza el seguimiento del cloruro de bencilo residual, comienza cuando la disolución está transparente, una vez que con la exotermia de la reacción la temperatura sube a 80°C. Es una etapa más larga que la primera y es aquí donde se estudian los efectos de las variables de la reacción antes mencionados.

6.1. Consideraciones previas

Síntesis de BAK

Una mezcla de alquildimetilamina (110 g; 0,49 mol), cloruro de bencilo (62 g; 0,49 mol) y 172 mL de agua o alcohol isopropílico se calienta a 50°C. Cuando se alcanza esta temperatura, se para el calentamiento y la temperatura aumenta hasta a 80°C debido a la exotermia de la reacción. A esta temperatura, la mezcla se vuelve transparente y se toma la primera muestra para el estudio de la cinética. La reacción se mantiene a 80°C y se toman varias muestras, a diferentes intervalos de tiempo, hasta que el cloruro de bencilo se consume totalmente. Se verifica

(diferentes inyecciones realizadas en varios días) que la reacción se detiene cuando las muestras se diluyen a la concentración del análisis.

6.2. Síntesis en disolución acuosa al 50% en presencia de un catalizador inorgánico

Como el compuesto estudiado, el cloruro de benzalconio, se forma con un mol de cada uno de los reactivos que intervienen en la síntesis (la amina terciaria y el cloruro de bencilo) se realiza la primera síntesis con esta relación molar y al 50% de disolución acuosa, al ser ésta una concentración comercial muy habitual.

La primera etapa se lleva a cabo en 20 minutos estando la mezcla prácticamente transparente a 74°C. En la segunda fase una vez alcanzadas la transparencia y la temperatura de 80°C se toma la primera muestra y, otras dos después de transcurridos 30 y 60 min, respectivamente y a continuación se toman a intervalos regulares de una hora durante cinco horas (figura IV-6). La ecuación cinética de segundo orden a la que han sido ajustados los datos de cloruro de bencilo con catalizador y exceso de amina es de la forma:

$$Y = \frac{A_0}{(1 + A_0 \times C \times t)} + \text{Residual}$$

donde t es el tiempo, Y es la concentración de cloruro de bencilo detectada, A_0 representa los valores iniciales del cloruro de bencilo, C es la constante de velocidad de reacción y el *residual* una constante con dimensiones de concentración.

La separación cromatográfica se lleva a cabo en régimen isocrático y paralelamente al análisis cromatográfico se determina por el método volumétrico la alcalinidad expresada como amina libre (tabla IV-8).

Tabla IV-8. Evolución de la alcalinidad expresada como amina libre (método: UNE 55712:1982) durante la formación de BAK en las siguientes condiciones: disolución acuosa al 50%, sin catalizador y en relación molar cloruro de bencilo/alquilamina (1:1) .

t (min)	0	30	60	130	180	240	300
Alcalinidad (%)	n.c.	0,31	0,13	0,056	0,046	n.d.	n.d.

n.c.= no cuantificado y n.d.= no detectado

El agente cuaternizante ajustado a una ecuación cinética de segundo orden tiene una velocidad lenta de desaparición y al cabo de cinco horas aunque se encuentra en niveles de $\mu\text{g mL}^{-1}$ tiene un valor de 800.

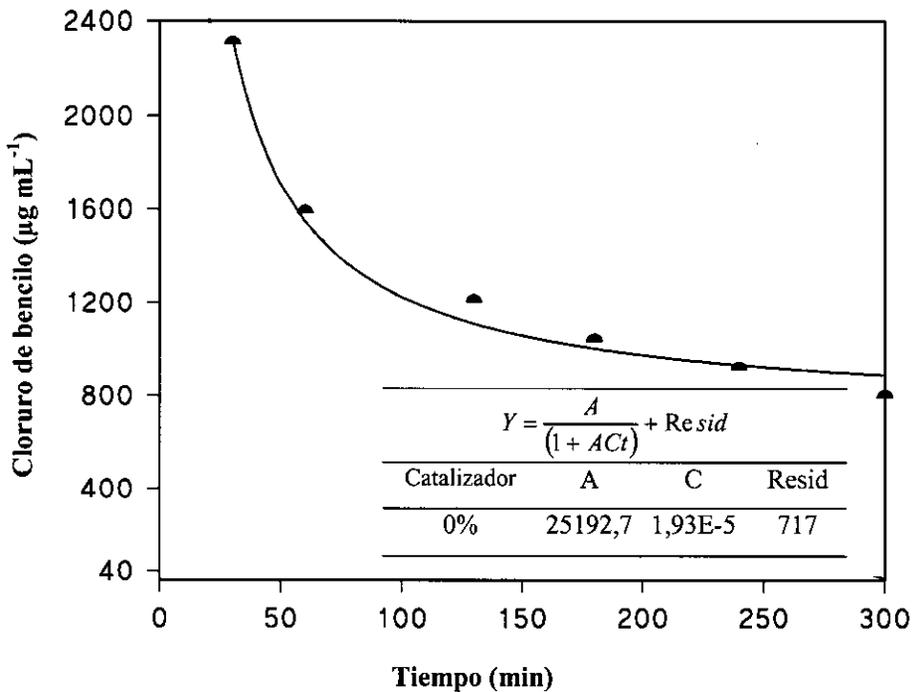


Figura IV-6. Cinética de eliminación del cloruro de bencilo durante la síntesis del BAK al 50% en agua en ausencia de catalizador.

El benzaldehído se ajusta a una ecuación cinética de primer orden $Y = A \exp(-kx) + Resid$ donde $A = -161,2$; $k = 0,02192$ y $Resid = 243,4$. El contenido total en el producto final inferior es $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ y su variación que durante la cinética no alcanza los $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, no está afectada en la fase final por los bajos niveles de amina.

El comportamiento del alcohol bencílico durante la reacción se representa en la figura IV-7. No se ha podido ajustar a ninguna ecuación cinética ya que posee una subida lineal al principio, se estabiliza en el medio y vuelve a subir cuando el método volumétrico ya no detecta amina libre. Se podría pensar que, el aumento del alcohol bencílico en la última hora sea debido a que el cloruro de bencilo libre no tiene amina terciaria para reaccionar.

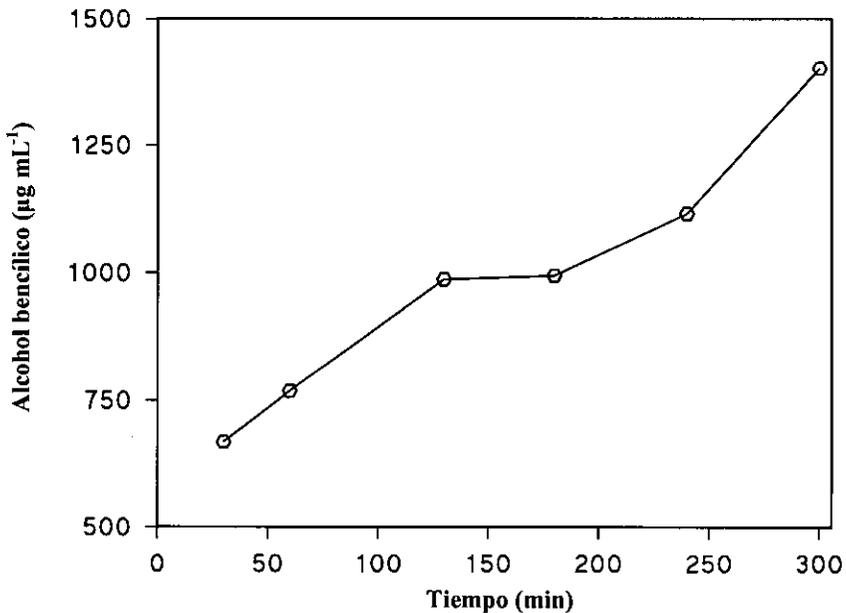


Figura IV-7. Cinética de formación del alcohol bencílico durante al síntesis del BAK al 50% en agua en ausencia de catalizador.

En suma, el cloruro de bencilo se elimina de forma lenta por lo que sería conveniente optimizar la cinética. El benzaldehído presenta niveles bajos y controlables, y el alcohol bencílico puede encontrarse en niveles superiores al 0,1%.

La presencia de un catalizador básico puede posibilitar la formación del cuaternario. Se prueba carbonato sódico en concentraciones en torno al 0,1% y se realiza un seguimiento cromatográfico de la reacción en su última fase, para comprobar, como afecta esta sal inorgánica en la eliminación del cloruro de bencilo y en la formación de sus derivados. Para ello se realizan dos síntesis al 50% en agua con cantidades de catalizador de 0,10 y 0,15% manteniendo la relación molar amina terciaria/cloruro de bencilo en 1:1.

La evolución del cloruro de bencilo durante las dos síntesis se representa comparativamente con la llevada a cabo sin catalizador en la figura IV-8. Los resultados obtenidos pueden resumirse en que, los $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloruro de bencilo a las cinco horas sin catalizador, son 50 con un 0,1% de carbonato sódico y ya no se detecta el cloruro de bencilo a las cuatro horas para un 0,15%. Este efecto tan significativo del catalizador sobre el agente cuaternizante explica su uso y el hecho de que esté afectada la velocidad de eliminación por la concentración del catalizador parece indicar que éste interviene en la etapa determinante de la reacción, formando parte del intermedio. La acción del carbonato de sodio sólo sería posible en síntesis acuosas debido a su insolubilidad en alcoholes.

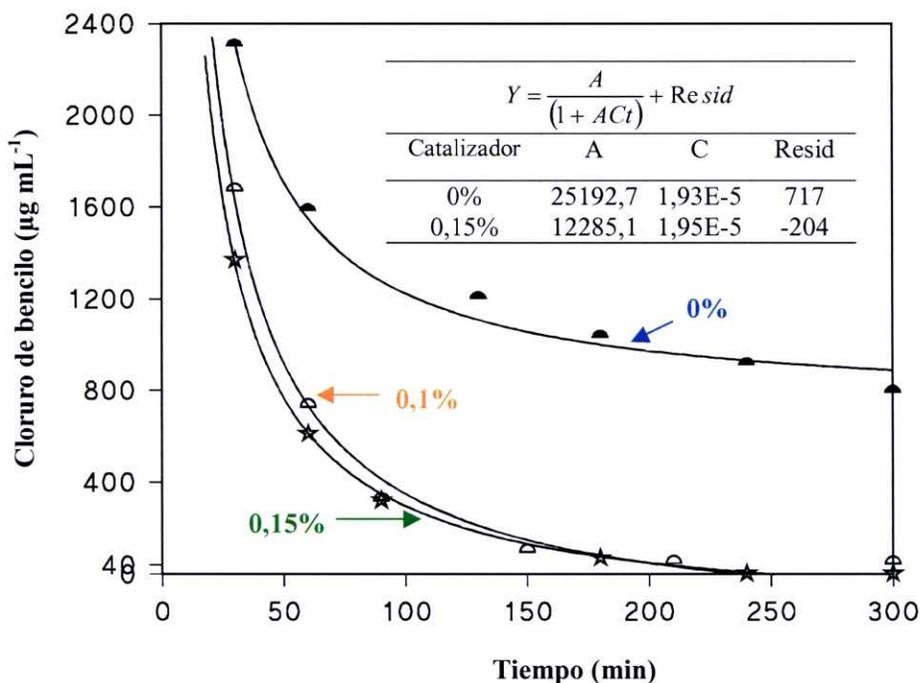


Figura IV-8. Cinéticas de eliminación del cloruro de bencilo, en ausencia y presencia de catalizador (0,1 y 0,15%), durante la síntesis del BAK al 50% en agua.

En cuanto a los subproductos (figura IV-9), el benzaldehído presenta un comportamiento similar para las tres síntesis ajustándose a una ecuación cinética de una monoexponencial de primer orden. Los valores cuantificados aumentan paulatinamente durante la fase de reacción estudiada y finalmente alcanzan valores alrededor de los 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El alcohol bencílico tiene una evolución distinta en las reacciones con y sin catalizador. Cuando está presente el catalizador, los valores suben ligeramente para tender a valores asintóticos sobre 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se ajusta a una ecuación monoexponencial de primer orden. Por lo tanto el catalizador también ayuda a minimizar y controlar la reacción de formación del alcohol bencílico.

La impureza no identificada que eluye muy cercana al agente cuaternizante presenta niveles muy bajos y puede ser separada en la base del pico del cloruro de bencilo.

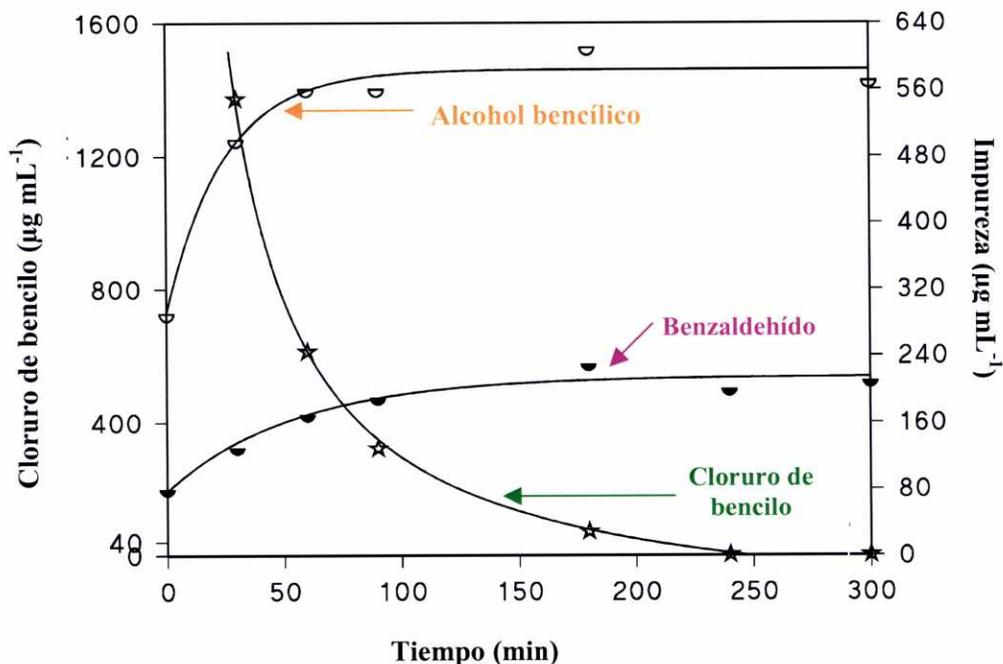


Figura IV-9. Cinéticas de cloruro de bencilo, benzaldehído y alcohol bencílico en presencia de un 0,15% de catalizador, durante la síntesis del BAK al 50% en agua.

Paralelamente al análisis cromatográfico se determina por el método volumétrico (UNE 55712:1982) la alcalinidad expresada como amina libre y los valores obtenidos se representan en la tabla IV-9.

Tabla IV-9. Evolución de la alcalinidad expresada como amina libre (método: UNE 55712:1982) durante la formación de BAK en las siguientes condiciones: disolución acuosa al 50%, con ausencia y presencia de catalizador y en relación molar cloruro de bencilo/alquilamina (1:1).

		t (min)						
		0	30	60	130	180	240	300
Alcalinidad (%)	Catalizador							
	0,0%	n.c	0,31	0,13	0,06	0,05	n.d.	n.d.
	0,10%	3,78	0,74	0,51	0,41	0,35	0,36	n.c.
	0,15%	0,93	0,75	0,59	0,55	0,49	0,47	0,44

n.d.= no detectado y n.c.=no cuantificado

6.3. Síntesis en disolución acuosa al 50% y con exceso de la alquildimetilamina

Si se cotejan las síntesis llevadas a cabo a partir de la cantidad equimolar de reactivos con las realizadas a esta misma relación molar pero con catalizador, se observa que, correlativamente con la mayor velocidad de eliminación del cloruro de bencilo en las reacciones catalizadas, éstas mantienen valores de alcalinidad que tienden a un valor constante, producido por la alcalinidad aportada por el catalizador. Así se plantea que si una alcalinidad residual originada por pequeños excesos del reactivo básico, la alquildimetilamina, ejercerá efectos semejantes a los del catalizador. Se ensayan tres relaciones molares 1:1,01; 1:1,02; 1:1,03 a la concentración del 50% en agua.

En la figura IV-10 se muestra el efecto del exceso de amina en la cinética del cloruro de bencilo a las tres relaciones molares ensayadas.

Con la relación molar 1:1,01 se alcanza un tiempo de eliminación ligeramente menor que el mejor tiempo optimizado en presencia del catalizador (cuatro horas) y se mejora ampliamente con la relación molar 1:1,02 en una hora y media. Incluso para la última relación probada, 1:1,03 una hora fue suficiente; si

bien este exceso de amina provoca un aumento fuerte en la alcalinidad final del BAK formado. Debido a que los excesos de amina libre en el cuaternario están limitados en algunas farmacopeas, como la europea, *la relación molar de 1:1,02 fue la elegida como la más adecuada.*

Resulta en consecuencia, que el exceso de amina tienen una repercusión mayor que el catalizador sobre la velocidad de eliminación del cloruro de bencilo. No obstante, los valores de alcalinidad residual (tabla IV-10) son mayores en las condiciones 1,02 y 1,03, en las cuales los tiempos se reducen drásticamente con respecto a los obtenidos con el uso del catalizador.

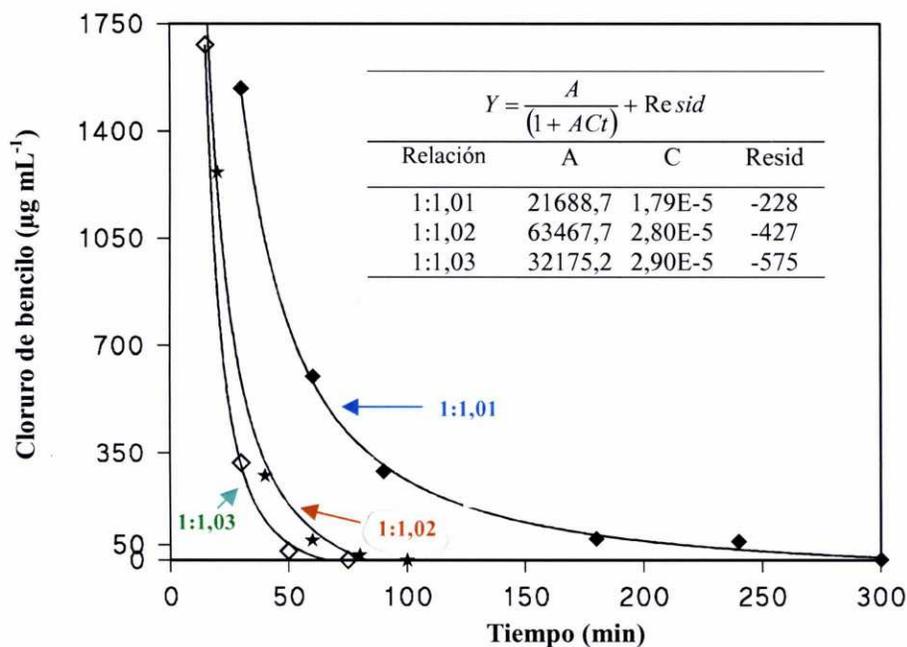


Figura IV-10. Influencia del exceso de amina en la eliminación de cloruro de bencilo durante la síntesis del BAK al 50% en agua.

Tabla IV-10. Evolución de la alcalinidad expresada como amina libre (método: UNE 55712:1982) durante la formación de BAK en las siguientes condiciones: disolución acuosa al 50%, sin catalizador y en relaciones molares cloruro de bencilo/alquilamina (1:1,01; 1:1,02 y 1:1,03).

Relación 1:1,01							
t (min)	0	30	60	90	180	240	300
Alcalinidad (%)	3,59	0,60	0,43	0,40	0,34	0,36	0,34

Relación 1:1,02								
t (min)	0	10	15	20	40	60	80	100
Alcalinidad (%)	9,64	1,00	0,80	0,76	0,71	0,71	n.c.	n.c.

Relación 1:1,03							
t (min)	0	15	30	50	75	100	120
Alcalinidad (%)	6,50	1,33	1,01	0,97	0,93	0,90	0,92

n.c.= no cuantificado

Aunque el valor del tiempo como indicador de la eficacia de un proceso industrial ha sido comentado en otros capítulos, en este método concretamente no se considera el tiempo de análisis sino el tiempo del proceso asociado a una calidad obligatoria del producto desde una perspectiva sanitaria. La optimización del tiempo del proceso condicionada a la eliminación del cloruro de bencilo realizada en una síntesis del laboratorio no es directamente extrapolable al proceso industrial a escala de toneladas pero sí permite detectar las variables críticas.

A la vista de las ecuaciones obtenidas para las relaciones ensayadas (figura IV-10), se observa que a medida que aumenta el exceso de amina de 1,01 a 1,03 hay un incremento de la constante de velocidad de $1,79 \cdot 10^{-5}$ a $2,9 \cdot 10^{-5}$. El primer punto de la curva al que se le asigna $t=0$ se toma en el momento que se alcanza los 80°C y la disolución es transparente y homogénea y en donde la pendiente de la curva es muy grande por lo que pueden existir imprecisiones que serían la causa de la obtención de un término de concentración negativo en la ecuación.

Solamente en la reacción sin catalizador con valores residuales superiores a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presenta un residual positivo.

En estas tres síntesis se ha efectuado la separación con los dos métodos optimizados, elución en isocrático y gradiente. El primero se ha aplicado a la síntesis con relación 1:1,01 pero para las otras relaciones, la impureza que solapa parcialmente el cloruro de bencilo ha obligado el uso de la elución en gradiente para la cuantificación. En principio, la aparición de la impureza podría estar asociada a distintos lotes de cloruro de bencilo ya que la primera síntesis está realizada con un lote distinto de esta materia prima al usado en las otras dos. No obstante, sin la identificación de los picos sería poco riguroso hacer aseveraciones sobre el origen de éstas. El comportamiento en la reacción de la impureza es una disminución a lo largo de la cinética para desaparecer junto con el cloruro de bencilo y la detección de una segunda impureza al final de la cinética, cercana al cloruro de bencilo que permanece en el producto final.

El BAK sintetizado en las tres condiciones descritas contiene cantidades de los subproductos, benzaldehído y alcohol bencílico inferiores a los 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a excepción de la 1:1,01 en la que el alcohol bencílico alcanza los 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. También en las reacciones con el catalizador se observa que valores bajos de alcalinidad propiciaban aumentos en la concentración de alcohol bencílico. No se han podido establecer otras correlaciones entre el exceso de amina y la formación de los subproductos.

6.4. Efecto de la cadena alquílica en la velocidad de la síntesis

La alquildimetilamina cuaternizada para la elaboración del cuaternario presenta un amplio margen en la composición de sus homólogos que viene

definido en sus especificaciones comerciales. La amina usada en este trabajo puede tener unos porcentaje de C_{12} entre 63-75%, C_{14} entre 24-30% y C_{16} , con un 5% como máximo. Pero existen otras alquildimetilaminas comerciales que al poseer un “corte coco”, es decir una distribución alquílica similar a la cadena natural de aceite de coco podrían cumplir también los requisitos exigidos por la farmacopea y ser usadas por tanto para procesar el cloruro de benzalconio. Por ello se estudia el efecto de esta variación en la longitud de la cadenas sobre la velocidad de eliminación del cloruro de bencilo para los dos homólogos principales, C_{12} y C_{14} .

Se utilizan las condiciones seleccionadas en el apartado anterior (relación 1:1,02 a un 50% en agua) usándose una laurildimetilamina con el homólogo $C_{12}H_{25}$ >95% y una miristildimetilamina con el homólogo $C_{14}H_{29}$ >95%. Para la laurildimetilamina, en la primera parte de la reacción, la mezcla se torna transparente cuando alcanza los 60°C, en lugar de los 80°C habituales para la cadena alquílica usada en las restantes síntesis. En la figura IV-11 se representan los datos de eliminación del cloruro de bencilo, observándose un pequeño incremento en la velocidad de reacción al disminuir la longitud de la cadena, así para C_{14} son necesarias más de dos horas para eliminar todo el agente cuaternizante.

Una explicación a este hecho experimental puede encontrarse en las propiedades micelares de los tensioactivos que han sido ampliamente estudiadas, concretamente en su capacidad para constituir agregados microscópicos formados por un gran número de moléculas del mismo compuesto que se encuentran en suspensión en un fluido (micelas). KARABORNI y col. (1996) han requerido, para predecir su comportamiento, un tratamiento termodinámico con modelos que

describen la micelización como un equilibrio múltiple o como una transición de pseudofase. Se pudo establecer relaciones entre la estructura del tensioactivo y su comportamiento micelar a través de medidas de parámetros como la concentración micelar crítica. De este modo, las propiedades micelares pueden estar influidas además de por el tamaño de la cadena por la presencia de una segunda cadena alquílica, grupos funcionales en la cadena, naturaleza del contraión, etc. (ZANA, 1991).

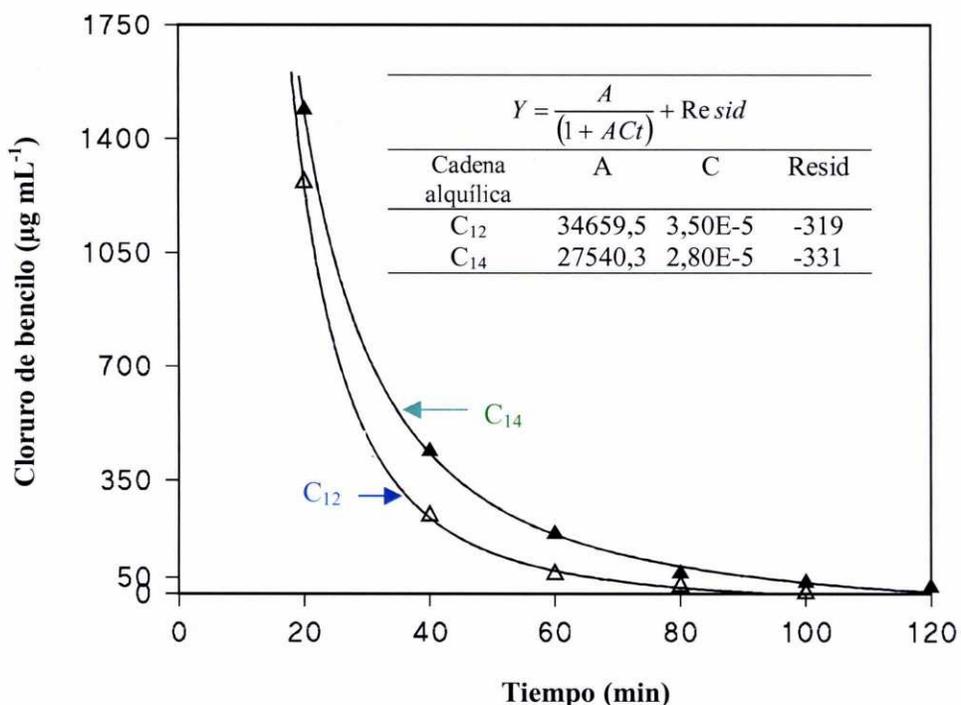


Figura IV-11. Influencia de la cadena alquílica en la eliminación de cloruro de bencilo durante la síntesis del BAK al 50% en agua.

Los compuestos catiónicos en disolventes polares y agua, dependiendo del número de átomos de carbono, poseen una concentración micelar que en el caso

de C_{12} es del orden $1,5 \cdot 10^{-2} M$, y para C_{14} de $3 \cdot 10^{-3} M$ (VAN OS y col., 1993). Luego, la concentración de compuesto C_{12} que permanece en el seno del disolvente sin formar agregados es más alto que en los compuestos que poseen C_{14} . Esto explicaría también que la transparencia o la incorporación a la disolución del cuaternario se produzca antes en C_{12} que con cadenas más altas como las C_{14} . Pero lo más importante es que, como consecuencia, la reacción es más rápida con los compuestos C_{12} que C_{14} y por lo tanto la velocidad de eliminación del agente cuaternizante también es mayor.

También en las síntesis de los homólogos puros, la separación se ha realizado con elución en gradiente detectándose dos impurezas no identificadas que han ido disminuyendo en el seguimiento de la cinética. Los valores de alcohol bencílico y benzaldehído llegan a alcanzar los $550 \mu g mL^{-1}$.

En el caso del C_{12} hay una disminución del alcohol bencílico al final de la cinética y un aumento del benzaldehído siendo los valores finales de éste mayores que para el alcohol y unos de los más altos cuantificados en esta aplicación. Para el C_{14} el aumento del benzaldehído es menor y hay fluctuaciones en los valores del alcohol.

Los valores de alcalinidad obtenidos en estas experiencias se presentan en la tabla IV-11.

Tabla IV-11. Evolución de la alcalinidad expresada como amina libre (método UNE 55712:1982) durante la formación de cloruro de lauralconio (C₁₂) y miristalconio (C₁₄) en las siguientes condiciones: disolución acuosa al 50%, sin catalizador y en relación molar cloruro de bencilo /alquilamina (1:1,02).

C ₁₂								
t (min)	0	20	40	60	80	100		
Alcalinidad (%)	6,85	0,93	0,72	0,66	0,64	0,60		
C ₁₄								
t (min)	0	20	40	60	80	100	120	180
Alcalinidad (%)	6,23	1,05	0,74	0,70	0,67	0,64	0,62	n.c.

n.c.= no cuantificado

6.5. Efecto del disolvente. Síntesis en medio alcohólico

Las formulaciones del cloruro de benzalconio comercial puede presentarse en disolución acuosa o alcohólica. En esta última, para compuestos exclusivamente de uso sanitario, el contenido de alcohol está limitado por las farmacopeas, así la americana (USP, 1995) establece que el BAK no debe contener más de un 10%, la europea (EP, 1985) indica que puede contener alcohol aunque sin especificar la concentración y por último la británica (BP, 1993) señala que el etanol será el alcohol a utilizar.

Recordando que la reacción de formación del BAK transcurre a través de una sustitución nucleófila de la amina terciaria, la velocidad de reacción dependerá del disolvente en el que tiene lugar (REICHART, 1988). Parece entonces necesario, una vez que se han estudiado las variables que afectan a las disoluciones acuosas, examinar si las condiciones optimizadas en la eliminación del agente cuaternizante son asimismo válidas para un medio alcohólico.

El alcohol ensayado es el isopropílico (IPA) que con el etílico es uno de los disolventes alcohólicos presente en las formulaciones. Se usa en una síntesis a concentración del 50% para una relación molar 1:1,02 de cloruro de bencilo/alquilbencilamina. A diferencia de las síntesis en agua, desde el principio de la reacción se produce una mezcla homogénea y esto suscita que el comienzo de la cinética viene marcado solamente por la temperatura máxima (80°C) alcanzada por la exotermia de la reacción.

En la figura IV-12 se comparan los resultados de las dos síntesis de BAK al 50% y a la misma relación molar, en agua y alcohol isopropílico. Los resultados muestran que la velocidad de reacción en IPA es apreciablemente menor que en agua y también que el efecto del exceso de amina es menos importante. De tal forma que al cabo de cinco horas de reacción se encuentran aún $90 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloruro de bencilo. Si se compara con la reacción en medio acuoso, los tiempos de reacción son largos, parecidos a los obtenidos en las primeras síntesis en medio acuoso sin optimizar. La eliminación del cloruro de bencilo hasta los límites de detección tendría que realizarse en un tiempo de reacción superior a las 5 h. A las 20 h de reacción aún queda cloruro de bencilo.

Otro aspecto interesante en las reacciones en medio alcohólico es el estudio de las impurezas identificadas (alcohol bencílico y benzaldehído) y no identificadas (aquellas que coeluyen cercanas al cloruro de bencilo). De las primeras es significativo el que no se haya detectado alcohol bencílico, seguramente porque no hay sustitución nucleófila sobre el cloruro de bencilo en medio alcohólico. El benzaldehído se ha cuantificado con valores sobre $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ que se consideran constantes a lo largo de la cinética. No se puede asegurar si el benzaldehído cuantificado procedía del cloruro de bencilo usado como

¿Por qué?

materia prima o se formó paralelamente con el BAK. En cuanto a las impurezas no identificadas que son las responsables del uso del gradiente en la separación siguen detectándose también en IPA.

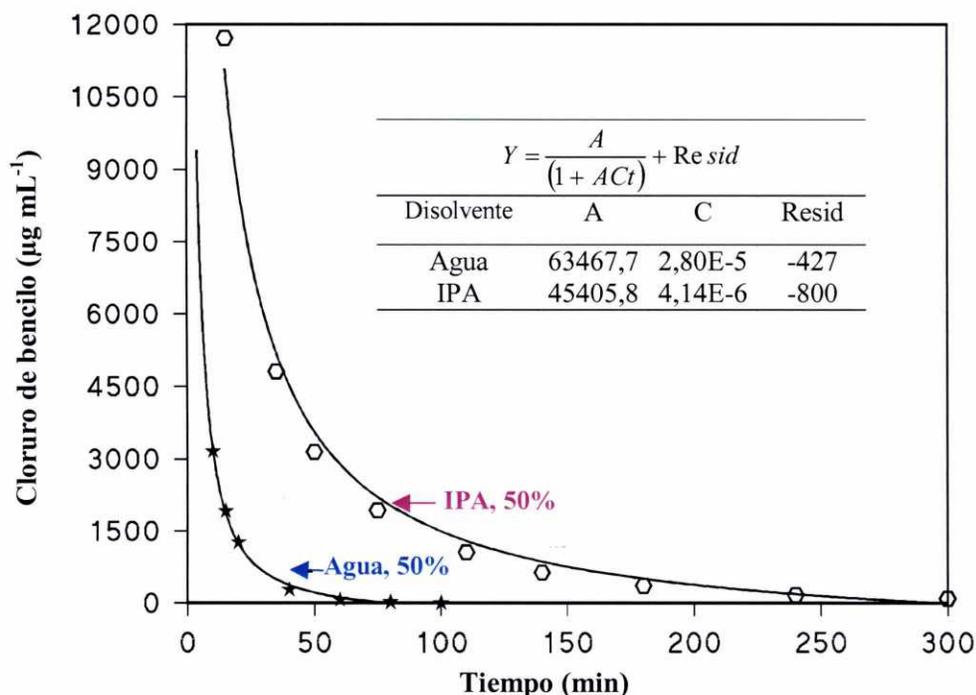


Figura IV-12. Influencia del disolvente en la eliminación de cloruro de bencilo durante la síntesis del BAK al 50% en agua y en IPA y en relación molar cloruro de bencilo/alquilamina (1:1,02).

Se ha realizado una prueba en las condiciones de síntesis que se están describiendo (IPA 50%, 1:1,02) con un mismo lote de dimetilalquilamina y dos lotes de distintos proveedores de cloruro de bencilo. Las diferencias en la formación de impurezas, están en la presencia de cantidades menores de benzaldehído y de la impureza que eluye a 4,1 min.

A continuación se muestran los valores de la alcalinidad durante la síntesis en las condiciones citadas (tabla IV-12).

Tabla IV-12. Evolución de la alcalinidad expresada como amina libre (método UNE 55712:1982) durante la formación del BAK en las siguientes condiciones: disolución en IPA al 50%, sin catalizador y en relación molar cloruro de bencilo/alquilamina (1:1,02).

t (min)	0	15	35	50	75	110	140	180	240	300
Alcalinidad (%)	8,38	2,67	1,39	1,09	0,88	0,70	0,64	0,61	0,56	0,54

6.6. Efecto de la concentración. Síntesis al 50 y al 80% en medio alcohólico

La mayoría de las formulaciones comerciales de BAK en alcohol suelen tener una concentración más alta del 50%. Es, seguramente, las altas viscosidades que alcanzan las formulaciones acuosas a estas concentraciones, uno de los motivos del empleo de alcoholes. La dificultad de manejo se minimiza al sustituir el agua como disolvente, por alcoholes que proporcionan productos menos viscosos.

Concentraciones del 80% de BAK suelen ser típicas en las formulaciones así que se ensaya la síntesis en alcohol isopropílico a esta concentración y con el resto de las condiciones constantes. Los resultados que se muestran en la figura IV-13 indican que la eliminación del cloruro de bencilo aún es más lenta, lo que corrobora la participación del disolvente en la reacción de formación del cuaternario.

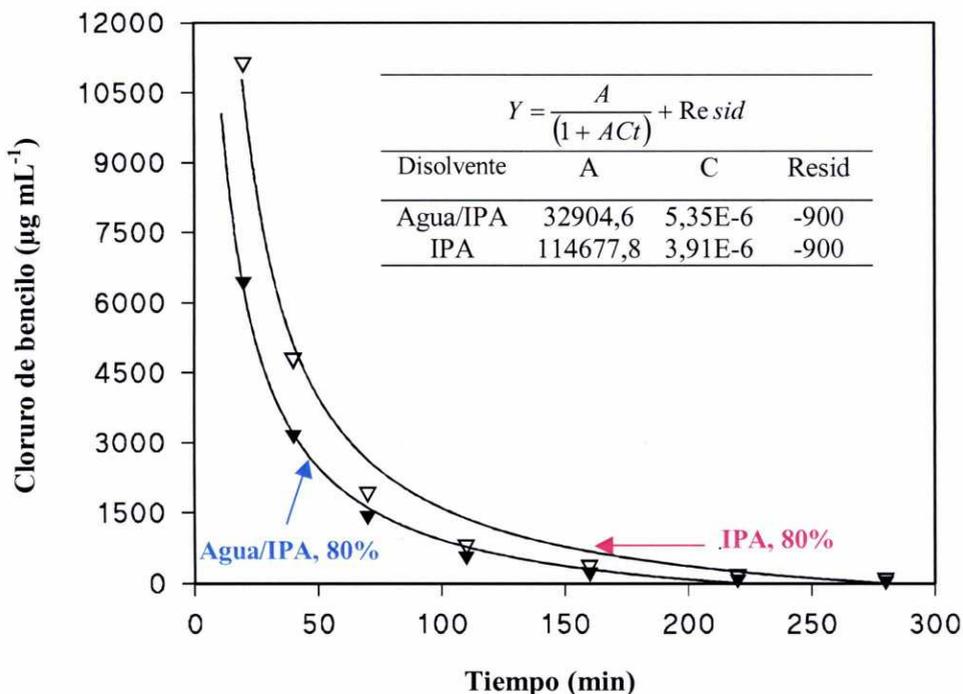


Figura IV-13. Influencia del disolvente en la eliminación de cloruro de bencilo durante la síntesis del BAK al 80% en IPA y agua/IPA y en relación molar cloruro de bencilo/alquilamina (1:1,02).

Con el fin de disminuir el tiempo de eliminación del cloruro de bencilo se añade una pequeña cantidad de agua, un 5% en una segunda síntesis al 80% pero al cabo de cinco horas aún quedan valores residuales del orden de $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A continuación en la tabla IV-13, se indican los valores de alcalinidad obtenidos durante los ensayos anteriores.

Tabla IV-13. Evolución de la alcalinidad expresada como amina libre (método UNE 55712:1982) durante la formación de cloruro de benzalconio en las siguientes condiciones: disolución en IPA y disolución de mezcla de agua/IPA al 80%, sin catalizador y en relación molar cloruro de bencilo/alquilamina (1:1,02).

		t (min)	0	20	40	70	110	160	220	280
Alcalinidad (%)	IPA	23,7	2,82	1,56	1,06	0,84	0,75	0,72	0,70	
	Agua/IPA	6,49	1,85	1,16	0,84	0,68	0,60	0,59	n.c.	

n.c.= no cuantificado

Si se enfoca el objetivo de calidad perseguido en esta aplicación: BAK exento de cloruro de bencilo, desde un punto de vista industrial, una estrategia (pero no la única) tal como una inmovilización del producto en el almacén hasta que no se detecten residuales, podría ser más factible económicamente que un aumento de las horas de reacción. Por lo tanto en lugar de seguir estudiando la cinética en el proceso de síntesis se estudia durante el almacenaje a temperatura ambiente. El cloruro de benzalconio contiene un exceso de amina que representa al final de la reacción una relación molar agente cuaternizante/amina de 1:35 por lo que puede que aún a temperatura ambiente continúe la reacción.

Un seguimiento analítico del cloruro de bencilo que no ha reaccionado en el BAK almacenado a temperatura ambiente indican que la reacción continua, a los tres días restan $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloruro de bencilo y los cuatro días ya no se detecta.

Con respecto a las impurezas identificadas, el alcohol bencílico no se ha detectado y del benzaldehído se han cuantificado valores más altos en la síntesis que contiene un 5% de agua, pero sin superar los $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las impurezas no identificadas, que se han mantenido constantes a lo largo de la cinética, han condicionado el uso de una separación con elución en gradiente.

7. CONCLUSIONES

- El método propuesto permite la separación simultánea por HPLC de los homólogos de cloruro de benzalconio, cloruro de bencilo, alcohol bencílico y benzaldehído usando condiciones de elución en gradiente e isocrático. También otras impurezas han sido separadas pero no identificadas.
- En el análisis cuantitativo se obtiene una buena linealidad y precisión para todos los productos residuales y un aceptable límite de detección para el cloruro de bencilo.
- La aplicación del método a la cinética de los productos residuales en la síntesis de cloruro de benzalconio permite concluir que:
 - El cloruro de bencilo puede ser eliminado en el transcurso de la síntesis o en un tiempo de almacenaje a temperatura ambiente.
 - Un catalizador inorgánico y un pequeño exceso de la alquildimetilamina producen una disminución del tiempo de eliminación, si bien el exceso de amina, a las concentraciones ensayadas, posee una influencia mayor que el catalizador en el tiempo de eliminación.
 - La eliminación del cloruro de bencilo es más rápida cuando se cuaterniza laurildimetilamina que miristildimetilamina, posiblemente debido al comportamiento micelar.
 - La reacción de cloruro de benzalconio en agua es más rápida que en alcohol isopropílico. En este último disolvente no se detecta alcohol bencílico en el BAK.

- La eliminación de cloruro de bencilo en alcohol isopropílico es más rápida a concentraciones más altas de disolvente (al 50% es mayor que al 20%).

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABIDI, S.L. (1980). Gas liquid chromatography of straight chain homologues of alkylbenzyltrimethylammonium compounds. *J. Chromatogr.* **200**, 200.
- ABIDI, L. (1985). Retention behaviour of long chain quaternary ammonium homologues and related nitroso-alkylamines. *J. Chromatogr.* **324**, 209.
- ABIDI, S. L. (1986). Liquid chromatographic of hydrocarbonaceous quaternary amines on cyclodextrin-bonded silica. *J. Chromatogr.* **362**, 33.
- AMBRUS, G.; TAKAHASHI, L.; MARTY, P. (1987). Direct determination of benzalkonium chloride in ophthalmics systems by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **76**, 74.
- BEASLEY, R.; RAGGERTY P.; HOLGATE, S. (1986). Benzalkonium chloride and bronchoconstriction. *The Lancet* **2** **8517**, 1227.
- BETTERO, A.; SEMENZATO, A.; BENASSI, C.A. (1990). Reversed-phase high-performance liquid chromatography applied to the direct analysis of untreated heterophasic systems. *J. Chromatogr.* **507**, 403.
- BLEAU, G.; DESAULNIERS, M. (1989). High-performance liquid chromatographic assay of benzalkonium in plasma. *J. Chromatogr.* **487**, 221.
- BOSS, M. (1982). The tensametric titration of ionic detergents. *Anal. Chim. Acta* **135**, 249.
- BP, BRITISH PHARMACOPEA (1993). Volume I HMSO London.
- BUTTAR, H. S. (1985). Embryotoxicity of benzalkonium chloride in vaginally treated rats. *J. Appl. Toxicol.* **5**, 398.

CAMPANELLA, L.; AIELLO, L.; COLAPICCHIONI, C.; TOMASSETTI, M. (1998). Lidocaine and benzalkonium analysis and titration in drugs using new ISFET devices. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**, 117.

CHALMERS, L.; BATHE, P. (1979). *Chemical specialites domestic and industrial*. Vol. (2) Ed. George Godwin, London.

COLEMAN, J.W., HOLGATE, S.T., CHURCH, H.K.; GODFREY, R.C. (1981). Immunoglobulin E decapeptide induced 5-hydroxytryptamine release from rat peritoneal mast cells. Comparison with corticotropin-(1-24)-peptide, polyarginine, polylysine and antigen. *Biochem. J.* **198**, 615.

CRAWFORD, J.J. (1983), En *Disinfection, Sterilization and Preservation* (S.S. Block, ed.) Lea & Febiger, Philadelphia.

CUTLER, R.A.; CIMIJOTI, E.B., OKOLOWICH, T.J.; WETTEREAU, W.F. (1966). Proceedings of the 53rd Annual Specialites Manufacturer's Association Meeting, en Fredell, Cationic surfactants.

CYBULSKI, Z.R. (1984). Determination of benzalkonium chloride by gas chromatography. *J. Pharm. Sci.* **73**, 1700.

De ZEEUW, R.A.; Van der LAAN, P.E.W.; GREVING, G. E.; van MANSVELT, F.J.W. (1976). Analysis of quaternary ammonium compounds by ion-pair thin layer chromatography on silica gel. *Anal. Lett.* **9**, 831.

DING, W-H., LIAO, Y-H. (2001). Determination of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides in river water and sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/ mass spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 36.

DHILLON, A.S.; WINTERFIELD, R.W.; THACKER, H.L. (1982). Quaternary ammonium compound toxicity in chickens. *Avian Dis.* **26**, 928.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **82**, 377.

DROBECK, H.P. (1994). In *Cationic surfactants: Analytical and biological evaluation*, Surfactant Science Series, Vol. 53, Marcel Dekker, New York.

ELROD, L.; GOLICH, T. G.; MORLEY, J. A. (1992). Determination of benzalkonium chloride in eye care products by high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction or on-line column switching. *J. Chromatogr.* **625**, 362.

EPTON, S.R. (1948). New method for the rapid titrimetric analysis of sodium alkyl sulfates and related compounds. *Trans. Faraday Soc.* **44**, 226.

EP, EUROPEAN PHARMACOPEIA (1985). Council of Europe 2nd edition. Maisonneuve, France.

FERRER, I., FURLONG E. (2001). Identification of alkyl dimethylbenzylammonium surfactants in water samples by solid-phase extraction followed by ion trap LC/MS and LC/MS/MS. *Environ. Sci. Tecnol.* **35**, 2583.

GÓMEZ- GOMAR, A.; GONZALEZ- AUBERT, M.M.; GARCÉS-TORRENTS, J.; COSTA- SEGARRA, J. (1990). Determination of benzalkonium chloride in aqueous ophthalmic preparations by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**, 871.

GORMAND, D.; BRAZIER, J.L.; COMET, F.; LECOMPTE, D. (1986). High-performance liquid chromatographic determination of benzyl alcohol and its degradation product benzaldehyde in a pharmaceutical cream. *J. Chromatogr.* **355**, 345.

GUIRGUIS, N.; HICKEY, M.W. (1987). Factors affecting the performance of thermophilic starters. 1. Sensitivity to dairy sanitizers. *Aust. J. Dairy Technol.* **42**, 11.

HERRERO MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ ALFONSO, E.F.; MONGAY FERNÁNDEZ, C.; RAMIS RAMOS, G. (2000). Determination of cationic surfactants by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with deoxycholate micelles in the presence of large organic solvent concentrations. *J. Chromatogr. A* **895**, 227.

HOLST, R.; MOLLER, H. (1975). One hundred twin pairs patch tested with primary irritants. *Br. J. Dermatol.* **93**, 145.

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. (1986). *Guía de riesgos químicos NIOSH/OSHA*. 2Ed Madrid.

ISO 2871-1. Agents de surface -Détergents-Détermination de la teneur en matière active cationique.

JONO, K.; TAKAYAMA, T.; KUNO, M.; HIGASHIDE, E. (1986). Effect of alkyl chain length of benzalkonium chloride on the bactericidal activity and binding to organic materials. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 4215.

KARABORNI, S.; ESSELINK, K.; SMIT, B. (1996). El baile molecular del aceite y el jabón. *Mundo Científico* **167**, 354.

KAWAKAMI, S.; CALLICOTT, R.H.; ZHANG, N. (1998). Trace analysis of benzalkonium chloride on skin by flow injection ion spray mass spectrometry-mass spectrometry. *Analyst* **123**, 489.

KIEL, J.; MORGAN, S.L.; ABRAMSON, R. (1985). Effects of amine modifiers on retention and peak shape in reversed-phase high- performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **320**, 313.

KROG, A.J.; MARSHALL, C.G. (1940). Alkyldimethylbenzylammonium chloride for sanitization of eating utensils. *Am. J. Pub. Health.* **30**, 341.

KÜMMERER, K.; EITEL, A.; BRAUN, U.; HUBNER, P.; DASCHNER, F.; MASCART, G.; MILANDRI, M.; REINTHALER, F.; VERHOEF, J. (1997). Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **774**, 281.

LEVSEN, K.; EMMRICH, M.; BEHNERT, S. (1993). Determination of dialkyldimethylammonium compounds and other cationic surfactants in sewage water activated sludge. *Fresenius J. Anal. Chem.* **346**, 732.

MACKISON, F.W.; STRICOFF, R.S.; PATRIDGE, J.R.L.J. (1981). *Occupational Health Guidelines for Chemical Hazards*, DHHS (NIOSH) Publication No. 81-123, U.S. Government Printing Office, Washintong, DC.

MARSH, F.; TAKAHASHI, L.T. (1983). Determination of benzalkonium chloride in the presence of interfering alkaloids and polymeric substrates by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **72**, 521.

METCALFE, L.D. (1963). Gas chromatographic analysis of long-chain quaternary ammonium compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **40**, 25.

MEYER, R.C. (1980). Determination of benzalkonium chloride by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *J. Pharm. Sci.* **69**, 1148.

MICHELSEN, E.R. (1978). Quantitative determination of quaternary ammonium bases (QAB) in water and wastewater by thin-layer chromatography. *Tenside Deterg.* **15**, 169.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. (1988). *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed. Ellis Horwood Limited, Chichester, England.

NAKAE, A.; KUNIHIRO, K.; MUTTO, G. (1997). Separation of homologous alkylbenzyltrimethylammonium chlorides and alkylpyridinium halides by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **134**, 459.

NAKAMURA K.; MORIKAWA, Y. (1982). Separation of surfactant mixtures and their homologs by high performance liquid chromatographic. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **59**, 64.

NAKASHIMA, A.K.; McCARTHY, M.A.; MARTONE, W.J.; ANDERSON, R.L. (1987). Epidemic septic arthritis caused by *Serratia marcescens* and associated with a benzalkonium chloride. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1014.

NG, L.-K.; HUPE, M.; HARRIS, A.G. (1986). Direct gas chromatographic method for determining the homologue composition of benzalkonium chloride. *J. Chromatogr.* **351**, 554.

NILSSON, U.L.; COLMSJÖ, A.L. (1991). Retention characteristics of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in normal phase HPLC. I Chloro-Added PAHs. *Chromatographia* **32**, 334.

NORBERG, J.; THORDARSON, E.; MATHIASSEN, L.; JONSSON, J.A. (2000). Microporous membrane liquid-liquid extraction coupled on-line with normal-phase liquid chromatography for the determination of cationic surfactants in river and waste water. *J. Chromatogr. A* **869**, 523.

PARKIN, J.E. (1993). Salting out solvent extraction for pre-concentration of benzalkonium chloride prior to high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **635**, 75.

PATEL, D.M.; ANDERSON, R. A. (1958). Determination of benzethonium chloride. *Drug Std.* **26**, 189.

PETROCCHI, A. N. 1983, *Disinfection, Sterilization and Preservation* (S.S. Block, ed.) Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 309-329 en Cationic surfactants: Analytical and biological evaluation, Surfactant Science Series, Vol. **53**, Marcel Dekker, New York.

QIAN, X.; HU, J.; GAN, P.; GONG, C.; HU, Z. (1988). Cationic surfactant selective electrode. *Fenxi Huaxue.* **16**, 873.

REICHART, C. (1988). *Solvents and solvent effects in Organic Chemistry*, VCH, Germany.

RIEGER, M.M. (1997). The skin irritation potential of quaternaries. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **48**, 307.

SAX, N.I. (1980). *Dangerous Properties of Industrial Materials*, sixth edition. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

STEUBACK, F. (1977). *Acta Pharmacol. Toxicol* **41**, 417 en Cationic Surfactants: Analytical and biological evaluation. *Surfactant Science Series*, Vol. **53**, Marcel Dekker, New York.

SUZUKI, S.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, M.; MORI, K.; WATANABE. (1989). Analysis of benzalkonium chlorides by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **463**, 188.

TAKANO, S.; TAKASAKI, C.; KUNIHURO, K. y YAMANAKA, J. (1977a). Analysis of cationic and amphoteric surfactants I. Determination of their homolog distributions by gas chromatography on the basis of the Wofmann degradation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54**, 139.

TAKANO, S.; KUZUKAWA, M.; YAMANAKA, J. (1977b). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **54**, 484 en Cationic Surfactants: Analytical and biological evaluation. *Surfactant Science Series*, Vol. **53**, Marcel Dekker, New York.

TAYLOR, R.B.; TOASAKSIRI, S.; REID, R.G. (1997). Determination of the quaternary ammonium compounds dequalinium and cetylpyridinium chlorides in candy-based lozenges by high performance liquid chromatography. *Analyst.* **122**, 973.

UNE 55712:1982. Agentes de superficie. Análisis de los cloruros de amonio cuaternario de cadena grasa técnicos. Determinación del índice de ácido y del índice de amina.

UNO, T.; MIYAJIMA, K.; TSUKATANI, H. (1960). Determination of quaternary ammonium salts by sodium tetraphenylborate. *Yakugaku Zasshi* **80**: 153.

USP. (1995). The United States Pharmacopeia and National Formulary, Rockville, MD.

VAN OS, N.M.; HAAK, J.R.; RUPERT, L.A M. (1993). Physico-Chemical Properties of selected anionic, cationic and nonionic surfactants. *Elsevier*, Amsterdam, The Netherlands.

WARRINGTON, H.P. (1961). Determination of homolog distribution of mixed alkylbenzyl dimethyl ammonium chlorides. *Anal. Chem.* **33**, 1898.

WILLIS, C.M.; STEPHENS, C.J.M.; WILKINSON, J.D. (1989). Epidermical damage induced by irritants in man: a light and electron microscopic study. *J. Invest. Dermatol.* **93** (5), 695.

XUNTA DE GALICIA (2000). Límites de exposición profesional para axentes químicos 2000.

ZANA, R. (1991). *Micellization of cationic surfactants* en *Cationic Surfactants physical chemistry*, , Surfactant Science Series, Vol. **37**, Marcel Dekker, New York, Ch 2.

ZHANG, Y.G.; WRIGHT, W.J.; TAM, W.K.; NGUYEN-DANG, T.H.; SALOME, C.M.; WOOLCOCK, A.T. (1990). Effect of inhaled preservatives on asthmatic subjects. II Benzalkonium chloride. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141** (6), 1405.

CAPÍTULO V

Análisis del agente cuaternizante residual y sus derivados en un compuesto catiónico de cadena alquílica corta: cloruro de trietilbencilamonio (TEBA)

CAPÍTULO V. ANÁLISIS DEL AGENTE CUATERNIZANTE RESIDUAL Y SUS DERIVADOS EN UN COMPUESTO CATIÓNICO DE CADENA ALQUÍLICA CORTA: CLORURO DE TRIETILBENCILAMONIO (TEBA)

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	197
2. APLICACIONES INDUSTRIALES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL TEBA	199
3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS	203
4. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA. MECANISMOS EN LA SEPARACIÓN DE COMPUESTOS CUATERNARIOS	204
4.1. Consideraciones previas	205
4.2. Efecto del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil.....	206
4.3. Efecto del pH de la fase acuosa en la fase móvil.....	207
4.4. Efecto de la naturaleza y la concentración del tampón	208
4.5. Efecto de la concentración del compuesto cuaternario	215
4.6. Condiciones finales de separación.....	221
5. ANÁLISIS CUANTITATIVO: PRECISIÓN Y RANGO LINEAL.....	221
6. APLICACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO A MUESTRAS COMERCIALES Y A UNA SÍNTESIS DE TEBA.....	224
6.1. Consideraciones previas	225
6.2. Síntesis de TEBA al 50% en medio acuoso con exceso de amina	225
7. CONCLUSIONES	232
8. BIBLIOGRAFÍA.....	234

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

En este capítulo se plantea inicialmente un problema de naturaleza similar al capítulo anterior, en cuanto que el producto analizado se obtiene por la misma vía sintética pero con la diferencia de que la amina terciaria cuaternizada está sustituida con cadenas alquílicas cortas (no más de dos átomos de carbono en la cadena más larga). El compuesto estudiado, el cloruro de trietilbencilamonio (TEBA) se sintetiza en agua a partir de la amina terciaria, trietilamina y cloruro de bencilo a concentraciones del 40% o superiores (figura V-1).

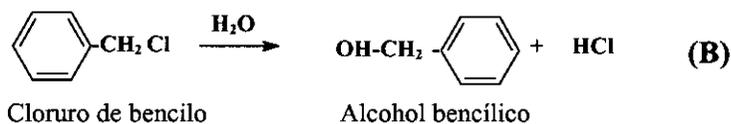
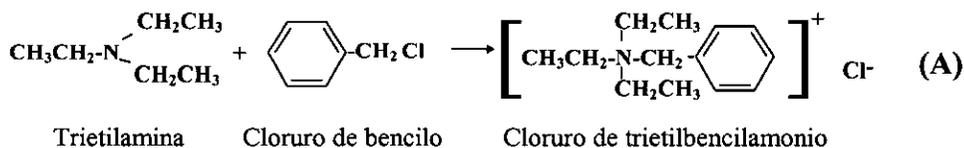


Figura V-1. (A) Reacción de formación de TEBA, (B) Reacción secundaria de hidrólisis del agente cuaternizante.

Para el análisis del producto comercial, dentro del control realizado en la planta industrial, se realizan las volumetrías descritas para el BAK en el capítulo III. Aunque la determinación de amina y acidez libre son posibles, el análisis del cuaternario presenta dificultades. La valoración del cuaternario por el método clásico de dos fases (ISO 2871, 1972) no es aplicable a cuaternarios de cadena corta por lo que se realiza una valoración indirecta del contraión cloruro con un

electrodo selectivo de aniones lo cual no asegura la determinación selectiva del cuaternario.

La necesidad de una determinación de cloruro de bencilo residual en TEBA no parece tan crítica como en el BAK debido a que no tiene un uso directo en el campo farmacéutico. Sin embargo, tal como se detalla posteriormente, su intervención como catalizador o intermedio de síntesis orgánicas, hace necesaria la determinación, simplemente por razones obvias de manipulación.

La información proporcionada por los análisis volumétricos aplicados al producto terminado, indican que la amina libre que no ha reaccionado podía estar agotada hasta niveles inferiores al 1% y los cloruros generados por la reacción del cloruro de bencilo se correspondían a los teóricos. Sin embargo, los valores de acidez determinados pueden alcanzar el 2%, por lo que parece probable que la reacción secundaria de sustitución nucleofílica del cloruro de bencilo para formar alcohol bencilico se produjera en mayor extensión que en el caso del cloruro de benzalconio. Así se confirmaría que el análisis de cuaternario por valoración indirecta del contraión es inadecuado para su cuantificación.

A la vista de los problemas observados, el análisis de TEBA por HPLC se plantea los siguientes objetivos:

- Análisis cuali y cuantitativo de un producto comercial con un contenido de 40% o superior en cloruro de trietilbencilamonio en base acuosa.
- Análisis selectivo y cuantitativo del cuaternario.
- Determinación del cloruro de bencilo residual y establecimiento de las condiciones en la síntesis para eliminarlo.
- Determinación de los subproductos producidos en la cuaternización.

- Evaluación comparativa de la reacción secundaria con el BAK.

2. APLICACIONES INDUSTRIALES Y MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL TEBA

El cloruro de trietilbencilamonio es un compuesto de amonio cuaternario como lo son también una clase importante de tensioactivos, los catiónicos, que posee numerosas aplicaciones en la Química Industrial. Atendiendo a su composición química, cabría preguntarse si se trata de un tensioactivo ya que a pesar de que presenta un grupo polar, carece de la parte hidrofóbica (sus cadenas alifáticas son de cadena corta). Sin embargo, algunos autores (CROSS, 1994) lo incluyen, junto con el tributilamonio, en los surfactantes catiónicos debido a que posee propiedades como las de catalizador de transferencia de fase, al igual que otros compuestos de amonio cuaternario, que estrictamente cumplen la definición de tensioactivo (hexadeciltrimetilamonio y el trialquil (C₈-C₁₈)metilamonio).

Los catalizadores de transferencia de fase son empleados en reacciones en las que uno de los reactivos está disuelto en fase acuosa y el otro en fase orgánica no miscible con agua. La reacción tiene lugar en la interfase o en una de las fases cuando uno de los solutos pasa a la otra fase con ayuda del catalizador. Los compuestos de amonio cuaternario resultan ser catalizadores selectivos de bajo coste, que producen un aumento en el rendimiento de la reacción.

Las reacciones de transferencia de fase en las que TEBA actúa como catalizador son variadas y muchas de ellas pertenecen a la química de sectores industriales tan importantes, por su volumen de producción y por su repercusión en la sociedad como el de los plásticos. Así es usado como catalizador de transferencia de fase en la manufactura de resinas epoxi (MATH y col., 1994), en

reacciones de condensación, acetilación, esterificación, formación de complejos organometálicos, etoxilación de cloroformo (LU y col., 1992). Pero también es utilizado en otras aplicaciones industriales como en electrodeposición de metales (CACHET y col., 1994), en el desarrollo de color en materiales fotográficos (SHAPKA y col., 1997), como acelerador complementario en la vulcanización del caucho (MATHUR y col., 1996) e incluso como agente descontaminante en la guerra química (destrucción de iperita) (CRONCE, 1996).

Así como la bibliografía sobre aplicaciones es muy amplia sobre todo en los años 90, la referente a métodos de análisis es más bien escasa. En algunas referencias el TEBA es utilizado como un reactivo analítico, en espectrometría y HPLC de par iónico para determinación trazas de metales (LEI y col., 1994) o en análisis bioquímicos (determinación de concentración bacteriana en alimentos...). Concretamente en cromatografía, el TEBA es usado como reactivo de par iónico en la fase móvil, en la separación de otros compuestos de amonio cuaternario (CROMMEN y col., 1977; LARSON y PFEIFFER, 1983) y también para la separación de metales formando complejos (DAS y DAS, 1997).

En los trabajos en los que el TEBA es analizado como compuesto de interés se han usado un amplio espectro de técnicas: resonancia magnética nuclear (RMN), electrodo selectivo de iones, cromatografía de capa fina, electroforesis capilar y HPLC.

NAMBIAR y col. (1991) en un método que tiene como objetivo principal la determinación de un desnaturalizante, benzoato de denatonio (Bitrex) en muestras reales de aceite de colza, y en el que usa electrodo selectivo y tetrafenilborato sódico como disolución valorante, analiza además sales de amonio cuaternario

(bromuro de trietilpropilamonio, benciltrimetilamonio, tetrametilamonio y el cloruro de TEBA) obteniendo buenas recuperaciones, próximas al 99%.

En electroforesis capilar, NIELEN (1993) separa TEBA de otros cuaternarios de bencilamonio con un capilar de polipropileno hueco. Estos capilares pretenden ser una alternativa a los capilares de sílice, en aquellas separaciones de compuestos, como los catiónicos, que presentan interacciones con las cargas negativas de los capilares de sílice. Asimismo una muestra que contiene TEBA, cloruro de benciltrimetil- y el benciltributilamonio sirve para comprobar a MOOLEN y col. (1997), la efectividad de un inyector que permite la inyección sin interrupción de la corriente. Observan una notable mejora en los límites de detección sobre todo cuando trabajan con electroforesis de correlación.

También en el estudio de la influencia del electrolito en las distorsiones del pico, WILLIAMS y col. (1997) hacen uso de la separación de los tres QUAT: TEBA, bromuro de benciltrimetilamonio y cloruro de benciltributilamonio. Empleando un tampón fosfato que contiene una mezcla de cationes (litio y tetrabutylamonio) varían la concentración de éstos manteniendo constante la fuerza iónica y miden experimentalmente los efectos en la forma del pico así como mediante simulación computacional con un modelo matemático.

LIN y col. (1996) abordan uno de los principales problemas que presentan los QUAT en electroforesis capilar, como es la formación de micelas, ensayando distintos disolventes orgánicos: acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano y acetona como modificadores orgánicos. Aunque presta especial atención a la influencia del pH y la concentración del tampón sobre la selectividad y resolución de los homólogos del BAK, es en el estudio del efecto del acetonitrilo, para romper las micelas de los cuaternarios, donde se logra una separación, en menos de 4 min, de

TEBA y otros ocho cuaternarios: dos de estructura de alquilfenilamonio y los seis restantes de naturaleza alquilbencilamonio.

La química analítica de los cuaternarios que están implicados en campos de interés prioritario como el farmacéutico o el bioquímico permite dilucidar, monitorizando reacciones de interés, el comportamiento químico de estos compuestos. El trabajo de BLUHM y LI (1999) enmarcado en el campo bioquímico, en sistemas de reconocimiento molecular de nucleótidos trifosfatados es un buen ejemplo. Se ensaya una separación preparativa de cuaternarios amónicos y piridínicos por cromatografía de capa fina basada en una cromatografía de par iónico. De los seis cuaternarios separados, uno de ellos es el benciltrietilamonio pero en este caso con el contraión bromuro.

A diferencia del BAK, los trabajos que tratan la determinación de TEBA por HPLC, en lo que se refiere a su análisis en diversas matrices, es poco numeroso. LARSON y PFEIFFER (1983) lo emplean para la separación de sales de amonio cuaternario alifáticas de cadena corta usando detección fotométrica indirecta. En una aportación colateral, separan TEBA y trimetilbencilamonio (TMBA) a concentraciones de 1 mg mL^{-1} , con columna de intercambio iónico y detección a 254 nm y comparando el efecto de dos sales en la fase móvil tales como formiato amónico e hidróxido de tetraetilamonio.

CROMMEN (1980) analiza por cromatografía, iones alquilamonio cuaternario en un soporte de sílice formando pares iónicos con 2 naftalensulfonato sódico. Con el fin de optimizar la separación, estudia aspectos como la influencia de la naturaleza del soporte de sílice, del volumen de la fase estacionaria, la adición de colina y la concentración de 1-pentanol en el comportamiento cromatográfico de los iones amonio. Una vez optimizadas las condiciones, se

muestran ejemplos de separación de cuaternarios; en uno de ellos el TEBA presenta un comportamiento menos hidrofóbico que otros cuaternarios con grupos alquílicos. Pero uno de los puntos de este trabajo más cercanos a los objetivos planteados al principio de este capítulo es la asignación de un pico que aparece en las muestras de TEBA como trietilamina residual aunque no se explica con claridad el criterio de asignación. La trietilamina no absorbería en ultravioleta y su carácter de amina terciaria haría dificultoso la derivatización, así que la formación de un par iónico con un compuesto absorbente parece una solución acertada.

3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS

- El sistema de HPLC, un Hitachi-Merck consiste en un controlador de gradientes L-500, una bomba modelo 655A-12, detector de longitud de onda variable, modelo 655A y un integrador modelo D-2000.
- Las columnas analíticas son LiChrosorb-CN, de dimensiones 250 mm × 4 mm x 5 µm, (Merck) con números de lote 634561 y 9426796 denominadas de aquí en adelante columna 1 y columna 2 respectivamente.
- Los disolventes y reactivos usados: acetonitrilo, agua, cloruro de bencilo, benzaldehído y cloruro de benciltrietilamonio, para síntesis fueron suministrados por Merck, el acetato sódico trihidratado, formiato sódico y acetato amónico, calidad para HPLC, por Scharlau y el alcohol bencílico, para análisis, por Panreac.
- Filtros de 0,2 µm de MSI Separations para el filtrado de disolventes.

4. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA. MECANISMOS EN LA SEPARACIÓN DE COMPUESTOS CUATERNARIOS

El método establecido en el capítulo III para la determinación de residuales originados en la cuaternización del cloruro de benzalconio (el cloruro de bencilo, benzaldehído y alcohol bencílico) se toma como punto de partida en la separación del TEBA (PRIETO y col., 1999). Las diferencias que *a priori* se podrían encontrar residen en que el TEBA no posee serie homóloga y sus cadenas alquílicas son cortas por lo que es de esperar un comportamiento cromatográfico distinto. Por otra parte, los residuales y los subproductos pueden presentarse en niveles de concentración diferentes a los obtenidos en el BAK.

Por lo tanto se comienza por el estudio del comportamiento cromatográfico del cuaternario para después abordar el problema de los distintos niveles de concentración de impurezas. Se prueban las dos eluciones (isocrática y gradiente) propuestas para BAK observando que en los dos casos el TEBA está poco retenido por la columna y presenta factores de capacidad cercanos a los productos residuales. Con elución en isocrático el TEBA no se separa del cloruro de bencilo mientras que en modo gradiente eluye entre el alcohol bencílico y el cloruro de bencilo solapando parcialmente el pico de este último a la concentración del cuaternario necesaria para cuantificar los residuales.

Se examinan, partiendo de las condiciones isocráticas como condiciones iniciales, los factores que influyen en el comportamiento cromatográfico tanto del TEBA como de los residuales. En la optimización de la separación se debe tener en cuenta que en la muestra objeto de análisis están presentes compuestos neutros, como los residuales y un compuesto con carga, el cuaternario. Además, este último, como se comentó en el capítulo IV, puede presentar características

específicas que van más allá de las esperadas para un compuesto con carga. Así, se eligen los siguientes factores para el estudio: la proporción de acetonitrilo y el pH de la fase acuosa así como la naturaleza y la concentración del tampón. Otro factor, la concentración del cuaternario, se incluirá posteriormente como consecuencia de los resultados obtenidos en las pruebas de separación y cuantificación.

4.1. Consideraciones previas

Preparación de patrones y muestra de TEBA

Se preparan disoluciones patrón concentradas ($2\text{-}3\text{ mg mL}^{-1}$) de cloruro de bencilo, benzaldehído y alcohol bencílico en acetonitrilo. Las disoluciones de trabajo se diluyen en fase móvil, a la concentración deseada. La disolución de TEBA se diluye en fase móvil a la concentración de 10 mg mL^{-1} sobre la base anhidra para la cuantificación de los residuales y $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ para los componentes mayoritarios.

Condiciones cromatográficas

Los análisis se realizan en la columna ciano usando como fase móvil 55% de acetato sódico $0,035\text{M}$ ($\text{pH}=7$) y 45% de acetonitrilo, el flujo es de $1,5\text{ mL min}^{-1}$ y el volumen de inyección $20\text{ }\mu\text{L}$. El cloruro de bencilo y el benzaldehído se cuantifican a una concentración de la muestra de 10 mg mL^{-1} y se detectan a 220 y 248 nm respectivamente. TEBA y el alcohol bencílico se cuantifican a $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ y detectados a 210 nm. Los valores del factor de capacidad (k) fueron evaluados a partir del blanco de tampón.

4.2. Efecto del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil

Se comienza estudiando la influencia que la fuerza del disolvente o la polaridad de la fase móvil ejerce sobre los componentes de la muestra ya que, como se verificó en la separación de los BAK, es un parámetro concluyente en la selectividad entre los tres residuales estudiados y en la selectividad entre el cuaternario y los residuales. Para ello se modifica la proporción de acetonitrilo en el rango de 45 a 60%, manteniendo constante con respecto a las condiciones iniciales, el pH, la naturaleza y la concentración del tampón (0,1M de NaCH_3COO , pH=5). La medida de la retención, expresada como el logaritmo del factor de capacidad, de todos los compuestos, frente al porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil se representa en la figura V-2.

Una de las conclusiones más obvias es que TEBA apenas se ve afectado en su retención por la variación de acetonitrilo sin embargo el agente cuaternizante y los subproductos presentan un relación lineal con pendiente negativa. Esto parece indicar que un aumento de la apolaridad de la fase móvil permite una mayor interacción con el compuesto y por tanto disminuye la retención de éste con la fase estacionaria. El cloruro de bencilo es el que presenta una pendiente más alta, con una disminución en la retención desde 45 al 60% de 1,4 a 0,8. En el benzaldehído la pendiente es menor y en el alcohol bencílico, el compuesto más polar, es significativamente más baja.

La primera variación observada en el comportamiento de TEBA con respecto a un cuaternario de cadena larga como el BAK se produce en las diferentes interacciones debidas a mecanismos hidrofóbicos. Al contrario del BAK en el que el porcentaje de acetonitrilo era uno de los parámetros a considerar para optimizar la separación, en este cuaternario de cadena corta parece que la contribución de la

interacción entre las cadenas alquílicas y el grupo ciano de la fase estacionaria está minimizada (GÓMEZ-GOMAR y col., 1990).

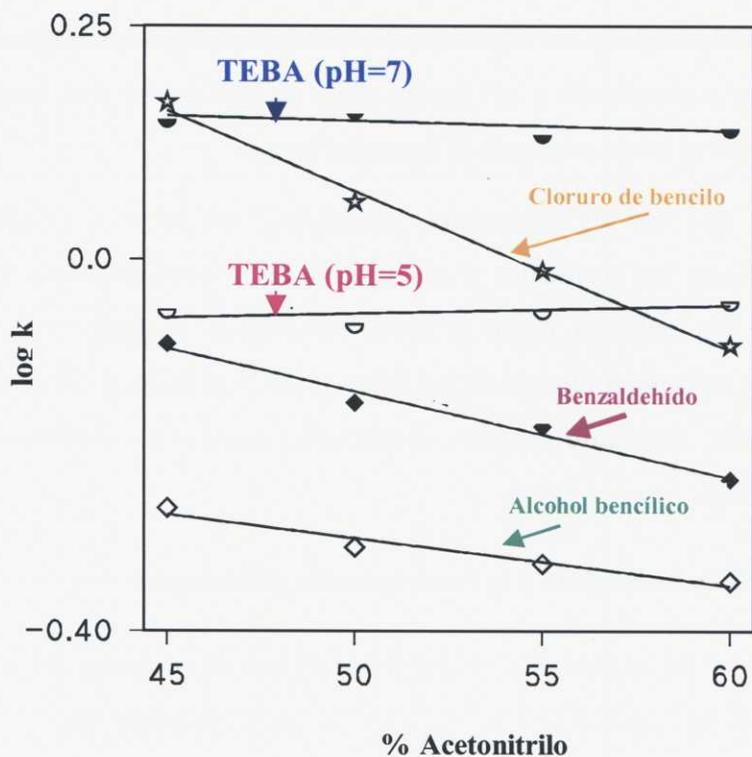


Figura V-2. Influencia del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil sobre la retención de TEBA, cloruro de bencilo, benzaldehído y alcohol bencílico.

4.3. Efecto del pH de la fase acuosa en la fase móvil

El pH es un parámetro que debe afectar al compuesto cargado y no a las especies neutras (agente derivatizante y subproductos). En las condiciones iniciales el pH de trabajo es ácido, así que se estudian los efectos en la separación

a pH 7. Los resultados experimentales confirman que la retención del cloruro de bencilo, benzaldehído y alcohol bencílico no cambia con el pH.

La retención del cuaternario se ve afectada aumentando de 0,9 a 1,4 desde pH 5 a 7. Desde un punto de vista mecanístico este efecto podría explicarse debido a una menor competencia a pH neutro entre la fase móvil y el grupo amonio cuaternario por el grupo nitrilo de la fase estacionaria.

Con dos de los parámetros estudiados, las mejores condiciones de separación entre los residuales y el cuaternario se producen con un 45% de acetonitrilo. Sin embargo, como se puede observar en la figura V-2, a pH=7 el TEBA no se separa del cloruro de bencilo y a pH 5 no lo hace del benzaldehído. Es por tanto necesario seguir optimizando con las restantes variables cromatográficas.

4.4. Efecto de la naturaleza y la concentración del tampón

El análisis de cuaternarios ha requerido el uso de reactivos de par iónico o modificadores que disminuyan las colas de los picos cromatográficos y regulen la retención. La importancia del contraión del modificador (parte aniónica) ha estado ampliamente resaltada en la bibliografía (GREVING y col., 1979; DENKERT y col., 1981), pero el papel del tampón catiónico también ha sido objeto de estudio tanto en cromatografía de fase inversa como normal (BLUHM y LI, 1999).

En el análisis del BAK (capítulo IV) se había utilizado el acetato sódico para disminuir la retención de sus homólogos; debido a que el TEBA presenta una baja retención con este tampón, se prueban otros dos: acetato amónico y formiato sódico que tienen en común con el anterior, el anión amónico y catión sódico

respectivamente. Esto permitirá estudiar de una forma independiente el efecto que sobre la retención del cuaternario ejercen el catión y el anión del tampón.

Al mismo tiempo que se estudia la naturaleza del tampón, también se examina el efecto de la concentración de los tres tampones sobre la retención del cuaternario en un rango de 0,01 a 0,1 M para una concentración de TEBA de 10 mg mL⁻¹ y pH=7 (figura V-3).

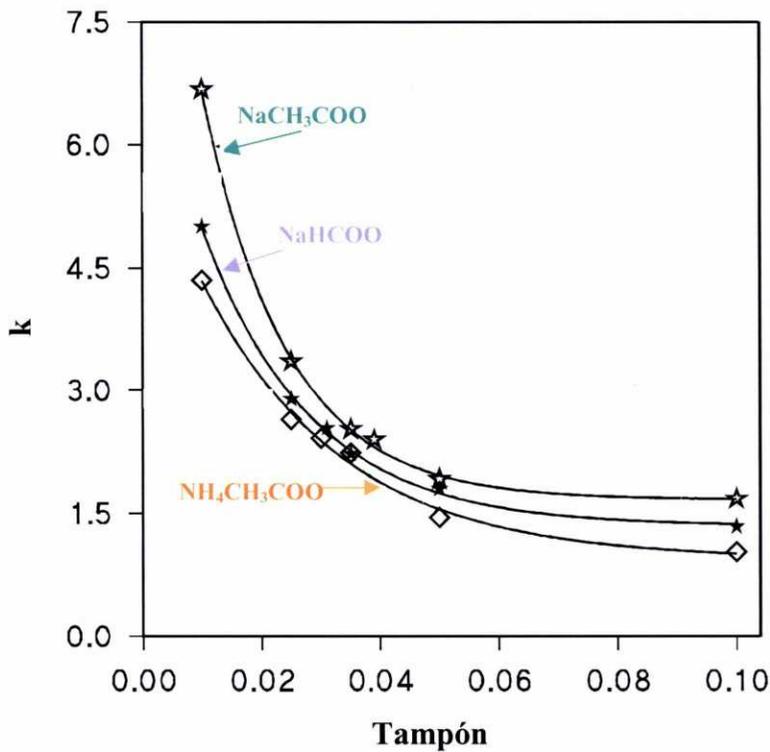


Figura V-3. Influencia de la concentración del tampón sobre la retención cromatográfica de TEBA.

La conclusión más general e inmediata es que una disminución en la concentración de los tampones produce un aumento exponencial de la retención. Este comportamiento experimental puede ser explicado con el modelo propuesto por BIJ y col. (1981) y NAHUM Y HORVÁTH (1981) de un mecanismo dual de interacciones hidrofóbicas (entre el eluato y los grupos siloxanos de la fase estacionaria) y silanofílicas (entre el eluato y los grupos silanoles). Trabajando con compuestos que poseen un grupo amino en su molécula, como los cuaternarios, en los que las interacciones silanofílicas son particularmente importantes, se controla la repercusión de los grupos silanoles en la separación por adición de un modificador (tampón o una amina) a la fase móvil. La interacción de los modificadores a alta concentración con los grupos silanoles de la fase estacionaria reduce el comportamiento del eluato a un mecanismo básicamente hidrófobico.

KIEL Y MORGAN (1985) amplian y matizan este modelo al considerar además de la retención, la simetría y por tanto la resolución del pico de los cuaternarios. Proponen un mecanismo en el que se mezclan las tres contribuciones: hidrófobica, de intercambio iónico con los grupos silanoles que se considera predominante para solutos básicos y de interacción por enlace de hidrógeno también con los grupos silanoles. Esta última sería la responsable de la pobre simetría de los picos en ausencia de modificadores (figura V-4).

A la luz de estos modelos que explican los mecanismos cromatográficos, la retención de TEBA a altas concentraciones de tampón podría estar gobernada por interacciones hidrofóbicas y a medida que disminuye la concentración del tampón intervendría en mayor magnitud un mecanismo de intercambio iónico debido a la interacción del cuaternario con los grupos silanoles libres de la columna ciano.

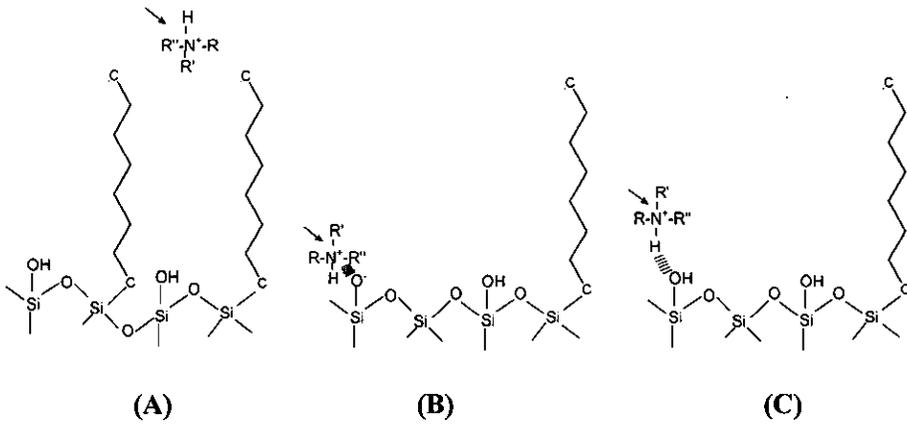


Figura V-4. Posibles interacciones de una amina terciaria con la superficie de una fase inversa. (A) Interacción hidrofóbica, (B) Intercambio iónico y (C) Enlace de hidrógeno.

Si se quiere ahora interpretar la información que proporciona la figura V-3 sobre la influencia de la naturaleza del anión, se toma una concentración fija de tampón y se observa que el cuaternario está más retenido con el contraión acetato en la fase móvil que con el formiato (véase acetato sódico frente a formiato sódico). El contraión formiato tiene una interacción mayor con el cuaternario que el acetato por lo que las interacciones polares del cuaternario con la fase estacionaria son menores con el formiato que con el acetato. GREVING y col. (1979) habían observado también que los factores de capacidad eran más bajos cuando el contraión formaba pares iónicos más fuertes.

En lo que respecta al catión, a una concentración dada de tampón, el cuaternario está más retenido con el ión sodio que con el amonio (véase acetato sódico frente a acetato amónico). Posiblemente debido a que el ión amonio tiene mayor interacción en los sitios polares de la columna que el sodio y por tanto la mayor ocupación de los centros polares por parte de los cationes impide la retención del cuaternario.

De SCHUTTER y De MOERLOOSE (1988) que determinan por cromatografía distintos cuaternarios probando modificadores de fase móvil diferentes: octanosulfonato sódico, cloruro sódico y amónico y perclorato sódico obtienen también mayores retenciones con el ión sodio que con el amonio. En ese caso no observan diferencias entre el anión cloruro y el perclorato pero si fuerte retenciones con el octanosulfonato sódico. KIEL y MORGAN (1985) estudian el efecto de la concentración del ión sodio en la retención de una amina terciaria, la amitriptilina pero no realizan comparativa con otros cationes.

Una vez analizada, independientemente, la influencia del catión y el anión y habiendo observado que ambos contribuyen a regular la retención del TEBA, se podría pensar en evaluar ¿cuál de ellos ejerce una mayor influencia? Como se ha discutido en detalle en párrafos anteriores, la figura V-3 muestra que el factor de capacidad es mayor con el catión sodio que con el amonio, $k_{Na^+} > k_{NH_4^+}$ y con el anión acetato con el formiato, $k_{CH_3COO^-} > k_{HCOO^-}$, pero además que la retención es mayor con el formiato sódico que con acetato amónico. A partir de estas tres deducciones experimentales la respuesta a la pregunta planteada sería por tanto que el catión tiene una influencia mayor que el anión en la retención del cuaternario estudiado.

El estudio de la retención del cuaternario tenía como finalidad conseguir un factor de capacidad para TEBA que permitiese una buena selectividad de los residuales. Este objetivo se alcanza para valores de k mayores de 2 aunque el análisis de muestras reales parece recomendar, en función de algunas impurezas separadas y no identificadas, un factor de capacidad mayor o igual a 2,5. La concentración de tampón necesaria para este valor de k la concentración es de 0,025M para NH_4CH_3COO ; 0,030M para $NaHCOO$ y 0,035M para $NaCH_3COO$.

Como la retención de los residuales no está afectada por la concentración ni por la naturaleza del tampón, se obtienen tres separaciones equivalentes con los tres tampones ensayados. Pero cuando la concentración de cualquiera de los tampones disminuye, la resolución empeora tanto para los residuales como para el cuaternario por lo que la concentración más alta es la adoptada y por lo tanto se elige el acetato sódico para trabajar con el TEBA.

Reproducibilidad entre columnas. Al estar explotando en la separación mecanismos silanofílicos, se está trabajando con elementos “indeseables o “residuales” de la funcionalización de la fase estacionaria. Los fabricantes en sus especificaciones más generales aseguran la reproducibilidad de las interacciones hidrofóbicas, pero no suelen facilitar una medida de los silanoles residuales. ¿Cabría esperar entonces una buena reproducibilidad de las columnas para esta separación? Dicho de otro modo, ¿cómo variará la selectividad conseguida en distintos lotes para un misma columna y fabricante? Y si existe esta variación, ¿cómo se puede controlar?

Se han usado en este trabajo dos columnas Lichrosorb-CN con las características indicadas en la sección experimental. Con la columna denominada número 1 y, cuando estaba a la mitad de su vida, se realizaron los ensayos representados en la figura V-3 donde se reflejaba la influencia de la concentración y la naturaleza del tampón. Revisadas las condiciones optimizadas con la columna 2 (que se utilizó nueva) se ha encontrado que para valores de k de 2,6 la concentración de acetato sódico necesaria es solamente de 0,025M. A la concentración de trabajo seleccionada para la primera columna es posible separar también los residuales del cuaternario con la segunda pero la selectividad disminuye y por la experiencia con muestras reales parece recomendable alcanzar

valores de 2,6 (figura V-5). La interpretación de estos hechos, a la vista de los aspectos mecanísticos de la separación, parece radicar en la diferencia de silanoles libres entre las dos columnas. La segunda tendría menos silanoles y por tanto necesitaría una concentración menor para minimizar su influencia o alcanzar un valor de retención dado. Sin embargo la reproducibilidad de las interacciones hidrófobas es buena porque no se observan diferencias en la retención de los residuales. Nos quedaría por estudiar el efecto que el envejecimiento de la columna tiene sobre los silanoles libres y si habría que variar la concentración del tampón para obtener resultados idénticos a los iniciales.

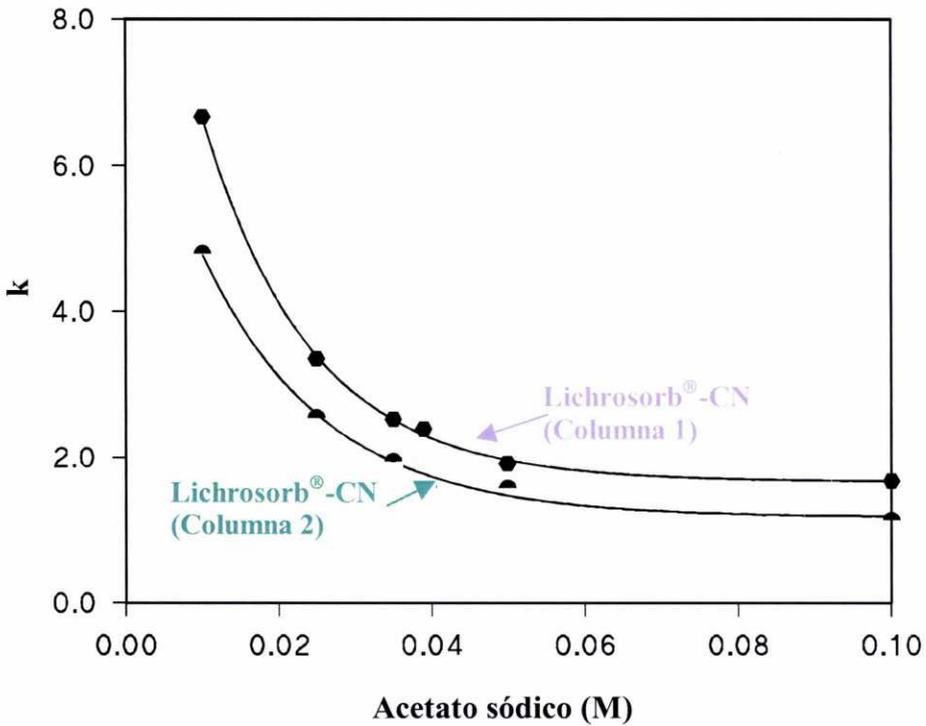


Figura V-5. Reproducibilidad de las columnas. Influencia de la concentración del tampón en la retención cromatográfica de TEBA.

4.5. Efecto de la concentración del cuaternario

Por último, se ha incluido este último factor, al observar en las pruebas para la cuantificación de los residuales y los subproductos en muestras reales, que la retención de TEBA se ve afectada, además de por el tampón añadido en la fase móvil (concentración y naturaleza) por su propia concentración en la muestra inyectada.

Así en la figura V-6 se representa el factor de capacidad del cuaternario frente a la concentración en la muestra, tomando como límite superior en abscisas la concentración de cuantificación en los residuales (44mM) y como límite inferior una concentración cercana a la de cuantificación del cuaternario (0,44mM).

Esta influencia se prueba para los tampones ensayados a una concentración de cada uno de ellos en la que la retención del cuaternario cuando se inyecta, a 44mM, es equivalente para los tres (0,025M para $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, 0,030M NaHCOO y 0,035M NaCH_3COO). La disminución de la concentración en los límites descritos produce un aumento de k en los tres casos entorno a una unidad.

El tiempo de retención es uno de los parámetros cromatográficos que caracteriza a un compuesto y a pesar de que estrictamente no puede ser empleado como criterio de identificación, si se utiliza en la optimización de la separación como variable dependiente solamente de las características de la fase móvil y estacionaria. Sin embargo la dependencia de la retención con la concentración ya estaba recogida en la bibliografía de sales de amonio cuaternario (MCPHERSON Y RASMUSSEN, 1994).

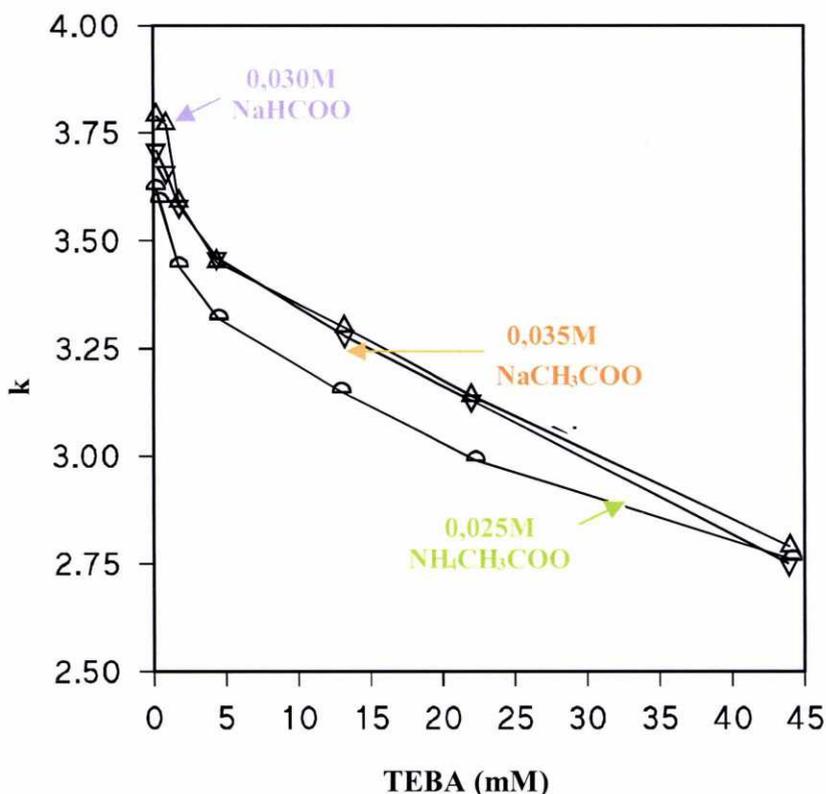


Figura V-6. Influencia de la concentración del cuaternario sobre su retención cromatográfica para una concentración 0,025M de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$; 0,035M de NaCH_3COO y 0,030M de NaHCOO .

PARRIS (1980) encuentra para un tensioactivo catiónico, el cloruro de alquilamidoalildimetilamonio, precursor de una sulfobetaina, una disminución de k con el aumento de la concentración del cuaternario en una separación cromatográfica de fase inversa con reactivo de par iónico. Representa este efecto para cuatro reactivos distintos de par iónico (ácido p-toluensulfónico, el 2-naftalensulfónico y para las sales sódicas del butilbencenosulfonato y el dodecilbencenosulfonato) observando que el efecto es más acusado con el ácido 2-

naftalensulfónico. Los reactivos se emplean a distinta concentración en función de su coeficiente de extinción por lo que es el 2-naftalensulfónico, el que está en la fase móvil a una concentración más baja. Este hecho sirve para atribuir la variación más fuerte del factor de capacidad a una concentración baja del reactivo.

Más tarde otros autores (DENKERT y col. 1981; HELBOE, 1983) vuelven a describir la disminución de k con el aumento de la cantidad de muestra. Los primeros trabajan con "vacancy chromatography" en la que los compuestos detectables de la muestra están presentes en la fase móvil; miden disminuciones de un 2% en el tiempo de retención con aumentos en la concentración de una muestra catiónica de $2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$ M. El segundo autor confirma en el análisis de alquiltrimetilamonio de cadena larga que el efecto es más pronunciado con ciertos reactivos de par iónico.

Pero son BIJ (1981) y HORVATH y col. (1981) quiénes usan TEBA (con anión bromuro) para investigar como afecta la adición de diferentes aminas a la fase móvil sobre el hecho experimental de la disminución del factor de capacidad de bromuro de trietilbencilamonio con el aumento de la cantidad inyectada del propio cuaternario. Se utilizan dos aminas con grupos hidroxilos (la dimetiletanolamina y el 2- etilaminoetanol) que reducen el efecto y otras dos (la trietilamina y la isopropilamina), sin función hidroxilo, que consiguen que k sea independiente de la cantidad de muestra en un rango entre 0-90 μ g de TEBA. Este comportamiento es explicado considerando el bloqueo de los grupos silanoles de la fase estacionaria por las aminas que impiden la interacción de éstos con el cuaternario. Al estudiar el papel de las aminas a pH ácido y básico encuentran que su acción es menos acusada a pH alcalino, justificado según los autores, por la ionización de los silanoles que provoca una mayor interacción con el cuaternario.

Aunque parece demostrado el papel de los grupos silanoles en los cambios de retención con la concentración, a partir de las conclusiones dadas no parece obvio concluir por qué por ejemplo 2 μg están más retenidos que 200 μg .

Si se estudia con más detalle la figura V-6, en el rango de concentración estudiado del cuaternario, se observa que la variación de k es menor para el acetato de amonio que para el acetato y el formiato sódico. Es pues el catión el que juega un papel determinante en este efecto sin que el anión tenga influencia tan acusada como ocurría en el estudio de la concentración. Aunque a bajas concentraciones se observa una desviación entre el formiato y acetato sódico, el acetato tiene retenciones mayores. También, los resultados sugieren que el catión amonio bloquea en mayor magnitud los grupos silanoles por eso la variación de k es menor y la retención a concentraciones de cuantificación es menor que para el ión sodio.

A la concentración a la que se cuantifican los residuales, el TEBA eluye en un pico que no presenta una distribución gaussiana sino que es muy asimétrico de tal forma que el tiempo de retención se obtiene al principio de la elución (figura V-7). Si el pico fuera simétrico, la retención sería igual o muy cercana a la que presenta a concentraciones bajas.

NAWROCKI (1997) en una revisión muy completa del papel del grupo silanol en cromatografía de líquidos, dedica un apartado a los estudios realizados sobre la influencia del soluto, considerado éste como un compuesto básico, en la interacción con los silanoles. Se mide este mecanismo por su efecto en la forma de pico usando el factor de simetría como parámetro cromatográfico. Así en series de compuestos, al incrementar el pK_a del soluto aumentan las interacciones silanofílicas (VERVOOT y col., 1992). MCCALLEY (1994) encuentra también una

una fuerte influencia de los efectos estéricos al estudiar el comportamiento cromatográfico de la piridina y 15 derivados alquílicos de ésta.

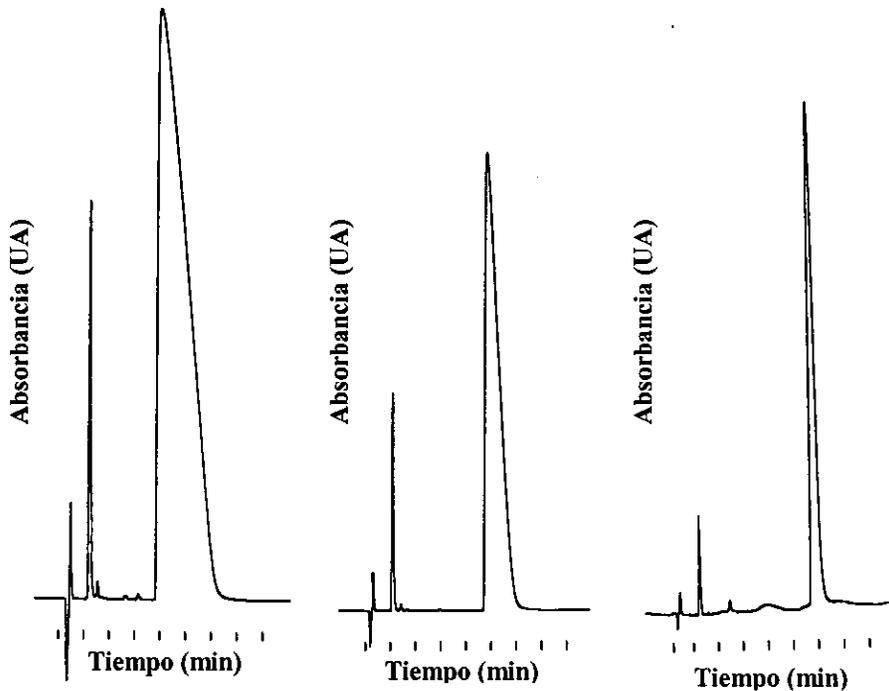


Figura V-7. Dependencia de la simetría del pico con la concentración de TEBA. Cromatograma de cloruro de trietilbencilamonio a diferentes concentraciones de muestra inyectada: (A) 9500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (B) 1900 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y (C) 91 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Además de la naturaleza del compuesto, se estudia el efecto del tamaño de muestra sobre la asimetría del pico. MCCALLEY (1994) observa una aumento de la asimetría en la piridina cuando la concentración de muestra inyectada varía desde 50 ng a 3,5 μg , y VERVOOT y col. (1992) registran la misma tendencia en una droga básica en un intervalo de 0,2 a 2,0 μg . Una interpretación a este fenómeno ha sido dada por EBLE y col. (1987) al considerar que se produce una sobrecarga

en los puntos potenciales reactivos de los grupos silanoles existentes en la fase estacionaria. Se habla de potenciales porque se constata, para una experiencia con una columna Zorbax ODS y angiotensina como soluto, que sólo una parte pequeña de los silanoles libres presentan reactividad con la muestra.

La asimetría del pico en compuestos amínicos es explicada por KIEL y MORGAN (1985) por interacciones de enlace de hidrógeno con los silanoles. Sin embargo el TEBA al poseer los cuatro enlaces alquílicos no tiene posibilidad de esta interacción. Tampoco se trata de un compuesto eminentemente básico pH (10% en agua) = 6-8 , así que la asimetría parece solamente debida al tamaño de muestra. Con todo, habría que tener en cuenta la variación de la retención y la asimetría de forma conjunta como la manifestación de una misma causa.

En el apartado anterior se ha explicado como la concentración de tampón empleado sólo bloquea parcialmente los silanoles de la fase estacionaria, con lo cuál el resto de los silanoles libres interaccionarán con el cuaternario. Considerando el caso del ión amonio a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TEBA, es decir, con una carga en la columna de $2 \mu\text{g}$ (para un loop de $20 \mu\text{L}$) el tiempo de retención es prácticamente constante; ésta sería la cantidad de muestra necesaria para bloquear el resto de los silanoles libres. Cuando la cantidad de muestra inyectada es mayor, por ejemplo $200 \mu\text{g}$, sólo un pequeño porcentaje interaccionaría con los silanoles y el resto representarían una sobrecarga que eluirían antes de la columna en una distribución no gaussiana. Esto explicaría porque el tiempo de retención se obtiene al principio de la elución y el pico presenta una asimetría tan grande que se reduce a medida que disminuye la concentración inyectada.

4.6. Condiciones finales de separación

A pesar de que comúnmente en la bibliografía se intenta bloquear las funciones catiónicas del analito para eliminar las interacciones silanofílicas o se buscan agentes enmascarantes de los grupos silanoles, finalmente en la separación objeto de estudio en este capítulo se han utilizado estas interacciones, como ya habían hecho BIJ y col. (1981) en una separación de péptidos, para regular la retención y conseguir selectividades adecuadas.

Así uno de los objetivos que se habían planteado: el análisis selectivo del cuaternario y el cualitativo, en lo que respecta al agente cuaternizante y los subproductos formados en la cuaternización parece cumplido.

Por último, las condiciones de separación adoptadas son una columna ciano de relleno irregular de 250 mm x 4 mm y una fase móvil 55% acetato sódico a pH=7 y 45% de acetonitrilo. La concentración del tampón puede oscilar entre 0,025-0,035 M dependiendo de los silanoles libres de la columna.

5. ANÁLISIS CUANTITATIVO: PRECISIÓN Y RANGO LINEAL

Un aspecto del análisis cuantitativo es la medida de la precisión calculada a la concentración más habitual en las muestras o a varias concentraciones dentro del intervalo de cuantificación. Como las condiciones para el cloruro de bencilo y benzaldehído son muy similares a las propuestas en la matriz de BAK, se estudian para los componentes mayoritarios.

La precisión para el cloruro de trietilbencilamonio y el alcohol bencílico se calcula a una concentración de 80,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 68 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente

obteniéndose para 10 inyecciones un porcentaje de la desviación relativa estándar de 0,8% y de 0,3% respectivamente.

En la optimización de la separación, en el apartado 4.5 se había examinado la influencia de la concentración del cuaternario sobre la variación del tiempo de retención. A la concentración de cuantificación se comprueba que el tiempo de retención es constante cuando se usa acetato amónico como modificador en la fase móvil y que está minimizada para el acetato sódico. Al ser este último el elegido para el análisis cuantitativo, fue necesario medir la variación del tiempo de retención del TEBA en el intervalo de cuantificación obteniéndose un coeficiente de variación de 1,6% . Para una concentración dada, la empleada en la precisión del área del pico, la variación del tiempo de retención es de 0,7%.

Una vez optimizada la separación de los componentes de interés, para el análisis cuantitativo será preciso escoger las longitud de onda de detección, estudiar los intervalos de linealidad y establecer las concentraciones para la cuantificación en la muestra.

En el análisis del BAK, se había elegido una longitud de onda de compromiso de 220 nm para el análisis de los residuales de la cuaternización. Para el TEBA, esta longitud es válida en el análisis del cloruro de bencilo residual y del benzaldehído. Si bien este último tiene un máximo de absorción a 248 nm que puede ser usado cuando los niveles en la muestra sean menores de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como en las muestras de TEBA comerciales, los compuestos a cuantificar se encuentran a diferentes concentraciones y en una misma inyección no se pueden cuantificar simultáneamente, para los componentes mayoritarios (cuaternario y alcohol bencílico) se elige una longitud de onda cercana al máximo de absorción

para los dos compuestos, 210 nm. A longitudes de onda más bajas se acentúan los problemas de estabilización de la línea de base.

La concentración de la disolución de TEBA, sobre su base anhidra, a la que son cuantificados todos los compuestos, junto con las longitudes de onda de detección se resume en la tabla V-1. Los componentes mayoritarios se cuantifican en el centro de sus respectivas gráficas de calibración.

TABLA V-1. Condiciones de cuantificación para el cloruro de bencilo, benzaldehído, alcohol bencílico y TEBA.

COMPUESTO	Longitud de onda (nm)	Concentración (mg mL⁻¹)
Cloruro de bencilo	220	10
Benzaldehído	220 o 248	10
Alcohol bencílico	210	2
TEBA	210	200*

*concentración expresada en µg mL⁻¹.

Los gráficos de calibración que muestran la dependencia lineal de la concentración de los compuestos con la altura del pico para el cloruro de bencilo, benzaldehído y alcohol bencílico y con el área del pico para TEBA se construyeron para 7 niveles de concentración para el cloruro de bencilo y benzaldehído, seis niveles para el alcohol bencílico y ocho para el cuaternario (con una media de al menos dos inyecciones por cada patrón). Las ecuaciones calculadas en el ajuste por mínimos cuadrados, los coeficientes de correlación y los rangos de concentración para todos los compuestos se resumen en la tabla V-2.

TABLA V-2. Parámetros del análisis cuantitativo.

Compuesto	Rango lineal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$y = a + b x$	Coefficiente de correlación
Cloruro de bencilo	0,4-100	$a = 615,3; b = 1607,8$	0,9997
	0,3-10	$a = -0,56; b = 1672,5$	0,9998
Benzaldehído	0,7-13	$a = -53; b = 755,9$	0,9986
		$a = -547,7; b = 5639,9^*$	0,9991
Alcohol bencílico	0,4-90	$a = 2277,7; b = 2611,5$	0,9995
TEBA	1-150	$a = 8763,8; b = 5729,6$	0,9997

* Obtenida a 248 nm.

En el benzaldehído, la pendiente de la ecuación obtenida a 248 nm es 8 veces mayor que a 220 nm, es decir, hay un incremento de la sensibilidad esperado puesto que a 248 nm se trabaja en uno de los máximos de absorción. Por otra parte el rango de concentración se elige en función de los bajos niveles de benzaldehído encontrados en las muestras de TEBA.

6. APLICACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO A MUESTRAS COMERCIALES Y EN UNA SÍNTESIS DE TEBA

En el análisis cualitativo de muestras comerciales de TEBA en agua, con la separación optimizada se obtienen como componentes mayoritarios además del cuaternario, el alcohol bencílico en cantidades que podrían estar entre 1-2%. Esto corrobora los resultados del análisis volumétrico de acidez libre que indican la importancia de la reacción secundaria. Así pues en la aplicación del método a una síntesis, se intenta además de estudiar las condiciones de eliminación del cloruro de bencilo, las de formación del alcohol bencílico. Dado los altos niveles del

subproducto en las disoluciones de TEBA, las condiciones más favorables irán en detrimento de la riqueza del cuaternario.

6.1 Consideraciones previas

Síntesis del cloruro de trietilbencilamonio

Una mezcla de trietilamina (110 g; 1,09 mol) con el exceso correspondiente en cada caso), cloruro de bencilo (138 g; 1,09 mol) y 254 mL de agua se calienta a 50°C. Cuando se alcanza esta temperatura, se para el calentamiento y la temperatura aumenta hasta a 80°C debido a la reacción exotérmica. La reacción se mantiene a 80°C y se realizan varios muestreos hasta que el cloruro de bencilo se consume totalmente. Se verifica (diferentes inyecciones realizadas en varios días) que la reacción se detiene cuando las muestras se diluyen a la concentración del análisis.

6.2. Síntesis de TEBA al 50% en medio acuoso con exceso de amina

La bibliografía de síntesis encontrada para este producto se encuentra registrada bajo patentes que se diferencian entre sí, en una primera lectura, por los disolventes empleados (disolventes orgánicos o agua). Un factor que podría tener influencia en los productos residuales, como es la relación molar entre cloruro de bencilo y trietilamina, también varía según la patente estudiada. Así CIOCA y col. (1984) no especifican las relaciones molares entre los dos reactivos, solamente detallan que se lleva a cabo en agua que posteriormente es eliminada formando un azeótropo con xileno. En la patente de RUNGE y LUECKE (1984) usan cantidades equimolares procesando en acetona a 55-60°C.

Sin embargo otras dos usan exceso de trietilamina así en NIEGEL y col. (1990), la síntesis tiene lugar en una mezcla de disolventes orgánicos, tolueno, acetona y dimetilformamida, a 80°C y con una relación molar entre los dos reactivos, cloruro de bencilo/trietilamina de 1:1-1,3. En la segunda, MATH y col. (1994) preparan TEBA en disoluciones acuosas destinado a la manufactura de resinas epoxi, haciendo reaccionar un mol de cloruro de bencilo con 1,02-1,06 moles de trietilamina para una concentración de un 60% de producto. Inicialmente usan como disolvente un alcohol, metanol o etanol y *a posteriori*, posiblemente al finalizar la reacción, diluyen con agua.

Tal vez una de las razones por la que las dos patentes trabajan con un exceso de trietilamina, sea la de incrementar la velocidad de eliminación del cloruro de bencilo, tal y como se vió para el cloruro de benzalconio. De esta forma, se prueban dos síntesis de TEBA a una concentración del 50%, usando como disolvente agua y con un exceso de trietilamina de un 1,0% y un 1,4% que representan en la relación molar cloruro de bencilo/trietilamina un 1:1,04 y 1:1,07, respectivamente.

Al igual que en el cloruro de benzalconio la reacción transcurre en dos etapas, una primera de formación mayoritaria del cuaternario, en una fase no homogénea debido a la insolubilidad de los reactivos en el disolvente y una segunda etapa de finalización de la reacción con eliminación del cloruro de bencilo residual. Pero en la primera etapa, a diferencia del BAK que transcurría muy rápidamente (20-45 min), para el TEBA es mucho más lenta pudiendo alcanzar desde que se inicia el calentamiento hasta la homogeneidad de la mezcla, dos horas y 30 min.

La aplicación del método de análisis optimizado al seguimiento de los residuales en las síntesis da como resultado la detección, además del cloruro de bencilo, de alcohol bencílico a una concentración alta, del orden de tanto por cien, del benzaldehído en partes por millón y una impureza sin identificar cercana al cloruro de bencilo (figura V-8). Se cuantifican los tres primeros compuestos y para la síntesis de relación 1:1,07 también el cuaternario. Paralelamente se realiza el seguimiento de la amina libre volumétricamente según norma UNE 55712:1982 para comprobar su evolución.

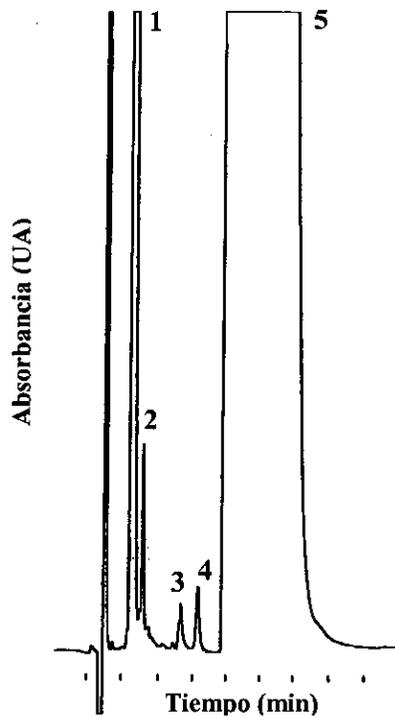


Figura V-8. Cromatograma de TEBA durante una síntesis. 1. Alcohol bencílico, 2. Benzaldehído, 3. Cloruro de bencilo, 4. Impureza no identificada, 5. TEBA.

Si representamos la concentración de cloruro de bencilo a los distintos tiempos de muestreo (figura V-9) se observa que la eliminación del cloruro de bencilo es más rápida al aumentar el exceso de amina libre, siendo para la relación 1:1,07 suficiente con 45 min. Los datos experimentales de la gráfica se ajustan a una ecuación cinética de segundo orden, en la que comparativamente con el BAK la desviación de valores positivos del término residual (con dimensiones de concentración) es más pequeña.

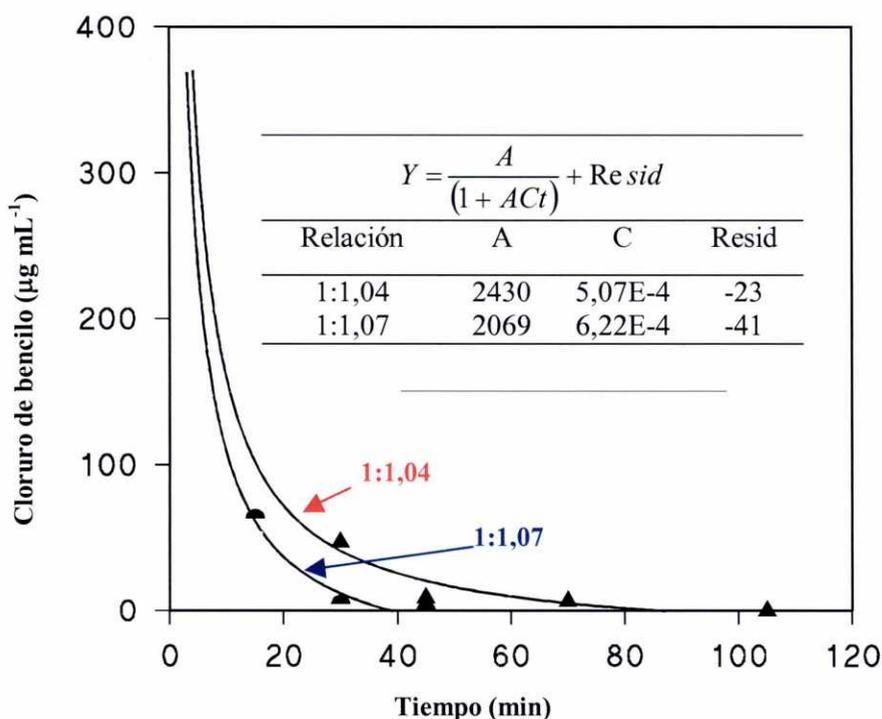


Figura V-9. Cinética de eliminación del cloruro de bencilo durante la síntesis del TEBA al 50% en agua con exceso de trietilamina.

Con respecto al benzaldehído los valores obtenidos oscilan en torno a los $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ en las dos síntesis sin observarse ningún aumento significativo en el transcurso de la cinética. Su origen podría encontrarse en el cloruro de bencilo usado como reactivo o generarse durante la formación del cuaternario.

La cinética de alcohol bencílico en la segunda etapa de la reacción se representa en figura V-10. Los altos valores encontrados al inicio del muestreo indican que la reacción secundaria se produce paralelamente y en competencia a la formación del cuaternario. Las concentraciones alcanzadas, con un valor máximo cercano al 1,5% representan que en el peor de los casos ensayados, aproximadamente el 6% del cloruro de bencilo se hidroliza y un 94% formaría el TEBA.

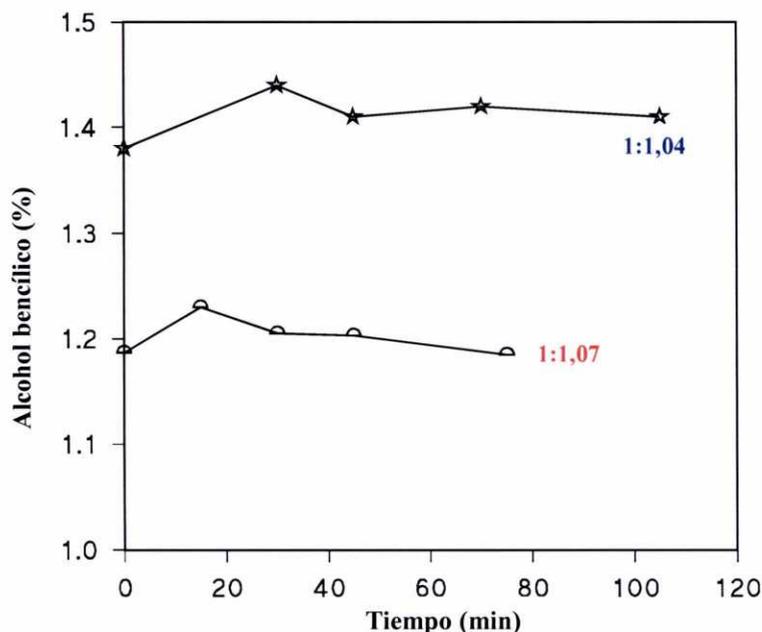


Figura V-10. Cinética del alcohol bencílico durante la síntesis del TEBA al 50% en agua con exceso de trietilamina.

La presencia de alcohol bencílico como subproducto no está favorecida con el exceso de amina ya que para relaciones 1:1,04 se cuantifican 1,4% y para 1:1,07 el 1,2%. Podría interpretarse esto como un aumento en el rendimiento de la reacción principal en detrimento de la secundaria. Por otra parte, no se ha encontrado explicación a las pequeñas variaciones durante la cinética, un aumento al inicio y una tendencia a la bajada después. Solamente apuntar que para los dos síntesis el incremento coincide con la mayor disminución de cloruro de bencilo, de 2000 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y una parte de éste pudo hidrolizarse y formar el alcohol.

Las diferencias encontradas entre la síntesis de los dos cuaternarios (BAK y TEBA) que radican en que para este último, se observa una menor velocidad de reacción en la formación del cuaternario y una mayor formación de subproductos (alcohol bencílico), podrían ser explicadas por una mayor basicidad de la amina alquilada. El pK_b de la trietilamina, de 3,2, es menor que el de las aminas primarias de la serie de la dimetilamina ($\text{C}_{12}\text{-C}_{16}$) usada para la formación del BAK. El pK_b de la laurilamina (C_{12}) es de 3,37 y el de la palmitilamina (C_{16}) es de 3,39 y como la basicidad de las aminas alifáticas cumple la secuencia: RNH_2 (primarias) > RN_3 (terciarias); es de suponer que la trietilamina sería más básica que la dimetilamina ($\text{C}_{12}\text{-C}_{16}$). También experimentalmente, se confirma que en TEBA las síntesis con excesos de amina, inferiores al 1%, elevan el pH a valores cercanos a 10 mientras que en BAK no sobrepasan pH 8.

En la tabla V-3 se recogen los datos obtenidos en la cuantificación del TEBA, con sus respectivos coeficientes de variación para dos repeticiones en la relación 1:1,07. En principio valores inferiores al 50% parecen concordar con la formación del alcohol bencílico y las variaciones a los distintos tiempos de reacción

(CV=0,6%) pueden englobar la precisión del método pero también la del muestreo.

Tabla V-3. TEBA durante la eliminación de cloruro de bencilo en la síntesis con relación 1:1,07 en agua al 50%.

Relación 1:1,07					
t (min)	0	30	45	70	105
TEBA (%)	47,6	47,7	47,2	47,9	47,4
CV (%)	1,1	0,5	2,0	0,8	1,3

En la revisión de la cinética de la amina libre (tabla V-4) para las dos relaciones molares, se aprecia que la estabilización tiene lugar a valores muy inferiores a los teóricos, un 0,2% para un teórico de 1% y un 0,5% para uno de 1,4%. Sin embargo considerando que con cada mol de alcohol bencílico formado se genera otro de ácido clorhídrico, parte de la amina libre estaría neutralizando el ácido.

Tabla V-4. Alcalinidad expresada como trietilamina libre (método UNE 55712:1982) durante la eliminación de cloruro de bencilo en las síntesis de TEBA en agua al 50%.

Relación 1:1,04					
t (min)	0	30	45	70	105
Alcalinidad (%)	0,36	0,23	0,19	0,23	0,20

Relación 1:1,07					
t (min)	0	30	45	70	105
Alcalinidad (%)	0,63	0,54	0,46	0,49	0,45

Para verificarlo y como análisis final se determina la acidez propuesta en UNE 55712:1982 expresada como amina clorhidrata (tabla V-5) y se realiza un balance másico de la trietilamina. Para el TEBA al 50% se emplea un porcentaje de amina que representaba el 23,2% del total, en el producto final se encuentra en el cuaternario (47,4%) representando un 21,05%, en la amina clorhidrata (1,7%) un 1,25% y como amina libre un 0,5%, lo que supone en total un 22,8% y una dispersión de un 0,4% con respecto al teórico posiblemente debida a la precisión en la cuantificación del cuaternario.

Otros análisis como el porcentaje de agua total con técnica de Karl Fischer (norma UNE 55-525-90) y los cloruros totales (tabla V-5) permiten confirmar el balance másico de los compuestos principales. El cuaternario, el alcohol bencílico y la amina en sus formas libre y clorhidrata suman un 50,7% y el agua representa un 49,2%. También el balance másico de los cloruros procedentes del TEBA y de la amina clorhidrata (7,84%) se ajustan bastante bien a los hallados en la determinación volumétrica.

Tabla V-5. Análisis finales de la síntesis de relación 1: 1,07 para balance másico (%).

TEBA	Agua	Alcohol bencílico	Amina libre	Amina clorhidrata	Cloruros
47,4	49,2	1,18	0,5	1,70	7,75

7. CONCLUSIONES

- El método elaborado consigue la separación y cuantificación por HPLC de cloruro de trietilamonio, cloruro de bencilo, benzaldehído y alcohol bencílico y en modo isocrático.

- El empleo controlado de la contribución silanofílica en el mecanismo de retención de TEBA ha sido decisivo para la separación del cuaternario de los residuales.
- La disminución de la concentración de los tampones aumenta la retención del TEBA al incrementar la contribución silanofílica de la fase estacionaria.
- La naturaleza del catión y el anión que componen el tampón de la fase móvil influyen en la retención del cuaternario. En la separación estudiada el catión tiene una mayor influencia que el anión siendo el sodio de los cationes ensayados (sodio y amonio), el que permite una mayor retención y de los aniones (acetato y formiato), el ión acetato.
- La retención del cuaternario varía con su concentración en la muestra inyectada. El catión del tampón que regula en mayor magnitud esta variación del QUAT es el amonio. También la concentración del TEBA ejerce un fuerte efecto sobre la asimetría del pico.
- Para una mejor adaptación a las muestras reales, se establecieron tres condiciones de cuantificación en función de la longitud de onda de detección y de la concentración de la muestra, con buena precisión y linealidad.
- El método aplicado al seguimiento de la cinética de los residuales conduce a las siguientes conclusiones:
 - o Un exceso de amina libre disminuye el tiempo de eliminación del cloruro de bencilo y posiblemente la formación de alcohol bencílico.
 - o El alcohol bencílico, producto de la reacción secundaria de hidrólisis del cloruro de bencilo, se genera en agua paralelamente al cuaternario y es al

menos 20 superior al encontrado en la formación del BAK en condiciones similares.

8. BIBLIOGRAFÍA

BIJ, K.E.; HORVATH, C.; MELANDER, W.R.; NAHUM A. (1981). Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. II Irregular retention behaviour and effect of silanol masking. *J. Chromatogr*, **203**, 65.

BLUHM, L.H.; LI, T. (1999). Effect of analogue ions in normal-phase ion-pair chromatography of quaternary ammonium compounds. *J. Chromatogr. Sci.* **37**, 273.

CACHET, C.; WIART, R.; IVANOV, I.S.; RASHKOV, S.S. (1994). Mechanism of zinc deposition and reverse dissolution of deposits. *Bul. Chem. Commun.* **27**, 468.

CIOCA, C.E.; IULIAN, M.; AMBRUS I.P. (1984). *Triethylbenzylammonium chloride*. Patent N° RO 84022, Kind B, Date 19840523, Application N° RO 1982-106441, Date 19820126.

CROMMEN, J.; FRANSSON, B.; SCHILL, G. (1977). Ion-pair chromatography in the low concentration range by use of highly absorbing counter ions. *J. Chromatogr*, **142**, 283.

CROMMEN, J. (1980). Ion-pair chromatography in the low concentration range by use of highly absorbing counter ions. III. High-performance liquid chromatography of quaternary alkylammonium ions as ions pairs with naphthalene-2-sulphonate, using a silica support of low surface area. *J. Chromatogr*, **193**, 225.

CRONCE, D.T. (1996). *Chemical warfare agent decontaminant solution using quaternary ammonium complexes*. Patent N° US 615348, Kind AO, Date 19961001, Application N° US 1996-615348, Date 19950315.

CROSS, J. (1994). *Cationic surfactants: Analytical and biological evaluation*, Surfactant Science Series, Vol 53, Marcel Dekker, New York.

DAS, S.; DAS, H.K. (1997). Extraction-spectrophotometric determination of iron using benzyltriethylammonium chloride. *J. Indian Chem. Soc.* **74**, 740.

DENKERT, M.; HACKZELL, L.; SCHILL, G.; SJÖGREN E. (1981). Reversed-phase ion -pair chromatography with uv- absorbing in the mobile phase. *J. Chromatogr.* **218**, 31.

De SCHUTTER, J.A.; De MOERLOOSE, P. (1988). Polar contributions of the stationary phase to the reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic separation of quaternary ammonium drugs. *J. Chromatogr.* **437**, 83.

EBLE, J.E.; GROB, R.L.; ANTLE, P.E.; SNYDER, L.R. (1987) . Simplified description of high-performance liquid chromatographic separation under overload conditions, based on the Craig distribution model. II. Effect of isotherm type, and experimental verification of computer simulations for a single band. *J. Chromatogr.*, **384**, 45.

GÓMEZ- GOMAR, A.; GONZALEZ-AUBERT, M.M.; GARCÉS-TORRENTS, J.; COSTA-SEGARRA, J. (1990). Determination of benzalkonium chloride in aqueous ophthalmic preparations by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**, 871.

GREVING, J.E.; BOUMAN, H.; JONKMAN, J.H.; WESTENBERG, H.G.M.; De ZEEUW, R.A. (1979). Analysis of quaternary ammonium compounds and basic drugs based on ion -pair adsorption high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **186**, 683.

HELBOE, P. (1983). Separation and quantitative determination of long-chain alkyltrimethylammonium ions by reversed-phase ion-pair liquid chromatography using ultraviolet-absorbing counter ions. *J. Chromatogr.* **261**, 117.

ISO 2871-1. 1972. Agents de surface -Détergents-Détermination de la teneur en matière active cationique.

KIEL, J.; MORGAN, S.L.; ABRAMSON, R. (1985). Effects of amine modifiers on retention and peak shape in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **320**, 313.

LARSON, J.R.; PFEIFFER, C.D. (1983). Determination of alkyl quaternary ammonium compounds by liquid chromatography with indirect photometric detection. *Anal. Chem.* **55**, 393.

LEI, CH.; TANG, F.; WANG, L.; TANG, M. (1994). Determination of trace copper, cobalt, manganese and zinc by ion-pair high-performance liquid chromatography and spectrometry. *Fenxi Huaxue* **22**(6), 552.

LIN, CH-E.; CHIOU, W-CH.; LIN, W-CH. (1996). Capillary zone electrophoresis separation of alkylbenzylquaternary ammonium compounds: effect of organic modifier. *J. Chromatogr. A* **722**, 345.

LU, W.; YAN, CH.; XUE, J.; GU, Z. (1992). Solid-liquid phase-catalyzed synthesis of triethyl orthoformate. *Huaxue Shiji* **14** (5) 317.

MATH, C.; FAZEKAS, M.; ERDELICS, S. (1994). *Producing benzyltriethylammonium chloride aqueous solutions as phase-transfer catalysts for manufacture of epoxy resins*. Patent N° HU 66752, Kind A2, Date 19941228, Application N° HU 92-9203964, Date 19921215.

MATHUR, R.; BISWAS, A.; CHANDRA, A.K.; MUKHOPADHYAY, R. (1996). Quaternary ammonium salts: new curatives for vulcanization of natural rubber. *Rubber India* **48** (9), 41.

McCALLEY, D.V. (1994). Influence of analyte stereochemistry and basicity on peak shape of basic compound in high-performance liquid chromatography with reversed-phase columns, using pyridine and alkyl-substituted derivatives as probe compounds. *J. Chromatogr. A* **664**, 139.

NAMBIAR, O.G.B.; KALPANA GOSAVI ; RAVINDRANATHAN, T. (1991). Plastic membrane ion-selective electrode for the determination of denatonium benzoate (Bitrex). *Analyst* **116** (10), 1011.

NAHUM, A.; HORVATH, C. (1981). Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. I Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr.* **203**, 53.

NAWROCKI, J. (1997). The silanol group and its role in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **779**, 29.

NIELEN, M. (1993). Capillary zone electrophoresis using a hollow polypropylene fiber. *High Resolut. Cromatogr.* **16** (1), 62.

NIEGEL, H.; MEYER, H.P.; NAUWALD, G. (1990). Preparation of triethylbenzylammonium chloride. Patent N° 283497, Kind A7, Date 19901017, Application N° 1988-318462, Date 19880729.

McPHERSON, B.P.; RASMUSSEN, H.T. 1994. *Cationic surfactants: Analytical and biological evaluation*, Surfactant Science Series, Vol 53, Marcel Dekker, New York.

van der MOOLEN, J.N.; POPPE, H.; SMIT, H. (1997). A micromachined injection device for CZE: Application to correlation CZE. *Anal. Chem.* **69** (20), 4220.

PARRIS, N. (1980). Reversed-phase HPLC. Determination of ionic surfactants as UV-absorbing ion pairs. *J. Liq. Chromatogr.* **3** (11) 1743.

PRIETO-BLANCO, M.C.; LOPEZ-MAHIA, P.; PRADA-RODRIGUEZ D. (1999). Analysis of residual products in benzalkonium chloride by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **37**, 295.

RUNGE, H.J.; LUECKE, L. (1984). *Technical production of triethylbenzylammonium chloride*. Patent N° DD 208147, Kind A1, Date 19840328, Application N° DD 1981-235879, Date 19811217.

SHAPKA, V.Kh.; KRAVTOV, V.S.; AGEEVA, I.S.; MILOKOSTOVA, T.V. (1997). Developing silver halide color photographic materials. Patent N° SU 1644074 , Kind A1 Date 19910423, Application N° SU 88-4622299 Date 19881219.

UNE 55712:1982. Agentes de superficie. Análisis de los cloruros de amonio cuaternario de cadena grasa técnicos. Determinación del índice de ácido y del índice de amina.

UNE 55-525-90. Agentes de superficie. Determinación del agua por el método de Karl Fischer.

VERVOOT, R.J M.; MARIS, F.A.; HINDRIKS, H. (1992). Comparison of high-performance liquid chromatographic methods for the analysis of basic drugs. *J. Chromatogr.* **623**, 207.

WILLIAMS, R.L.; CHILDS, B.; DOSE, E.V.; GUIOCHON, G.; VIGH G. (1997). Peak shape distortions in the capillary electrophoretic separations of strong electrolytes when the background electrolyte contains two strong electrolyte cations. *Anal. Chem.* **69** (7) 1347.

CAPÍTULO VI

Separación individual y simultánea de la serie homóloga del cloruro de benzalconio (BAK) y de cocoamidopropilbencilamonio (BAA) por electroforesis capilar de zona (CZE)

CAPÍTULO VI. SEPARACIÓN INDIVIDUAL Y SIMULTÁNEA DE LA SERIE HOMÓLOGA DEL CLORURO DE BENZALCONIO (BAK) Y DE COCOAMIDOPROPILBENCILAMONIO (BAA) POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE)

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	241
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS CUATERNARIOS POR CE.....	243
3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS	254
4. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL CLORURO DE BENZALCONIO (BAK)	255
4.1. Consideraciones previas.....	257
4.2. Efecto del modificador orgánico como aditivo en el electrolito portador	259
4.3. Efecto del modificador orgánico en la preparación de la muestra.....	262
4.4. Efecto de la longitud del capilar, la temperatura y el voltaje	263
4.5. Mejora de la sensibilidad con técnicas de inyección de campo amplificado	268
5. SEPARACIÓN SIMULTÁNEA DE BAK Y DE BAA	271
5.1. Efecto de la longitud del capilar, el voltaje y la temperatura	273
5.2. Efecto del pH y la concentración del electrolito.....	275
5.3. Mejora de la sensibilidad con técnicas de preconcentración de campo amplificado	281
6. ASPECTOS CUANTITATIVOS EN EL ANÁLISIS DEL BAK Y BAA.....	283
7. APLICACIÓN A MUESTRAS INDUSTRIALES Y PRODUCTOS FORMULADOS	285
8. ESTUDIO ANALÍTICO COMPARATIVO PARA BAA Y BAK POR HPLC Y CE.....	287
9. CONCLUSIONES.....	294
10. BIBLIOGRAFÍA.....	295

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

En el estudio de los tensioactivos catiónicos, la aplicación de las nuevas técnicas analíticas que van surgiendo, parece un objetivo ineludible, para mejorar la información sobre su naturaleza química y abrir campos de investigación en el análisis de residuales o de formulaciones. En compuestos químicos industriales como los tensioactivos, de producción y uso masivo, en ocasiones, la necesidad de nuevos planteamientos va por delante de la propia investigación química.

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que aunque puede constituir una alternativa al HPLC (abarca un rango mayor de compuestos susceptibles de analizar, desde pequeñas moléculas hasta agregados moleculares), en la mayoría de los casos es complementaria, dando muy buenos resultados en el análisis de iones. Comparativamente con HPLC, presenta un bajo consumo de disolventes, requiere pequeños volúmenes de muestra, capilares de bajo costo y con respecto a una gran mayoría de los métodos, que en cromatografía de líquidos no se llevan a cabo en columnas capilares, una eficiencia y resolución excelente en un tiempo de análisis muy corto.

La electroforesis capilar de zona (CZE), con detección ultravioleta combinada con técnicas de preconcentración propias, puede ser adecuada para análisis de productos formulados o de trazas medioambientales aunque los límites de detección sean del orden $\mu\text{g L}^{-1}$ o mg L^{-1} .

Pese a que en los años 90 han surgido numerosos artículos sobre los tensioactivos catiónicos en CE, su análisis ha presentado problemas debido a la tendencia a adsorberse a la superficie interior del capilar y a formar agregados micelares. El origen de la adsorción está en la interacción del compuesto catiónico

con la superficie cargada negativamente (grupos silanoles) de los capilares. No obstante estas dificultades iniciales, han sido solventadas usando medios no acuosos para la separación, capilares recubiertos o con la práctica más extendida, empleando modificadores orgánicos en proporciones altas en el tampón y con concentraciones de trabajo inferiores a la concentración micelar crítica.

A la vista de la bibliografía analítica y a las características de la técnica, en principio la CE ofrece muy buenas expectativas para el análisis de la serie homóloga de los tensioactivos catiónicos en estudio: el cloruro de benzalconio y el de cocoamidopropildimetilamonio (BAA). Este último se formaría al cuaternizar la cocoamidopropilamina (CAPA) con cloruro de bencilo según la siguiente reacción (Figura VI-1).

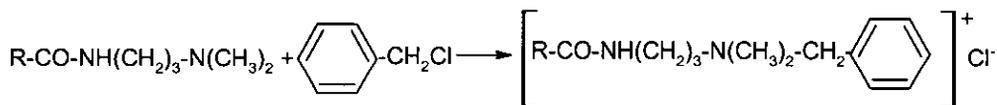


Figura VI-1. Reacción de formación del cloruro de cocoamidopropilbencildimetilamonio.

El análisis de residuales quedaría pospuesto a investigaciones futuras debido a las limitaciones de concentración del tensioactivo catiónico en el sistema. En electroforesis capilar de zona (CZE), para una migración libre, sin problemas de agregación, el compuesto catiónico no debe alcanzar la concentración micelar crítica, que es del orden de 10^{-3} M para C_{12} , (350 mg L^{-1} en BAK). Por lo que determinar los productos residuales con concentraciones en la matriz del orden de mg L^{-1} (0,0001%), supondría desarrollar un método analítico con unos límites de detección para los residuales inferiores a $\mu\text{g L}^{-1}$.

Planteado de esta manera el problema, los objetivos a alcanzar serían:

1. Separación de la cadena homóloga del cloruro de benzalconio.
2. Búsqueda de un método con buenos límites de detección que permita la identificación de BAK en diferentes matrices.
3. Separación de la cadena homóloga del cuaternario derivado de la cocoamidopropilamina.
4. Desarrollo de un método que posibilite la separación simultánea de la serie homóloga de los dos compuestos cuaternarios estudiados: BAK y BAA.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS CUATERNARIOS POR CE

La electroforesis como técnica de separación fue introducida en los años 30 por Arne Teselius y está basada en la migración de iones bajo un campo eléctrico, los positivos migran al cátodo y los negativos al ánodo en función de la relación carga / radio de los iones. En los años 80 cuando la electroforesis convencional ya contaba con una fuerte implantación para el análisis de macromoléculas, aparecen nuevas aplicaciones con los trabajos en MIKKERS y col. (1979) y de JORGENSON y LUKACS (1981) en un nuevo tipo de electroforesis, la llamada electroforesis capilar. En 1988 se comercializa el primer instrumento y en la actualidad la técnica demuestra su gran versatilidad en aplicaciones a análisis de alimentos, medioambientales, bioquímicos, farmacéuticos, de biofluidos y de diagnóstico clínica puesto que resulta eficaz para separar iones pequeños, moléculas neutras y macromoléculas (YANG y col., 1997).

Con respecto a la electroforesis convencional, la capilar mitiga algunas de sus limitaciones, como son el ensanchamiento de las bandas provocado por el efecto Joule o calor producido en la disolución de trabajo cuando es atravesada por una corriente eléctrica. Los capilares con una alta resistencia permiten aplicar campos eléctricos muy altos (100-500 V/cm) con una mínima generación de calor. Por otra parte, la alta relación área superficial/volumen de los capilares ayuda a disipar fácilmente el calor generado (AGUILAR, 1990). Aunque con menos entidad que en la electroforesis tradicional, el ensanchamiento de banda reflejado en el pico en CE, también puede ser atribuible a efectos térmicos además de efectos de adsorción y de difusión.

A lo largo de los años 90, en los que la CE sufrió un rápido desarrollo, posiblemente ha corrido más pareja a la cromatografía que a la electroforesis tradicional. Las dos son técnicas de separación que comparten soportes de separación parecidos (capilares y columnas), formas de detección similares (UV, de fotodiodos, conductimétrico), un tratamiento de la señal idéntico e incluso publicaciones donde la electroforesis constituye un apartado junto a la cromatografía de gases o a la HPLC. En cuanto a los fundamentos, ambas técnicas tienen como punto de conexión, el que están basadas en las diferencias de velocidad entre solutos y como discrepancia, el que la CE se produce por la acción de un campo eléctrico, lo que le proporciona unas variables propias que no son aplicables en cromatografía.

Por otra parte, las dos técnicas se encuentran en un tipo de electroforesis capilar, la cromatografía capilar micelar electrocinética (MECK) resultante de una combinación de cromatografía y electroforesis que permite separar a la vez especies neutras y cargadas. La diferenciación entre los solutos no es debida

solamente a la relación carga/radio sino que para compuestos neutros, los mecanismos hidrofóbicos y de interacciones electrostáticas, similares a los que tienen lugar en cromatografía, jugarán un papel determinante (MONING Y KENNEDY, 1994).

Para los objetivos perseguidos en este capítulo se emplea el modo de electroforesis más habitual la CZE, donde los solutos catiónicos y aniónicos migran "en zonas" discretas a diferentes velocidades (HEIGER, 1992). De otros modos de CE, la electroforesis capilar sobre gel (CEG), el enfoque isoelectrónico capilar (CIEF) y la isotacoforesis, es esta última la que se ha aplicado a QUAT.

De los dos cuaternarios estudiados, BAK y BAA, el primero ya ha sido ampliamente examinado desde el punto de vista químico y de sus aplicaciones en el capítulo IV. Así que, a continuación se clasificará de forma breve, el segundo cuaternario BAA, después de que en el capítulo III se revisara la química de su precursor, la cocoamidopropilamina.

Los tensioactivos del tipo amidoamina se caracterizan por poseer una estructura que contiene uno o más grupos amida conjuntamente con uno o más grupo amino. Constituyen un grupo muy numeroso que se diversifica en función de la composición de la cadena grasa o de variaciones en el grupo amino que puede ser del tipo hidracina, dietilentriamina, de nailon, o del grupo del acrilonitrilo entre las que se encuentra la DMPA. A partir de las amidoaminas grasas se pueden formar óxidos de amina, betaínas o cuando uno de los grupos amino se cuaterniza, la sal de amonio cuaternario. El cuaternario de esta familia, comercialmente más importante, posiblemente es la diamidoamina de sebo, cuaternizada con dimetilsulfato, que constituye un buen agente suavizante de tejidos (RICHMOND, 1990).

El cuaternario de amidoamina analizado con el BAK es el bencil QUAT de amidoamina producto resultante de cuaternizar la cocoamidopropilamina (CAPA) con cloruro de bencilo según la reacción descrita en la figura VI-1. Este compuesto está recomendado como acondicionador de pelo por RICHMOND (1990), y dada la similitud estructural con el BAK podría ser empleado como bactericida en limpieza de materiales.

La mayor parte de la bibliografía analítica de compuestos catiónicos por CE se refiere a sales de alquilbencilamonio de cadena corta o con serie homóloga. Específicamente, no se ha encontrado ningún método cromatográfico ni electroforético sobre BAA, pero sí de BAK con separación de serie homóloga, determinación en formulaciones y comparación de métodos por HPLC y CE. En principio, se examina los trabajos de catiónicos, en general, por CE porque plantean problemas y soluciones comunes y posteriormente se centrará la revisión en los BAK.

Conjuntamente con los inconvenientes que presentan los tensioactivos catiónicos inherentes a sus propiedades de hidrofobicidad y polaridad, muchos de ellos no poseen grupos cromóforos, lo que imposibilita su detección directa en UV. Al igual que en HPLC, los investigadores que han analizado por CE compuestos catiónicos con estas características, han optado por detección indirecta (SHAMSI y DANIELSON, 1996 y ALTRIA y col., 1998) o conductimétrica (TRIBET y col., 1992).

En la detección indirecta, el sistema óptico empleado es el mismo que para la detección en UV, solamente que en el electrolito se añade un reactivo cromóforo. SHAMSI y DANIELSON (1996) proponen un cromóforo, el monofosfato de adenosina para tensioactivos aniónicos (alquilsarcosinatos) y otro para catiónicos,

el violeta de tetrazolinio. Este último reactivo se encuentra en concentraciones del orden de mM en un electrolito de ácido bórico a pH=6 y metanol como modificador orgánico. A diferencia de otros cromóforos como el C₁₂-BAK y la efedrina que a longitudes de onda bajas poseen una absorción comparable con el violeta de tetrazolinio, este último presenta tres máximos en el intervalo de 250-300 nm, en cualquiera de los cuáles los límites de detección para los compuestos catiónicos son ligeramente inferiores a 1 mg L⁻¹. Para muestras reales, la posibilidad de detección a longitud de onda medias hace más viable el método ya que son menos probables las interferencias de impurezas.

Con estas condiciones, se plantean tres tipos de separaciones: catiónicos de cadena corta como tetrametil-, tetraetil- y tetrabutilamonio; de cadena larga como dialquildimetilamonio con serie homóloga en el intervalo de C₁₂-C₁₈ y por último una separación, de isómeros cis y trans de derivados catiónicos de azonioadamantano. Generalmente, en CE los isómeros se resuelven más fácilmente que con otras técnicas de separación.

ALTRIA y col. (1998) emplean otro cromóforo el imidazol, en la separación de los siguientes compuestos: cationes metálicos, aminas no cromóforas, cuaternarios de cadena corta (tetra (metil- etil- y butil-) amonio y tensioactivos catiónicos (dodecil, tetradecil, hexadecil y octadecil) trimetilamonio y benciltetrametilamonio. Además utilizan metanol con ácido acético, reduciendo de esta forma las interacciones hidrofóbicas y la micelización. El uso de un electrolito no acuoso (metanol) ya había sido introducida en el análisis de tensioactivos aniónicos por SALIMI-MOOSAVI y CASSIDY (1996). Los medios no acuosos tienen como ventajas, además de analizar sustancias con pobre solubilidad en agua, las bajas viscosidades que poseen algunos disolventes

orgánicos lo que facilita una movilidad alta de los iones y tiempos de análisis cortos. No obstante estos electrolitos, a longitudes de onda bajas en UV, suelen presentar la línea de base con más ruido que los acuosos.

Con detección conductimétrica, TRIBET y col. (1992) determinan sales de alquiltrimetilamonio desde C₈-C₂₀ en modo de isotacoforesis y en capilares huecos de 0,5 mm de d.i. El electrolito precedente contiene como ión principal K⁺ y contraión acetato a pH ácido con un aditivo, el tetraetilenglicol, el electrolito final es una disolución de creatinina y el disolvente de ambos es una mezcla de metanol/agua (50:50). Los tiempos de análisis son altos de 20-30 min pero los límites de detección aceptables del orden de 10⁻⁵ M. El método se aplica a una muestra industrial de alquiltrimetilamonio al 50%, disuelta en una mezcla de agua e isopropanol. La cadena alquílica saturada del QUAT proviene de un aceite de copra de manera que las cadenas mayoritarias son C₁₂ (60%) y C₁₄ (20%) con un 10% de C₁₆ y en menor proporción C₁₈ y C₈₋₁₀. Esta composición es cuantificada con y sin calibración para una concentración de muestra inyectada mayor que la tolerada en CZE, del orden de 10⁻² M. También se analizan tensioactivos aniónicos, sulfatos y sulfonatos variando la composición de electrolito.

Una prueba de la competencia, que no solo alternancia, de la CE con HPLC es el trabajo de PIERA y col. (1999) realizado con detección directa a 210 nm. Ante la aparición de un nuevo tipo de tensioactivo catiónico, las sales del alquilamido arginina, se confrontan ambas técnicas en el análisis de la cadena homóloga. Seguramente debido a que la separación de homólogos en HPLC está muy estudiada, la optimización para este nuevo compuesto no es demasiado laboriosa. En CE se ensayan variables del tampón: pH, naturaleza y concentración del tampón y del modificador orgánico e instrumentales como la temperatura y el

protocolo de limpieza del capilar. El tampón dihidrógeno fosfato sódico a pH de 4,5 y un 50% de acetonitrilo (con un voltaje de 5kV) o 50% de tetrahidrofurano (15kV) son condiciones suficientes para separar la serie homóloga. Un aumento de la concentración del tampón a 100mM permite una mejora en la sensibilidad y la reproducibilidad. En este último parámetro, la temperatura y la limpieza del capilar juegan un papel decisivo. Aunque la HPLC, en general, proporciona tiempos de análisis más largos, cuando estos autores realizan la comparación entre las dos técnicas observan que sorprendentemente, los tiempos de elución son 10 veces más cortos que los de migración en CE (sobre 50 min). También el rango lineal y la sensibilidad son mejores en HPLC, pero la eficiencia es mayor en EC.

La primera referencia que encontramos de haluros de alquilbencilamonio es decir, de estructura de BAK y BAA es la de WEISS y col. (1992) y en ella se exponen los problemas (comunes a todos los tensioactivos catiónicos) que presentan estos compuestos en CE para su separación: alta polaridad y formación de micelas siendo la solución adoptada para solventarlos la adición de un modificador orgánico como el tetrahidrofurano. El método optimizado permite separar BAK (con contranión bromuro) de los alquiletilbencilamonio con tiempos de migración elevados para los homólogos, entre 15 y 18 min y un límite de detección inferior a un 1 mg L^{-1} . Estos autores, incluso utilizan el C_{12} de los BAK, en unión del dodecilsulfato sódico en detección indirecta para separar y cuantificar haluros de alquiltrimetilamonio en un desinfectante.

LIN y col. (1996a) revisan la efectividad del modificador orgánico en el tampón para romper las micelas con cuatro disolventes, estableciendo el siguiente orden: acetonitrilo > tetrahidrofurano > acetona > metanol. Igualmente, se estudian otros factores como la concentración y el pH del tampón, y la

concentración de la muestra consiguiendo la separación de los homólogos del BAK y de otros 5 cuaternarios en solamente 3 min. En un trabajo posterior, LIN y col. (1996b) se centran en la separación de los homólogos del BAK y mejoran la resolución de los picos de cadenas más largas, sobre todo C₁₈, con el cambio del disolvente orgánico en la preparación de la muestra: acetonitrilo por metanol. Para ello realiza un estudio teórico documentado con bibliografía sobre la causa del ensanchamiento de los picos, a saber, la incompleta separación de las micelas del tensioactivo. En esta línea de investigación, PIERA y col. (1997) separan los homólogos con THF, con buena resolución de los picos y con tiempos de migración 10 veces superiores a los de Lin (de 20 a 30 min frente a 3 min). Finalmente el método es aplicado a una muestra industrial de BAK al 50%.

HEINIG y col. (1997a) separa también los homólogos en un tiempo mayor de 10 minutos determinándolos en un spray nasal. Se consigue la separación de BAK y un tensioactivo aniónico, un alquilbenceno sulfonato con vistas a una futura aplicación medioambiental. En un análisis comparativo con HPLC, concluyen que esta última técnica posee unos mejores límites de detección y reproducibilidad. En otro trabajo, los mismos autores HEINIG y col. (1997b) ensayan los homólogos del BAK como cromóforos para la detección indirecta de alquil y dialquilamonio.

En los trabajos publicados de BAK con CE que están orientados al análisis de muestras reales (formulaciones farmacéuticas), el problema a resolver será compatibilizar, en una separación, compuestos con características electroforéticas muy distintas. En la mayoría de los casos, la consecución de los objetivos propuestos se efectúa con la llamada cromatografía capilar micelar electrocinética (MECK). Esta modalidad resulta eficaz en matrices que contienen compuestos sin

carga y/o muy hidrofóbicos y se caracteriza por la adición de un tensioactivo, en muchas ocasiones el dodecilsulfato sódico (SDS), en el tampón a concentraciones por encima de CMC.

ALTRIA y col. (1996), en un método validado para su inclusión en la farmacopea británica (BP), separan los homólogos del BAK de histamina e histidina en una formulación con características prefijadas de concentración de los componentes; la histamina se encuentra en un amplio rango de concentraciones (0,12-16 mg mL⁻¹) y el BAK a una concentración fija (0,01%). El método propuesto sustituiría a tres determinaciones con otras técnicas especificadas en la BP: cromatografía en capa fina, volumétrico y de color, con un ahorro de tiempo tal, que las operaciones que en electroforesis capilar se miden en minutos o en horas, en los métodos de la farmacopea se necesitan horas o en días. Además el límite de detección del BAK es muy bueno 0,05 mg L⁻¹.

TAYLOR y col. (1998a) separan tres agentes antimicrobianos BAK, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de decalinio que pueden formar parte, aunque individualmente, en formulación de pastillas para el tratamiento de las infecciones bucales y de garganta. Los compuestos presentan diferencias de hidrofobicidad (longitud de la cadena alquílica) y de carga (el decalinio presenta dos grupos cuaternarios) por lo que se optimizan tres métodos de separación variando para cada uno de ellos el pH y de concentración del tampón y la longitud de onda de trabajo. En el caso del decalinio fue necesario el uso de SDS para separarlo de dos impurezas que contiene. Los tiempos de elución son muy buenos, menores de 4 min y separan los tres homólogos del BAK (C₁₂, C₁₄ y C₁₆).

CIFUENTES y col. (1998) se enfrentan a una separación de BAK (dos homólogos) mezclados con dos compuestos no iónicos en un espray nasal, que

resuelven después de la optimización de parámetros como la concentración de SDS o la temperatura, en un sólo análisis y en un tiempo menor de 5 min. También en un spray nasal, JIMIDAR y col. (1998) separan del componente principal de la formulación dos homólogos del BAK, C₁₂ y C₁₄ usando un electrolito que contiene ácido fosfórico y trietilamina a pH 2,3.

HERRERO y col. (2000) analizan mezclas de BAK, resolviendo los cuatro homólogos (C₁₂, C₁₄, C₁₆, y C₁₈) y cloruro de cetilpiridinio (CPC) con cromatografía micelar capilar electrocinética ya que con la electroforesis de zona no consiguen la separación total de los cinco componentes. Para este problema a diferencia de otros trabajos publicados, MECK no se elige por la existencia de compuestos neutros, ambos son catiónicos, sino por que ofrece una mejor selectividad.

El sistema tampón/surfactante consiste en borato a pH básico (8,5) y un biotensioactivo, concretamente “deoxicolato” sódico con un bajo número de agregación y unas características estructurales que lo hacen compatible (no hay rupturas de micelas) con cantidades de modificador orgánico de hasta un 20% de etanol. Con tiempos de migración entre 10 y 20 min y límites de detección 3 y 25 mg L⁻¹, se cuantifican los dos catiónicos en 9 formulaciones (desinfectante para la piel, oral, para el lavado de la boca, espermicida...) aunque en ninguna de ellas contiene BAK y CPC a la vez.

En algunas aplicaciones como el análisis de iones inorgánicos (HADDAD, 1997) HPLC y CE han desarrollado líneas en la investigación con resultados muy similares. También para BAK, usando ambas técnicas se han publicado numerosos trabajos que abordan la separación de homólogos o la cuantificación en formulaciones y por tanto se comienzan a realizar comparaciones. Así PRINCE y

col. (1999) cotejan el método recomendado por la USP para HPLC para la separación de homólogos y un método de CE probado en una matriz bioquímica (ALTRIA y col., 1996) concluyendo que la primera tiene una mejor precisión, sobre todo en días distintos, pero la segunda tiene unos tiempos de análisis 5 veces menores. Después de revisar la bibliografía esto puede hacerse extensivo para la mayoría de las condiciones optimizadas en ambas técnicas. Otros parámetros analíticos como la linealidad y la sensibilidad en este método son comparables para ambas técnicas.

TAYLOR y col. (1998b) en la formulación estudiada en otros trabajos (TAYLOR y col., 1998a) con tres antimicrobianos, uno de ellos el BAK logra un análisis completo de los homólogos por CE pero en HPLC no consigue esa separación eluyéndolos todos juntos en un pico cromatográfico. Las condiciones ensayadas en HPLC no han incluido muchas de las soluciones encontradas por otros investigadores para eliminar interferencias (citadas en el capítulo IV) por lo que realmente no sería correcto hablar de un análisis comparativo sino de la descripción de los experimentos de los autores.

El análisis de tensioactivos aniónicos por CE está siendo aplicado en muestras medioambientales, en aguas de ríos y residuales como recogen VOGT Y HEINIG (1999) en una revisión de técnicas cromatograficas (CG, HPLC, GC-MS y LC-MS) y electroforéticas. Sin embargo los tensioactivos catiónicos (alquilbencilamonio) sólo han sido determinados como trazas en formulaciones, esperando en el futuro con posteriores desarrollos de la técnica, su aplicación a muestras medioambientales.

3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS

- El sistema de electroforesis capilar empleado es un HP^{3D} CE Hewlett-Packard con un detector de fotodiodos.
- Los capilares de sílice fundida no recubiertas de dimensiones entre 40 y 56 cm de longitud efectiva y 50 μm de diámetro y los capilares de sílice fundida recubiertas de poliimida de 40 x 50 μm fueron suministradas por Composite Metal Service (Teknocroma).
- Baño ultrasonidos BRANSON, modelo 3200.
- Acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano (Romil) de calidad cromatográfica.
- Agua desionizada ultrapura producida por un sistema Milli-Q (Millipore).
- Didihidrógeno fosfato sódico dihidrato (Panreac), para análisis.
- Hidróxido sódico 1M y 0.1M, de Hewlett-Packard.
- Bromuro de bencildimetildodecilamonio del 97%, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio del 99% y cloruro de bencildimetilestearilamonio monohidrato del 90%; todos ellos de Aldrich. Cloruro de bencildimetilhexadecilamonio con un 5% de agua de Sigma.
- Cloruro de benzalconio (BAK), puro, mezcla de C₁₂ y C₁₄ de Panreac.
- Cloruro de benzalconio (BAK) y de amidoamina (BAA) al 50% en disolución acuosa con cadena alquílica tipo “coco” pertenecen a lotes de fabricación de Arteixo Química.
- Membranas Millex (Millipore).

4. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DEL CLORURO DE BENZALCONIO (BAK)

La tendencia de los tensioactivos a formar agregados moleculares de tamaño coloidal como las micelas, resulta en CE un factor más crítico que en HPLC. Tanto que, antes de que estos compuestos se introduzcan en el sistema es necesario realizar consideraciones acerca de su concentración óptima. Revisando los estudios sobre la naturaleza de las micelas (forma, estructura...) se considera que éstas son normalmente agregados esféricos donde los grupos polares están orientados hacia la superficie de la micela y las colas hidrofóbicas hacia el interior. Se originan como resultado de los efectos hidrofóbicos que generan las cadenas hidrocarbonadas al no poder ser solvatadas en disolución acuosa, disminuyendo de este modo la energía libre del sistema. Cuando la concentración del tensioactivo en disolución es superior a la concentración micelar crítica (CMC), las micelas se forman a través del equilibrio:



donde N es el número de agregación que varía en un rango de 40-120 dependiendo del tipo de tensioactivo (HINZE, 1987). Además para cada sistema, N es una media debida al equilibrio de intercambio de las micelas con el monómero para formar nuevas micelas con un tamaño cercano al valor de N. Desde el punto de vista electrofóretico esto supone especies de distinto tamaño con velocidades de migración diferentes, que darán bandas de dispersión en el electroferograma. De ahí la necesidad de trabajar con concentraciones por debajo de CMC para minimizar la formación de micelas. WEISS y col. (1992) recogen la CMC para cloruros de alquilbencildimetilamonio en función de la cadena alquílica (tabla VI-1) y trabajan con concentraciones de 1 mM, LIN y col. (1996), rebajan la

concentración a 0,01 mM más cercana al CMC de las cadenas alquílicas más largas si bien éstas son las que se encuentran en menor proporción en la serie homóloga. Una concentración de 0,01 M es la que se escoge en este trabajo para la separación.

Tabla VI-1. Concentración micelar crítica para diferentes cloruros de alquilbencildimetilamonio.

Longitud de la cadena alquílica	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈
CMC(mM)	3	0,37	0,2-0,4	0,008

La optimización de la separación debe resolver, en principio, los problemas específicos de los tensioactivos catiónicos, para separar la cadena homóloga con buena selectividad y posteriormente, sirviéndose de variables instrumentales, ajustar las condiciones obtenidas en la primera etapa para lograr la mejor resolución de los homólogos en el menor tiempo posible. Por último, se realiza una mejora de la sensibilidad haciendo uso de técnicas de preconcentración *on-column* de la electroforesis capilar.

El parámetro que nos permite obtener una medida cuantitativa de los resultados conseguidos en la separación será la resolución (Rs). Al igual que en cromatografía de líquidos, la resolución está definida como el cociente entre la diferencia entre los máximos de dos picos y la media del ancho de cada pico o si se expresa en función de la movilidad electroforética y el número de platos teóricos como:

$$Rs = \frac{1}{4} \left(\frac{\Delta\mu}{\mu_{MED}} \right) N^{1/2} \quad (1)$$

donde: $\Delta\mu$ es la diferencia de movilidades electroforéticas entre los dos compuestos considerados ($\Delta\mu = \mu_A - \mu_B$), μ_{MED} es la media de las movilidades electroforéticas de los compuestos considerados y N el número de platos teóricos.

Esta expresión proporciona una perspectiva acerca de la resolución como un producto de la selectividad (cociente de movilidades electroforéticas) y de la eficiencia (número de platos teóricos), dos parámetros de la separación a optimizar (GROSSMAN Y COLBURN, 1992).

4.1. Consideraciones previas

Preparación del capilar, del electrolito portador y de las disoluciones patrón

Los capilares nuevos antes de ser empleados para el análisis se someten a un ciclo de lavado con NaOH 1M durante 10 min, seguido de otros 10 min de lavado con NaOH 0,1 M y por último 5 min con agua desionizada. Después del lavado el capilar se equilibra con tampón durante 40 min.

El electrolito se prepara disolviendo la cantidad correspondiente de la sal sódica en una mezcla de acetonitrilo/agua (40:60) que se filtra y posteriormente se desgasifica en baño de ultrasonidos de 3 a 5 min justo antes de su utilización.

Se preparan disoluciones patrón concentradas de 1mM de BAK y BAA en agua. Las disoluciones de trabajo se obtienen por dilución en mezclas de agua/metanol (20/80, v/v) para la separación del BAK y en mezcla agua/acetonitrilo (60/40, v/v) para la separación de los dos catiónicos (BAK y BAA).

Condiciones electroforéticas

La separación del BAK se efectúa en las siguientes condiciones: un capilar de sílice fundida recubierta de poliimida de 40 cm de longitud efectiva y 50 μm de diámetro interno, termostata a 20°C, con detección ultravioleta a 200 nm. El electrolito portador consiste en un 60% tampón fosfato 20 mM (pH=5,2) y 40% acetonitrilo, aplicando un voltaje de 25 kV. Las muestras se inyectan hidrostáticamente con una presión positiva de 50 mbar durante 20 s variando el tiempo de inyección como función del procedimiento de preconcentración usado.

La separación electroforética simultánea de los dos catiónicos (BAK y BAA) se realiza con columna capilar de sílice fundida sin recubrir de 56 cm de longitud efectiva y 50 μm de diámetro interno termostata a 40°C con detección ultravioleta a 200 nm. El electrolito portador consiste en un 60% tampón fosfato 75 mM (pH=5,2) y 40% acetonitrilo, creando un campo eléctrico con un voltaje de 30 kV y la inyección se lleva a cabo de modo hidrodinámico aplicando una presión positiva de 50 mbar durante 20 s.

Acondicionamiento del capilar

Se efectúa una limpieza del capilar entre inyecciones para minimizar las adsorciones de los surfactantes catiónicos. Son dos los procedimientos que han dado buenos resultados:

- Lavado del capilar durante 3 min con electrolito portador.
- Lavado del capilar durante 3 min con NaOH 0,1M y posteriormente durante otros tres minutos del electrolito portador.

Si se emplean disoluciones diluidas y si se utiliza modificador orgánico en el electrolito y en la disolución de las muestras se consigue una buena reproducibilidad en el análisis con el primer procedimiento.

4.2. Efecto del modificador orgánico como aditivo en el electrolito portador

Dadas las dificultades que exhiben los catiónicos en CZE, tales como la adsorción en la pared del capilar y formación de micelas, se intenta minimizar estos efectos para conseguir que el tensioactivo catiónico migre libremente a través del capilar. Para ello el factor que parece más efectivo es la adición de un modificador orgánico al medio acuoso, conjuntamente con la separación en capilares con pared interna recubierta con poliimida.

La formación de micelas aumenta cuando un medio acuoso lleva un electrolito como es el caso del tampón en CE, y por tanto se rebaja la CMC, así para el SDS cuya CMC es de 8 mM en agua, con tampones fosfato/borato baja a 5 mM (SEPANIAK y COLE, 1987). Pero los disolventes orgánicos también influyen en el proceso de micelización, los alcoholes a bajas concentraciones aumentan la formación micelar pero a altas concentraciones la inhiben y otros como el acetonitrilo en mezclas con agua aumentan la CMC. Así los disolventes orgánicos más utilizados en la bibliografía de análisis de tensioactivos catiónicos (incluido BAK) por CE han sido el acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano. WEISS y col. (1992) trabajan con tetrahidrofurano advirtiendo que el acetonitrilo o el metanol no mejoran la forma del pico lograda con el primer disolvente. Sin embargo LIN y col. (1996), al realizar una búsqueda del modificador entre disolventes polares como acetonitrilo, metanol, acetona y tetrahidrofurano concluyen que el primero

es el más efectivo. Resultados comparables en cuanto a inhibición de la micelización con THF requerían tiempos de análisis más largos.

Teniendo en cuenta estos resultados de la bibliografía para el modificador, se verifica a distintas concentraciones cuál de los tres disolventes es más efectivo en una muestra de BAK con dos homólogos mayoritarios C_{12} y C_{14} . El metanol genera mucha inestabilidad en la línea de base y con el tetrahidrofurano se obtiene menos sensibilidad que cuando se prueba el acetonitrilo. Así que se elige el acetonitrilo y se optimiza la proporción necesaria de éste en el electrolito entre 0-50% (figura VI-2). Simultáneamente con las ventajas alcanzadas considerando la naturaleza del disolvente, se ha encontrado en los ensayos realizados, que la aplicación de la desgasificación sobre la mezcla del electrolito y el disolvente orgánico resulta primordial para conseguir una línea de base estable, con un ruido minimizado que permita separar los homólogos con buenos límites de detección.

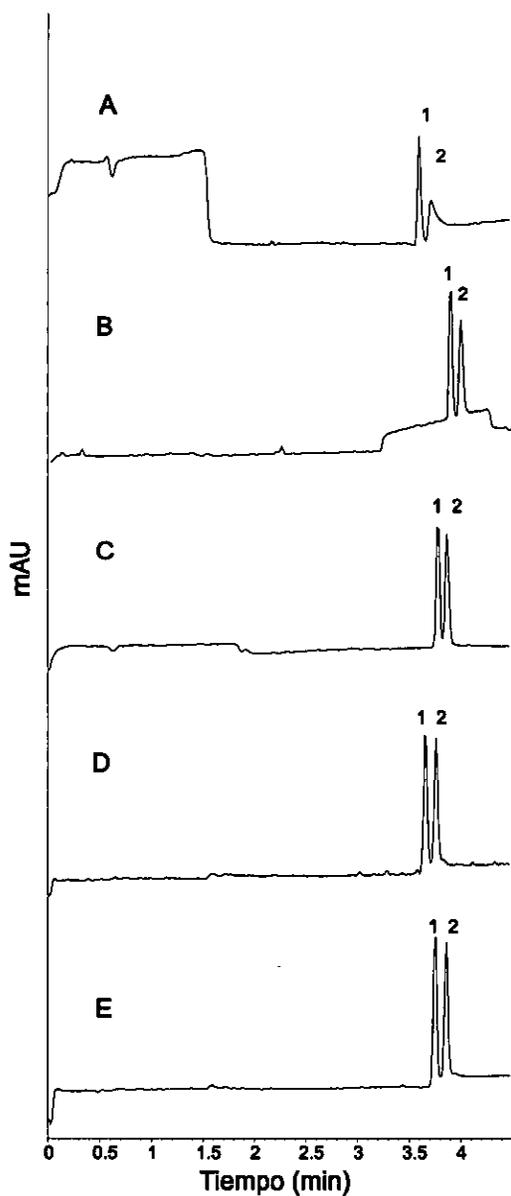


Figura VI-2. Efecto del acetonitrilo como modificador orgánico en el electrolito. (A) 0%, (B) 15%, (C) = 30% y (D)= 40%. (E) = 50%. Electrolito: 20mM NaH_2PO_4 pH=5,2. Voltaje: 25 kV, Temperatura: 20°C Detección: 200nm. Modo de inyección hidrodinámica: 50mbar, 5s. Muestra: 0,01mM en metanol:agua (80/20 v/v). 1. C_{12} -BAK, 2. C_{14} -BAK.

En ausencia de acetonitrilo sólo el homólogo C₁₂ eluye con un pico simétrico mientras el C₁₄ lo hace en un pico con cola y una señal más baja, indicativo de la existencia de micelas y de que no se produce una migración libre en el capilar. A medida que aumenta la proporción de acetonitrilo a 15, 30 y 40% la resolución va mejorando progresivamente, consiguiéndose los resultados óptimos en un 40%. Cantidades mayores de acetonitrilo no producen mejoras apreciables.

4.3. Efecto del modificador orgánico en la preparación de la muestra

El modificador orgánico tiene una influencia decisiva para la separación no sólo cuando forma parte del electrolito sino también en la preparación de la muestra. Su efecto en la forma del pico y la resolución ya había sido estudiado por ACKERMANS y col. (1991) con alquilfenoles sustituidos; por CRABTREE y col. (1994) con acetona-2,4 dinitrofenilhidrazona o LIN y col. (1996) con QUAT. Estos últimos investigadores usando metanol como disolvente en la preparación, realizan una discusión teórica de los posibles mecanismos que explican el hecho experimental de su efecto en el equilibrio micelar y por tanto en el número de cationes libres en el sistema electroforético.

Por una parte, el metanol es absorbido parcialmente por las micelas del catiónico pero como consecuencia de su carácter débilmente hidrofóbico (tiene un grupo metilo) no en el interior de la micela sino en su parte externa, por la cabeza iónica, aumentando las interacciones solvofóbicas de las cadenas alquílicas de las micelas y estabilizando la micela. Pero también el metanol disminuye la constante dieléctrica (ϵ) del medio al desplazar el agua de la superficie de la micela, disminuir su polaridad y aumentar las repulsiones en las cabezas iónicas, conduciendo a la ruptura de las micelas cuando la cantidad de metanol es

suficientemente grande. Los dos efectos combinados (solvofóbicos y cambios de ϵ) son dependientes de la concentración de metanol, para concentraciones altas producen una disminución del número de agregación y un aumento de CMC.

De este modo, se prueba metanol como modificador en mezclas acuosas en proporciones altas, desde 50 a 80% (figura VI-3).

En el nivel más bajo ensayado, al 50% se separan los dos homólogos, C_{12} y C_{14} pero con una señal pequeña, aumentando gradualmente la respuesta al aumentar el porcentaje de metanol, confirmándose que hay que romper las micelas no sólo en el electrolito portador sino también en la disolución de la muestra que contiene al analito.

Cuando se ensaya acetonitrilo se observa que se necesita una concentración menor que el metanol, un 40% frente a un 80%. Sin embargo para condiciones de selectividad similares, la sensibilidad decrece con acetonitrilo. El área del pico C_{12} era de 0,80 mAU para el acetonitrilo y 1,25mAU para el metanol.

4.4. Efecto de la longitud del capilar, la temperatura y el voltaje

Resueltas las dificultades provocadas por la naturaleza de la muestra, se optimizan las variables instrumentales: longitud del capilar, voltaje y temperatura que además de afectar a la resolución pueden ayudar a disminuir el tiempo de análisis.

El tiempo de residencia de una especie es directamente proporcional al cuadrado de la longitud del capilar e inversamente proporcional al voltaje. Por lo tanto acortando el capilar unos cm se logran reducciones significativas en el tiempo de análisis.

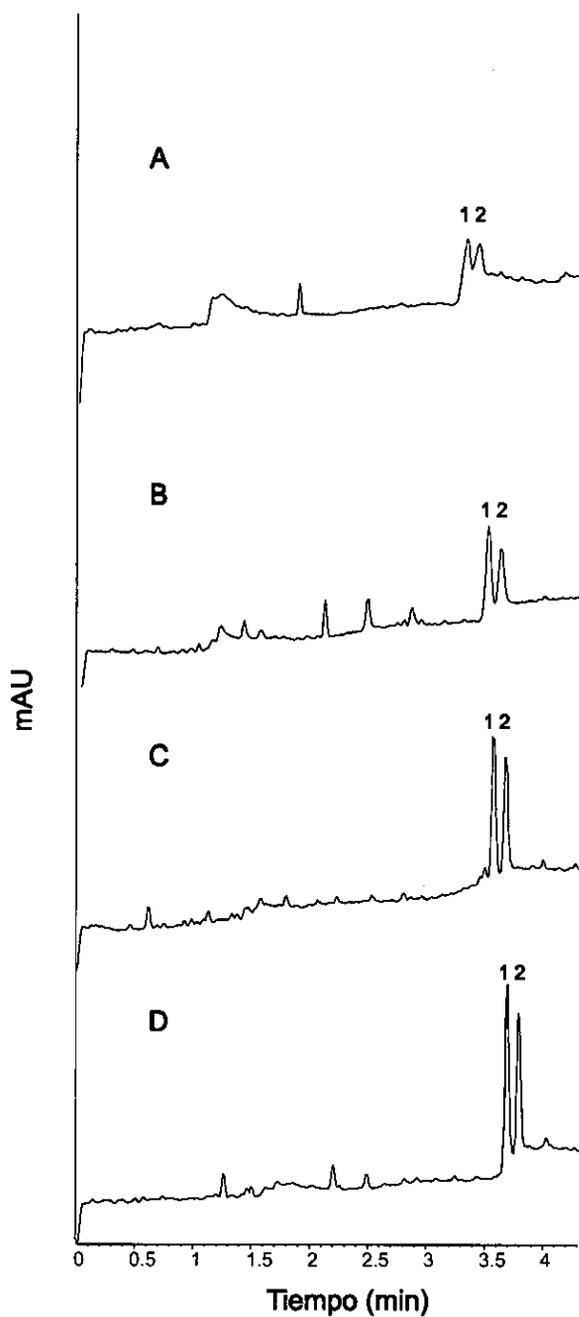


Figura VI-3. Efecto del metanol como modificador en la preparación de la muestra. (A) 50%, (B) 60%, (C) 70% y (D) 80%. 1. C₁₂-BAK, 2. C₁₄-BAK.

$$t = \frac{L^2}{\mu_{TOTAL} V} \quad (2)$$

donde L es la longitud del capilar, V voltaje aplicado y μ_{TOTAL} la movilidad total que a su vez está definida como la suma algebraica de la movilidad electroforética y la movilidad electroosmótica.

$$\mu_{TOTAL} = \mu_e + \mu_{eo} \quad (3)$$

donde μ_e es la movilidad electroforética y μ_{eo} es la movilidad electroosmótica.

Para las condiciones ensayadas, si en lugar de un capilar de 50 μ m de diámetro interno con longitud efectiva 56 cm se emplea uno de longitud efectiva 40 cm, el tiempo de análisis de los homólogos decrece de 6,5 a 3,5 min como se puede apreciar en la Figura VI-4.

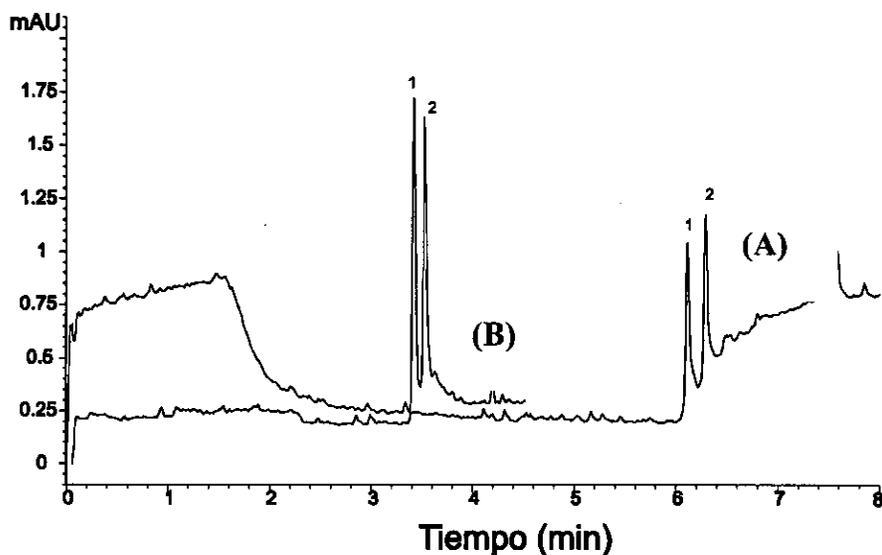


Figura VI-4. Efecto de la longitud del capilar en la eficiencia de la separación de los homólogos C₁₂ y C₁₄ del BAK. (A) 56 cm y (B) 40 cm. 1. C₁₂-BAK, 2. C₁₄-BAK.

Si se examina teóricamente la influencia de la temperatura, al disminuir ésta aumenta la viscosidad del medio y como este parámetro presenta una relación inversamente proporcional a la movilidad electroforética (ecuación 5, pág. 276) una disminución de μ_{eo} . Para un catión la μ_{eo} baja supone tiempos de análisis mayores y un pequeño aumento de la resolución.

El efecto del voltaje sobre la separación es también complejo, debido a que presenta una relación inversamente proporcional al tiempo y directamente proporcional al número de platos teóricos. Para un compuesto dado, voltajes elevados implicarían tiempos de análisis cortos y una mayor eficiencia. No obstante el efecto sobre la resolución (separación entre dos compuestos) es menor (HEIGER,1992) y sobre todo está muy limitado por la generación de calor por efecto Joule.

$$\text{Res} = 0,177 \Delta\mu \sqrt{\frac{V}{2D(\mu_{MED} + \mu_{eo})}} \quad (4)$$

donde D es el coeficiente de difusión del soluto.

Altos voltajes significarían disipar mayores cantidades de calor y pueden producirse gradientes de temperatura dentro del capilar (SEPANIAK Y COLE, 1987).

Si se combinan estas dos variables en el problema tratado, y se aplican voltajes de 20, 25 y 30 kV y temperaturas entre 20, 25 y 30°C se obtienen los valores representados en la figura VI-5. Para un voltaje dado, a temperaturas más bajas se obtienen mejores valores de resolución como se había supuesto (ecuación 3 y 4).

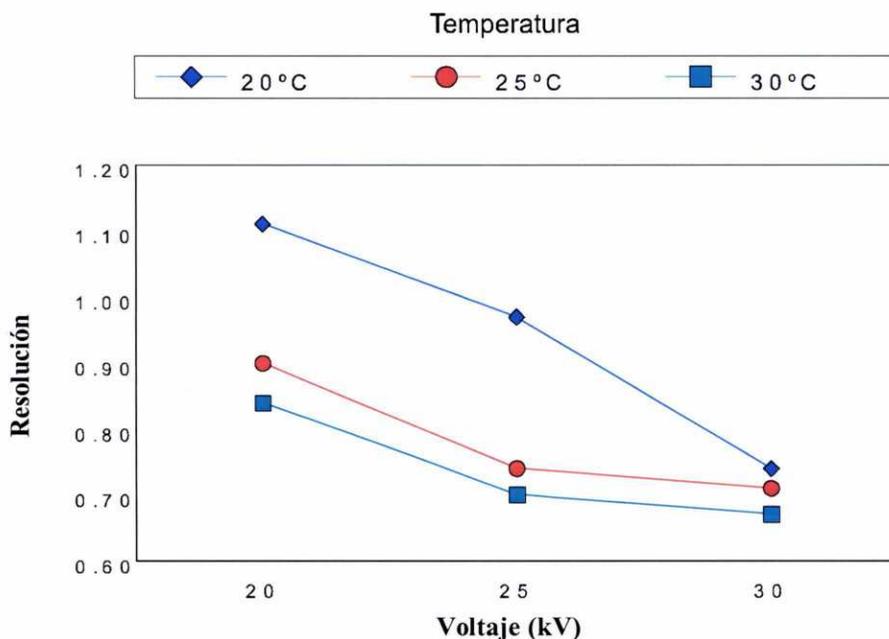


Figura VI-5. Resolución del homólogo C₁₂-BAK frente al voltaje aplicado a distintas temperaturas.

Sin embargo a cualquiera de las temperaturas ensayadas, el hecho experimental de que la resolución aumente al disminuir el voltaje, en contradicción con lo predicho por la ecuación 3, podría ser interpretado como consecuencia del efecto Joule. Esta interpretación estaría reforzada al observarse que en el valor más bajo de voltaje (20 kV), la termostatación de la columna a T bajas (20°C), ayuda a disipar el calor generado y produce aumentos de la resolución más significativos, que cuando se trabaja a 30 kV, donde la variación de temperatura apenas influye en la resolución. A 30 kV no se puede contrarrestar el efecto Joule con temperaturas de hasta 20°C.

Así en las condiciones de menor voltaje y temperatura (20 kV y 20°C) se logra la resolución más alta (mayor eficiencia y mayor selectividad) con un valor

de 1,1. Pero a 25 kV y 20°C, la resolución es buena, 0,97 y se reduce el tiempo de análisis en 1 min con respecto a las primeras condiciones.

4.5. Mejora de la sensibilidad con técnicas de inyección de campo amplificado

Conseguida una buena selectividad en cuanto a tiempo de migración y resolución se intenta mejorar la sensibilidad mediante una preconcentración en el capilar con técnicas de inyección de campo amplificado (*sample stacking*). Esta técnica está fundamentada en la relación directamente proporcional entre la velocidad electroforética y la fuerza del campo eléctrico aplicado (voltaje/longitud del capilar). El compuesto a analizar se disuelve en una matriz con una conductividad menor que electrolito portador (de fondo), lo que provoca que experimente una mayor fuerza de campo y se moverá a una velocidad mayor hasta que alcance la zona de separación entre la muestra y el tampón donde se concentra y vuelve a disminuir su velocidad. Los analitos catiónicos se enfocarán hacia el cátodo y los aniónicos el ánodo mientras que los no iónicos no sufrirán orientación. El factor de enriquecimiento que se puede lograr con esta técnica es aproximadamente de 10.

La limitación radica en la necesidad de que la zona de muestra debe ocupar una longitud pequeña comparada con el resto del capilar para obtener un pico bien resuelto. Como se inyectan grandes volúmenes de muestra, si el espacio ocupado es suficientemente grande (un 4% del volumen del capilar para una inyección electrocinética y un 2% para la hidrodinámica) se origina una presión hidrostática por diferencias de los flujos electrosmóticos entre la zona de muestra y el electrolito, se produce un flujo laminar y como consecuencia un ensanchamiento

de banda. El resultado es que en el electroferograma los picos también se ensanchan perdiendo resolución.

NIELEN (1993) y TURNES y col. (1996) preconcentraron especies cargadas, y clorofenoles respectivamente con esta técnica pero no consta en la bibliografía su aplicación a tensioactivos catiónicos. Para la mejora de la sensibilidad de los homólogos del BAK, se preconcentra con una inyección hidrodinámica a 50 mbar variando el tiempo de inyección de 5-30 s como una medida indirecta del volumen de muestra (figura VI-6). Como se puede observar la eficiencia de la separación es aceptable hasta 20 s, por encima de este valor los picos se vuelven más anchos y se reduce por tanto la resolución a causa de la sobrecarga del capilar.

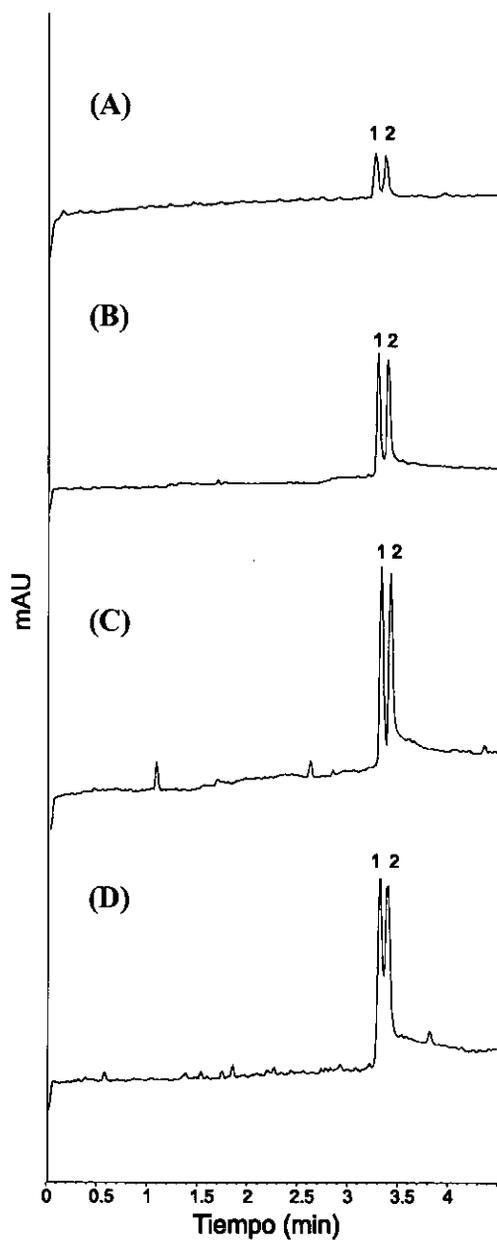


Figura VI-6. *Sample stacking*: electroferogramas de BAK a 0,01 mM a diferentes tiempos de inyección de (A) 5s, (B) 10s (C) 20s y (D)= 30s. En todos los experimentos la presión de la inyección se mantiene a 50 mbar.

El límite de detección conseguido es menor del $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ (10^{-7}M). Este valor es del orden de 10 a 1000 veces más bajo que los existentes en la bibliografía del BAK, especialmente los que utilizan tetrahidrofurano y que se muestran en la tabla VI-2. Con la ventaja añadida, al usar una técnica de preconcentración, que la muestra no es sometida a pretratamiento o manipulación, lo que redunda en un ahorro del tiempo total del análisis.

Tabla VI-2. Comparación de los límites de detección obtenidos para el BAK en este trabajo con los de otros autores de la bibliografía.

Autores	Límite de detección	Modificador orgánico
LIN y col., 1996	$0,15-0,3 \mu\text{g mL}^{-1}, 10^{-6}\text{M}$	Acetonitrilo
WEISS y col., 1992	$<1 \mu\text{g mL}^{-1}, 10^{-6}\text{M}$	Tetrahidrofurano
HEINIG y col., 1997	$5 \mu\text{g mL}^{-1}, 10^{-5}\text{M}$	Tetrahidrofurano
PIERA y col., 1997	$10-19 \mu\text{g mL}^{-1}, 10^{-4}\text{M}$	Tetrahidrofurano

5. SEPARACIÓN SIMULTÁNEA DE BAK Y DE BAA

Tomando como base la separación alcanzada para los dos homólogos principales del BAK, se pretende la separación de un cloruro de benzalconio de un cloruro de cocoamidopropilbencilamonio. El BAK empleado para este fin posee una cadena alquílica que se corresponde a un “corte coco” en el que la serie homóloga está compuesta por seis componentes de diferente longitud de cadena alquílica, con el siguiente número de átomos de carbono: C_8 , C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} y C_{18} . El BAA, además del mismo contraión, cloruro y de los radicales unidos al nitrógeno, dimetil y bencil, cuenta con una cadena alquílica idéntica al BAK a excepción del grupo amidopropilo al final de la cadena alquílica que enlaza con el cuaternario (figura VI-1, pág. 242).

Se realizan ensayos previos disolviendo las muestras en agua y usando como modificador orgánico acetonitrilo al 40%. Los seis homólogos del BAK se separan entre 2,6-3 min para unas condiciones instrumentales que incluían, una longitud de capilar de 40cm, 30 kV de voltaje y 20°C de temperatura (figura VI-7). Cuando se prueba la separación de una muestra del cuaternario de la bencilamidoamina, los tiempos de migración resultan muy similares (2,8-3,2 min) sin que la diferencia estructural entre los dos QUAT, el grupo amidopropil, parezca influir substancialmente en las movilidades electroforéticas.

Por tanto, la separación simultánea de las dos series homólogas de los QUAT, no es posible en estas condiciones ya que se solapan los siguientes homólogos: C₁₂-BAK con C₈-BAA, C₁₄-BAK con C₁₀-BAA, C₁₆-BAK con C₁₂-BAA, y C₁₈-BAK con C₁₄-BAA.

Las condiciones que permitan la separación de los 12 homólogos deben de seguir minimizando los efectos de adsorción a las paredes del capilar y de agregación micelar de los dos cuaternarios por lo tanto será necesario el modificador orgánico tanto en el tampón como en la muestra. Se examinan sistemáticamente dos grupos de variables: los parámetros instrumentales del sistema y el tampón. De los primeros se revisan: la longitud del capilar, voltaje y temperatura. De los segundos, se ensayan dos nuevas variables: el pH y la concentración del tampón manteniendo constantes la naturaleza y la concentración del modificador orgánico.

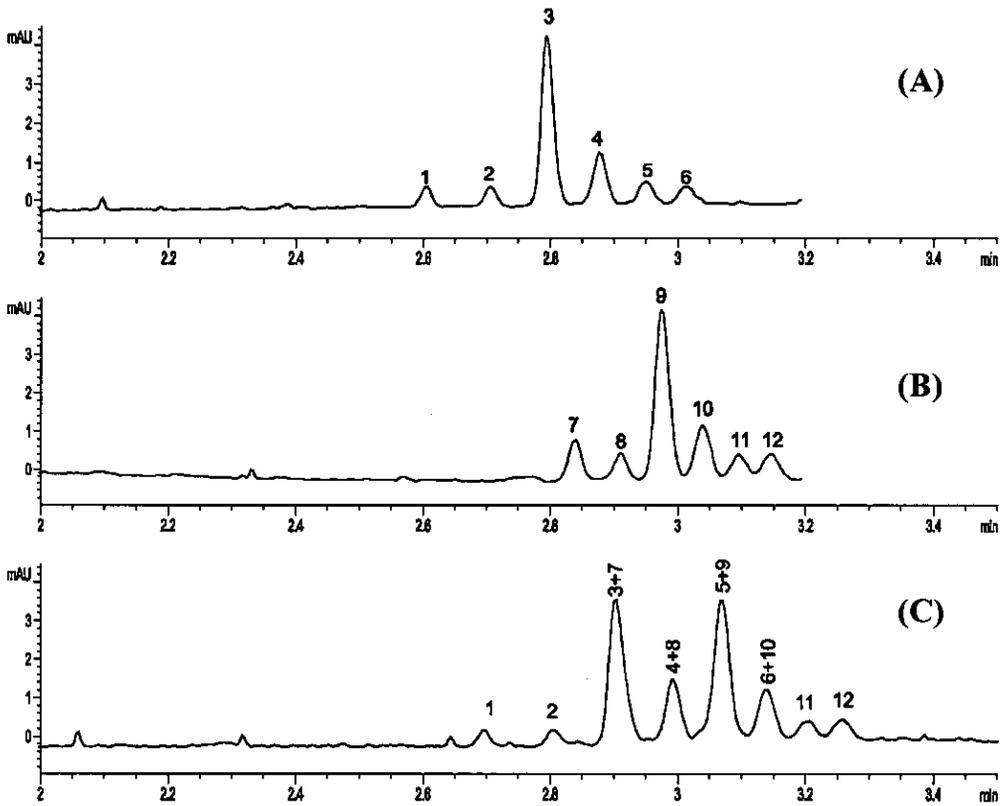


Figura VI-7. (A) Separación de una muestra BAK , (B) Separación de una muestra BAA (C) Separación de una muestra de BAK y BAA. Condiciones experimentales Capilar: diámetro interno 50 μ m, longitud efectiva, 40cm Electrolito: 20mM NaH₂PO₄ pH=5,2/ACN (60/40 v/v) Voltaje: 30KV, Temperatura: 20°C Detección: 200nm. Modo de inyección hidrodinámica: 50mbar 10s. 1. C₈-BAK, 2.=C₁₀-BAK, 3. C₁₂-BAK, 4. C₁₄-BAK, 5. C₁₆-BAK, 6. C₁₈-BAK, 7. C₈-BAA, 8. C₁₀-BAA, 9. C₁₂-BAA, 10. C₁₄-BAA, 11. C₁₆-BAA y 12. C₁₈-BAA.

5.1 Efecto de la longitud del capilar, el voltaje y la temperatura

Para una longitud de capilar de 40 cm, optimizada en la separación de los homólogos C₁₂-BAK y C₁₄-BAK, el voltaje fue progresivamente aumentado de 20

a 30 kV, reduciéndose el tiempo de análisis pero sin mejorar la resolución de los homólogos de los dos cuaternarios BAK y BAA. El efecto de la temperatura del capilar fue estudiado en el rango entre 20 a 40°C pero no se modifica ni la eficiencia ni la resolución conseguida.

Si aumentamos la longitud efectiva del capilar a 56 cm, el tiempo de migración aumenta produciéndose la separación entre 4,5-5,5 min pero como contrapartida con una mínima mejora en la eficiencia y la resolución.

Así con esta longitud del capilar se investigan las otras dos variables instrumentales: el voltaje y la temperatura. Con un incremento del voltaje hasta 30 kV para lograr una mejora de la eficiencia, se examina el efecto de la temperatura entre 20, 30 y 40°C. A la máxima temperatura, 40°C, el tiempo disminuye a entre 2,5-3,5 min y dos pares de homólogos (C_{12} -BAK con C_8 -BAA y C_{14} -BAK con C_{10} -BAA) son parcialmente resueltos, mientras los otros tres permanecen solapados. En un intento para subir la temperatura hasta 45°C provoca distorsiones en la línea de base, así que 56 cm de longitud de columna capilar, 30 kV de voltaje y 40°C de temperatura son los valores seleccionados (figura VI-8).

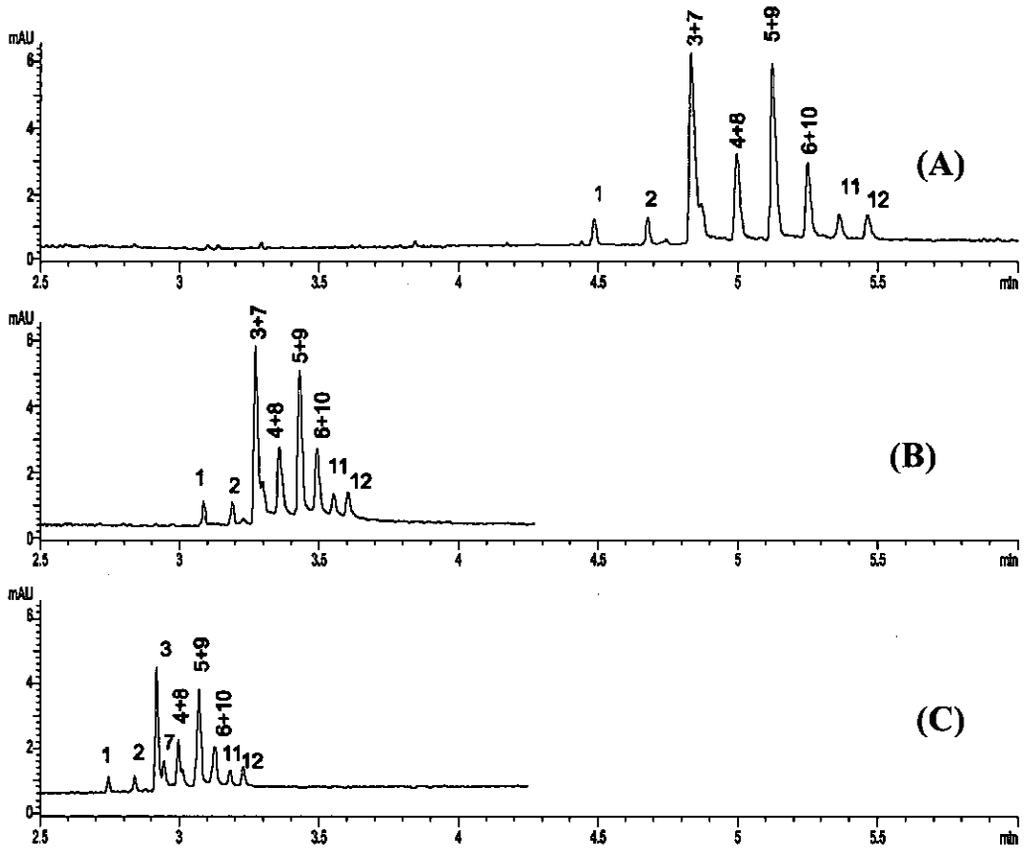


Figura VI-8. Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de la separación sobre las series homólogas del BAK y BAA (A) 20°C, (B) 30°C y (C) 40°C. Condiciones experimentales. Capilar: diámetro interno 50µm, longitud efectiva, 56 cm, las condiciones restantes y la numeración de los picos se corresponden a las de la figura VI-7.

5.2. Efecto del pH y la concentración del electrolito

La superficie de la sílice fundida está formada por grupos silanoles ionizados en medio alcalino o ligeramente ácido, de manera tal que la superficie del capilar está cargada negativamente y contrarrestada con los iones positivos del tampón. El

estudio de las interacciones iónicas que se producen en este medio y los factores de influencia pueden ser analizados a la luz del modelo de la doble capa que describe la interfase entre un ión simple, sus contraiones y la disolución circundante.

El potencial existente en esta interfase ha sido descrito con distintos modelos Helmholtz (1879), Debye y Huckel (1923) y Gouy-Chapman (1910-1913). Se considera que bajo la influencia del campo eléctrico, los iones y las moléculas y contraiones fijas al ión central se mueven longitudinalmente con éste, formando un plano de corte con el medio, el potencial en este plano es el potencial zeta (ζ).

El potencial propio que generan la doble capa de los grupos silanoles y contraiones, ζ condiciona la movilidad de los iones. Así bajo el potencial externo aplicado, los iones migran hacia el cátodo arrastrando, al estar solvatados, a la disolución en el capilar dando lugar al flujo electroosmótico (EOF), que es medido por la movilidad electroosmótica:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta_{eo}}{4\pi\eta} \quad (5)$$

donde η = viscosidad de la disolución, ε = constante dieléctrica del medio y ζ_{eo} = potencial zeta electroosmótico. Si la movilidad total o aparente observada del analito es una combinación vectorial de movilidad electroforética, μ_e y, de la electroosmótica, μ_{eo} , cuando se trate de cationes, como en la separación del BAK y BAA, los dos componentes llevan el mismo sentido, del ánodo al cátodo y por tanto serán dos términos aditivos. Así los factores que incrementen el potencial zeta, aumentarán la movilidad electroforética.

El potencial zeta y por tanto la movilidad electroósmótica están influidas por el tamaño y la carga de los iones, el pH y la concentración del tampón (ST. CLAIRE, 1996). Cuando la concentración del tampón, es decir la fuerza iónica se incrementa, se produce una compresión de la doble capa, una disminución del potencial zeta y en consecuencia la movilidad del ión disminuye.

En la bibliografía analítica referente a CZE es conocido que la selectividad puede ser modificada a través del pH del medio (HEIGER, 1992). Si los analitos poseen grupos ionizables con distintos pK, cambios en el pH afectarían de forma diferente a cada uno de ellos. GROSSMAN y col. (1988) al trabajar con péptidos de tamaños semejantes (el mismo número de aminoácidos) pero distinta carga, variando 1,5 unidades de pH logran cambios drásticos en la selectividad.

En el problema de separación planteado, la separación de los dos cuaternarios, la polaridad del grupo amidopropil tendría que actuar como diferenciador en el pK del BAA, para que se comportase de forma electroforéticamente distinto que el BAK. Para verificarlo, con una mezcla de tampón fosfato con un 40% de acetonitrilo, se examina el efecto del pH del tampón entre valores de 3,5 a 6 sobre la movilidad electroforética de los cuaternarios. Al disminuir el pH hay un aumento del tiempo de migración ya que los silanoles están protonados, hay menos carga en la superficie del capilar y se produce una disminución del flujo electroosmótico, pero con movilidades semejantes en BAK y BAA que no permiten alcanzar la separación simultánea de la serie homóloga de los dos cuaternarios.

Los pares de homólogos C₁₄-BAK con C₁₀-BAA, C₁₆-BAK con C₁₂-BAA, y C₁₈-BAK con C₁₄-BAA continúan sin separarse. Sin embargo después de un exhaustivo estudio de los electroferogramas y de las condiciones operacionales, se

observa que cuando se incrementa la corriente eléctrica, la eficiencia y la resolución también aumentan ligeramente. Una estrategia usada en CE para lograr una subida de la corriente eléctrica es a través de un aumento de la fuerza iónica y esto se alcanza con un aumento de la concentración del tampón. Las consecuencias de la elevación de la fuerza iónica del tampón son una compresión de la doble capa, una disminución del potencial zeta y una reducción de EOF, y por tanto un aumento de los tiempos de residencia del soluto en el capilar. Concentraciones altas son también útiles para limitar las interacciones coulombicas del soluto con las paredes del capilar debido a una disminución de la carga efectiva en la pared. Así PIERA y col. (1999) observan un aumento de la sensibilidad y una menor cantidad del compuesto cuaternario retenido en el capilar, con un incremento de la concentración del electrolito.

En la figura VI-9 se muestra el efecto de la concentración del tampón en el intervalo entre 20-75 mM. Como era de esperar con un aumento de la concentración del tampón, los tiempos de migración se incrementan para cada uno de los seis homólogos en los dos cuaternarios. También se observa paralelamente con el incremento de la concentración un aumento de la intensidad de corriente. Otros parámetros como la eficiencia y la resolución también están drásticamente determinadas por la concentración del tampón.

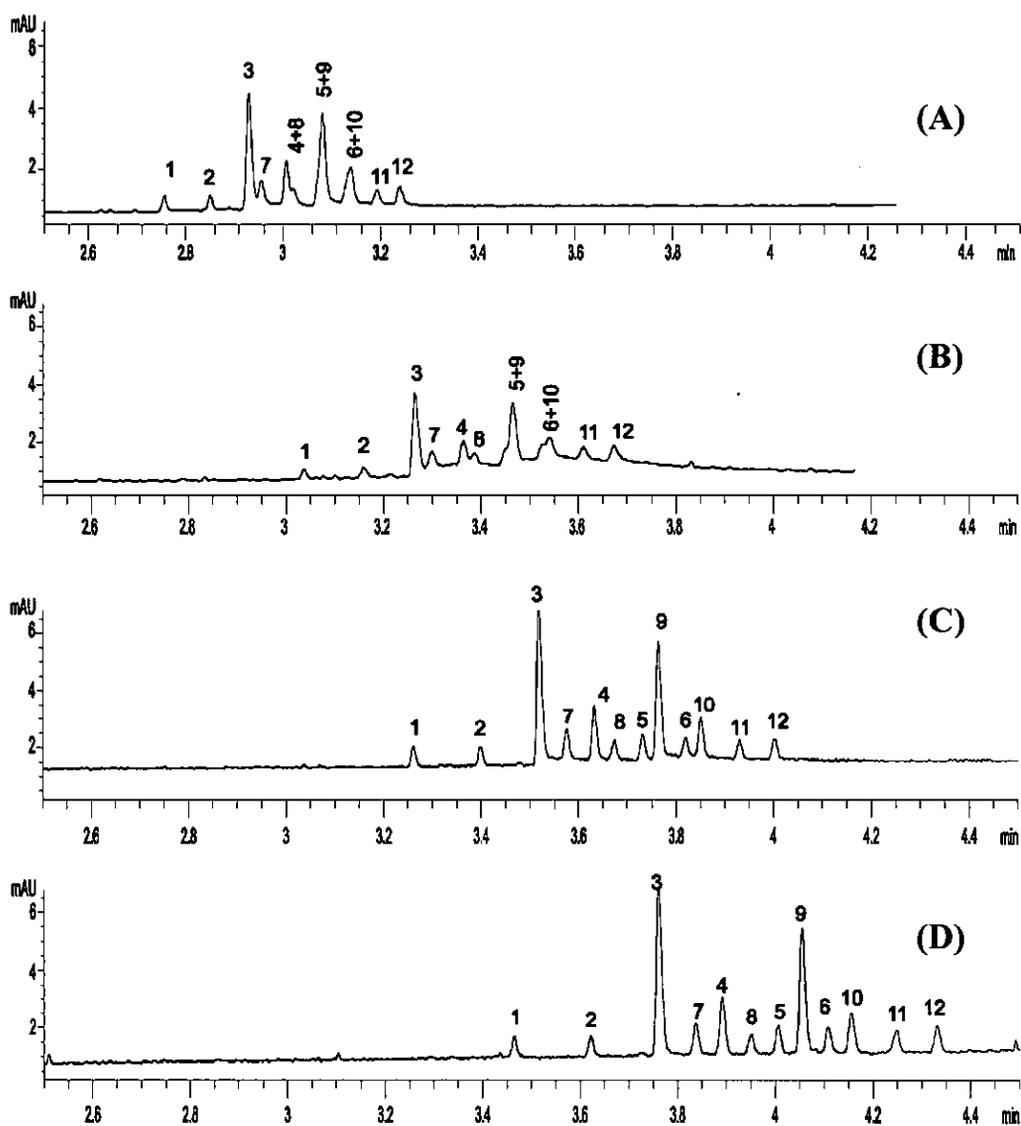


Figura VI-9. Efecto de la concentración del tampón sobre la eficiencia de la separación sobre las series homólogas del BAK y BAA. (A) 20mM, (B) 30mM, (C) 50mM (D) y 75mM de fosfato . Las condiciones experimentales y la numeración de los picos se corresponden a las de la figura VI-8.

Cuando la concentración del tampón se aumenta a 30 mM alcanzando la intensidad de corriente 24 μA , se comienza a obtener una resolución parcial de todos los pares de homólogos. Con una concentración de 50 mM de tampón fosfato ($I=39 \mu\text{A}$) se consigue la separación total de los 12 componentes en menos de 4 min. Pero si se aumenta la concentración hasta 75 mM ($I=55 \mu\text{A}$) se mejora la separación ya que se produce un incremento en la selectividad.

También, a partir de los datos experimentales, se puede establecer una relación lineal entre los tiempos de migración y el número de átomos de carbono de la cadena alquílica para los dos cuaternarios (figura VI-10). Estas relaciones en cromatografía se explican por un mecanismo de partición dependiente también de la temperatura y han sido estudiadas entre otros muchos compuestos para la serie homóloga del BAK (ABIDI, 1985). SALIMI-MOOSAVI y CASSIDY (1996) encuentran que hay una correlación entre la longitud de la cadena alquílica de los alquenosulfonatos y alquilsulfatos y la movilidad, para distintas concentraciones de cationes alcalinotérreos, añadidos al electrolito en medios no acuosos. Estas relaciones son interpretadas por una interacción iónica entre el catión y el tensioactivo, en un efecto de par iónico. Según las distintas afinidades de los dos aniónicos por el ión se puede ajustar la selectividad.

En nuestro caso BAK y BAA interaccionarían con el anión fosfato, produciéndose, con la concentración del tampón, una variación de la ecuación de la recta que establece la relación. No sólo se incrementa la ordenada en el origen (debido a la reducción de EOF) sino también la pendiente, posiblemente debido a la extensión de los efectos de par iónico. A concentraciones altas, 75 mM, el BAK se ve más afectado por el tampón, (la relación de pendientes BAK/BAA es superior que a 20 mM) quizá por una mayor tendencia a formar pares iónicos que

el BAA, lo que trae como resultado la separación de los pares de homólogos que estaban solapados.

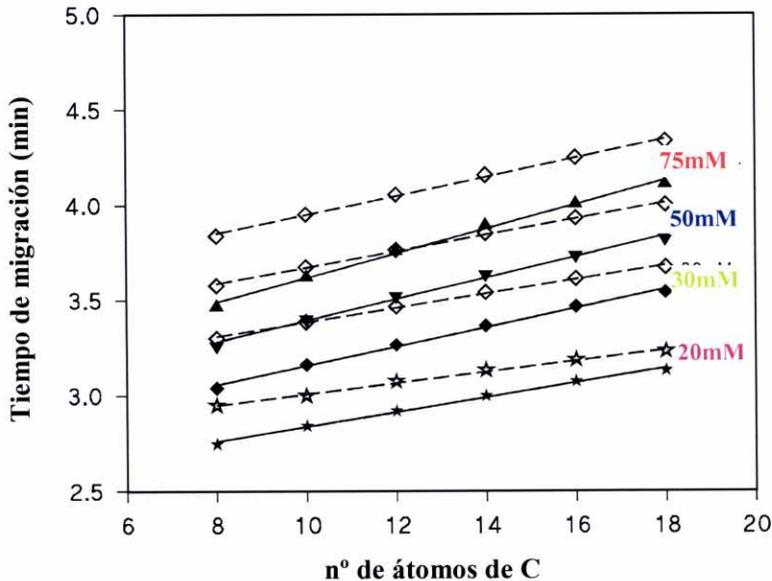


Figura VI-10. Relación lineal entre el número de átomos de carbono de la cadena alquílica del BAK (línea continua) y BAA (línea discontinua) frente al tiempo de migración a distintas concentraciones del tampón.

5.3. Mejora de la sensibilidad con técnicas de preconcentración de campo amplificado

Se optimiza la preconcentración con *sample stacking*, en una mezcla de BAK y BAA a una concentración de 0,01 M, inyectándose a distintos tiempos, de 10 a 30s y manteniendo la presión en 50 mbar. En la figura VI-11 se muestran los electroferogramas obtenidos. Para una concentración de 50 Mm de fosfato, el tiempo de inyección no puede superar los 10 s porque a 20 s la resolución entre

C₁₆-BAK con C₁₂-BAA y C₁₈-BAK con C₁₄-BAA no conserva los resultados optimizados (figura VI-11, A y B respectivamente).

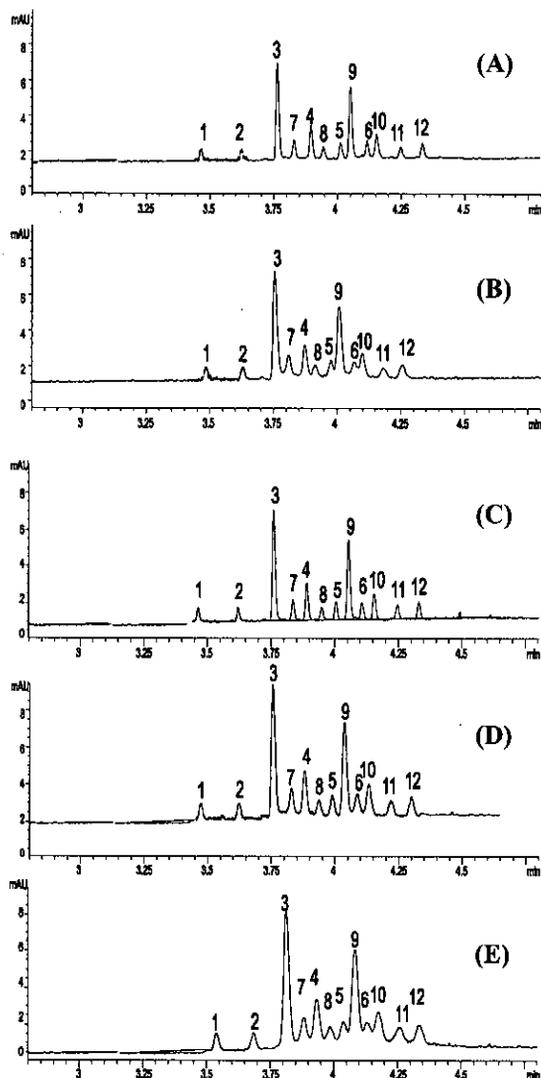


Figura VI-11. Electroferogramas del BAK y BAA a distintos tiempos de inyección para dos concentraciones: 50mM de fosfato (A) 10s y (B) 20s; 75mM de fosfato (C) 10s, (D) 20s y (E) 30s. Las condiciones experimentales y la numeración de los picos se corresponden a las de la figura VI-8.

No obstante para 75 mM es posible alcanzar un tiempo de inyección de 20 s sin menoscabo de la eficiencia de la separación; tiempos mayores provocan distorsiones en la línea de base que ensanchan los picos debido a la sobrecarga de muestra producida en el capilar.

Pese a que las dos concentraciones ensayadas del tampón 50 y 75 mM permiten alcanzar una buena selectividad, se eligió la de 75 mM ya que proporciona una mejor sensibilidad al ser posible trabajar con un volumen mayor de muestra inyectado.

6. ASPECTOS CUANTITATIVOS EN EL ANÁLISIS DEL BAK Y BAA

Se lleva a cabo el análisis cuantitativo escogiendo dentro del intervalo de longitudes de onda del primer máximo de absorción, aquella en la que se obtienen para una concentración dada un máximo de áreas de pico, 200 nm.

En la separación simultánea del BAK y BAA se evalúa la reproducibilidad en tiempos de migración y áreas de picos. Se calcula el coeficiente de variación para 5 repeticiones de los 12 homólogos (6 del BAK y 6 del BAA) a las dos concentraciones de tampón optimizadas, 50 y 75 mM y con tiempos de inyección de 10 y 20 s (tabla VI-3).

Para el tiempo de migración de todos los homólogos la reproducibilidad es muy buena <0,7% y en el área del pico es < del 5% para los homólogos del BAK-C₁₂ y BAA-C₁₂. Estos ensayos se realizaron con muestras de BAK y BAA.

Tabla VI-3. Precisión (%CV) del tiempo de migración y del área del pico como función de la concentración del tampón y del tiempo de inyección.

	CONCENTRACIÓN DE TAMPÓN							
	50 mM				75 mM			
	Tiempo de migración		Área de pico		Tiempo de migración		Área de pico	
	10s	20s	10s	20s	10s	20s	10s	20s
C₈-BAK	0,30	0,58	3,34	3,51	0,25	0,36	3,10	4,98
C₁₀-BAK	0,31	0,55	5,15	6,40	0,26	0,56	4,23	0,60
C₁₂-BAK	0,32	0,50	2,95	2,07	0,27	0,58	1,64	0,44
C₈-BAA	0,33	0,50	1,56	6,04	0,27	0,58	4,93	5,90
C₁₄-BAK	0,32	0,48	3,00	3,22	0,28	0,62	1,34	3,37
C₁₀-BAA	0,33	0,45	3,18	8,45	0,28	0,63	5,43	7,61
C₁₂-BAA	0,33	0,50	3,03	4,80	0,29	0,65	3,19	5,48
C₁₈-BAA	0,34	0,52	4,11	5,55	0,29	0,67	4,19	1,66
C₁₈-BAK	0,34	0,54	1,71	7,97	0,30	0,70	2,96	3,35
C₁₄-BAA	0,35	0,53	1,01	5,90	0,30	0,69	6,11	2,42
C₁₆-BAA	0,35	0,60	5,85	7,75	0,30	0,74	3,67	3,59
C₁₈-BAA	0,36	0,63	4,15	2,44	0,31	0,77	4,19	3,18

Al no disponer en el mercado de patrones de los homólogos de BAA y de C₈ y C₁₀ BAK se estudia la linealidad del método solamente para C₁₂-BAK, C₁₄-BAK, C₁₆-BAK y C₁₈-BAK, en el rango 0,1 a 13 µg mL⁻¹ considerando el área de los picos; la inyección se realiza en modo "sample stacking" durante 20s. Las ecuaciones y los coeficientes de correlación de las rectas para los cuatro homólogos se muestran en la tabla VI-4. Se incluyen también los límites de detección y cuantificación establecidos como 3 y 10 veces la relación señal/ruido respectivamente (MILLER y MILLER, 1988).

Tabla VI-4. Parámetros para el análisis cuantitativo de BAK.

Compuesto	Recta de calibrado y coeficiente de correlación (r)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
C ₁₂ -BAK	y=-0,0198+1,096x; 0,9979	0,0097	0,034
C ₁₄ -BAK	y=0,0172+1,132x; 0,9978	0,0095	0,033
C ₁₆ -BAK	y=-0,1260+1,0228x; 0,9979	0,0120	0,041
C ₁₈ -BAK	y=-0,2275+1,1436x; 0,9949	0,0120	0,043

En cuanto a la medida de la eficiencia en la separación del BAK y BAA, se han medido valores de N de 250000 platos teóricos para las dos concentraciones del electrolito, 50 y 75mM. Estos datos son de un orden de magnitud más altos que los proporcionados por la bibliografía analítica de HPLC para la mayoría de las aplicaciones.

7. APLICACIÓN A MUESTRAS INDUSTRIALES Y PRODUCTOS FORMULADOS

El método fue aplicado a la determinación de homólogos del BAK en muestras reales de diferente procedencia, desde productos técnicos a productos formulados (alcohol, colirio etc.). El desarrollo del método de la separación simultánea de los dos QUAT se lleva a cabo con los productos técnicos, cloruro de benzalconio al 50% en agua y cloruro de cocoamidopropilbencildimetilamonio al 50% en una mezcla de agua/IPA.

El empleo de BAK como desinfectante en formulaciones está bastante generalizado así que se eligen dos productos de uso habitual de los que no se requiere un estricto control farmacéutico. La primera muestra ensayada es un alcohol de uso farmacéutico cuya composición específica es de 1% de cloruro de

benzalconio, sin indicar cuáles son los homólogos que contiene. La preparación de la muestra se efectúa en una mezcla de metanol/agua (80:20 v/v) con una concentración de producto tal que el BAK se encuentre aproximadamente a 0,01 mM. En el electroferograma obtenido que se muestra en la figura VI-12, se identifica el homólogo BAK-C₁₂ y el BAK-C₁₄ siendo mayoritario el primero, probablemente debido a su mayor capacidad desinfectante.

Otra muestra, dentro de los productos comerciales de la gama de cuidado personal, en la que los fabricantes indican la presencia de cloruro de benzalconio, es en una loción en la cual van impregnadas unas toallitas húmedas para niños. Para la preparación de esta muestra se mantiene la toallita sumergida en una muestra de 20 mL de metanol/agua (80:20 v/v) durante 15min. Después una alícuota de ésta se inyecta en el sistema en las condiciones descritas en la figura VI-12. Se encuentran los homólogos BAK-C₁₂ y el BAK-C₁₄, sin observarse efectos de matriz de los otros componentes de la muestra.

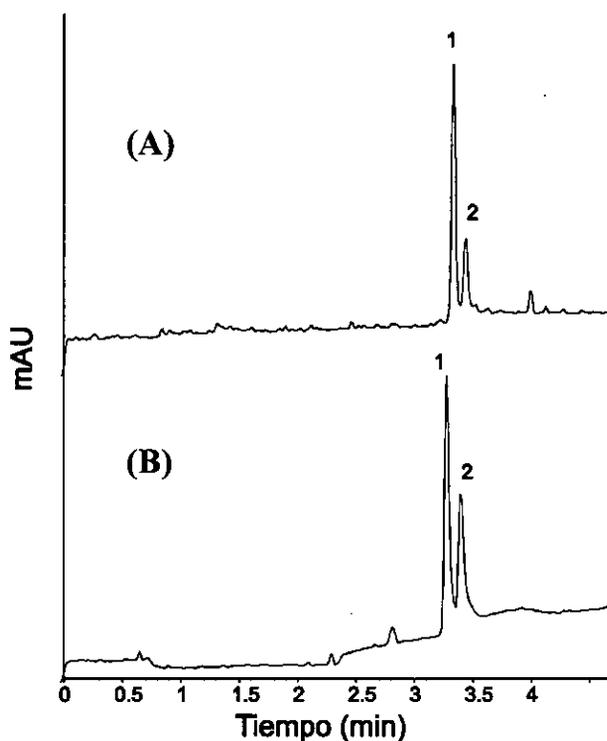


Figura VI-12. Electroferogramas obtenidos con muestras reales (A) Alcohol (B) Loción limpiadora en toallitas húmedas para niños. Las condiciones experimentales y la numeración de los picos se corresponden a los de la figura VI-6.

8. ESTUDIO ANALÍTICO COMPARATIVO PARA BAA Y BAK POR HPLC Y CE

Puesto que en HPLC se ha propuesto un método de análisis de residuales que a su vez permite la separación de la serie homóloga (capítulo IV) parece obligado verificar si al menos es válido para la serie homóloga del otro cuaternario estudiado, el cloruro de cocoamidopropildimetilamonio y comparar los resultados con los obtenidos con la electroforesis capilar.

En el BAA se prueban el modo de elución en isocrático y gradiente a la concentración de trabajo, 10 mg mL^{-1} sobre la base anhidra. En el primero no separarían el cloruro de bencilo de los homólogos más bajos de la cadena pero si en gradiente, donde la cadena alquílica cocoamidopropil con los seis homólogos, de C_8 a C_{18} eluye en 10 min (figura IV-13 A).

Se prueba también el modo gradiente con una muestra comercial de BAK sintetizado a partir de una cocodimetilamina (Figura VI-13 B). Comparativamente con el BAA está más retenido en la fase estacionaria eluyendo el último homólogo (C_{18}) cercano a los 13 minutos además de poseer unos picos más ensanchados. Posiblemente el grupo amida dota al QUAT de una mayor polaridad que incrementa su afinidad por la fase móvil.

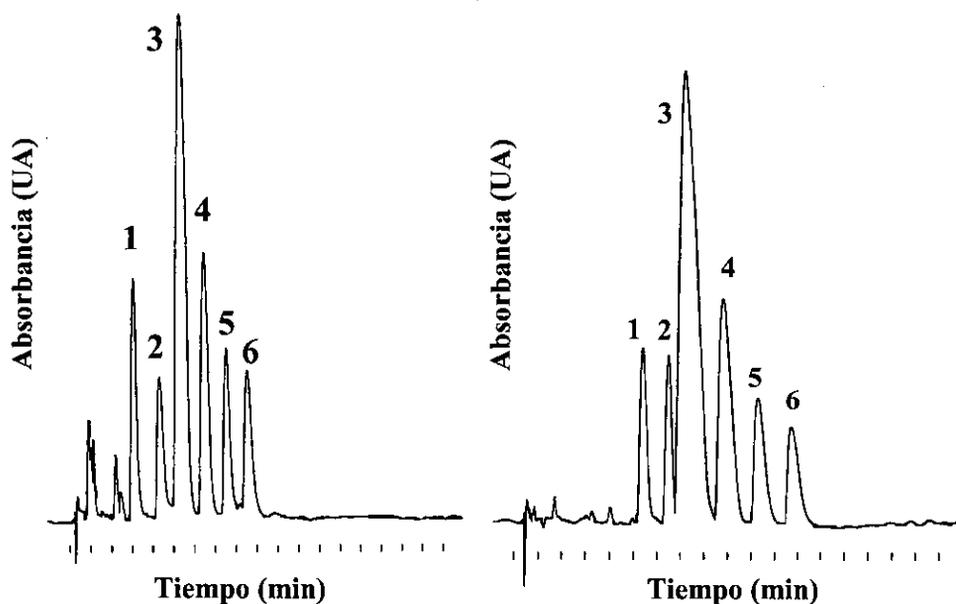


Figura VI-13. Cromatograma en modo gradiente. (A) BAA de cadena coco y (B) BAK. 1. C_8 , 2. C_{10} , 3. C_{12} , 4. C_{14} , 5. C_{16} , 6. C_{18} .

Como ya se había mencionado anteriormente, en el BAK se puede establecer una relación lineal entre el factor de capacidad y el número de átomos de la cadena alquílica. También en el BAA (figura VI-14) se puede correlacionar linealmente estos dos parámetros pero con una pendiente más pequeña que el BAK.

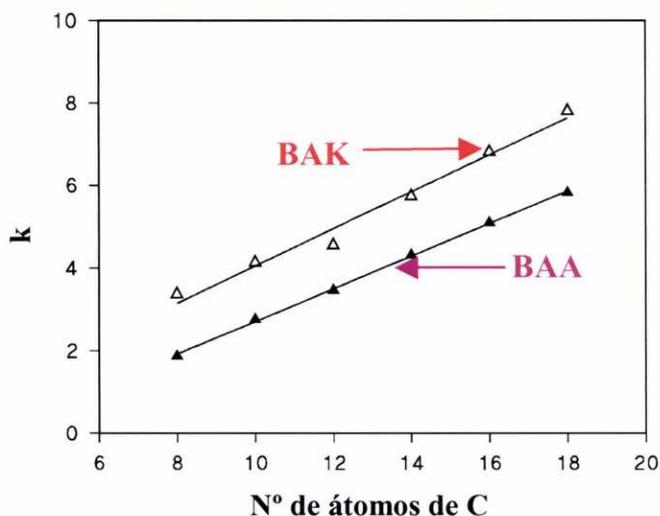


Figura VI-14. Relación lineal entre el número de átomos de carbono de la cadena alquílica del BAK y BAA frente al factor de capacidad en HPLC.

Algunos aspectos cuantitativos como la cuantificación de la cadena alquílica han sido abordados según se indica en la farmacopea americana (USP, 1995). Considera en el BAK que la absorptividad molar es la misma para todos los componentes de la serie homóloga. Así se calcula el porcentaje de cada homólogo ($\%C_n$) según la fórmula:

$$\%C_n = \frac{100A}{B} \quad \text{siendo } A \text{ y } B: \quad A = A_n \text{ } PM_n; \quad B = \sum A_n \text{ } PM_n$$

dónde A_n es el área de cada homólogo y PM_n el peso molecular de cada homólogo desde $n=8$ a 18.

Los valores obtenidos se muestran en la tabla VI-5 junto con los calculados para el BAA siguiendo la misma metódica. La diferencia entre ellos reside en que BAA tiene una distribución de una cadena coco natural con porcentajes sobre un 10% para cada una de las cadenas más bajas, C_8 y C_{10} , mientras que el BAK tiene un menor contenido de éstas y está más enriquecido en la cadena mayoritaria, C_{12} .

Si comparamos estos valores con los especificados para la cadena alquílica en su origen, es decir, los proporcionados por el proveedor de la cocodimetilamina en el BAK y los existentes para la cadena natural del triglicérido coco en el BAA se observa que se ajustan bien a la especificación para el BAK. En el BAA hay una desviación en el homólogo C_8 y más importante aún en el C_{18} . Para este último, el valor de la especificación está referido a una cadena esteárica saturada sin embargo el coco natural puede contener entre un 5-8,5% de cadena oleica con 18 átomos de carbono, al igual que la esteárica pero con un doble enlace en su cadena. Cuando el aceite de coco es sometido a tratamiento de hidrogenación para eliminar las insaturaciones, el contenido de la cadena esteárica puede cifrarse entre un 10-14%. No obstante habría que comprobar en futuros trabajos si el método es capaz de separar la cadena oleica de la esteárica.

Este tipo de cuantificación presenta, en los análisis de control, un ahorro de tiempo de análisis muy importante con respecto a las cuantificaciones realizadas calibrando con patrón externo, en las que es necesario la construcción de la recta de calibrado y repetidas inyecciones de patrón y muestra.

Puesto que en electroforesis capilar la detección se lleva a cabo en ultravioleta, se prueba si es posible medir la composición de la cadena alquílica en

el mismo modo que en HPLC. Se cuantifica la muestra que contenía la mezcla de BAK y BAA en las condiciones optimizadas (figura VI-9, D) con 75 mM de fosfato. Los resultados obtenidos se muestran paralelamente con los del HPLC y los valores son muy semejantes a estos, sobre todo teniendo en cuenta que las muestras no pertenecen al mismo lote.

Tabla VI-5. Porcentaje (%) de cada homólogo en la cuantificación de la serie homóloga en el BAK y BAA y comparación con las especificaciones comerciales.

Homólogo	BAK	BAK _{muestra}		Cadena coco natural	BAA _{muestra}	
	(especificación)	(HPLC)	(CE)	(especificación)	(HPLC)	(CE)
C ₈	4-12	6,1	4,7	6-9	10,5	9,2
C ₁₀	2-12	6,0	5,4	5-7	6,9	6,3
C ₁₂	45-55	49,6	51,8	42-53	42,2	45,6
C ₁₄	14-24	19,3	18,7	14-21	18,4	16,2
C ₁₆	5-13	10,0	9,6	8-11	10,3	10,4
C ₁₈	4-12	9,0	9,8	2-5	11,6	12,2

Al igual que en electroforesis se puede plantear la separación conjunta de ambos cuaternarios. En principio, los doce homólogos presentan factores de capacidad distintos, sin embargo en las cadenas de menor número de átomos de carbono la selectividad es baja, con valores de 1 para C₁₀-BAK y C₁₂-BAA, así como para C₈-BAK y C₁₀-BAA.

No se acomete la mejora de la separación porque de cara a formulaciones habría que resolver primero el efecto que sobre la retención ejerce la concentración del QUAT en la muestra. Al igual que se había observado en el TEBA (capítulo V) la retención se incrementa al disminuir la concentración. En el

caso de cuaternarios con serie homóloga, para cada uno de los miembros habría que tener en cuenta además de la concentración del QUAT en la muestra, la concentración relativa del homólogo.

Así para una concentración fija de BAK, 10 mg mL^{-1} , se mide el factor de capacidad de los dos homólogos principales, C_{12} y C_{14} en tres tipos de muestra: cuando posee una cadena mayoritaria (95%), en un corte coco (50% de C_{12} y 19% C_{14}) y en la usada en las síntesis del BAK (65% de C_{12} , 31% de C_{14} y 4% de C_{16}). Los resultados que se muestran en la tabla VI-6 indican que los factores de capacidad de la serie homóloga están fuertemente determinados por la concentración de cada homólogo. Para una misma concentración (95%) la pequeña diferencia de retención entre C_{12} y C_{14} estaría explicada por efectos hidrofóbicos puros.

Tabla VI-6. Influencia del porcentaje de los homólogos C_{12} y C_{14} del BAK en la serie homóloga sobre el factor de capacidad.

Porcentaje de los homólogos	C_{12}			C_{14}		
	95%	64%	50%	95%	31%	18%
k	4,2	4,4	4,5	4,7	5,5	5,7

Por otra parte, si se mantiene composición de la serie homóloga y se disminuye un orden de magnitud la concentración, el factor de capacidad aumenta una unidad (tabla VI-7). No se ha encontrado en la bibliografía del BAK justificaciones del mecanismo de interacción que consideren la influencia de la concentración.

Tabla VI-7. Influencia de la concentración de BAK sobre el factor de capacidad.

Concentración de BAK (mg mL ⁻¹)	C ₁₂		C ₁₄	
	10	1	10	1
k	4,4	5,1	5,5	6,1

En definitiva, sería necesario previamente intentar la separación con algún modificador amínico que bloqueara los silanoles y eliminara la variación de la retención con la concentración antes de abordar la separación simultánea de la serie homóloga de los dos cuaternarios. En este punto hay que tener en cuenta que mediante la electroforesis capilar se ha conseguido un tiempo de análisis para los doce homólogos, en principio difícilmente superable por HPLC con una columna convencional.

La ventaja de los métodos propuestos de CE con respecto a los de HPLC reside en la separación individual y simultánea de la serie homóloga para los dos cuaternarios en un tiempo de análisis excelente y unos límites de detección buenos. Sin embargo, el método de HPLC consigue, en el análisis individual de los cuaternarios, separar conjuntamente los residuales y la cadena alquílica. La cuantificación del porcentaje de cada homólogo en la cadena alquílica puede realizarse con el método recomendado por la USP (1995) tanto por HPLC como por CE.

9. CONCLUSIONES

- Un modificador orgánico, como el acetonitrilo, en el electrolito soporte y otro en la preparación de la muestra como el acetonitrilo o el metanol resultan imprescindibles para minimizar la formación de micelas y la adsorción a las paredes del capilar de los cuaternarios, BAK y BAA.
- La variable crítica para la separación simultánea de los dos cuaternarios el BAK y el BAA con la misma cadena grasa y una diferencia estructural mínima, un grupo amidopropil, ha sido la concentración de electrolito.
- Los dos métodos propuestos para la separación individual y simultánea separan la serie homóloga en un tiempo 3,5 y 4,5 min, respectivamente, que resulta excelente para los tiempos obtenidos en la bibliografía analítica para CE y 4 veces más bajos que los que proporciona el HPLC.
- La aplicación de técnicas de preconcentración *on-colum* de campo amplificado como el *sample stacking* reducen los límites de detección a $<0,05 \text{ mg L}^{-1}$ (10^{-7} M), muy bajos en relación con los encontrados en la bibliografía consultada del BAK por CE.
- Los dos métodos desarrollados se han aplicado a productos formulados y a las muestras industriales, con buenas perspectivas para el análisis de matrices medioambientales.
- En un análisis comparativo del método de CE para BAK y BAA con el método de HPLC se concluye que el primero permite la separación simultánea de la cadena alquílica de ambos cuaternarios en productos formulados mientras que el segundo separa en cada cuaternario la cadena alquílica de los residuales. Asimismo la cuantificación de la composición

de la cadena alquílica puede realizarse de forma rápida y sencilla tanto en HPLC como en CE.

10. BIBLIOGRAFÍA

ABIDI, L. (1985). Retention behaviour of long chain quaternary ammonium homologues and related nitroso-alkylamines. *J. Chromatogr.* **324**, 209.

ACKERMANS, M.T.; EVERAERTS, F.M.; BECKERS, J.L. (1991). Determination of some drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography. The pseudo-effective mobility as parameter for screening. *J. Chromatogr.* **585**, 123.

AGUILAR, M. (1990). Electroforesis capilar de alta eficacia (HPCE), una nueva técnica de separación en desarrollo. *Química Analítica* **9**, 129.

ALTRIA, K.D.; ELGEY, J.; HOWELLS, J.S. (1996). Validated capillary electrophoretic method for the quantitative analysis of histamine acid phosphate and/or benzalkonium chloride. *J. Chromatogr. B* **686**, 111.

ALTRIA, K.D.; WALLBERG, M.; WESTERLUND, D. (1998). Separation of a range of cations by nonaqueous capillary electrophoresis using indirect and direct detection. *J. Chromatogr. B* **714**, 99.

CIFUENTES, A.; BERNAL, J.L.; DÍEZ-MASA, J.C. (1998). Use of detergents and high contents of organic solvents for simultaneous quantitation of ionic and nonionic drugs by electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* **824**, 99.

CRABTREE, H.J.; IRELAND, I.D.; DOVICH, N. J. (1994). Effect of acetonitrile in the sampling solution on the analyte peak shape in micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A* **669**, 263.

St CLAIR, R.L. (1996). Capillary electrophoresis, *Anal.Chem.* **68**, 569.

GROSSMAN, P.D.; WILSON, K.J.; PETRIE, G.; LAUER, H H. *Anal Biochem.* **173** (1988) 265 en P.D. GROSSMAN; J.C. COLBURN. *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*, ed. Academic Press, Inc, San Diego, 1992.

GROSSMAN, P.D.; COLBURN, J.C. (1992). Capillary Electrophoresis, theory and practice, ed. Academic Press, Inc, San Diego.

HADDAD, P.R. (1997). Comparison of ion chromatography and capillary electrophoresis for the determination of inorganic ions. *J. Chromatogr. A* **770**, 281.

HEIGER, D.N. (1992). High Performance Capillary Electrophoresis, An introduction, Hewlett-Packard, Waldbronn.

HEINIG, K.; VOGT, C. y WERNER, G. (1997a). Determination of cationic surfactants by capillary electrophoresis. *Fresenius J. Anal. Chem.* **358**, 500.

HEINIG, K.; VOGT, C.; WERNER, G. (1997b). Determination of cationic surfactants by capillary electrophoresis with indirect photometric detection. *J. Chromatogr. A* **781**, 17.

HERRERO MARTÍNEZ, J.M.; SIMÓ ALFONSO, E.F.; MONGAY FERNÁNDEZ, C.; RAMIS RAMOS, G. (2000). Determination of cationic surfactants by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with deoxycholate micelles in the presence of large organic solvent concentrations. *J. Chromatogr. A* **895**, 227.

HINZE, W.L. (1987). "Organized Surfactant Assemblies in Separation Science" en Capillary Electrophoresis, theory and practice, ed. Academic Press, Inc, San Diego, 1992.

JORGENSEN, J.W.; LUKACS, K.D. (1981). Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal.Chem.* **53**, 1298.

JIMIDAR, M.; BEYNS, I; ROME, R.; PEETERS, R.; MUSCH, G. (1998). Determination of benzalkonium chloride in drug formulations by capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.* **12**, 128.

LIN, C-E; CHIOU, W-C; LIN, W-C. (1996a). Capillary zone electrophoretic separation of alkylbenzyl quaternary ammonium compounds: effect of organic modifier. *J. Chromatogr. A* **722**, 345.

LIN, C-E.; CHIOU, W-C; LIN, W-CH. (1996b). Separation of alkylbenzyl quaternary ammonium compounds by capillary zone electrophoresis. Effect of organic solvent in sample solution. *J. Chromatogr. A* **723**, 189.

MIKKERS, F.E.P; EVERAERTS, F.M.; VERHEGGEN, TH.P. (1979). High-performance zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* **169**, 11.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. (1988). *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed. Ellis Horwood Limited, Chichester, England.

MONING, C.A.; KENNEDY, R.T. (1994). Capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **66**, 280.

NIELEN, M.W.F. (1993). Trace enrichment of environmental samples in capillary zone electrophoresis. *Trends in Anal. Chem.* **12**, 345.

PIERA, E.; DOMINGUEZ, C.; CLAPES, P.; ERRA, P.; INFANTE, M. R. (1999). Qualitative and quantitative analysis of new alkyl amide arginine surfactants by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **852**, 499.

PIERA, E.; ERRA, P.; INFANTE, M.R. (1997). Analysis of cationic surfactants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **757**, 275.

PRINCE, S.J.; McLAURY, H-J.; ALLEN, L.V.; McLAURY, P. (1999). Analysis of benzalkonium chloride and its homologs: HPLC versus HPCE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**, 877.

RICHMOND, J.M. (1990). *Cationic surfactants: Organic Chemistry* (Surfactant Science Series, Vol **34**, Marcel Dekker, New York.

SALIMI-MOOSAVI, H.; CASSIDY, R.M. (1996). Application of nonaqueous capillary electrophoresis to the separation of long-chain surfactants. *Anal. Chem.* **68**, 293.

SEPANIAK, M.J.; COLE, R.O. (1987). Column efficiency in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chem.* **59**, 472.

SHAMSI, S.A.; DANIELSON, N. (1996). Capillary electrophoresis of cationic surfactants with tetrazolium violet and of anionic surfactants with adenosine monophosphate and indirect photometric detection. *J. Chromatogr. A* **405**, 405.

TAYLOR, R.B.; TOASAKSIRI, S.; REID, R.G. (1998). Determination of antibacterial quaternary ammonium compounds in lozenges by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **798**, 335.

TAYLOR, R.B.; TOASAKSIRI, S.; REID, R.G. (1998). Capillary electrophoresis and liquid chromatography in the analysis of some quaternary ammonium salts used in lozenges as antibacterial agents. *J. Cap. Elec.* **005**, 45.

TRIBET, C.; GABORIAUD, R.; GAREIL, P. (1992). Determination of C₈-C₂₀ saturated anionic and cationic surfactant mixtures by capillary isotachopheresis with conductivity detection. *J. Chromatogr.* **608**, 381.

TURNES, M.I.; MEJUTO, M.C.; CELA, R. (1996). Determination of pentachlorophenol in water samples by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **733**, 395.

USP (1995). The United States Pharmacopeia and National Formulary, Rockville, MD, pp 2218-2220.

VOGT, C.; HEINIG, K. (1999). Trace analysis of surfactants using chromatographic and electrophoretic techniques. *Fresenius J. Anal. Chem.* **363**, 612.

WEISS, C.S.; HAZLETT, J.S.; DATTA, M.H.; DANZER. (1992). Determination of quaternary ammonium compounds by capillary electrophoresis using direct and indirect UV detection. *J. Chromatogr.* **608**, 325.

YANG, Q.; HIDAJAT, K.; LI, S.F.Y. (1997). Trends in Capillary Electrophoresis: 1997. *J. Chromatogr. Sci.* **35**, 358.

CAPÍTULO VII

Determinación del alquilbencenos como impurezas en cloruro de bencilo y cloruro de benzalconio (BAK)

CAPÍTULO VII. DETERMINACIÓN DE ALQUILBENCENOS COMO IMPUREZAS EN CLORURO DE BENCILO Y CLORURO DE BENZALCONIO (BAK)

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	301
2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS ALQUILBENCENOS OBJETO DE ESTUDIO. TOXICIDAD DEL CLORO Y DICLOROTOLUENOS.....	303
3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS.....	311
4. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	312
4.1. Consideraciones previas	314
4.2. Separación de seis alquilbencenos con columna Lichospher-C ₁₈	315
4.3. Mejora de la separación con columna Simmetry- C ₁₈	319
4.4. Condiciones finales de separación	325
5. APLICACIÓN A MUESTRAS DE CLORURO DE BENCILO.....	326
5.1. Análisis cualitativo y cuantitativo	328
5.2. Análisis de muestras comerciales.....	330
6. ANÁLISIS DE IMPUREZAS EN MUESTRAS DE BAK.....	333
6.1. Separación cromatográfica con fase estacionaria Lichrosorb-CN..	333
6.2. Análisis cualitativo y cuantitativo	334
6.3. Identificación y cuantificación de impurezas en BAK.....	337
7. CONCLUSIONES.....	341
8. BIBLIOGRAFÍA	342

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

A causa de la detección de impurezas no identificadas en muestras de cloruro de benzalconio sintetizado en el laboratorio, del estudio de la bibliografía analítica referente a las impurezas existentes en el cloruro de bencilo técnico (RAO Y SUBBARAM, 1972; BABINA Y KVARTAL'NOVA, 1979 Y GALAZKA, 1983) y de las especificaciones proporcionadas por distintos proveedores de este producto, se plantea la necesidad de establecer la influencia de los productos residuales del cloruro de bencilo usado como materia prima, sobre la futura calidad de los productos terminados, los compuestos cuaternarios.

Como ya se ha mencionado en la introducción de esta Tesis Doctoral, es conocido que las materias primas son una de las vías de componentes indeseados. En las rutas de síntesis, hasta que se obtiene el producto final con una aplicación de consumo, se fabrican productos intermedios y las impurezas formadas, si no se degradan, minimizan o eliminan, son transmitidas a lo largo de los procesos.

Industrialmente, el cloruro de bencilo puede ser preparado a partir de la cloración de tolueno (halogenación de un alquilbenceno a través del radical bencílico como intermedio) con luz o calor, y sometido para su purificación a un lavado con agua y a una destilación final (figura VII-1). Otros derivados clorados como el 2-clorotolueno o el α,α -diclorotolueno tienen una vía de síntesis muy similar. El primero se formaría a partir de la cloración catalítica del tolueno y una posterior cloración del cloruro de bencilo o la cloración con dos moles sobre el tolueno en presencia de luz conduciría a la formación del α,α -diclorotolueno (CAREY, 1999). Además este último al hidrolizarse constituye la materia prima para la obtención industrial de benzaldehído. El alcohol bencílico se puede

obtener por hidrólisis del cloruro de bencilo o a partir de una autooxidación-reducción del benzaldehído con una base fuerte (reacción de Cannizzaro) (ALLINGER y col., 1979; HAWLEY, 1985).

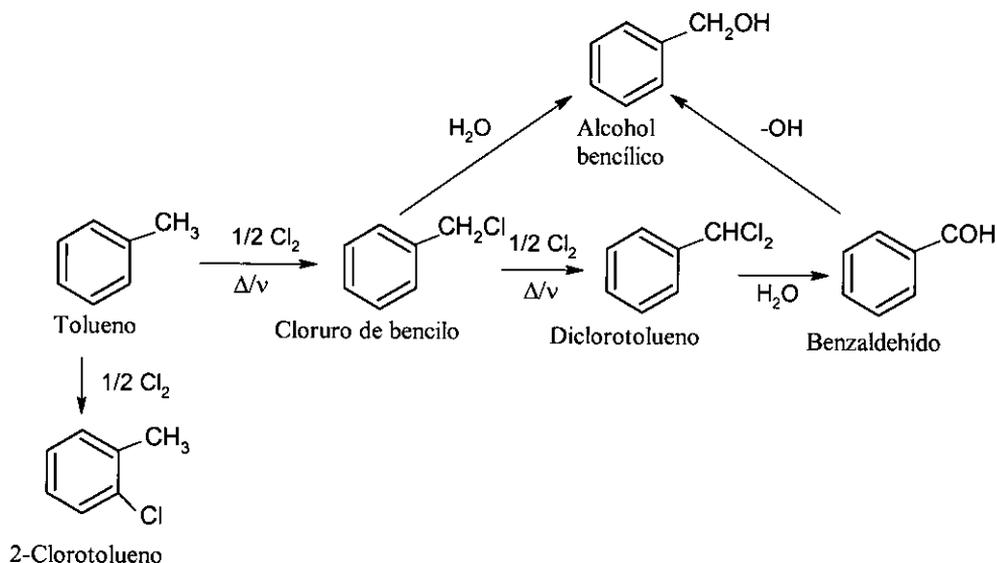


Figura VII-1. Reacción de obtención del cloruro de bencilo, 2-clorotolueno, α,α -diclorotolueno, alcohol bencílico y benzaldehído.

El cloruro de bencilo técnico presente en el mercado tiene una especificación de pureza mayor del 99% y es frecuente que la pureza encontrada sea igual o superior al 99,5%. En consecuencia, las impurezas presentes que contenga, la materia prima, el tolueno y los cloro y diclorotoluenos serán del orden de partes por millón. Sin embargo podrían constituir impurezas de los compuestos cuaternarios o sufrir reacciones de formación de productos secundarios.

La cromatografía de gases es la técnica usada habitualmente en la bibliografía relativa al análisis de la materia prima (cloruro de bencilo). Al no disponer de estos equipos en el laboratorio industrial se intentará la adaptación de un método

por cromatografía de líquidos. Teniendo en cuenta que en los productos terminados, los compuestos cuaternarios se determinan por HPLC sería importante disponer de un conjunto de métodos con una técnica analítica común, cuyo paso de uno a otro precisará de pequeñas adaptaciones, de forma que en un período de tiempo corto, fuese posible analizar todo el ciclo de un producto o productos de una misma clase química.

Por todo lo anteriormente tratado, los objetivos perseguidos son:

1. Desarrollo de un método por HPLC que permita separar, identificar y cuantificar seis compuestos: alcohol bencílico, tolueno, cloruro de bencilo, 2-clorotolueno, α,α -diclorotolueno y benzaldehído.
2. Aplicación del método creado al análisis de un cloruro de bencilo técnico en el que éste es el componente mayoritario y los restantes compuestos se encuentran como impurezas.
3. Verificación de que los métodos desarrollados para el cloruro de benzalconio permiten separar los cinco compuestos.
4. Identificación de las impurezas en BAK que condicionaron el uso de una elución en gradiente.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS ALQUILBENCENOS OBJETO DE ESTUDIO. TOXICIDAD DEL CLORO- Y DICLOROTOLUENOS

La revisión de la bibliografía referente al análisis del alcohol bencílico, cloruro de bencilo, tolueno, benzaldehído, clorotolueno y α,α -diclorotolueno conduce a una clasificación en tres niveles de interés según la orientación de los investigadores. Un primero, donde se revisa algún aspecto teórico de una técnica analítica o un nuevo enfoque usando series de compuestos estructuralmente

similares o al menos con comportamiento cromatográfico análogo. El segundo nivel, más específico y más acorde con uno de los objetivos planteados en este capítulo, es el análisis de productos industriales; y por último un tercero de carácter medioambiental.

Son habituales varias técnicas de separación como cromatografía de gases, de fluidos supercríticos y de líquidos, para el análisis de los seis compuestos conjuntamente (debido a que presentan entre sí semejanzas estructurales) o de forma individual en series, que son usadas para predecir parámetros cromatográficos, construir modelos o probar nuevas fases estacionarias o modificadores.

Usando como técnica la cromatografía de gases, ZENKEVICH (1999) correlaciona los clorotoluenos con los arenos cuando establece una relación logarítmica lineal entre los índices de retención de distintas series de compuestos orgánicos estructuralmente similares. WAWRZYNIAK Y WASIAK (1999) determinan halohidrocarburos, entre ellos cloruro de bencilo y clorotoluenos, con dos fases estacionarias, ciano y tiol modificando con sales de CuCl_2 y CoCl_2 las ciano y NiCl_2 y CoCl_2 los grupos tiol. Los cambios en la retención debido a la interacción entre el metal y los halohidrocarburos se estudian y comparan con las fases sin modificar.

AL-HAJ y col. (2001) emplean cloruro de bencilo en una de las series que usan para validar aproximaciones matemáticas que estudian el mecanismo de interacción molecular con siete fases estacionarias de HPLC, verificando una buena correlación entre los datos calculados y los experimentales. Estas aproximaciones de relaciones cuantitativas entre estructura y retención permiten

evaluaciones de columnas cromatográficas y predecir la retención de analitos con estructuras definidas.

PYO y col. (1998) prueban los efectos del modificador, metanol, en cromatografía capilar de fluidos supercríticos, usando una ecuación que relaciona el factor de capacidad con el coeficiente de partición entre las fases. Se estudian también los mecanismos de retención, en una serie de 35 compuestos entre los que se encuentran el alcohol bencílico, tolueno, benzaldehído y cloruro de bencilo.

DING Y FRITZ (1997) explorando las posibilidades que tiene una técnica como la electroforesis capilar para el análisis de productos no iónicos, separan cloruro de bencilo y benzaldehído en una serie de 20 compuestos orgánicos polares usando un tensioactivo en el electrolito, concretamente un alcohol etoxilado funcionalizado con un grupo sulfónico, que compleja con el analito. Los investigadores hacen uso de la concentración del tensioactivo y del porcentaje de acetonitrilo en el electrolito, para conseguir la selectividad requerida en la separación de una serie de compuestos orgánicos polares que incluye el cloruro de bencilo y en otras series formadas por cinco tipos de testosteronas o en hidrocarburos aromáticos policíclicos.

En la bibliografía referida al análisis de un cloruro de bencilo técnico, se encuentran solamente tres trabajos, uno de ellos bajo patente (GALAZKA, 1983), en los que la técnica cromatográfica usada es la cromatografía de gases. RAO y SUBBARAM (1972) se plantean la determinación de una de las impurezas del cloruro de bencilo: el α,α -diclorotolueno para valores menores del 1%. Las condiciones conseguidas suponen mantener la columna a una temperatura de 125°C, emplear como gas portador una mezcla de nitrógeno, hidrógeno y oxígeno y cuantificar usando el tetradecano como patrón interno.

Además del α,α -diclorotolueno, otros compuestos residuales: tolueno y clorotolueno son cuantificados en un cloruro de bencilo del 99%, usando como patrón interno el ciclohexano (BABINA y KVARTAL'NOVA, 1978). Las temperaturas de la columna y del inyector fueron de 90°C y de 250°C respectivamente.

La patente de GALAZKA (1983) incluye con el análisis de componentes de cloruro de bencilo, también los del alcohol bencílico técnico. Aunque en el sumario de la patente no se especifica la naturaleza de los componentes separados, el número de registro de los compuestos que intervienen en el estudio indica que se trata con benzaldehído, tolueno, clorotolueno y α,α -diclorotolueno. También se resumen en el método patentado: el tratamiento con metilsilicona y polietilenglicol sobre el relleno de la columna cromatográfica, las condiciones de separación, nitrógeno como gas portador, gradiente de temperaturas y el empleo de patrones internos como el etilbenceno y 1,3,5-triclorobenceno.

En el análisis de compuestos industriales, el cloruro de bencilo y sus impurezas pueden estar presentes en una matriz donde el componente mayoritario tenga vías de síntesis similares a ellos, como en el benzaldehído o el 2-clorobenzaldehído. BABINA Y KVARTAL'NOVA (1979), analizan impurezas en benzaldehído usando un detector de ionización de llama, una columna tratada con un 15% succinato de glicol y la separación realizada a 130°C usando benzoato de butilo como patrón interno. Entre los compuestos residuales determinados se encuentran el cloruro de bencilo y el α,α -diclorotolueno.

Usando HPLC en fase normal y como fase móvil una mezcla del 90% de ciclohexano y 10% de cloroformo, otros autores (FAN y LEVINE, 1978) analizan el benzaldehído de calidad USP encontrando como impurezas el α,α -diclorotolueno,

el nitrobenzeno y el ácido benzoico. El método es una alternativa a un test de la USP y además más rápido.

RAMAKRISHNAN y SUBRAMANIAN (1975) analizan mezclas de tolueno y sus derivados clorados: cloruro de bencilo, cloruro de benzal y benzotricloruro por cromatografía de gases con detector de conductividad térmica y como patrón interno el tetracloruro de carbono.

En el método aplicado por FAN y col. (2001) en la producción industrial de 2-clorobenzaldehído se usa cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas, detectando entre otros subproductos, orto-clorotolueno y diclorotolueno.

Dentro de los trabajos de carácter medioambiental que incluyen el cloruro de bencilo, clorotolueno, tolueno o diclorotolueno, hay un conjunto de ellos que tienen en común el empleo como técnica analítica de la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas para el estudio de un tipo de contaminantes atmosféricos: los compuestos orgánicos volátiles (VOC). MCCLENNY y col. (1984) trabajan con el cloruro de bencilo y el tolueno y KROST y col. (1982) con cloruro de bencilo.

SIN y col. (2001) estudian la estabilidad en tubos de muestreo en un período de cuatro meses. Aunque los VOC probados, entre ellos el clorotolueno, presentan buena estabilidad, el cloruro de bencilo disminuye más de un 30% de su concentración en un período de almacenaje de sólo tres semanas. El método además consigue la separación de 143 VOC en 35 min, encontrándose el clorotolueno y cloruro de bencilo en tiempos de retención cercanos a los 30 min.

MAEDA y col. (1998) con el empleo de cromatografía de gases capilar para lograr la separación simultánea de 36 patrones de hidrocarburos aromáticos y

clorados en aire, inciden más en el estudio del análisis cromatográfico que en aspectos de muestreo, usando dos tipos de detectores, de fotoionización y de conductividad electrolítica. Si bien no es posible la cuantificación con los dos detectores propuestos para todos los compuestos empleados, en el caso del cloruro de bencilo, el detector de fotoionización permite su detección y cuantificación con un tiempo de retención de aproximadamente 38 min mientras que con el de conductividad tan sólo puede ser detectado. Finalmente, con el método optimizado se monitorizan muestras de aire en las que no se detecta cloruro de bencilo.

Uno de los métodos GC/MS para VOC (KROST y col., 1982) es aplicado por PELLIZARI (1982) en áreas industrializadas de Estados Unidos donde se producen, usan y almacenan VOC y también en áreas cercanas a un vertedero. En este último emplazamiento se detectan y cuantifican, dos de los compuestos de interés, el clorotolueno y diclorotolueno y en algún punto de muestreo alcanzan los valores más altos, cercanos a los $500\mu\text{g m}^{-3}$.

Otros trabajos medioambientales están orientados al análisis en una matriz concreta: lodos de aguas residuales, gases residuales o aguas naturales donde se han encontrado compuestos clorados. Con GC, KOKLOVA (1986) propone un método para determinar monoclorotoluenos en aguas naturales. Con HPLC, HROMUL'AKOVA Y LEHOTAY (1996) determinan cloruro de bencilo, clorobenceno, naftaleno y bifenilo en gas residual absorbidos en 2-metoxietanol. En 1997, LEHOTAY Y HROMUL'AKOVA en muestras ambientales de aguas, detectan niveles trazas de cloruro de bencilo con un límite de detección de 90 ppt. Otros contaminantes como los bifenilos, naftaleno y clorobencenos también son separados.

En lodos de aguas residuales, ANNA y col. (1984), analizan entre otros contaminantes orgánicos el cloruro de bencilo y el diclorotolueno y FRIEGE y col. (1989) en lodos de efluentes de la industria textil, clorobencenos y clorotoluenos. También, en lodos procedentes de aguas residuales de origen doméstico, estos últimos autores determinan compuestos policlorados como dibenzodioxinas y dibenzofuranos.

En el capítulo IV se había examinado la toxicidad del cloruro de bencilo, por lo que en éste se revisará la correspondiente a sus posibles impurezas: tolueno, benzaldehído, clorotolueno y diclorotoluenos.

La LD₅₀ oral en ratas es en general, significativamente más alta para estos compuestos (tabla VII-1) que para el cloruro de bencilo (oral-rat LD₅₀ =1231 mg kg⁻¹). Con todo, los compuestos clorados han estado sometidos a evaluaciones sobre su capacidad para provocar irritación ocular y respiratoria. En esta última, se miden con ratones, las concentraciones en aire necesarias para provocar una caída del ritmo respiratorio del 50%, RD₅₀. STADLER Y KENNEDY (1977) midiendo el RD₅₀ en una serie de compuestos químicos, entre ellos el 2-clorotolueno, concluyen por los datos obtenidos, que ninguno de ellos individualmente debería causar irritación respiratoria en humanos a niveles entre 100 y 1000 mg L⁻¹; aunque ésta sí se produciría a bajas concentraciones por combinación de emisiones de varios compuestos.

Otros autores (DUDEK y col., 1992) al medir el potencial de irritabilidad respiratoria en la serie del tolueno sustituido en α por un cloro (cloruro de bencilo), dos cloros (α,α -diclorotolueno), yodo y bromo, resaltan como un compuesto relativamente poco irritante como el tolueno, aumenta su potencial al ser sustituido por un halógeno. Esta relación entre actividad y estructura puede ser

explicada para los compuestos estudiados con una interacción en la bicapa de lípidos al formarse una carga negativa en el carbono en α y una disociación del enlace con el halógeno. Cuando miden el RD_{50} del tolueno con un cloro en orto (2-clorotolueno) los valores son más bajos que los obtenidos por STADLER Y KENNEDY (1977) (tabla VII-1).

TABLA VII-1. Datos toxicológicos de posibles impurezas del cloruro de bencilo.

Compuesto	Oral-rat LD_{50} (mg kg^{-1})*	RD_{50} (mg L^{-1})#
Tolueno	5000	4900
Benzaldehído	1300	-
α,α -Diclorotolueno	3249	27
Clorotolueno	5700 ⁱ	2,9

Fuente: * SAX (1980); # DUDEK y col. (1992); ⁱ PIS'KO y col. (1981).

El estudio de la irritabilidad ocular se lleva a cabo mediante un test realizado en conejos que en un futuro se pretende sea reemplazado por otras técnicas que no supongan el empleo de animales. Existe un banco de datos (ECETOC, 1998 y BAGLEY y col., 1999) que contiene los distintos tipos de compuestos químicos (haluros de acilo, ésteres, aldehídos...) con miembros que pueden causar irritabilidad ocular y los grados de ésta. De los 132 compuestos seleccionados uno de ellos es el α,α -diclorotolueno.

Con respecto a las concentraciones, que con los conocimientos actuales, un trabajador puede estar expuesto sin efectos adversos para la salud, o valores límites ambientales-exposición diaria (VLA-ED), la Xunta de Galicia (2000) estipula para el tolueno 50 ppm o 191 $mg\ m^{-3}$ y para el clorotolueno 50 ppm o 264 $mg\ m^{-3}$.

También hay trabajos que revisan la toxicidad en las aguas para el tolueno y los clorotoluenos. PIS'KO y col. (1981) en función del examen de los datos toxicológicos, entre ellos el oral-rat LD₅₀, recomiendan para el orto y paraclorotolueno como concentración máxima permitida un 0,04 mg L⁻¹ en depósitos de agua. TOLSTOPYATOVA y ZHOLDAHOVA (1980), subrayan el aumento de todos los parámetros de toxicidad con el número de átomos de cloro sobre el anillo aromático del tolueno.

FUKUDA y col. (1981) examinan la potencial carcinogenicidad de cloruro de bencilo, de benzal (α,α -diclorotolueno), del benzotricloruro y del cloruro de benzoílo por administración de dosis bajas en ratones en períodos largos de tiempo. Se observan resultados positivos para el benzotriazol y con menor incidencia en el cloruro de benzal y el cloruro de bencilo. Otros trabajos como el de YASUO y col. (1978) estudian el efecto mutágeno sobre sistemas bacterianos, obteniendo para los procedimientos empleados, que el cloruro de bencilo era débilmente mutágeno y el cloruro de benzal requería activación metabólica.

3. INSTRUMENTACIÓN, MATERIAL Y REACTIVOS

- Cromatógrafo de líquidos WATERS equipado de sistema de gradiente cuaternario modelo 600, detector ultravioleta-visible con red de diodos modelo 996, inyector Reodyne con loop de 20 μ L y tratamiento de datos con software Millenium.
- Las columnas C₁₈ empleadas son: una LiChrospher[®] de Merck de dimensiones, 250 mm x 4 mm x 5- μ m y Symmetry[®] de Waters de 150 x 4,6 mm x 3,5 μ m de dos lotes distintos (W10261D024 y W11581D012).
- Precolumna Symmetry[®] de 20 mm x 3,9 mm x 5 μ m.

- La columna LiChrosorb[®] CN de Merck, de dimensiones, 250 mm x 4,0mm x 5 µm.
- Jeringa SGE de 100 µL.
- Matraces aforados de 10, 25 y 50mL y pipetas de doble aforo 1, 2, 5 y 10 mL.
- Material fungible de uso corriente en laboratorio.
- Acetonitrilo (Merck) de calidad cromatográfica y agua obtenida con un aparato de purificación Direct-Q 3 (Millipore).
- Trietilamina, para análisis, de Merck y ácido fosfórico del 85%, para análisis, de Panreac.
- Alcohol bencílico del 99,8%, benzaldehído del 99,5%, cloruro de bencilo para síntesis, α,α -diclorotolueno (cloruro de benzal, cloruro de bencilideno, dicloruro de bencilo) del 98% y cloruro de 2-clorobencilo, mayor del 99%, de Aldrich, clorotolueno, para síntesis, de Merck, dibenciléter (99%) de Avocado y tolueno, para análisis, de Panreac.
- Cloruro de bencilo técnico de distintas fuentes comerciales.

4. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

La separación de los seis alquilbencenos se emprende con el propósito de que se adecue a matrices de cuaternarios en los que éstos puedan coexistir como impurezas.

Por otra parte, los compuestos a analizar presentan entre sí un gran parecido estructural ya que partiendo del grupo bencilo, si se añade un hidrógeno se obtiene, tolueno, un cloro, cloruro de bencilo, dos cloros, α,α -diclorotolueno, un

grupo hidróxilo, alcohol bencílico y un aldehído para formar el benzaldehído. El sexto compuesto, 2-clorotolueno presenta el sustituyente directamente enlazado en el grupo aromático.

Se intenta la separación usando una fase estacionaria octadecilsilice muy común en fase inversa y de bajo coste. La fase móvil consiste en una mezcla de agua/acetonitrilo en la que previamente se fijan tres variables, naturaleza y concentración del tampón y pH de la fase acuosa con el fin de compatibilizar, en futuras aplicaciones, el análisis de los compuestos cuaternarios con el de las impurezas alquilbenciladas.

Se elige como parte catiónica en el tampón, trietilamina a una concentración de 0,15%, en lugar de los habituales iones inorgánicos (Na^+ , K^+ , NH_4^+). Esta amina ya fue usada a una concentración de 0,1% por GÓMEZ GOMAR y col. (1990) en la separación de la cadena alifática del BAK comprobando que la retención del cuaternario aumentaba con un incremento de la concentración de trietilamina. También es recomendada por BIJ, y col. (1981) para eliminar mecanismos de tipo iónico que ocasionan la variación del tiempo de retención con la concentración de los compuestos cuaternarios.

Con respecto al otro parámetro, el pH, a través de la bibliografía (ABIDI, 1985) y del trabajo realizado en el capítulo V de esta Tesis Doctoral se conoce su influencia sobre el comportamiento cromatográfico de los cuaternarios, reflejada en un aumento de la retención al cambiar de pH ácido a pH neutro. Por ello se escoge pH 7 en un intento de eluir, como en el caso del BAK y el TEBA, en primer lugar los compuestos neutros y después el compuesto cuaternario. El ajuste de la fase móvil desde el pH básico, que origina la trietilamina, hasta neutro se lleva a cabo con ácido fosfórico (50 mg mL^{-1}).

Al disponer en la elaboración del método de un detector de fotodiodos, se crea una biblioteca con los espectros individuales de muestra patrón con cada uno de los seis compuestos analizados (espectro tomado en el intervalo entre 190-400 nm). Después en cada muestra, se comparan para su identificación los espectros de los picos obtenidos con los existentes en la biblioteca, obteniéndose además un valor cuantitativo del grado de identificación con el espectro patrón.

La comparación espectral debe ser realizada en las condiciones de máxima semejanza. Esto quiere decir que la composición de fase móvil y la concentración de muestra serán lo más parecidas posible sino iguales. En ensayos previos se ha observado que el factor más determinante es la concentración de las muestras, debido a que el acetonitrilo de la fase móvil no presenta una transmitancia del 100% a longitudes de onda bajas (menores de 210nm). Así en las concentraciones más diluidas, la zona de máxima absorción se ve desplazada a longitudes de onda más bajas. Para una misma concentración del patrón de la biblioteca y la muestra, la variación de acetonitrilo entre un 50-85% no ha sido impedimento para la identificación espectral de los compuestos.

4.1. Consideraciones previas

Preparación de estándares, muestras de cloruro de bencilo y BAK

Se preparan disoluciones madres de todos los compuestos (alcohol bencílico, benzaldehído, cloruro de bencilo, α,α -diclorotolueno, clorotolueno y tolueno) de 3 mg mL⁻¹ en acetonitrilo y se diluyen a las concentraciones de trabajo en acetonitrilo o en fase móvil. Las muestras de cloruro de bencilo se preparan a una concentración de 3 mg mL⁻¹ en fase móvil y las de BAK a 10 mg mL⁻¹ sobre la base anhidra.

4.2. Separación de seis alquilbencenos con columna Lichrospher®-C₁₈

Fijadas algunas de las variables cromatográficas (agua con 0,15% de TEA a pH=7) y la metodología de trabajo (identificación espectral) se efectúan los ensayos de separación con la columna, Lichrospher®-C₁₈ y dimensiones 250 x 4 mm y una muestra preparada con patrones de alcohol bencílico, benzaldehído, cloruro de bencilo, tolueno, α,α -diclorotolueno y clorotolueno a una concentración de 5-6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada uno de ellos. Este supuesto, igual concentración para todos, se aleja en cierta medida, del tipo de separación que necesitarían las muestras de cloruro de bencilo pero puede ser válido para los cuaternarios y por otra parte permitirá medir con más facilidad parámetros cromatográficos como la selectividad y resolución, al minimizar el riesgo de solapamientos. En cuanto al nivel de concentración fijada, puede ser la adecuada para las matrices en las que se encuentren como impurezas.

Así pues, el estudio de la separación de los compuestos bencílicos se efectúa variando la relación tampón acuoso/acetonitrilo en un intervalo desde 50 a 85% de acetonitrilo en la fase móvil. En la figura VII-2, se representan la variación del factor de capacidad frente al porcentaje de acetonitrilo para los seis compuestos. Los datos experimentales obtenidos confirman un comportamiento semejante en todos, caracterizado por un aumento de la retención con una disminución del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil. Es decir, un aumento de la retención en la columna al aumentar la polaridad del eluyente si bien, no en el mismo grado lo que condicionará la selectividad entre ellos (figura VII-2).

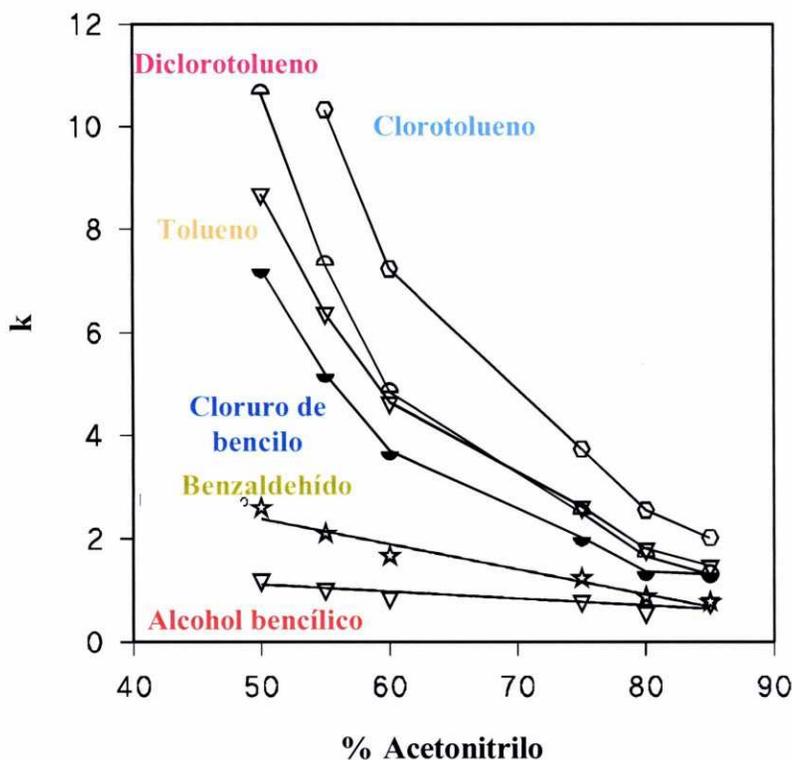


Figura VII-2. Influencia del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil sobre el factor de capacidad de los compuestos. (Columna Lichrospher C₁₈, fase móvil=ACN/ 0,15% de TEA a pH=7)

Un primer grupo de compuestos, entre los que se encuentran el alcohol bencílico y el benzaldehído muestran en el intervalo estudiado, una relación lineal con una pendiente pequeña, sin alcanzar factores de capacidad de 3. Un segundo grupo formado por los clorados, cloro- y dicloro- toluenos comienzan con factores de capacidad alrededor de 2 y para porcentajes de acetonitrilo mayores del 50% superan el valor de 10, siendo el aumento más acusado para el clorotolueno. Por último, el grupo que incluye el cloruro de bencilo y tolueno también aumentan

exponencialmente a medida que, disminuye el acetonitrilo pero con una pendiente más baja. No obstante, el α,α -diclorotolueno para porcentajes mayores de un 60% de acetonitrilo tiene un comportamiento más similar con el tolueno y el cloruro de bencilo y es a partir del 60% cuando se asemeja al clorotolueno.

Con respecto a la selectividad, es buena para el primer grupo, entre el benzaldehído y el cloruro de bencilo y suficiente para que eluyan sin solapamientos el cloro- y el α,α -diclorotolueno. En el segundo grupo y a la concentración de trabajo, la selectividad entre 1,1 y 1,2, tolera la separación entre el cloruro de bencilo y el tolueno. Es para el tolueno y el α,α -diclorotolueno donde hay más dificultades de separación. Entre 70-85% de acetonitrilo, el orden de elución es α,α -diclorotolueno-tolueno, y a excepción de 85%, en el resto de condiciones con una selectividad menor de 1,1 los dos compuestos eluyen parcialmente solapados. A partir de un 60% de acetonitrilo, el orden de elución es tolueno- α,α -diclorotolueno, pero no se separan hasta que la fase móvil contiene un 55% de acetonitrilo.

En definitiva, para concentraciones de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ se consigue separar simultáneamente los seis compuestos con un porcentaje de un 85% de acetonitrilo en 5 min (elución isocrática *A*) y con un 55% en 18 min (elución isocrática *B*). Cantidades mayores de 55% aumentan en demasía el tiempo de análisis (figura VII-3). Pese a todo, en las condiciones más favorables de las optimizadas (85% ACN, 5 min), el cloruro de bencilo y el α,α -diclorotolueno presentan colas y en las segundas (55%, 18 min) los últimos picos en eluir están ensanchados. Con estas últimas, puesto que en ellas se consigue mejor selectividad para los compuestos clorados, se intenta una mejora que abarque dos objetivos: acortar el tiempo de análisis y aumentar la resolución entre los siguientes compuestos

cloruro de bencilo-tolueno y tolueno- α,α -diclorotolueno. Se eligen estos tres compuestos con el fin de que la separación presente versatilidad para distintas concentraciones de los componentes.

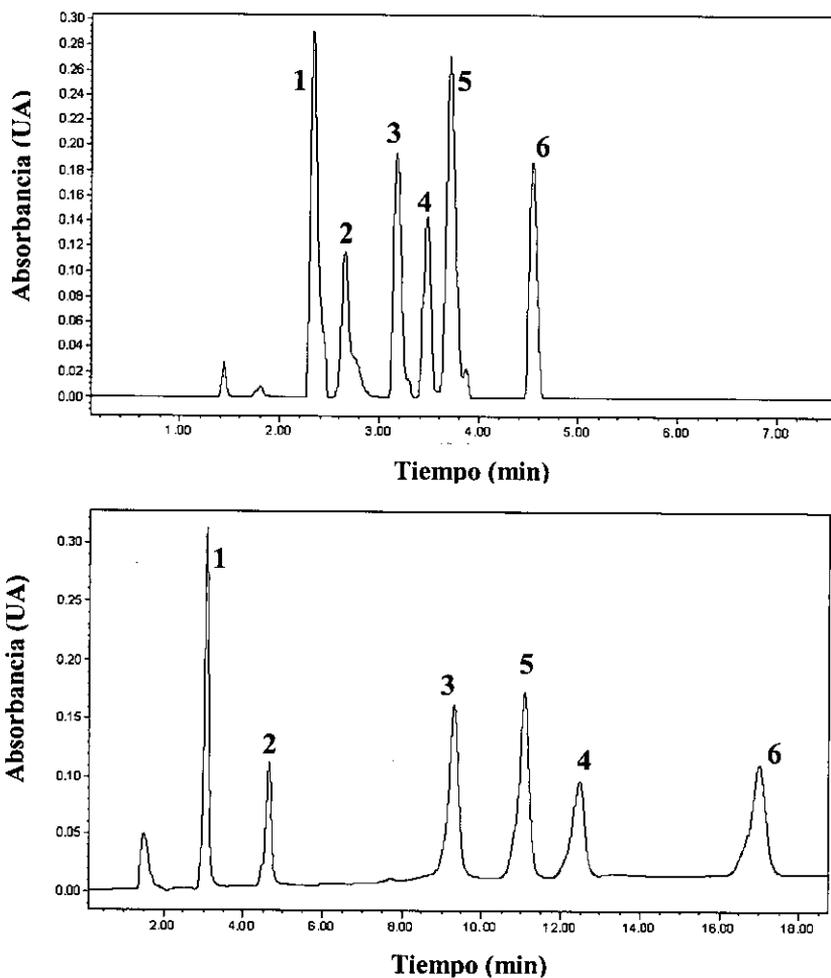


Figura VII-3. Cromatogramas de la separación de los seis alquilbencenos estudiados con columna Lichrospher en los modos de elución isocrática A Y B descritos en el texto. 1. Alcohol bencílico, 2. Benzaldehído, 3. Cloruro de bencilo, 4. α,α -Diclorotolueno, 5. Tolueno y 6. Clorotolueno.

4.3. Mejora de la separación con columna Simmetry[®]-C₁₈

Con el propósito de mejorar la separación conseguida en los seis alquilbencenos, se revisan los fundamentos de la cromatografía para elegir las variables sobre las que actuar. Así la resolución y la simetría de los picos pueden ser dos parámetros que nos permiten alcanzar la separación óptima.

La resolución o la medida del poder del sistema cromatográfico para separar dos compuestos, puede ser expresada como una función de tres términos el número de platos teóricos, la selectividad y la retención (Ecuación 1). El primero de ellos se refiere a aspectos cinéticos relacionados con el ensanchamiento de banda y los otros dos a aspectos termodinámicos de los compuestos (su constante de distribución en las dos fases, estacionaria y móvil).

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad (1)$$

R_s = resolución entre dos compuestos A y B, α = selectividad entre dos compuestos A y B, k_B = factor de capacidad del compuesto B, teniendo este un factor de capacidad mayor que A y N = número de platos o eficacia.

Una opción para disminuir el tiempo de análisis será reducir la longitud de la columna, por ejemplo a 150mm manteniendo constante la naturaleza de la fase estacionaria, C₁₈, la fase móvil y el flujo. No obstante, esto supone una disminución de la eficacia ya que el número de platos es directamente proporcional a la longitud de la columna (ecuación 2). Por lo tanto, para compensar el efecto sobre N y por tanto sobre la resolución, se puede disminuir el denominador de la ecuación 2 y la variable de la columna que lo permite es el tamaño de partícula de la fase estacionaria.

$$N = \frac{L}{H} \quad (2)$$

L = longitud de la columna y H = altura del plato teórico

La relación entre el tamaño de partícula, más concretamente su diámetro d_p y H se establece a través de la ecuación de van Deemter (ecuación 3) que explica las interacciones de tipo físico que se producen en la columna. Se compone de tres términos independientes que consideran la difusión longitudinal, la transferencia de masa entre las fases y los caminos múltiples del flujo. En el término de transferencia de masa, el coeficiente C_M es directamente proporcional al cuadrado del diámetro de las partículas que constituyen el relleno. Una disminución de d_p , implica una disminución de H y por tanto un aumento de N y de la resolución

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M)u \quad (3)$$

dónde H es la altura del plato teórico, u es la velocidad lineal de la fase móvil, A es el coeficiente debido a los caminos múltiples de flujo, B es el coeficiente de difusión longitudinal y C_S y C_M es el coeficiente de transferencia de masa de la fase estacionaria y móvil respectivamente.

Se elige una columna Symmetry[®]-C₁₈ con una longitud de 150 mm y un tamaño de partícula de 3,5 μm, es decir con dimensiones menores que las que poseía Lichrospher[®] (250 mm y 5 μm). Sin embargo el diámetro de la columna, que al igual que el de la partícula del relleno afecta a la eficacia, es mayor en Symmetry[®], (4,6 mm) que en Lichrospher[®] (4 mm) por lo que el aumento tendría un efecto negativo sobre la resolución.

El primer y manifiesto resultado, si se comparan los cromatogramas de Symmetry[®] y Lichrospher[®], es una disminución de los valores del factor de capacidad, k , (tabla VII-2) de manera que el tiempo de análisis se acorta en

4 minutos, sin menoscabo de la selectividad, idéntica en los cuatro últimos compuestos en eluir (tabla VII-3). La única excepción, la disminución entre el benzaldehído y el cloruro de bencilo no es significativa para la muestra de los patrones.

Tabla VII-2. Factores de capacidad de alcohol bencílico, benzaldehído, cloruro de bencilo, tolueno, α,α -diclorotolueno y clorotolueno en columnas Lichrospher[®]-C₁₈ y Symmetry[®]-C₁₈, para una fase móvil 45% de fase acuosa/55% acetonitrilo.

Factor de capacidad (k)	Columna		
	Lichrospher [®]	Symmetry [®]	Precolumna + Symmetry [®]
Alcohol bencílico	1,0	0,9	0,8
Benzaldehído	2,1	1,8	1,6
Cloruro de bencilo	5,2	4,8	4,4
Tolueno	6,4	6,1	5,7
Diclorotolueno	7,3	6,9	6,4
Clorotolueno	10,3	9,9	9,1

Tabla VII-3. Selectividad de alcohol bencílico-benzaldehído, benzaldehído-cloruro de bencilo, cloruro de bencilo-tolueno, tolueno- α,α -diclorotolueno, α,α -diclorotolueno-clorotolueno en Lichrospher[®] y Symmetry[®] para una fase móvil compuesta de 45% de fase acuosa (0,15% TEA) y 55% de acetonitrilo.

Selectividad (α)	Columna		
	Lichrospher [®]	Symmetry [®]	Precolumna + Symmetry [®]
Alcohol bencílico/benzaldehído	2,0	2,0	2,1
Benzaldehído/cloruro de bencilo	2,5	2,1	2,7
Cloruro de bencilo/tolueno	1,3	1,3	1,3
Tolueno/diclorotolueno	1,1	1,1	1,1
Diclorotolueno/clorotolueno	1,4	1,4	1,4

Con el fin de salvaguardar la cabeza de columna de posibles deterioros pero también para aumentar el volumen de fase estacionaria sobre el que se lleva a cabo la separación, a la columna Symmetry[®] se le acopla una precolumna de dimensiones 20 x 3,9 mm y 5 µm. En la tabla VII-2 se muestran los factores de capacidad ligeramente menores para el sistema con precolumna.

Conseguido el primer objetivo, se examina el efecto sobre la resolución: si ha disminuido o se han conservado los valores alcanzados con Lichrospher[®]. Concretamente, en el caso del cloruro de bencilo-tolueno aumenta muy ligeramente, disminuye para el tolueno- α,α -diclorotolueno y para los restantes pares de compuestos, a pesar de que todos no presentan la misma tendencia, las variaciones en el valor de resolución son pequeñas (figura VII-4). Cuando se trabaja con precolumna hay un incremento de la resolución para todos los compuestos aunque no muy significativo. Así pues queda pendiente la mejora de este parámetro.

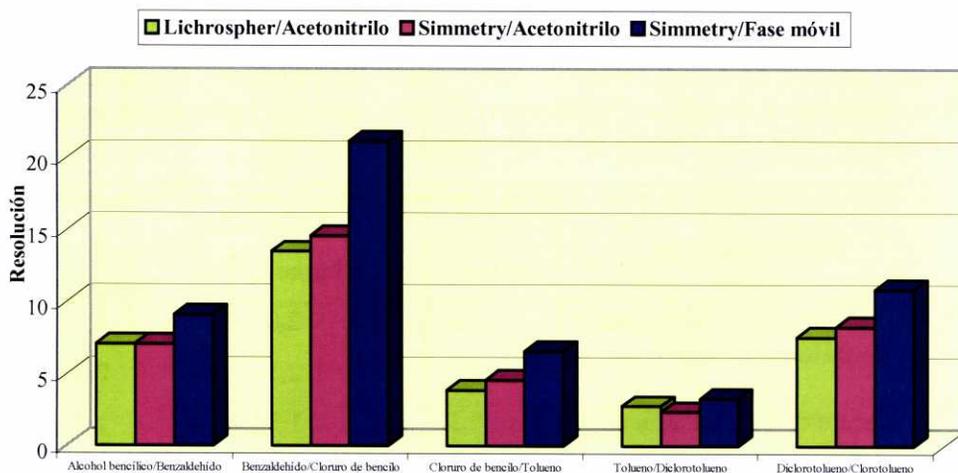


Figura VII-4. Influencia de la columna y la composición del disolvente de la muestra sobre la resolución.

Existen otros factores, independientes de las fases móvil y estacionaria, como el volumen de la muestra inyectada o la composición del medio en que está disuelta la muestra, que tienen influencia en el ensanchamiento de los picos y por tanto en la resolución. Si en la optimización que se está realizando, se cambia el acetonitrilo por una composición idéntica a la de la fase móvil, se consigue una disminución en el ancho de los picos que expresado en términos de resolución significa alcanzar un incremento equiparable a los objetivos perseguidos (figura VII-4).

La columna Symmetry[®] posee como característica diferenciadora, además de las que se refieren a la longitud y el tamaño de partícula, un bajo contenido en metales, con una especificación de Fe y Al sobre un 1 ppm. El fabricante recomienda esta columna cuando se quiere mejorar la simetría de los picos, especialmente para compuestos básicos y polares que eluyen con colas. La presencia de metales en la fase estacionaria provoca un aumento de los silanoles libres sin puente de hidrógeno en la superficie de la sílice, con los que puede interaccionar el analito dando efectos indeseados de asimetría (WATERS Corporation, 1999 y 2001). Para examinar su influencia en la separación objeto de estudio se utiliza el parámetro de factor de simetría (ecuación 4), propio de la farmacopea europea y equivalente al factor de cola en la farmacopea americana. Está definido como el cociente entre la anchura al 5% de la altura del pico (W) y dos veces la distancia entre el comienzo del pico y el tiempo de retención al 5% de la altura del pico (F).

$$FS = \frac{W}{2F} \quad (4)$$

La forma del pico puede ser explicada por la dispersión simétrica de las velocidades de las moléculas del analito alrededor de un valor medio tomando un modelo gaussiano. La desviación de este modelo produce la asimetría de los picos que puede ser frontal o en la cola. Cuando $2F < W$ el pico presenta cola y el factor de simetría es mayor que 1, si $2F > W$ el pico tiene frente y el factor de simetría es menor de 1. En Lichrospher® el factor de simetría presenta valores menores de 1 para todos los picos, con la Symmetry® hay un aumento solamente para el tolueno y para el clorotolueno, mejorando en todos y acercándose a valores cercanos a 1 con la incorporación de la precolumna. Esto parece indicar que su mecanismo de interacción no tiene una fuerte contribución de interacción silanofílica. Cuando se disuelve la muestra en fase móvil todos los factores de simetría suben por encima de 1,0 entre 1,1-1,2 (figura VII-5).

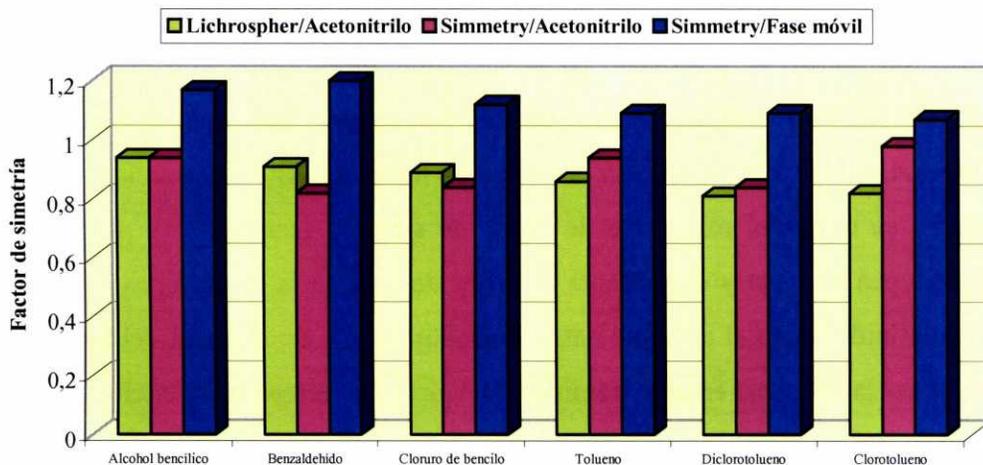


Figura VII-5. Influencia de la columna y la composición del disolvente de la muestra sobre la simetría de los picos. Columna Lichrospher y disolvente: acetonitrilo, columna Symmetry y disolvente: acetonitrilo y columna Symmetry y disolvente: fase móvil.

Finalmente la separación de los seis compuestos queda como se muestra en la figura VII-6.

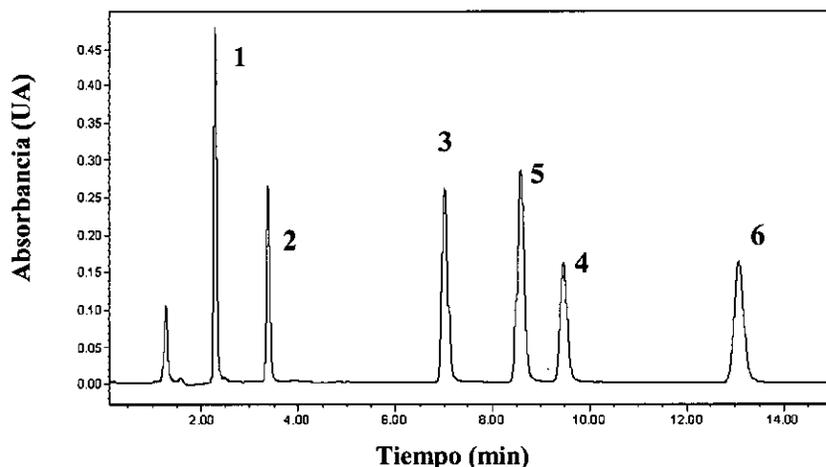


Figura VII-6. Cromatogramas de la separación de los seis alquilbencenos estudiados con columna Symmetry[®] y precolumna en el modo de elución isocrática B descrito en el texto. 1. Alcohol bencílico, 2. Benzaldehído, 3. Cloruro de bencilo, 4. α,α -Diclorotolueno, 5. Tolueno y 6. Clorotolueno.

4.4. Condiciones finales de separación

Condiciones cromatográficas

Se optimizan dos condiciones de separación, en las primeras se emplea columna Lichrospher[®]-C₁₈, con eluyente compuesto por 15% de fase acuosa y 85% de acetonitrilo (*condiciones isocráticas A*) y en las segundas columna Symmetry[®]- C₁₈ y fase móvil, 45% de fase acuosa y 55% de acetonitrilo (*condiciones isocráticas B*).

Ambas tienen en común el eluyente acuoso que contiene un 0,15% de TEA y ajustado a pH 7 con ácido fosfórico; la detección se lleva a cabo en el máximo de absorción de todos los compuestos encontrándose estos valores en el rango entre 190-202 nm; el flujo es de 1 mL min^{-1} y el volumen inyectado en columna es de 20 μL .

5. APLICACIÓN A MUESTRAS DE CLORURO DE BENCILO

Las condiciones de separación optimizadas con patrones se aplican a una de las matrices de interés, el agente cuaternizante de los cuaternarios estudiados en esta Tesis, el cloruro de bencilo. Los distintos proveedores comerciales existentes en el mercado ofrecen especificaciones en las que la concentración y/o la naturaleza de las impurezas pueden presentar variantes relacionadas con el proceso de síntesis, la efectividad de éste o las exigencias de calidad del proveedor.

De este modo, las impurezas facilitadas por las fuentes comerciales y determinadas mediante métodos de cromatografía de gases son el cloruro de benzal o α,α -diclorotolueno con un contenido máximo que oscila según el proveedor entre $<0,1\%$ y $0,25\%$ o clorotolueno entre un $0,25-0,3\%$ y tolueno un $0,01\%$. Otra información de tipo analítico aportada en el cloruro de bencilo técnico es la presencia de un estabilizante que puede ser dimetilformamida (sobre $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) o caprolactama ($0,1\%$).

De las dos condiciones en régimen isocrático conseguidas para la separación de los seis patrones, se descartan las que utilizan un 85% de acetonitrilo (*elución isocrática A*) puesto que los valores de selectividad para el cloruro de bencilo y el α,α -diclorotolueno y entre el benzaldehído y el cloruro de bencilo son más bajos

que los obtenidos para un 45% de acetonitrilo (*elución isocrática B*) (tabla VII-3) e insuficientes cuando el cloruro de bencilo es mayoritario.

Se verifica la capacidad de la elución isocrática B con muestras de cloruro de bencilo de distintos orígenes, siendo posible separar y detectar α,α -diclorotolueno, clorotolueno y benzaldehído. Se produce una disminución de resolución, provocada por el aumento del ancho del pico del cloruro de bencilo, para el compuesto que lo precede en la elución, el benzaldehído, con valores de resolución de 10,5 que no causan problemas en la separación.

Se verifica también que el método es capaz de separar un isómero del α,α -diclorotolueno, el cloruro de 2-clorobencilo obteniéndose un factor de capacidad de 6,9, es decir que eluiría entre el α,α -diclorotolueno y el 2-clorotolueno.

En la bibliografía reciente se describen nuevas rutas de síntesis de cloruro de bencilo por lo que la composición o concentración de los residuales presentes podría sufrir cambios. TANG y col. (1997) proponen una modificación de la síntesis clásica de cloración del tolueno usando un catalizador, lo que evita la cloración térmica y la fotocloración. BUYSCH y col. (1998) lo sintetizan en ausencia de catalizador mediante hidrólisis de dibenciléter con una disolución acuosa de ácido clorhídrico (figura VII-7).

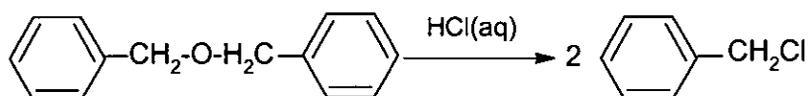


Figura VII-7. Reacción de formación de cloruro de bencilo a partir de dibenciléter.

Se comprueba si el modo de separación adoptado podría determinar el dibenciléter en el caso de que el cloruro de bencilo técnico por su origen sintético

lo contuviese. Para ello con un patrón de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de dibenciléter se verifica que en estas condiciones el factor de capacidad es de 11,2, es decir, que eluye después del clorotolueno sin alargar demasiado el tiempo de análisis.

A una muestra de cloruro de bencilo, se le adiciona una concentración de dibenciléter que representarían sobre $300\mu\text{g mL}^{-1}$, confirmando que el factor de selectividad, de 1,2, con respecto a la última impureza en eluir es suficiente para afirmar que el método tiene capacidad para detectar otro posible residual como el dibenciléter (figura VII-8).

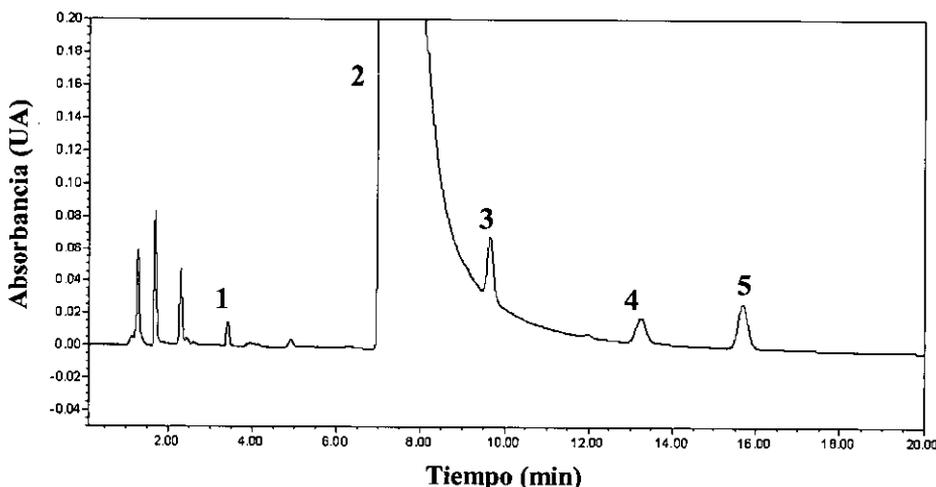


Figura VII-8. Cromatograma de cloruro de bencilo técnico n° identificación:1475. 1. Benzaldehído, 2. Cloruro de bencilo, 3. α,α -Diclorotolueno, 4. Clorotolueno y 5. Dibenciléter.

5.1. Análisis cualitativo y cuantitativo

La cuantificación en cloruro de bencilo se realiza en el máximo de absorción de cada uno de los compuestos entre 190-202nm, en el rango de concentraciones entre $0,1-10\mu\text{g mL}^{-1}$, estableciéndose como criterio de integración en ambos

casos, el que asegura la pureza espectral de los picos. Inicialmente la señal del cromatograma se recoge el intervalo entre 190-400 nm, se verifica la pureza de pico y se realiza la identificación espectral frente a la biblioteca que contiene los espectros de los patrones. Es al procesar los datos para el análisis cuantitativo, cuando se trabaja en el intervalo de los máximos de absorción.

La linealidad para cada uno de los seis compuestos se halla correlacionando la altura del pico con la concentración en el intervalo de entre 0,1 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (tabla VII-4). Cada una de las rectas se construye con cinco niveles de concentración y tres repeticiones por inyección, con disoluciones de patrones que contienen para cada nivel los seis compuestos. Las ecuaciones calculadas por regresión de mínimos cuadrados con sus coeficientes de correlación se recogen en la tabla VII-4. Asimismo, como en capítulos anteriores, los límites de detección y cuantificación se calculan según MILLER y MILLER, 1988. Los límites de detección para todos los compuestos son menores de 40 ng mL^{-1} .

Tabla VII-4. Ecuación de linealidad, coeficiente de correlación, límites de detección y de cuantificación ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para los cinco compuestos estudiados.

Compuesto	$y = a + bx$	r	LD	LC
Benzaldehído	$a=12550; b=38383$	0,9987	0,034	0,110
Tolueno	$a=7861; b=48865$	0,9993	0,011	0,036
Diclorotolueno	$a=8320; b=24047$	0,9975	0,028	0,094
Clorotolueno	$a=661; b=30297$	0,9998	0,018	0,061

Una muestra de cloruro de bencilo que contiene como impurezas: benzaldehído, α,α -diclorotolueno y clorotolueno, se inyecta 10 veces consecutivas

para estudiar la precisión de cada uno de los compuestos a las concentraciones habituales en la matriz de cloruro de bencilo (tabla VII-5).

Tabla VII-5. Precisión de tres de los compuestos estudiados a las concentraciones habituales en matriz de cloruro de bencilo.

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%)
Benzaldehído	0,3	2,9
Diclorotolueno	1,2	1,4
Clorotolueno	0,6	1,0

Aunque disoluciones patrón que contenían simultáneamente alcohol bencílico y cloruro de bencilo disueltas en la fase móvil no presentaron inestabilidad durante 24 h, se observa que cuando se disuelve el cloruro de bencilo a la concentración de cuantificación $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$, el área del alcohol bencílico aumenta seis veces el valor inicial en cuatro horas y media; posiblemente debido a la hidrólisis del cloruro de bencilo en presencia de una base, la amina de la fase móvil TEA. Sería necesario pues para la detección y cuantificación del alcohol bencílico, que la disolución de la muestra se hiciera en acetonitrilo ya que este compuesto no precisaba de mejora en su resolución.

5.2. Análisis de muestras comerciales

Se analizan muestras de cloruro de bencilo técnico de distintas fuentes comerciales y aquella a partir de la que se habían sintetizado BAK en el laboratorio (nº identificación = 0098). En la figura VII-9 se pueden observar los cromatogramas a modo de ejemplo. Los valores obtenidos, así como el coeficiente de variación para tres inyecciones se indican en la tabla VII-6.

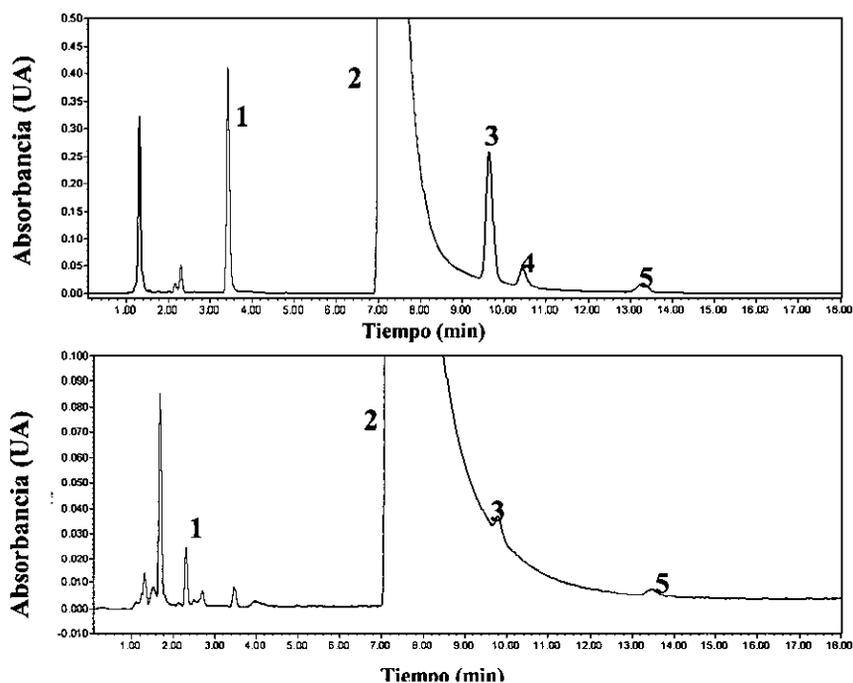


Figura VII-9. Cromatograma de cloruro de bencilo n° identificación: 0098 y 2017. 1. Benzaldehído, 2. Cloruro de bencilo, 3. α,α -Diclorotolueno, 4. Pico no identificado y 5. Clorotolueno.

Tabla VII-6. Concentración de impurezas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) y coeficientes de variación (%) en muestras de cloruro de bencilo.

N° identificación	Benzaldehído	Tolueno	Diclorotolueno	Clorotolueno
2017	54,1 (12,1%)	n.d.	68,2 (2,1%)	n. i.
2097	50,1 (7,8%)	n.d.	64,8 (11,7%)	n.p.
2164	919 (0,65%)	n.d.	658 (0,72%)	n.p.
0098	3477 (0,45%)	n.d.	3163 (0,37%)	n.i
1475	110 (3,7%)	n.d.	401 (0,6%)	n.p.

n.d.= no detectado, n.i.= no identificado por la biblioteca de espectros, n.p.= no pasa criterio de pureza.

El análisis del tipo y cantidad de impurezas encontradas en las muestras chequeadas indica que el tolueno no se detecta y dos de las posibles impurezas: el benzaldehído y el α,α -diclorotolueno aparecen desde concentraciones inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta valores de un 0,3%. En dos de las muestras (2017 y 2097) presentan valores cercanos al límite de cuantificación, por lo que los coeficientes de variación son altos.

Con respecto al 2-clorotolueno, todas las muestras presentan un pico con un factor de capacidad idéntico a éste, sin embargo aplicado el análisis espectral se obtienen resultados dispares. El pico de la muestra 2017 es espectralmente homogéneo pero no es identificado como clorotolueno al compararlo con el patrón existente en la biblioteca. En otras tres muestras (1475, 2097 y 2164) el pico no es espectralmente homogéneo aunque presenta semejanzas con el clorotolueno. Por último en la muestra 0098, el pico pasa el criterio de pureza con una integración parcial que elimine el frente del pico pero no pasa la comparativa con la biblioteca. Los factores de capacidad de otros isómeros del monoclorotolueno podrían ser revisados en posteriores trabajos para comprobar si estarían coeluyendo con el 2-clorotolueno.

Una impureza no identificada que eluye entre el α,α -diclorotolueno y su isómero el cloruro de 2-clorobencilo con factor de capacidad 7,1 es detectada en dos de las muestras (0098 y 2164). Su espectro de absorción en el ultravioleta no presenta similitudes con él de los alquilbencenos sino que al poseer un segundo máximo sobre 240 nm es más semejante al benzaldehído.

6. ANÁLISIS DE IMPUREZAS EN MUESTRAS DE BAK

En el capítulo IV, se consiguieron separar los residuales procedentes del agente cuaternizante: alcohol bencílico, benzaldehído, cloruro de bencilo y algunas impurezas no identificadas conjuntamente con los homólogos del cloruro de benzalconio. También, el análisis de los espectros de algunas de las impurezas detectadas habían mostrado fuertes semejanzas con los del tolueno y cloruro de bencilo. Así en este último capítulo se intentará analizar los restantes residuales del cloruro de bencilo: tolueno, cloro y α,α -diclorotolueno en el BAK.

Se eligen las condiciones isocráticas *A*, con columna Symmetry[®] ya que podrían ser suficientes para matrices en las cuales el nivel de todos los compuestos fuera similar. En una muestra de cloruro de benzalconio al 50% en agua disuelta en fase móvil se comprueba que los seis compuestos residuales son separados de las cadenas homologas. Sin embargo para eluir las cadenas alquílicas C_{12} ($k=6,1$) y C_{14} ($k=18,2$) no son suficientes 30 min, lo que conduce a tiempos de análisis demasiado elevados. El otro modo de elución *B* supondría aumentar todavía más el tiempo de análisis.

En definitiva, en fase estacionaria octadecilsílice para los cuaternarios se consiguen resultados mejorables como la separación en BAK con tiempos largos de análisis. Otras variables cromatográficas como el pH o la concentración de TEA quedarían pendientes de desarrollar en posteriores estudios.

6.1. Separación cromatográfica con fase estacionaria Lichrosorb[®]-CN

Luego de examinar las posibilidades de la fase octadecilsílice parece obligado comprobar si los métodos propuestos en el capítulo IV, que usaban una fase estacionaria cianopropilsílice (Lichrosorb[®]-CN) son extensivos para las otras

tres impurezas presentes en el cloruro de bencilo: tolueno, cloro y diclorotolueno. Igualmente, con este nuevo objetivo sería interesante mantener los logros conseguidos: separación y cuantificación del agente cuaternizante, del alcohol bencílico, benzaldehído y BAK. Se prueba el modo de elución isocrática para el BAK en la separación de tolueno, cloro- y diclorotolueno pese a su imposibilidad para separar alguna de las impurezas no identificadas del cloruro de bencilo. Se incluye también el cloruro de bencilo para comprobar si interfiere con alguna de las impurezas. El resultado es un solapamiento al menos del cloruro de bencilo con el α,α -diclorotolueno. Sin embargo, la separación en modo de elución en gradiente es efectiva para los cuatro compuestos con los factores de capacidad y selectividades que se indican en la tabla VII-7. Los que eluyen después del cloruro de bencilo son, en este orden el cloro- y diclorotolueno con una selectividad pequeña pero suficiente si todos se encuentran a concentraciones de residuales.

Tabla VII-7. Factor de capacidad (k) y selectividad (α) de tolueno, cloruro de bencilo, clorotolueno y α,α -diclorotolueno en Lichrosorb[®]-CN y elución en gradiente.

Factor de capacidad (k)		Selectividad (α)	
Tolueno	1,7	Cloruro de bencilo/Tolueno	1,1
Cloruro de bencilo	1,8	Clorotolueno/Cloruro de bencilo	1,1
Clorotolueno	2,0	Diclorotolueno/Clorotolueno	1,1
Diclorotolueno	2,2		

6.2. Análisis cualitativo y cuantitativo

Al igual que para la optimización con columna octadecilsílice, en la cianopropilsílice se hace uso del análisis espectral y se crea una biblioteca con los espectros de los compuestos a dos niveles de concentración, alrededor de 8-10 μg

mL^{-1} y $1\mu\text{g mL}^{-1}$ (figura VII-10). El espectro de las disoluciones más diluidas, sobre todo en el intervalo 190-210 nm, con una señal de absorbancia menor de 0,005 presenta un ruido alto lo que dificulta la identificación espectral. Para corregir y minimizar el ruido se aplica el filtro de SAVITSKY Y GOLAY (1964) de manera que la comparativa de los espectros no se vea impedida por la disparidad con la señal debida al ruido (figura VII-11).

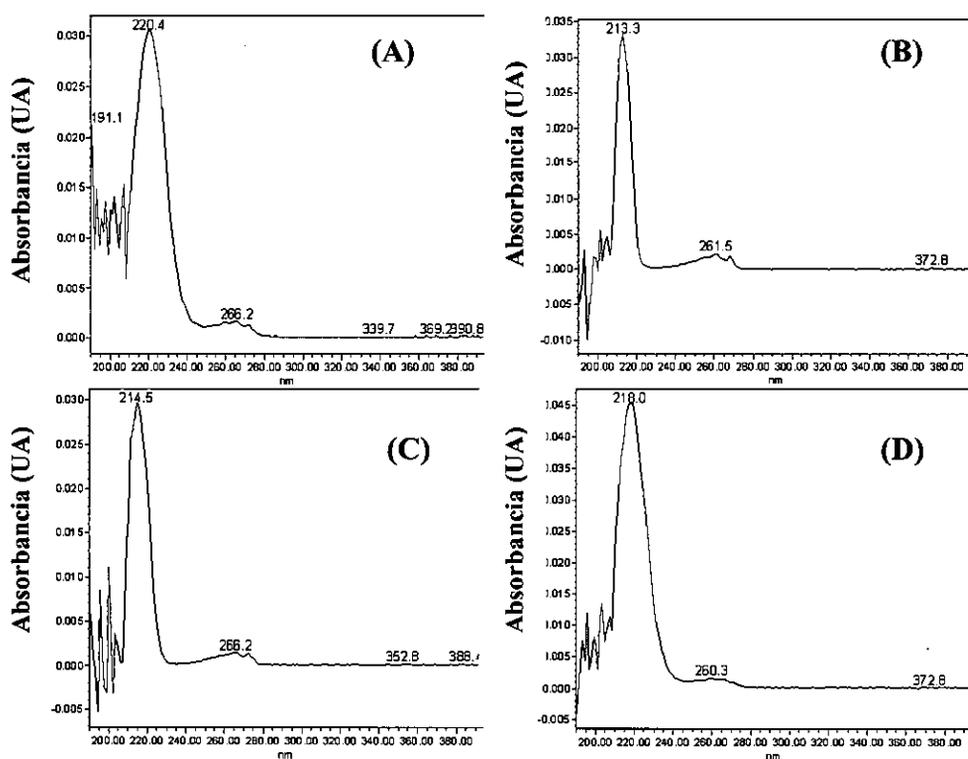


Figura VII-10. Espectros de absorción entre 190-400 nm: (A) α,α -Diclorotolueno, (B) Tolueno, (C) Clorotolueno, (D) Cloruro de bencilo. Elución en gradiente y columna Lichrosorb[®]-CN.

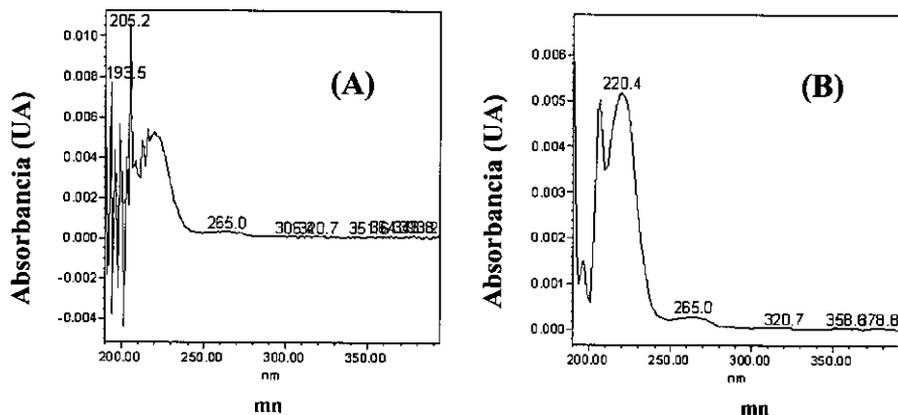


Figura VII-11. Efecto del filtro de Savitsky-Golay sobre el ruido en el espectro de absorción (190-400 nm) del α,α -diclorotolueno a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en condiciones de elución en gradiente y columna Lichrosorb[®]-CN. (A) Sin filtro y (B) Con filtro.

El rango de linealidad para el tolueno, clorotolueno y α,α -diclorotolueno fue establecido por ajuste por mínimos cuadrados entre las concentraciones de los compuestos en el rango entre $0,5\text{-}10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y la altura del pico a la longitud de onda del método, 220 nm, para cinco niveles de concentración y dos repeticiones para cada nivel (tabla VII-8). Para la longitud de onda de trabajo, 220nm, es el tolueno el compuesto que presenta una pendiente más baja y por tanto una menor sensibilidad.

Tabla VII-8. Ecuación de linealidad, coeficiente de correlación para los cuatro compuestos estudiados en columna -CN y detección a 220 nm.

Compuesto	$y = a + bx$	r
Cloruro de bencilo	$a=-340, b=5149$	0,9996
Tolueno	$a=-53, b=881$	0,9973
Diclorotolueno	$a=-568, b=3650,1$	0,9995
Clorotolueno	$a=42, b=2970$	0,9985

6.3. Identificación y cuantificación de impurezas en BAK

Para el cloruro de benzalconio, se busca la posible presencia de tolueno, clorotolueno y α,α -diclorotolueno en aquellas muestras procedentes de las síntesis en las que se estudiaron las condiciones de reacción para la eliminación del cloruro de bencilo residual (capítulo IV). En el seguimiento de la cinética se habían observado al menos dos impurezas no identificadas que eluían después del cloruro de bencilo con un comportamiento que se podría resumir en los siguientes puntos:

- En las síntesis acuosas con exceso de alquildimetilamina, una de las impurezas a tiempo de retención 4 minutos ($k=1,86$) disminuye y desaparece paralelamente con el cloruro de bencilo, mientras la otra ($t_r=4,3-5$ y $k=2,2$) aparece al final de la cinética (véase Pág. 176).
- La cantidad detectada de la primera impureza no identificada parecía estar asociada al uso de distintos lotes de cloruro de bencilo (véase Pág. 176).
- En medio alcohólico, las impurezas no identificadas permanecen constantes durante la cinética y por tanto no se eliminan en el producto final (véase Pág. 185).

Se podría pensar que, si existe una correlación entre el nivel de impurezas y el cloruro de bencilo de distintos lotes de fabricación o de proveedores, se trata de residuales que aporta el cloruro de bencilo. Si eluyen después de éste, los posibles candidatos de los compuestos estudiados serán el clorotolueno o α,α -diclorotolueno y las muestras donde aún se podrán identificar serán las

correspondientes a las síntesis llevadas a cabo en medio alcohólico. Así se chequean las seis muestras que se indican en la tabla VII-9 .

Tabla VII-9. Análisis de impurezas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) en muestras de BAK sintetizado en el laboratorio.

Muestra	Cloruro de bencilo	Tolueno	Clorotolueno	Diclorotolueno
BAK-7	n.d.	n.d.	n.d.	306 (0,51%)
BAK-9	n.d.	n.d.	n.d.	91 (1,21%)
BAK-10	n.d.	n.d.	n.d.	81 (1,71%)
BAK-12	n.d.	n.d.	n.d.	210 (0,24%)
BAK-13	n.d.	n.d.	n.d.	202 (3,3%)
BAK-14	n.d.	n.d.	n.d.	267 (0,89%)

Entre paréntesis se indica el Cv%, n.d.= no detectado.

La identificación de los compuestos se efectuó, en principio por el tiempo de retención, después se verificó la homogeneidad de pico para comprobar que éste era producido por la elución de un único compuesto. Por último, se comparó la forma del espectro en el intervalo 190-400nm con los existentes en la biblioteca mediante un parámetro cuantitativo del software del equipo de HPLC, el ángulo de coincidencia (*match angle*) con una escala de 0 a 90 grados. Para la primera impureza que eluía sobre 4 min y en todas las muestras de la tabla, se obtuvo semejanza a un espectro del α,α -diclorotolueno con valores inferiores a 5 grados, lo que indica buena equivalencia. Además el umbral (*match threshold*) o el valor más alto que puede ser atribuido solamente al ruido y/o la contribución del disolvente y no a las diferencias espectrales es mayor que el *match angle*, lo que indica que pasa el criterio de igualdad (figura VII-10). La segunda impureza que se detecta en algunas muestras no ha podido ser identificada.

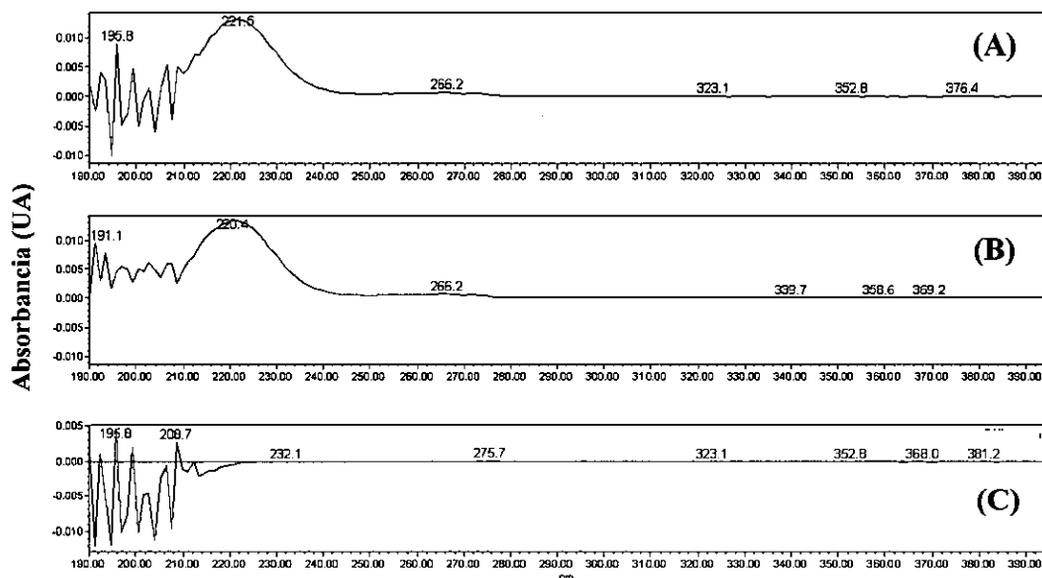


Figura VI-10. Comparación entre el espectro de α,α -diclorotolueno en BAK-14 y el existente en la biblioteca. (A) Espectro del componente de la muestra, (B) Espectro de absorción de un α,α -diclorotolueno patrón (C) Diferencia entre ambos espectros.

De las seis muestras analizadas dos de ellas (BAK-7 y BAK-10) contienen un 50% de cloruro de benzalconio y las restantes un 80%. Se han empleado para las síntesis dos proveedores (A y B) de cloruro de bencilo y para uno de ellos, B también muestras de lotes de fabricación diferentes. En las síntesis de BAK-9 y 10 se usó el cloruro de bencilo del proveedor A y los valores finales de α,α -diclorotolueno están entre 80 y 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. EL cloruro de benzalconio identificado como BAK-7 fue sintetizado a partir del cloruro de bencilo 0098 del proveedor B, con un contenido en α,α -diclorotolueno muy alto, sobre 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (figura VII-11). Aunque esta concentración fue medida *a posteriori*, cuando

había transcurrido más de un año de su uso en las síntesis y pudo sufrir alguna degradación.

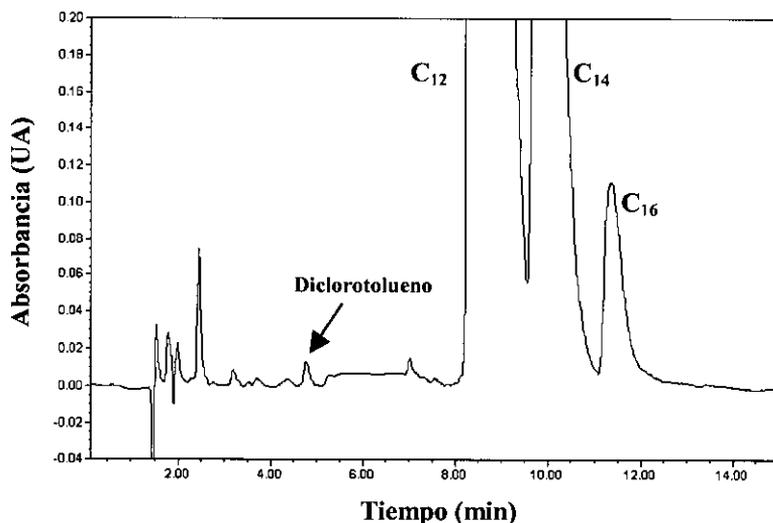


Figura VII-11. Cromatograma de cloruro de benzalconio al 80% en IPA.

¿Cómo se justificaría la distinta evolución del α,α -diclorotolueno durante la síntesis que transcurren en disolución en agua con respecto a las que tienen lugar en IPA? A la luz de las reacciones descritas en la figura VII-1, es factible que el benzaldehído se forme por la hidrólisis del α,α -diclorotolueno en disoluciones acuosas.

Durante las síntesis en agua, se había observado un aumento del benzaldehído en el transcurso de la cinética y una disminución de la impureza no identificada; en IPA el benzaldehído y la impureza, seguramente α,α -diclorotolueno permanecen constantes. Las fuentes por tanto de benzaldehído en BAK pueden encontrarse bien en el benzaldehído residual existente en el cloruro de bencilo o bien en el que se forme por hidrólisis del α,α -diclorotolueno.

Además la presencia de este compuesto tóxico en el cloruro de bencilo sería más crítica en las síntesis alcohólicas que en las acuosas ya que en éstas se degradaría a un producto más inocuo como el benzaldehído. Por esta razón, mezclas de agua y alcohol parecen lo más conveniente no sólo para acelerar la eliminación del cloruro de bencilo si no también para degradar el α,α -diclorotolueno. Aunque se podrían revisar las condiciones en la primera etapa de reacción del BAK (formación del cuaternario) que permitieran reaccionar al α,α -diclorotolueno.

Pero en principio, la primera medida para la eliminación del α,α -diclorotolueno en disoluciones alcohólicas será la selección de un cloruro de bencilo técnico que contuviera esta impureza en la menor concentración posible.

7. CONCLUSIONES

- El método creado permite separar y cuantificar por HPLC seis compuestos bencílicos estructuralmente muy similares: alcohol bencílico, benzaldehído, cloruro de bencilo, tolueno, α,α -diclorotolueno y 2-clorotolueno con al menos dos modos de elución isocrática.
- La optimización realizada con fase octadecilsílice permite concluir que las características de la columna Symmetry son más adecuadas en esta separación que las de la columna Lichrospher C₁₈.
- Uno de los modos de elución isocrática (B) consigue la determinación de impurezas en cloruro de bencilo técnico. Además de los compuestos optimizados podrían separarse dibenciléter y cloruro de 2-clorobencilo.
- El modo de elución en gradiente con una columna ciano elaborado para la separación simultánea de cloruro de benzalconio, cloruro de bencilo, alcohol

bencílico, benzaldehído puede hacerse extensivo a otras posibles impurezas procedentes del agente cuaternizante como el tolueno, cloro y α,α -diclorotolueno.

- En muestras comerciales de cloruro de bencilo técnico se detectó benzaldehído y α,α -diclorotolueno. Las concentraciones encontradas pueden estar, en función de la procedencia comercial del cloruro de bencilo, desde partes por millón hasta tanto por cien.
- Se identificó α,α -diclorotolueno en muestras de cloruro de benzalconio al 50% y al 80% sintetizadas en el laboratorio usando como disolvente alcohol isopropílico. Sin embargo no se detectó esta impureza en cloruro de benzalconio sintetizado en agua y con cloruro de bencilo procedente de la misma fuente comercial. Posiblemente debido a su hidrólisis a benzaldehído durante la síntesis.

8. BIBLIOGRAFÍA

ABIDI, L. (1985). Retention behaviour of long chain quaternary ammonium homologues and related nitroso-alkylamines. *J. Chromatogr.* **324**, 209.

AL-HAJ, M.A.; KALISZAN, R.; BUSZEWSKI, B. (2001). Quantitative structure-retention relationships with model analytes as a means of an objective evaluation of chromatographic columns. *J. Chromatogr. Sci.* **39**, 29.

ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; De JONGH, D.C.; JOHNSON; C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. *Química Orgánica*. Ed. Reverté Barcelona, 1979.

ANNA, J.; PLIEGER, E.; REUPERT, R. (1984). Identification and determination of organic pollutants in sewage sludges of various origins. *Gewaessershultz, Wasser, Abwasser* **65**, 315.

BABINA, Y.K.; KVARTAL'NOVA, A.N. (1978). Gas-chromatographic analysis of benzyl chloride. *Zavod. Lab.* **44** (4), 412.

BABINA, Y.K.; KVARTAL'NOVA, A.N. (1979). Gas-chromatographic determination of impurities in benzaldehyde. *Khim. Prom-st. Ser. Metody Anal. Kontrolya Kach. Prod. Khim. Prom-sti* **3**, 1.

BAGLEY, D.M.; GARDNER, J.R.; HOLLAND, G.; LEWIS, R.W.; VRIJHOF, H.; WALTER, A.P. (1999). Eye irritation: updated reference chemicals data bank. *Toxicol. in vitro* **13** (3), 505.

BLOCK, J. Y LEVINE, H. (1978). Rapid and sensitive high-pressure liquid chromatography technique for detecting impurities in benzaldehyde USP. *J. Chromatogr.* **166** (1), 313.

BIJ, K.E.; HORVATH, C.; MELANDER, W.R.; NAHUM, A. (1981). Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. II Irregular retention behaviour and effect of silanol masking. *J. Chromatogr.* **203**, 65.

BUYSCH, H-J.; HOFFMANN, E-G.; JANSEN, U.; OOMS, P.; SCHENKE, B-U. (1998). *Preparation of benzyl chloride from dibenzyl ether using hydrochloric acid*. Patent N° 19703906, Kind A1, Date 19980806, Application N° DL 1997-19703906, Date 19970203.

CAREY, F.A. (1999). *Química Orgánica* Ed. McGRAW-HILL Madrid.

DING, W.; FRITZ, J.S. (1997). Separation of nonionic compounds by CE using of lauryl poly (oxiethylene) sulfate additive. *Anal. Chem.* **69**, 1593.

DUDEK, B.R.; SHORT, R.D.; BROWN, M.A.; ROLOFF, M.V. (1992). Structure-activity relationship of a series of sensory irritants. *J. Toxicol. Environ. Health* **37** (4), 511.

EUROPEAN CENTER FOR ECOTOXICOLOGY AND TOXICOLOGY OF CHEMICALS (ECETOC). (1998). Eye irritation. Reference chemicals data bank (second edition). *Tech. Rep.* **48** (2) 1.

FAN, S.; QIOU, D.; ZHENG, T. (2001). Determination of industrial 2-chlorobenzaldehyde by GC/MS. *Ranliao Gongye* **38** (2), 42.

FRIEGE, H.; BACHHAUSEN, P.; LEUCHS, W.; ALBERTI, J.; JONKE, B.; KLINKE, I.; REUPERT, R.; PLIEGER, E. (1989). Organic contaminants in sewage sludge. *Vom Wasser* **73**, 413.

FUKUDA, K.; MATSUSHITA, H.; SAKABE, H.; TAKEMOTO, K. (1981). Carcinogenicity of benzyl chloride, benzal chloride, benzotrichloride and benzoyl chloride in mice by skin application. *Gann* **72**, 655.

GALAZKA, S. (1983). *Separation of compounds contained in technical benzyl chloride and benzyl alcohol using gas chromatography*. Patent N° 117665, Kind B1, Date 19810831, Application N° PL 1978-210801, Date 19781107.

GÓMEZ- GOMAR, A.; GONZALEZ- AUBERT, M.M.; GARCÉS-TORRENTS, J.; COSTA- SEGARRA, J. (1990). Determination of benzalkonium chloride in aqueous ophthalmic preparations by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**, 871.

HAWLEY, G.G. (1985). *Diccionario de Química y productos químicos*. Ed. Omega, Barcelona.

HROMUL'AKOVA, H.; LEHOTAY, J. (1996). Determination of benzyl chloride, chlorobenzene, naphthalene and biphenyl in waste gas by HPLC. *Chem. Listy* **90** (12), 933.

KOKLOVA, V.S. (1986). Determination of monochlorotoluenes in water. *Gig. Sanit.* **2**, 53.

KROST, K.J.; PELLIZZARI, E.D.; WALBURN, S.G.; HUBBARD, S.A. (1982). Collection and analysis of hazardous organic emissions. *Anal. Chem.* **54**, 810.

LEHOTAY, J.; HROMUL'AKOVA, H. (1997). HPLC determination of trace levels of benzylchloride, chlorobenzene, naphthalene and biphenyl in environmental samples. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **20** (19), 2193.

MAEDA, T.; FUNAKI, K.; YANAGUCHI, Y.; ICHIOKA, K.; SUZUKI, K.; YAMAMOTO, N.; MORITA, M. (1998). On-site monitoring system for hazardous air pollutants using an adsorption-thermal desorption -capillary GC system equipped with a photoionization detector and an electrolytic conductivity detector. *J. High. Resol. Chromatogr.* **21**, 471.

McCLENNY, W.A.; PLEIL, J.D.; HOLDREN, M.E.; SMITH, R.N. (1984). Automated cryogenic preconcentration and gas chromatographic determination of volatile organic compounds in air. *Anal. Chem.* **56**, 2947.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. (1988). *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd ed. Ellis Horwood Limited, Chichester, England.

PELLIZZARI, E.E. (1982). Analysis of organic vapor emissions near industrial and chemical waste disposal sites. *Environ. Sci. Technol.* **16** (11), 781.

PIS'KO, G.T.; TOLSTOPYATOVA, G.V.; BELYANINA, T.V.; BORISOVA, E.V.; GUDZ, O.V.; ZABARA, A.M.; ZEL'MAN, S.M.; KOZACHUK, S.Y. (1981).

Substitution of maximum permissible concentrations of o- and p-chlorotoluenes in reservoir water. *Gig. Sanit.* **2**, 67.

PYO, D.; KIM, H.; PARK, J.H. (1998). Modifier effects in open tubular capillary column supercritical fluid chromatography. Retention mechanisms from linear solvation energy relationships. *J. Chromatogr.* **796**, 347.

RAMAKRISHNAN, R. y SUBRAMANIAN, N. (1975). Quantitative analysis of mixtures of toluene and its side-chain-chlorinated derivatives by gas chromatography. *J. Chromatogr.* **114** (1), 247.

RAO, G.K.; SUBBARAM, M.R. (1972). Quantitative determination of trace amounts of benzylidene chloride in benzyl chloride by gas-liquid chromatography. *Indian J. Technol.* **10** (5), 203.

SAX, N.I. (1980). *Dangerous Properties of Industrial Materials*, sixth edition. Van Nostrand Reinhold Company, New York.

STADLER, J.C.; KENNEDY, G.L. (1997). Evaluation of the sensory irritation potential of volatile organic chemicals from carpets-alone and in combination. *Food Chem. Toxicol.* **34** (11/12) 1125.

SAVITSKY, A.A.; GOLAY, M.J.E. (1964). Smoothing and differentiation of data by Least-Squares Procedures. *Anal. Chem.* **36**, 1627.

SIN, D.W.-M.; WONG, Y.-C.; SHAM, W.-C.; WANG, D. (2001). Development of an analytical technique and stability evaluation of 143 C₃-C₁₂ volatile organic compounds in Summa canisters by gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* **126**, 310.

TANG, X.; SHI, G.; LIU, P. (1997). New catalytic synthesis of benzyl chloride. *Xiandaj Huagong* **17** (2), 23.

TOLSTOPYATOVA, G.V.; ZHOLDAHOVA, Z.I. (1980). Comparative hygienic characteristics of chloro derivatives of toluene as possible water pollutants. *Gig. Sanit.* **12**, 64.

WATERS Corporation. (1999). Chromatography columns and supplies catalog, USA.

WATERS Corporation (2001). Symmetry columns, Certificate of analysis USA.

WAWRZYNIAK, R.; WASIAK, W. (1999). Capillary complexation gas chromatography in analysis of halohydrocarbons. *Chromatographia* **49**, 147.

XUNTA DE GALICIA (2000). Límites de exposición profesional para axentes químicos 2000.

YASUO, K.; FUYIMOTO, S.; KATOH, M.; KIKUCHI, Y.; KADA, T. (1978). Mutagenicity of benzotriazole and related compounds. *Toxicol. Environ. Sci.*, **58** (2-3), 143.

ZENKEVICH, I.G. (1999). Mutual correlation between gas-chromatographic retention indices of organic compounds from different series. *J. Anal. Chem.* **54** (12), 1127.

CAPÍTULO VIII

Conclusiones generales

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES

1. Se analiza DMPA mediante derivatización química por HPLC con un método especialmente diseñado para el análisis de rutina en el control de procesos: es muy rápido comparativamente con los métodos cromatográficos, simple en el modo de operación, empleando reactivos baratos y sin toxicidad. Su aplicación a matrices de tensioactivos, las amidoaminas, permite un control de residuales amínicos en precursores de tensioactivos con un amplio uso en formulaciones comerciales.
2. Se elaboran dos métodos por HPLC para la determinación del agente cuaternizante residual y sus derivados en dos compuestos cuaternarios, BAK y TEBA. Para el primero de ellos se establecen las adaptaciones según el número o la naturaleza de otras impurezas existentes (modo de elución isocrática o en gradiente) y en el segundo se consigue el empleo prácticamente equivalente de tres tampones en la fase acuosa.
3. La aplicación de los métodos construidos a síntesis de laboratorio de los cuaternarios estudiados: BAK y TEBA proporciona información sobre las condiciones de eliminación de los residuales más tóxicos o la formación de subproductos en función de variables de la reacción como el disolvente, el catalizador y la concentración de cuaternario.
4. El análisis simultáneo de compuestos con propiedades cromatográficas diferentes, compuestos residuales apolares en matrices de cuaternarios muy polares como el TEBA exige la adopción de soluciones poco habituales como la explotación de las interacciones silanofílicas.
5. La electroforesis capilar se confirma, en la separación de la serie homóloga de cuaternarios tipo cloruro de benzalconio, como una técnica con resultados

comparables a la HPLC; con la ventaja añadida, sobre todo para el control de rutina, de tiempos de análisis notablemente más reducidos, además de límites de detección bajos. La separación conjunta de la serie homóloga de dos cuaternarios BAK y BAA, muy similares estructuralmente entre sí, indica que al igual que HPLC posee una buena versatilidad en el análisis de cuaternarios.

6. Se desarrolla un método por HPLC para la detección y cuantificación de cinco potenciales impurezas del agente cuaternizante (cloruro de bencilo) empleado en la formación de los cuaternarios estudiado, tales como: benzaldehído, clorotolueno, diclorotolueno, tolueno y dibenciléter.
7. Los compuestos residuales procedentes del cloruro de bencilo podrían estar presentes en los cuaternarios y por lo tanto precisar condiciones especiales de síntesis para su minimización. El método del BAK en gradiente tiene capacidad para separar residuales procedentes del cloruro de bencilo, tales como son el clorotolueno, diclorotolueno y tolueno.
8. Para un cloruro de bencilo con concentraciones altas de diclorotolueno, esta impureza solamente ha sido detectada en BAK sintetizado en el laboratorio con disolvente alcohólico. Así un primer paso a seguir para reducir o eliminar estos residuales de los cuaternarios, será elegir el cloruro de bencilo técnico con unas especificaciones que garanticen los niveles de concentración más bajos de subproductos.
9. La consecución de los fines propuestos para cada problema ha supuesto construir un planteamiento experimental que considerase aspectos teóricos tanto de las propiedades específicas de los compuestos analizados: formación de micelas, basicidad, reacciones de derivatización, como de los fundamentos de la técnica de separación empleada. Esto implica la revisión de variables

electrofóreticas (voltaje, temperatura, concentración del electrolito, longitud del capilar, naturaleza del modificador orgánico) o propias de la cromatografía líquida de la fase móvil (concentración del modificador orgánico, flujo, naturaleza y concentración del tampón, pH de la fase acuosa) y de la fase estacionaria (dimensiones, funcionalidad, características de relleno) y mecanismos de separación (basados en interacciones hidrofóbicas y silanofílicas).

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700759525



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA