Agraïments,

En primer lloc, al Dr. Quim Font (tutor) per la seva ajuda i paciència. També per la confiança dipositada en mi per realitzar un Treball Fi de Carrera.

En segon terme, per la paciència que han tingut amb mi: a la Maria Reyes (co-tutora), Toni Valerio i en especial a l'Anna Vázquez per la seva col·laboració durant aquests 7 mesos. També, a la resta de professors de l'Escola per la seva ajuda.

Per últim, a les empreses: Curtits Aqualata, S.A., Laboratorios Miret, S.A. per la cessió de TCMTB pur i Industrial Igualdina ,S.L per les nombroses mostres de pell cedides.

Moltes gràcies a tots!

Igualada, Setembre de 2004

INDEX

Pàgina

1.-Presentació, objectiu i resum..... 4

2.-Fonament teòric: Què es la cromatografia?..... 7

2.1.-Principi de la cromatografia..... 7

2.2.-Cromatografia de gasos..... 9

2.3.-Cromatografia líquida 9

2.3.1.-Cromatografia líquida d'alta resolució..... 10

2.4.-Conceptes cromatogràfics..... 11

2.4.1.-Parts del cromatograf..... 13

2.5.-Cromatografia de fase inversa lligada..... 15

2.6.-Els fungicides continguts en les pells..... 21

2.6.1.-TCMTB..... 21

2.6.1.-OPP..... 25

2.6.1.-PCMK 25

3.-El·laboració de rectes de calibratge..... 27

3.1.- Recta 2(thiocyanometilthio)benzotiazol (TCMTB)..... 30

3.2.- Recta OrtoFenilFenol (OPP)..... 33

3.3.- Recta ParaCloroMetaKresol (PCMK)..... 34

4.-Estudi del temps d'extracció en mostres de pell..... 37

4.1.-Mostres de pell crutida al Crom (WetBlue)..... 37

4.2.-Mostres de curtició vegetal..... 42

5.-Influència del pH en l'estabilitat del TCMTB..... 45

5.1.-Clorur de metilè no acidificat, extracció a 4 hores..... 46

5.2.-Clorur de metilè no acidificat, extracció a 6 hores..... 47

5.3.-Clorur de metilè acidificat, extracció a 6 hores..... 48

Pàgina

6.- Precisió de resultats..... 51

6.1.- Repetibilitat de la determinació cromatogràfica.....51

6.2.- Repetibilitat del mètode global..... 53

7.- Recuperació del mètode complert 55

7.1.-Quantificació de la mostra no fortificada.....56

7.2.-Quantificació i càlcul del fungicida contingut en la mostra comercial 30%.....56

7.3.-Fortificar les mostres de pell prèviament quantificades.....57

7.4.-Càlculs, analítica i fixar quin es el percentatge de recuperació.....58

8.- Aplicació del mètode..... 61

9.- Procediments Normalitzats de Treball (PNTs) 66

PNT HPLC101: "Determinació de TCMTB, OPP i PCMK en pells"..... 67

PNT HPLC102: "Determinació de TCMTB, OPP i PCMK en una solució comercial"..... 72

PNT HPLC003: "Elaboració de rectes de calibratge en el programa Empower"... 75

PNT HPLC004: "Elaboració de còpies de seguretat del programa Empower"..... 82

10.-Conclusions.....86

11.-Bibliografia.....88

1.- Presentació

En el marc global de la indústria química un dels sectors importants a casa nostra es el de l'adoberia. La indústria adobera, tot i estar en rescissió en els països més desenvolupats, és una potent i complexa indústria de transformació amb multitud de processos i productes de mes o menys impacte medi ambiental. Es per aquests motius que creiem important investigar per tal millorar o canviar processos, per aconseguir disminuir el seu impacte i permetre fer rentables les indústries ja instal·lades en els països mes desenvolupats ja que son aquests els que reben més pressions a nivell legislatiu ambiental.

En qualsevol pell de qualsevol animal que es vulgui donar sortida comercial, cal evitar l'atac de fongs per tal de mantenir les òptimes condicions físiques, mecàniques i estètiques. La via mes important que s'aplica per tal de conservar-les es l'addició de fungicides.

Desde els anys 30 els biocides més utilitzats en la indústria de la fusta, construcció, pintura i adobera era el pentaclorofenol o PCP. La seva problemàtica era l'elevada toxicitat envers les persones i la possible formació de dioxines al cremar residus. Aquesta va ser la causa de l'aparició a principis dels 90 d'una legislació europea ambiental que prohibia l'aplicació de PCP. Aquests motius van motivar investigacions sobre nous fungicides alternatius i menys perillosos. Després d'un seguit d'estudis, es van proposar el 2-(tiocianometiltio)benzotiazol (TCMTB), OrtoFenilFenol (OPP) i el p-Cloro-m-Cresol (PCMK), entre altres. Actualment aquests 3 son els mes comuns en l'adoberia, en especial el TCMTB que ha sigut el principal substitut del PCP[1]. El TCMTB es biodegradable, únicament és estable en medi àcid i es descompon de forma ràpida en els pHs comuns del medi aquàtic.

En aquest treball elaborarem un mètode que ens permeti analitzar i quantificar els fungicides mes comuns aplicats en la indústria adobera. Aquest mètode serà útil en múltiples vessants: controls de qualitat de les pells, controls de qualitat dels fungicides comercials que adquireixen les empreses, controls de procés d'aplicació de fungicida, també en casos de peritatge per poder demostrar de forma contrastable l'aplicació o no d'aquests, etc. A més, en un futur i en posteriors estudis pot ser útil per millorar l'eficiència dels fungicides ja que son productes d'elevat cost econòmic i potencialment contaminants en grans concentracions.

Objectiu

L'objectiu d'aquest treball es elaborar un ***mètode fiable i concloent*** per determinar els principals fungicides aplicats en les pells: **Ortofenilfenol** (OPP), **P-Cloro-m-cresol** (PCMK) i sobretot, **2-(tiocianometiltio)benzotiazol** (TCMTB). Així doncs, caldrà fixar quines son les òptimes condicions d'extracció i determinació d'aquesta darrera molècula.

Alhora com que l'anàlisi fiable d'aquests únicament es pot fer per cromatografia líquida també millorarem i crearem Procediments Normalitzats de Treball per a l'utilització del cromatògraf i del Software associat al cromatògraf (Empower).

Com que una part de l'estudi serà trobar quin es el percentatge de recuperació del mètode, haurem de crear un mètode d'anàlisi dels productes comercials concentrats de fungicides destinats a la indústria adobera.

Al no disposar d'un mètode oficial, s'haurà de fer una important recerca de la poca bibliografia existent en aquest camp. Així, caldrà fer recerca sobre com extreure el fungicida de la pell i com analitzar-la.

Els objectius concrets d'aquest treball són:

- crear rectes de calibratge fiables per a l'anàlisi dels biocides
- fixar variables (temps d'extracció, condicionament del extracte, ...)
- estudiar la repetitivitat i fiabilitat del mètode determinant la recuperació pel mètode de fortificació
- elaborar mètodes i redactar Procediments Normalitzats de Treball
- adquirir experiència i coneixements en la Cromatografia Líquida i els principals fungicides de les pells

Per últim, cal dir que aquest treball es una continuació d'un estudi realitzat al Febrer de 2004[*] on es va determinar la composició de la fase mòbil i les condicions de separació dels biocides en un cromatògraf líquid, per tant una part complexa de l'analítica ja ha estat realitzada amb garanties.

[*] "Implantació de noves aplicacions cromatografiques en el laboratori"; TFC de Anna Vazquez, Tutor:Quim Font; Febrer 2004

Resum

L'objectiu principal d'aquest Treball Fi de Carrera es la determinació quantitavia del TCMTB i semiquantitativa del OPP i PCMK. Donades les característiques del TCMTB, aquest només es pot analitzar (de forma fiable) per cromatografia líquida.

Els diferents punts de l'estudi són:

- Elaboració d'unes rectes de calibratge per la quantificació dels 3 biocides
- Estudi de les condicions òptimes d'extracció dels biocides continguts en les pells
- Influència del pH en l'estabilitat del TCMTB
- Estudi de precisió del mètode analític (HPLC)
- Estudi de precisió del mètode global
- Estudi de la recuperació del mètode complert pel mètode de fortificació
- Elaborar Procediments Normalitzats de Treball com:
    Determinar TCMTB en les pells
    Determinar fungicides d'una mostra comercial
    Altres PNTs relacionats amb Software del Cromatògraf.
- Comprovar els resultats obtinguts amb mostres de pell qualsevols per tal d'observar si hi han incidències.

Els resultats més destacables que hem obtingut són:

- Temps d'extracció de fungicides en la pell d'unes 6 hores en un Soxhlet
- El dissolvent d'extracció (diclormetà) ha d'estar acidificat amb àcid acètic glacial
- Al assecar l'extracte en el rotavapor s'ha d'arribar al punt just abans de sequedat
- En el cromatògraf, cal intercalar un blanc (fase mòbil) entre cada mostra.

Els resultats de la fiabilitat i reproducibilitat sobres mostres reals de l'anàlisi cromatogràfic i el mètode analític global han sigut d'una RSD ±0,45% i ±1,7% respectivament. La recuperació del mètode ha estat del 86% pel mètode de fortificació.

2.- *Fonament teòric:* Què es la Cromatografia?

L'origen de la paraula cromatografia es grec, prové de dos paraules: Kromatos (color) + graphos (escrit). Aquesta es una tècnica moderna iniciada a principis del segle XX a on Tsweet (botànic rus) va elaborar una tècnica anomenada "columna d'adsorció" on tenia una columna de vidre impregnada de material adsorbent per on fluian diferents substàncies de colors, aquestes quedaven adsorbides en diferents punts de la columna[2].

La cromatografia es pot definir com la ciència i art de separar els components dels materials. Aquest tipus de separació s'aconsegueix mitjançant una gran varietat de tècniques i les diferències moleculars en les que es basen les separacions son molt diverses. Per exemple, les molècules poden separar-se per les seves diferències de càrrega molecular, tamany molecular, massa molecular, polaritat d'enllaç, potencial redox, constants de ionització i a modificacions d'enllaços tals com la estructura dels isòmers o quiralitat[3].

2.1.- Principi de la cromatografia

Una separació cromatogràfica s'aconsegueix mitjançant la distribució dels components de una mescla entre la fase estacionària i la fase mòbil. La separació entre dues substàncies comença quan una es retinguda mes fortament per la fase estacionària que l'altre, que tendeix a desplaçar-se més ràpidament en la fase mòbil[4]. De forma gràfica seria:

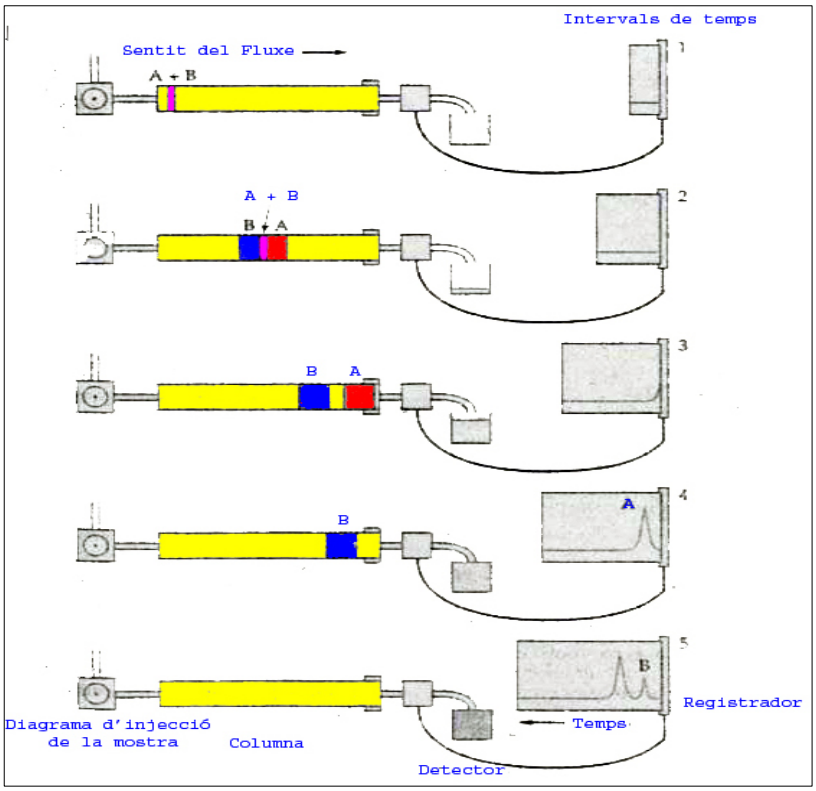


Figura A [5]

La separació cromatogràfica es fonamenta en l'equilibri d'atracció entre la fase mòbil i la fase estacionària. La separació es deguda a la diferent velocitat de cada analit al circular al llarg de fase estacionària en unes condicions determinades. Això doncs si suposem dos analits X i Y:

$$X_{\text{fase mòbil}} \leftrightarrows X_{\text{fase estacionària}};\ K_x = \frac{[X]f_{estacionària}}{[X]f_{mòbil}};$$

$$Y_{\text{fase mòbil}} \leftrightarrows Y_{\text{fase estacionària}};\ K_y = \frac{[Y]f_{estacionària}}{[Y]f_{mòbil}};$$

Si $K_x \neq K_y$ tenim separació ja que els analits sortiran a temps diferents. Com mes diferents siguin aquest quocients més separats estaran els pics entre ells.

Existeixen diferents tipus de mètodes cromatogràfics en funció de les característiques de l'analit:

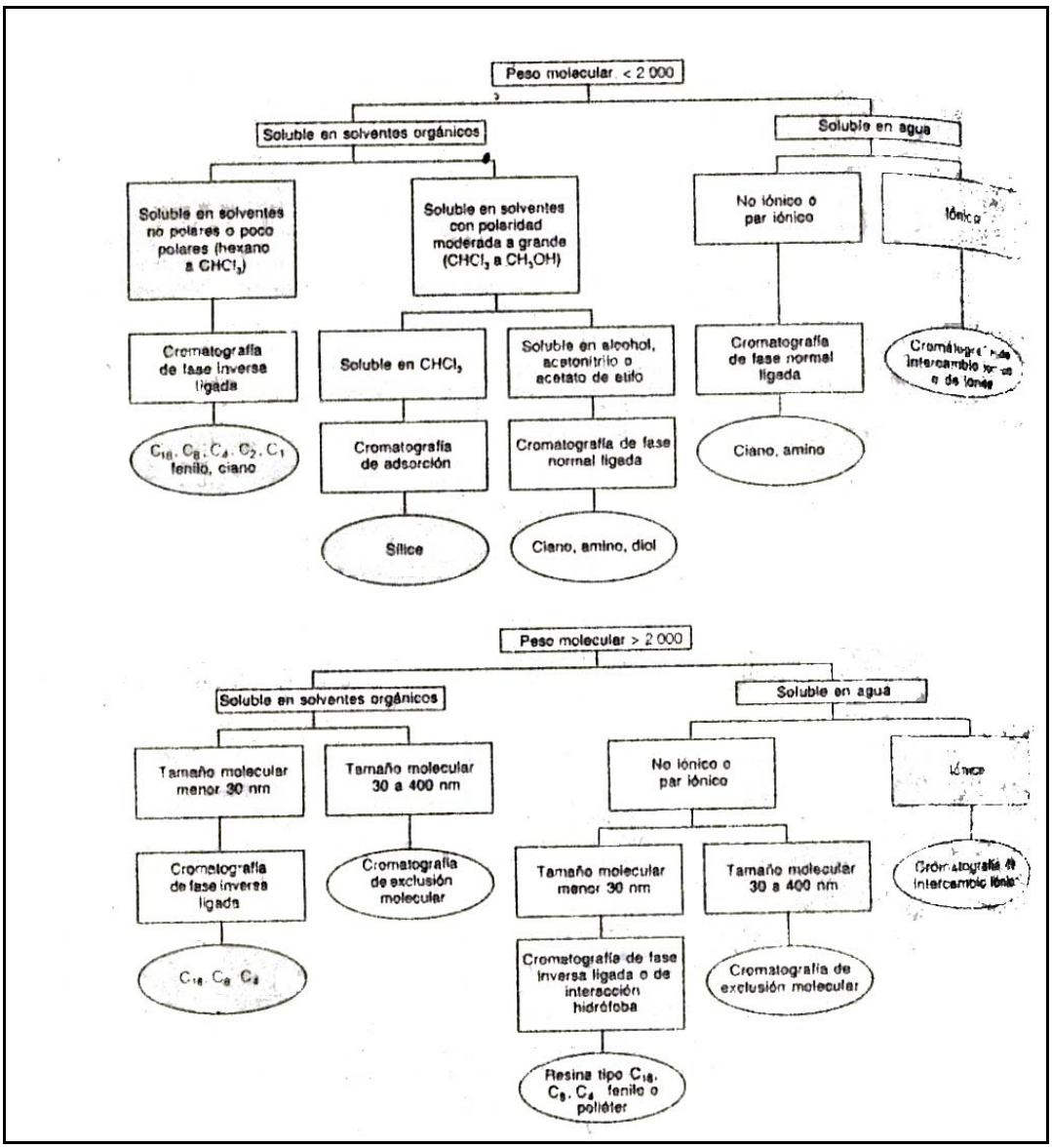


Figura B[6]

Les característiques dels diferents tipus de cromatografies que tenim en funció de la retenció de la fase estacionària són:

Tipus	*Fase mòbil*	*Fase estacionària*	*Retenció de la fase estacionaria.*
Partició	Líquid	Líquid	Absorció en un sòlid porós col·locat en el tub de la columna
Paper	Líquid	Líquid	Retingut en el porus d'un paper prim
Gel	Líquid	Líquid	Retingut en els intersticis d'un polímer sòlid.
Capa fina	Líquid	Líquid o sòlid	Sòlid finament triturat col·locat sobre una placa d vidre i el líquid pot absorbir-se sobre les partícules
Gas - líquid	Gas	Líquid	Adsorció sobre un sòlid porós col·locat en un tub o absorbit en la superfície inerta d'un tub capil·lar
Gas - sòlid	Gas	Sòlid	Retingut en el tub de la columna
Intercanvi iònic	Líquid	Sòlid	Resina d'intercanvi iònic fina retingut en el tub d'una columna.

Així doncs, podem dividir la cromatografia en dues branques principals: cromatografia líquida i de gasos. En aquest treball ens centrarem en la cromatografia líquida dóna't que es el pilar principal de l'estudi, tot i així farem una breu pinzellada de la cromatografia gasosa:

2.2.- Cromatografia de gasos

El fonament és el mateix en cromatografia de gasos que liquida, l'únic que canvia en la de gasos es l'estat de la fase mòbil que és gasós i la fase estacionària es un sòlid o líquid retingut en un sòlid de suport inert. Els seus principis de separació cromatogràfica son 2: La volatilitat de l'analit, com més volàtil sigui més ràpid viatjarà a través de la columna i l'afinitat amb la fase estacionària (polaritat), es a dir, si tenen polaritats molt similars tindran més afinitat amb la fase estacionària.

2.3.- Cromatografia líquida

Que es la cromatografia líquida?

La cromatografia líquida es una extensió de la distribució a contracorrent. Aquest es un procés d'extracció creat per L.C.Crag al 1949. L'objectiu de la distribució a contracorrent es separar dos o mes soluts d'una mescla mitjançant una distribució entre dues fases líquides. Una condició necessària es que els coeficients de distribució dels soluts han de ser diferents. A diferència de la cromatografia en fase gas, aquesta no depèn per res de la temperatura.

La cromatografia moderna ha evolucionat, actualment aquesta tècnica s'utilitza àmpliament en experiments de química i bioquímica on podem separar quantitats relativament grans (mil·ligram

de grams). La cromatografia líquida es fonamental en química, ja que la majoria dels compostos no son suficientment volàtils o no tenen suficient estabilitat tèrmica[7].

Que es un cromatògraf?

Es l'instrument utilitzat per a les separacions cromatogràfiques que, permet separar diferents analits i enregistrar les dades per tal de realitzar un tractament posterior. Si parlem d'un HPLC (High Liquid Performance Chromatography) bàsicament està format per una bomba, una càmara de premescla, un injector, una columna, i un detector ultravioleta, aquest està connectat a un ordinador per poder tractar les dades. Aquí tenim l'esquema d'un cromatògraf:

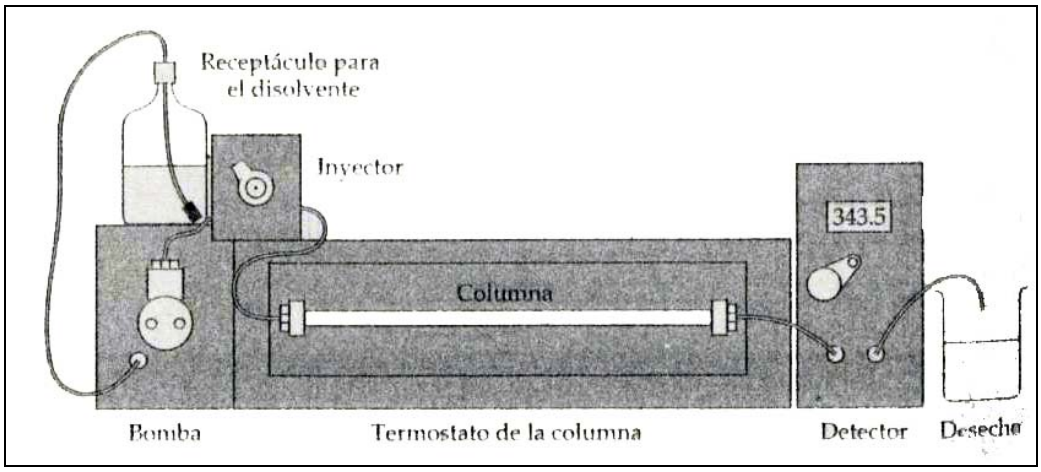


Figura C [8]

2.3.1- Cromatografia líquida d'alta resolució (CLAR o HPLC)

Generalment està format per la columna que es un tram curt d'acer amb un diàmetre de 2 a 5mm i una longitud de 10 a 30m. Altres components bàsics son un sistema d'entrega de dissolvent, una vàlvula de injecció per la mostra, un detector i computadora per mostrar i guardar les dades.

Cal dir que la resolució de la cromatografia de líquids millora al disminuir el tamany de partícula de la fase estacionària. Si el solut es pot difondre amb rapidesa entre la fase mòbil i la fase estacionaria, la altura equivalent de plat teòric (A.E.P.T.) disminueix, i la eficiència de un tram de columna augmenta. En aquest gràfic es mostra la major resolució que s'obté reduint el tamany de partícula de la fase estacionària de 10 a 5µm.

Un plat teòric es pot considerar com la longitud de la columna necessària per a que s'estableixi un equilibri imaginari. Es a dir, podem suposar que tot i que la cromatografia es un procés continu, la columna es divideix en N segments, on a cada un dels quals s'estableix un equilibri i per tant, les

columnes es comporten sovint com si tinguessin diferents números de plats per a diferents soluts en la mescla[9].

Els camps d'aplicació de la Cromatografia Líquida d'Alta Resolució són molt variats:

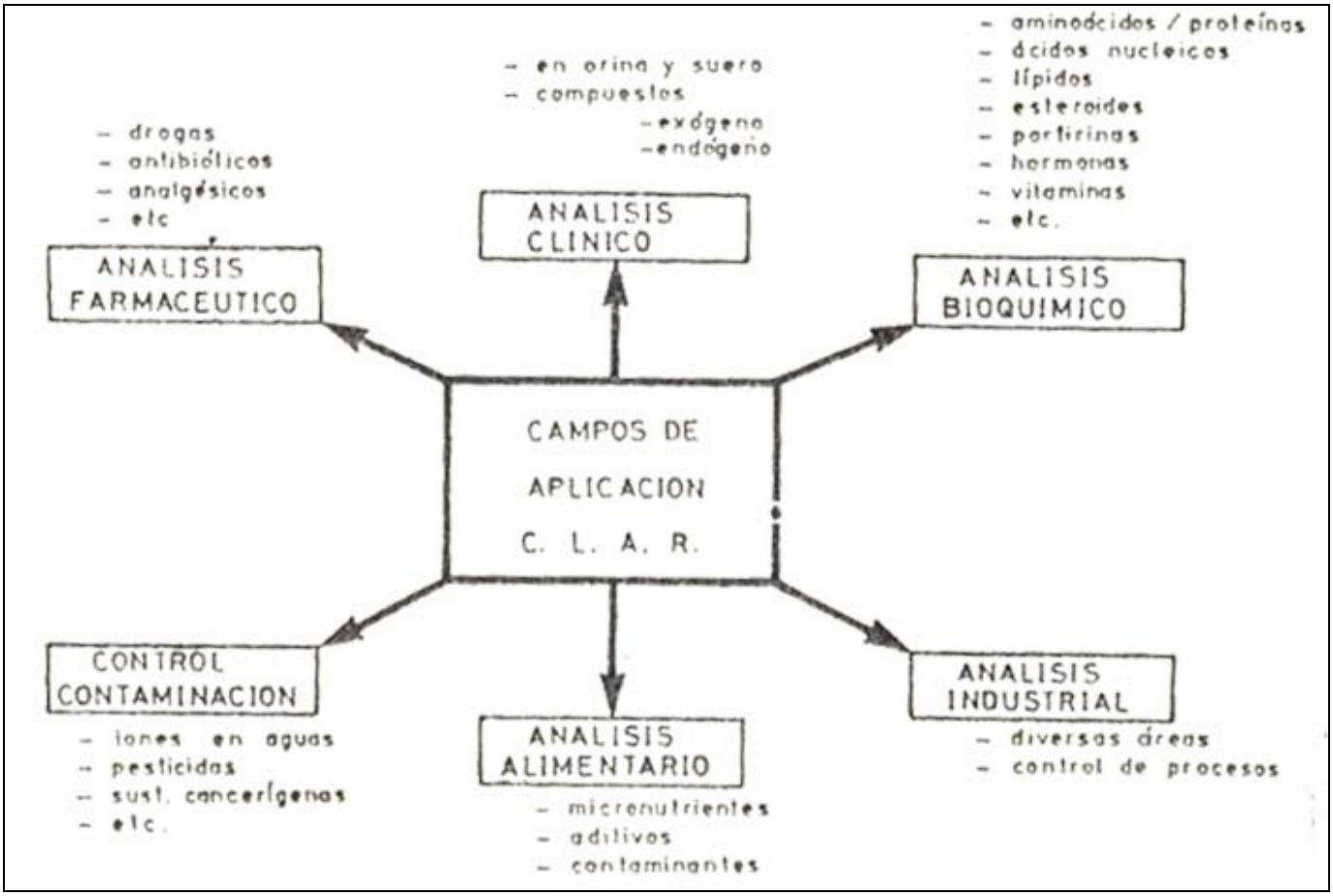


Figura D [10]

2.4.- Conceptes cromatogràfics

Fase Mòbil

La fase mòbil l'injectem juntament amb la mostra en el cromatògraf. Aquesta circula al llarg de la columna on els analits es van separant degut a les diferents velocitats de flux en funció de la seva afinitat amb la fase estacionària.

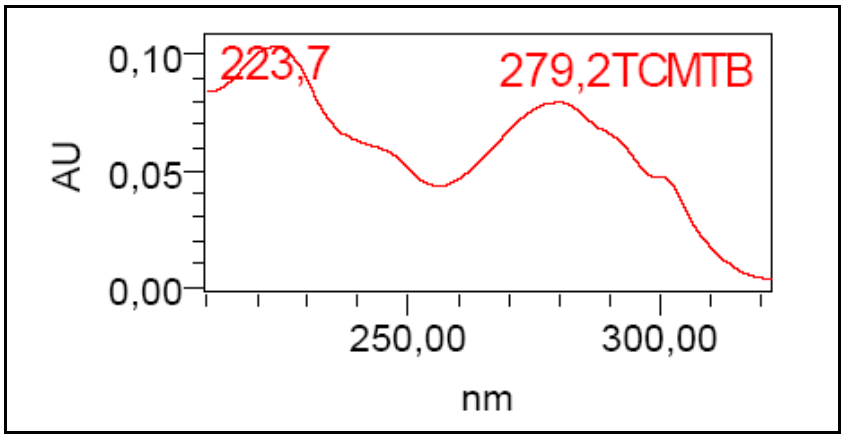
Fase Estacionària

La seva interacció amb la fase mòbil provoca diferents velocitats de flux, d'aquesta manera obtenim la separació cromatogràfica dels analits. Un suport comú es el de les partícules microporoses de sílice amb un diàmetre de 5 a 10µm que genera uns pics mes simètrics comparat amb partícules de forma irregular. En CLAR també s'utilitza suports menys rígids que els de sílice

(com els de poliestirè), degut al seu tamany de poro favorable per a les separacions per exclusió molecular[11].

Cromatograma

Es el resultat obtingut de la separació cromatogràfica, tant pot ser en suport digital com físic (paper). Consta de una sèrie de pics en funció del temps. Cada pic es un compost diferent que podem identificar pel tant pel temps de retenció com pel seu espectre. Cal dir, que moltes vegades el temps de retenció no es suficient per identificar un analit, ja que la gran quantitat de compostos que hi podem trobar en una mostra poden solapar-se en el mateix temps que l'analit que nosaltres busquem, per això cal tenir unes condicions de fase mòbil i estacionària molt concretes. Ara bé, la fiabilitat amb un detector de fotodiodes o PDA (veure pàgina 14 i 15) s'incrementa.



Espectre PDA del TCMTB

Temps mort: Es el temps necessari que una substància inerta no retinguda recorri tota la columna. obtenir el pic màxim d'una mostra.

Temps de retenció: Es el temps que l'analit triga a recórrer tota la columna. Es important trobar una fase mòbil adequada de manera que aquest temps sigui el mes curt possible. Es mesura en el màxim del pic de l'analit.

Temps corregit: Es la diferència de temps entre el temps de retenció i el temps mort.

Amplada de base: Es l'amplada de la base del pic, generalment el que mes tarda es que té la base més ample[12].

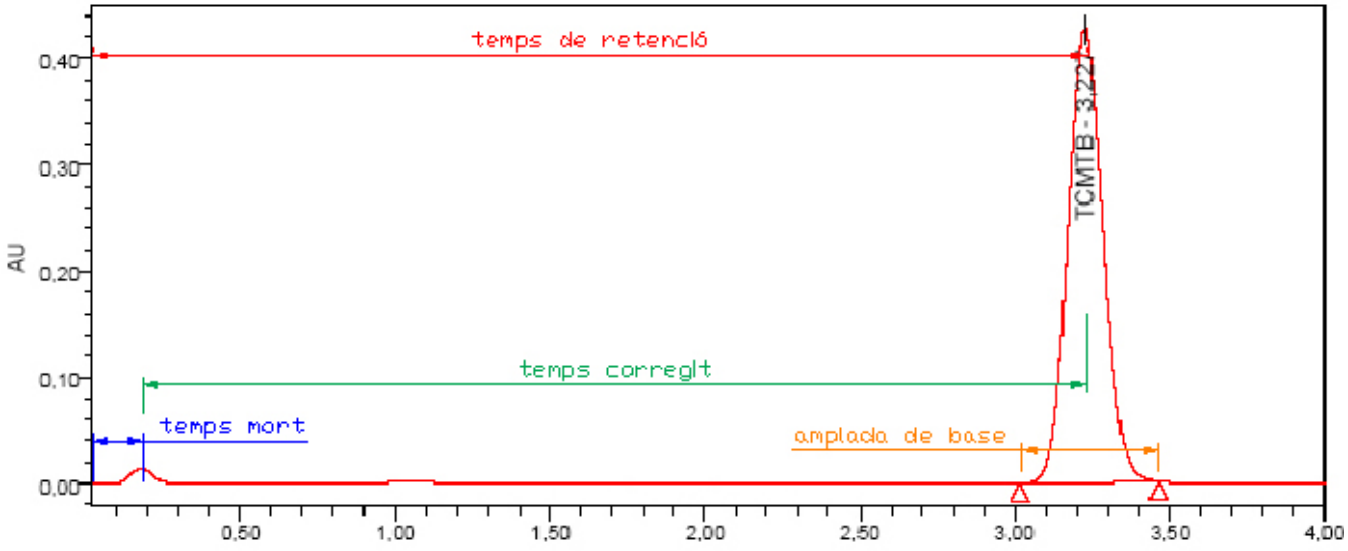


Figura ilustrativa de conceptes cromatogràfics

2.4.1- Parts del cromatògraf

Bomba

Disposem d'una bomba per injectar la mostres a elevades pressions, en el nostre cas capaç d'arribar a 400Kg/m^2

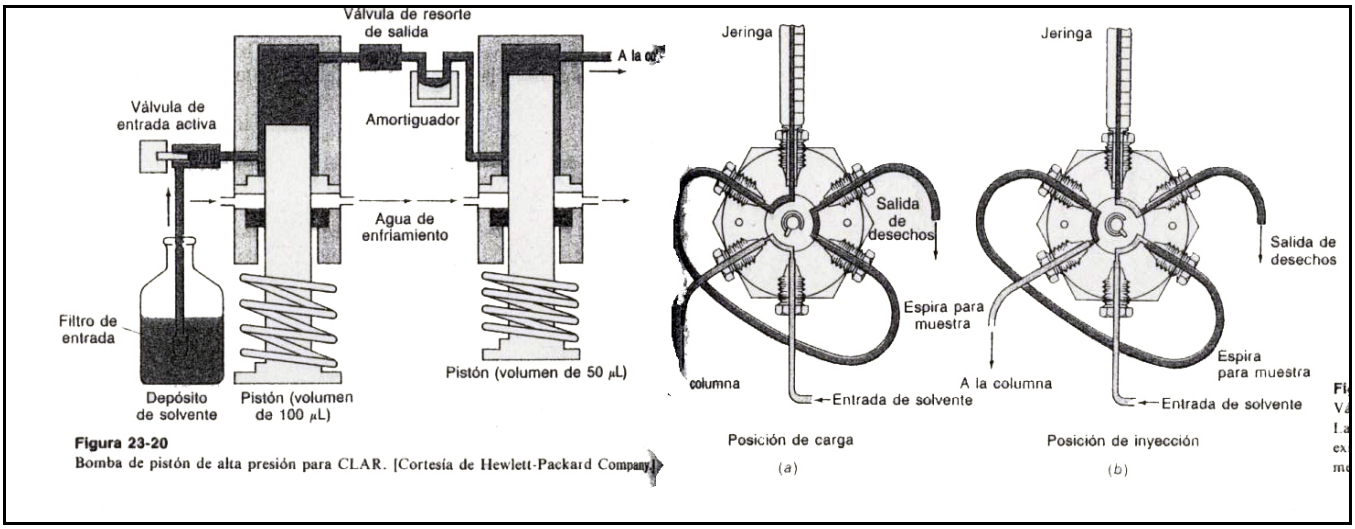
Premescla

Tenim una càmara a on es produeix la mescla de les fases mòbils, aquestes normalment son d'aigua ultrapura o metanol, ara bé, en fase reversa podem trobar fins a 4 fases mòbils diferents (com es en aquest estudi) que es mesclaran sempre en aquest punt del HPLC. En aquest treball utilitzarem una mescla de 30% de Metanol. 30% H_2O Milli-Q[†] i un 40% Acetonitril acidificat

Injector

Ens agafa una quantitat indicada de mostra i ens la injecta a la columna. Es a temperatura ambient. No tota la mostra injectada va a la columna, sinó que també hi ha una purga a l'exterior. A continuació tenim un esquema del injector i les diferents vàlvules:

[†] Aigua ultrapura obtinguda amb un aparell Milli-Q de la casa Millipore. Consta de un llit de resines i un filtre carbó actiu.



esquema d'injector i vàlvules

Figura E[13]

Columna

Nosaltres treballem amb una columna d'acer inoxidable, el que ens permet si cal, treballar a pressions elevades. Es una columna del tipus Columna Xterra™ MS C_{18} 5 µm 3,9 mm x 150 mm de la casa WATERS

Detector ultravioleta

És el mes utilitzat en CLAR, perquè molts soluts absorbeixen aquesta radiació i aquest detector es força sensible. Un volum típic es de 10µL per a un trajecte de 1cm. En instrumentacions versàtils s'utilitza una làmpada de Deuteri i un monocromador per a mesures a longitud variable. Els detectors d'alta qualitat proporcionen intervals d'absorvància en tota l'escala de 0,005 a 3 unitats d'absorvància. El soroll es de un 1% en l'escala complerta en l'interval més sensible.

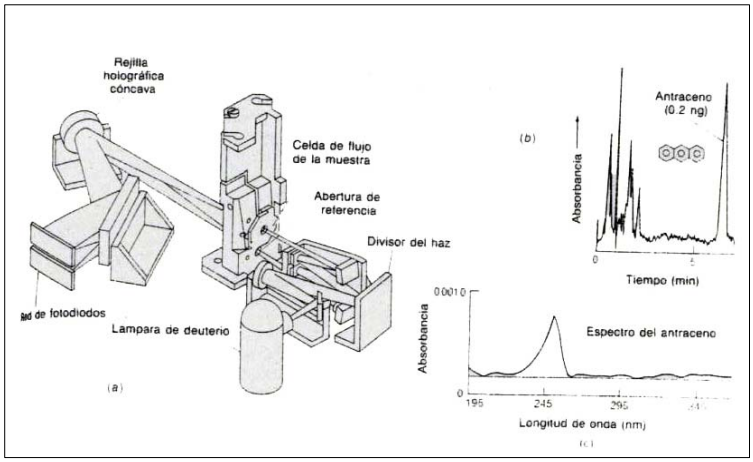


Figura F [14] detector PDA

Muntatge de fotodiodes

El muntatge de fotodiodes o PDA (Photo Diode Array) es un tipus de detector UV format per un conjunt de fotodiodes que permet registrar l'espectre complert de cada solut conforme passa per la columna. Aquest sistema pot buscar el màxim d'absorvància de cada solut mentre flueix[15]. El cromatògraf utilitzat en aquest estudi disposa de un detector PDA.

Els detectors espectofotomètrics són més versàtils que els fotòmers i son els utilitzats en els instruments d'alta resolució. Els aparells moderns com el nostre estan equipats amb sistemes de diodes que poden mesurar un espectre complert quan l'analit surt de la columna. Aquests permeten identificar els elements als analits a mesura que surten per la columna[16].

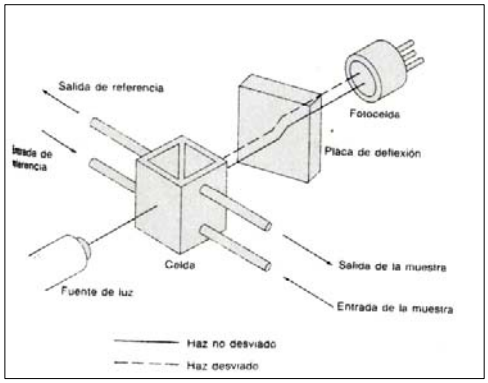


Figura G[17]

Desgasificador

Es important per evitar la formació de bombolles en les fases mòbils a l'interior de la columna ja que ens disotorsionaria els cromatogrames.

Donades les característiques de la mostra d'aquest treball, nosaltres treballarem en fase inversa lligada, ja que el P.m. dels analits són <2000, es soluble en solvents orgànics poc polars com podem veure en el gràfic de la pàgina 8.

2.5.- Cromatografia de fase inversa lligada

En la cromatografia de fase inversa més comú s'utilitza una fase estacionària no polar y un solvent polar.

La cromatografia de fase inversa va evolucionar a partir de la antiga cromatografia de partició, en la qual la part sòlida es recobria amb un dissolvent orgànica com n-butanol, benzè, o cloroform, i la fase mòbil era aigua, un dissolvent orgànic polar, o ambdós. D'aquest manera, la cromatografia de partició es una vertadera cromatografia de extracció líquid-líquid encara que la coberta orgànica no enllaçada tendeix a desaparèixer en el transcurs del temps. En la antiga literatura el nom de cromatografia de partició s'utilitza per a referir-se al mètode original, encara que en la actualitat aquest terme s'utilitza, a vegades, per referir-se a cromatografia amb fases com el C18 i altres similars[18].

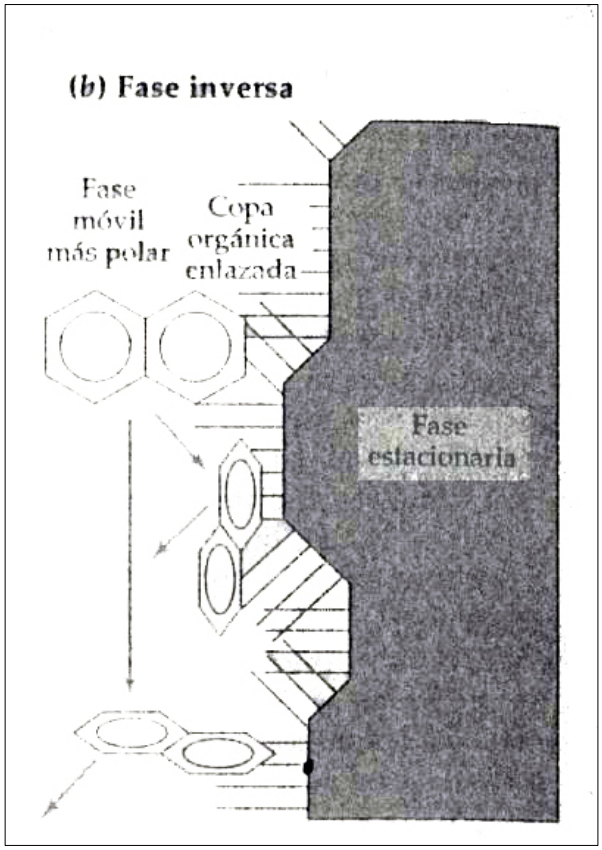


Figura H [19]

En la cromatografia de fase inversa, la fase estacionària es menys polar que la fase mòbil.

S'utilitzen dos tipus fonamentals de fases estacionàries i les més comú son grups no polars enllaçats amb la Sílice. Entre ells, els més comuns sovint son els grups orgànics $–CH_3$, $-C_8H_{17}$, i $C_{18}H_{37}$ D'aquests el més utilitzat es la cadena de 18 àtoms de carboni que es el tipus de columna que hem utilitzat en l'estudi. Els grups orgànics enllaçats exerceixen un efecte similar al que produiria una capa summament prima de dissolvent orgànic en la superfície de les partícules de Sílice. D'aquesta manera, els soluts es reparteixen entre el recubriment superficial i la fase mòbil, de forma molt semblant a una extracció líquid-líquid. A més, a mesura que la cadena de carbonis es mes llarga, aquestes capes es tornen més "orgàniques". Com a resultat, les cadenes mes prolongades interaccionen amb més força amb els soluts que es dissolen preferencialment en una fase orgànica.

El segon tipus de fase estacionària que s'utilitza en cromatografia de fase inversa està composta de perles de polímers orgànics. Un polímer força característic es una resina de poliestiré i divinilbenzé. El divinilbenzé forma enllaços creuats entre les cadenes de polímer i poliestiré. Aquest enllaços creuats provoquen una rigidesa física en el polímer; la major densitat de enllaços creuats s'associa amb un material més rígid. La rigidesa es necessària per revestir la deformació a altes pressions.

Resumit d'una manera molt esquemàtica la Cromatografia en fase inversa:

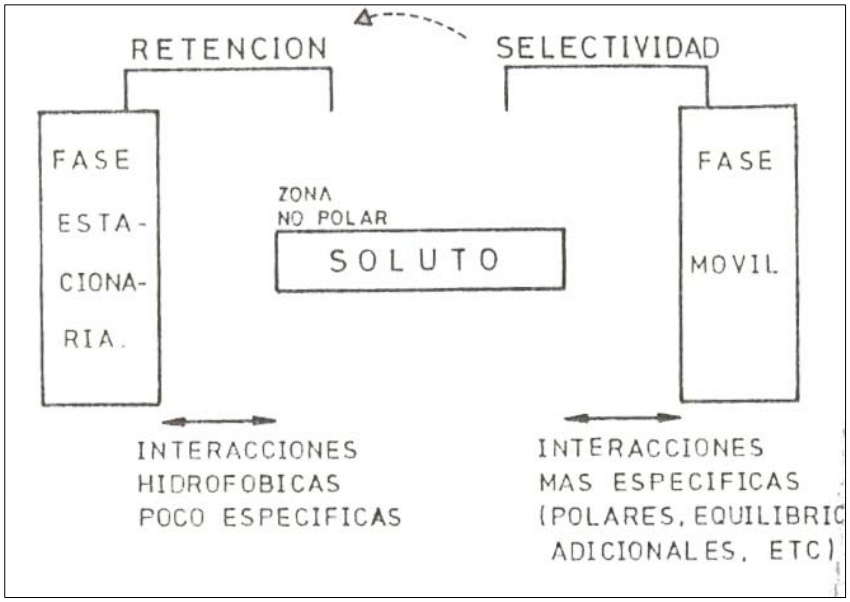


Figura I [20]

La cromatografia de fase inversa es força popular, ja que els pics en una separació d'aquest tipus obté pics més fins més fins i simètrics i les reaccions d'equilibri d'adsorció i desorció tendeixen a ser ràpides.

Així doncs, Es tracta de la modalitat de cromatografia de major interès i impacte, actualment el 75-90% de les aplicacions de la CLAR es fa en fase inversa. Es tracta de utilitzar un dissolvent fonamentalment polar com a fase mòbil i utilitzant una cadena hidrocarbonatada lligada com a fase estacionària.

Les avantatges mes destacades d'aquesta modalitat cromatogràfica són:

- Gran estabilitat de la fase estacionària de la columna, el que origina una gran reproducibilitat de les anàlisis.
- Degut a que no existeixen forces elevades de retenció:
  - Els temps de retenció son baixos
  - La velocitat de mostreig es elevada
  - No es produeixen reaccions irreversibles
  - No es deteriora la columna
- El sistema cromatogràfics es simple, no necessita complicacions tècniques com precolumnes d'equilibració de la fase mòbil.
- El camp d'aplicació es molt ampli.
- Gran varietat de compostos a determinar: no iònics i ionitzables.
- Possibilitat de augmentar la selectivitat al poder fer intervenir equilibris addicionals (àcid-base, formació de complexes, parells iònics, efecte del ió comú, intercanvi de lligants, etc...).
- Possibilitat de dur a terme la preconcentració dels analits de un gran volum de mostra al utilitzar inicialment una fase mòbil amb poc poder de elecuió.
- Determinació de paràmetre físico-químics: constants de dissociació i formació de complexes, magnituds hidrofòbiques, etc.

Per tots aquests motius, les aplicacions cada vegada son mes nombroses. La limitació més important es la necessitat de mantenir la **fase mòbil** en el **pH de 2 a 7,5** degut a que es poden produir efectes hidrolítics catalitzats per protons o hidroxils, que poden fer produir danys irreversibles a la estructura de la fase lligada. Si no s'utilitza un tractament final de bloqueig o eliminació dels grups silanols no enllaçat, es produeixen fenòmens de adsorció indesitjats que alteren la distribució cromatogràfica.

La retenció en cromatografia de fase lligada inversa es deu de forma casi exclusiva a les interaccions hidrofòbiques no específiques solut-fase estacionària, es a dir, al caràcter hidrofòbic o hidrocarbonat del solut. La selectivitat, en canvi, es fonamenta en les interaccions específiques entre el solut i la fase mòbil, ja sigui del tipus polar, de formació d'enllaços d'hidrogen, o mitjançant equilibris secundaris provocats al variar la composició de la fase mòbil (àcid-base, formació de complexes o parells iònics, addició de complexes metal·lics-lligants o reactius quirals per a separar isòmers òptics, etc.)

Una característica molt peculiar de la cromatografia de fase inversa es la complexitat dels mecanismes bàsics de retenció i elució, en contrast amb altres alternatives cromatogràfiques. Un aspecte d'especial interès es la interfase real que hi ha entre les fases mòbil i la estacionària. Donat que la fase no polar estacionària esta en forma de monocapa, es molt difícil que es produeixin interaccions efectives de retenció per solubilitat. Scott suposa que el component menys polar de la fase mòbil pot acumular-se en forma de una capa estacionària amb una concentració majoritària d'aquest component de la fase mòbil, per el que incrementa la proporció de la fase estacionària (augmenta el gruix de la capa)[21].

La seva casi universalitat d'aquesta modalitat cromatogràfica pel que fa al tipus de solut es fonamenta en el fet de que totes les molècules orgàniques tenen regions hidrofòbiques mes o menys amplies en la seva estructura i son capaces de intereccionar amb la fase estacionària. En general, la presència de additius (de diferent grau de polaritat, reactius, etc...) es clau per aconseguir la discriminació cromatogràfica.

La cromatografia de fases lligades no polars es molt adequada per la separació de mescles de compostos que formen sèries homologues. En aquest cas la selectivitat s'origina de forma important per l'amplitud de la zona no polar dels mateixos.

En contrast amb les series elutròpiques per les fases estacionàries com la sílice o l'alumini, els dissolvents menys polars són eluients més poderosos en les separacions de fase inversa. Aquest poder d'elució de fase inversa s'indica mitjançant una escala numèrica anomenada índex de polaritat.

El fet de que la fase mòbil sigui hidrofílica permet la introducció de mostres amb matriu fonamentalment aquoses., el que suposa la aplicació a camps de gran interès social (clínics, nutricional, ambiental, industrial, etc...) A més el compostos polar, iònics o ionitzables, que estan "prohibits" en altres cromatografies de adsorció o de partició, es separen amb èxit amb aquesta modalitat.

En el context bioquímic i clínic, existeix un gran numero de aplicacions. Un d'important i actual pot ser les separacions d'aminoàcids, el que implica entrar en el camp de la genètica.

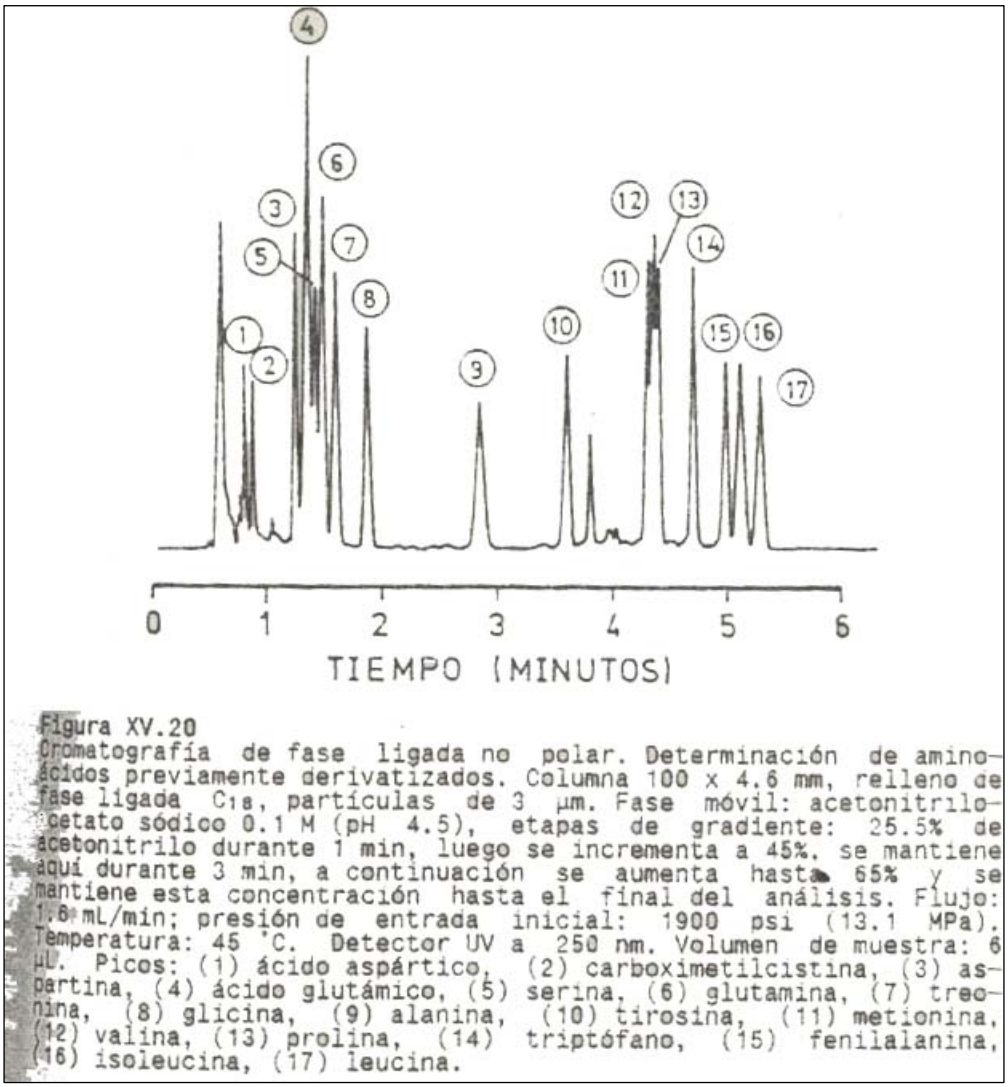


Figura XV.20
Cromatografía de fase ligada no polar. Determinación de aminoácidos previamente derivatizados. Columna 100 x 4.6 mm, relleno de fase ligada C_{18}, partículas de 3 µm. Fase móvil: acetonitrilo-acetato sódico 0.1 M (pH 4.5), etapas de gradiente: 25.5% de acetonitrilo durante 1 min, luego se incrementa a 45%, se mantiene aquí durante 3 min, a continuación se aumenta hasta 65% y se mantiene esta concentración hasta el final del análisis. Flujo: 1.6 mL/min; presión de entrada inicial: 1900 psi (13.1 MPa). Temperatura: 45 °C. Detector UV a 250 nm. Volumen de muestra: 6 µL. Picos: (1) ácido aspártico, (2) carboximetilcistina, (3) asparina, (4) ácido glutámico, (5) serina, (6) glutamina, (7) treonina, (8) glicina, (9) alanina, (10) tirosina, (11) metionina, (12) valina, (13) prolina, (14) triptófano, (15) fenilalanina, (16) isoleucina, (17) leucina.

Figura J [22]

En la figura J es mostra una aplicació en un context clínic, es el resultat d'una separació espectacular de 17 aminoàcids en menys de 6 minuts.

Unaltre exemple es el control de qualitat alimentari, que s'ha beneficiat enormement al aplicar aquesta modalitat cromatogràfica de fases lligades no polars. També en el camp de control de contaminació de les aigües, ens permet la determinació de contaminants orgànics.

Últimament, s'ha utilitzat una tipus de grafit com a fase estacionària. Aquest material s'anomena PGC (porous graphytic carbon) i essencialment es carbó pur amb superfícies molecularment planes. Conté pocs àtoms que no siguin de carbó i els presents estan ubicats en els cantos de grans plaques (a nivell molecular). El PGC es menys polar que els dissolvents en general; per tant, es classifica entre els suports de fase inversa. Tot i així, la propietat més interessant del PGC es que la seva força d'interacció amb les molècules de solut depèn quasi exclusivament de l'àrea molecular amb contacte amb la placa. Com a resultat, les molècules de

tamany gran tendeixen a enllaçar-se amb més força que les molècules i les molècules flexibles s'enllacen més que les rígides. La càrrega iònica no afecta al enllaç. Per últim, es possible separar enantiòmers quan la estructura d'algun d'ells permet l'aproximació de gran número de àtoms a la superfície, diferencian-los així de l'altre forma enantiomèrica. Aquest mecanisme mixt d'interacció ofereix una alternativa a les fases normals i enllaçants per certs tipus de compostos, també anomenat UHPLC (Ultra Liquid Performance Liquid Chromatography)[23].

2.6.- Els fungicides continguts en les pells

Un fungicida es una substància d'origen natural o sintètic que ataca o destrueix els fongs paràsits[24].

El criteri seguit per a la selecció d'un biocida per a les pells es que aquest no pugui fer malbé ni les pells ni el cuir. Partint d'aquesta base, les característiques que hauria de tenir són:

- Romandre inert sobre la pell.
- Ser efectiu en la concentració aplicada durant el temps que faci falta.
- No interferir ni ser modificat pels tractaments de conservació que s'apliquin a la pell.
- Tenir baixa toxicitat, baix impacte ambiental i ser segurs durant el seu us[25].

En aquest treball analitzarem els tres fungicides més utilitzats avui en dia en les pells, el 2-(tiocianometiltio)benzotiazol o TCMTB (el més comú), el Ortofenilfenol (OPP) i el P-Cloro-m-cresol (PCMK). Els antecedents d'aquests biocides es remunta a finals dels 80 quan fins llavors s'utilitzaven els fenols policlorats, va ser el Desembre de 1989 quan va entrar en vigor una llei a Alemanya de prohibició de fabricació i us de Pentaclorofenol (PCP). Va ser en aquell moment, quan van entrar en joc diferents fungicides alternatius als fenols clorats que tenien menor impacte ambiental. Les molècules proposades en aquell moment van ser: clorur de benzalkonio, TCMTB, isotiazolona, OPP, PCMK i benzoimidazol[26][27][28]. Amb el temps els compostos més usats han sigut el TCMTB, i en molt menor mesura el OPP i PCMK Aquests van substituir els fenols policlorats com el pentaclorofenol que eren bons fungicides però tenien un fort impacte ambiental.

2.6.1.- TCMTB

Els fungicides orgànics estan tenint un paper cada vegada mes important en la indústria de la curtició com a protecció de les pells. El biocida més utilitzat conté el TCMTB. Aquest compost el trobem en diferents formules comercials tals com Busan 30, Busan 72, Leathergard, Butrol 30L (Espanya), etc. La efectivitat d'aquest fungicida està contrastada per molts fabricants.

L'activitat biocida del TCMTB va ser estudiada als 80, inicialment com a fungicida per la fusta de pi i posteriorment per la pell, pintura, i altres. Les formes derivades de la oxidació del TCMTB sovint son utilitzades per les llavors de cereals, arròs, cotó, sucre i llegums també per la seva activitat fungicida.

El seu procés d'extracció en les pells s'ha provat de diferents formes:

- Mostra de pell submergida en excés de diclormetà amb poques agitacions durant 24h i al final una rentada també amb diclormetà.
- Extracció amb Soxhlets entre 2 i 16 hores utilitzant diclormetà com a dissolvent
- Bany d'ultrasons en excés de diclormetà a punt d'ebullició tapat amb un vidre de rellotge durant 30 minuts
- Banys d'ultrasons juntament amb Soxhlets, primer el bany d'ultrasons i després amb els Soxhlets.

Els resultats obtinguts han sigut:

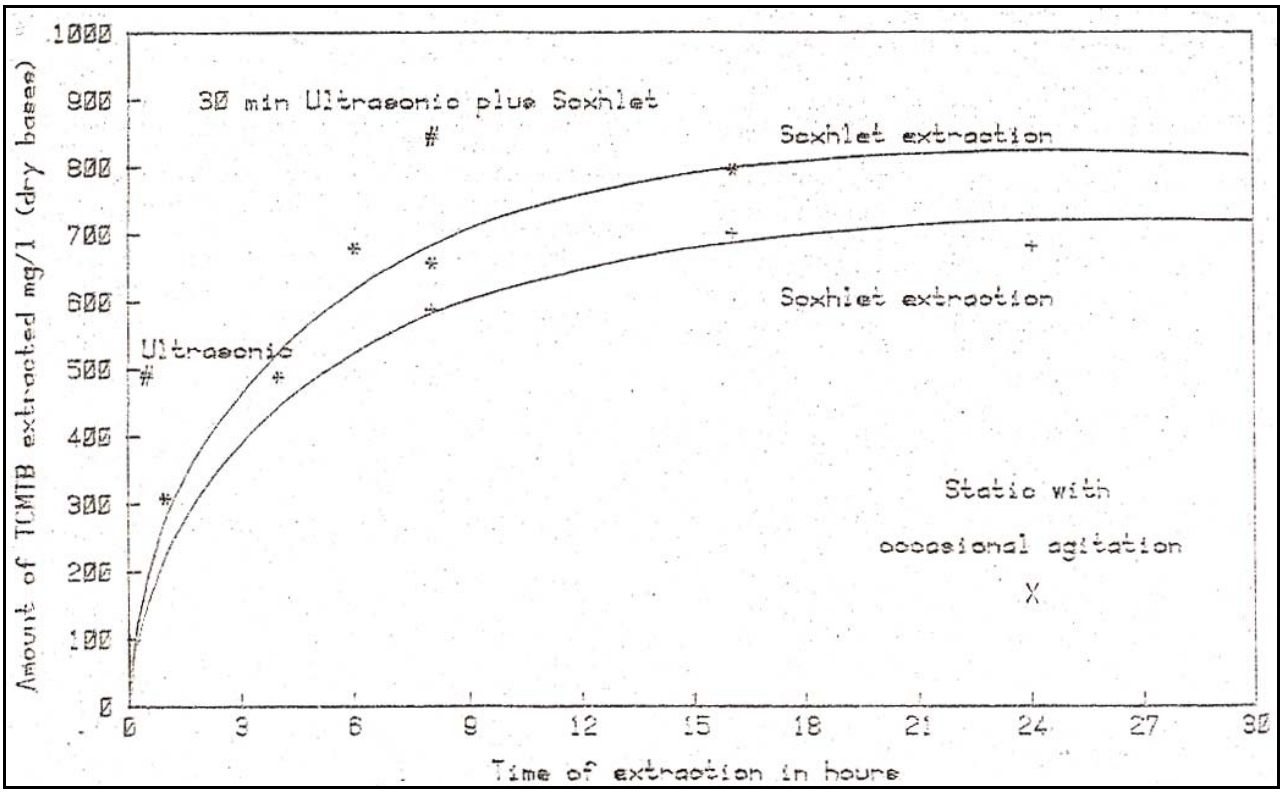


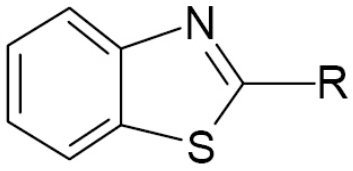
Figura K [29]

Es millors resultats son fent extraccions de les mostres amb Diclormetà a punt d'ebullició (utilitzant Soxhlet) a més d'un bany de 30minuts amb ultrasons. La eficiència d'aquest mètode es d'un 82% de TCMTB contingut en la mostra[30].

Després de l'extracció del TCMTB està contrastat per diferents autors que la millor forma d'analitzar-lo es per Cromatografia Líquida d'Alta resolució[31][32][33][34].

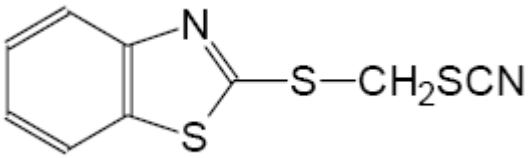
Cal dir, que cal que estigui en medi àcid ja que sinó aquest es degrada en subproductes i perd la seva propietat fungicida.

El TCMTB prové de la família dels benzotiazols i la seva estructura típica es:



Benzotiazol

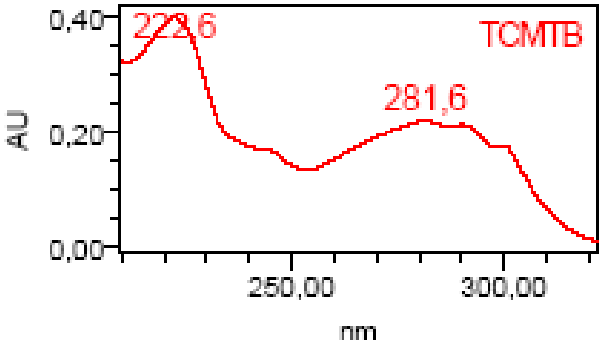
La estructura molecular del TCMTB es:



TCMTB [2-(thiocianometiltio)benzotiazol]

TCMTB: $C_9H_6N_2S_3$; P.M. 181g; Solubilitat 125mg/L a 25ºC; LD_{50}=1590mg/Kg; nº CAS: 21564-17-0

L'espectre UV que ens dona el detector de fotodiodes del cromatògraf es:



Experiments de laboratori han demostrat la inestabilitat del TCMTB, aquest ràpidament es degrada per hidròlisi a 2-mercaptobenzotiazol i la llum es catalitzadora de la degradació[35]. Aquest es un dels motius pels quals s'utilitza tant el TCMTB ja que ràpidament es degrada a una molècula gairebé inerta.

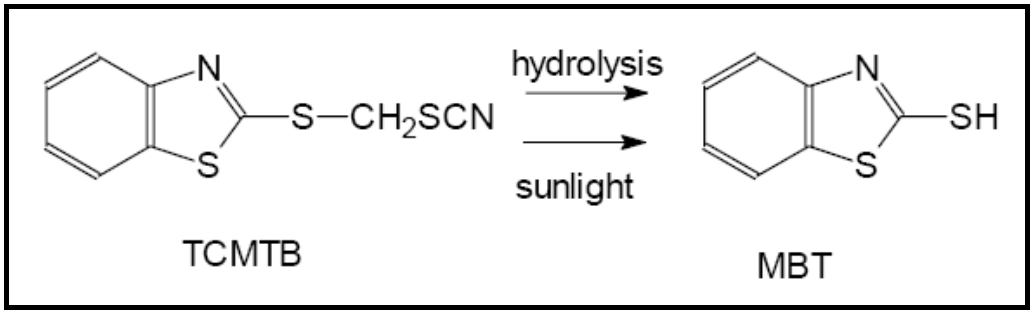


Figura L [36]

La seva degradació microbiològica aeròbica es de un 95% al cap de 9 a 12 dies. El producte de la seva degradació es MBT i BT, ambdós son poc estables i s'acaben de degradar. El BT en 8 dies està completament degradat mentre el MBT passar a ser MTBT que es un producte molt estable, però d'un caràcter poc nociu[37].

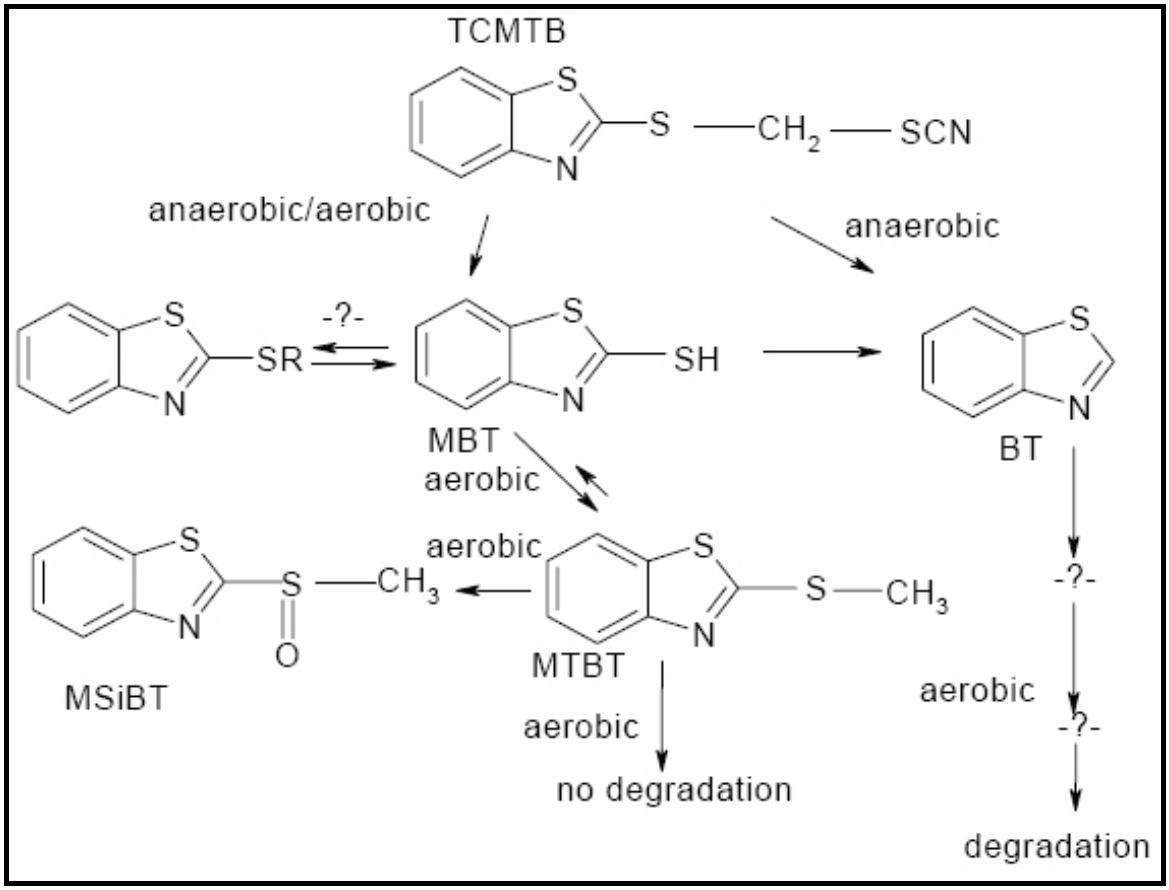
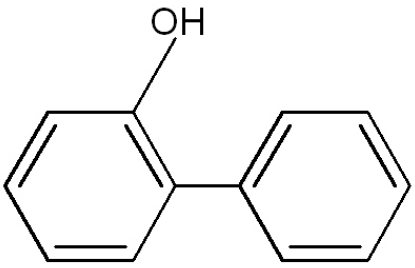


Figura M; degradació microbiològica del TCMTB [38]

2.6.2.- OPP

Es tracta de petits cristalls de color blanc utilitzat en la indústria de la goma, fungicida i desinfectant. És pràcticament insoluble en aigua. Per solubilitzar-lo en aigua s'utilitza la sal sòdica d'aquest.

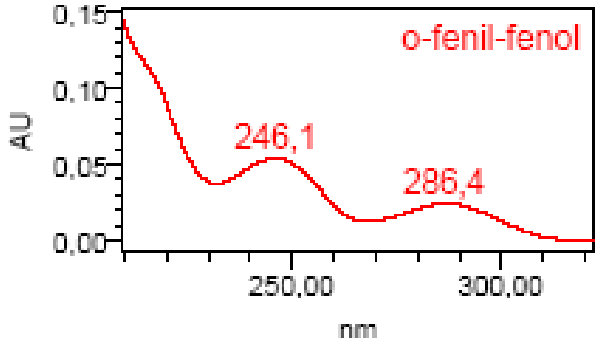
La seva estructura molecular es:



OPP o-FenilFenol

OPP: $C_{12}H_{10}O$; P.M. 170,2g; Solubilitat 122mg/L a 25ºC; LD_{50}=2480mg/Kg; [39]

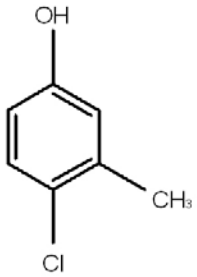
L'espectre UV que ens dona el detector de fotodiodes del cromatògraf es:



2.6.3.- PCMK

Obtingut de la cloració del m-cresol. Es un producte de caràcter antisèptic, desinfectant i fungicida, es més actiu en solucions àcides que alcalines.

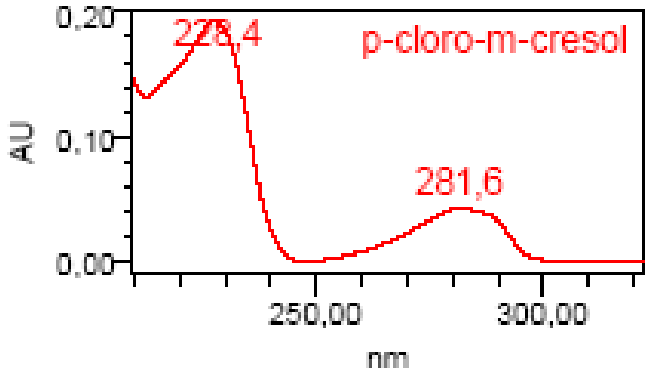
La seva estructura molecular es:



PCMK p-Cloro-m-Cresol

PCMK: $C_{17}H_7ClO$; P.M. 142,58g; Solubilitat 3846mg/L a 25ºC; [40]

L'espectre UV que ens dona el detector de fotodiodes del cromatògraf es:



Tots aquests fungicides s'incorporen en el procés d'adoberia en diferents processos segons les conveniències de fabricació concretes:

- al piquelat
- en Wet Blue (en el bany de curtició)
- en el bany de greixatge (final de procés)

3.- Elaboració de les rectes de calibratge

- Objectiu -

Crear unes rectes de calibratge fiables en el HPLC dels tres fungicides en que està enfocat l'estudi. El calibratge es farà per 4 patrons externs i un blanc. Posteriorment farem regressions per corbes de calibració rectilínies[41].

-Patrons-

TCMTB: Disposem d'una mostra de TCMTB concentrada (99,49%) cedida per Laboratorios Miret S.A. (LAMIRSA).

OPP: Tenim una mostra d'una puresa superior al 99,9% sintetitzada per F.E.R.O.S.A. (SCHARLAU)

PCMK: La mostra que tenim es d'una puresa del 99,5% i també ha estat sintetitzada per la casa F.E.R.O.S.A (SCHARLAU)

- Instrumental-

- Cromatògraf Líquid d'alta resolució (HPLC): Water cromatograf líquid ALLIANCE 2695 Separations Module de WATERS amb detector PhotoDiode Array (PDA) 2996 de WATERS, amb una columna del tipus Columna Xterra™ MS C_{18} 5 µm 3,9 mm x 150 mm de WATERS
- Micropipetes de 0,5mL, 1mL i 5mL
- Instrumental de laboratori tal com matrassos aforats, pipetes, vasos de precipitats, etc...
- Filtres Millipore Type HN 0,45µm

- Productes-

- Acetonitril (CH_3CN) grau de gradient per a cromatografia en fase liquida MERCK

Nota: Tota la solució d'Acetonitril acidificat amb àcid ortofosfòric ha sigut filtrada, per a evitar obturacions en la columna del HPLC.

-Planteig del procediment-

Coneixem per bibliografia i per dades internes del laboratori i dels propis fabricants que aquests fungicides els podem trobar en les pells en concentracions fins a 500mg de fungicida per cada quilogram de pell. El fungicida més comú es el TCMTB, mentre que pel que fa al OPP i el PCMK es mes difícil trobar-ne ja que aquests són minoritaris. La fase mòbil que utilitzarem en el cromatograf sempre serà 30% de Metanol, 30% de Aigua Milli-Q i un 40% d'Acetonitril acidificat amb àcid ortofosfòric (85:15), aquestes dades les tenim establertes per un TFC anterior[42].

El mètode de calibratge que utilitzarem serà per corbes de regressió rectilinees amb patrons externs. Aquest es el mètode més utilitzat i consisteix en analitzar patrons que contenen concentracions conegudes d'analit, seguidament es fa una estandardització dels diferents punts que hem obtingut. Quan la corba de calibració es lineal, significa que la sensibilitat del mètode es constant per a tot el l'interval de concentracions[43].

Les equacions de la recta de calibratge es faran a partir de la concentració i de l'àrea de cada pic dels cromatogrames. Serà una equació del tipus:

$$\mathbf{y = b \cdot x + a}$$

(On y serà l'àrea del pic i x la concentració en mg/L)

Els càlculs per obtenir una recta de calibratge amb una sèrie de valors (X,Y) són els següents:

La ordenada en l'origen (a):

$$a = \frac{\sum y_i}{N} - \frac{\sum x_i}{N} = \overline{Y} - b\overline{X}$$

La pendent (b):

$$b = \frac{\frac{\sum x_i y_i}{N} - \frac{\sum x_i}{N}\frac{\sum y_i}{N}}{\frac{\sum x_i^2}{N} - \left(\frac{\sum x_i}{N}\right)^2} = \frac{S_{XY}}{S_X^2}$$

Cada recta es pot verificar segons el coeficient de correlació lineal, aquest valor està comprés entre 0 i 1. Com més propera sigui el coeficient a 1 millor serà la recta, el cocient d'una recta perfecte es de 1. La seva fórmula de càlcul es[44]:

Coeficient de correlació lineal (r):

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{N}\left(x_i - \bar{x}\right)\left(y_i - \bar{y}\right)}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N}\left(x_i - \bar{x}\right)^2 \sum_{i=1}^{N}\left(y_i - \bar{y}\right)^2}} = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$$

-Procediment per a les rectes de calibratge-

Partint d'aquestes concentracions haurem de buscar quin es l'interval de concentració que haurien de tenir les rectes de calibratge. El pes de les mostres de pell triturada que nosaltres utilitzarem en cada analítica serà de uns 4 o 5grams, que es la quantitat que podem posar en cada cartutx d'extracció. Suposarem que la concentració màxima dels fungicides de les mostres sigui de 450ppm.

(450mg fungicida / 1Kg de pell) · (1Kg/1000g) · (5grams mostra) = 2,25mgrams de fungicida com a màxim en cada mostra

Si al extracte obtingut el diluïm en 15mL de fase mòbil:

(2,25mgrams fungicida / 15mL) · (1000mL/1L) = 150mg/L fungicida en la dissolució

Per tant la rectes de calibratge per poder cobrir tot el rang de concentracions de les mostres haurien de comprendre l'interval entre 0 i 150mg/L de fungicida, ja que serà en aquests punts a on tindrem les concentracions de les mostres.

3.1.- Recta del 2-(thiocyanometilthio)benzotiazol (TCMTB)

-Procediment de la recta de calibratge per al TCMTB-

Així doncs, partint de l'interval teòric de 0 a 150ppm de concentració la nostra proposta per la recta de calibratge per al TCMTB és:

Inicialment, farem una solució mare d'uns 1200ppm aprox. de TCMTB continguts en un matràs de 50mL, seguidament preparem diferents dissolucions en els intervals de concentració del TCMTB proposats en un altre matràs de 50mL. Per últim aquestes solucions les passem en un vialet (previ filtratge de cada mostra) on procedim a fer la quantificació de cada un.

Observacions:

Els resultats obtinguts de les rectes no han sigut bons, la millor recta té una r inferior a 0,997. Donat que arrosseguem un error notable cada vegada que diluïm el patró optem per fer una solució mare més diluïda (350pppm) i elaborar els patrons en els mateixos vialets, d'aquesta forma evitem el pas intermig d'utilitzar un matràs de 50mL. Així hem pogut la millorar la recta de calibratge.

-Resultats experimentals -

Solució mare de 50mL a 350ppm de TCMTB:

→ 50mL de 350mg/L de TCMTB:

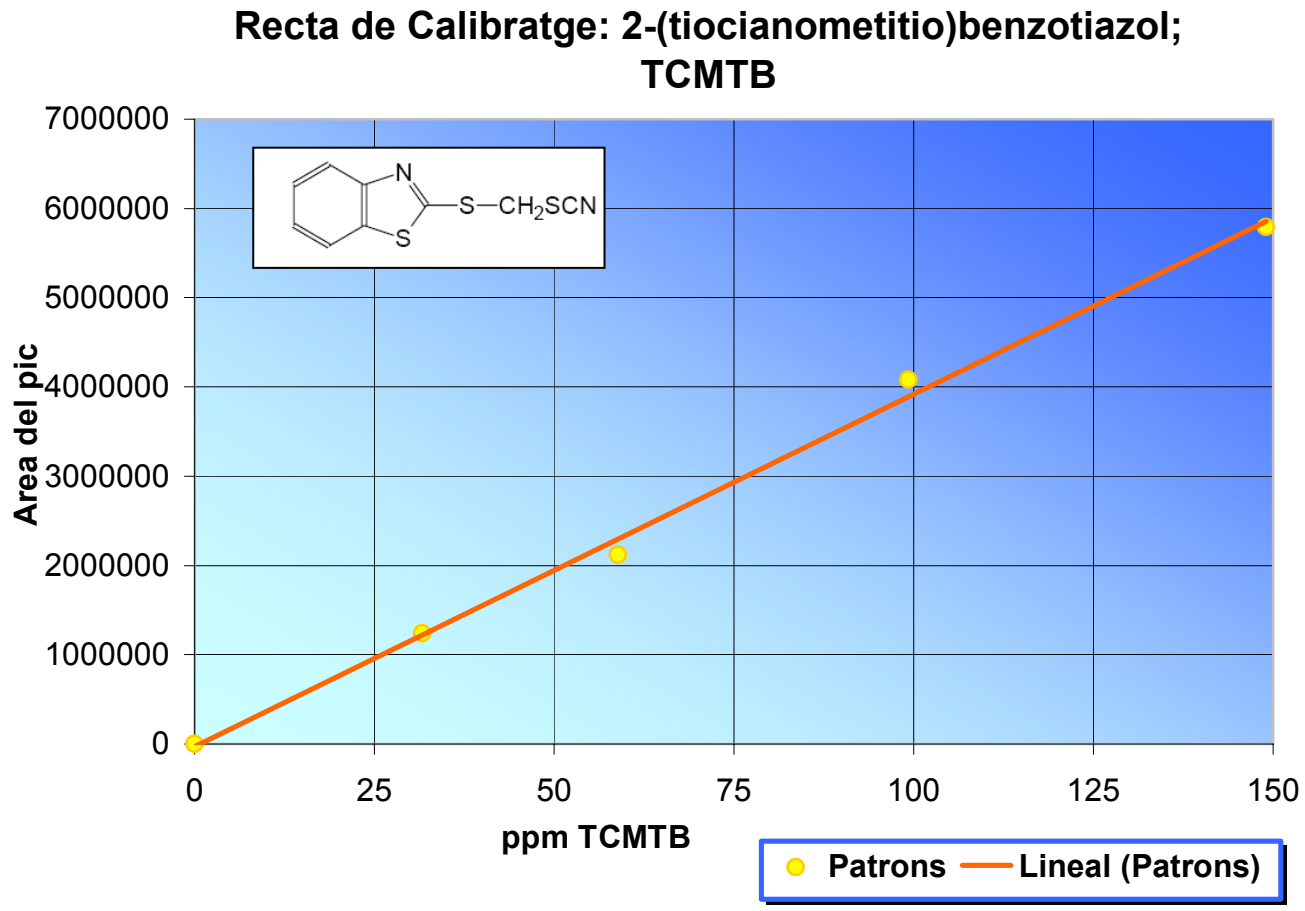
350mg/L de TCMTB · 50mL · 1L/1000mL · 1g/1000mg · 99,40gTCMTB/100g = 0,0174 grams de TCMTB a diluir en 50mL. Així tenim que:

pesada	0,0175	g TCMTB 99,49%
dilució	50	mL
	348,215	**ppm TCMTB**

Els patrons fets en els vialets queden:

Patrò	*volum sol. Mare (mL)*	*volum disolvent (mL)*	*Factor Dilució (aprox)*	*conc. TCMTB (ppm)*	*Área del pic*
1	0	2	0	**0**	0
2	0,10055	1,00405	1/10	**31,6975**	1237764,000
3	0,2002	1,00405	1/5	**58,8888**	2116698,009
4	0,4005	1,00405	2/5	**99,2917**	4078572,008
5	0,7515	1,00405	3/4	**149,0607**	5791654,011

Una vegada preparats els patrons en els vialets, els injectem al HPLC i calculem la recta de de regressió lineal:

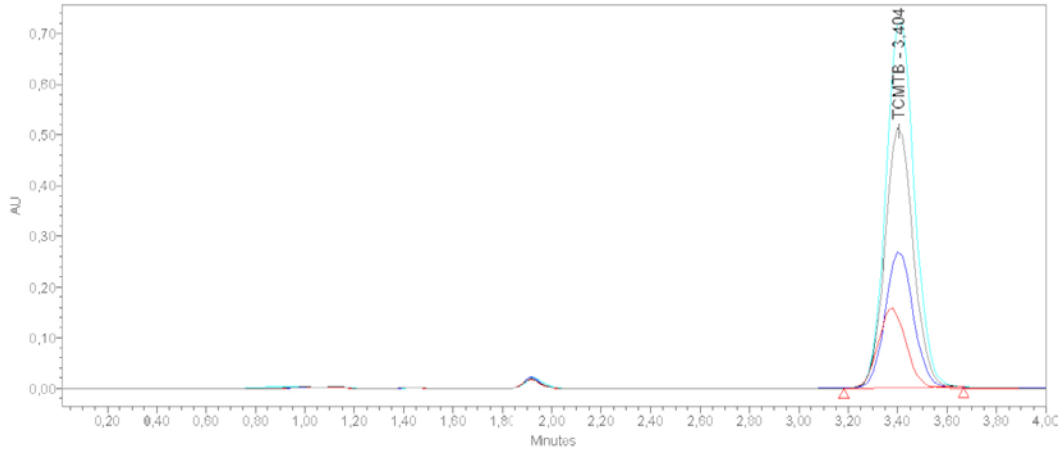


Recta de calibratge	
A	-6,528E+04
B	3,979E+04
R	0,9972

$$y = 3{,}98 \cdot 10^4 x - 6{,}53 \cdot 10^4$$

(y=area del pic; X=concentració mg/L)

Hem obtingut els següents 4 cromatogrames (sobreposats):



Observacions:

Aquesta es la millor recta obtinguda i serà la que utilitzarem posteriorment per a la determinació del TCMTB en les mostres de l'estudi. Com s'ha explicat anteriorment, la recta de calibratge es fa a partir de l'àrea del pic de cada cromatograma, com podem veure en aquest patró el pic del TCMTB (el mes alt) té un temps de retenció de 3,2min.

La recta obtinguda pel programa del cromatògraf (Empower) la podem veure en la pàgina 3 de l'annex.

-Procediment per a les rectes del OPP i PCMK-

Aquestes dues rectes de calibratge les farem utilitzant solucions patró que contenen ambdós analits, ho farem d'aquesta manera per tal de disminuir l'error. Seguirem els mateixos passos que en l'anterior recta.

Coneixem que ambdós els podem trobar en concentracions inferiors que el TCMTB i s'utilitzen amb menor freqüència, per aquest motiu que en aquest treball fi de carrera no hi ha l'intenció de validar la determinació de OPP i PCMK. Aquests els podem determinar per altres tècniques tals com la Cromatografia de Gasos[45].

La nostra proposta per a elaborar les rectes de calibratge es:

Amb les solucions concentrades de OPP (99,9%) i PCMK (99,5%) crearem dues rectes de calibratge amb els intervals de 0 i 150ppm. Preparem una solució mare de uns 600ppm de cada un i farem els diferents patrons per dilució:

3.2.- Recta de l'OrtoFenilFenol OPP

-Resultats experimentals -

→ 50mL de 600ppm de OPP:

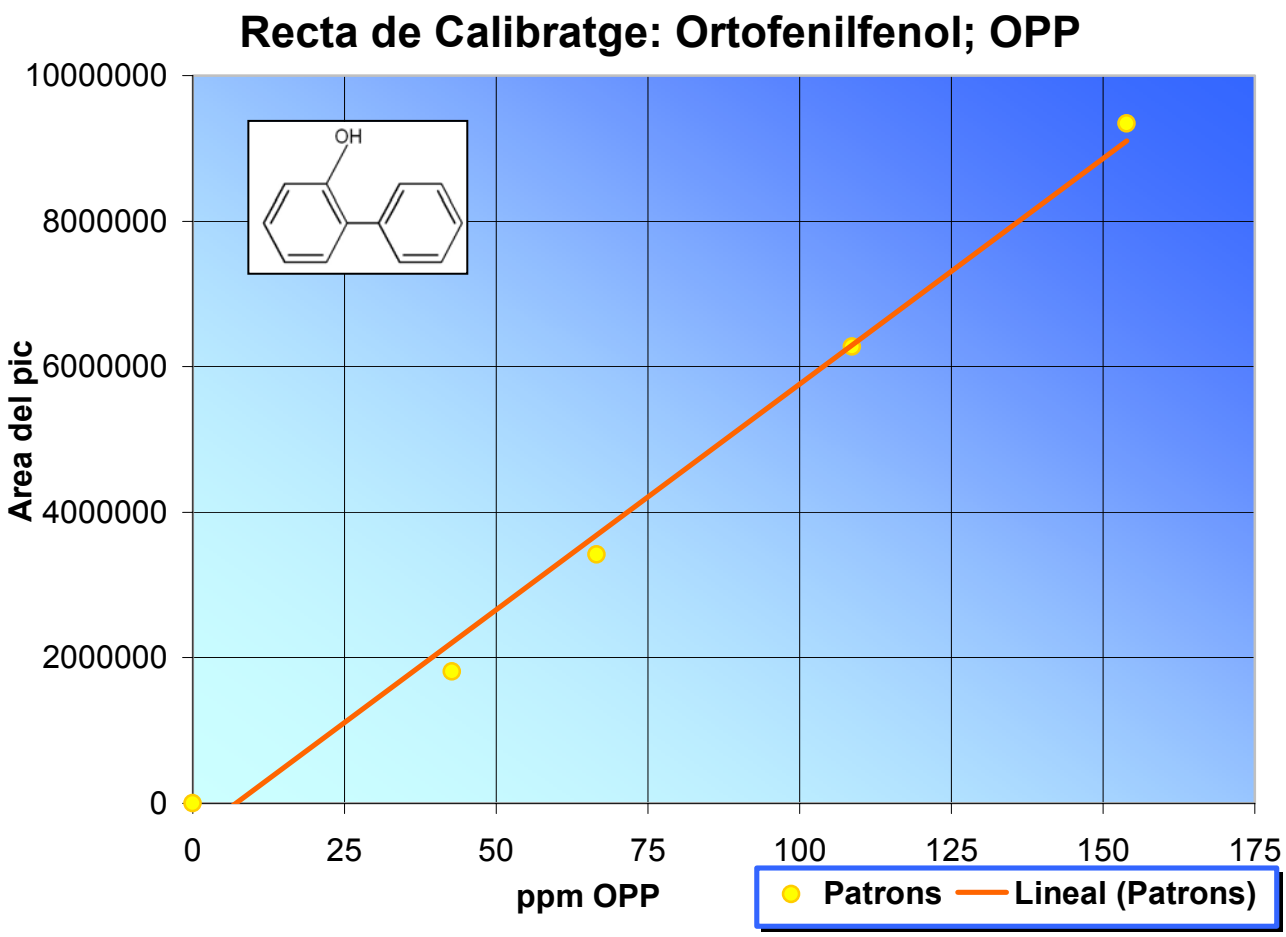
600mg/L de OPP · 50mL · 1L/1000mL · 1g/1000mg · 99,9gOPP/100g = 0,02997 grams de OPP a diluir en 50mL per tenir la solució mare. La dissolució sempre la fem amb Acetonitril acidificat amb àcid ortofosfòric (20mmols/L).

pesada	0,0301	g OPP 99,9%
dilució	50	mL
	601,398	**ppm OPP**

La proposta dels 4 patrons ens queda:

Patró	*Sol. Mare (mL) OPP*	*dissolvent (mL)*	*Factor Dilució (aprox.)*	*ppm OPP teòrics*	*Àrea del pic*
1	0,000	1,000	0	**0**	0
2	0,075	1,075	1/15	**39,2216**	1810200
3	0,150	1,150	1/7	**69,3921**	3420854
4	0,300	1,300	1/4	**112,7621**	6271260
5	0,450	1,350	1/4	**150,3495**	9337664

Una vegada tenim els patrons en els vialets procedim a l'injecció al HPLC i trobem la recta de calibratge, el resultat es:



Recta de calibratge OPP	
A	-1,083E+06
B	6,772E+04
R	0,9965

$$y = 6{,}772 \cdot 10^{4} x - 1{,}083 \cdot 10^{6}$$

(y=area del pic; X=concentració mg/L)

3.3.- Recta del ParaCloroMetaKresol (PCMK)

-Resultats experimentals -

→ 50mL de 600ppm de PCMK:

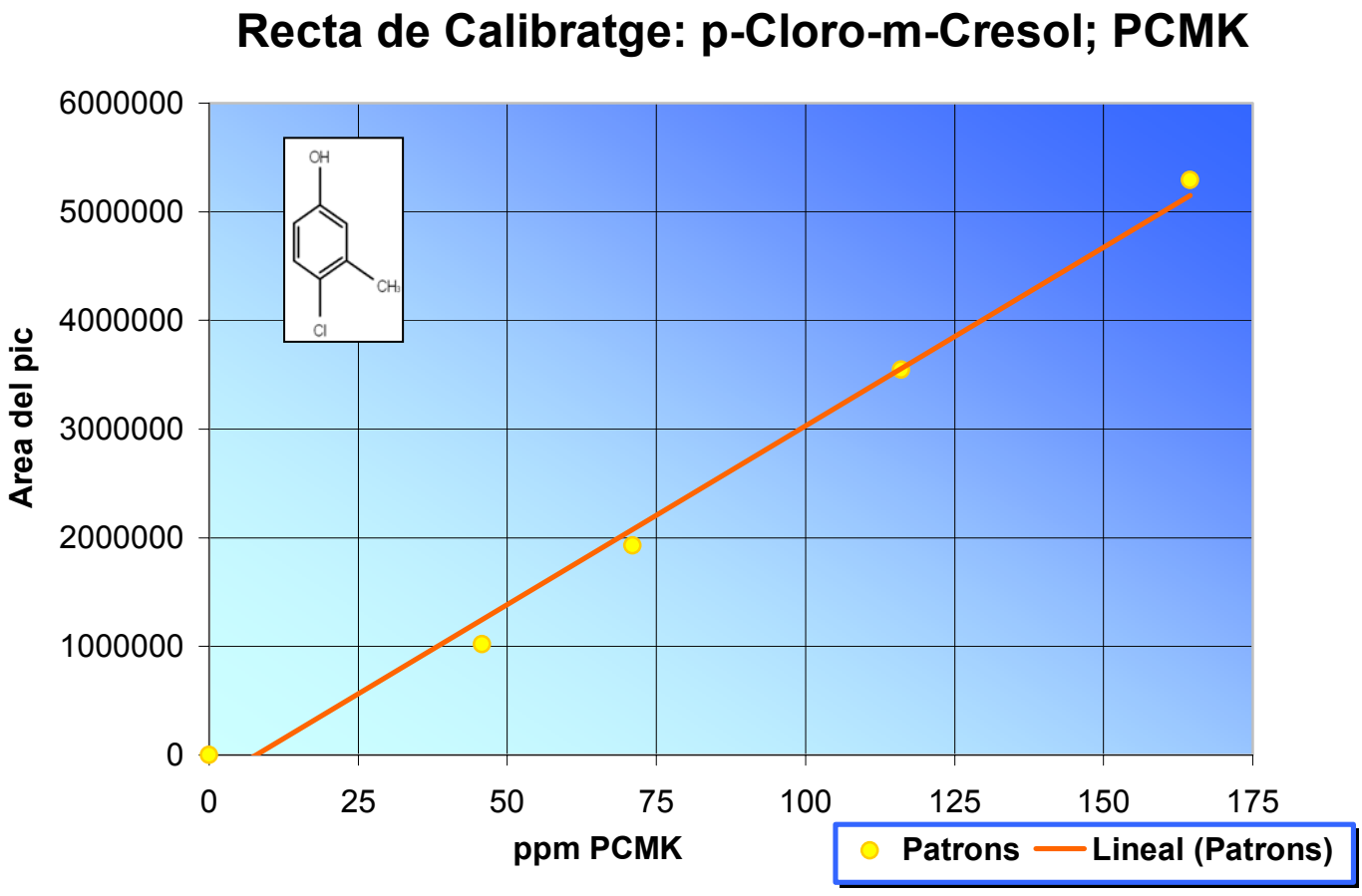
600mg/L de PCMK · 50mL · 1L/1000mL · 1g/1000mg · 99,5gPCMK/100g = 0,02985 grams de PCMK a diluir en 50mL per tenir la solució mare.

Pesada	0,323	g PCMK 99,5%
Dilució	50	mL
642,77		**ppm PCMK**

A partir d'aquesta solució mare tenim els següents patrons:

Patró	Sol. Mare (mL) PCMK	dissolvent (mL)	Factor Dilució (aprox.)	ppm PCMK teòrics	Àrea del pic
1	0,000	1,000	0	**0**	0
2	0,075	1,075	1/15	**41,9198**	1018696
3	0,150	1,150	1/7	**74,1658**	1925622
4	0,300	1,300	1/4	**120,5194**	3546138,5
5	0,450	1,350	1/4	**160,6925**	5290131,5

Procedim a fer l'injecció de les mostres i obtenim la tercera recta de calibratge:



Recta de calibratge PCMK	
A	-6,271E+05
B	3,597E+04
R	0,9964

$$y = 3{,}597 \cdot 10^{4}x - 6{,}271 \cdot 10^{5}$$

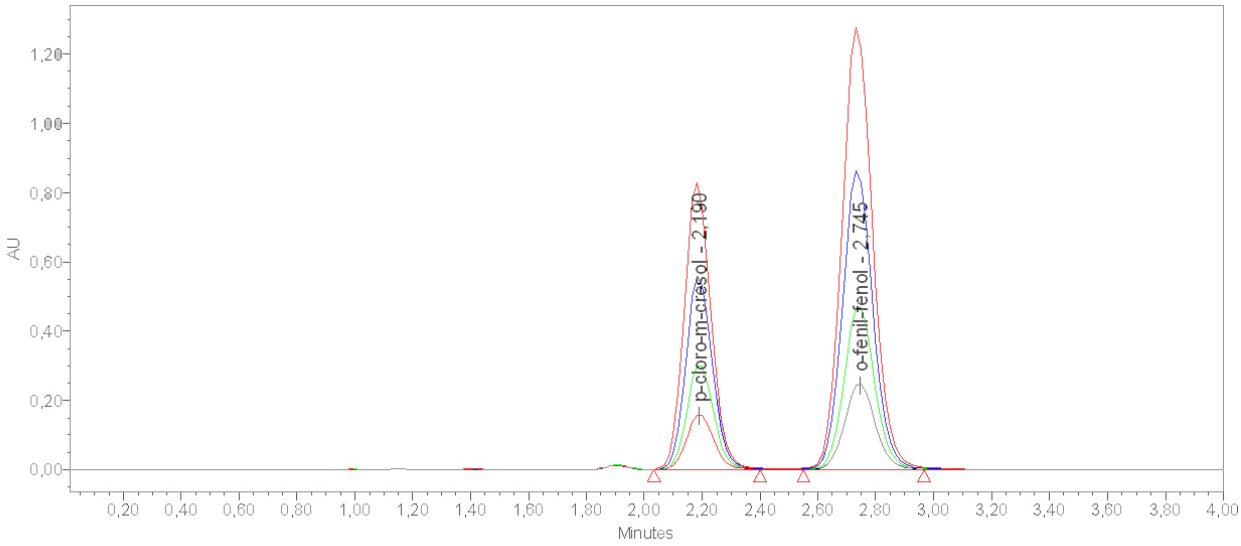
(y=area del pic; X=concentració mg/L)

Observacions:

Al fer les injeccions d'aquests patrons hem vist que els temps de retenció de cada analit augmentaven fins al moment que el Software no els identificava correctament, teníem inestabilitat en el temps de retenció. El OPP ens el detectava com a TCMTB i el PCMK com a OPP, es a dir el desplaçava. Com que disposem d'un cromatògraf de tres dimensions hem pogut solucionar el problema ja que podem reconèixer cada un per el seu espectre. Per evitar el problema hem decidit punxar entre cada mostra un blanc (fase mòbil) de manera de que la columna i la xeringa quedin absolutament nets, d'aquesta forma els pics tornat ha estar dins de l'interval establert de retenció.

El temps de retenció per al OPP es de 2,7min i per al PCMK de 2,18min.

Aquí tenim un els quatre cromatogrames obtinguts al realitzar les rectes de calibratge:



Observacions:

Observem en els cromatogrames com els pics del PCMK i el OPP tenen un temps de retenció prou diferent i repetibles entre ells, i també com son prou bons per assegurar que la seva presència no suposa cap interferència en la determinació del TCMTB.

Les rectes obtingudes pel programa del cromatògraf (Empower) les podem veure en les pàgines 4 i 5 de l'annex .

Ara, ja disposem d'unes rectes de calibratge que ens permetran trobar i quantificar de forma fiable el TCMTB, i si en trobem en alguna mostra, el OPP i el PCMK. Estem apunt per realitzar el pròxim pas que és estudiar la influència del temps de l'extracció Sólid-Líquid.

4.- Estudi del temps d'extracció en mostres de pell

- Objectiu -

Realitzar un estudi del temps mínim d'extracció dels fungicides d'una mostra de pell. Les extraccions les farem en cartutxos de pell triturada a 2, 4 i 6 hores utilitzant Soxhlets i Diclormetà acidificat amb àcid ortofosfòric com a dissolvent.

Aquest estudi el farem amb dos tipus de mostres representatives de processos adobers: una mostra de pell al Crom (WetBlue) i una pell de curtició vegetal greixada i acabada.

- Instrumental -

- Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC): Water Cromatògraf líquid ALLIANCE 2695 Separations Module de WATERS amb detector PhotoDiode Array (PDA) 2996 de WATERS, amb una columna del tipus Columna Xterra™ MS C_{18} 5 µm 3,9 mm x 150 mm de WATERS
- Instrumental de laboratori tal com matrassos aforats, rotavapor, bomba de buit, Soxhlet, etc.

4.1.- MOSTRES de pell curtida al Crom (WetBlue)

-Mostres-

- Mostra de pell comercial de WetBlue (125grams aprox.)

-Planteig del procediment-

Al no existir cap mètode oficial, buscant en la bibliografia no trobem un temps d'extracció establert fixa, tot i que hem trobat que per una mostra de pell sense desfibrar en un bany de 30 minuts d'ultrasons i posteriors extraccions amb Soxhlet al voltant de les 7,5 hores s'obtenen bons resultats[46].

Nosaltres farem l'estudi a 2,4 i 6 hores d'extracció. Els motius pels quals nosaltres reduïm el temps en comparació amb altres estudis son:

- Condicionarem la pell assecant-la completament per assegurar que l'extracció sigui Sòlid-Líquid evitant Líquid-Líquid.
- Triturarem la pell amb un molí fins a un tamany inferior als 2mm. (A major superfície de contacte major eficiència en l'extracció)

- Acidifiquem el diclormetà per assegurar l'estabilitat dels fungicides, en especial del TCMTB

La composició de la fase mòbil en el cromatògraf ja ha sigut estudiada[47] i serà 30% H2O Milli-Q 30% Metanol i 40% Acetonitril. Pel que fa al procediment seguirem els mateixos passos que el PNT HPLC101: Determinació de TCMTB en les pells del Gener de 2004.

-Procediment experimental-

Les extraccions les realitzem segons el Procediment Normalitzat de Treball PNT HPLC101 (veure pàgina 67). Els passos a seguir de forma breu son:

a) Acondicionament de la pell i triturar-la
b) Extracció en un Soxhlet amb diclormetà
c) Condicionament del extracte obtingut per l'anàlisi cromatogràfic
d) Anàlisi per cromatografia líquida

Totes les mostres les determinem per duplicat i els resultats que obtenim són els següents per les mostres de WetBlue són:

Mostres WetBlue										
Mostra	Pes Mostra (g)	Extracció (h)	Resultats HPLC (ppm)			mg fungicida/ Kg de pell‡			RESULTATS	Dilució
			TCMTB	OPP	PCMK	TCMTB	OPP	PCMK	Mitja TCMTB	mL
1	5,0572	2	23,163	-	-	91,60	-	-	95,83	20
2	5,0421	2	25,223	-	-	100,05	-	-		20
3	4,7586	4	14,656	-	-	61,60	-	-	66,77	20
4	5,1446	4	18,507	-	-	71,95	-	-		20
5	4,0543	6	21,364	-	-	105,39	-	-	103,83	20
6	4,6592	6	23,823	-	-	102,26	-	-		20

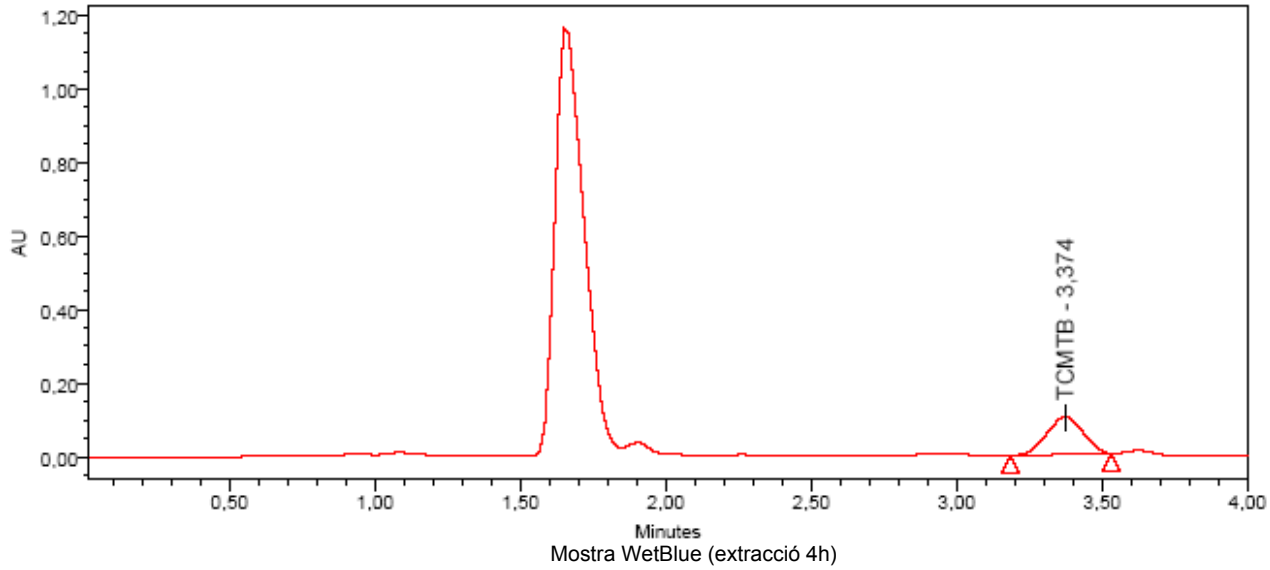
Els càlculs que fem per a determinar la concentració en la mostra pell son:

Xmg/L TCMTB anàlisis · 20mL dilució · (1L/1000mL) = mg TCMTB en la mostra

(mg TCMTB / Xg de mostra) · (1000g / 1Kg) = **mg de TCMTB / Kg de pell**

‡ Resultats sobre pes real de pell acondicionada a 23ºC i 50% d'humitat

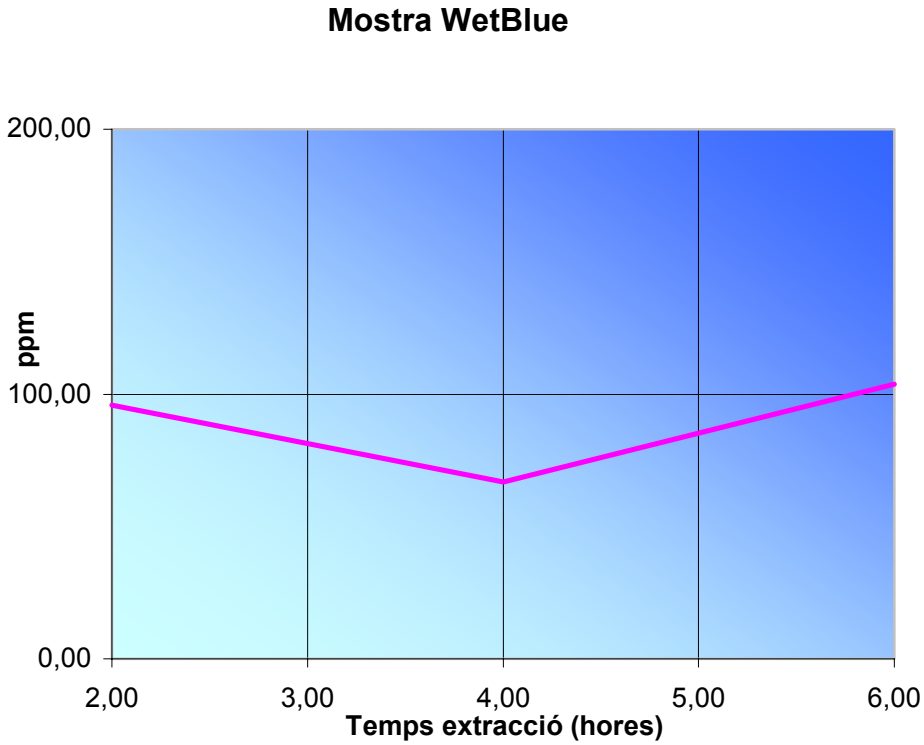
Els cromatogrames que obtenim son del tipus:



Mostra WetBlue (extracció 4h)

***Observacions**:*

Els resultats tot i ser força precisos no són coherents, almenys pel que fa a l'extracció de 4hores ja que obtenim pics mes baixos que a 2 i 6 hores. De forma gràfica es veu ben clar:



En vistes d'aquests resultats decidim modificar el PNT per tal de millorar-lo.

Modificacions del PNT:

→ El punt potser més crític de tota l'extracció es segurament quan evaporem el dissolvent d'extracció (diclormetà acidificat) en el rotavapor fins arribar al punt de sequedat. Si ens passem pot ser que cremem o evaporem l'extracte, així que ara arribarem al punt just abans de sequedat enlloc d'arribar a sequedat total

→ Les dissolucions finals les tindrem sempre tapades per evitar possibles evaporacions, sobretot quan afegim la fase mòbil després del rotavapor .

→ Per assegurar una perfecta homogenització i que el greix no retingui els fungicides agitarem la mostra durant almenys 5 minuts abans de filtrar-la per posar en el vialet.

→ Es innecessari afegir Sulfat Sodi anhidre per eliminar l'aigua quan tenim la mostra dissolta en acetonitril acidificat, ja que es molt poca la quantitat d'aigua i a més, després en el cromatògraf utilitzem aigua ja que la fase mòbil consta de: 30%aigua Milli-Q, 30%Metanol i 40%Acetonitril.

→ Per obtenir cromatogrames amb pics de major àrea reduirem el factor de dilució. Enlloc de diluir a 20mL ho farem en 15mL

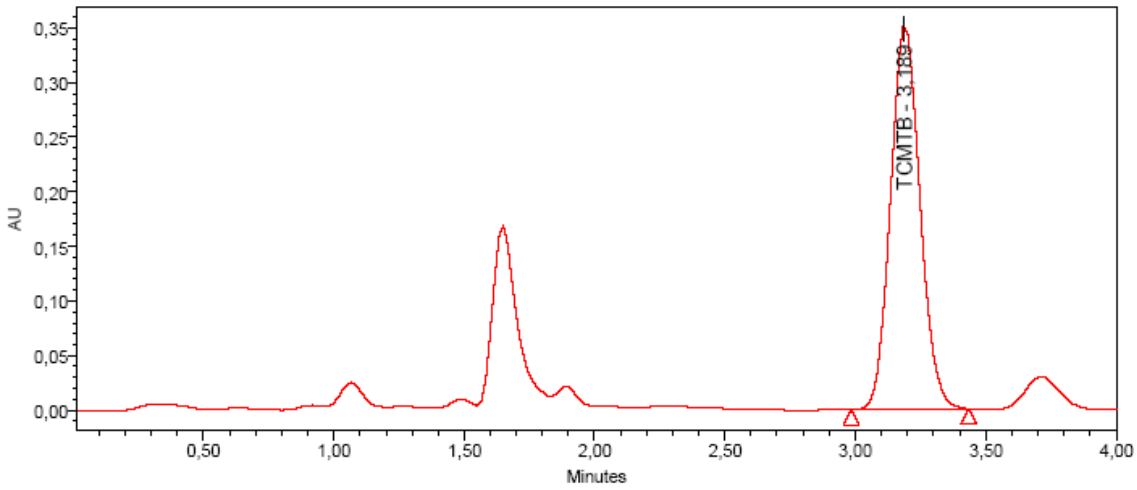
Fetes aquestes modificacions en el PNT els resultats que obtenim canvien notablement com podem veure en aquesta taula:

Mostres WetBlue									
Mostra	***Pes Mostra (g)***	***Extracció (h)***	***Resultats HPLC (ppm)***			***mg fungicida/ Kg de pell[§]***			***Dilució***
			TCMTB	***OPP***	***PCMK***	***TCMTB***	***OPP***	***PCMK***	***mL***
7	4,4216	2	24,294	-	-	**82,42**	**-**	**-**	15
8	4,4363	4	24,405	-	-	**82,52**	**-**	**-**	15
9	4,5113	6	20,137	-	-	**66,96**	**-**	**-**	15

.

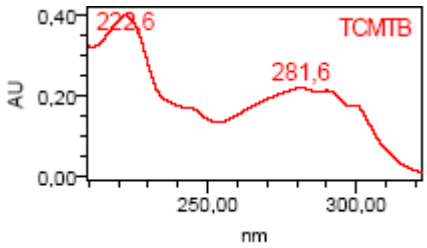
[§] Resultats sobre pes real de pell acondicionada a 23ºC i 50% d'humitat

Els cromatogrames que obtenim son del tipus:

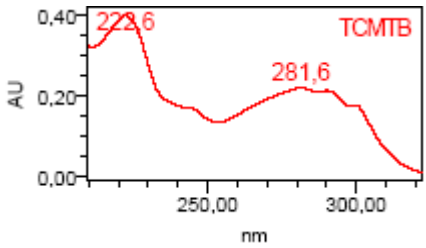


Mostra WetBlue (extracció 4h)

Si comparem espectre ultraviolat del TCMTB de l'anàlisi amb el que tenim dels patrons veiem que aquests coincideixen, son els mateixos.

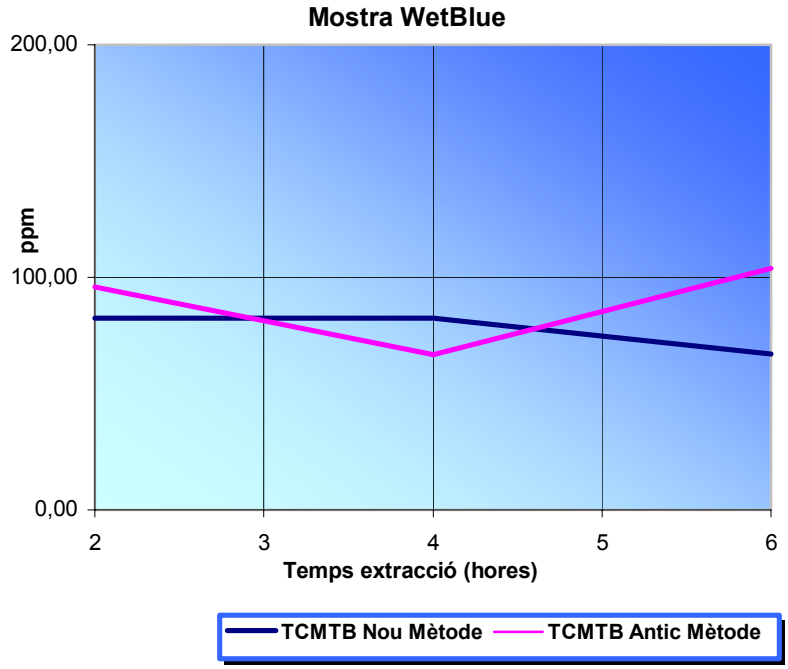


Patró TCMTB



Mostra de pell

Si comparem els resultats obtinguts en un gràfic veiem que:



Observacions:

Els resultats que obtenim son acceptables, la modificació ens ha millorat el mètode i podem dir que en principi l'extracció òptima es a 4 hores. De totes formes, caldrà fer més experiments per confirmar aquests resultats.

Nota:

El nombre d'extraccions aproximades en el Soxhlet és de:

TOTAL EXTRACCIONS				
nº extraccions	*temps (min)*	*2h*	*4h*	*6h*
2	0:05:12	**42**	**84**	**126**
2	0:06:20			

4.2.- MOSTRES DE CURTICIO VEGETAL

-Mostres-

Mostra comercial de curtició Vegetal greixada i acabada (125grams aprox.)

-Procediment experimental-

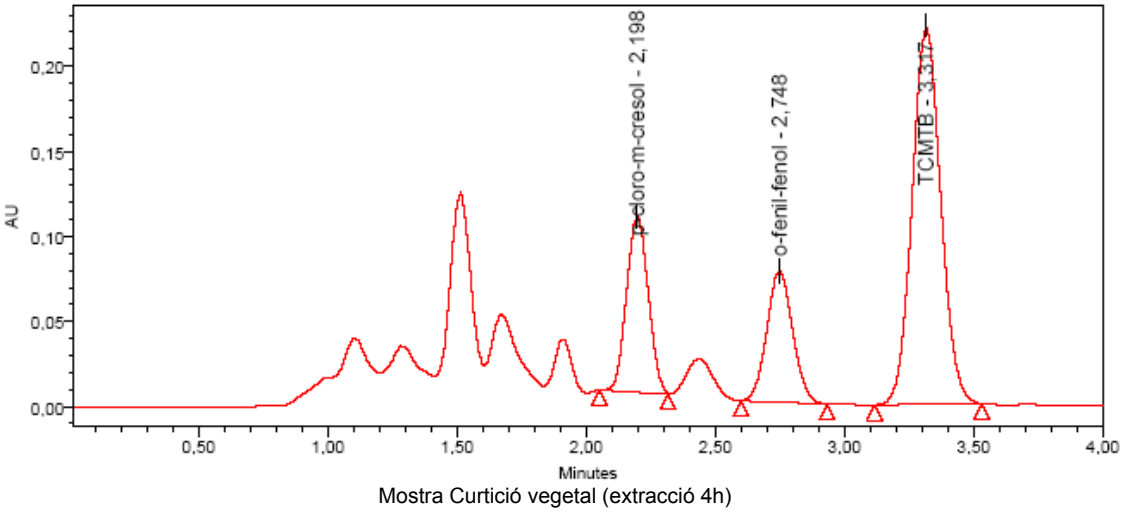
El mateix que hem fet amb les mostres de WetBlue també ho farem amb mostres de curtició vegetal a on també podem trobar notables concentracions de fungicides. Aquestes mostres les treballarem ja amb les noves modificacions del PNT ja fetes anteriorment.

Els resultats que obtenim son:

Mostra de Curtició Vegetal									
Mostra	*Pes Mostra (g)*	*Extracció (h)*	*Resultats HPLC (ppm)*			*mg fungicida / Kg de pell***			*Dilució*
			TCMTB	*OPP*	*PCMK*	*TCMTB*	*OPP*	*PCMK*	*mL*
1	5,0421	2	53,958	25,344	38,787	**160,5**	**75,4**	**115,4**	15
2	4,7586	4	75,22	29,739	47,508	**237,1**	**93,7**	**149,8**	15
3	5,1446	6	80,039	30,317	48,85	**233,4**	**88,4**	**142,4**	15

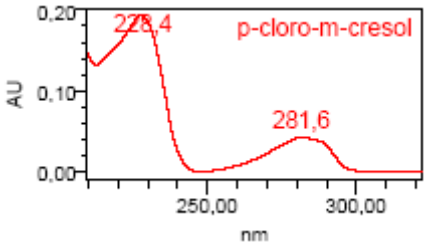
** Resultats sobre pes real de pell acondicionada a 23ºC i 50% d'humitat

Aquesta es una mostra complerta ja que conté els 3 tipus de fungicides buscats en aquest estudi. Els seus cromatogrames son del tipus:

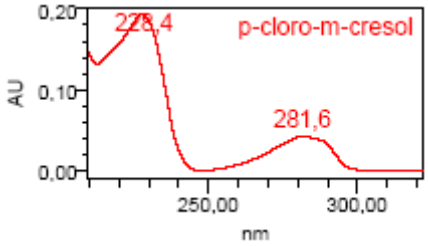


Mostra Curtició vegetal (extracció 4h)

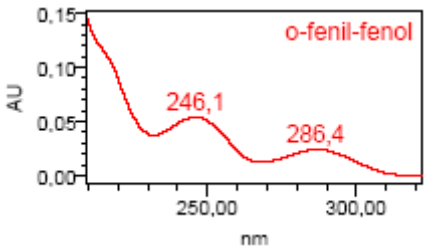
Si comparem l'espectre ultraviolat del OPP i PCMK l'anàlisi amb el que tenim dels patrons veiem que aquests coincideixen, son els mateixos.



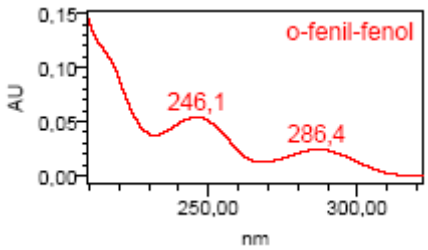
Patró PCMK



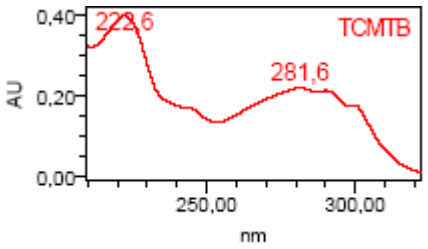
Pic a 2,20min de la mostra de pell



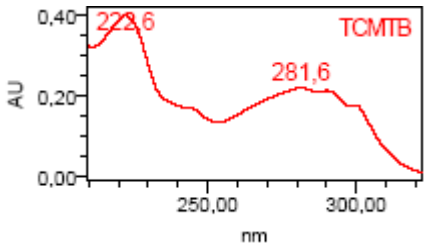
Patró OPP



Pic a 2,75min de la mostra de pell

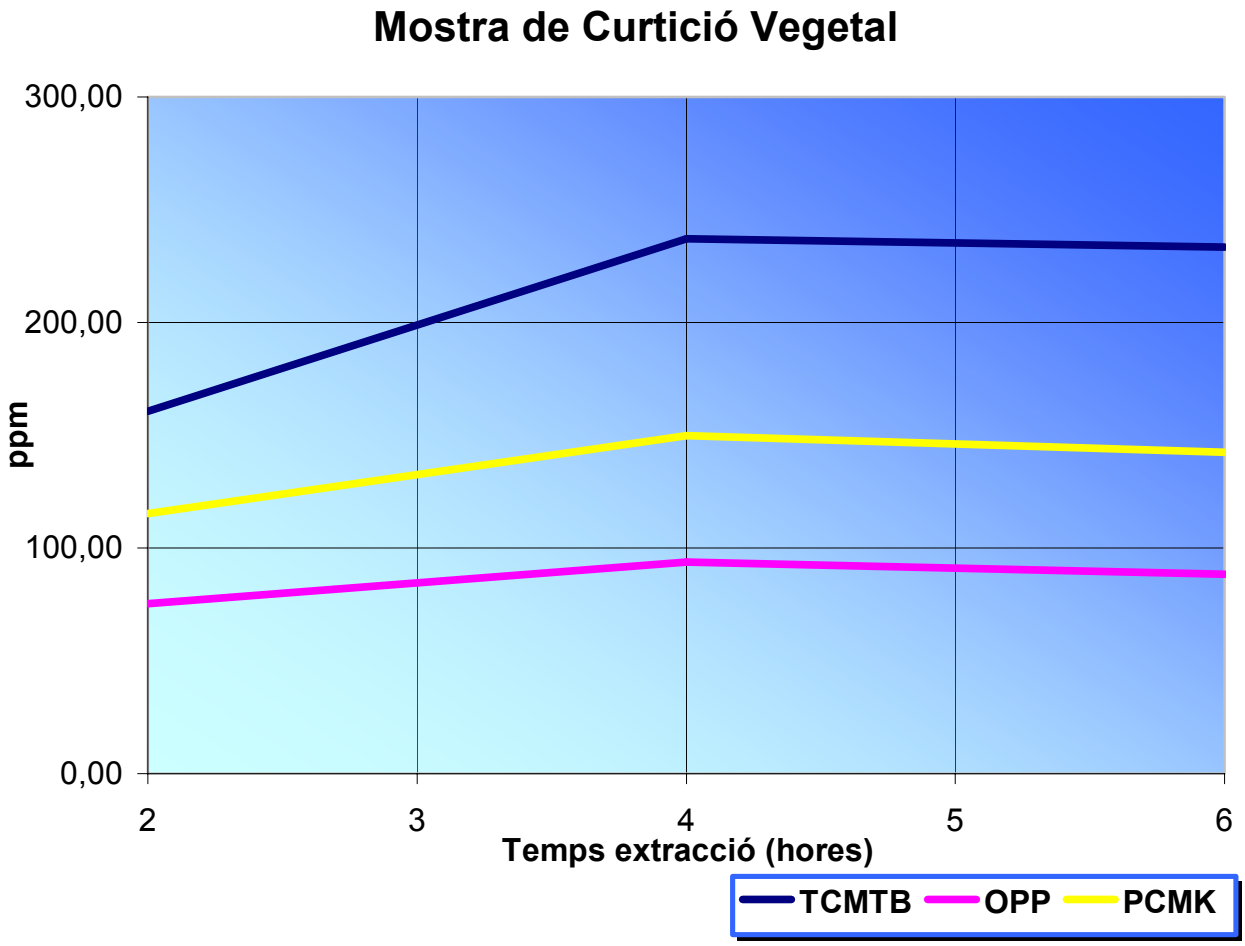


Patró TCMTB



Pic a 3,32min de la mostra de pell

Els resultats expressats de forma gràfica són:



Observacions:

De la mateixa manera que en les postres de WetBlue, el temps òptim d'extracció d'aquestes mostres es de 4hores, ja que es el punt en que els pics son mes alts. A les 2 hores encara no s'han extret del tot, mentre que a 6 hores sembla que aquests es degraden o s'evaporen i obtenim pics lleugerament mes baixos.

Tots els informes cromatogràfics d'aquest estudi estan en l'Annex de la pàgina 7 a 22.

5.- Influència del pH en l'estabilitat del TCMTB

- Objectiu -

Estudiar la influència del pH de la solució extractiva en l'estabilitat del TCMTB així com corraborar els resultats obtinguts en el capítol anterior pel que fa al temps d'extracció.

-Mostres-

Mostra de pell WetBlue (100grams aprox.)

-Planteig del procediment-

Observarem l'estabilitat del TCMTB amb Diclormetà (dissolvent d'extracció) no acidificat durant 4 hores d'extracció. Si els resultats no son bons farem les modificacions necessàries ja sigui en el temps d'extracció com en l'acidificació amb àcid acètic glacial.

Per expressar els resultats aplicarem la Desviació Estàndard (RSD). La RSD descriu la dispersió de les mesures individuals al voltant de la mitjana i ve donada per les fórmules[48]:

$$S = \sqrt{\frac{\Sigma_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2}{n-1}} \qquad RSD(\%) = \frac{\overline{X}}{S} \cdot 100$$

càlcul de la desviació estàndard

- Instrumental-

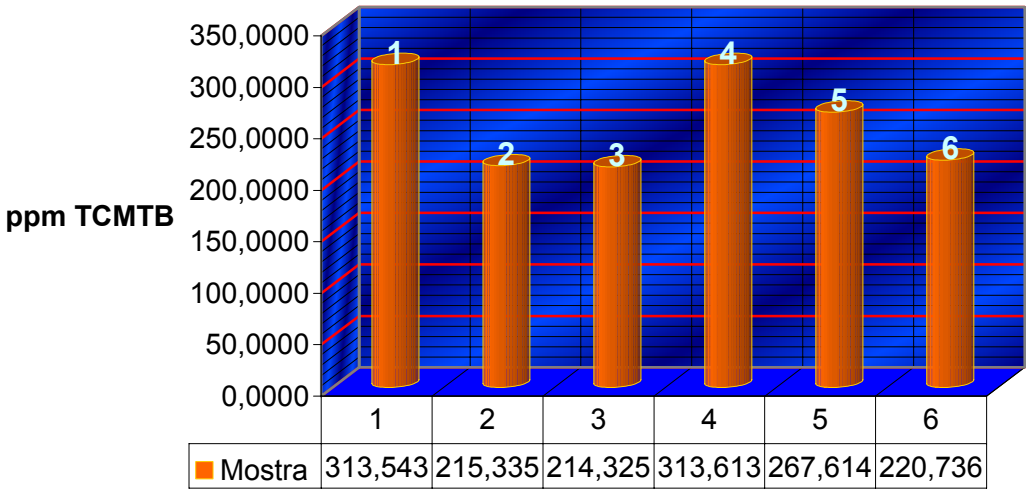
- Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC): Water Cromatògraf líquid ALLIANCE 2695 Separations Module de WATERS amb detector PhotoDiode Array (PDA) 2996 de WATERS, amb una columna del tipus Columna Xterra™ MS C_{18} 5 µm 3,9 mm x 150 mm de WATERS
- Instrumental de laboratori tal com matrassos aforats, pipetes, vasos de precipitats, etc.

5.1.- Clorur de metilè no acidificat, extracció a 4 hores

Analitzarem la mostra de pell WetBlue amb les condicions fixades anteriorment sense acidificar amb àcid acètic glacial. Els resultats que hem obtingut són:

Mostra WetBlue (NO acidificada 4 hores)									
Mostra	Pes Mostra (g)	Extracció (h)	Resultats HPLC (ppm)			mg fungicida/ Kg de Pel[††]			Dilució
			TCMTB	OPP	PCMK	TCMTB	OPP	PCMK	mL
1	4,2994	4	89,87	-	-	**313,55**	-	-	15
2	5,5601	4	79,819	-	-	**215,34**	-	-	15
3	5,8943	4	84,22	-	-	**214,33**	-	-	15
4	5,0775	4	106,158	-	-	**313,61**	-	-	15
5	4,7618	4	84,955	-	-	**267,61**	-	-	15
6	5,0925	4	74,94	-	-	**220,74**	-	-	15

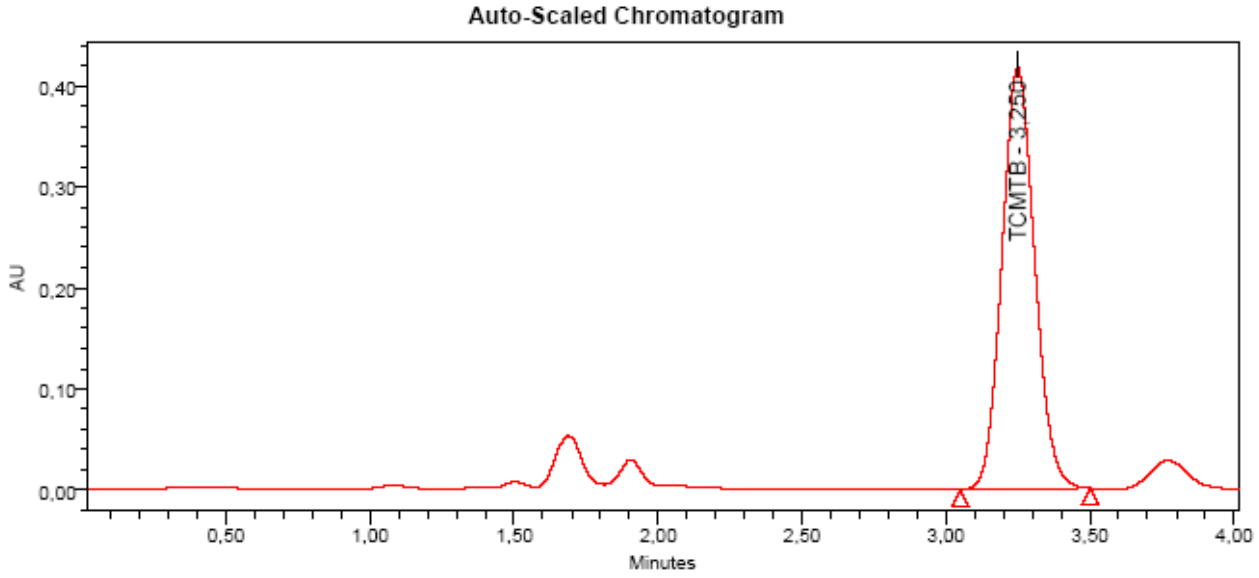
Anàlisi mostra WetBlue No acidificat (4h)



Mitjana	Desviació	RSD (%)	Resultat
264	±49,3988	**±18,6**	**264 mg/Kg**

[††] Resultats sobre pes real de pell acondicionada a 23ºC i 50% d'humitat

Els cromatogrames son del tipus:



Extracció Wetblue 4 hores (NO acidificat)

Observacions:

Es tracta d'una mostra que només conte TCMTB. Obtenim una desviació extremadament elevada, per tant, el resultat que obtenim no son fiables. Provarem ampliant el temps d'extracció durant 6 hores (anteriorment hem vist que de 4 a 6 hores els resultats eren pràcticament els mateixos) ja que potser que en aquesta mostra el TCMTB estigui mes fixada en la mostra.

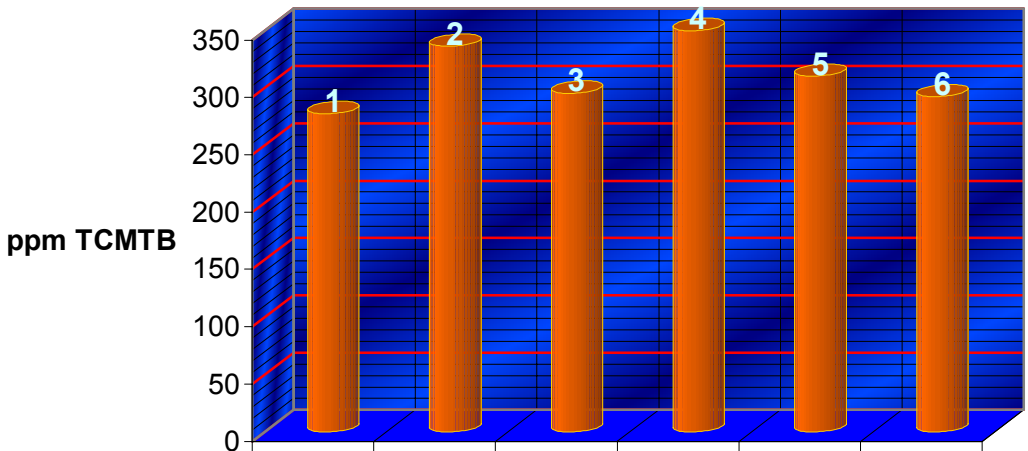
5.2.- Clorur de metilè no acidificat, extracció a 6 hores

El resultat obtingut ens serà útil per col·laborar el que hem dit anteriorment de fixar el temps d'extracció a 4 hores, o no. El resultats que obtenim són els següents:

Desviació del Mètode (NO acidificat 6 hores)									
Mostra	***Pes Mostra (g)***	***Extracció (h)***	***Resultats HPLC (ppm)***			***mg fungicida per Kg de Pell‡‡***			***Dilució***
			TCMTB	***OPP***	***PCMK***	***TCMTB***	***OPP***	***PCMK***	***mL***
1	4,4055	6	61,135	-	-	**277,54**	-	-	20
2	4,0140	6	67,495	-	-	**336,30**	-	-	20
3	4,2088	6	62,148	-	-	**295,32**	-	-	20
4	5,5029	6	102,457	-	-	**372,38**	-	-	20
5	4,0535	6	62,866	-	-	**310,18**	-	-	20
6	4,9745	6	72,708	-	-	**292,32**	-	-	20

‡‡ Resultats sobre pes real de pell acondicionada a 23ºC i 50% d'humitat

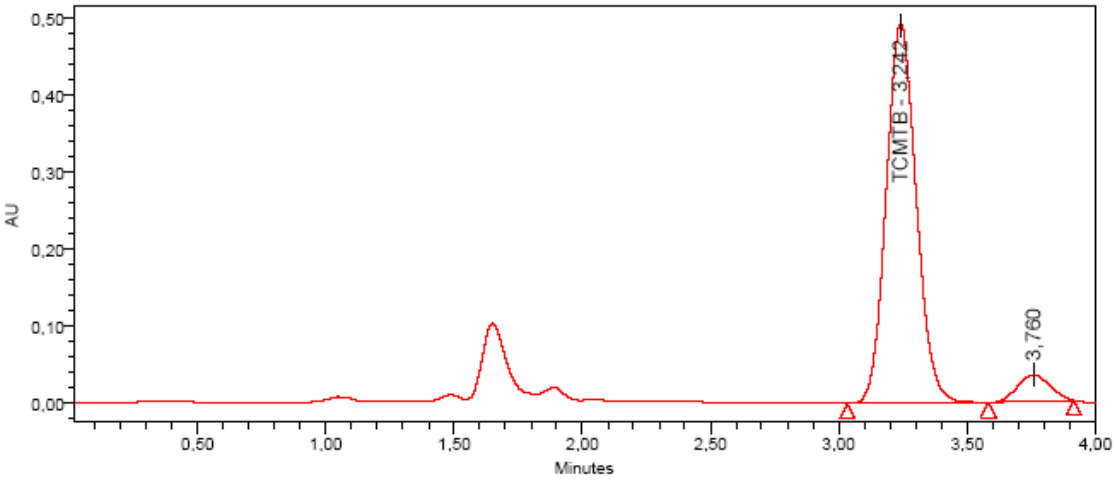
Anàlisi mostra WetBlue NO acidificat (6h)



	1	2	3	4	5	6
Mostra	277,539	336,298	295,324	372,374	310,181	292,322

Mitjana	Desviació	RSD (%)	Resultat
314	±34,8351	±11	314 mg/Kg

Els cromatogrames obtinguts son del tipus:



Mostra WetBlue 6 hores (NO acidificada)

Observacions:

Com que obtenim pics mes elevats (concentracions mes elevades) que en les extraccions anteriors, totes les extraccions a partir d'aquest moment les farem a 6 hores. Hem disminuït la RSD, tot i així els resultats s'han de refusar ja que l'error encara es

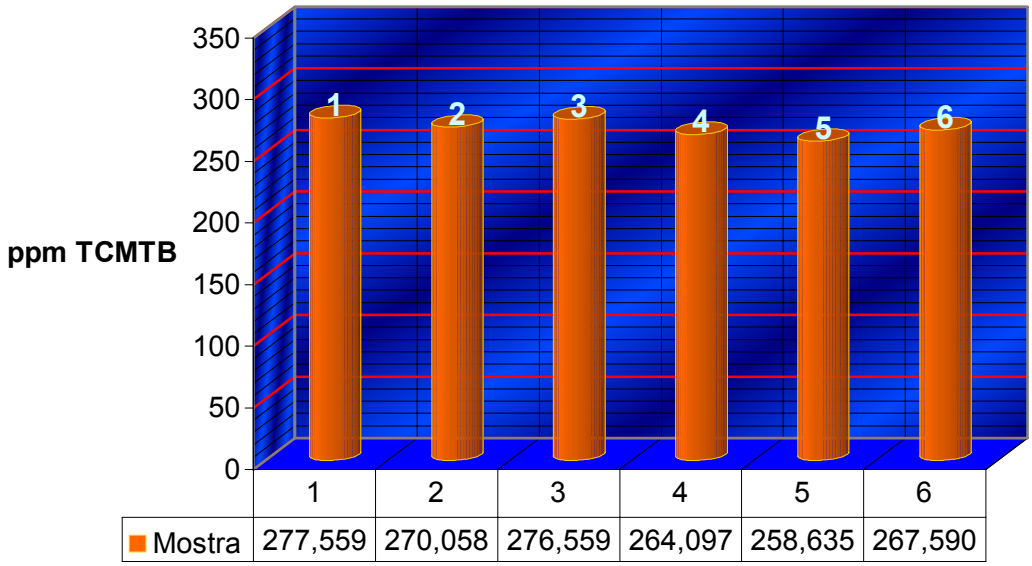
elevat. Caldrà que acidifiquem sempre la mostra per tal d'assegurar la estabilitat del TCMTB.

5.3.- Clorur de metilè acidificat, extracció a 6 hores

Amb la mostra acidificada i fent l'extracció de 6 hores els resultats milloren notablement:

Mostra WetBlue (acidificada 6 hores)									
Mostra	Pes Mostra	Extracció (h)	Resultats HPLC (ppm)			mg fungicida/ Kg de Pell[§§]			Dilució
			TCMTB	OPP	PCMK	TCMTB	OPP	PCMK	mL
1	4,6421	6	64,423	-	-	**277,56**	-	-	20
2	4,8665	6	65,712	-	-	**270,06**	-	-	20
3	4,4065	6	81,244	-	-	**276,56**	-	-	15
4	4,0351	6	71,044	-	-	**264,10**	-	-	15
5	4,0984	6	70,666	-	-	**258,64**	-	-	15
6	4,3922	6	78,354	-	-	**267,59**	-	-	15

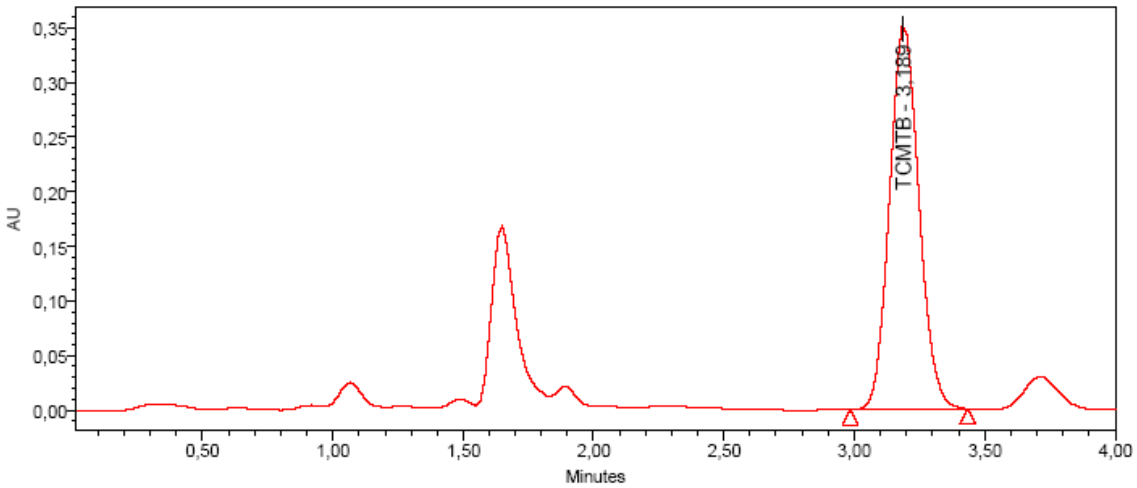
Anàlisi mostra WetBlue acidificat (6h)



Mitjana	Desviació	RSD (%)	Resultat
269	±7,2794	**±2,7**	**269 mg/Kg**

[§§] Resultats sobre pes real de pell acondicionada a 23ºC i 50% d'humitat

Els cromatogrames obtinguts son del tipus:



Mostra WetBlue 6 hores (acidificada)

Observacions:

Aquest resultat es acceptable. Aquesta mostra conté 269mg de TCMTB per Kg de pell amb una desviació estàndard del ±2,7%. Aquesta mostra de pell la utilitzarem més endavant en l'estudi de recuperació del mètode per fortificació.

Tots els informes cromatogràfics d'aquest estudi estan en l'Annex de la pàgina 23 a la 44.

6.- Precisió del mètode

- Objectiu -

Estudiar la repetibilitat dels diferents processos d'aquest mètode tant en la determinació instrumental del cromatògraf com en el procés global que inclou l'extracció de fungicida en la mostra. La precisió estarà focalitzada en el TCMTB ja que es el principal analit d'aquest estudi.

- Instrumental-

- Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC): Water Cromatògraf líquid ALLIANCE 2695 Separations Module de WATERS amb detector PhotoDiode Array (PDA) 2996 de WATERS, amb una columna del tipus Columna Xterra™ MS C_{18} 5 µm 3,9 mm x 150 mm de WATERS
- Micropipetes de 0,5mL, 1mL i 5mL
- Instrumental de laboratori tal com matrassos aforats, pipetes, vasos de precipitats, etc.

6.1.- Repetibilitat de la determinació cromatogràfica

-Planteig del procediment-

Farem un estudi a partir de l'extracte d'una mostra que repartirem en 2 vialets iguals. Farem 3 punxades de cada un, d'aquesta forma podrem fer un càlcul de la desviació instrumental ja que tindrem 6 resultats, en teoria hem de d'obtenir resultats molt precisos ja que les úniques operacions que es fan són injecció, elució i mesura de l'àrea.

-Resultats experimentals-

Després de fer una extracció de 4 hores d'una mostra de pell WetBlue i seguint els passos del PNT modificat anteriorment, hem preparat els dos vialets. Per tal d'assegurar que la columna quedi neta, decidim intercalar un blanc entre cada injecció de mostra.

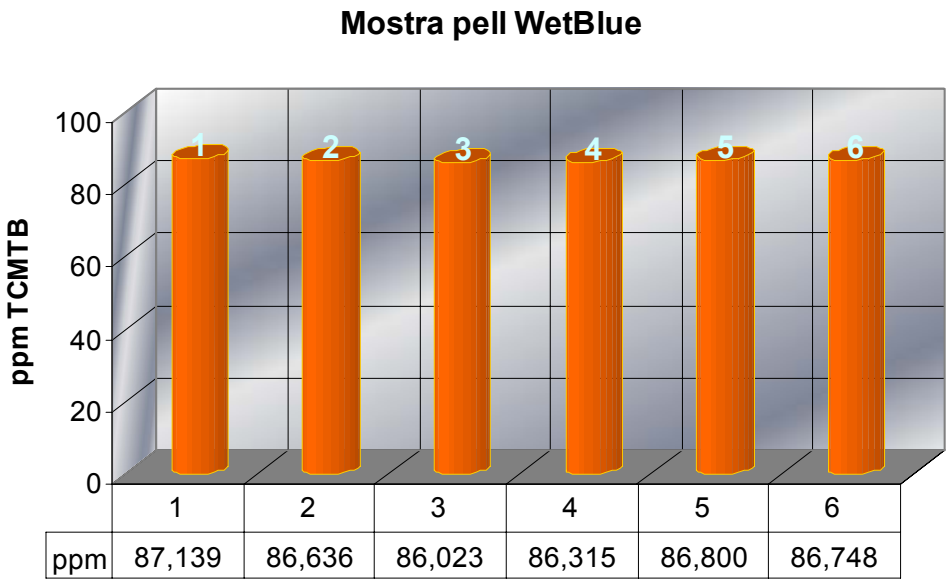
Els resultats que obtenim son els següents:

Càlcul de la desviació Estàndard Instrumental		
Valors HPLC (ppm TCMTB)		**Valor mig (ppm TCMTB)**
Vial 1	87,139	*86,610*
	86,636	**S**
	86,023	*0,3917*
Vial 2	86,315	***Desviació Estàndard (%)***
	86,800	***±0,45***
	86,748	

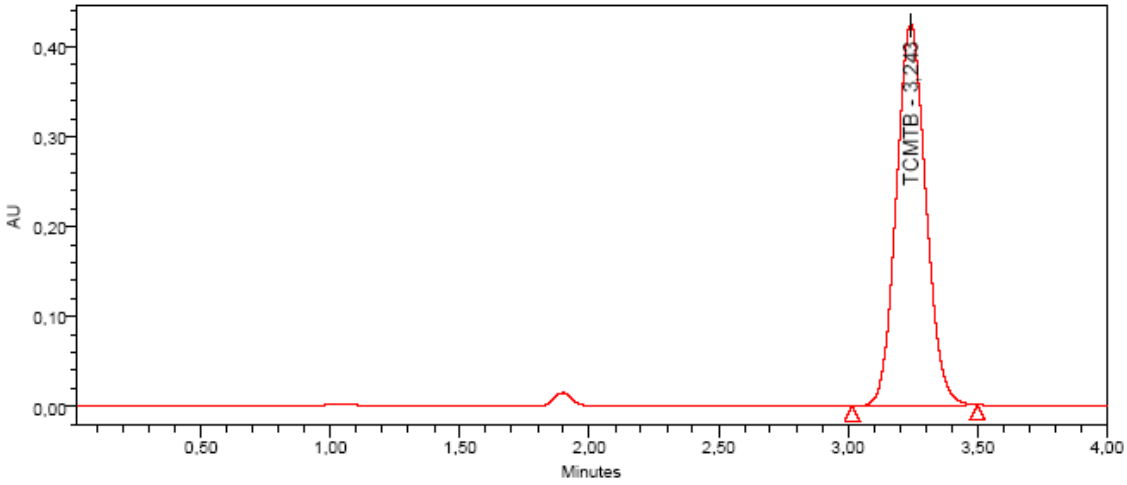
RSD = ±0,45

(veure definició de RSD en la pàgina 46)

Els resultats expressats de forma gràfica queden:



Els cromatogrames son del tipus:



Desviació instrumental del HPLC (mostra B2)

Observacions:

Els resultats obtinguts són molt precisos i ens confirmen la repetibilitat de la determinació cromatogràfica. El resultat es molt bo. Un dels motius d'aquest èxit es que el cromatògraf disposa d'un injector automàtic, la qual cosa ens assegura un volum i un cabal de mostra constant durant l'anàlisi.

Ara coneixem la fiabilitat del instrumental que utilitzem, a continuació el que hem de fixar es quina es la fiabilitat del mètode complert d'extracció i determinació dels fungicides.

Els cromatogrames obtinguts en aquest apartat es troben en l'annex de la pàgina 45 a la 50.

6.2.- Repetibilitat del mètode global

En l'apartat 5.3 hem analitzat una mateixa mostra de pell fent repeticions de forma totalment independent desde el principi (extracció) fins al final (injecció i mesura de l'àrea del pic) Es resultats han estat:

Mostra de pell WetBlue									
Mostra	Pes Mostra	Extracció (h)	Resultats HPLC (ppm)			mg fungicida / Kg de Pell***			Dilució
			TCMTB	OPP	PCMK	TCMTB	OPP	PCMK	mL
1	4,6421	6	64,423	-	-	**277,56**	-	-	20
2	4,8665	6	65,712	-	-	**270,06**	-	-	20
3	4,4065	6	81,244	-	-	**276,56**	-	-	15
4	4,0351	6	71,044	-	-	**264,10**	-	-	15
5	4,0984	6	70,666	-	-	**258,64**	-	-	15
6	4,3922	6	78,354	-	-	**267,59**	-	-	15

Mitjana	Desviació	RSD (%)	Resultat
269	±7,2794	**±2,7**	**269 mg/Kg**

*** Resultats sobre pes real de pell acondicionada a 23ºC i 50% d'humitat

Observacions:

La desviació global és bona, com era d'esperar es superior a la de la injecció per si sola, ja que inclou l'etapa més complicada que és l'extracció i manipulació de l'extracte. Els resultats obtinguts són bons:

Desviació estàndard instrumental	**RSD = ±0,45%**
Desviació estàndard del mètode global	**RSD = ±2,7%**

Els cromatogrames obtinguts en aquest punt estan en l'annex de la pàgina 37 a la 54.

7. - Recuperació del mètode complert

-Planteig del procediment-

Farem un estudi de recuperació per fortificació, es a dir, anàlisi d'una mostra que s'ha fortificat amb una quantitat coneguda d'analit. Aquest tipus d'estudi permet detectar errors sistemàtics deguts a la matriu de la mostra o a l'estabilitat d'aquesta[49].

Per determinar la recuperació per fortificació la mostra es divideix en 2 parts. En una d'elles s'hi afegeix una concentració coneguda d'analit. En la recuperació es mesura la massa de l'analit en les mostres fortificades (F) i la massa de l'analit en les mostres no fortificades (I).

Els càlculs els efectuarem segons la següent equació:

$$recuperació(\%) = \frac{F}{(A+I)} \cdot 100$$

(A es la massa afegida d'analit)

Per tant, aquest estudi de recuperació constarà de diferents etapes:

1.- Quantificació de la mostra no fortificada

2.- Quantificació i càlcul del fungicida en una mostra comercial

3.- Fortificar mostres amb fungicida comercial

4.-Calcul de la nova concentració esperada i analítica

5.-Fixar quin es el percentatge de recuperació

Aquest experiment es repetirà en 5 fraccions idèntiques de la mateixa mostra de pell. La fortificació la farem amb una mostra de biocida comercial sovint aplicat en les indústries adoberes (Butrol 30L).

-Mostres-

Mostra de pell comercial (en aquest cas utilitzarem pell WetBlue)

Mostra de fungicida comercial al 30% (Butrol 30L)

7.1.-Quantificació de la mostra no fortificada

Utilitzarem la mostra de pell WetBlue que ja hem quantificat anteriorment (veure apartat 5.3). Es tracta d'una mostra que conté TCMTB en una concentració de 269mg per Kg de pell amb una desviació estàndard del 2,7%.

Coneguda la concentració podem passar al pròxim pas que serà la quantificació de la solució comercial de fungicida per després fortificar en aquests 269mg de TCMTB per Kg de pell.

7.2.-Quantificació i càlcul del fungicida contingut en la mostra comercial 30%

Sabem que la concentració del producte (Butrol 30L) es d'uns 300.000ppm segons el fabricant, la nostra proposta per poder fer l'analitica en el cromatògraf es la següent: Diluïm aproximadament 3grams de la mostra en 100mL de Metanol (solució A). D'aquesta dissolució n'agafarem 0,50mL per diluir-lo en 50mL de fase mòbil (solució B).

Els càlculs son:

(suposem densitat = 1Kg/L)

Solució A

(300.000mg TCMTB / 1L) · (1L / 10^6mg) · (1000mg/1g) · (3grams de mostra / 100mL de Metanol) · (1000mL / 1L) = 9grams/L de TCMTB = **9000mg / L TCMTB**

Solució B

9000mg / L TCMTB · (1L / 100mL) · (0,5mL Solució A / 50mL fase mòbil) = **90mg/L de TCMTB**

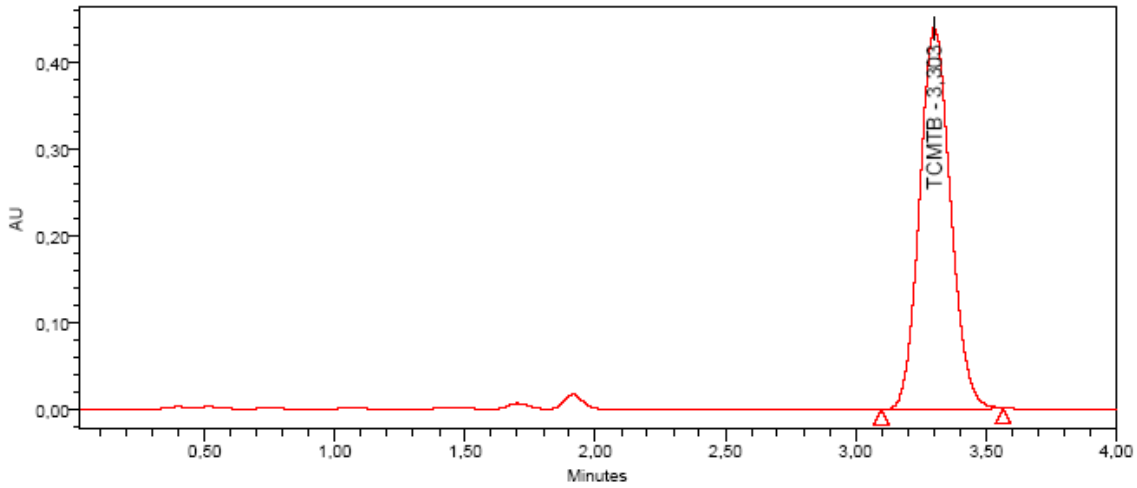
Amb aquesta concentració entrem dins els intervals de la recta de calibratge del cromatògraf. Aquesta analítica la farem per duplicat.

Els resultats experimentals que hem obtingut per les dues mostres son:

Solució comercial TCMTB (Butrol 30L)			
	Vial 1	***Vial 2***	***Unitats***
Dilució	30	30	%
pesada inicial	3,0366	3,0626	g
2a pipetejada	0,5025	0,5025	mL
dilució Sol. A	100	100	mL METANOL
dilució Sol. B	50	50	mL Fase Mòbil
Solució A	9109,8	9187,8	ppm TCMTB
Solució B	**91,553**	**92,337**	ppm TCMTB
resultat HPLC	**80,394**	**81,836**	ppm TCMTB
mostra comercial	**263433**	**265882**	**ppm TCMTB**

Mitjana	Desviació	RSD (%)	mg/L TCMTB (Butrol 30L)
264660	1731,4035	**±0,65**	**264660**

Els cromatogrames obtinguts son del tipus:



Mostra comercial 30% desviació del mètode complert

Oservacions:

El resultat obtingut es bo i fiable, ara coneixem la concentració de TCMTB en la mostra de WetBlue i alhora sabem la concentració de la solució comercial. Arribat aquest punt ja podem fortificar la mostra de WetBlue amb la solució comercial i d'aquesta manera saber quina es la recuperació de fungicida en aquest mètode.

NOTA: Hem tingut que crear aquest mètode per analitzar la concentració de fungicida en una solució comercial, tots els passos a seguir estan explicats en el "PNT HPLC102: Determinació de TCMTB, OPP i PCMK en una solució comercial" (veure pàgina 72).

7.3.- Fortificar les mostres de pell prèviament quantificades

Els càlculs que fem per saber quina es la quantitat de TCMTB en la Solució B (apartat anterior) que hem d'afegir en la mostra de pell son:

Suposem que agafem 4,5grams de pell triturada

Sabem que: la mostra conté 269,0835mg per Kg. de pell de TCMTB amb una desviació de ±2,7%

4,500grams Pell en el cartutx · (269,0835mg TCMTB / 1Kg de pell) · (1Kg / 1000g) = **1,21 mgrams de TCMTB en el cartutx.**

La nostra proposta es augmentar en 0,5 grams la concentració de TCMTB, de manera que ens assegurem estar dins de l'interval de la recta de calibratge. Així la concentració de TCMTB en el cromatograma ens quedarà:

1,21 + 0,50 = **1,71 mgrams de TCMTB en el cartutx**
(1,71mgrams de TCMTB / 20mL dissolució fase mòbil) · (1000mL / 1L) = **85,5mg/L de TCMTB**

En el cas que la recuperació fos del 100% en el cromatograma ens hauria de sortir una concentració de 85,5mg/L

Per saber quin es el volum que cal afegir de solució comercial de TCMTB, els càlculs son:

Suposem una solució de 90mg/L de TCMTB
0,50 mg de TCTMB que volem afegir · 1L/90mg TCMTB = 0,0055L **= 5,5mL que cal afegir de solució 90ppm de TCMTB**

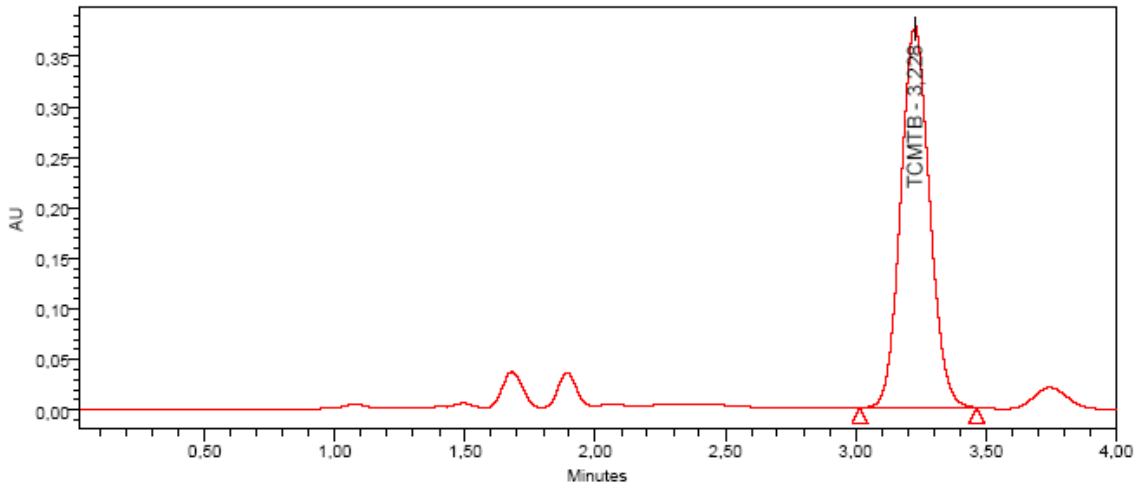
En el moment de fortificar la mostra agafarem els 5,5mL de la solució (veure punt 7.4) i els desarem a sobre del cartutx a on hi ha la pell, esperarem aproximadament uns 30minuts per tal d'assegurar que s'hagi absorbit tot i procedirem a fer les extraccions amb Acetonitril acidificat durant 6 hores.

7. 4.-Càlculs, analítica i fixar quin es el percentatge de recuperació

Preparem unaltre dissolució de TCMTB (per tal que sigui el mes fresca possible) seguint exactament els mateixos passos que en l'apartat 7.2 (PNT HPLC102). Procedim a l'anàlisi d'aquesta mostra per fortificar la pell (per duplicat). Trobem que conté 93,047ppm de TCMTB.

Anàlisis solució comercial 30%		
mostra 1a	*93,017*	*ppm TCMTB*
mostra 2a	*93,077*	*ppm TCMTB*
Mitjana	**93,047**	**ppm TCMTB**

Els cromatogrames que obtenim son del tipus (veure annex pàgina 51 i 52):



Desviació del mètode complert

7.5.-Fixar quin es el percentatge de recuperació

Per conèixer quin es el percentatge de recuperació del mètode ho hem fet amb 5 mostres de pell WetBlue que hem analitzat prèviament per després fortificar-les. La taula de característiques de les mostres (resultats experimentals) son els següents:

	mostra de pell no fortificada (I)			concentració afegida d'analit (A)			A + I
Mostra	*Pes Mostra (g)*	*mg Kg/ pell*	*mg TCMTB*	*ppm*	*mL afegits*	*mg TCMTB*	*mg totals TCMTB*
1	4,0893	269,08	**1,100**	93,047	5,00	**0,465**	**1,566**
2	4,6024	269,08	**1,238**	93,047	5,00	**0,465**	**1,704**
3	4,1851	269,08	**1,126**	93,047	5,00	**0,465**	**1,592**
4	4,1692	269,08	**1,122**	93,047	5,00	**0,465**	**1,587**
5	4,1023	269,08	**1,104**	93,047	5,00	**0,465**	**1,569**

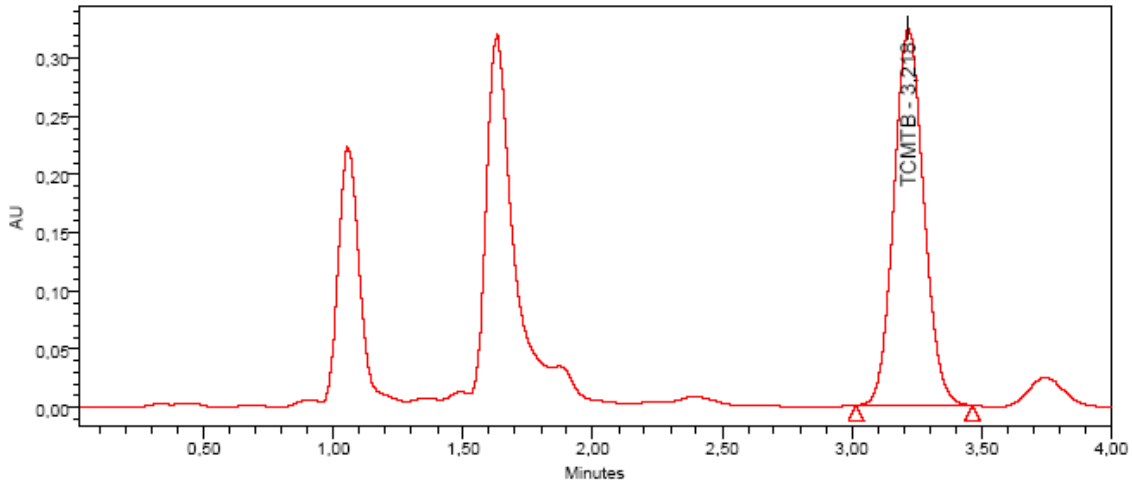
mostra fortificada (F)			*RECUPERACIÓ (%)*
ppm TCMTB (HPLC)	*mg TCMTB/ Kg de Pell*	mg TCTMB	*r(%) = F / (A+i) · 100*
66,843	326,917	**1,337**	**85,38**
70,985	308,469	**1,420**	**83,32**
68,732	328,460	**1,375**	**86,37**
69,199	331,953	**1,384**	**87,20**
67,160	327,426	**1,343**	**85,60**

El resultat final de la recuperació del mètode analític global es:

Mitjana	Desviació	RSD (%)	Resultat
85,58	±1,4473	±1,7	85,58%

Els cromatogrames tenen un pic similar al de la pell sense fortificar (el pic no es mes alt) ja que els factors de dissolució influeixen directament en l'àrea de cada pic. A més dilució, menor àrea del pic.

Els cromatogrames obtinguts de l'anàlisi son del tipus:



Mostra enriquida amb solució comercial

Observacions:

El resultat obtingut es bo i fiable. Una recuperació superior al 80% per un mètode analític d'aquestes característiques en què les concentracions de l'analit es mesuren en l'ordre de ppms es considera molt bo. Per tant podem afirmar que aquest mètode és fiable.

Tots els cromatogrames obtinguts en aquest capítol estan a l'annex de la pàgina 51 a la pàgina 57.

8. - Aplicació del mètode

- Objectiu -

Aplicar el mètode elaborat en diferents mostres reals per tal d'observar si es presenten problemes o dificultats no previstes en els Procediments Normalitzats de Treball. Aquest estudi es realitzarà en 3 mostres de diferents parts d'una mateixa pell. Dóna't que les diferents parts d'una pell no son uniformes podríem observar diferents concentracions de fungicides en funció de la localització de la presa de mostra. Les mostres seran de "garra", "falda" i "serratge". A més, hi ha una mostra totalment desconeguda que ni tant sols sabem si conté fungicida. En aquest estudi podrem demostrar l'aplicació del mètode.

- Instrumental-

- Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC): Water Cromatògraf líquid ALLIANCE 2695 Separations Module de WATERS amb detector PhotoDiode Array (PDA) 2996 de WATERS, amb una columna del tipus Columna Xterra™ MS C_{18} 5 µm 3,9 mm x 150 mm de WATERS
- Instrumental de laboratori tal com matrassos aforats, pipetes, vasos de precipitats,
- Filtres per al Cromatògraf Millipore Type HN 0,45µm

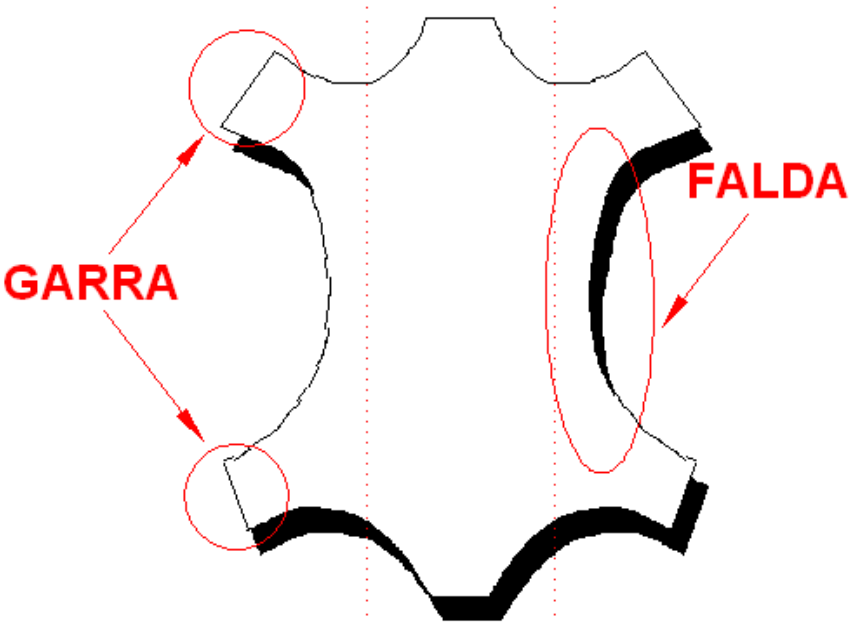
-Mostres-

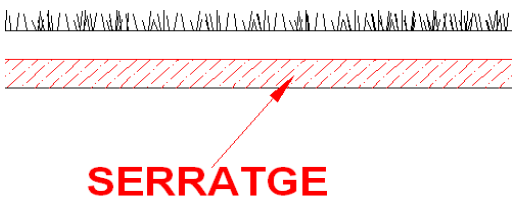
Les mostres han estat cedides per l'empresa "Industrial Igualadina, S.L.", aquestes mostres WetBlue són de diferents parts d'una pell:

- *Serratge*
- *Falda*
- *Garra*
- *Mostra no identificada*

Coneixem pel fabricant que les tres primeres mostres contenen fungicides comercials, mentre que la última desconeixem si en té.

A continuació tenim un gràfic il·lustratiu de quines son les parts de la pell on hem fet el mostreig:



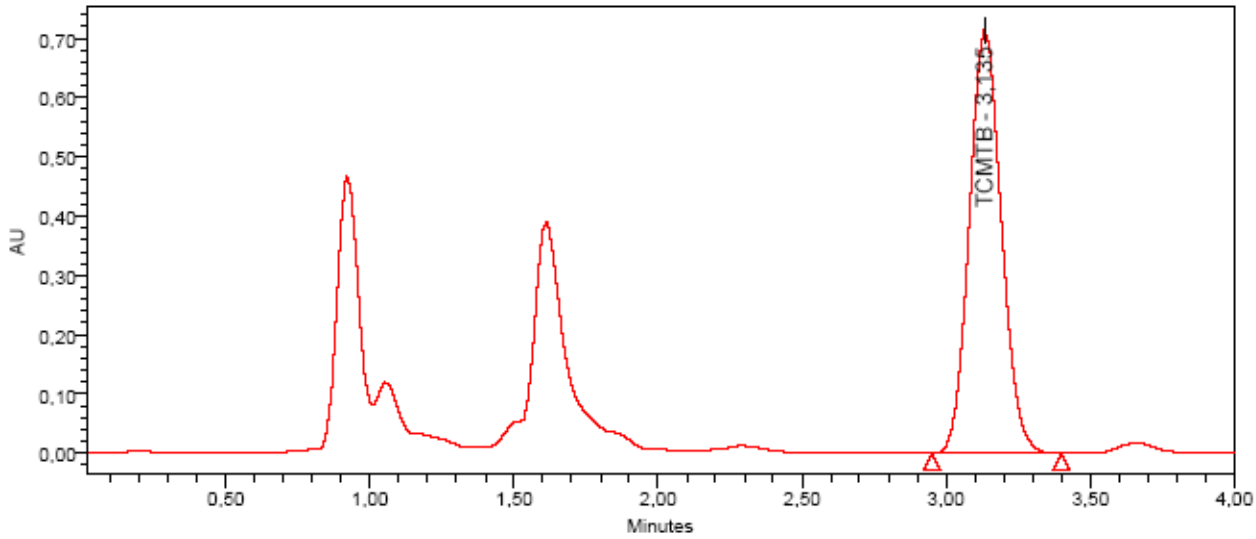


El "serratge" es la làmina inferior (interna) de la pell mentre que la "garra" son les extremitats i la "falda" la part compresa entre les garres i l'esquena.

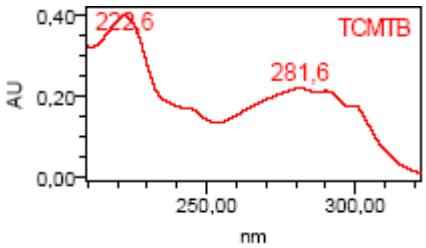
-Resultats experimentals-

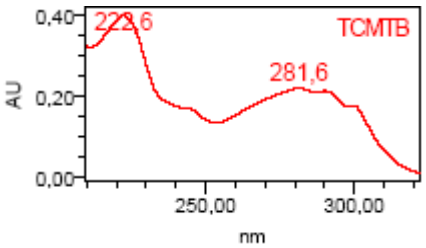
Els cromatogrames obtinguts per a cada mostra son els següents:

GARRA



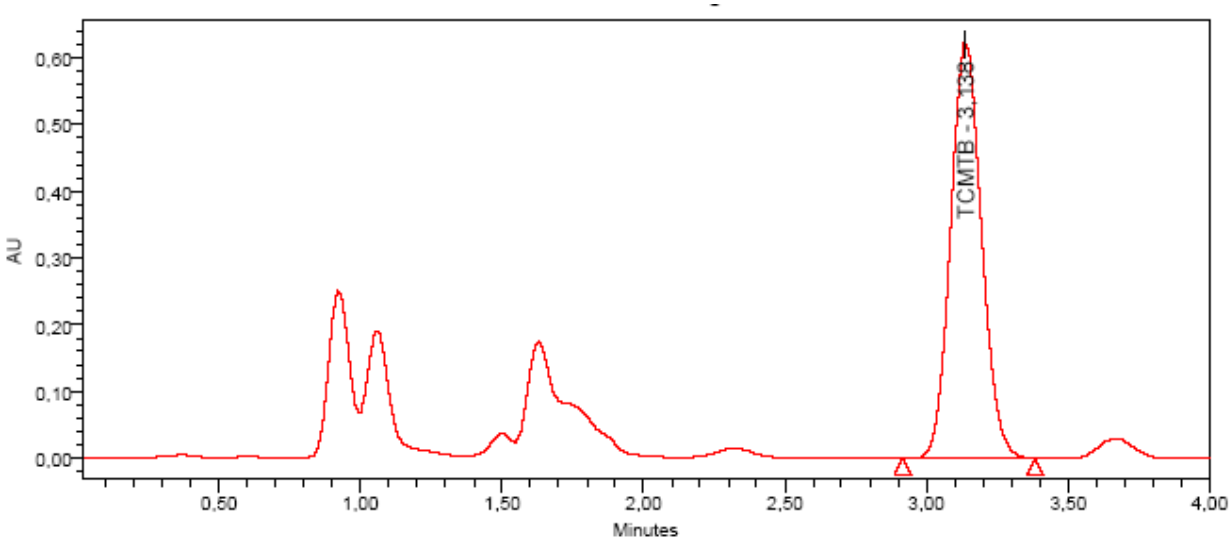
Si comparem l'espectre ultraviolat del pic de 3,135 minuts de temps de retenció amb el patró, confirmem que es tracta de TCMTB:



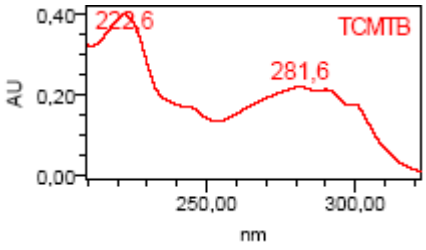


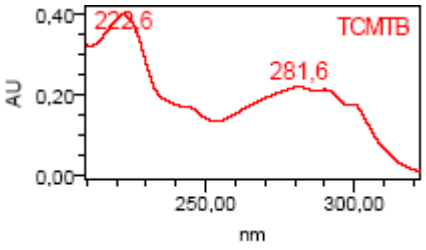
Patró TCMTB ***Mostra de pell ("Garra")***

SERRATGE



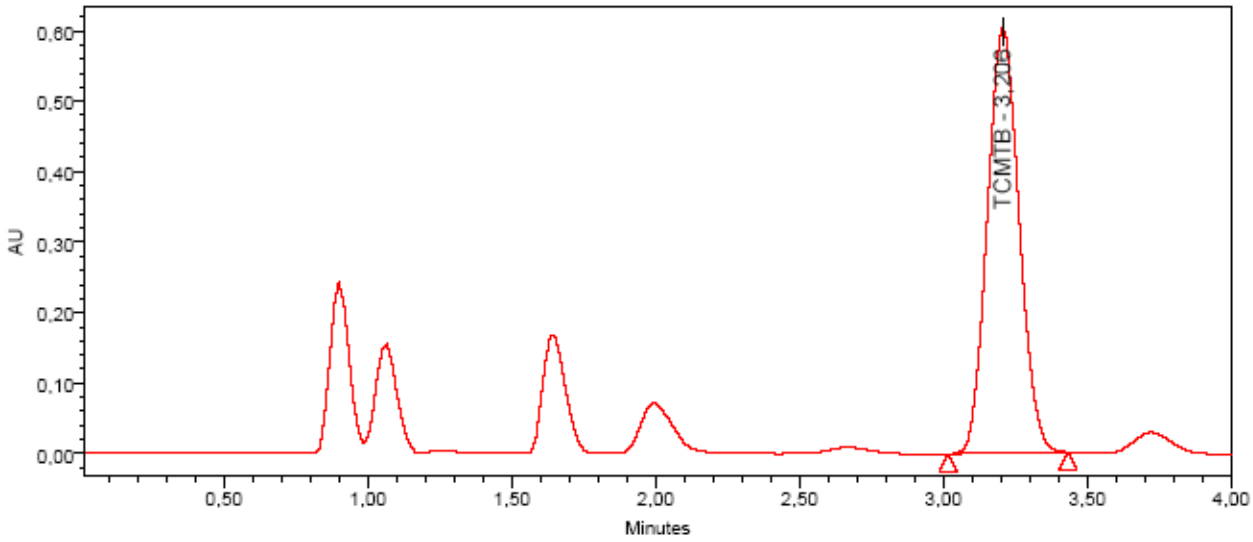
Si comparem l'espectre ultraviolat del pic de 3,138 minuts de temps de retenció amb el patró, confirmem que es tracta de TCMTB:



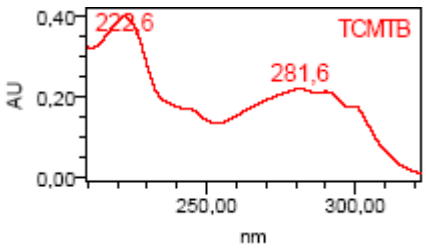


Patró TCMTB ***Mostra de pell ("Serratge")***

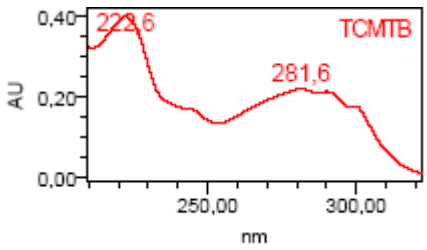
FALDA



Si comparem l'espectre ultraviolat del pic de 3,200 minuts de temps de retenció amb el patró, confirmem que es tracta de TCMTB:

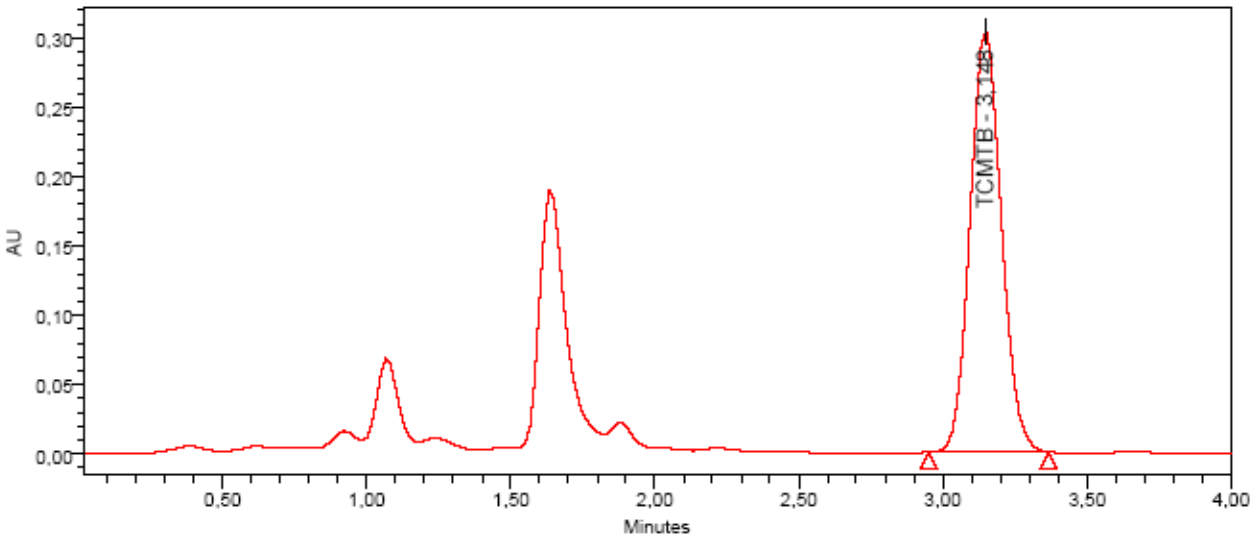


Patró TCMTB

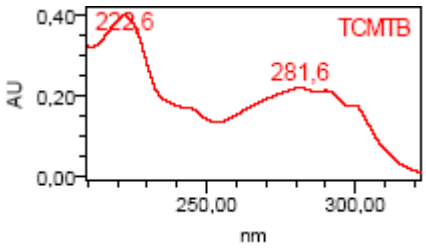


Mostra de pell ("Falda")

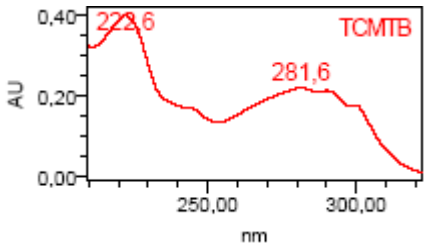
MOSTRA NO IDENTIFICADA



Si comparem l'espectre ultraviolat del pic de 3,148 minuts de temps de retenció amb el patró, confirmem que es tracta de TCMTB:



Patró TCMTB



Mostra de pell desconeguda

Observacions:

El fungicida contingut en les 4 mostres es únicament TCMTB. No hem detectat cap presència de OPP ni de PCMK.

El cromatogrames són correctes, l'absorbància es inferior a 1. El TCMTB apareix abans del temps normal entre 3,2 i 3,3minuts, això potser degut a les elevades temperatures de l'estiu ja que estàvem a 28ºC a la sala de cromatògraf quan la temperatura estàndard de treball de la columna es de 25ºC.

La identificació del TCMTB s'ha confirmat sense cap mena de dubte per l'espectre ultraviolat en les 4 mostres.

Podem afirmar que la mostra desconeguda conté també un fungicida, el TCMTB, però en menor concentració que les altres mostres conegudes.

Hem seguit tots els passos segons l'actualització del PNT HPLC101. Els resultats han sigut:

Mostra	Pes (g)	Dilució (mL)	Analítica HPLC (ppm)			*mg fungicida/ Kg de Pell*		
			TCMTB	OPP	PCMK	TCMTB	OPP	PCMK
Garra	4,5843	20	140,674	-	-	**613,7**	0	0
Serratge	4,7034	20	120,953	-	-	**514,3**	0	0
Falda	4,7706	20	118,050	-	-	**494,9**	0	0
Desconegut	4,4481	20	59,358	-	-	**266,9**	0	0

En resum els resultats són:

Mostra	*mg TCMTB / Kg de Pell*[†††]
Garra	**613,7**
Serratge	**514,3**
Falda	**494,9**
Desconegut	**266,9**

Tots els cromatogrames obtinguts en aquest capítol estan a l'annex de la pàgina 58 a la 61.

[†††] Resultats sobre pes real de pell acondicionada a 23ºC i 50% d'humitat

9.- Procediments Normalitzats de Treball (PNT)

(Les modificacions realitzades estan de color vermell)

1.- Fonament.-

Extracció del 2-(tiocyanometiltiol)benzotiazol (TCMTB), ortofenilfenol (OPP) i P-Cloro-m-Cresol contingut en una pell amb diclormetà. L'extracte s'injecta, a continuació, en un cromatògraf líquid amb columna Xterra™ MS C_{18} i detector PDA.

Per a la utilització del cromatògraf líquid, consultar prèviament el PNT **HPLC001.**

2.- Mostres a les quals es poden aplicar.-

Aquest procediment es pot aplicar als diferents tipus de pell que existeixen tan en adobament vegetal com al crom.

3.- Material.-

3.1.- Productes i reactius.

- ✓ Acetonitril Cod: 1000301000 *MERCK* Qualitat*: grado gradiente para cromatografia en fase gas*
- ✓ Àcid acètic glacial Cod: 401391 *CARLO ERBA* Qualitat*: RPE*
- ✓ Àcid orto-fosfòric 85% Cod: 131032 *PANREAC* Qualitat*: PA*
- ✓ Metanol (CH_3OH) Cod: 131091 *PANREAC* Qualitat*: PA*
- ✓ Diclorometano estabilizado con amileno Cod: 211254 *PANREAC* Qualitat*: QP*
- ~~✓ Sulfat sòdic anhidre Cod: 48704 *PROBUS*~~
- ✓ Aigua ultrapura

.- Solució de diclorometà acidificat: diclormetà amb 0,1% de CH_3COOH

Es preparen 300 mL de diclormetà i s'afegeixen 0,3 mL d'àcid acètic glacial.

.- Solució acetonitril acidificat : Acetonitril : H_3PO_4 20 mM (85:15).

3.2.- Aparells.

- ✓ Cromatògraf líquid ALLIANCE 2695 Separations Module de WATERS amb detector PhotoDiode Array (PDA) 2996 de WATERS.
- ✓ Columna Xterra™ MS C_{18} 5 µm 3,9 mm x 150 mm de WATERS
- ✓ Equip rotavapor amb bomba de buit
  - Controls: HEIDOLPH VV2001
  - Bany: HEIDOLPH OB2001
  - Bomba de buit: DINKO Mod. D-9

- ✓ Balança analítica Mettler Toledo AB204
- ✓ Placa calefactora PSelecta
- ✓ Aparell d'aigua ultrapura Milli-Q plus Millipore
- ✓ Molí Wiley Mill Standard model N 0.3

3.3.- Altres materials.

- ✓ Material habitual de vidre de laboratori.
- ✓ Equip d'extracció: Soxhlet de 50 mL i refrigerant adequats per a un matràs baló de 125 mL esmerilat.
- ✓ Adaptadors de vidre.
- ✓ Paper de filtre de 11x13 cm per a fabricar el cartutx d'extracció.
- ✓ Motlle cilíndric de 2,5 cm aproximadament per a fabricar el cartutx d'extracció.
- ✓ Xeringa de vidre de 10 mL. Seringue hypodermique interchangeable RUTHE
- ✓ Filtres MILLEX–HV non-sterile 0,45 µm SLHV 025 NS Solvent resistent MILLIPORE
- ✓ Vials de vidre amb tap de rosca i junta de tefló.
- ✓ Pipetes de volum variable de 1000p Gilson Pipetman
- ✓ Pipeta de volum variable de 5 mL LABMATE HTL

4.- Preparació de la mostra.-

S'acondiciona la pell durant el temps necessari per tenir un pes constant en una habitació climatitzada a 23ºC i 50% d'humitat.

Es fabrica un cartutx d'extracció amb un rectangle de paper de filtre de 11x13 cm aproximadament. S'enrotlla el paper en el motlle cilíndric i es tanca per un extrem.

Un cop seca, es tritura la pell en el molí i es pesa, amb exactitud, entre 4 - 5 g. en la balança analítica.

S'introdueix la pell al interior del cartutx d'extracció i es tanca la part superior i s'introdueix en el Soxhlet.

Es procedeix a muntar l'estructura del Soxhlet.

S'afegeix un volum aproximat de 75 mL de diclormetà acidificat en el Soxhlet i es connecta la placa calefactora per a començar la extracció.

L'extracció té una durada de 6 hores, es a dir el que equival a unes 125extraccions aproximadament.

Obtingut l'extracte (procurant deixar un volum entre 2 i 5mL), es transfereix a un baló de 50mL i es redueix el volum mitjançant el rotavapor fins just abans d'arribar a sequedat, vigilant de no cremar el residu.

A l'extracte se li afegeixen 15mL (pipeta) de fase mòbil (acetonitril acidificat). En algunes mostres, com alguns WetBlue, que tenen molt TCMTB, es recomanable afegir 20 mL de fase mòbil en lloc dels 15. Es tapa el baló i es remena durant 5minuts per assegurar la dissolució del TCMTB. En mostres amb molt de greix por ser recomanable remenar els 5 minuts en un aparell d'ultrasons.

~~Un cop enrasat i ben homogenitzat agitar durant 2 minuts, s'ha d'assecar tota l'aigua de la solució, per tant, afegir una mica de sulfat sodi anhidre abans de l'anàlisi per HPLC.~~

Preparació de 500mL d'acetonitril acidificat (85:15)

85% Acetonitril (*MERCK* Qualitat*: grado gradiente para cromatografia) →425mL*

15% Solució d'àcid ortofosfòric 20mM *→75mL*

Pesem 0,173 grams de H_3PO_4 85% (Qualitat PA) amb un comptagotes i els diluïm en 75mL d'aigua ultrapura (Milli-Q), mesclem fins que la dissolució sigui homogènia. Enrasem en un matraç aforat fins a 500mL amb Acetonitril i agitem fins que la mescla sigui homogènia.

Es connecta un filtre en la boca de la xeringa de vidre i tot el conjunt es subjecta amb un conjunt de pinces amb el seu corresponent peu metàl·lic.

S'introdueix uns 1,5 mL de la solució problema en la xeringa, amb l'ajuda d'una pipeta, i amb l'èmbol es fa passar a través del filtre cap a l'interior del vial.

Muntatge de la xeringa.

Observacions:

Cal dir que el greix que s'ha extret de la pell no es dissol en acetonitril i aquest queda dipositat en la base del matràs.

A més a més calen els dissolvents àcids per la estabilitat del TCMTB.

Per aquest motiu es realitza l'agitació de 2 minuts perquè el greix no retingui TCMTB.

5.- Programa de cromatografia.-

Les condicions cromatogràfiques que s'han introduït en el cromatògraf són les següents:

Programa d'adquisició de dades:

Projecte: BIOCIDAS

Equip: Alliance

Method Set: PCMK_OPP_TCMTB01

Volum d'injecció: 10,00 µL

Fase mòbil: 30% Metanol; 30% H_2O Milli-Q; 40% Acetonitril : H_3PO_4 20 mM (85:15)

Fluxe fase mòbil : 1,2 mL/ min

Mode: isocràtic

Detector:

Tipus: PDA

Longitud d'ona: 210 – 325 nm

Du*ració del programa*: 4 min.

Per a realitzar una injecció de mostra en el cromatògraf cal seguir els passos descrits en el PNT **HPLC002** sobre la utilització del programa Empower i l'adquisició de dades.

6.- Interpretació dels cromatogrames.

En el cromatograma obtingut s'obtindrà la concentració del TCMTB.

.- Càlculs:

$$\text{Concentració}_f = \frac{\text{massa}_{TCMTB}}{\text{volum}}$$

On:

Concentració$_f$: valor de Amount que proporciona l'aparell (µg/mL)
Massa$_{TCMTB}$: pes de TCMTB (µg)
Volum : volum enrasat ⇨ 15 o 20 mL.

$$\text{Conc}_{TCMTB} = \frac{\text{massa}_{TCMTB}}{\text{massa}_{pell}}$$

On:

Conc$_{TCMTB}$: concentració de TCMTB (mg/kg pell)
Massa$_{TCMTB}$: pes de TCMTB (µg)
Massa$_{pell}$: Pes de mostra de pell (g)

7.- Referències.

⇨ Fowler, W.M; Russell, A.E.; Kruger, I.H., Pinchuc, S.C.

"The extraction and high performance liquid chromatography (HPLC) of TCMTB samples of treated wet blue", Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, vol. 71, p.100 (April 1986)

1.- Fonament.-

Determinació de la concentració del 2-(tiocyanometiltiol)benzotiazol (TCMTB), ortofenilfenol (OPP) i p-Cloro-m-Cresol (PCMK) en una solució comercial de fungicida tal com Busan30, Busan72, Leathergard, Butrol 30L, etc.

Es tracta de diluir la solució fins a obtenir una concentració inferior als 150ppm, a continuació s'injecta la solució en un HPLC (Cromatograf Líquid d'Alta Resolucio) amb una columna del tipus Xterra™ MS C_{18} i detector PDA.

2.- Mostres a les quals es pot aplicar el procediement.-

Aquest procediment es pot aplicar a tot tipus de fungicida comercial que contingui algun dels tres components que hem mencionat anteriorment.

3.- Material.-

3.1.- Productes i reactius.

- ✓ Acetonitril Cod: 1000301000 *MERCK* Qualitat*: grado gradiente para cromatografia en fase gas*
- ✓ Àcid orto-fosfòric 85% Cod: 131032 *PANREAC* Qualitat*: PA*
- ✓ Metanol (CH_3OH) Cod: 131091 *PANREAC* Qualitat*: PA*
- ✓ Diclorometano estabilizado con amileno Cod: 211254 *PANREAC* Qualitat*: QP*
- ✓ Aigua ultrapura (Milli-Q)

.- Solució acetonitril acidificat : Acetonitril : H_3PO_4 20 mM (85:15).

3.2.- Aparells.

- ✓ Cromatògraf líquid ALLIANCE 2695 Separations Module de WATERS amb detector PhotoDiode Array (PDA) 2996 de WATERS.
- ✓ Columna Xterra™ MS C_{18} 5 µm 3,9 mm x 150 mm de WATERS
- ✓ Balança analítica Mettler Toledo AB204
- ✓ Aparell d'aigua ultrapura Milli-Q plus Millipore

3.3.- Altres materials.

- ✓ Material habitual de vidre de laboratori.
- ✓ Filtres MILLEX–HV non-sterile 0,45 µm SLHV 025 NS Solvent resistent MILLIPORE

- ✓ Vials de vidre amb tap de rosca i junta de tefló.
- ✓ Pipetes de volum variable de 1000p Gilson Pipetman
- ✓ Matraç aforat de 50mL i 100mL
- ✓ Pipeta de volum variable de 5 mL LABMATE HTL

4.- Preparació de la mostra.-

Preparació de 500mL d'acetonitril acidificat (85:15)

85% Acetonitril (*MERCK* Qualitat*: grado gradiente para cromatografia) →425mL*

15% Solució d'àcid ortofosfòric 20mM →*75mL*

Pesem 0,173 grams de H_3PO_4 85% (Qualitat PA) amb un comptagotes i els diluïm en 75mL d'aigua ultrapura (Milli-Q), mesclem fins que la dissolució sigui homogènia. Enrasem en un matraç aforat fins a 500mL amb Acetonitril i agitem fins que la mescla sigui homogènia.

De la solució comercial homogenitzada agafem uns 2,5-3grams aproximadament per diluir en 100mL de Metanol. La pesada de solució comercial la fem amb balança analítica per tal d'obtenir 4 xifres decimals. Mesclem fins que la solució sigui homogènia.

D'aquesta solució n'agafarem 0,6mL amb la micropipeta prèviament calibrada els transferim a un matraç aforat de 50mL. Enrasem el matraç amb l'acetonitril acidificat prèviament preparat.

A continuació, omplim un vialet i procedim a l'injecció en el cromatògraf.

Observacions:

Qualsevol dilució que fem ha des ser homogènia i sense precipitat.

La pesada dels 2,5-3grams de mostra ha de tenir almenys 4 decimals per obtenir bona precisió.

5.- Les condicions del programa de cromatografia seran:

Les condicions són les següents:

Programa d'adquisició de dades:

Projecte: BIOCIDAS

Equip: Alliance

Method Set: PCMK_OPP_TCMTB01

Volum d'injecció: 10,00 µL

Fase mòbil: 30% Metanol; 30% H_2O Milli-Q; 40% Acetonitril : H_3PO_4 20 mM (85:15)

Fluxe fase mòbil : 1,2 mL/ min

Mode: isocràtic

Detector:

Tipus: PDA

Longitud d'ona: 210 – 325 nm

Du*ració del programa*: 4 min.

Per a realitzar una injecció de mostra en el cromatògraf cal seguir els passos descrits en el PNT **HPLC002** sobre la utilització del programa Empower i l'adquisició de dades. *Nota: Si la concentració que obtenim esta fora dels marges de la recta de calibratge (>150ppm) caldrà modificar els factors de dilució fins que la solució estigui dins del marge de la recta.*

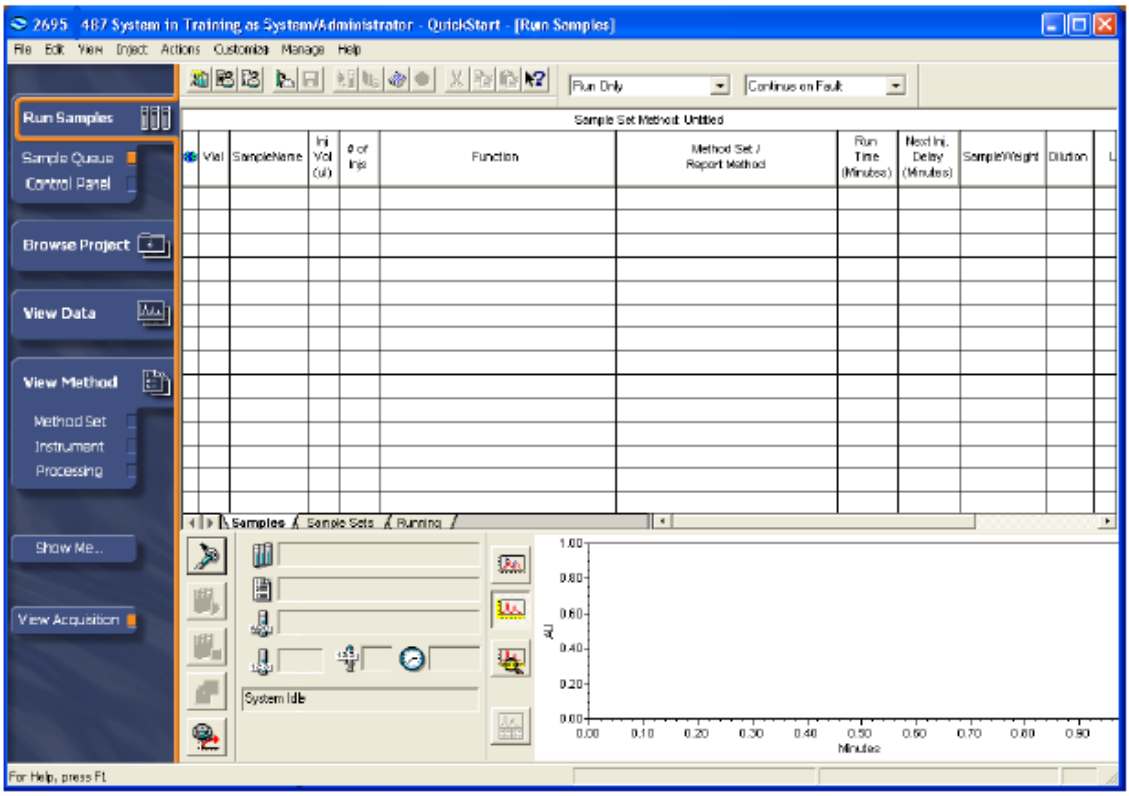
6.- Càlculs

Els càlculs estan basats en aplicar els factors de dissolució utilitzats.

Resultat HPLC (mg/L) · [50mL / 0,5mL] · [100mL / pes mostra (g)] · [1g/1000mg] · [1000mL] / 1 L = **concentració solució comercial (mg/L);**

1.- Entrada al programa.-

Iniciem el programa com tal com ens indica el PNT HPLC002 ("Guia d'utilització del programa EMPOWER"). Tal com inicia el EMPOWER ens deixarà en la pantalla "**Run Samples"**:



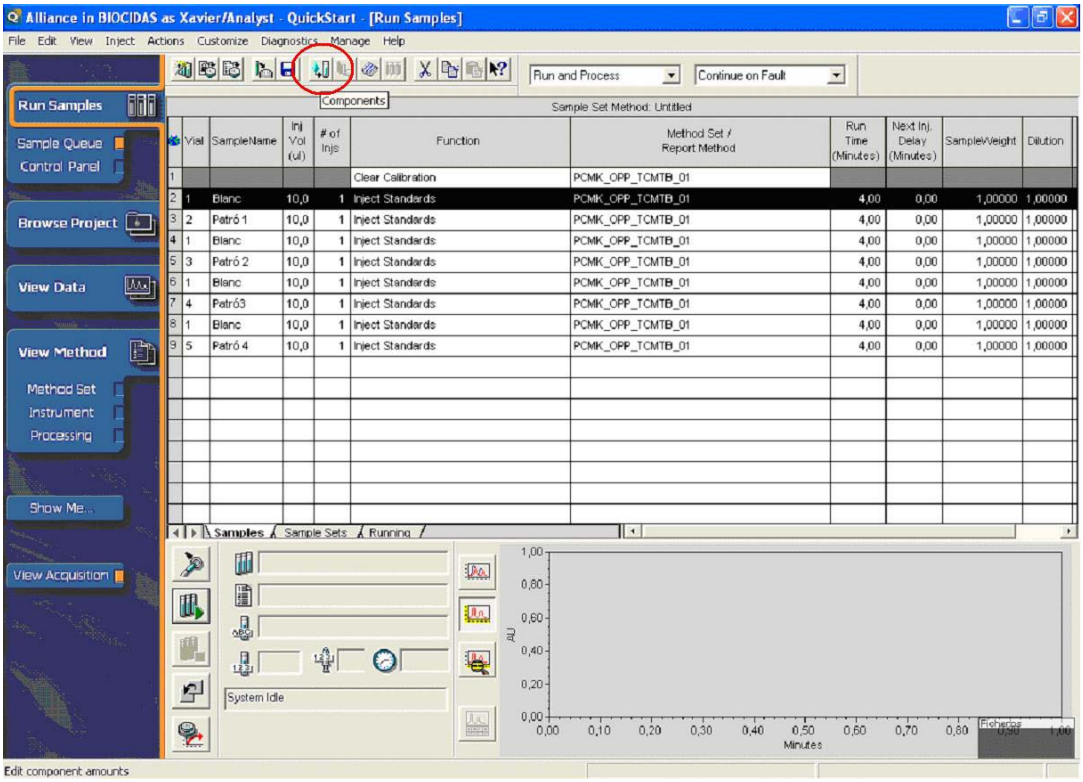
En aquesta pantalla introduirem les dades i característiques cromatogràfiques dels vialets. Posarem el nom i el numero de cada vialet, l'ordre en que s'han d'injectar, el tipus de mostra que es, el mètode de procés i temps de cada cromatograma.

2.- Entrada de dades.-

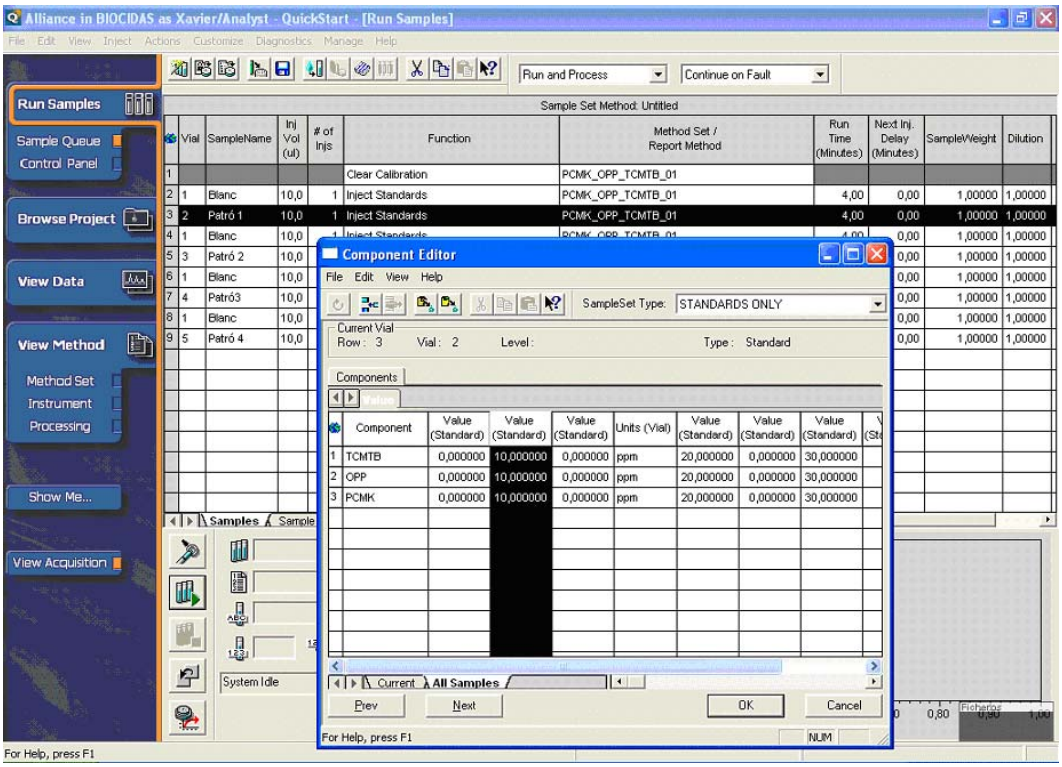
Per fer una recta de calibratge en la primera línia de la pantalla d'adquisició de dades cal posar en la columna "**Function"** – "**Clear Calibration"** (encara que no hi hagi cap corba de calibració prèvia). S'haurà de seleccionar el Method Set on voldrem afegir la corba. En les línies posteriors de la mateixa columna caldrà seleccionar la opció de **"Inject Standards"** (Injectar patrons). La resta de columnes s'ompliran igual que qualsevol injecció.

A continuació hi ha un exemple d'una taula per elaborar una recta de calibratge (entre cada injecció sempre es recomanable punxar un blanc per netejar bé la columna):

Una vegada introduïdes les dades de cada vialet i el Mètode de procés caldrà informar de quina es la concentració teòrica de cada patró de la sèrie. Per fer-ho anirem a la opció **"components"** que es troba en una icona a la part superior de la taula.



Ens sortirà una subtaula del tipus:



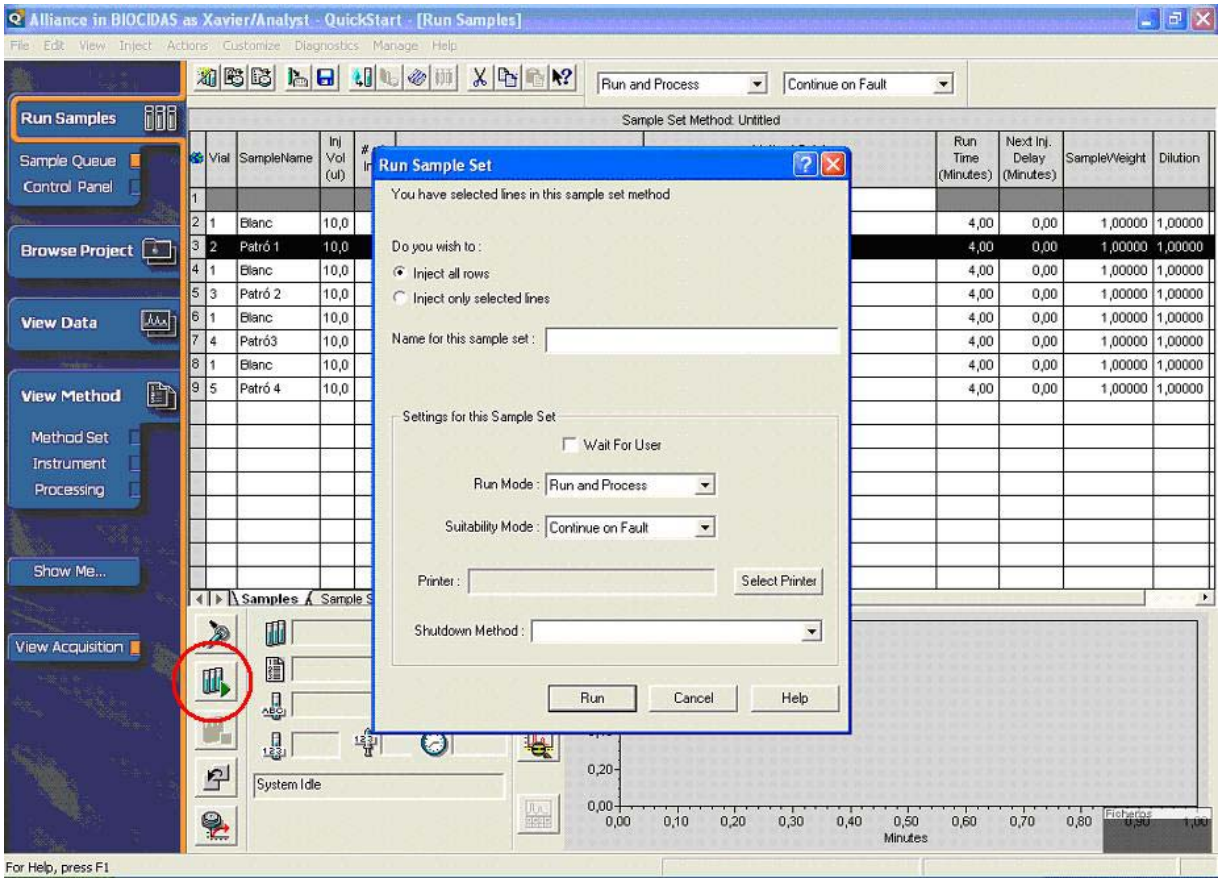
Per introduir les dades en la taula primer caldrà indicar quins seran els productes que trobarem en cada patró en la columna "**Component"**(en aquest cas TCMTB, OPP i PCMK).

A continuació caldrà posar quines son les unitats de concentració en que trobarem els analits a la columna **"Units (vial)"**, en aquest cas son ppm.

Seguidament introduïm la concentració calculada per a cada patró en les columnes **"Value (Standard)"** (valor de cada patró). Cada columna correspon a un vial, es a dir, primera columna, primer vial, segona columna, segon vial, etc. Si ens fixem amb el gràfic anterior veiem que la part seleccionada en negre es la segona columna que correspon a la segona fila o vialet de la pantalla que queda en segon plano.

Important: Una vegada introduïdes totes les dades en aquesta subtaula, es important anar a la opció "**File"** i clicar a **"Save Preferences"**. Seguidament ja podem prémer **"Ok"** i passar al següent pas.

Una ja tenim tota la informació introduïda passem a fer la sèrie de punxades, per fer-ho anem a l'icone de **"Run sample Set"** que es troba a la part inferior esquerra de la pantalla com es veu en aquest gràfic (també hi podem accedir per als menús superiors):

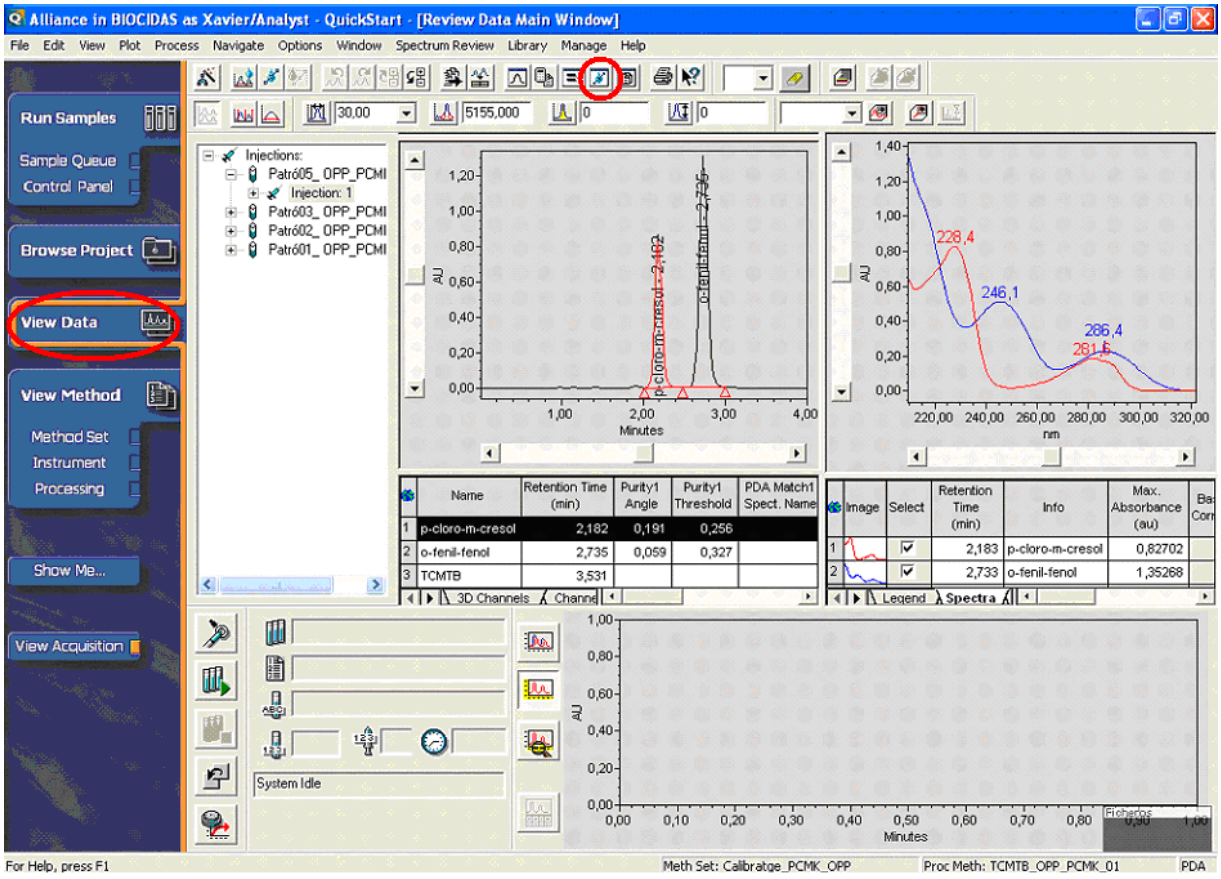


Cal introduir un nom a la bateria de punxades en la casella **"Name for this sample set"** i a on posa Run Mode: **"Run and Process"**, a continuació cliquem a **"Run"** i automàticament

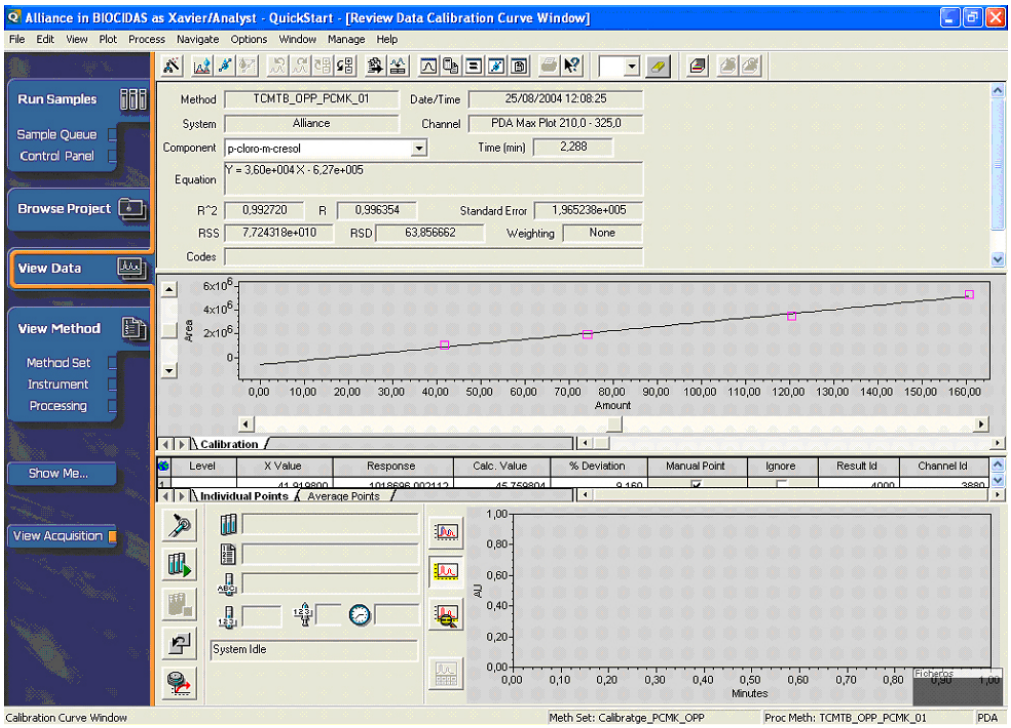
començarà l'analítica de la bateria de vialets. Cal esperar fins que acabi el cromatògraf per anar al següent pas.

3.- Obtenció de la recta.-

Una vegada acabat l'anàlisi caldrà mirar el resultat de la recta. El normal és que aquesta s'hagi creat automàticament sino s'haurà de fer manualment. Per mirar el resultat de la recta cal anar a la pantalla **"View Data"** i clicar sobre l'icone de rectes de calibratge com es pot veure en aquest gràfic:

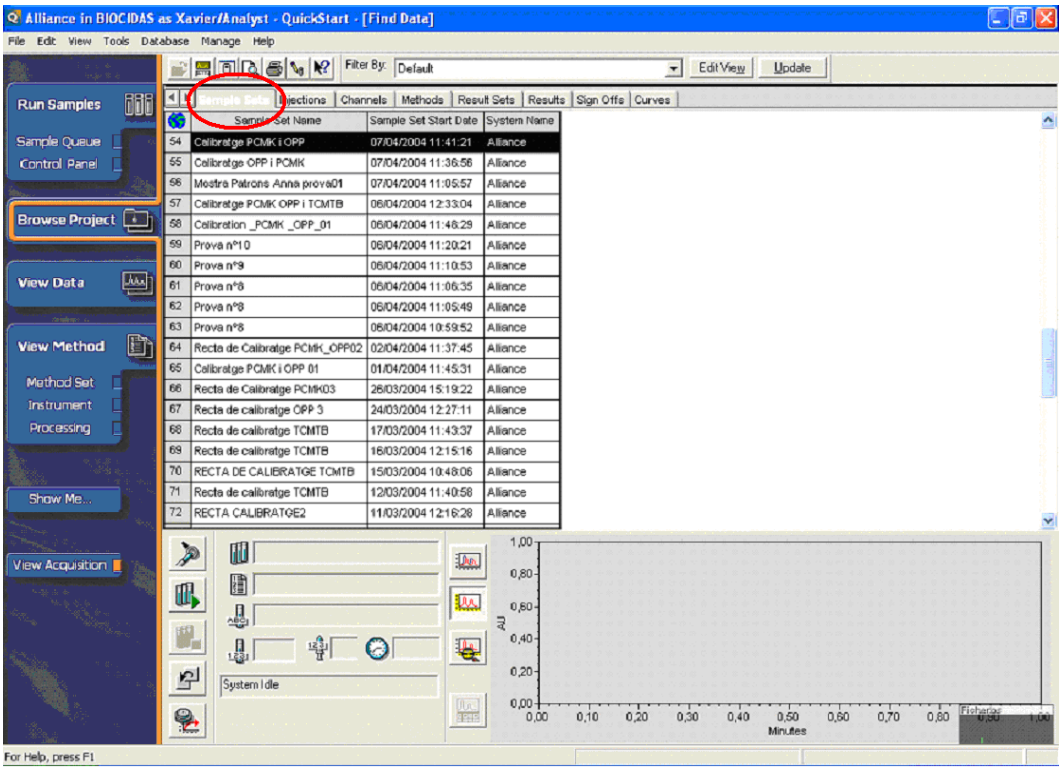


Si les rectes s'han creat automàticament tindrem una pantalla amb les diferents rectes de calibratge i tots els valors del tipus:



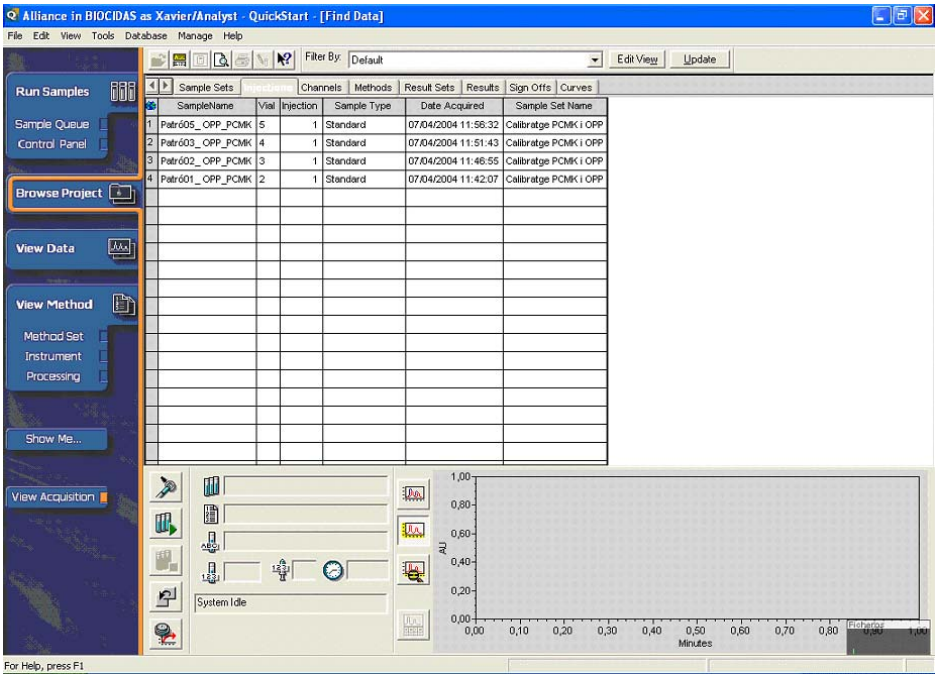
3.1.- Rectes de calibratge “manuals”.-

Si les rectes no s’han creat automàticament caldrà anar a la opció **“Browse Project”** del menú de l’esquerra i clicar en la pestanya de **“Sample Sets”** (la primera de totes de la part superior). En aquest punt cliquem 2 cops en el nostre Sample Set. El nom d’aquest serà el títol que hem donat a la bateria de punxades.

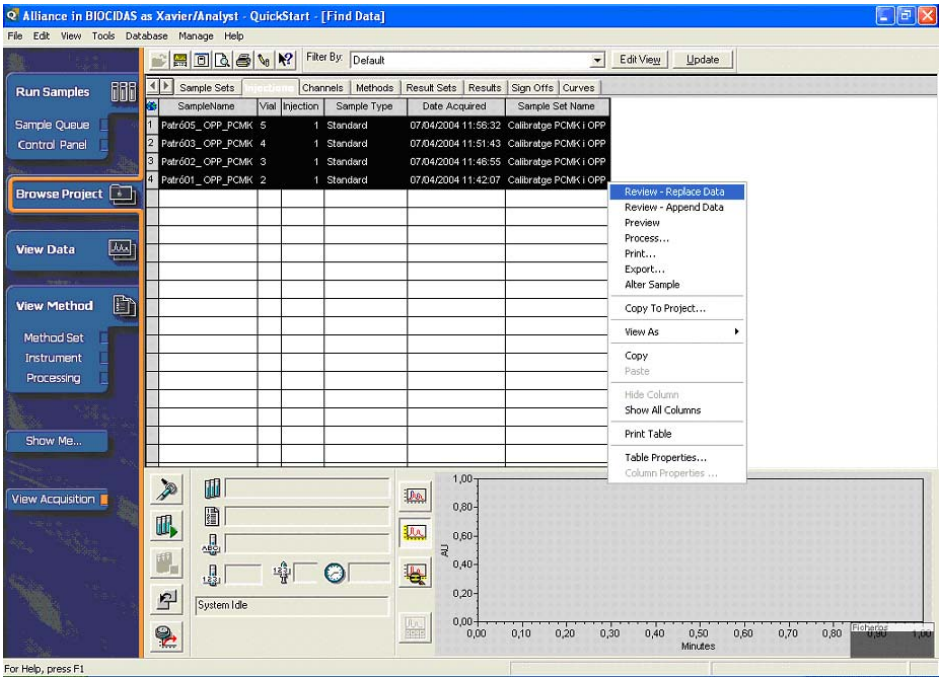


En aquesta pantalla també podem veure les rectes de calibratge, es troben en l'última pestanya de totes a on posa **"Curves"**.

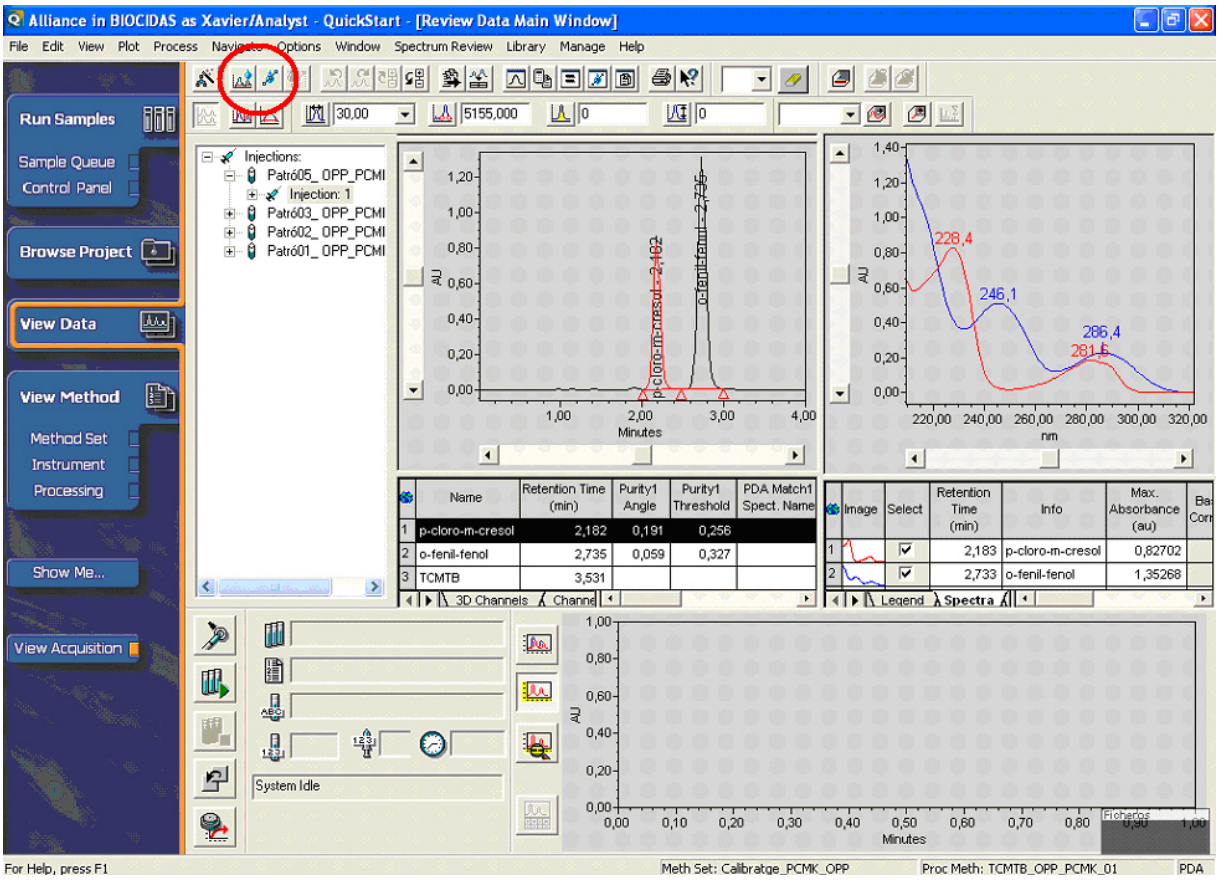
Després de clicar 2 vegades en el nostre Sample Set ens apareixerà unaltre taula amb totes les punxades de l'analítica, la pantalla es del tipus:



Seguidament caldrà seleccionar totes les injeccions amb la tecla "Control" apretada, a continuació clicant amb el botó dret del ratolí ens apareixerà una sèrie d'operacions que podem fer:



Haurem de seleccionar la primer de totes **"Review – Replace Data"** i sortirem a una pantalla:



Arribat aquest punt seleccionarem el nostre processing method desde el menú **"File"**. Després agafarem les injeccions una per una i tal com esta indicat en el dibuix clicarem sobre els dos icones marcats. El primer es **"Integrate"** i el segon es **"Calibrate"** (Cal fer-ho en aquest ordre), una vegada ho hem fet amb tots els patrons anirem a **"File"** i **"Save Calibration"** i ja tindrem la recta creada manualment. Seguidament ja podem observar la recta com hem explicat en l'inici d'aquest punt.

→ Per a més informació consultar el manual del programa Empower o l'ajuda dins del mateix programa (molt complerta).

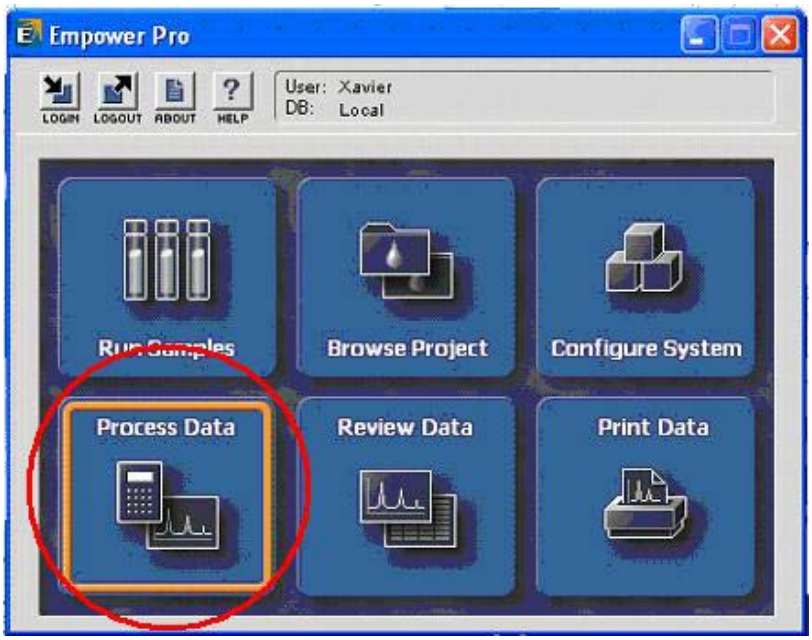
Nota: Una vegada creades les rectes aquestes es troben en un processing method, així que cada vegada que vulguem quantificar alguna mostra caldrà seleccionar el processing method on tenim les rectes.

1.- Inici del programa.-

Iniciem el programa Empower clicant 2 cops en el seu icona.

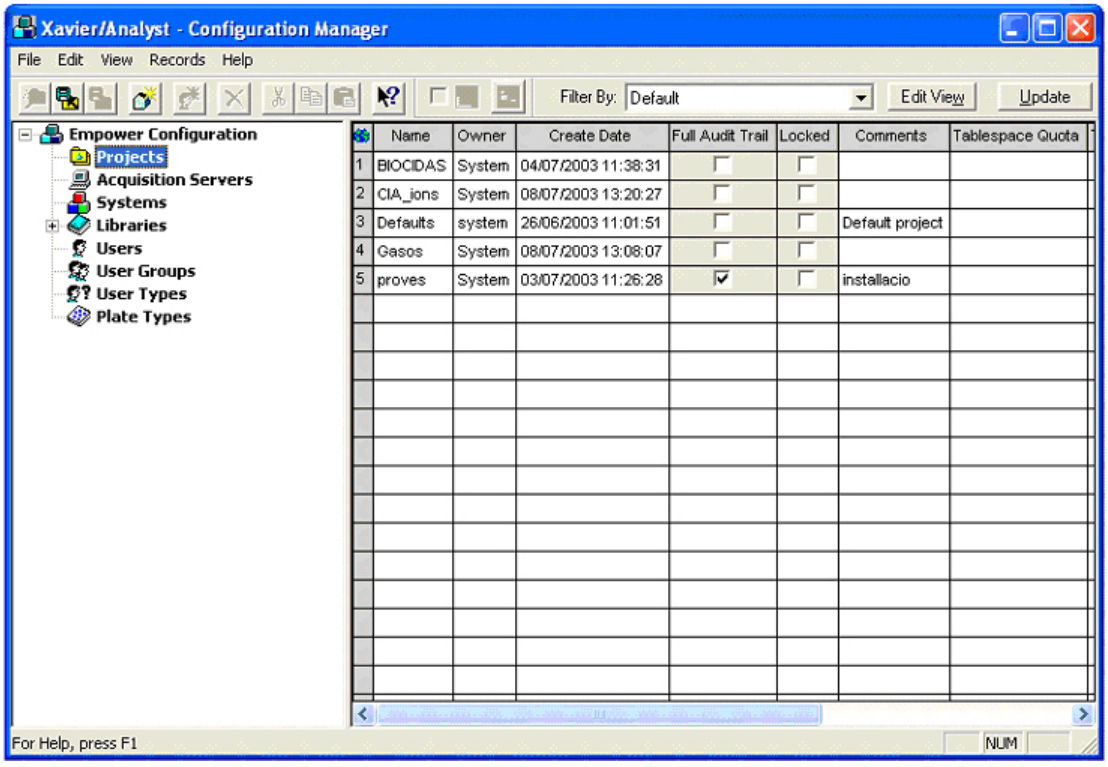
Quan el programa està iniciat, aquest ens demana el nom d'usuari i la contrasenya corresponent per l'accés del programa. Per elaborar les còpies cal clicar sobre l'icona de "Advanced" i seleccionar la opció "**Pro**" com es veu en aquest gràfic. A continuació prémer "**ok**".

Ens apareixerà un menú principal del tipus:



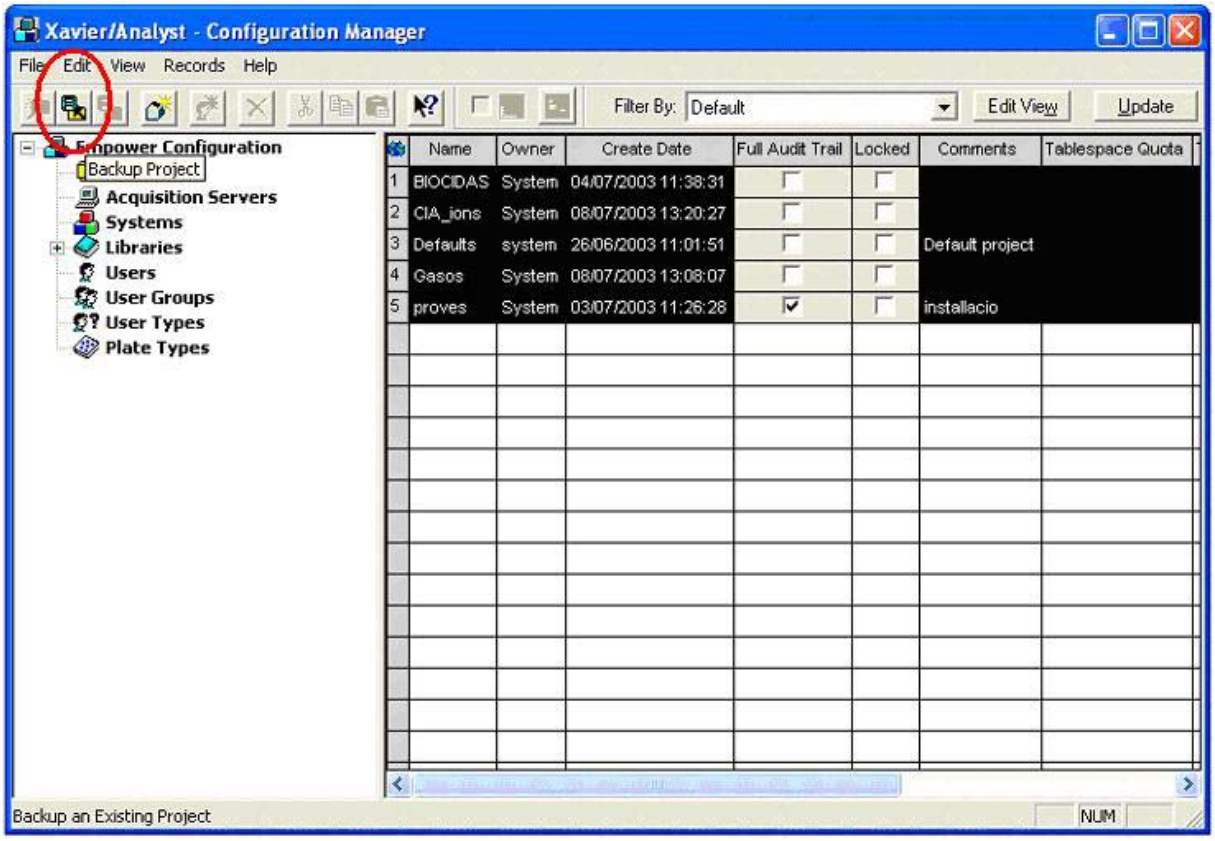
De les 6 opcions que ens dona el programa seleccionem “**Process Data**”. Ens apareixerà una pantalla com aquesta:

2.-Elaboració de les còpies de seguretat

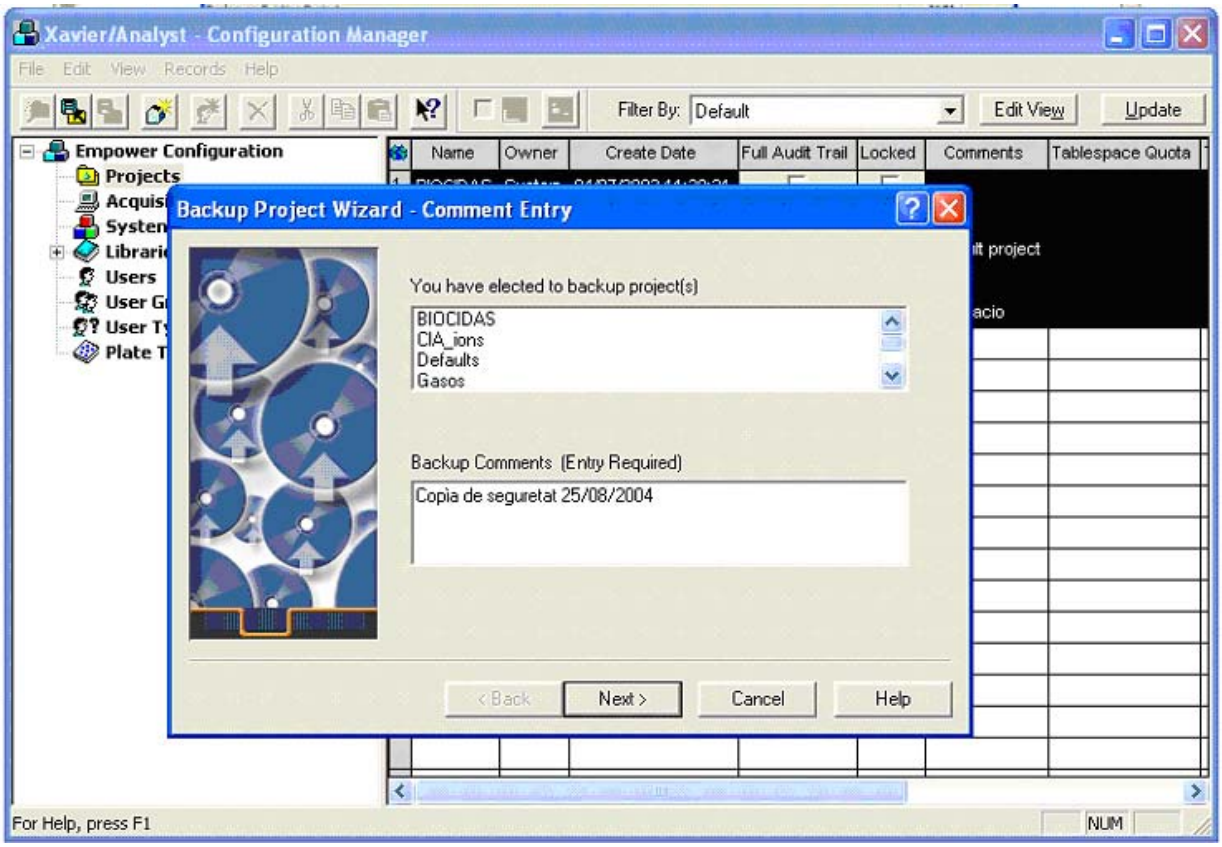


A la part dreta de la pantalla tindrem un llistat amb tots els projectes que hi ha en el programa, dins de cada un d'ells hi ha tota la informació relacionada amb ells (cromatogrames, condicions de fase mòbil, etc.). Caldrà que seleccionem almenys un projecte per fer la còpia de seguretat. En aquest exemple hem seleccionat tots els projectes de manera que la còpia serà complerta.

Seleccionem amb el ratolí i la tecla “control” apretada tots els projectes, seguidament anem a l’icona de dalt a l’esquerra o seleccionem “**BackUp Project**”.

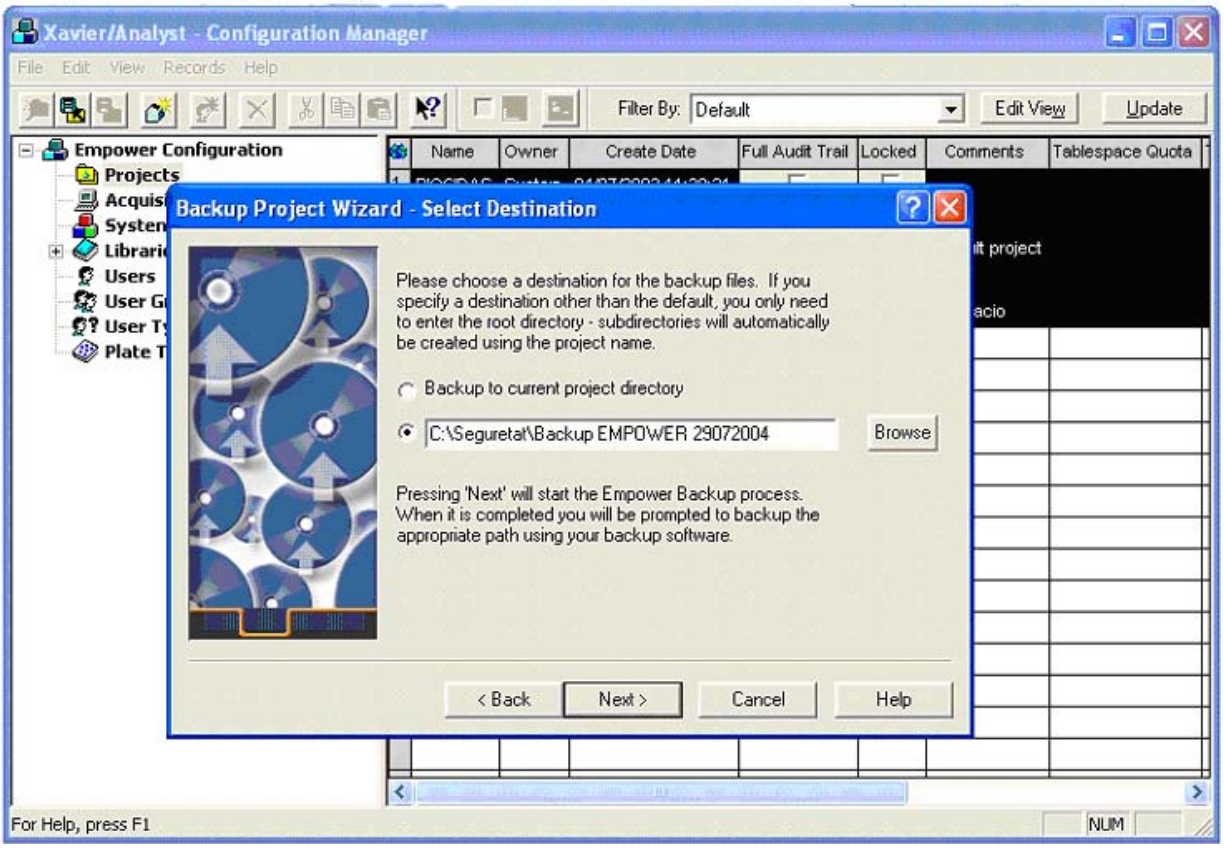


Ens apareixerà un submenú com aquest:



Aquí podem veure la llista de tots els projectes que hem seleccionat (part superior) i caldrà que posem una descripció de la còpia de seguretat (part inferior) que farem. A continuació clicar "**Next**".

Arribat aquest punt, l'últim pas serà donar una ruta o carpeta on fer les còpies de seguretat. Tenim 2 opcions: la primera es fer la copia en una carpeta que per defecte ens dona l'Empower i l'altre es designar nosaltres en quina carpeta i unitat ho volem. Seguidament premem a "**Next**" i es començaran a fer les còpies de seguretat.



Al final del procés ens sortirà una pantalleta amb un petit informe de les còpies per saber si s'han fet correctament.

3.- Altres

El procés d'elaboració de les còpies de seguretat te una durada depenent de la informació continguda, tot i així normalment son menys de 5 minuts. L'espai que pot ocupar una còpia de seguretat complerta serà d'un màxim de 50Mb (depenent de la informació).

Es recomana fer còpies de seguretat periòdicament. Els intervals entre còpia i còpia dependran de la freqüència de treball del cromatògraf, ara bé es recomanable fer **almenys una còpia de seguretat mensual en una unitat que no sigui el Disc Dur de l'ordinador, per exemple un CD o una FlashMemory**.

Per qualsevol altre dubte del programa Empower consultar el PNT HPLC002 ("Guia d'utilització del programa EMPOWER").

10.- Conclusions

L'objectiu d'aquest treball ha estat elaborar un mètode precís i fiable per la determinació dels fungicides més comuns en les pells. Tot i les dificultats que presenta fer anàlisis tant complex com aquest, hem trobat quines son les condicions òptimes per tal d'obtenir uns resultats validables per determinar el 2-(metiltiocianometiltio)benzotiazol (TCMTB), i resultats semiquantitatius pel OrtoFenilFenol (OPP) i el P-Clorometakresol (PCMK). En la nova versió del mètode hem fixat el següent (PNT HPLC101):

- Temps òptim d'extracció dels fungicides en les pells: **6 hores** (125 extraccions aprox.)
- Cal **acidificar** el **diclormetà** (dissolvent d'extracció) amb àcid acètic glacial per mantenir l'estabilitat dels fungicides durant l'extracció i manipulació posterior.
- Quan assequem l'extracte en el rotavapor s'ha d'arribar al punt just abans de sequedat per tal d'evaporar el màxim de diclormetà sense fer malbé els fungicides.
- Es innecessari afegir Sulfat Sodi anhidre per eliminar l'aigua.
- Cal tenir sempre les mostres ben tapades per evitar evaporacions.
- Abans de posar la mostra en el vialet cal agitar almenys durant 5 minuts per tenir una mescla homogènia i evitar que el greix ens retingui els fungicides.
- Entre injeccions de mostra, cal injectar fase mòbil per assegurar un bon rentat de columna

Fetes totes les modificacions pertinents hem estudiat quina es la fiabilitat i la reproducibilitat tant del **anàlisi cromatogràfic (RSD ±0,45%)** com de la **recuperació del mètode analític global (RSD ±1,7%)** que ha estat del **86%** (pel mètode de fortificació). Ambdós els resultats son bons tenint en compte les característiques de l'anàlisi. Estem en condicions d'afirmar que hem millorat l'eficàcia del mètode i el temps d'extracció comparant amb altres estudis [50] on la recuperació del TCMTB estava en un 82% i 7,5 hores l'extracció en Soxhlet.

Per poder fer l'estudi de recuperació ens hem vist obligats a crear un **mètode d'anàlisi de mostres comercials de biocides** (PNT HPLC102) per aplicar en les pells

Hem realitzat PNTs per al Software de gestió del cromatògraf líquid. Hem fixat com elaborar rectes de calibratge en el programa Empower en el PNT HPLC003 i com fer còpies de seguretat de tota la informació (PNT HPLC004).

S'ha pogut comprovar que donada la composició de la fase mòbil (30% de Metanol. 30% H_2O Milli-Q i un 40% Acetonitril) els pics cromatogràfics del OPP, PCMK i TCMTB queden ben definits i no s'interfereixen entre ells.

Hem aconseguit tots els objectius marcats en l'inici. Hem realitzat un mètode d'anàlisi complert i al mateix temps bastant simple per determinar i quantificar quins són els fungicides (en especial el TCMTB) continguts en una pell qualsevol. Alhora també hem creat un altre mètode fiable d'anàlisi per mostres comercials de biocides utilitzades en el sector de l'adoberia.

Per concloure, cal dir que acabat aquest treball, s'obren noves portes per posteriors estudis dels fungicides utilitzats en la indústria adobera, ja sigui per optimitzar el procés, per disminuir l'impacte ambiental de l'operació, etc. A més, des d'aquest moment la determinació de TCMTB en pell passa a ser un nou servei a les empreses ofert pel Laboratori de la EUETII.

11.- Bibliografia

[1] Equipo Tècnico de INESCOP;
"La prohibición del pentaclorofenol. Situación actual". Boletín AQEIC 1991; Any 1991. Pàg.79-81

[2] Equip de Jorge de Navascués;
"*Enciclopedia SALVAT";* Ed. Salvat S.A. ediciones; Any 1983. Pàg. 1732-1734

[3] Judith F. Rubinson, Kenneth A. Rubinson;
"Quimica Aanalitica Contemporanea"; Ed. Pearson educacions; Any 2000. Pàg. 404

[4] D.R. Browning;
"Chromatography"; Ed. McGraw-Hill; Any 1971. Pàg. 3

[5] Judith F. Rubinson, Kenneth A. Rubinson;
"Quimica Aanalitica Contemporanea"; Ed. Pearson educacions; Any 2000. Pàg. 405

[6] D.C. Harris;
"Anàlisis Químico Cuantitativo"; Ed. Iberoamerica;, Mèxic Any 1992; Pàg. 662

[7] D.C. Harris;
"Anàlisis Químico Cuantitativo"; Ed. Iberoamerica;, Mèxic Any 1992; Pàg. 653 i 654

[8] Judith F. Rubinson, Kenneth A. Rubinson;
"Quimica Aanalitica Contemporanea"; Ed. Pearson educacions; Any 2000. Pàg. Figura 13.2

[9] M.Valcarcel i A. Gomez Hens;
"Tècnicas Analíticas de Separación"; Ed. Reverté; Barcelona, Any 1998; Pàg. 475-483

[10] M.Valcarcel i A. Gomez Hens;
"Tècnicas Analíticas de Separación"; Ed. Reverté; Barcelona, Any1998; Pàg. 482

[11] Skoog, D.A ; West, D.M.
"Análisis Instrumental ", Ed McGraw-Hill, segunda edición, Mexico D.F., 1990. Pàg. 747-753.

[12] Waters;
"*Curso básico de HPLC LC School*"; HPLC Básico, 2003; Pàg. 12 a 32;

[13] D.C. Harris;
"Anàlisis Químico Cuantitativo"; Ed. Iberoamerica;, Mèxic Any 1992; Figures 23-20 i 23-21

[14] D.C. Harris;
"Anàlisis Químico Cuantitativo"; Ed. Iberoamerica;, Mèxic Any 1992; Pàg. 667

[15] D.C. Harris;
"Anàlisis Químico Cuantitativo"; Ed. Iberoamerica;, Mèxic Any 1992; Pàg. 657-677

[16] Douglas A.Skoog, Donald M. West, F. James Holler, Sanley R. Crouch;
"Química Analítica"; Ed. McGraw-Hill; Any 2000; Pàg. 709

[17] D.C. Harris;
"Anàlisis Químico Cuantitativo"; Ed. Iberoamerica;, Mèxic Any 1992; Pàg. 667

[18] Judith F. Rubinson, Kenneth A. Rubinson;
"Quimica Analítica Contemporanea"; Ed. Pearson educacions; Any 2000; Pàg. 404

[19] Judith F. Rubinson, Kenneth A. Rubinson;
"Quimica Analítica Contemporanea"; Ed. Pearson educacions; Any 2000; Figura 13,10

[20] M.Valcarcel i A. Gomez Hens;
"Tècnicas Analíticas de Separación"; Ed. Reverté; Barcelona; Any1998; Pàg. 522

[21] Skoog, D.A ; West, D.M.
"Análisis Instrumental ", Ed McGraw-Hill, segunda edición, Mexico D.F., 1990. Pàg. 747-767.

[22] M.Valcarcel i A. Gomez Hens;
"Tècnicas Analíticas de Separación"; Ed. Reverté; Barcelona; Any1998; Pàg. 545

[23] Judith F. Rubinson, Kenneth A. Rubinson;
"Quimica Analítica Contemporanea"; Ed. Pearson educacions; Any 2000; Pàg. 429

[24] "Diccionario Enciclopedico Espasa"; Ed. Espasa-Calpe, S.A.; Any 1985; Pàg. 622

[25] Equipo Tècnico de INESCOP;
"La prohibición del pentaclorofenol. Situación actual". Boletín AQEIC 1991; Any 1991. Pàg.79-81

[26] Equipo Tècnico de INESCOP;
"La prohibición del pentaclorofenol. Situación actual". Boletín AQEIC 1991; Any 1991. Pàg.79-81

[27] J.Font i E.Poch;
"Determinación de Pentaclorofenol en cuero por cromatografía en fase gaseosa"; Revista "Tècnica y Ciencia" ; Boletín AQEIC 1991; Any 1991; Pàg.149-154

[28] M.Tomaselli, A. Cozzolino;
"I pesticide nell'industria del cuoio. Parte II: Determinazione quantitative"; Cuoio Pelli Mat. Concianti (Napoli); Agosto 1991. Boletin AQEIC 1991;

[29] "Journal of the Society of Leather and Chemists"; Vol.71 Pàg. 102;

[30] "Journal of the Society of Leather and Chemists", Vol.71 Pàg. 100;

[31]M.Tomaselli, A. Cozzolino;
"I pesticide nell'industria del cuoio. Parte II: Determinazione quantitative"; Cuoio Pelli Mat. Concianti (Napoli); Agosto 1991. Boletin AQEIC 1991;

[32] Nikolaos Voulvoulis, Mark D. Scrimshaw and John N. Lester;
"Analytical methods for the determination of 9 antifouling paint booster biocides in estuarine water samples"; Chemosphere, Vol. 38, nº15; Any 1999; Pàg. 3503-3516

[33] Analitical Methods Staff, Engineering and analisys division, office of science and technology, Office of water, U.S. Environmental Proteccion Agency;
"Guidance on Evaluation, Eesolution and Documentation of Analytical problems associated with Compliance Monitoring"; Washington D.C. June 1993; Pàg. 6

[34] M.Sc.Hafida Kirouani-Harani;
"Microbial and phtolytic degradations of Benzotiazoles in water and wastewater"; Technisher Universität Berlin. Juliol 2003. Pàg. 39 Pàg. 39

[35] Helsingor 5-9June 2001 International Council for the Exploration of the sea
"Report of the ICES Advisory Comitee on the marine environment, 2001" Pàg. 189

[36]M.Sc.Hafida Kirouani-Harani;
"Microbial and phtolytic degradations of Benzotiazoles in water and wastewater"; Technisher Universität Berlin. Juliol 2003. Pàg. 39

[37]M.Sc.Hafida Kirouani-Harani;
"Microbial and phtolytic degradations of Benzotiazoles in water and wastewater"; Technisher Universität Berlin. Juliol 2003. Pàg. 39

[38] M.Sc.Hafida Kirouani-Harani;
"Microbial and phtolytic degradations of Benzotiazoles in water and wastewater"; Technisher Universität Berlin. Juliol 2003. Pàg. 30

[39] "Index Merck, 70th Edition"; Any 1997; Pàg. 7276

[40] "Index Merck, 70th Edition"; Any 1997; Pàg. 2136

[41] David Harvey;
"Quimica Analitica Moderna". Ed. McGrawHill, Any 2002; Pàg. 80

[42] Anna Vázquez, Tutor Dr. Quim Font;
"TFC: Implantació de noves aplicacions cromatografiques en el laboratori"; Igualada, Febrer 2004; Pàg. 101

[43] David Harvey;
"Quimica Analitica Moderna". Ed. McGrawHill, Any 2002; Pàg. 80

[44] Dr. Toni Rius;
"Apunts de Quimica Analítica Semipresencial"; Juny 2004. Capítol 3, pàgines de 1 a 6

[45] J.Font i E.Poch;
"Determinación de Pentaclorofenol en cuero por cromatografía en fase gaseosa"; Revista "Tècnica y Ciencia" ; Boletín AQEIC 1991; Any 1991; Pàg.150-153

[46] *"Journal of the Society of Leather and Chemists";* Vol.71 Pàg. 102

[47] Anna Vázquez, Tutor Dr. Quim Font;
"TFC: Implantació de noves aplicacions cromatografiques en el laboratori"; Igualada, Febrer 2004; Pàg. 101

[48] David Harvey;
"Quimica Analitica Moderna". Ed. McGrawHill, Any 2002; Pàg. 43

[49] David Harvey;
"Quimica Analitica Moderna". Ed. McGrawHill, Any 2002; Pàg. 497

[50] *"Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists"*, Vol. 71 Pàg. 107