

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



**EVALUACION CUANTITATIVA DE LA RESOLUCION  
EN CROMATOGRAFIA POR EXCLUSION  
PARA POLIMEROS**

Por **HECTOR ALFREDO ANDREETTA**

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Biblioteca  
50 y 115 1° subsuelo  
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar  
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-56186

1982

485

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



"EVALUACION CUANTITATIVA DE LA RESOLUCION EN CROMA-  
TOGRAFIA POR EXCLUSION PARA POLIMEROS"

Por

Tesis  
485

HECTOR ALFREDO ANDREETTA

1982

DONACION.....	
A.....	
Fecha... 25-6-99	
Inv. N..... Inv..... B. 56.186	

Este trabajo de tesis fue realizado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) bajo la dirección del Profesor Dr. Rubén V. Figini, y se pone a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, para optar al grado académico de "Doctor en Ciencias Químicas".

Deseo expresar mi agradecimiento al Profesor Dr. Rubén Víctor Figini por su constante e invaluable apoyo en la ejecución del tema de trabajo. También hago extensivo mi agradecimiento a la Dra. M. Marx de Figini y al Prof. Dr. E. M. Macchi y a todos los compañeros, profesionales y técnicos, de la División Macromoléculas.

Al mismo tiempo quiero agradecer al director del INIFTA, Prof. Dr. Alejandro J. Arvía y a todo el personal que de alguna u otra manera ha hecho posible la realización de este trabajo.

A mis padres, por su valioso apoyo y comprensión

A mi esposa e hijos, por su cariño y paciencia

# I N D I C E

## CAPITULO I

1) OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO Y RESUMEN TEMATICO DE SUS PARTES .....	1
--	---

## CAPITULO II

2) APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION EN EL ANALISIS DE POLIMEROS .....	3
2.1 Introducción .....	3
2.2 Factores determinantes de la cromatografía de exclusión .....	11
2.2.1 Concentración de soluto .....	12
2.2.2 Velocidad de flujo .....	15
2.2.3 Temperatura .....	15
2.3 Geles .....	16
2.4 Fase móvil .....	17
2.5 Métodos de detección .....	18

## CAPITULO III

3) CARACTERIZACION SUMARIA DE LOS GELES DE SILICE PASIVADOS	25
3.1 Ventajas y desventajas del uso de estos geles .....	26
3.2 Detección de posibles interacciones específicas polímero-gel .....	26
3.3 Determinación de la capacidad de resolución de los geles .....	29

## CAPITULO IV

4) CARACTERIZACION CUANTITATIVA .....	35
4.1 Introducción al análisis cuantitativo en CPG (Calibración-Dispersión) .....	35
4.2 Método de los promedios aparentes de peso molecular .....	37
4.2.1 Fundamento del método empleado .....	38
4.2.2 Condiciones de aplicación del método .....	41
4.3 Procedimiento numérico de optimización de parámetros. Método iterativo de Gauss .....	43
4.4 Planteamiento del cálculo .....	47
4.4.1 Funciones de calibración y dispersión. Criterio de selección .....	47
4.4.2 Caso I: Curva de calibración logarítmica lineal y función de dispersión gaussiana .....	49
4.4.3 Caso II: Curva de calibración logarítmica parabólica y función de dispersión gaussiana...	50
4.4.4 Caso III: Curva de calibración logarítmica lineal y función de dispersión no gaussiana o asimétrica .....	52
4.4.5 Caso IV: Curva de calibración logarítmica parabólica y función de dispersión asimétrica..	52

## CAPITULO V

5) PARTE EXPERIMENTAL	
5.1 Aparato empleado .....	56
5.1.1 Columnas .....	58
5.1.2 Solvente .....	58
5.1.3 Filtración e inyección de muestra .....	59
5.1.4 Valores iniciales .....	59
5.2 Curva de calibración experimental .....	59

## CAPITULO VI

6) METODO ITERATIVO DE GAUSS. CONVERGENCIA. RESULTADOS OBTENIDOS. DISCUSION Y CONCLUSIONES .....	64
6.1 Proceso iterativo de obtención de la curva de calibración de partida .....	65
6.2 Aplicación del método iterativo de Gauss a los diferentes casos .....	67
6.3 Análisis de los resultados obtenidos .....	74
6.4 Conclusiones .....	77

## APENDICE I

I) TRATAMIENTO DEL CASO IV .....	79
I.1 Consideraciones previas y método de cálculo .....	79
I.1.1 Procedimiento de sustitución de $W(y)$ por $f(v)$ en el cálculo de $L$ .....	81
I.1.2 Procedimiento iterativo en el cálculo de $L$ ..	89
I.2 Conclusiones sobre el Caso IV .....	95
APENDICE II .....	97
APENDICE III .....	99
REFERENCIAS .....	103

## RESUMEN

Indudablemente la "Cromatografía de Exclusión" ó "Cromatografía por Permeación de Geles" (CPG), como también se la llama, ocupa un lugar preponderante en el análisis de polímeros en solución. Una evaluación cuantitativa de esta técnica no es un hecho inmediato, sino por el contrario requiere la caracterización de los materiales con que se rellenan las columnas cromatográficas.

En el presente trabajo se describen procedimientos de caracterización de columnas de exclusión con material de relleno de reciente uso cromatográfico, que comprenden desde técnicas cualitativas sumarias hasta análisis cuantitativo. Respecto de este último se desarrolla un método que permite obtener simultáneamente los parámetros de las funciones de calibración y dispersión en cromatografía por exclusión, con requerimientos experimentales no más grandes que aquellos necesarios para llevar a cabo una calibración común.

Se comparan además los resultados obtenidos para distintas combinaciones de funciones de calibración y dispersión con los resultados experimentales, como así también las ventajas, inconvenientes y posibles aplicaciones de los procedimientos matemáticos presentados.

## CAPITULO I

### 1) OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO Y RESUMEN TEMATICO DE SUS PARTES

El presente trabajo describe la fundamentación y la aplicación de un método de calibración de columnas usadas en cromatografía de geles (CPG)<sup>x)</sup>. El método permite obtener la relación entre el volumen de elución (que constituye la variable experimental inmediata y que es medida por la cantidad de fase móvil necesaria para que una sustancia eluya por todas las columnas) y el peso molecular con simultánea consideración de la resolución (capacidad de separar componentes en una mezcla) del sistema cromatográfico constituido este último por el sistema de inyección, las columnas y el detector.

La exposición que sigue está dividida en:

- a) Descripción de la CPG en relación con su uso en analítica macromolecular, así como la enumeración de los factores fundamentales que la regulan con consideración de detalles operativos generales (capítulo II).
- b) Exposición de los resultados cualitativos y cuantitativos de naturaleza sumaria para la caracterización de las columnas usadas (capítulo III).
- c) Consideración de los métodos usados en la literatura para obtener la calibración de las columnas cromatográficas y exposición de los fundamentos matemáticos del método propuesto en este trabajo (capítulo IV).
- d) Descripción de la parte experimental (capítulo V).
- e) Reseña de los resultados obtenidos, así como discusión y conclusiones de los mismos (capítulo VI).

---

<sup>x)</sup> Acerca de la terminología ver Apéndice II

- f) Procedimientos aproximados en el caso de necesidad explícita del conocimiento de la distribución de peso molecular para efectuar la calibración (Apéndice I).
- g) Definiciones de términos usados en el texto (Apéndice II).
- h) Relación entre peso molecular y volumen de elución (Apéndice III).

## CAPITULO II

### 2) APLICACION DE LA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION EN EL ANALISIS DE POLIMEROS

#### 2.1 Introducción

La contribución de la cromatografía de exclusión al examen de polímeros en solución, radica en la posibilidad de poder separar muestras de polímeros de acuerdo con su peso molecular.

El conocimiento del peso molecular y su distribución en polímeros, es uno de los objetivos principales en la analítica de polímeros, puesto que de estos parámetros depende la mayoría de las propiedades fisicoquímicas que caracterizan a las macromoléculas, así como muchas propiedades físicas y mecánicas. A diferencia de las sustancias no poliméricas, o de bajo peso molecular, cuyos pesos moleculares son únicos y conocidos con exactitud, en polímeros tenemos una distribución de pesos moleculares por lo cual el peso molecular es de naturaleza promedial. Por ello, puede darse el caso de muestras que con similares pesos moleculares promedios, presenten distribuciones distintas y por lo tanto comportamientos diferentes.

Esta no uniformidad en el peso molecular o polidispersidad, hace necesaria la caracterización de los polímeros más allá de los límites impuestos por la aplicación de los métodos comúnmente usados para medir pesos moleculares promedios. De ahí el gran interés que existe en la cromatografía de exclusión, también llamada cromatografía por permeación de geles, (CPG), como método analítico para caracterizar polímeros.

El fenómeno de exclusión o permeación aprovecha el hecho que distintas moléculas de soluto en solución, de diferentes pesos moleculares, ocupan diferentes volúmenes molares, y por lo tanto se diferenciarán en la posibilidad de acceso a los poros internos de una columna de relleno inerte.

Las moléculas pequeñas podrán difundir dentro de los poros del

gel, mientras que las más grandes son excluidas; y las de tamaño intermedio podrán penetrar en aquellos poros más grandes. Por lo tanto, en las moléculas completamente excluidas, el volumen de elución ( $V_e$ ), es igual al volumen intersticial o volumen muerto de la columna ( $V_o$ ). Para las moléculas pequeñas, las cuales penetran en todos los poros del gel, el volumen de elución será igual al volumen total del líquido en la columna, es decir el volumen muerto más el volumen interno ( $V_i$ ). Para moléculas de tamaño intermedio el  $V_e$  será:

$$V_e = V_o + K_D \cdot V_i \quad (1)$$

donde  $K_D$  es el coeficiente de partición y resulta ser igual a la relación entre el volumen de poro accesible y el volumen total de poro.

$$K_D = \frac{V_{i,acc.}}{V_i} \quad (2)$$

La ecuación (1) se mantendrá para todos los casos involucrados en esta técnica, tomando  $K_D$  valores extremos como cero y uno para una completa exclusión o una total permeación respectivamente. Según esto, es posible (a través de esta técnica) poder determinar una correlación entre el peso molecular y el volumen al cual eluye el soluto,  $V_e$ . En una representación gráfica, tomando como ordenada el logaritmo del peso molecular y como abscisa el volumen de elución, se obtiene en la mayoría de los casos una curva similar a la de la Fig. 1

Si bien la explicación anterior es válida, también es cierto que no son muy bien conocidos los fenómenos físicos que ocurren en la interfase polímero solución-polímero sustrato. Las teorías que se formulan al respecto, suponen la condición de equilibrio termodinámico en la interfase polímero - sustrato, facilitando de este modo el desarrollo de las mismas, si bien suponer un equilibrio de fases no es estrictamente correcto.

Una de las teorías que se han formulado<sup>41)</sup>, supone que en ausencia de interacciones específicas soluto - sustrato, el fenómeno de permeación se debe únicamente a los cambios conformacionales de las macromoléculas al pasar de un medio donde poseen un volumen totalmente asequible (todas las conformaciones que la molécula puede adoptar

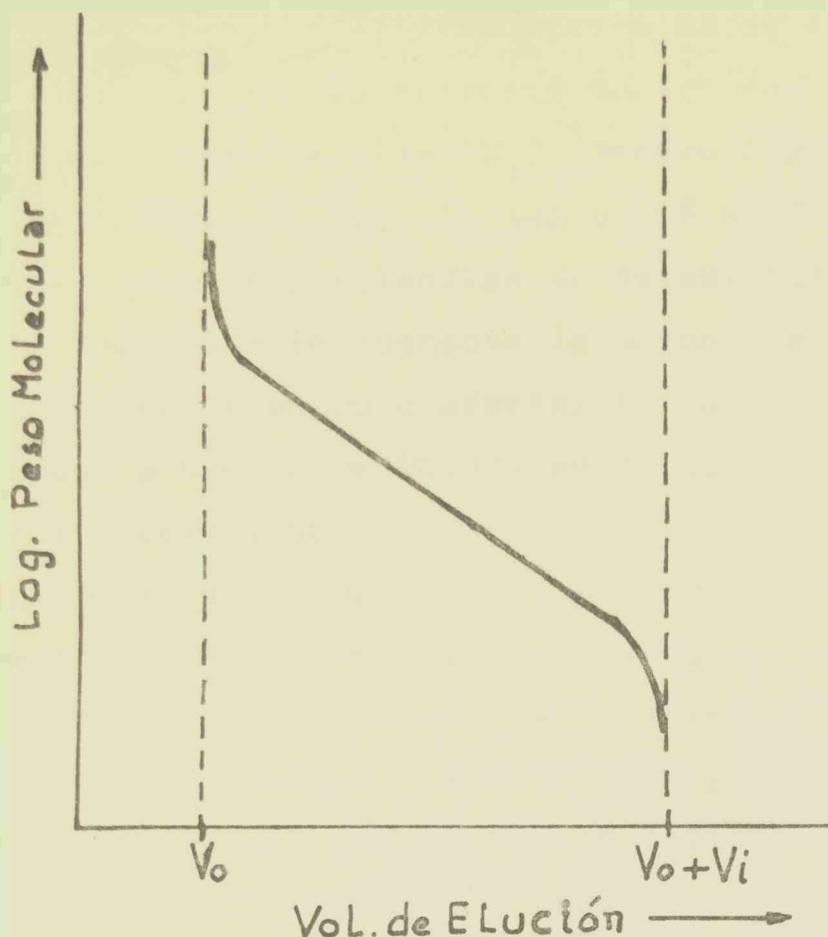


Fig. 1 Representación gráfica de la relación típica entre el peso molecular y el volumen de elución en cromatografía de exclusión.

son realizables) a un medio de volumen restringido (donde sólo algunas conformaciones, ver Apéndice II, son realizables).

Esta teoría, en su forma más simple, para soluciones diluidas y cadenas poliméricas lineales flexibles, supone que para un estado de equilibrio soluto - gel, la única contribución a los cambios de energía libre se deben a los cambios de entropía conformacional al pasar de un medio a otro.  $K_D$  definido en la ecuación (2) dependerá por un lado de los cambios conformacionales de la molécula al pasar de un medio a otro y por otro de la geometría de la cavidad del material de relleno.

Al no haber contribución entálpica,  $K_D$ , resulta ser proporcional a los cambios de entropía.

$$K_D \sim e^{-\Delta G/RT} \sim e^{\Delta S/R} \quad (3)$$

donde  $\Delta S = S_f - S_i$ .

A partir de esta ecuación se puede ver que sucederá con  $K_D$  con los cambios de entropía: si la molécula es de dimensiones mayores que la cavidad del gel, la entropía dentro del poro ( $S_p$ ), será mucho más pequeña que fuera de ella ( $S_1$ ) (tendrá mayor número de conformaciones en la interfase), por lo tanto  $\Delta S$  es fuertemente negativo y  $K_D$  tenderá a cero. Para moléculas de dimensiones menores a la cavidad del gel, tendrán estadísticamente la misma posibilidad de realizar sus conformaciones adentro o afuera, por lo tanto  $S_p = S_1$  y  $K_D$  resultará ser igual a uno. Para moléculas de dimensiones intermedias  $K_D$  oscilará entre cero y uno.

Según lo expresado es posible hallar la relación teórica entre las dimensiones moleculares  $R$ , radio de giro (definido en el apéndice II) y  $K_D$ , para una longitud característica de poro  $\bar{a}$ , de geometría de terminada (para más detalles ver ref. 41 y 42).

La representación gráfica que se obtiene cuando representamos  $R/\bar{a}$  versus  $K_D$  o en su defecto  $V_e$  (ver ec. (1)) para distintas geometrías de poro (esferas, cilindros, en capas) se aprecia en la Fig. 2.

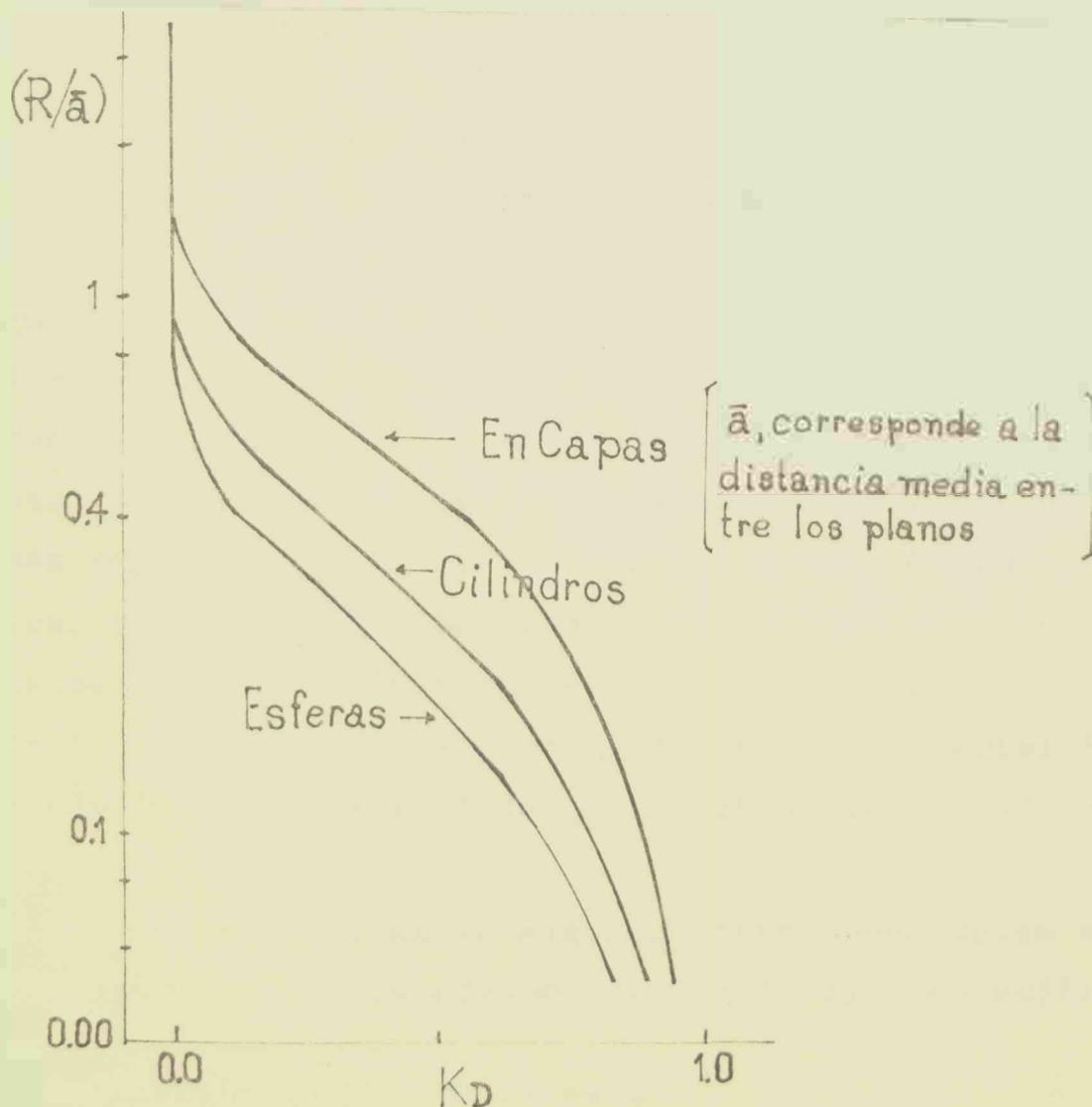


Fig. 2 Representación gráfica obtenida para la relación teórica  $R/\bar{a}$  vs.  $K_D$  (ref. 41,53).

Estas curvas teóricas han sido comparadas con diferentes rellenos de columnas<sup>(53)</sup> encontrándose una buena concordancia entre ellas. Además, si expresáramos las dimensiones moleculares en términos de peso molecular y comparáramos con las curvas experimentales (Fig. 1), confirmaríamos la validez de la teoría. Por otra parte, recordando que experimentalmente  $R^2 \propto M^{1+b}$ , donde M es el peso molecular y b una constante levemente superior a cero, se obtienen curvas similares a las de la figura 2 cuando  $\ln R$  se reemplaza por  $\ln M$  que es experimentalmente más fácil de determinar. En esta forma la teoría es -cualitativamente- ampliamente confirmada por la experiencia en todo caso que el fenómeno cromatográfico sea dominado por la exclusión. Se puede asegurar que se trata de la mejor forma de revelar el fenómeno de exclusión.

Una forma algo más general de probar la teoría fue propuesta por Grubisic y colaboradores<sup>57)</sup>, quienes usaron como parámetro de caracterización molecular al producto de la viscosidad intrínseca y el peso molecular  $[\eta] \cdot M^{(*)}$  cuyo logaritmo representaron en función del volumen de elución. Tal procedimiento permite poner aproximadamente en una sola función los datos experimentales para polímeros de distinta composición química y hasta de distintas estructuras catenarias. La razón de la universalidad de esta representación (en la literatura pertinente se conoce como curva de calibración universal), radica en que el producto  $[\eta] \cdot M$  es proporcional al volumen molar del polímero en solución (según las teorías hidrodinámicas de soluciones de polímeros). Esta circunstancia recalca que el factor volumétrico es la característica fundamental en el fenómeno de cromatografía de exclusión. Una comprobación más cuantitativa de la teoría, está fuera de los límites experimentales, ya que dada la manifiesta influencia no sólo de las dimensiones, sino también de la forma de poro, implicaría un conocimiento previo de la distribución de forma y tamaño del material de relleno, meta alejada de las posibilidades actuales de los estudios de porosimetría.

Las macromoléculas, salvo algunas excepciones tales como aquellos polímeros naturales no degradados que constituyen específicamente pro-

---

(\*) Ver definición de  $[\eta]$  en la secc. 2.2.1.

teínas, DNA, celulosa, etc., son en general mezclas de moléculas de diferente peso molecular y eventualmente de constitución química distinta. Por lo tanto, como se mencionó al principio del capítulo, es de sumo interés evaluar pesos moleculares y distribución de pesos moleculares con buena precisión, si se quiere establecer correlaciones entre propiedad, procesabilidad y estructura, o bien determinar mecanismos de polimerización. Con este propósito se han desarrollado técnicas de fraccionamiento, algunas de las cuales son tan antiguas como la ciencia de polímeros misma.

Hoy en día probablemente, la técnica de fraccionamiento más desarrollada sea la cromatografía de exclusión, aún cuando otras técnicas puedan ser importantes y se sigan utilizando, como por ejemplo: métodos de precipitación o solución fraccionada, métodos de transporte que emplean ultracentrífugas, etc.

El método de precipitación fraccionada se vale de la dependencia de la solubilidad con el tamaño molecular, obteniéndose en caso de polímeros dos fases líquidas: una fase móvil (fase sol) que contiene las fracciones de pequeño peso molecular (más solubles) y otra fase viscosa (fase gel) que contiene las fracciones de peso molecular mayor (menos solubles). A través de gradientes de solventes, cada vez más ricos en precipitante, o mediante gradientes de temperatura, o ambas cosas a la vez, se separan primero las fracciones de peso molecular más elevado, y por último las de menor peso molecular. Esta es sin lugar a dudas, la técnica más antigua para determinar la distribución de pesos moleculares, pero aún hoy es muy utilizada por la simplicidad de procedimiento y por la instrumentación sencilla que requiere.

La técnica conocida como fraccionamiento por columna<sup>58)</sup>, consiste en depositar una fina capa o película de polímero sobre un soporte inerte por evaporación del solvente. Idealmente cada partícula del soporte quedará recubierta de una película uniforme de polímero. El soporte inerte con el polímero, es colocado en una columna que contiene como relleno el mismo soporte inerte, luego se hace pasar un gradiente de solvente de tal forma, que primero se arrastra el componente más soluble y por último el componente menos soluble (de manera opuesta a la técnica de precipitación). Este comportamiento tiene una explicación puramente termodinámica, basada en las diferentes solubilidades que presentan las

macromoléculas según el tamaño o peso molecular frente a un mismo solvente. Por lo tanto, las moléculas más pequeñas (más solubles) se solubilizarán primero y serán arrastradas antes que las de mayor tamaño (menos solubles). Que se produzcan otros fenómenos distintos al mencionado, como por ejemplo la difusión, está supeditado al espesor de la película.

La etapa más delicada del proceso es la formación de la película, debido a que el tiempo de difusión es directamente proporcional al cuadrado de la distancia que deben recorrer las moléculas (espesor de la película) e inversamente proporcional al coeficiente de difusión, que en polímeros es del orden de  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/seg. El espesor de la película deberá ser lo suficientemente delgado como para permitir que las moléculas lleguen al solvente y sean arrastradas por éste sin que haya difusión. Para analizar estas fracciones, se las puede inyectar en CPG, hallándose de esta manera las distribuciones de peso molecular y la distribución total del polímero. Este es un ejemplo de las ventajas que puede traer el empleo de más de una técnica de análisis cuando se procesan muestras poliméricas con distribuciones anchas.

El empleo de la ultracentrífuga para la evaluación de la polidispersidad se funda en que: cuando se le aplica un campo centrífugo a un soluto de composición no uniforme como las macromoléculas, se produce una separación parcial, o un fraccionamiento físico de las partes componentes.

Por medio de una observación óptica se puede determinar la distribución de los coeficientes de sedimentación, para luego hallar la distribución de pesos moleculares. En tanto que en CPG, medimos la distribución de pesos moleculares para un intervalo de volúmenes de elución, con esta técnica medimos la distribución de peso molecular para un intervalo de coeficiente de sedimentación. Esta técnica presenta dificultades tanto desde el punto de vista experimental como interpretativo, y los mejores resultados se han logrado para aquellos sistemas polímero-solvente, donde el solvente se comporta como un solvente theta (ver apéndice II, al final), permitiendo así que la molécula polimérica esté en la solución en un estado no perturbado, eliminando toda interacción polímero-solvente que introduce errores en las mediciones. Desafortunadamente no son muchos los solventes que presentan esta propiedad a

las temperaturas experimentalmente accesibles.

La técnica de fraccionamiento más empleada, como se mencionó al principio es la cromatografía por permeación de geles. Se presentan dos alternativas operacionales dentro de esta técnica: la llamada CPG "preparativa" y CPG "analítica" ó CPG de "alta resolución". La CPG preparativa permite obtener fracciones del orden de los miligramos e incluso de gramos, por el empleo de columnas de grandes dimensiones (éstas tienen una longitud aproximada de 90 cm con un diámetro de partícula de relleno promedio de  $50 \mu\text{m}$ ). Aún así muchas veces se opta por combinar las fracciones de corridas repetidas<sup>48)</sup>, o bien reciclar las fracciones para aumentar la resolución de la muestra<sup>49)</sup>, evitando de este modo el uso de columnas excesivamente largas, con la consiguiente caída de presión del sistema y aumento del tiempo de análisis. De todos modos, los tiempos de análisis son de horas y pueden llegar incluso hasta días.

El desarrollo de los rellenos de columnas, en lo referente a composición, porosidad y resistencia mecánica, ha dado origen a la CPG "analítica" de alta resolución; la misma utiliza columnas mucho más cortas que las anteriores (son del orden de 40 cm de longitud con rellenos de esferas de diámetro promedio de  $10 \mu\text{m}$ ). Los tiempos de análisis con esta técnica son mucho menores y presentan desventaja respecto de las columnas grandes pues admiten menores cargas de muestra.

Muchas veces, a las fracciones recogidas de una columna preparativa se las inyecta a un CPG "analítico" para determinarle su distribución y peso molecular promedio como complemento del análisis.

Es conveniente recalcar que la cromatografía de exclusión, por sí sola no nos puede dar información sobre promedios de pesos moleculares o distribución de pesos moleculares, sin una etapa previa de calibración que requiera el uso de polímeros patrones caracterizados por métodos absolutos. El tipo y grado de exactitud de la caracterización puede ser variable ya que ella no sólo dependerá del método analítico y el basamento teórico en la interpretación de los resultados experimentales de la técnica empleada, sino que está influenciada por la estructura química del polímero (homo - copolímero), estructura catenaria (cadenas lineales o ramificadas), solubilidad, etc..

Es obvio que esos factores entonces se reflejarán en la calibra-

ción obtenida.

En el presente trabajo se propone un método que contemple los factores fundamentales de la calibración, requiriendo una caracterización de los estándares provista por métodos de aplicación irrestricta. Por tal circunstancia, las consideraciones teóricas y la aplicación experimental se refieren fundamentalmente a homopolímeros lineales.

## 2.2 Factores Determinantes de la Cromatografía de Exclusión

La posibilidad de aplicación de esta técnica en casos concretos, depende de una serie de circunstancias, que pueden agruparse en dos categorías. La primera de ellas, comprende todo aquello que posee características más o menos únicas, o sea que las alternativas de variación son muy limitadas. Estos son los parámetros procesales primarios, que comprenden:

a) Los Geles: con sus características fundamentales de: porosidad, capacidad de separación, estabilidad mecánica, térmica y química.

b) Medio de Elución: en relación a la capacidad de solvatación, viscosidad, compatibilidad con el gel, propiedades físicas o fisicoquímicas que determinen la detectabilidad del soluto con la máxima sensibilidad.

c) Método de Detección: generalmente los métodos de detección son los comunes a otras técnicas, como absorción en el visible y ultravioleta; o diferencias en el índice de refracción soluto-solvente. Existen también métodos de detección específicos para polímeros como viscosidad y dispersión de luz.

Dada la importancia que tienen estos parámetros procesales, que muchas veces resultan decisivos en el empleo de esta técnica, se tratarán con más detalle al final del capítulo.

La segunda categoría corresponde a aquellas variables denominadas "variables de ajuste operacional", siendo las más importantes:

- a) Concentración de soluto
- b) Velocidad de flujo
- c) Temperatura

Estas variables dejan al operador un ámbito de ajuste mucho más amplio.

### 2.2.1 Concentración de Solute

Son conocidos los efectos de exceso de concentración sobre el volumen de elución con la consiguiente distorsión en los elugramas<sup>1),2) 36)</sup>, por el llamado "efecto filete viscoso" ó "efecto dedo viscoso"<sup>3) 8),37)</sup>. Este efecto hallado en el estudio de flujos en fluidos viscosos sobre materiales rellenos, se produce en aquellas muestras que presentan alta viscosidad. Esta característica permite que la muestra al atravesar el material relleno de una columna haga las veces de "tapón", el cual puede ser atravesado por el solvente (menos viscoso), formándose un frente de solvente y uno de polímero que resulta temporalmente retardado. Como la muestra se va dispersando a medida que recorre la columna rellena, el efecto disminuirá a la salida de la misma, en forma tal que el último componente que eluye reflejará el efecto de distorsión en menor grado. Esto hace que la curva de elución comience en el mismo punto en que lo hacen las mismas muestras a concentraciones más bajas, pero se eleva más lentamente que éstas y retoma la línea base en forma retardada. Este fenómeno depende de varios factores, los que pueden ser fácilmente comprendidos si recurrimos a la siguiente aproximación:

$$[\eta] \approx \frac{\eta - \eta_0}{c} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (4)$$

Donde  $[\eta]$ : viscosidad intrínseca en ml/g

$\eta$  : viscosidad de la solución

$\eta_0$  : viscosidad del solvente

$C$  : concentración en g/ml

$\eta_{sp}$ : viscosidad específica

<sup>3)</sup> La palabra original viene del inglés "viscous fingering".

Teniendo en cuenta la expresión que relaciona  $[\eta]$  con el peso molecular  $[\eta] = K \cdot M^\alpha$  (ecuación de Staudinger, Mark, Houwink y Sakurada), podemos escribir:

$$\frac{\eta - \eta_0}{c} \approx K \cdot M^\alpha \quad (5)$$

ó

$$\eta \approx \eta_0 + \eta_0 \cdot K \cdot M^\alpha \cdot c \quad (6)$$

donde  $K, \alpha$  : son constantes que dependen del par polímero solvente y  $M$ : peso molecular.

De la última expresión se puede ver más fácilmente, que un aumento en la concentración de la solución, como en el peso molecular del polímero (para la mayoría de los casos  $\eta_{sp}$  toma valores cercanos a uno), o en la viscosidad del solvente, implicará un aumento de la viscosidad de la solución. Lo contrario ocurriría, si aumentáramos la temperatura, puesto que en este caso disminuiría la viscosidad del solvente  $\eta_0$ . El efecto de concentración es mayor en el caso de polímeros de peso molecular elevado, según se desprende de (6). Se propone para esos casos<sup>3), 22)</sup>, trazar curvas de calibración  $\log M$  vs.  $V_e$ , cuyos  $V_e$  sean calculados por extrapolación a concentración cero.

Un razonamiento interesante de lo que podría ocurrir hipotéticamente según estos efectos de concentración sería por ejemplo el de dos curvas de calibración a dos concentraciones diferentes, las cuales presentan como lo demostraron experiencias de Berger<sup>22)</sup> y Mori<sup>3)</sup> un aumento de la pendiente o lo que es lo mismo una pérdida de la capacidad de separación de la columna, al aumentar la concentración como se ve en la Fig. 3.

Supongamos que preparamos una mezcla A con  $C_1$  de  $M_1$  y  $C_2$  de  $M_2$ . Según la curva de calibración para esas dos concentraciones, la mezcla A no se separaría. Si por el contrario preparáramos una mezcla B, con concentraciones  $C_1$  de  $M_2$  y  $C_2$  de peso molecular  $M_1$ , según la Fig. 3, lograríamos una mayor separación que la que se obtiene para una mezcla de  $M_1$  y  $M_2$  de igual concentración.

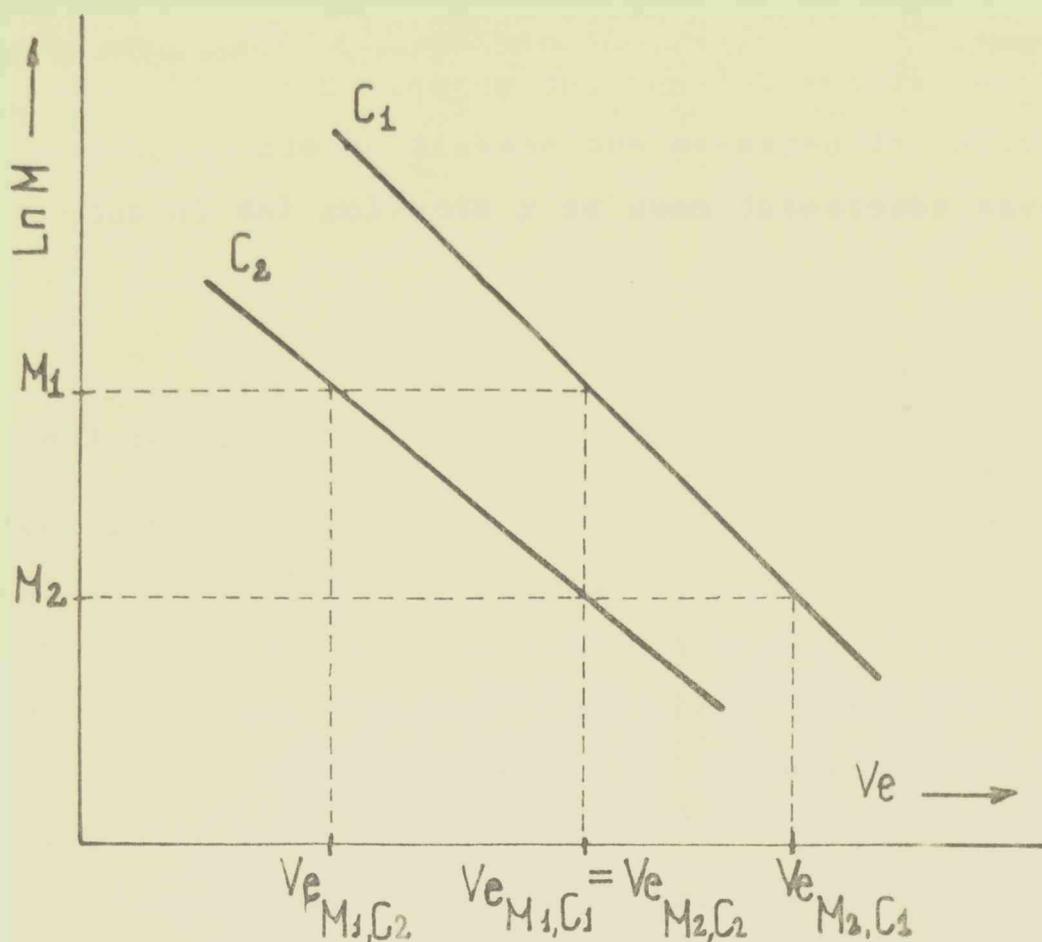


Fig. 3 Representación de la curva  $\ln M$  vs.  $V_e$  a dos concentraciones distintas. Donde  $C_1$  es  $> C_2$  y el peso molecular  $M_1 > M_2$ .

Es importante también mencionar a este respecto la influencia que tienen los componentes de una mezcla polidispersa sobre un componente de dicha mezcla. Berger<sup>40)</sup>, trató este problema experimentando con una muestra de polímero aproximadamente monodispersa activa (marcada con  $C^{14}$ ) y muestras de poliestireno inactivo. Experimentalmente se encontró que la forma del elugrama en el polímero molecularmente uniforme (activo), era similar si se lo inyectaba sólo o con muestras de poliestireno inactivo de pesos moleculares diferentes al de las moléculas marcadas. Sólo los componentes circundantes (de similar peso molecular), actúan sobre la forma y distribución de un elugrama, pero no los componentes de peso molecular alejados.

Algunos autores han encontrado que la distorsión de los elugramas decrece a velocidades de flujo altas y pesos moleculares elevados. De todos modos, en la actualidad, en CPG "analítica" o de "alta resolución", se prefiere trabajar con concentraciones que no van más allá de 10 mg/ml, aunque algunas veces la falta de sensibilidad en la

detección de las muestras, hace necesario el elevar las concentraciones de las mismas, con los riesgos mencionados anteriormente. Esto ocurre por ejemplo, cuando se trabaja con muestras de índices de refracción próximos al del solvente y se usan detectores basados en esta propiedad.

### 2.2.2 Velocidad de Flujo

Existen discrepancias en la literatura en cuanto a la influencia que tiene la velocidad de flujo en el volumen de elución, ancho y simetría de los elugramas y en la resolución de las columnas. Así, por ejemplo, encontramos que algunos autores hallan dependencia del volumen de elución con la velocidad de flujo<sup>52)</sup> y efectos de ensanchamientos significativos a velocidades elevadas<sup>3), 5)</sup>. Unos encuentran que el volumen de elución disminuye para materiales de peso molecular bajo a velocidades pequeñas<sup>76), 77)</sup>, en tanto que otros sostienen que los volúmenes de elución de los polímeros de peso molecular bajo son poco o nada sensibles a las variaciones de la velocidad de flujo<sup>78), 79)</sup>. Hay también quienes encontraron pequeñas variaciones en el volumen de elución y ensanchamientos de pico y pérdida de resolución no tan significativos como los anteriores en un rango amplio de velocidades de flujo<sup>2)</sup>.

Seguramente una solución a estas discrepancias estará dada no sólo en una mayor información y comprensión de los mecanismos que regulan la separación, sino también en una mejor optimización de los parámetros procesales con los cuales trabajamos. Sin embargo, en la mayoría de los casos se prefiere trabajar en CPG "analítica" a velocidades que están en el orden o por debajo de 1 ml/min.

### 2.2.3 Temperatura

En líneas generales, no se tiene una idea clara de los efectos que puede producir la temperatura, salvo el uso de temperaturas elevadas que necesitan algunos polímeros para solubilizarse y por su viscosidad. Se ha encontrado por ejemplo<sup>4)</sup>, que el volumen de elución de determinados compuestos poliméricos decrece cuando elevamos la temperatu

ra, del mismo modo tiende a decrecer el ancho del pico del elugrama cuando se aumenta ésta, lo que probablemente se deba a una disminución de la viscosidad y por consiguiente disminución del "filete viscoso" (ver Secc. 2.2.1).

### 2.3 Geles

Bajo este nombre se incluyen todos los materiales de relleno de columnas empleadas con CPG, que son una parte esencial del éxito del análisis en cromatografía de exclusión.

Generalmente es deseable que los materiales de relleno posean estabilidad química, mecánica y térmica. Esta combinación de propiedades permite usar columnas con diferentes solventes a distintas temperaturas, a varias velocidades de flujo con pequeña o ninguna pérdida de resolución. La distribución de tamaños de poro, de tamaños y empaquetamientos de partículas, su característica polar y otros parámetros físicos, juegan un papel preponderante en el comportamiento del relleno. La reducción del diámetro de partícula (por debajo de los 20  $\mu\text{m}$ ), ha permitido aumentar la eficiencia de las columnas y por lo tanto reducir la longitud y diámetro de las mismas, permitiendo disminuir el tiempo de análisis por un factor mayor de diez con respecto a aquellas columnas rellenas con diámetro de partículas del orden de 50  $\mu\text{m}$ . Esto, junto con la estabilidad de los nuevos rellenos, ha permitido trabajar a velocidades de flujo más altas, dando origen a la llamada CPG "analítica" o de "alta resolución". En la actualidad hay diversos materiales de relleno que cumplen en mayor o menor medida con los requisitos mencionados anteriormente.

Desde el punto de vista de la composición química del relleno, encontramos materiales orgánicos e inorgánicos. Dentro de los materiales orgánicos más comunes, se pueden mencionar los rellenos a base de poliestireno entrecruzado, con un espectro de tamaño de partícula de 20 a 60  $\mu\text{m}$  (conocido comercialmente como Styragel). Posteriormente se desarrollaron rellenos del mismo material con diámetro de partícula de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  ( $\mu$ -Styragel). Asimismo existen rellenos de poli (acetato de vinilo) (Merkogel) y otros materiales porosos como el Sephadex (dextrano), como material de relleno, Bio Gel (acrilamida o

agarosa), etc. Algunos de estos materiales son blandos, mientras que otros son rígidos. De allí las diferentes longitudes de columnas que se pueden construir y las presiones que pueden soportar. Los geles blandos como el Sephadex y Bio Gel, tienden a hincharse apreciablemente con muchos solventes y sólo pueden resistir presiones de trabajo mucho menores que los geles rígidos.

En los últimos años se ha incrementado el interés y la popularidad de los materiales de relleno de tipo inorgánico. Así, por ejemplo, tenemos materiales porosos de sílice, como los conocidos bajo el nombre de Spherosil, rellenos de vidrio poroso de amplio espectro de porosidad como el Bio Glass y Corning Porous Glass. Los hay también pasivados, es decir materiales a base de sílice pasivados, como los comercialmente conocidos  $\mu$ -Bondagel (a los oxhidrilos activos de la sílice se los pasiva creando una fase éter) y Lichrospher (a los oxhidrilos activos se los hace reaccionar con compuestos halosilánicos). Sobre este último se darán más detalles en el próximo capítulo, por ser el material utilizado en nuestras experiencias.

Con respecto a la porosidad de las columnas puede hacerse la siguiente pregunta: ¿qué es más conveniente?, ¿utilizar una sola columna con amplia variación del tamaño de poro, o un juego de columnas, cada una con definida porosidad?. La respuesta es afirmativa para la segunda alternativa, puesto que contar con una distribución de porosidades como en el caso del juego de columnas, permite según los intervalos de pesos moleculares de interés, cambiar las columnas de porosidad menos adecuada por otras más aptas y lograr con ello una mayor selectividad en la determinación de pesos moleculares.

#### 2.4 Fase móvil

El solvente a emplear como medio de elución es uno de los problemas principales cuando se encara la aplicación de esta técnica a polímeros, ya que el mismo debe cumplir una serie de requisitos tales como el de disolver un número grande de compuestos, ser fácilmente accesible, y por otro lado, sus impurezas se deberán eliminar con facilidad.

Durante el almacenamiento y posterior utilización no debe sufrir cambios químicos, no debe ser agresivo a los materiales de relleno de

las columnas y a otras partes del equipo cromatográfico, ni tampoco deberá reaccionar con los componentes a separar.

El eluyente debe también cumplir otros requerimientos desde el punto de vista fisicoquímico. Por ejemplo, en el caso de ser solvente orgánico, deberá tener una viscosidad lo más baja posible, pero por otro lado no tendrá que ser demasiado volátil.

Para la detección, los detectores espectrométricos requieren el uso de solventes que tengan una absorbancia mínima en la zona del espectro a usar. Los refractómetros diferenciales necesitan solventes con índice de refracción que difieran (tanto como sea posible) del índice de la muestra. En principio, como veremos más adelante, debemos asegurarnos que el fenómeno que ocurra sólo sea el de exclusión, y esto implica por lo tanto, que no haya interacción entre el soluto y relleno poroso, lo cual se consigue usando solventes termodinámicamente buenos<sup>59), 60), 61)</sup>. De esta forma se impide o disminuye considerablemente toda interacción soluto-gel.

Para aquellos sistemas llamados "hidrofílicos", los solventes más adecuados son: agua, metanol, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etc..

Para compuestos "organofílicos", los solventes más comúnmente usados son el tetrahidrofurano, benceno, tolueno, cloroformo, dioxano, trifluoretanol, hidrocarburos clorados aromáticos, etc..

## 2.5 Métodos de Detección

La elección de un detector dependerá del tipo de sustancia a separar y de los requerimientos de sensibilidad en la detección. La elección de un detector en particular lleva generalmente a una situación de compromiso entre los requerimientos de sensibilidad y universalidad y la necesidad de trabajar bajo distintas condiciones experimentales (velocidad de flujo, temperatura, composición de fase móvil, dilución, etc.).

Los detectores más ampliamente usados para detectar polímeros son los refractómetros diferenciales; para ello se usa el sistema solvente-polímero que dé una diferencia máxima en el índice de refracción. Cuantitativamente, la respuesta del detector, depende de la re-

lación de proporcionalidad que existe entre  $\Delta n$  (índice de refracción del polímero menos el del solvente) y la concentración del polímero. Por otro lado, esto implicaría que el índice de refracción del polímero fuera independiente del peso molecular, condición esta que generalmente se cumple para series homólogas de polímeros por encima de unos cientos en peso molecular, pero para pesos moleculares más bajos, específicamente en la zona de oligómeros hay una dependencia con el peso molecular<sup>6)</sup>, que hace necesario introducir algún factor de corrección.

La refractometría diferencial no es específica, es decir no es satisfactoria para monitorear fracciones o una mezcla de polímeros de distinta composición química, así pues, no hay una regla para determinar si un pico pequeño en una mezcla representa trazas de componentes con una gran diferencia en el índice de refracción con respecto al solvente, o es el componente que está en mayor proporción con un índice de refracción muy similar al solvente. Como el refractómetro es un detector diferencial, deberá contar con una celda de referencia por donde pase el solvente solamente, y dado que es capaz de medir diferencias entre la sexta y séptima cifra decimal (corresponde aproximadamente a un cambio de concentración de una ppm.), del índice de refracción, durante la operación cromatográfica, se debe evitar que se produzcan cambios de temperatura, presión, velocidad de flujo, etc.. Además, el solvente utilizado como eluyente se deberá desgasificar. El no tener en cuenta todos estos detalles puede significar tener "líneas de base" defectuosas.

Otro de los detectores ampliamente usado es el de absorción en ultravioleta, (UV). Sus principales ventajas son: dependencia relativamente pequeña de la respuesta con los cambios de velocidad de flujo de la fase móvil y de la temperatura, y alta selectividad. Los hay de distintos tipos: los que operan con una o más longitudes de onda bien definida (por ejemplo el de  $\lambda = 254$  nm., proveniente de la lámpara de mercurio), o aquellos que vienen provistos de monocromadores, que permiten trabajar a varias longitudes de onda. Con respecto a este punto, se debe aclarar que muchas veces en la práctica se presentan situaciones de compromiso respecto a la elección del tipo a usar. Si bien el nombrado en último lugar, permite trabajar con un intervalo más amplio

de longitudes de onda, suministra menor intensidad de luz (absorción del monocromador, ángulo sólido más grande, etc.). Comercialmente se consiguen detectores de UV de alta sensibilidad, que permiten un intervalo amplio de trabajo.

Detectores en la región del espectro visible también son utilizados, siempre y cuando el soluto a detectar absorba en esa zona. Su construcción es similar a la del detector UV.

Para ciertos tipos de compuestos también se usan detectores fluorimétricos e infrarrojos. Estos últimos tienen la ventaja de poseer una alta selectividad, pero su gran desventaja es la dificultad de encontrar solventes que sean transparentes en esa región.

Todos los detectores mencionados hasta ahora proporcionan el mismo tipo de información, es decir, cantidad o peso del eluato en función del volumen de elución. Cualquier información acerca de la distribución o peso molecular del soluto detectado, requerirá hallar una función que relacione el volumen eluido con el peso molecular (función de calibración). Sin embargo, existen en cromatografía de exclusión otros detectores que por su especificidad se los podría llamar "detectores macromoleculares", capaces de medir el peso molecular del soluto eluido sin necesidad de calibrar previamente el sistema; ellos son los detectores viscosimétricos y los detectores por dispersión de luz. Ambos operan simultáneamente con detectores que miden la concentración; de esta manera la relación entre la viscosidad relativa o la intensidad dispersada en función de la concentración nos dará el peso molecular de la fracción de soluto que eluye para ese intervalo de volumen de elución.

El dispositivo que mide la viscosidad es sustancialmente diferente de los viscosímetros comunes usados para polímeros, pues deberá medir continuamente pequeños volúmenes de efluente. Los hay de dos tipos: aquéllos que detectan a través de un mecanismo "discontinuo" el soluto que pasa con el efluente<sup>43),44),45)</sup>, y aquéllos que detectan en forma "continua" ó "automática"<sup>46),47)</sup>.

El mecanismo del viscosímetro discontinuo, consiste en coleccionar y cargar automáticamente efluente en una serie de viscosímetros en un gabinete termostatzado, controlando el flujo que reciben mediante un sifón (generalmente tiene 5 ml de capacidad), o un cuentagotas, regis-

trando con ayuda de dispositivos ópticos, como por ejemplo fotocélulas, el tiempo que tarda en escurrir la fracción colectada a través de un capilar de dimensiones conocidas. Estos tiempos son relacionados al tiempo  $t_0$  de escurrimiento del solvente para obtener la viscosidad relativa  $\eta_r$  o la viscosidad específica  $\eta_{sp}$ , según las ecuaciones (7) y (8)

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (7)$$

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (8)$$

donde  $t$ , es el tiempo de flujo de la solución.

Dividiendo  $\eta_{sp}^{(x)}$ , por la concentración de la solución, obtenemos la viscosidad intrínseca  $[\eta]$ , definida como:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp}/c) \quad (\text{ml/g}) \quad (9)$$

Extrapolando a concentración cero  $\eta_{sp}/c$  en función de  $c$  (donde  $c$  es la concentración del eluato, determinado por el detector de concentración), obtenemos en la ordenada  $[\eta]$ , la cual está relacionada al peso molecular por la expresión general empírica de Staudinger (ver ecuación 5). Conocidas las constantes  $K$  y  $\alpha$  que dependen del sistema polímero-solvente utilizado, podemos hallar el valor del peso molecular sin necesidad de contar con una curva de calibración  $\log M$  vs.  $V_e$ . El mismo razonamiento es aplicable para los viscosímetros "continuos", con la diferencia de que en lugar de medir tiempos, se miden las presiones originadas por la viscosidad del eluato al pasar a velocidad de flujo constante por el interior de un tubo capilar (ley de Poiseuille)

---

(x) La verdadera expresión es  $\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$ , siendo  $\eta$  y  $\eta_0$  la viscosidad de la solución y solvente respectivamente. Sin embargo, para mediciones hechas en viscosímetros capilares y a bajas concentraciones (tal que la densidad de la solución es aproximadamente igual a la del solvente), la ecuación (8) es una buena aproximación.

de acero inoxidable de dimensiones conocidas.  $\eta_r$ , será ahora la relación entre los delta de presión de la solución respecto a los delta de presión del solvente.

$$\eta_r = \frac{\Delta P}{\Delta P_0} \quad (10)$$

El  $[\eta]$  se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$(**) \eta_{inh} = \frac{1}{c} \ln \eta_r \quad (11)$$

Los detectores viscosimétricos continuos requieren una sensibilidad de respuesta muy grande, puesto que las fracciones colectadas tienen una concentración muy pequeña. Además, necesitan otras condiciones operacionales que garanticen la detección tales como mantener la velocidad de flujo y temperatura constante, flujo laminar en el capilar, etc.

El segundo tipo de detector continuo, mide la intensidad de luz dispersada por las macromoléculas en solución. Esta intensidad depende de la concentración del soluto, del ángulo de dispersión, es decir el ángulo que forman el haz incidente con el dispersado bajo el cual se mide y del tamaño de la macromolécula.

En líneas generales, estos detectores<sup>56), 63)</sup> vienen equipados con una fuente de radiación laser (He, Ne) y un sistema óptico que permite hacer mediciones a pequeños ángulos de dispersión (6°, 7°). La celda portamuestra está diseñada de manera de poder trabajar con volúmenes pequeños de eluato (aproximadamente 10  $\mu$ l de capacidad), y algunas permiten trabajar a temperaturas elevadas<sup>55)</sup>. Por último el haz dispersado es recibido en un fototubo o fotomultiplicador. El fotómetro se coloca a la salida de las columnas cromatográficas junto

---

(\*\*\*) La ecuación (11) en realidad corresponde a la llamada viscosidad inherente  $\eta_{inh}$ . Pero cuando trabajamos a concentraciones pequeñas y extrapolamos a concentración cero  $\ln \eta_r/c$  vs.  $c$ , medimos en la ordenada un valor de  $\eta_{inh}$  muy cercano al  $[\eta]$  obtenido por extrapolación de  $\eta_{sp}/c$  vs.  $c$ .

con el detector de concentración. De este modo se determina en forma continua y simultánea la concentración del eluato y la intensidad de la radiación después de ser dispersada por él.

La expresión usada para calcular los pesos moleculares de las fracciones eluidas, no tiene en cuenta la dependencia angular de la intensidad (está afectada por el seno cuadrado del ángulo de dispersión). Sin embargo como las medidas son efectuadas a ángulos pequeños, el despreciar este término no introduce errores en el cálculo. La ecuación para el cálculo es la siguiente:

$$\frac{K C_i}{\bar{R}_{\theta i}} = \frac{1}{M_i} + 2 \cdot A_{2i} \cdot C_i \quad (12a)$$

ó

$$M_i = \left[ \frac{K \cdot C_i}{\bar{R}_{\theta i}} - 2 \cdot A_{2i} \cdot C_i \right]^{-1} \quad (12b)$$

donde  $M_i$ : peso molecular de la fracción  $i$ .

$A_{2i}$ : segundo coeficiente de Virial (se debe determinar previamente).

$C_i$ : concentración de la fracción  $i$ .

$K$ : constante óptica del polímero.

$\bar{R}_{\theta i}$ : exceso de factor Rayleigh definido como la diferencia entre el factor Rayleigh de la solución y del solvente.

En esta técnica, que se la conoce comúnmente como LALLS<sup>54</sup>) (low angle laser light scattering), se determina el  $\bar{R}_{\theta i}$  y  $C_i$  para cada incremento  $i$  de volúmenes de elución, y con las constantes  $K$  y  $A_{2i}$  se calculan los  $M_i$  correspondientes. El valor de  $A_{2i}$  puede conocerse o bien calcularlo (ver apéndice II) y se lo considera constante para todo el intervalo de pesos moleculares calculados ( $A_{2i} = A_2$ ). Esto es correcto cuando se trabaja con distribuciones de pesos moleculares angostas y soluciones diluidas. No obstante, cuando se trabaja con muestras de distribución ancha y se quiere obtener buena precisión en las medidas de  $M_i$ , es necesario corregir a  $A_{2i}$  por polidispersidad.

El empleo de estos detectores específicos de macromoléculas (tam-

bién se los podría llamar detectores absolutos), es un ejemplo más de la conveniencia de trabajar en el análisis cuantitativo en CPG con más de un detector<sup>7)</sup>. La utilización simultánea de dos o más detectores permite obtener una mayor y más completa información sobre la composición y distribución del peso molecular del polímero.

### CAPITULO III

#### 3) CARACTERIZACION SUMARIA DE LOS GELES DE SILICE PASIVADOS

En el capítulo anterior se describió con algún detalle la importancia y los requisitos físicos y/o fisicoquímicos que debían cumplir los materiales de relleno o geles en la cromatografía de exclusión cuantitativa. También se mencionó un tipo de material de relleno inorgánico pasivado (gel de sílice pasivado). La popularidad que está alcanzando este tipo de geles inorgánicos, hace que aumente la experiencia en su uso y su perfeccionamiento en la fabricación, ya sea en cuanto a la regularidad y homogeneidad del relleno, como a la disminución del diámetro de las partículas y la consiguiente disminución de las dimensiones de las columnas.

En la introducción al capítulo anterior se dejó bien en claro que el método de CPG es un método fundamentalmente separativo, y que para poder realizar un análisis se debía previamente efectuar una calibración. Es por eso que antes de desarrollar una evaluación cuantitativa del método es necesario calibrar las columnas con que estamos trabajando, es decir hallar la relación entre el peso molecular conocido del polímero y el volumen a que eluye. Previo a esto es imprescindible realizar una caracterización sumaria de los geles, que consiste fundamentalmente en comprobar que existen solamente fenómenos de exclusión y no otro tipo de interacción polímero-gel, como son la adsorción, asociación, efectos de sobrecarga (filete viscoso), así como evaluar aproximadamente la capacidad de separación. En lo que resta de este capítulo se describirán las propiedades y caracterizaciones efectuadas a las columnas conocidas bajo el nombre comercial Hibar<sup>R</sup>, Lichrospher CH-8, fabricadas por E. Merck, Darmstadt.

### 3.1 Ventajas y desventajas del uso de estos geles

Este material ofrece características altamente beneficiosas como ser:

- a) Alta resistencia mecánica, por lo que puede usarse a altas presiones sin que esto tenga consecuencias erosivas sobre el material poroso, y también, en principio, permite trabajar a altas temperaturas.
- b) Total inercia química, por lo que amplía el número de medios de elución a usar sin consecuencias para la estabilidad del gel, circunstancia que puede en determinado caso decidir si la técnica de CPG puede o no ser usada.
- c) Su diámetro pequeño de partícula (10  $\mu\text{m}$ ), permite disponer de columnas de dimensiones reducidas (longitud-diámetro), con alta eficiencia, pudiendo de esta manera obtener separaciones satisfactorias en tiempos relativamente cortos.

Frente a estas ventajas existe potencialmente la posibilidad de una disminución de la capacidad de separación por interacción específica entre el gel de sílice y el soluto macromolecular, dada la gran polaridad de la superficie; interacción (adsorción u oclusión) que interfiere en el puro fenómeno de permeación por exclusión. Es decir al fenómeno entrópico-configuracional se yuxtapone otro entálpico de impredecible efecto. Por tal razón se somete a los geles a un tratamiento de pasivación que elimina los oxhidrilos superficiales por reacción con compuestos halosilánicos.

### 3.2 Detección de posibles interacciones específicas polímero-gel

Uno de los problemas que se presenta en el estudio de los fenómenos que conducen a la separación de solutos de muestras poliméricas es el determinar los tipos de estos fenómenos. En cromatografía por exclusión el fenómeno preponderante es el de permeación o exclusión como también se lo llama<sup>8)</sup>. Pero eso no implica que puedan existir otras interacciones soluto-gel, como por ejemplo adsorción u oclusión, fenómenos que producen cambios en el volumen de elución

de las muestras y también deformación de los elugramas. Los fenómenos de adsorción pueden incluso cambiar drásticamente la relación entre el peso molecular y el volumen de elución, dando curvas de calibración con pendientes totalmente opuestas a las curvas de calibración donde se presenta solamente el fenómeno de permeación<sup>70)</sup> (ver Fig. 1). Por otro lado, la adsorción guarda una relación proporcional con el peso molecular, ejemplo de ello es la separación de oligómeros por técnicas de cromatografía de adsorción y no por cromatografía de exclusión.

En el caso de rellenos inorgánicos de sílice no pasivados u orgánicos de poliestireno se han encontrado interacciones o adsorciones en ciertos tipos de solutos<sup>9)</sup>, tal es el caso del nitrato de celulosa. Este polímero interfiere manifiestamente con rellenos inorgánicos de sílice no pasivados, y es por eso que nuestra primera caracterización del relleno consistió en verificar si había adsorción con dicho polímero. Se utilizó para ello como medio de elución tetrahidrofurano (THF), y la solución de nitrato de celulosa en acetona se inyectó en diferentes volúmenes y distintas concentraciones con el fin de verificar la existencia de efectos que provocan variaciones en los volúmenes de elución y distorsión de los elugramas. Se varió también el número de columnas (para corroborar su comportamiento interparticular) y la permeabilidad de las mismas, con la finalidad de ver si las columnas tienen el mismo comportamiento si el polímero permea o no; es decir observar si hay efectos distintos al de exclusión. La velocidad de flujo empleada fue de 0,5 ml/min. Los resultados de tales análisis están graficados en la figura 4, en la cual se representa la relación entre los miligramos de muestra inyectados y la superficie medida de los elugramas experimentales.

Se utilizó para detectar las muestras, un detector UV modelo 440 de la firma Waters a una longitud de onda de 2.540 Å.

La pendiente de cuarenta y cinco grados que se observa en el gráfico, nos indica claramente que la relación entre la cantidad inyectada y el área de los elugramas son independientes bajo muy diferentes condiciones experimentales. También los máximos de los elugramas en función de la concentración de la solución inyectada muestran el comportamiento normal del aumento de volumen de elución por aumento

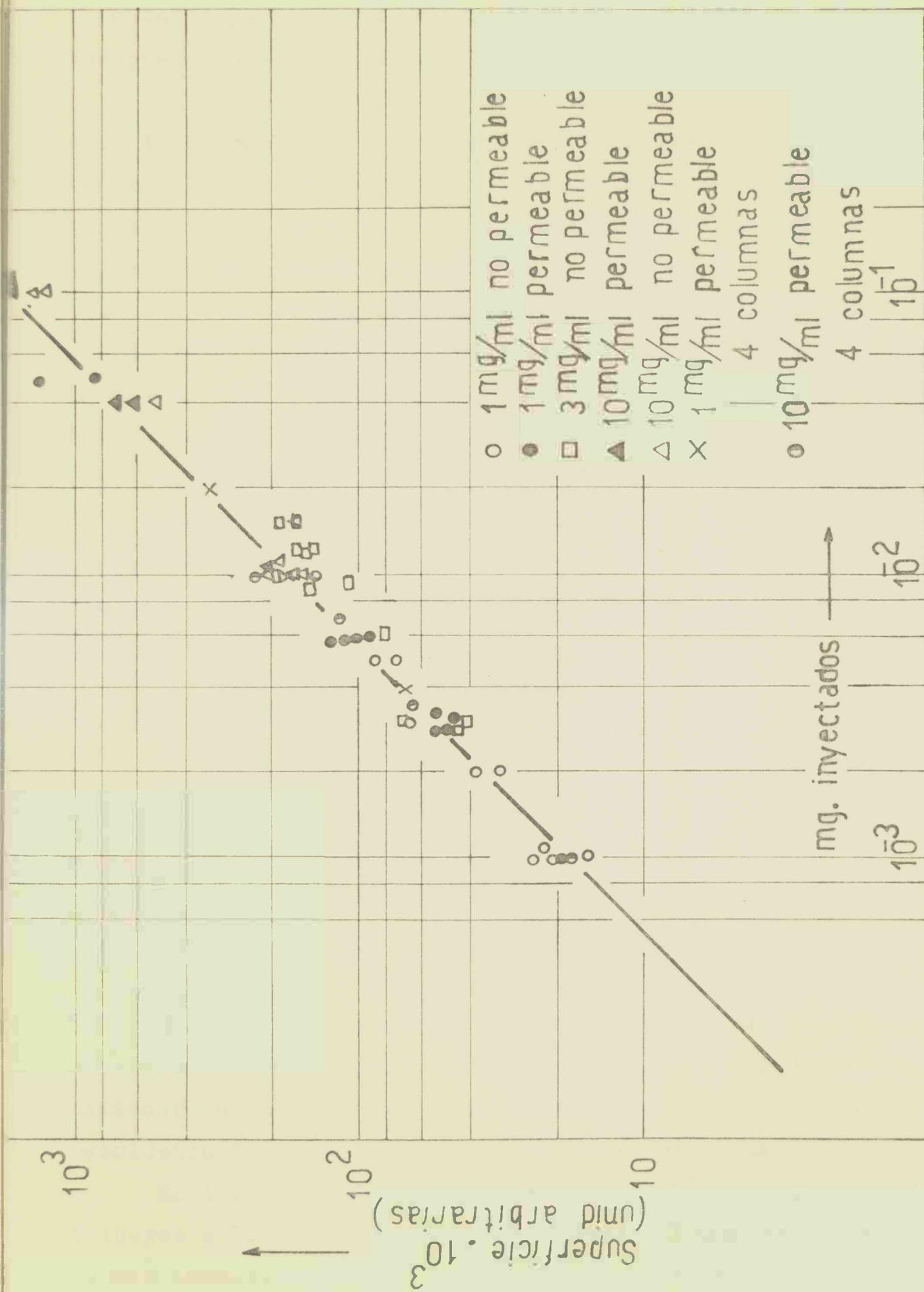


Fig. 4. Relación entre cantidad detectada y nitrato de celulosa inyectado a distintas concentraciones en THF. Permeable significa que el polímero tiene acceso parcial o total al volumen interno del gel. No permeable significa total exclusión. La recta trazada posee pendiente unitaria.

de la concentración (comparar Ambler<sup>10)</sup>), como puede ser observado en las figuras 5 y 6, para poliestireno estándar.

En la figura 5 se representa la relación entre el volumen de elución del máximo del elugrama en función de los miligramos totales inyectados para concentraciones similares de poliestirenos de distintos pesos moleculares.

La figura 6 representa el volumen de elución del máximo en función de la cantidad total de miligramos inyectados, pero para dos concentraciones distintas de los mismos pesos moleculares. En ambas figuras se puede observar que a cantidades de inyección pequeñas, los volúmenes de elución no varían.

Las soluciones de poliestireno fueron preparadas en cloroformo, siendo éste también el eluyente. Se trabajó a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min, y a una temperatura de 25°C. Los valores del  $V_{e,máx.}$ , fueron corregidos usando 1,2,4 triclorobenceno como patrón interno (ver Capítulo V).

Los mismos resultados que para nitrato de celulosa y poliestireno se obtuvieron para poli-beta-propiolactona en diferentes solventes como cloroformo, diclorometano y tetrahidrofurano.

### 3.3 Determinación de la capacidad de resolución de los geles

La eficiencia de los mecanismos de separación están asociados a dos factores: la separación de dos picos contiguos, y el ancho de pico. Giddings<sup>11)</sup> definió la resolución como:

$$R = \frac{\Delta V_e}{4 \sigma} \quad (13)$$

donde  $\Delta V_e$  es la separación de dos picos contiguos expresado como la diferencia de sus volúmenes de elución;  $\sigma$  es la desviación promedio estándar de pico. Para que la separación sea razonablemente buena, la resolución R, tendrá que tomar el valor uno o mayor.

En cualquier método cromatográfico hay siempre procesos que contribuyen a la eficacia de la separación, y procesos que causan dispersiones indeseables, que perjudican la eficiencia. Es por eso que antes de emprender la tarea de caracterización cuantitativa de las columnas

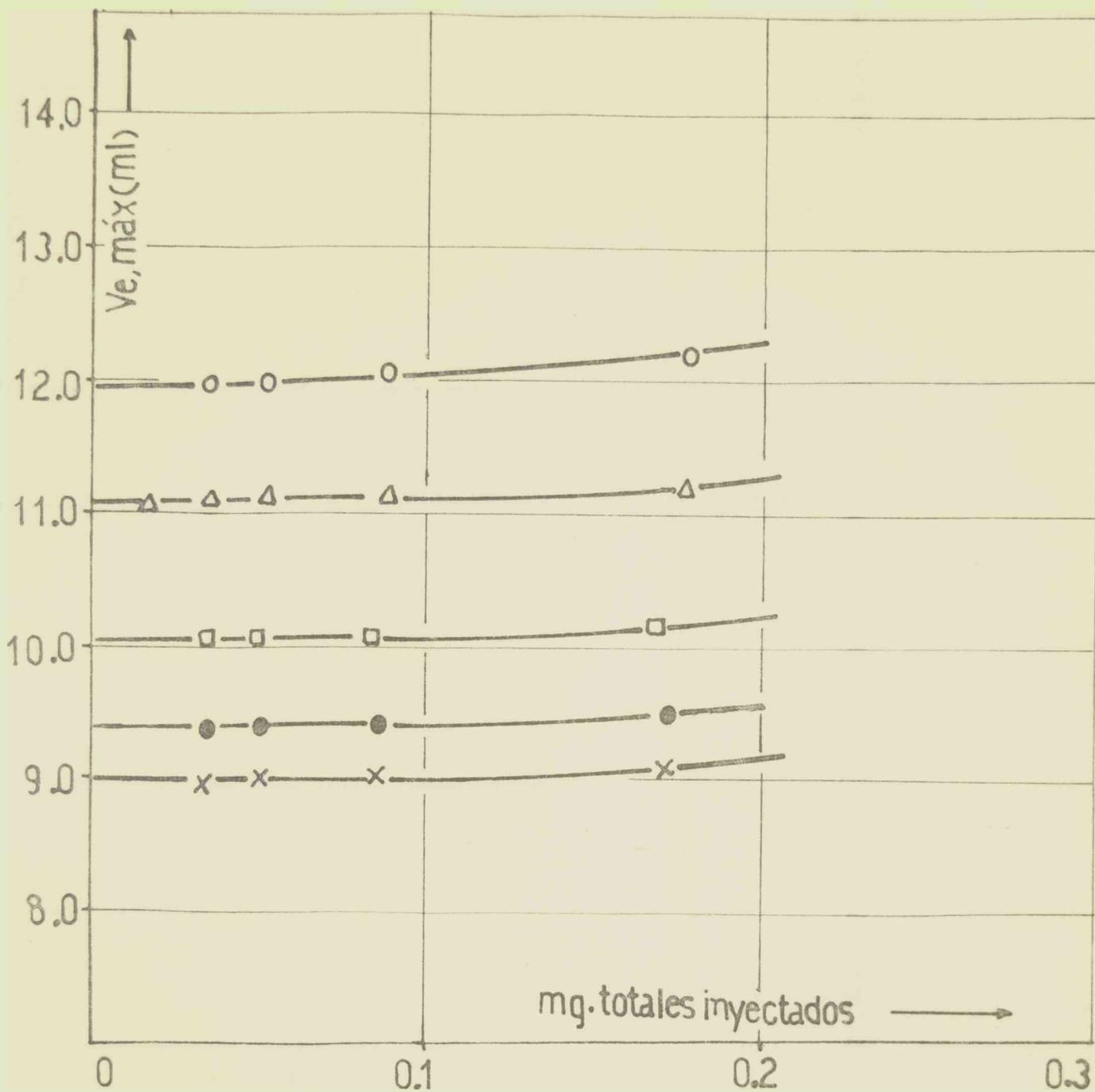


Fig. 5 Relación  $V_{e, \text{máx}}$  vs. mg inyectados para distintos pesos moleculares de poliestireno estándar: ○ 17.500 (4,46 mg/ml); △ 35.000 (4,45 mg/ml); □ 110.000 (4,20 mg/ml); ● 233.000 (4,33 mg/ml); × 470.000 (4,27 mg/ml).

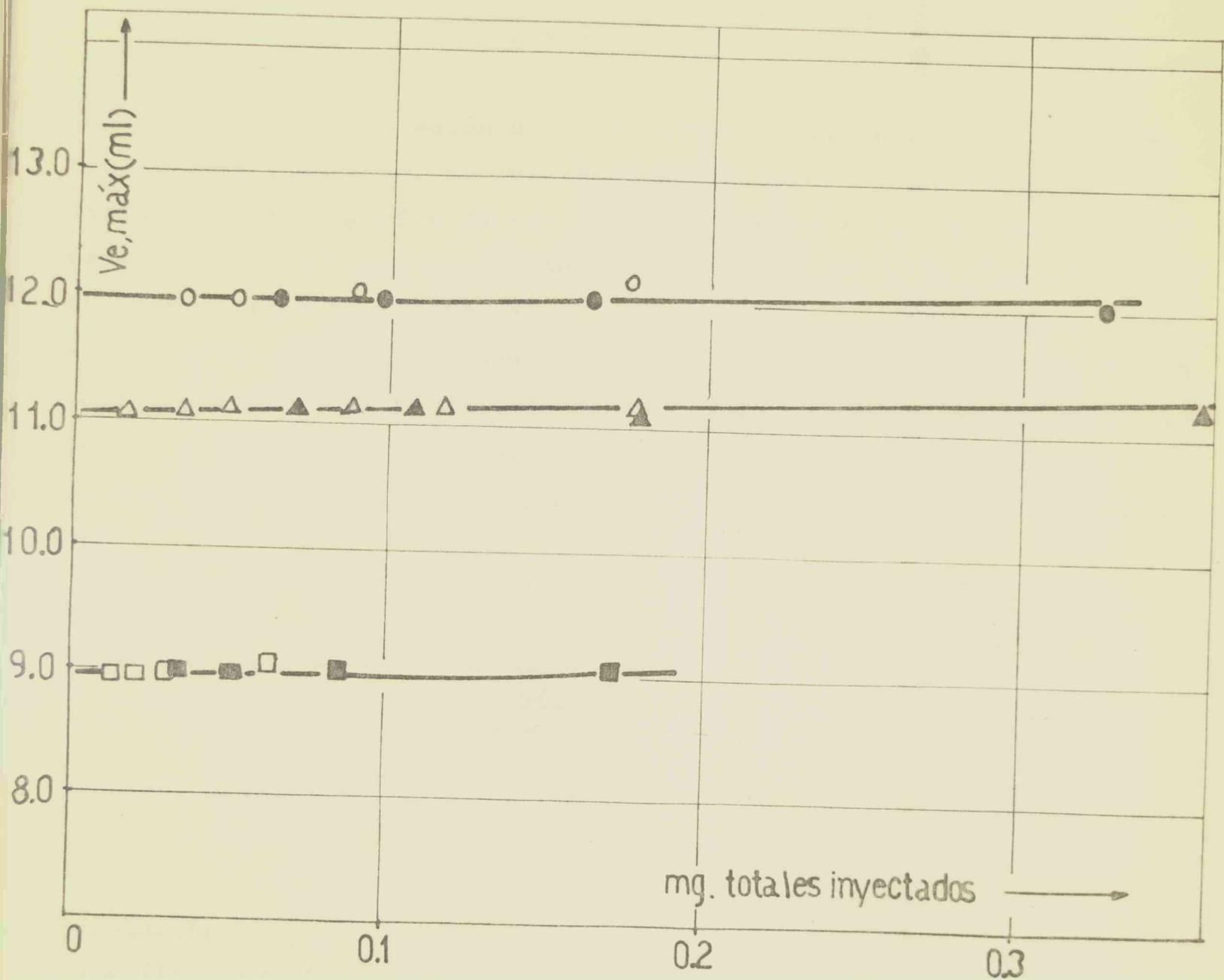


Fig. 6 Representación  $V_{e, \text{máx}}$ . vs. mg inyectados para poliestireno de peso molecular: 17.500 (○,  $c = 4,46$  mg/ml; ●,  $c = 8,18$  mg/ml), 35.000 (Δ,  $c = 4,43$  mg/ml; ▲,  $c = 8,89$  mg/ml, 470.000 (□,  $c = 1,55$  mg/ml; ■,  $c = 4,27$  mg/ml).

cromatográficas, es conveniente cerciorarse si las mismas cumplen con valores de resolución mínimos para poder ser empleados en el análisis cuantitativo. Para expresar la eficiencia de las columnas en cromatografía en general, se usa el concepto del número de platos teóricos (N) definido por:

$$N = 16 \cdot \left[ \frac{V_e}{4\sigma} \right]^2 \quad (14)$$

Si bien la expresión anterior tiene un uso amplio en cromatografía líquida y gaseosa, en realidad para determinar capacidad de resolución en cromatografía de exclusión no nos sirve, a lo sumo nos dará idea de la bondad del empaquetamiento<sup>12)</sup>. Un punto de vista más realista en este tipo de técnica es el de vincular a la resolución el peso molecular y el ancho de base de pico. Siguiendo este principio se han definido diferentes parámetros de resolución, los cuales darán una idea de la eficiencia de la resolución de las columnas empleadas. Dentro de ellos, algunos comúnmente empleados en CPG están dados en la tabla 1.

TABLA 1

Término	Símbolo	Ecuación
Resolución ( $M_1 + M_2$ )	R 11)	$R = 2 \cdot \frac{(V_{e1} - V_{e2})}{W_1 + W_2}$
Resolución específica ( $M_1 < M_2$ )	Rs 50)	$R_s = \frac{2 (V_{e1} - V_{e2})}{(W_1 + W_2) \cdot \log M_2 / M_1}$
Índice de resolución ( $M_1 < M_2$ )	RI 12)	$RI = \left( \frac{M_1}{M_2} \right)^{\frac{W_1 + W_2}{2(V_{e1} - V_{e2})}}$

En todos los casos, M corresponde al peso molecular absoluto, W al ancho de pico, medido entre las intersecciones de las tangentes

a la curva en los puntos de inflexión y la línea de base, y  $V_e$  el volumen de elución del pico del elugrama.  $R$ ,  $R_s$ ,  $RI$  iguales a cero indican que no hay resolución, mientras que el valor máximo que puede tomar  $RI$  es la unidad.

En la tabla 2, se incluyen algunos de los resultados obtenidos con un juego de columnas inorgánicas pasivadas por silanización con un tamaño promedio de partícula de  $10 \mu m$ . Las muestras inyectadas fueron de poliestireno estándar de peso molecular conocido. Las soluciones fueron preparadas en diclorometano de calidad espectroscópica, siendo éste también el eluyente. Las variables operacionales como temperatura y velocidad de flujo se mantuvieron constantes a  $25^\circ C$  y  $0,3 \text{ ml/min}$  respectivamente, usando un detector UV para detectar las muestras.

Sobre la base de los tres términos definidos en la tabla 1, se investigó la influencia del peso molecular en la resolución y qué efectos ejerce sobre ella la cantidad inyectada.

TABLA 2

A) Influencia del peso molecular

Pesos moleculares de los pares analizados <sup>a)</sup>	$R$ <sup>b)</sup>	$RI$ <sup>b)</sup>	$R_s$ <sup>b)</sup>
3.600 - 9.177	0,23	0,02	0,89
38.000 - 111.000	1,08	0,37	2,34
233.000 - 383.000	0,42	0,31	1,95

a) Corresponden a los pesos moleculares viscosimétricos

b) Calculados según ecuaciones de la tabla 1

B) Influencia de la cantidad inyectada

$$\text{Par} \begin{cases} M_1 = 233.000 \\ M_2 = 383.000 \end{cases} \quad c)$$

Cantidad inyectada en miligramos	R	RI	Rs
$1,3 \times 10^{-3}$	0,39	0,28	1,80
$15,5 \times 10^{-3}$	0,43	0,32	2,01
$26,0 \times 10^{-3}$	0,44	0,33	2,06

c) Las muestras fueron mezcladas en igual proporción a una misma concentración

Tomando como referencias los límites superior e inferior de exclusión para ese juego de columnas, que son de  $10^6$  y 800 en peso molecular respectivamente, la tabla 2-A nos indica, comparando entre sí los valores calculados para los tres parámetros de resolución, que la eficiencia de separación es mayor en la zona intermedia de ese rango de pesos moleculares. Una pobre separación se tiene para el par de pesos moleculares más bajo, debido principalmente a la cercanía del límite inferior de exclusión, es decir cuando la muestra sale con el frente de solvente (que es lo que ocurre para un peso molecular de 800). Los valores obtenidos de los parámetros de resolución nos indican que este tipo de columnas posee una buena capacidad de separación y selectividad moderada, comparando con los valores obtenidos para otros materiales de relleno (13), 51).

En cuanto a los valores de la tabla 2-B se observa un ligero aumento de los tres parámetros con el aumento de la cantidad inyectada. Sin embargo, toda conclusión al respecto sería arriesgada, puesto que se necesitarían más datos sobre el particular y por otro lado el único propósito perseguido era el de ver como se comportaban las columnas para cantidades de muestras que usaremos en experiencias posteriores y que además son las que comúnmente se utilizan en cromatografía analítica de permeación de geles o CPG de alta resolución.

## CAPITULO IV

### 4) CARACTERIZACION CUANTITATIVA

#### 4.1 Introducción al análisis cuantitativo en CPG (Calibración-Dispersión)

Las determinaciones analíticas cuantitativas de las distribuciones y pesos moleculares de polímeros, no es posible obtenerla en forma directa. Para ello se requiere lo que se conoce como función de calibración, la cual vincula el volumen de elución, que es la variable operativa experimental, con el peso molecular de la sustancia que eluye. Por intermedio de esta función, transformamos la curva de elución experimental (relación de cantidad de sustancia-volumen de elución), en la distribución de peso molecular (relación de cantidad de sustancia-peso molecular). No obstante, el peso molecular promedio o distribución de peso molecular así obtenidos son aparentes, dado que cada componente de la mezcla polimolecular se dispersa sobre un intervalo determinado de volumen de elución. Esto hace que el volumen de elución del máximo de la curva experimental con que expresamos la función de calibración sea la contribución de dos factores: i) la polidispersidad del polímero, ii) la dispersión que sufre cada componente de la mezcla polimolecular.

Un esquema de la contribución de las especies al cromatograma total se puede observar en la figura 7<sup>14)</sup>.

La función que describe la dispersión se llama función de dispersión, o dispersión instrumental<sup>15)</sup>, que es el resultado de varios factores operativos como: técnica de inyectar la muestra, sistema de detección, volumen muerto del aparato, calidad de empaque de las columnas, concentración y cantidad total de muestra procesada, viscosidad del eluyente, temperatura de operación y mecanismos de transporte del soluto a través del medio poroso. Este último factor es el parecer el preponderante del fenómeno de dispersión<sup>16)</sup>. A ello ha contribuido el perfeccionamiento en la tecnología de los equipos analíticos, de

tal manera que las otras contribuciones a la dispersión sean mínimas.

La Fig. 7 indica que es imposible hacer una evaluación cuantitativa directamente del elugrama (cromatograma total), ya que para el caso de polímeros no podemos evaluar las especies individuales que lo componen, a lo sumo podremos obtener la cantidad total de muestra cromatografiada midiendo el área total del elugrama, previa normalización de la respuesta del detector. Luego es imprescindible para hallar las especies que componen el polímero, conocer a qué volumen eluyen, lo que se logra calibrando el sistema con muestras de pesos moleculares conocidos determinados por métodos absolutos, así como determinando la dispersión de cada componente. Surge de este razonamiento, que cuando se determina la calibración forzosamente se debe tomar en cuenta la dispersión. Esta circunstancia no es siempre tenida en consideración en la literatura pertinente. El presente trabajo tiene como una de sus metas el tratamiento conjunto de calibración y dispersión.

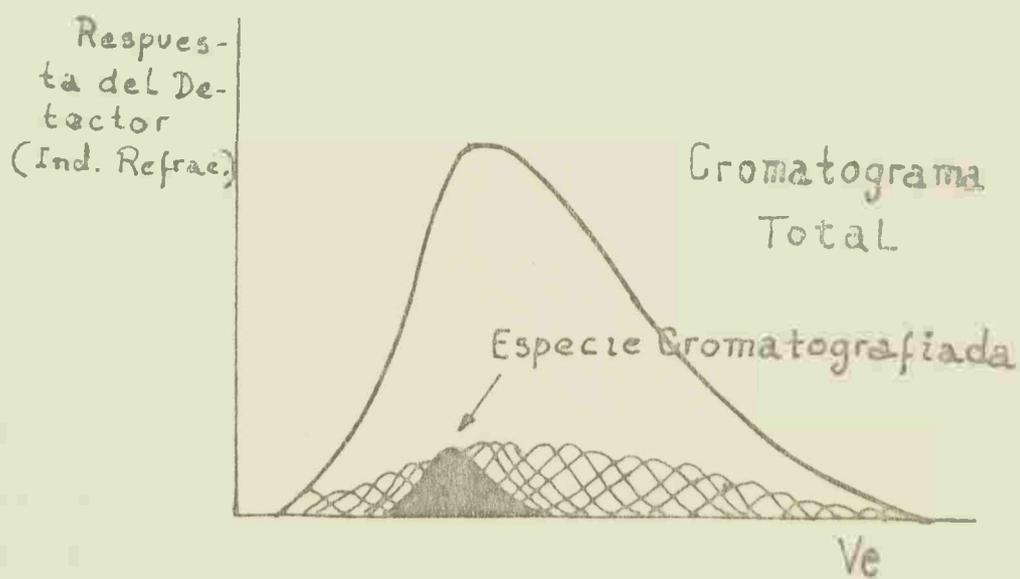


Fig. 7 Contribución de las especies al cromatograma total

Existen en la literatura distintos métodos con corrección por dispersión. En forma aproximada esos métodos los podemos agrupar en tres clases. Una primera clase está constituida por los procedimientos que usan la técnica del flujo invertido<sup>17),18)</sup>.

Una segunda clase de métodos está constituida por aquellos procedimientos que se basan en la suposición de poseer suficiente número de muestras poliméricas, con conocida distribución de pesos moleculares<sup>19),20)</sup>.

La tercera clase de métodos, supone poseer muestras de polímeros con conocidos promedios de pesos moleculares y operan con hipotéticos tipos de funciones tanto de calibración como para la dispersión<sup>21),22)</sup>.

Los dos últimos métodos mencionados, pueden resolver simultáneamente calibración y dispersión. Las técnicas o métodos que usan el flujo invertido permiten en principio obtener la función de dispersión en forma directa, sin embargo la ejecución experimental de esta técnica choca con ciertas dificultades relacionadas con los posibles efectos de la inversión de flujo sobre el relleno de las columnas que podrían conducir aún a la inutilización de las mismas y por lo tanto no puede ser usada en columnas de alta resolución como en el caso presenta. Tampoco son aplicables aquellos métodos que suponen poder operar con muestras poliméricas de conocida distribución, porque o bien hay carencias de técnicas de síntesis al respecto y/o falta de métodos adecuados de medición de distribución de pesos moleculares con la exactitud ó universalidad requeridas. Por último, la suposición de determinado tipo de funcionabilidad para las curvas de calibración y/o dispersión trae el inconveniente de forzar la interpretación de los datos experimentales en términos de las hipotéticas relaciones, sin poder evaluar el error que se comete en cada caso.

En este trabajo se desarrollará un método que permita ambas cosas, es decir variar el tipo de funcionalidad en la calibración y en la dispersión, y al mismo tiempo usar una técnica que nos permita optimizar los parámetros con los cuales estamos trabajando. Esta técnica de optimización se basa en el criterio más universalmente usado que es el de cuadrados mínimos.

#### 4.2 Método de los promedios aparentes de peso molecular

El método permite obtener los valores de los parámetros de calibración y dispersión, seleccionándolos previamente, pudiendo optar por aquéllos que mejor reproducen los resultados experimentales. El método

presupone el conocimiento de promedios de peso molecular de distintas muestras de polímero y las correspondientes curvas de elución.

#### 4.2.1 Fundamento del método empleado

Fue Tung<sup>15)</sup>, quien basándose en una serie de suposiciones que se verán más adelante, desarrolló en una forma relativamente simple en cuanto a su interpretación la ecuación que lleva su nombre, originando un gran impulso en el desarrollo de nuevos métodos para corregir ensanchamientos de banda en el cálculo de pesos moleculares y su distribución.

Supongamos en un primer momento que tenemos una muestra consistente solamente de un componente simple  $i$ , que sufre una dispersión gaussiana. El elugrama representado por la función  $f(v)$ , para este caso tendrá la forma:

$$f(v) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_i} \exp \left[ -\frac{(v-y_i)^2}{2 \sigma_i^2} \right] \quad (15)$$

donde  $\sigma_i$ , representa la desviación estándar de la distribución gaussiana;  $v$  = volumen de elución;  $y_i$  = volumen de elución del máximo del elugrama.

El elugrama de una muestra polimérica, consiste de muchos picos solapados (ver Fig. 7). La función  $f(v)$  estará representada por la suma de los elogramas individuales.

$$f(v) = \sum_{i=1}^n w_i \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_i} \exp \left[ -\frac{(v-y_i)^2}{2 \sigma_i^2} \right] \quad (16)$$

donde  $w_i$  es la fracción de peso del componente  $i$ , y  $n$  es el número total de componentes. En esta ecuación queda implícito que la dispersión de un componente no es afectada por la concentración de otros componentes de la muestra.

Para un número grande de componentes la sumatoria de la ecuación (16) puede ser reemplazada por la integral siguiente:

$$f(v) = \int_{y_a}^{y_b} w(y) \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma} \exp \left[ -\frac{(v-y)^2}{2 \sigma^2} \right] dy \quad (17)$$

La función  $W(y)$ , representa la frecuencia de peso de los componentes que tienen el volumen de elución  $y$  y los límites de integración  $y_a$  e  $y_b$ , corresponden a los volúmenes de elución del componente más bajo y más alto de peso molecular en la muestra. Estos límites pueden ser reemplazados por  $v_a$  y  $v_b$ , volumen inicial y final del elugrama, o bien extenderlos a más o menos infinito.

Si la dispersión no es gaussiana, la integral (17), puede ser escrita en forma general:

$$f(v) = \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot g(v, y) \cdot dy \quad (18)$$

donde  $g(v, y)$ , representa la función de dispersión en general.

A la ecuación (18), se le llama comúnmente "integral de convolución de Tung", en la cual  $f(v)$  y  $g(v-y)$  son conocidos y  $W(y)$  es la función a calcular (distribución de peso molecular corregido por dispersión). Esta denominación de integral de convolución, sólo es válida si la función de dispersión o el núcleo (kernel) de la integral (18) es función solamente de la diferencia  $(v-y)$ , implicando con ello que  $g(v-y)$  es únicamente función de la diferencia  $v-y$  y además no depende de la concentración del soluto. En general la ecuación (18) corresponde a una ecuación integral singular de Fredholm de primera clase<sup>23)</sup>, dado que  $g(v-y)$  puede depender de  $v$  e  $y$  individualmente y no sólo de la diferencia. Además, la función  $g$  puede mostrar una cierta dependencia con la concentración, por lo que deberemos asegurarnos de trabajar a concentraciones tales para las que sea solamente función del volumen de elución.

La determinación experimental de  $g(v-y)$  por medio de la ecuación (18) exigirá el conocimiento de  $W(y)$ , y esto implicaría a su vez, operar con muestras poliméricas de distribución conocida y columnas cromatográficas cuya función de calibración se conoce. Tal procedimiento ocasionalmente aplicado, es experimentalmente muy difícil de llevar a cabo, por las dificultades que ofrece conocer con suficiente exactitud  $W(y)$  y por otro lado, la no existencia de procedimientos experimentales que nos provean la función de calibración sin tener que recurrir directa o indirectamente a alguna suposición sobre  $g(v-y)$ . Sin embargo, es posible salvar estas dificultades, reem

plazando la relación directa de  $f(v)$  con  $W(y)$  de la ecuación (18) por la relación de los momentos de pesos moleculares aparentes,  $\bar{M}_{k,apar.}$ , calculados a partir de los elugramas experimentales, con los momentos de pesos moleculares verdaderos,  $\bar{M}_{p,cal.}$ , obtenidos por técnicas de mediciones osmométricas, viscosimétricas y de dispersión de luz. Las definiciones de ambos momentos, están dados en las ecuaciones (19) y (20).

$$\bar{M}_{k,apar.}^{1/k} = \left[ \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot M^k(v) \cdot dv \right]^{1/k} \quad (19)$$

$$\bar{M}_{p,cal.}^{1/p} = \left[ \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot M^p(y) \cdot dy \right]^{1/p} \quad (20)$$

$\bar{M}_{k,apar.}^{1/k}$  : es el peso molecular promedio aparente, calculado directamente de la curva experimental

$\bar{M}_{p,cal.}^{1/p}$  : corresponde al promedio de peso molecular calculado a partir de la curva de distribución de pesos moleculares  $W(y)$ .

$M(v)=M(y)$ : representan la función de calibración experimental.

Ambos miembros en (19) y (20) se elevan al mismo exponente para expresarlos en unidades de peso molecular.

Es posible relacionar matemáticamente ambos momentos simplemente reemplazando  $f(v)$  de (18) en (19)

$$\bar{M}_{k,apar.} = \iint_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot g(v-y) \cdot M^k(v) \cdot dy \cdot dv = \int_{-\infty}^{+\infty} M^k(v) \cdot dv \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot g(v-y) \cdot dy \quad (21)$$

De la ecuación (21), es necesario obtener una expresión de  $\bar{M}_{k,apar.}$ , donde por un lado aparezca la distribución  $W(y)$  y por el otro las funciones de calibración y dispersión. Esto se consigue usando la regla de Leibnitz<sup>24)</sup>, por lo que la ec. (21) se transforma en

$$\bar{M}_{k,apar.} = \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot dy \int_{-\infty}^{+\infty} M^k(v) \cdot g(v-y) \cdot dv \quad (22)$$

Con la ayuda de (20), es posible demostrar que<sup>24)</sup> (22) conduce

$$\bar{M}_{k, \text{apar.}}^{1/k} = \bar{M}_{p, \text{cal.}}^{1/p} \cdot L \quad (23)$$

donde L es una función que contiene los parámetros de calibración y dispersión y es independiente del volumen de elución.

Además  $k = F(p)$ , pudiendo F contener parámetros de dispersión y calibración.

Si optimizamos los valores numéricos de los parámetros de calibración y dispersión contenidos en L y F, podemos llegar a la siguiente igualdad:

$$\bar{M}_{p, \text{exper.}}^{1/p} = \bar{M}_{p, \text{cal.}}^{1/p} \quad (24)$$

$\bar{M}_{p, \text{exper.}}^{1/p}$  : son los valores de pesos moleculares medidos experimentalmente.

$\bar{M}_{p, \text{cal.}}^{1/p}$  : son los valores de  $\bar{M}_{p, \text{cal.}}$  con (23), usando los parámetros optimizados.

Concluyendo con el desarrollo anterior, dadas las funciones de calibración  $M(v)$  y la función de dispersión  $g(v-y)$ , y conociendo el elugrama experimental  $f(v)$ , es posible aplicar el método de los "promedios aparentes de peso molecular", llegando a la igualdad (24) optimizando los parámetros de ambas funciones de calibración y de dispersión. Como esa optimización se realizará simultáneamente para varios valores experimentales (que superan el número de parámetros a optimizar), el problema se transforma en uno de regresión numérica. Tanto para juzgar la validez del método, como para la posibilidad de aplicación experimental, se hace necesario ver bajo qué condiciones se cumple la expresión (23).

#### 4.2.2 Condiciones de aplicación del método

Fundamentalmente la ecuación (23) deberá cumplir las siguientes condiciones:

I) Validez del formalismo de Tung.

Esto, como se dijo anteriormente, significa que en la ecuación

(18),  $g(v-y)$  sea una función unívoca del volumen de elución, es decir que no varíe con la cantidad inyectada total del polímero cromatografiado. Esta condición fue verificada experimentalmente, comparando el volumen de elución del máximo con la cantidad inyectada como muestra la figura 5 del capítulo III.

## II) Existencia de la función L.

La función L, deberá ser función exclusiva de los parámetros de  $g(v-y)$  y  $M(v)$  e independiente de los detalles de la distribución de pesos moleculares  $W(y)$ . A su vez la existencia de L dependerá del tipo de función matemática de  $M(v)$  y  $g(v-y)$ . Para la mayoría de las funciones propuestas en la literatura L existe<sup>24)</sup>, por lo tanto el método permite tratar los casos de análisis cuantitativo que se presentan en cromatografía de exclusión.

## III) Existencia de polímeros como material de calibración.

Desde el punto de vista experimental, el método exige el conocimiento de dos promedios de peso molecular por muestra de polímero usada en la calibración. El número total de promedios a usar depende de la bondad que se requiera en la optimización de los parámetros (ver ec. (26) secc. 4.3). Por otro lado, no se requiere ninguna información sobre la distribución de pesos moleculares de las muestras usadas en el método.

## IV) Existencia de un método de optimización de parámetros contenidos en la función L.

Para hallar la igualdad (24) es necesario optimizar los valores numéricos de los parámetros contenidos en L.

El método numérico de optimización más empleado es el de cuadrados mínimos, pero dado que dicho método es aplicable a ecuaciones lineales, no es posible usarlo para optimizar la ecuación (23), por la no linealidad de la misma. El método de optimización que se aplicó en este caso es un método numérico que está fundamentado en el criterio de cuadrados mínimos, comúnmente denominado "método iterativo de Gauss"<sup>25)</sup>.

4.3 Procedimiento numérico de optimización de parámetros. Método iterativo de Gauss<sup>26)</sup>

La ecuación (23) puede ser escrita en forma general como una ecuación que contiene n parámetros a determinar:

$$Z = F(P_1, P_2, \dots, P_j, \dots, P_n) \quad (25)$$

Aquí Z representa el peso molecular,  $\bar{M}_{p,cal}^{1/p}$  (o su logaritmo en la ecuación (23)).

El procedimiento consiste en obtener valores de los parámetros tales que minimicen a S de la ecuación:

$$\sum_{i=1}^N (Z_{exp} - Z_{cal})_i^2 = \sum_{i=1}^N \Delta_i^2 = S \quad (26)$$

donde N significa el número de valores experimentales  $Z_{exp}$ . En otras palabras N significaría el número de los diferentes pesos moleculares promedios tomados en consideración para aplicar la ecuación (20) y la (21).

La iteración comienza dando un conjunto de valores aproximados de  $P_{j,0}$  a los n parámetros  $P_j$ , obteniéndose entonces un valor inicial  $Z_0$  que corresponderá a la primera aproximación en Z. Es decir:

$$Z_{cal,0} = F(P_{1,0}, P_{2,0}, \dots, P_{j,0}, \dots, P_{n,0}) \quad (27)$$

Para poder mejorar esta primera aproximación  $Z_0$ , es necesario calcular la modificación  $\delta P_{j,0}$  de los  $P_{j,0}$ , los cuales son capaces de minimizar S. Esa modificación puede ser expresada mediante el desarrollo en serie de Taylor:

$$Z_{cal,1} = Z_{cal,0} + \sum_{j=1}^n \left( \frac{\partial F}{\partial P_j} \right)_0 \delta P_j \quad (28)$$

Este  $Z_1$  calculado, introducido en la ecuación (26) permitirá calcular los n valores de  $\delta P_{j,0}$  por medio de n ecuaciones lineales, deducidas a partir de (28).

Por condición de mínimo según (26), se tiene:

$$(\partial S / \partial P_j)_0 = 0 = -2 \sum_{i=1}^N (\partial Z / \partial P_j)_{0,i} \Delta i \quad (29a)$$

$$\sum_{i=1}^N \Delta i \cdot (\partial Z / \partial P_j)_{0,i} = \sum_{i=1}^N (\partial Z / \partial P_j)_{0,i} \cdot \sum_{j=1}^N (\partial Z / \partial P_j)_{0,i} \delta P_{j,0} \quad (29b)$$

Aquí hemos puesto  $\Delta i = Z_{cal,1} - Z_{cal,0}$  (ec. (26)), lo que significa que adjudicamos los errores  $\Delta i$  a la falta de valores óptimos de los  $P_j$ , lo que constituye la hipótesis fundamental en el método de optimización de parámetros por cuadrados mínimos. Existe una ecuación (29) por cada parámetro  $P_j$ , es decir, se trata de un sistema de  $n$  ecuaciones lineales con los desconocidos  $\delta P_j$ , cuya resolución proporcionará los valores de los mismos.

Los valores mejorados de los parámetros  $P_j$  serán ahora:

$$P_{j,1} = P_{j,0} + \delta P_{j,0} \quad (30)$$

Estos valores de  $P_{j,1}$  se introducen en la ecuación (27) y se calculan los nuevos valores  $Z_{cal,1}$  con los cuales se repiten los pasos originalmente dados con  $Z_{cal,0}$ . El proceso se repite (iteración) hasta que un nuevo paso no introduzca cambios significativos en los valores numéricos de los parámetros.

La ecuación (29b) se puede expresar de acuerdo al álgebra matricial como<sup>25)</sup>

$$M \cdot \delta = v \quad (29c)$$

donde  $M$ , representa una matriz cuadrada simétrica

$$[M_{\alpha\beta}] = \sum_{i=1}^N (\partial Z / \partial P_{\alpha})_{i,0} (\partial Z / \partial P_{\beta})_{i,0} \quad (31)$$

$v$  es un vector cuyos componentes son:

$$v_j = \sum_{i=1}^N (\partial Z / \partial P_j)_{i,0} \Delta i \quad (32)$$

$\delta$ , es el vector de  $\delta P_j$  componentes. El vector  $\delta$  se obtiene a partir de la ecuación (29c) por inversión de la matriz

$$\delta = M^{-1} \cdot v \quad (33)$$

Una dificultad que puede presentarse en el cálculo y que está contemplada en el método es que los  $\delta P_j$ , tomen valores iniciales grandes debido a valores grandes de M. El trabajar con estos valores de deltas grandes, puede producir fuertes fluctuaciones o saltos en las sucesivas iteraciones, dando como resultado que la convergencia entre los parámetros experimentales y calculados sea muy lenta. Para poder eliminar este efecto, es necesario trabajar con valores más o menos pequeños de  $\delta P_j$ . Una forma de lograrlo es dividir a los  $\delta P_j$  o algunos de ellos por un número entero mayor que uno. Muchas veces es suficiente con hacerlo una vez.

El método nos permite además, comprobar el grado de optimización alcanzado. Supongamos para ello, que  $S^*$  representa el valor mínimo de S (ec. (26)). Por expansión en serie de Taylor alrededor del mínimo, nos queda la siguiente expresión en S:

$$S = S^* + \sum_{j=1}^n (\partial S / \partial P_j)^* \delta P_j + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^n \sum_{j=1}^n (\partial^2 S / \partial P_k \partial P_j) \delta P_j \delta P_k + \dots \quad (34)$$

Las condiciones que se imponen a la ecuación (34) son las siguientes:

$$\delta P_j = \delta P_k \begin{cases} = 0 & \text{si } j=k \neq \alpha \\ \neq 0 & \text{si } j \neq k \neq \alpha \end{cases}$$

es decir que cuando estamos calculando un parámetro los otros son mantenidos constantes.

Con estas condiciones y la ecuación (29a), la ecuación (34) se reduce a:

$$\delta P_\alpha = \left[ 2 \cdot (S - S^*) / (\partial^2 S / \partial P_j^2) \right]^{0,5} \quad (35)$$

$(S - S^*)$ , se puede expresar como una estimación de variancias residuales. En ese caso se obtendría

$$(S-S^*) \approx S^*/(N-n) \quad (36)$$

donde  $N$  es el número de promedios usados y  $n$ , el número de parámetros.

El significado geométrico de  $\overline{\delta P_\alpha}$  (ec. (35)), puede ser ilustrado de la siguiente manera:

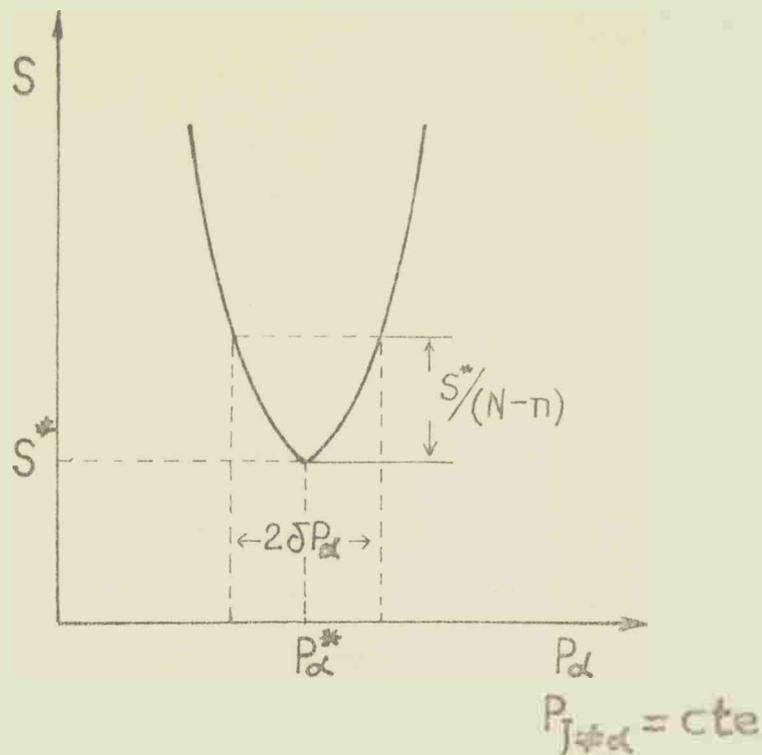


Fig. 8 Interpretación gráfica de la definición  $\overline{\delta P_\alpha}$ .

Por ecuación (26), tenemos:

$$\begin{aligned} \partial^2 S / \partial P_\alpha^2 &= (\partial / \partial P_\alpha) \sum_{i=1}^N 2(-\partial Z_{\text{cal}} / \partial P_\alpha)_i \Delta i \\ &= 2 \sum_{i=1}^N \left[ (\partial Z_{\text{cal}} / \partial P_\alpha)_i^2 - (\partial^2 Z_{\text{cal}} / \partial P_\alpha^2)_i \Delta i \right] \approx \\ &\approx 2 \sum_{i=1}^N (\partial Z_{\text{cal}} / \partial P_\alpha)_i^2 \end{aligned} \quad (37)$$

Con el objeto de tener una medida de la bondad de la optimización de los parámetros, se definió el "índice relativo de indiferencia" como <sup>25)</sup>

$$R_{\alpha} = \left| \frac{\overline{\delta P_{\alpha}}}{P_{\alpha}} \right| \quad (38)$$

Reemplazando (36) y (37) en la ecuación (35), y esta última en la expresión (38), se obtiene la expresión general:

$$R_{\alpha} = \left[ \frac{S^*}{P_{\alpha}^2(N-n) \sum_{i=1}^N (\partial z_{cal} / \partial P_{\alpha})_i^2} \right]^{0,5} \quad (39)$$

Si el valor de  $R_{\alpha} \ll 1$ , los valores óptimos de  $P_{\alpha}$  fueron bien determinados, lo contrario ocurre cuando  $R_{\alpha} \gg 1$ .

#### 4.4 Planteamiento del cálculo

##### 4.4.1 Funciones de calibración y dispersión. Criterio de selección

La función de calibración más comúnmente usada en CPG, es aquella que relaciona directamente el peso molecular con el volumen de elución. Es decir, tiene la forma:

$$\ln M = A - B.V \quad (40)$$

donde M = peso molecular

A, B = constantes positivas

V = volumen de elución

Esta expresión logarítmica lineal muchas veces no alcanza para describir la curva de calibración en el caso que el espectro de pesos moleculares a cubrir sea muy grande, por lo que su empleo puede traer serios errores. Para mejorar esta aproximación, lo que se hace es introducir un factor de curvatura a la ecuación lineal. Generalmente se usa una relación logarítmica parabólica

$$\ln M = A - B.V + C.V^2 \quad (41)$$

donde A, B y C son constantes.

Es necesario mencionar aquí el procedimiento común que se sigue

para la construcción de la curva de calibración experimental: se toma algún promedio de peso molecular conocido y se lo representa versus el volumen de elución del máximo del elugrama obtenido. Esta correlación peso molecular-volumen de elución del máximo, no es correcta (sobre todo en polímeros de distribución ancha) puesto que el volumen de elución del máximo del elugrama no tiene porqué coincidir con el volumen de elución correspondiente al promedio de peso molecular elegido<sup>67)</sup>. Dicho de otro modo, no hay una correspondencia directa entre el peso molecular y el volumen de elución del máximo, sino que la relación dependerá de otros factores como son el tipo de promedios utilizados en la calibración, la dispersión ( $g(v-y)$ ), y la distribución del polímero ( $W(y)$ ).

La elección del tipo de función de dispersión resulta más difícil. En el caso de poseer muestras de polímeros totalmente uniformes respecto del peso molecular, la curva experimental coincide con la función de dispersión de acuerdo a la ecuación (18) de la sección 4.2.1 (ecuación de Tung), en donde  $W(y)$  es reemplazado por una función delta. Desde el punto de vista experimental, la completa uniformidad de la distribución de peso molecular, sólo se puede obtener en la región de los oligómeros.

En el caso de polímeros de alto peso molecular, tal cosa no es posible, ya sea por razones de síntesis como por la carencia de métodos de medición suficientemente finos como para asegurar la existencia de la uniformidad requerida, según lo expresado antes.

En el caso que las condiciones operativas lo permitan, es posible usar la técnica de flujo invertido que nos proporciona la función de dispersión, eliminando la contribución de la distribución de peso molecular<sup>17)</sup>.

La función de dispersión más comúnmente usada en la bibliografía<sup>64), 65), 66), 68), etc.</sup>, es aquella de tipo simétrica o función de dispersión gaussiana.

$$g(v-y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sqrt{V_D}} \exp \left[ -\frac{(v-y)^2}{2 V_D^2} \right] \quad (42)$$

donde  $y$  = volumen de elución del polímero en el caso de no existir dispersión.

$v$  = volumen de elución

$\sqrt{V_D}$  = parámetro de dispersión

Una derivación aproximada de (42) para CPG se puede ver en H. Hess y R.F. Kratz<sup>69)</sup>.

En el caso de existir asimetría, se puede usar una función de dispersión del tipo

$$g(v-y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sqrt{V_D}} \left[ 1 + \tau(v-y)/\sqrt{V_D} \right] \exp \left[ -(v-y)^2/2 \sqrt{V_D}^2 \right] \quad (43)$$

El parámetro  $\tau$  es proporcional a la asimetría de la función de dispersión.

Las ecuaciones (40), (41), (42) y (43) son las expresiones más comúnmente utilizadas en el análisis cuantitativo en cromatografía de exclusión.

En vista de ello se aplicará el "método de los promedios aparentes de peso molecular", considerando alternativamente las distintas combinaciones de función de calibración y función de dispersión. Para ello conviene efectuar el siguiente ordenamiento según los casos:

#### 4.4.2 Caso I: Curva de calibración logarítmica lineal (40) y función de dispersión gaussiana (42)

Para este caso usando la expresión<sup>24)</sup> logarítmica de la ecuación (23) (pág. 41) se obtiene:

$$\begin{aligned} Z \equiv \ln \bar{M}_{p, \text{cal.}}^{1/p} &= -\ln L + \ln \bar{M}_{k, \text{apar.}}^{1/k} \\ &= -\frac{p \cdot B^2 \cdot \sqrt{V_D}^2}{2} + p^{-1} \cdot \ln \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot e^{p(A-Bv)} dv \end{aligned}$$

con  $p = k$

$$L = - p \cdot B^2 \cdot \sqrt{V_D}^2 / 2$$

Esta ecuación es similar a la obtenida por Hamielec y colaboradores<sup>29)</sup>.

Las derivadas parciales respecto de los parámetros de calibra-

ción y dispersión son respectivamente <sup>26)</sup>

$$D_1 = \partial \ln \bar{M}_{p, \text{cal}}^{1/p} / \partial A = 1$$

$$D_2 = \partial \ln \bar{M}_{p, \text{cal}}^{1/p} / \partial B = -J - p B \nabla_D^2$$

$$D_3 = \partial \ln \bar{M}_{p, \text{cal}}^{1/p} / \partial \nabla_D^2 = -p.B^2$$

donde  $J = \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) v e^{p(A-Bv)} dv / \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) e^{p(A-Bv)} dv$

Según las ecuaciones (29b) y las derivadas  $D_1, D_2, D_3$ , nos queda un sistema de ecuaciones que por medio de (29c) nos permite calcular  $\delta A, \delta B, \delta \nabla_D^2$  (ec.(33))

$$\sum_{i=1}^N D_{1,i}^2 \delta A + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{3,i} \delta \nabla_D^2 = \sum_{i=1}^N D_{1,i} \Delta_i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{2,i}^2 \delta B + \sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{3,i} \delta \nabla_D^2 = \sum_{i=1}^N D_{2,i} \Delta_i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{3,i}^2 \delta \nabla_D^2 = \sum_{i=1}^N D_{3,i} \Delta_i$$

Dándole valores iniciales a  $A, B, \nabla_D^2$  obtenemos las correspondientes derivadas. Del sistema de ecuaciones anteriores calculamos los  $\delta A, \delta B, \delta \nabla_D^2$  correspondientes. Estos valores numéricos reemplazados en la ecuación (30) nos dan los nuevos valores de los parámetros y por ende posibilitan una nueva iteración, hasta llegar a valores numéricos tales que prácticamente no varíen por nuevas iteraciones.

#### 4.4.3 Caso II: Curva de calibración logarítmica parabólica (41) y función de dispersión gaussiana (42).

La ecuación correspondiente a  $\bar{M}_{p, \text{cal}}$  es <sup>24)</sup>:

$$Z \equiv \ln \bar{M}_{p, cal}^{-1/p} = - \ln \left\{ (1 + 2 C p \sqrt{D}^2)^{0,5/p} \cdot \exp \left[ \frac{p \sqrt{D}^2 (B^2 - 4A \cdot C)}{2 (1 + 2 C \cdot p \cdot \sqrt{D}^2)} \right] \right\} +$$

$$+ \frac{1}{k} \ln \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) e^{k(A - Bv + Cv^2)} dv$$

donde  $k = p / (1 + 2Cp \sqrt{D}^2)$  y

$$L = (1 + 2Cp \sqrt{D}^2)^{0,5/p} \cdot \exp \frac{p \sqrt{D}^2 (B^2 - 4AC)}{2 (1 + 2Cp \sqrt{D}^2)}$$

Las derivadas parciales son:

$$D_1 = \partial \ln \bar{M}_{p, cal}^{-1/p} / \partial A = 1$$

$$D_2 = \partial \ln \bar{M}_{p, cal}^{-1/p} / \partial B = -k(J/p + B \sqrt{D}^2)$$

$$D_3 = \partial \ln \bar{M}_{p, cal}^{-1/p} / \partial C = (k \sqrt{D}^2 / p) \cdot [2BkJ + 2(-C + (2k \sqrt{D}^2)^{-1}) \cdot kI + kB^2 p \sqrt{D}^2 - 1]$$

$$D_4 = \partial \ln \bar{M}_{p, cal}^{-1/p} / \partial \sqrt{D}^2 = (k/2p) \cdot [4kBJC - 4kC^2 I - 2C - kB^2]$$

$$\text{donde } J = \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot v \cdot e^{k(A - Bv + Cv^2)} dv / \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot e^{k(A - Bv + Cv^2)} dv$$

$$I = \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot v^2 \cdot e^{k(A - Bv + Cv^2)} dv / \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot e^{k(A - Bv + Cv^2)} dv$$

De la misma forma que para el caso anterior, se obtiene el sistema de ecuaciones siguiente<sup>26)</sup>:

$$\sum_{i=1}^N D_{1,i}^2 \delta A + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{3,i} \delta C + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{4,i} \delta \sqrt{D}^2 = \sum_{i=1}^N D_{1,i} \Delta_i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{2,i}^2 \delta B + \sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{3,i} \delta C + \sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{4,i} \delta \sqrt{D}^2 = \sum_{i=1}^N D_{2,i} \Delta_i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{3,i}^2 \delta C + \sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{4,i} \delta \sqrt{D}^2 = \sum_{i=1}^N D_{3,i} \Delta_i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{4,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{4,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{4,i} D_{3,i} \delta C + \sum_{i=1}^N D_{4,i}^2 \delta \sigma_D^2 = \sum_{i=1}^N D_{4,i} \Delta_i$$

4.4.4 Caso III: Curva de calibración logarítmica lineal (40) y función de dispersión no gaussiana o asimétrica (43).

El cálculo con dichas funciones arroja el siguiente resultado<sup>24)</sup>:

$$Z \equiv \ln \bar{M}_{p,cal}^{-1/p} = p^{-1} \left[ -p^2 B^2 \sigma_D^2 / 2 - \ln(1+p\tau B \sigma_D) + \ln \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot e^{k(A-Bv)} dv \right]$$

donde  $p = k$

$$L = (1+p\tau B \sigma_D) \cdot \exp(p \cdot B^2 \cdot \sigma_D^2 / 2)$$

Las derivadas parciales son<sup>26)</sup>:

$$D_1 = \partial \ln \bar{M}_{p,cal}^{-1/p} / \partial A = 1$$

$$D_2 = \partial \ln \bar{M}_{p,cal}^{-1/p} / \partial B = -J - pB\sigma_D^2 - \tau\sigma_D / (1+p\tau B \sigma_D)$$

$$D_3 = \partial \ln \bar{M}_{p,cal}^{-1/p} / \partial \tau = -B \sigma_D / (1+p\tau B \sigma_D)$$

$$D_4 = \partial \ln \bar{M}_{p,cal}^{-1/p} / \partial \sigma_D^2 = -pB^2 \sigma_D^2 - B / (1+p\tau B \sigma_D)$$

Se plantea el sistema de ecuaciones de la misma forma que el caso II, con la diferencia que en lugar de derivar con respecto a C, lo hacemos respecto del parámetro de asimetría  $\tau$  en  $D_3$ .

4.4.5 Caso IV: Curva de calibración logarítmica parabólica (41) y función de dispersión asimétrica (43)

Para este caso la función L no existe como tal, dado que en sus términos aparece explícitamente la distribución de peso molecular  $W(y)$ . La expresión que se obtiene para ese caso es la siguiente<sup>24)</sup>:

$$Z \equiv \ln \bar{M}_{p,cal}^{-1/p} = p^{-1} \left\{ -\ln F1 + \ln \left[ \bar{M}_{k,apar} \cdot \exp(-F3) - F2 \cdot \pi(y) \right] \right\}$$

$$\text{donde } F1 = z^{0,5} (1+zBk\gamma\sqrt{V_D})$$

$$F2 = z^{0,5} \gamma (1-z)/\sqrt{V_D}$$

$$F3 = zk^2 \sqrt{V_D}^2 (B^2/2 - 2AC)$$

$$z = (1-2kC \sqrt{V_D}^2)^{-1}$$

$$k = p/(1+2Cp \sqrt{V_D}^2)$$

$$\Pi(y) = \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot y \cdot e^{p(A-By+Cy^2)} dy$$

Las derivadas parciales son:

$$D_1 = \partial \ln \bar{M}_{p, \text{cal}}^{1/p} / \partial A = 1$$

$$D_2 = \partial \ln \bar{M}_{p, \text{cal}}^{1/p} / \partial B = -\gamma \sqrt{V_D} / (1+zBk\gamma\sqrt{V_D}) + \left\{ \left[ \bar{M}_{k, \text{apar}} \cdot e^{-F3} (-J/z - k \sqrt{V_D}^2 B) + F2 \Pi^j(y) \Pi(y) \right] / \left[ \bar{M}_{k, \text{apar}} \cdot e^{-F3} - F2 \Pi(y) \right] \right\}$$

$$D_3 = \partial \ln \bar{M}_{p, \text{cal}}^{1/p} / \partial C = -k \sqrt{V_D}^2 / p + (1/\bar{M}_{k, \text{apar}} \cdot e^{-F3} - F2 \Pi(y)) \cdot \left\{ \bar{M}_{k, \text{apar}} \cdot e^{-F3} \cdot 2k^2 \sqrt{V_D}^2 / p \left[ (2k \sqrt{V_D}^2 I)^{-1} - C \cdot I + B(J + pB \sqrt{V_D}^2 / 2) \right] + \left[ 2\gamma \sqrt{V_D} (p/k)^{0,5} (1+kC \sqrt{V_D}^2) - F2 \Pi^i(y) \right] \cdot \Pi(y) \right\}$$

$$D_4 = \partial \ln \bar{M}_{p, \text{cal}}^{1/p} / \partial \gamma = - \left\{ z^{0,5} B \sqrt{V_D} / F1 + (1/kz^{0,5} \sqrt{V_D}) \cdot \left[ (1-z) \Pi(y) / \bar{M}_{k, \text{apar}} \cdot e^{-F3} - F2 \Pi(y) \right] \right\}$$

$$D_5 = \partial \ln \bar{M}_{p, \text{cal}}^{1/p} / \partial \sqrt{V_D}^2 = -kC/p + (1/\bar{M}_{k, \text{apar}} \cdot e^{-F3} - F2 \Pi(y)) \cdot \left\{ \bar{M}_{k, \text{apar}} \cdot 2k^2 / p \cdot e^{-F3} \cdot (B(C \cdot J - B/4) - C^2 \cdot I) + 2\gamma C / \sqrt{V_D} (p/k)^{0,5} \cdot \Pi(y) (1+Ck \sqrt{V_D}^2) \right\}$$

$$\text{donde } \pi^j(y) = \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot y^2 \cdot e^{p(A-By+Cy^2)} dy / \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot y \cdot e^{p(A-By+Cy^2)} dy$$

$$\pi^i(y) = \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot y^3 \cdot e^{p(A-By+Cy^2)} dy / \int_{-\infty}^{+\infty} W(y) \cdot y \cdot e^{p(A-By+Cy^2)} dy$$

$$J = \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot v \cdot e^{k(A-Bv+Cv^2)} dv / \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot e^{k(A-Bv+Cv^2)} dv$$

$$I = \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot v^2 \cdot e^{k(A-Bv+Cv^2)} dv / \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot e^{k(A-Bv+Cv^2)} dv$$

El sistema de ecuaciones para este caso es:

$$\sum_{i=1}^N D_{1,i}^2 \delta A + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{3,i} \delta C + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{4,i} \delta \tau + \sum_{i=1}^N D_{1,i} D_{5,i} \delta \sigma_D^2 =$$

$$= \sum_{i=1}^N D_{1,i} \Delta i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{2,i}^2 \delta B + \sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{3,i} \delta C + \sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{4,i} \delta \tau + \sum_{i=1}^N D_{2,i} D_{5,i} \delta \sigma_D^2 =$$

$$= \sum_{i=1}^N D_{2,i} \Delta i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{3,i}^2 \delta C + \sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{4,i} \delta \tau + \sum_{i=1}^N D_{3,i} D_{5,i} \delta \sigma_D^2 =$$

$$= \sum_{i=1}^N D_{3,i} \Delta i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{4,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{4,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{4,i} D_{3,i} \delta C + \sum_{i=1}^N D_{4,i}^2 \delta \tau + \sum_{i=1}^N D_{4,i} D_{5,i} \delta \sigma_D^2 =$$

$$= \sum_{i=1}^N D_{4,i} \Delta i$$

$$\sum_{i=1}^N D_{5,i} D_{1,i} \delta A + \sum_{i=1}^N D_{5,i} D_{2,i} \delta B + \sum_{i=1}^N D_{5,i} D_{3,i} \delta C + \sum_{i=1}^N D_{5,i} D_{4,i} \delta \tau + \sum_{i=1}^N D_{5,i}^2 \delta \tau_D^2 =$$

$$= \sum_{i=1}^N D_{5,i} \Delta i$$

Como la información sobre  $W(y)$  no existe, un uso directo de la ecuación de  $\bar{M}_{p,cal}$  no es posible.

Como este caso resulta representativo para una serie de similares  $L$ , las cuales son funciones explícitas de la distribución, se lo trataré con cierto detalle en el apéndice I.

### FE DE ERRATAS

- 1.- En la leyenda dentro de la Fig.4 (pág.28), debajo de " $\Delta$  10 mg/l no permeable", debe agregarse "5 columnas".
- 2.- En la secc. 4.4.2 (pág.49) en lugar de  $L = - p \cdot B^2 \cdot \nabla_D^2 / 2$ , se debió escribir  $L = \exp \left[ p \cdot B^2 \nabla_D^2 / 2 \right]$ .
- 3.- En la tabla 3 (pág.60), en el encabezamiento de la segunda columna debe decir: " $p = -1$ ".
- 4.- En la secc. II.2 (pág.97) al final de la página debe decir: "donde  $(R^2)^{1/2}$  es la raíz cuadrada del promedio cuadrático de R".

*J. B. Acuña*

## CAPITULO V

### 5) PARTE EXPERIMENTAL

#### 5.1 Aparato empleado

La parte experimental se llevó a cabo con un equipo cromatográfico modelo ALC/GPC 244 de la firma Waters.

El esquema del aparato utilizado está en la figura 9, cuyas partes componentes son: una bomba recíproca modelo M 6.000 formada por dos cuerpos. Un cuerpo es la parte hidráulica, constituida fundamentalmente por el motor de la bomba, que mueve dos pistones de manera alternada. Otras partes componentes de este cuerpo son la cámara del solvente, donde se juntan los fluidos bombeados por los dos pistones y el transductor o sensor de presión, compuesto por un tubo de Bourdon más un detector fotoeléctrico que transmite eléctricamente las variaciones de presión a una fuente de luz. Los cambios de intensidad de la fuente son registrados en la escala de presiones en el otro cuerpo de la bomba o parte electrónica.

La unidad electrónica regula la velocidad de los pistones, permitiendo seleccionar la velocidad de flujo manualmente desde 0,1 a 9,9 ml/min., en intervalos de 0,1 ml/min. Además de la escala de presiones, la unidad electrónica cuenta con un sistema de seguridad que detiene la bomba en casos que se exceda la presión límite establecida. Esta bomba también permite reciclar el eluato.

Los otros componentes del equipo son: el inyector y el detector. El inyector modelo U6K, está diseñado para permitir cargas de muestras a presiones elevadas (aprox. 420 bars) sin interrumpir el flujo del solvente o eluyente. Para ello viene equipado con una serie de tubos y llaves que permiten cargar la solución sin que se produzcan pérdidas de presión. Admite cargas de muestra que van de fracción de microlitros hasta 2 ml. Cuando se efectúa la inyección, una señal es enviada automáticamente al registrador como punto inicial de la corrida o tiempo cero.

El detector usado es el modelo 440 UV-visible de la firma Waters, constituido por una parte óptica formada por una lámpara de mercurio y las celdas portamuestras. La luz transmitida en la celda es transformada en señal eléctrica por un fototubo. Esta señal es amplificada en la parte electrónica del detector y enviada al registrador. Este modelo posee un amplio intervalo de sensibilidad, que va de 2,0 hasta 0,05 unidades de absorbancia.

La señal de salida del detector es conectada a un registrador Servogor 311 de BBC Metrawatt, compuesto de dos graficadores.

Las conexiones entre la bomba y el inyector son tubos de acero inoxidable de 0,51 mm de diámetro interno, y las conexiones entre el inyector, las columnas y el detector son tubos de acero inoxidable de 0,23 mm de diámetro interno. Con esto se tiene un volumen muerto despreciable en las conexiones, logrando con ello que el mismo corresponda totalmente al de las columnas.

Al igual que la muestra, el eluyente ingresa a la bomba convenientemente filtrado, mediante filtros colocados en el reservorio del solvente y en la entrada de la bomba.

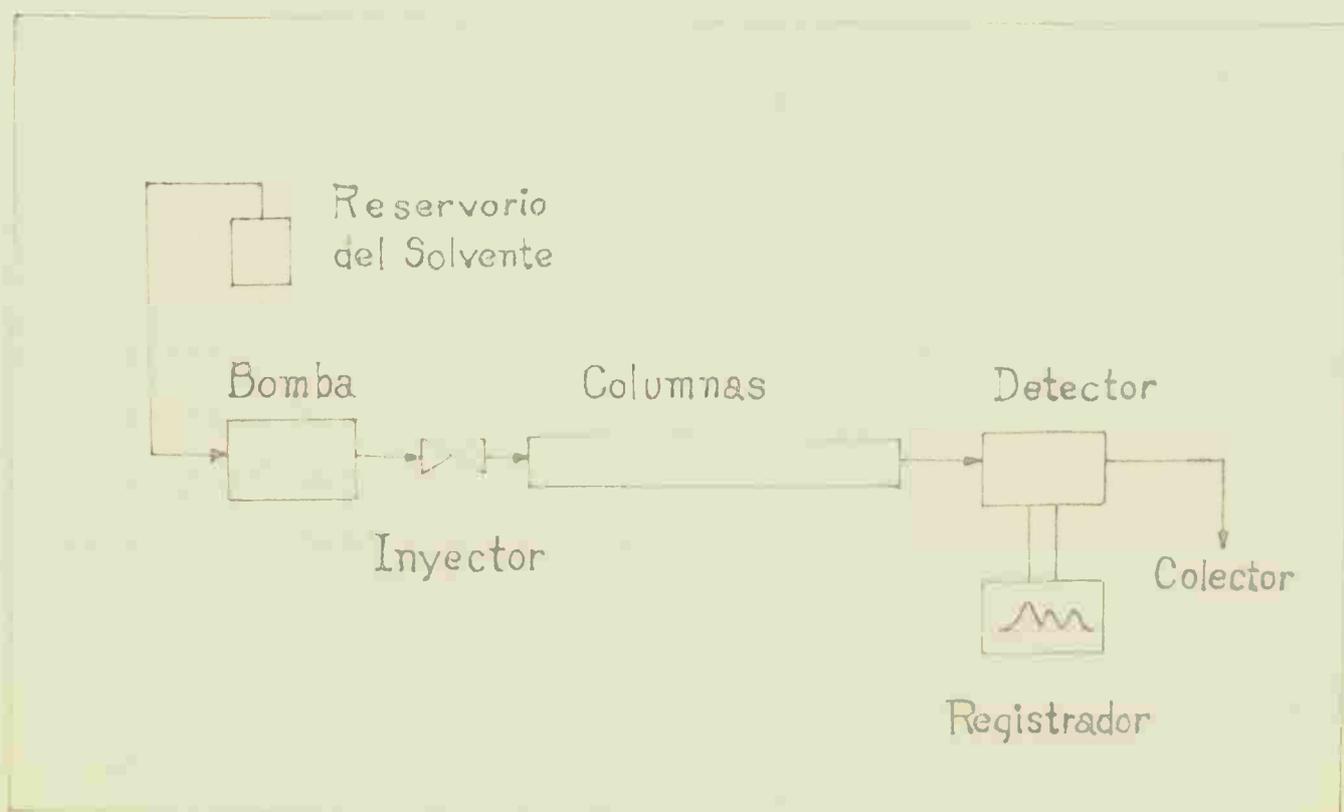


Fig. 9 Esquema del aparato utilizado

### 5.1.1 Columnas

Las columnas empleadas fueron las Hibar R. Lichrospher CH-8 E. Merck, Darmstadt, rellenas con gel silícico pasivado de diámetro de partícula promedio 10  $\mu$ m. Se utilizaron un total de cinco columnas de 0,4 cm de diámetro interno, ordenadas según el sentido del flujo de la siguiente manera:

<u>N</u>	<u>Columnas</u>	<u>Longitud</u>	<u>Límite de Exclusión</u> (*)
1	Lichrospher CH8 1000	25 cm	$1-2 \times 10^6$
2	Lichrospher CH8 500	50 cm	$4-5 \times 10^5$
3	Lichrospher CH8 100	50 cm	$5-8 \times 10^4$
4	Lichrospher CH8 100	25 cm	$5-8 \times 10^4$
5	Lichrospher CH8 100	25 cm	$5-8 \times 10^4$

(\*)

Los límites aproximados de exclusión son los dados por el fabricante para poliestireno lineal y cloroformo como eluyente.

El volumen total de líquido para una columna de 25 cm de longitud es de aproximadamente 2,20 ml, correspondiéndoles a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min el total de las columnas, un número de platos teóricos de aproximadamente 2.900, para una muestra de triclorobenceno que permea totalmente con un volumen de elución promedio de 16,05 ml (el volumen muerto entre las conexiones inyector-columna-detector es despreciable).

Para caracterizarlas se utilizaron muestras de poliestireno estándar, de nitrato de celulosa con un  $[\eta] = 240$  mg/ml a 20°C en acetona y de poli-beta-propiolactona en diferentes solventes (ver capítulo III).

### 5.1.2 Solvente

Las soluciones de poliestireno estándar utilizadas para calibrar las columnas fueron preparadas en cloroformo de grado PA ( $d = 1,471$  g/ml a 25°C. El mismo solvente fue utilizado como eluyente y

antes de ser usado como tal fue desgasificado, calentándolo con agitación continua durante aproximadamente 45 minutos a 10°C por debajo del punto de ebullición.

### 5.1.3 Filtración e inyección de muestra

Las soluciones son filtradas antes de la inyección con membrana de teflon de 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro por 13 mm de diámetro, evitando de esta manera la presencia de impurezas no detectables visualmente que puedan taponar las columnas.

Para cargar las muestras en el inyector fueron utilizadas jeringas especiales de doble émbolo, Precisión Sampling Corp. de 10 y 100  $\mu\text{l}$  de capacidad máxima.

### 5.1.4 Valores iniciales

Con el objeto de aplicar el método desarrollado en la secc. 4.3 a resultados experimentales, se tomaron los cromatogramas de nueve muestras de poliestireno estándar (suministrado por Pressure Chemical Co. Pittsburgh, PA USA), cuyos pesos moleculares promedios están dados en la tabla 3.

### 5.2 Curva de calibración experimental

En la construcción de la curva de calibración experimental se utilizó el juego de cinco columnas descrito en 5.1.1. Las inyecciones de poliestirenos estándares fueron repetidas como mínimo tres veces. Se inyectaron volúmenes menores que 10  $\mu\text{l}$  para concentraciones que oscilaron entre 3 y 5 mg/ml, evitando de esta manera deformaciones y corrimientos en el volumen de elución de los elugramas.

Los volúmenes de elución para las muestras así como otros datos, son presentados en la tabla 4. En la misma se puede ver que las diferencias en el volumen de elución para una misma muestra no excede de 0,03 ml.

TABLA 3

Diferentes promedios de peso molecular de poliestireno estándar usados.

Muestras de Poliestireno	$\bar{M}_p$		
	p=1 ( $\bar{M}_n$ )	p=0,76 <sup>a)</sup> ( $\bar{M}_\eta$ )	p=1 ( $\bar{M}_w$ )
I	2.220	2.400	-
II	3.750	3.600	-
III	9.170	9.180	-
IV	15.100	17.400	20.400
V	36.000	38.000	33.000
VI	111.000	111.000	111.000
VII	217.600	233.000	254.000
VIII	350.000	383.000	392.000
IX	-	948.500	900.000

a) Valor del coeficiente de Staudinger para poliestireno en solvente cloroformo a 25°C<sup>27)</sup>.

TABLA 4

Volúmenes de elución usados en la construcción de la curva de calibración.

Lote (Batch) No <sup>(a)</sup>	$\bar{M}_\eta$ <sup>(b)</sup>	Ve, máx (ml)	Ve, promedio
12 c	2.400	14,10	14,10
		14,10	
		14,10	
61.110	3.600	13,70	13,71
		13,71	
		13,71	
60.422	9.177	12,98	12,96
		12,95	
		12,96	

Cont. Tabla 4

			11,96	
41.220	17.400		11,98	11,97
			11,97	
			11,04	
7 b	38.000		11,04	11,05
			11,06	
			10,01	
4 b	111.000		10,04	10,04
			10,04	
			9,38	
50.154	233.000		9,35	9,36
			9,36	
			8,95	
3 b	383.000		8,94	8,95
			8,95	
			8,20	
61.208	948.500		8,20	8,21
			8,22	

(a) : Corresponde a la denominación que le da la Pressure Chemical Co.

(b) : Peso molecular viscosimétrico.

La temperatura de trabajo fue de 25°C.

Para construir la curva de calibración, los volúmenes de elución pico o del máximo fueron controlados por un patrón interno. El uso de estos patrones internos se hace con la finalidad de evitar errores en el volumen de elución por fluctuaciones de la velocidad de flujo durante la operación<sup>35), 38), 39)</sup>. Se debe también evitar tener una línea base defectuosa o variaciones de la misma, porque provoca errores en la determinación de los pesos moleculares y su distribución<sup>67)</sup>. Otros factores que pueden intervenir en los errores de las

determinaciones, pero de menor importancia, son las variaciones en la velocidad del papel, respuesta del detector, temperatura, etc.

Con el propósito de demostrar la importancia de los errores en el volumen de elución y la línea de base, se harán cambios hipotéticos en el volumen de elución y la línea de base de los elugramas experimentales.

Como primera aproximación, supongamos que la curva de calibración es lineal, ec. (43). La pendiente queda expresada como:

$$\frac{d \ln M}{dV_e} = - B$$

En forma aproximada la podemos expresar como:

$$\frac{\Delta M}{M} = - B \cdot \Delta V_e$$

Si asignamos a B un valor igual a  $-1 \text{ (ml}^{-1}\text{)}$ , valor que se aproxima bastante a los encontrados experimentalmente para las muestras de poliestireno analizadas, un error absoluto en  $V_e$  como por ejemplo 0,05 ml involucra un error relativo en el peso molecular del 5 %. En nuestras experiencias el error máximo en  $\Delta V_e$  fue del 0,3 %. Para corregir corrimientos en  $V_e$  es necesario inyectar junto con la muestra un patrón o referencia (llamado patrón interno), cuyo volumen de elución se conoce para ese juego de columnas. Los volúmenes de elución obtenidos en la corrida se ajustan a ese volumen conocido tomado como valor de referencia. La ecuación empleada para ajustar el volumen de elución del máximo es la siguiente:

$$V_{e \text{ corr}} = V_a \frac{V_m}{V_s} \text{ (ml)}$$

donde  $V_{e \text{ corr}}$  : es el volumen de elución corregido

$V_a$  : volumen de elución del patrón interno, considerado como valor de referencia

$V_m$  y  $V_s$ : volúmenes de elución de la muestra y patrón interno respectivamente para ese elugrama.

El patrón interno usado en todos los ensayos fue 1,2,4 triclorobenceno, en una proporción respecto a la muestra inyectada de aproximadamente 10 veces menor (equivalente a 0,1  $\mu$ l aprox.).

Los errores cometidos por corrimiento hipotético de la línea de base están representados en la tabla 5. En la misma se representan las variaciones del peso molecular aparente en peso y en número, para la muestra de poliestireno estándar de peso molecular nominal 17.500, para los corrimientos horizontales ( $\Delta h$ ) entre 1 y 9 mm por arriba de la línea de base del elugrama experimental. En todos los casos los corrimientos fueron tomados paralelos a la línea de base experimental, y los puntos del elugrama cuyas alturas están por debajo de los  $\Delta h$  considerados, son tomados como cero. En la tabla 5 también están representados los errores relativos porcentuales para cada promedio.

TABLA 5

$\Delta h$ (mm)	$\bar{M}_w$	% Error	$\bar{M}_n$	% Error
0	18.435	-	16.756	-
-1	18.500	0,35	16.957	1,19
-3	18.601	0,90	17.218	2,75
-5	18.687	1,37	17.416	3,93
-7	18.835	2,16	17.707	5,68
-9	18.894	2,48	17.833	6,43

donde  $\Delta h$  = línea de base experimental (cero) menos la línea de base considerada (en mm).

La diferencia en el error porcentual entre los dos promedios de pesos moleculares dados, se debe a la forma no-gaussiana que presenta el elugrama experimental considerado. El mismo presenta una "cola" en la región de los pesos moleculares pequeños o volúmenes de elución altos. Por lo tanto, cuando se trazan las líneas de base hipotéticas a diferentes  $\Delta h$ , se corta una porción mayor de la zona correspondiente a los pesos moleculares pequeños. El  $\bar{M}_n$  es más sensible a estos que el  $\bar{M}_w$ , por lo que el error que se comete al variar la línea de base es mayor en  $\bar{M}_n$  que en  $\bar{M}_w$ .

## CAPITULO VI

### 6) METODO ITERATIVO DE GAUSS. CONVERGENCIA. RESULTADOS OBTENIDOS. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Con el objeto de aplicar el método descrito en el capítulo IV (sec. 4.3), a los distintos casos de la sec. 4.4, se usaron los cromatogramas de los nueve polímeros indicados en el capítulo anterior (tabla 3), tomándose alrededor de 80 puntos de cada uno de ellos con el fin de calcular las distintas integrales requeridas en cada caso particular. Los cálculos para los casos I, II y III fueron realizados con una computadora de bolsillo Texas 59 programable, mientras que para los cálculos del caso IV, se utilizó una computadora Hewlett Packard 1000, empleando el lenguaje Basic.

Dado que el espectro de pesos moleculares cubre casi tres potencias de diez, los resultados experimentales se han dividido en cinco regiones, aplicándose a cada una de ellas los distintos casos de combinaciones de funciones de calibración y dispersión vistos en la sección anterior. Con el fin de poder identificar mejor estos intervalos de peso molecular, se han representado las muestras poliméricas con números romanos (ver tabla 3).

Esta forma de proceder, es decir trabajar con secciones o intervalos limitados de peso molecular, tiene por objeto evitar, que un extenso intervalo en peso molecular pueda modificar en forma apreciable las condiciones bajo las cuales poseen validez algunas de las funciones de calibración y/o dispersión usadas, y de esta manera interferir en el análisis de los resultados obtenidos con el método descrito anteriormente. Con este modo de encarar los cálculos nos aseguramos dos cosas fundamentales: a) que la función de calibración valga en todo ese intervalo y b) que disminuya la influencia que tiene el volumen de elución sobre el parámetro de dispersión ( $\sqrt{D}$ ), como veremos más adelante.

Para que pueda aplicarse el método de Gauss, los valores iniciales de los parámetros de calibración y dispersión deberán ser próximos

a los valores óptimos. Un método para obtener esos valores es el de iteración propuesto por Vrijbergen y colaboradores<sup>28)</sup>, que permite obtener los parámetros de calibración solamente. Para los parámetros de dispersión, se parte simultáneamente con una serie de valores (ver tabla 8).

Una descripción detallada de los pasos seguidos en el desarrollo del método de optimización es el siguiente:

### 6.1 Proceso iterativo de obtención de la curva de calibración de partida

El procedimiento consiste en:

- 1) a) Se comienza por seleccionar una serie de elugramas que cubran un cierto intervalo de volúmenes de elución ( $V_e$ ).
- b) Se obtiene A y B de la curva de calibración, usando el  $V_e$  del máximo de cada elugrama y los promedios conocidos de peso molecular de cada muestra. Se usarán en los pasos sucesivos solamente los elugramas cuyos rangos de  $V_e$  queden totalmente cubiertos por la curva de calibración.
- c) Con esa curva de calibración, se calculan los promedios de peso molecular aparente (ec. (19)) de los elugramas que han sido usados en b) y el volumen de elución que corresponde para cada uno de los elugramas elegidos en b).
- d) Con los  $V_e$  calculados en c), y los promedios experimentales (tabla 3) usados ya en b), se vuelve a calcular una nueva curva de calibración.
- e) Se repite el paso c) hasta que los sucesivos  $V_e$  calculados no varíen significativamente.

La tabla 6 muestra los valores de A y B encontrados para el intervalo de pesos moleculares cuyos pesos nominales van de 35.000 a 950.000.

- 2) El paso siguiente consiste en calcular las integrales J e I, que aparecen en las derivadas de los distintos casos (I, II y III). A modo de ejemplo la tabla 7 resume los cálculos efectuados en las

TABELA 6

Obtención de los parámetros de calibración, según el método de Vrijbergen y col. 281

Felímero	Procedidos de pesos molec.	$V_e, \text{máx.}$	$A_0$	$B_0$	$V_{e1}$	$A_1$	$B_1$	$V_{e2}$	$\bar{M}_w, \text{apar.}$
35.000	$\bar{M} = 29.000$ $\bar{M}_n = 36.000$ $\bar{M}_w = 33.000$	11,05	23,1103	1,1454	22,3047	1,0391			
111.000	$\bar{M} = 111.000$ $\bar{M}_n = 111.000$ $\bar{M}_w = 111.000$	10,02			10,15			10,15	113.839
33.000	$\bar{M} = 233.000$ $\bar{M}_n = 217.600$ $\bar{M}_w = 254.000$	9,36			10,25			10,25	102.788
470.000	$\bar{M} = 393.000$ $\bar{M}_n = 350.000$ $\bar{M}_w = 332.000$	8,95			10,14			10,15	115.084
950.000	$\bar{M} = 948.500$ $\bar{M}_n = 350.000$ $\bar{M}_w = 100.000$	8,21			9,46			9,46	243.687
					9,56			9,56	220.277
					9,45			9,45	216.484
					9,05			9,06	181.099
					9,14			9,14	347.366
					9,05			9,05	154.844

El los  $V_e$  iniciales y finales de esos tres elogramas caen dentro del intervalo de  $V_e$  para la curva que va desde 35.000 a 150.000 en pesos moleculares.

etapas 1 y 2 para ese rango de pesos moleculares. Los datos son A, B, p y los elugramas experimentales de cada promedio de peso molecular considerado ( $\bar{M}_{exp}^{-1/p}$ ).

6.2. Aplicación del método iterativo de Gauss a los diferentes casos

Caso I: Con los valores numéricos de la tabla 7 y dando valores iniciales a  $\nabla_D^2$ , estamos en condiciones de aplicar el "método iterativo de Gauss" para el caso I.

Los resultados de la primera iteración para diferentes valores de  $\nabla_D^2$ , están representados en la tabla 8.

El  $S_0$ , (ver tabla 8), corresponde al valor de S (ec. (26)) para los diferentes  $\nabla_D^2$ , inicial, con los correspondientes valores iniciales de A y B (tabla 7). En general los subíndices 1,2,3, etc. indican los números de iteraciones efectuadas.

TABLA 7

Ejemplo del cálculo de los  $\bar{M}_{k,apar.}$  y J, para los distintos casos.

Polímero	p	$\bar{M}_{k,apar.}^{-1/k}$	$\bar{M}_{exp}^{-1/p}$	J
A = 22,8047				
B = 1,0991				
110.000	0,76	113.839	111.000	10,1237
"	-1	102.788	111.000	10,3136
"	1	115.084	111.000	10,1059
233.000	0,76	243.887	233.000	9,4313
"	-1	220.277	217.600	9,6229
"	1	246.484	254.000	9,4139
470.000	0,76	381.099	383.000	9,0277
"	-1	347.366	350.000	9,2016
"	1	384.894	392.000	9,0115

TABLA 8

Resultados de la primera iteración con  $\nabla_D^2$  dados ( $\nabla_{D, inicial}^2$ ), para el caso I.

$\nabla_{D, inicial}^2$	0,00	0,10	0,20
$A_1$	22,8263	22,8263	22,8263
$B_1$	1,1007	1,1007	1,1007
$\nabla_{D,1}^2$	0,0268	0,0265	0,0262
$S_0$	0,011	0,026	0,097

Donde:

$$A_1 = A + \delta A$$

$$B_1 = B + \delta B$$

$$\nabla_{D,1}^2 = \nabla_{D, inicial}^2 + \delta \nabla_D^2$$

TABLA 9

Resultados de la segunda iteración para el caso I.

$\nabla_{D,1}^2$	0,0268	0,0265	0,0262
$A_2$	22,8263	22,8263	22,8263
$B_2$	1,1007	1,1007	1,1007
$\nabla_{D,2}^2$	0,0267	0,0267	0,0267
$S_1$	0,0095	0,0095	0,0095

Donde:

$$A_2 = A_1 + \delta A$$

$$B_2 = B_1 + \delta B$$

$$\nabla_{D,2}^2 = \nabla_{D,1}^2 + \delta \nabla_D^2$$

Con los valores de la tabla 8 para los parámetros de calibración se vuelven a calcular los J y pesos moleculares aparentes. Con estos datos se hace una nueva iteración, usando los  $\bar{V}_{D,1}^2$  calculados anteriormente. Los resultados de la segunda iteración están representados en la tabla 9. Aquí nuevamente el subíndice 1 de S está indicando el valor de la sumatoria con los valores de  $A_1$ ,  $B_1$  y  $\bar{V}_{D,1}^2$ .

Se vuelven a repetir los pasos anteriores hasta que los valores de los parámetros no cambien significativamente en dos iteraciones sucesivas.

Caso II: En el caso II, se deben calcular además de los pesos moleculares aparentes y los J, las integrales I. De la misma forma que en el caso anterior se necesitarán como datos el elugrama experimental y los parámetros de la curva de calibración (curva parabólica en este caso), para efectuar el cálculo.

Se toma como valor inicial C igual a cero, y los valores de A y B para el ejemplo que se da en la tabla 10 corresponden a los valores óptimos del caso I ( $A_2$  y  $B_2$ , ver tabla 9). Los valores de J e I como los de  $\bar{M}_{k,apar.}$  para el intervalo de pesos moleculares dado son los siguientes:

TABLA 10

Cálculo de los  $\bar{M}_{k,apar.}$  e integrales J, I para el caso II

Polímero	p	$\bar{M}_{k,apar.}^{1/p}$	$\bar{M}_{p,exp}^{1/p}$	J	I
				A = 22,8263	
				B = 1,1007	
				C = 0	
111.000	0,76	114.450	111.000	10,1236	102,5578
"	-1	103.308	111.000	10,3138	106,5074
"	1	115.705	111.000	10,1058	102,1915
233.000	0,76	245.467	233.000	9,4312	89,0171
"	-1	221.636	217.600	9,6231	92,7467
"	1	248.089	254.000	9,4138	88,6836
470.000	0,76	383.816	383.000	9,0276	81,5609
"	-1	349.745	350.000	9,2018	84,8007
"	1	387.598	392.000	9,0114	81,2649

Se puede observar, comparando las tablas 7 y 10, que los exponentes de los pesos moleculares aparentes son distintos en esta última, esto se debe a que en el caso I el exponente  $k$  (ver ec. (19)) resulta ser idéntico al exponente  $p$  (ver ec. (20)); pero en el caso II,  $k$  es una función del exponente  $p$  (ver sec. 4.4.3).

Con un valor inicial dado de  $\sqrt{D}^2$ , (en nuestro caso, corresponde al valor óptimo hallado en el caso I) se procede igual que antes a optimizar los parámetros de calibración y dispersión. El procedimiento a seguir es análogo al caso anterior y los resultados de las iteraciones sucesivas están dados en la tabla 11.

TABLA 11

Resultados de las iteraciones para el caso II

Número de iteraciones	A	B	C	$\sqrt{D}^2$	S
1	34,2799	3,4787	0,1230	0,0202	0,00950
2	34,0458	3,4320	0,1207	0,0157	0,00685
3	34,3191	3,4888	0,1237	0,0158	0,00675
4	34,2380	3,4720	0,1228	0,0156	0,00688

En la tabla 11 puede verse la rápida convergencia del método, bastando solamente dos o tres iteraciones para hallar el valor óptimo. Esta rápida convergencia es encontrada para todos los casos tratados.

Resumen de la aplicación de los casos I y II: Las tablas 12 y 13 nos muestran los resultados para los distintos intervalos de pesos moleculares para el caso I y II respectivamente.

TABLA 12

Tabla de valores de los parámetros de calibración y dispersión para el caso I:

Muestras de Polímeros	A ( $R_A$ )	B(ml <sup>-1</sup> ) ( $R_B$ )	$\sqrt{V_D^2}$ (ml <sup>2</sup> ) ( $R_{V_D^2}$ )	S
I, II, III, IV	20,6747 (0,0024)	0,8964 (0,0042)	0,16 (0,93)	0,10
III, IV, V	19,1123 (0,0021)	0,7656 (0,0043)	0,082 (1,8)	0,064
IV, V, VI, VII	21,6960 (0,0013)	0,9866 (0,0027)	0,053 (1,20)	0,078
VI, VII, VIII	22,8263 (0,00058)	1,1007 (0,0012)	0,027 (1,10)	0,0095
VII, VIII, IX	23,7641 (0,00051)	1,2020 (0,0011)	0,0073 (0,36)	0,0060

Entre paréntesis figuran los valores de  $R_\alpha$  (ec.(39)).

TABLA 13

Tabla de valores de los parámetros de calibración y dispersión para el caso II:

Muestras de Polímeros	A ( $R_A$ )	B(ml <sup>-1</sup> ) ( $R_B$ )	C(ml <sup>-2</sup> ) ( $R_C$ )	$\sqrt{V_D^2}$ (ml <sup>2</sup> ) ( $R_{V_D^2}$ )	S
I, II, III, IV	-1,1837 (0,038)	-2,4074 (0,0014)	-0,1243 (0,0020)	0,23 (0,41)	0,063
III, IV, V	30,9475 (0,0012)	2,7118 (0,0011)	0,0797 (0,0031)	0,079 (1,40)	0,052

Cont. Tabla 13

IV,V,VI,VII	28,2953 (0,00087)	2,2156 (0,0010)	0,0567 (0,0036)	0,038 (1,30)	0,058
VI,VII,VIII	34,2799 (0,00033)	3,4787 (0,00034)	0,1230 (0,00098)	0,020 (0,86)	0,0068
VII,VIII,IX	28,1158 (0,00042)	2,1877 (0,00059)	0,0556 (0,0025)	0,0011 (16)	0,0055

Entre paréntesis figuran los valores de  $R\alpha$ . (ec.(39))

Con el propósito de comparar el comportamiento de ambos casos frente a la curva de calibración experimental, se representaron en la Fig. 10 las curvas teóricas de los casos I y II y los puntos experimentales. Los valores numéricos utilizados para construir las curvas, son los valores promedios de los parámetros calculados para los cinco intervalos de pesos moleculares elegidos (ver tablas 12 y 13). En las mismas puede verse la buena correlación entre los puntos experimentales y las curvas teóricas para todo el intervalo de pesos considerado.

Caso III: El cálculo del determinante  $M$  de la ecuación (33) para este caso, nos da un valor aproximadamente cero. Este resultado indica que el parámetro de asimetría ( $\tau$ ), no es totalmente independiente de los parámetros de las funciones de calibración y dispersión. Esta situación se presenta cuando  $\tau$  toma valores próximos a cero.

Así la expresión de  $\bar{M}_{p,cal}$  para el caso III:

$$\ln \bar{M}_{p,cal}^{1/p} = p^{-1} \left[ -p^2 B^2 \sigma_D^2 / 2 - \ln(1+p \tau B \sigma_D) + \ln \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot e^{k(A-Bv)} dv \right]$$

se transforma para  $\tau \rightarrow 0$  en:

$$\ln \bar{M}_{p,cal}^{1/p} \longrightarrow -p B^2 \sigma_D^2 / 2 + p^{-1} \ln \int_{-\infty}^{+\infty} f(v) \cdot e^{k(A-Bv)} dv$$

El  $\bar{M}_{p,cal}$  en este caso es indistinguible del obtenido para el caso I.

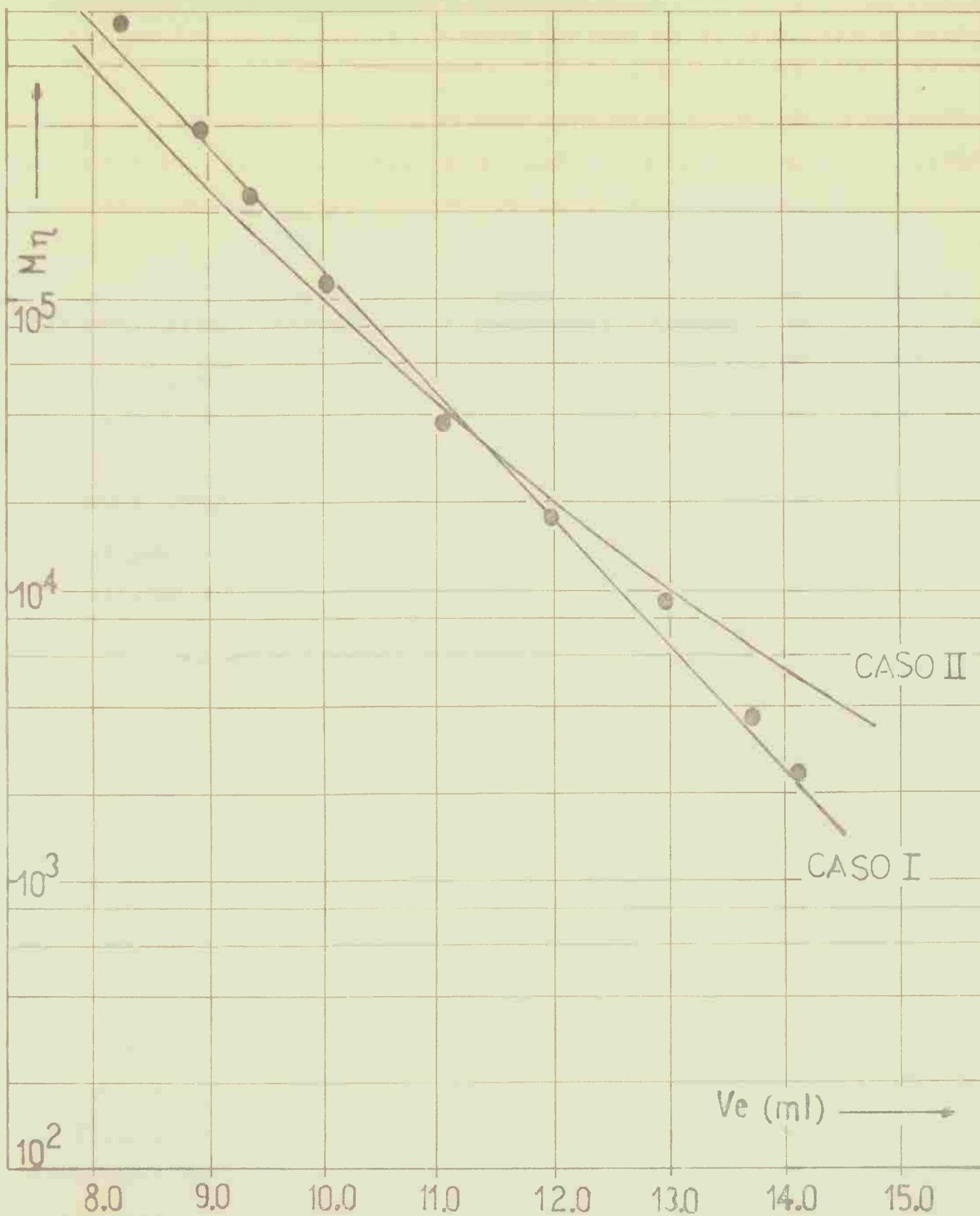


Fig. 10 Curva de calibración  $\ln \bar{M}\eta$  vs.  $V_e$

● Datos experimentales

Caso I:  $\bar{A} = 21,6147$  ,  $\bar{B} = 0,9903$

Caso II:  $\bar{A} = 24,091$  ,  $\bar{B} = 1,6373$  ,  $\bar{C} = 0,0381$

Por lo tanto, se puede concluir que si existe asimetría en los elugramas, ella es tan pequeña que no puede ser detectada por el método. Esta es otra de las ventajas del método iterativo de Gauss, puesto que nos permite ir analizando qué influencia tienen los parámetros considerados en el cálculo de los pesos moleculares.

### 6.3 Análisis de los resultados obtenidos

El análisis de los valores numéricos de las tablas 12 y 13 nos muestra que en principio, tanto en el caso I como en el caso II, los parámetros de la función calibración son bien optimizados, mientras que para el parámetro de dispersión, la optimización no es tan buena, aunque por otro lado los valores calculados en uno y otro caso guardan una cierta concordancia para  $\sigma_D^2$ .

Este comportamiento de  $\sigma_D^2$  se debe presumiblemente a la aproximación que se hizo, al suponerlo independiente del volumen de elución. La figura 11, nos indica que hay una dependencia del parámetro de dispersión con el volumen de elución, confirmando lo hallado por otros autores<sup>30-34</sup>).

La curva de la figura 11 nos daría una dependencia del parámetro de dispersión con el volumen de elución de la forma:

$$\sigma_D^2 \approx H^2 + R.V_e \approx H'^2 + R'.\ln M \quad (44)$$

Por otro lado, se hace necesario verificar qué errores se cometen en la determinación del peso molecular al usar un caso u otro. En la figura 12 se muestran las curvas teóricas correspondientes a la representación  $\ln \bar{M}$  vs.  $V_e$ , para los dos casos (I y II). La misma se construyó con los valores optimizados de los parámetros en un caso y otro (ver tablas 12 y 13), teniendo en cuenta el intervalo de pesos moleculares elegidos para su optimización, el cual aparece recuadrado en la figura.

Las curvas correspondientes a los otros intervalos de pesos considerados, son dados en el apéndice III.

Tanto la figura 12 como las otras figuras dadas en el apéndice III muestran una buena concordancia entre los pesos moleculares halla-



Fig. 11 Parámetro de dispersión vs. volumen de elución promedio (obtenidos de la curva de calibración respectiva) para los pesos moleculares de la tabla 3.

- O Curva de calibración logarítmica lineal (T.12)
- x Curva de calibración logarítmica parabólica (T.13)

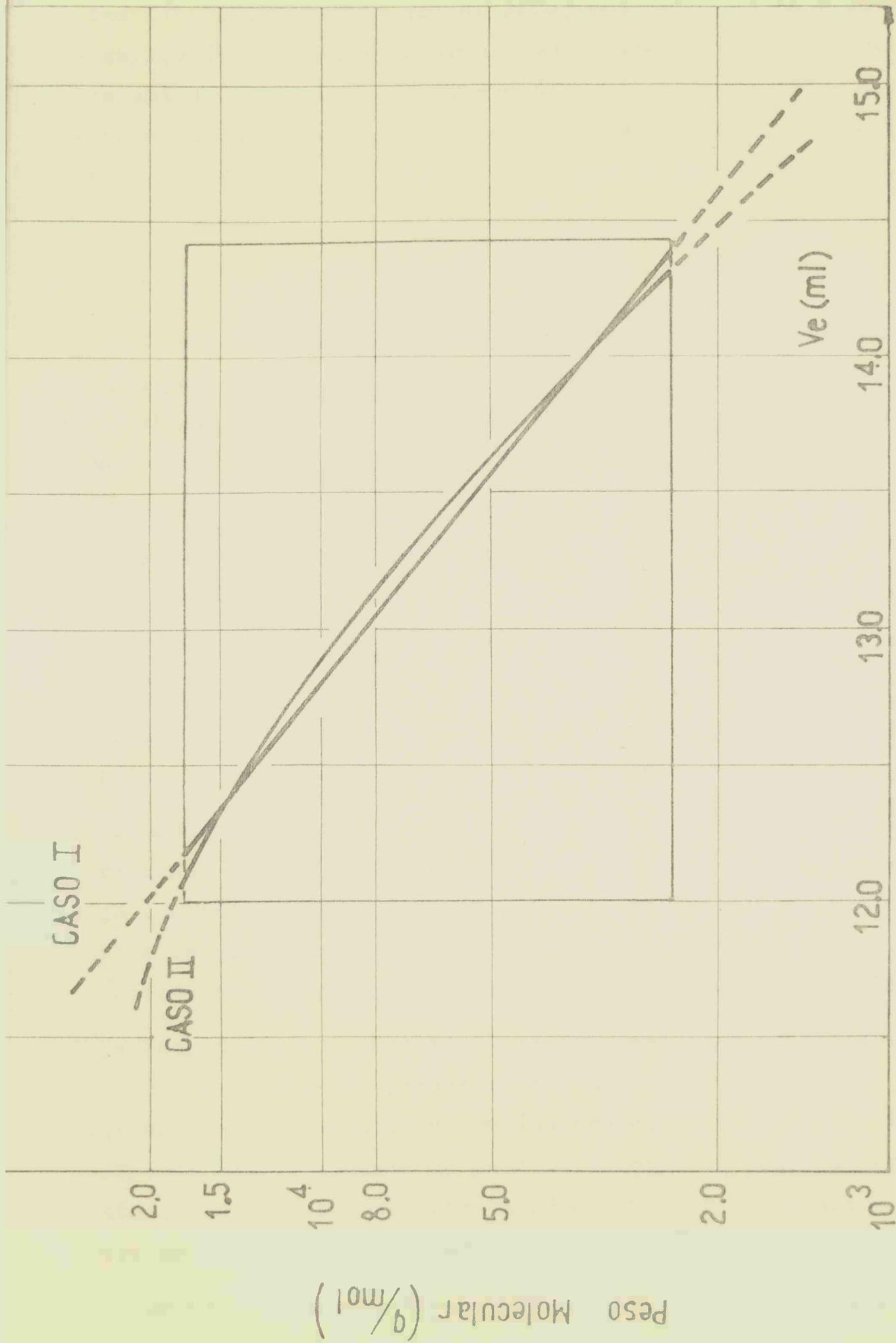


Fig. 12 Comparación entre dos curvas de calibración optimizadas según los casos I y II, para las muestras de polímeros, I, II, III, IV (ver T.3). En recuadro la zona considerada en la optimización.

dos para un caso y otro para un mismo  $V_e$ . El error en todos los casos está por debajo del 10 %, error éste que es comparable a los que se cometen en la determinación de peso molecular por métodos absolutos. Es también lógico pensar que si referimos estos casos a un espectro más amplio de pesos moleculares, las diferencias que se encontrarían entre estas funciones de calibración serían más grandes, pero caeríamos en el inconveniente de no poder estimar la dispersión  $\nabla_D^2$ , por su dependencia con el peso molecular o volumen de elución.

#### 6.4 Conclusiones:

El análisis de los resultados experimentales en cromatografía líquida por exclusión llevados a cabo en base al método matemático desarrollado, permite sacar una serie de conclusiones respecto del estado actual del mismo y sus aplicaciones futuras, que se pueden resumir en los siguientes puntos:

- a) Es posible llevar a cabo simultáneamente la calibración y la corrección por dispersión en CPG, con un requerimiento experimental no mayor que el que se usa actualmente para calibrar solamente.
- b) El método de iteración de Gauss, para aplicar la técnica de cuadrados mínimos a funciones no lineales, produce excelentes resultados al analizar las curvas de elución cromatográfica.
- c) El método de los promedios aparentes de peso molecular aquí desarrollado (secc. 4.2) permite analizar los datos experimentales bajo distintos puntos de vista, tanto referente a la calibración como a la dispersión, pudiéndose así seleccionar el comportamiento matemático que mejor explique los resultados experimentales.
- d) Se encontró que la función L existe como función analítica en tres de los cuatro casos presentados. En el caso que L no es analítica (caso IV), la relación entre los promedios aparentes y calculados, depende explícitamente de la distribución de pesos moleculares<sup>24)</sup>. Aún así es posible aplicar el método bajo ciertas aproximaciones que se verán en el Apéndice I (caso IV).

De esta forma, el uso simultáneo de los dos métodos, el de los

momentos aparentes y el método iterativo de Gauss, nos da una generalidad de aplicación desconocida hasta ahora en los métodos descritos en la literatura pertinente.

- e) El método iterativo de Gauss, puede aplicarse a la distribución aparente de peso molecular o sea a la curva de elución experimental, si se conoce la distribución de pesos moleculares de muestras poliméricas. En ese caso,  $Z$  de la ecuación (27), secc. 4.3 es esta última y los parámetros  $P_j$  siguen siendo los correspondientes a las funciones de calibración y dispersión. Las sumatorias requeridas para la evaluación de las ecuaciones (29c), (33) y (39) de la sección 4.3, se extienden a todos los puntos experimentales tomados de la curva de elución. Esta forma de proceder posee la ventaja de procesar mayor información experimental que en el caso de los pesos moleculares aparentes, pero por otro lado la necesidad de conocer la distribución de peso molecular del polímero con la necesaria exactitud, hace que este procedimiento no sea tan aplicable.

APENDICE I

I) TRATAMIENTO DEL CASO IV

I.1 Consideraciones previas y métodos de cálculo

Es interesante detenerse a analizar el caso IV, puesto que éste representa un caso particular de un problema general que es el de necesitar conocer en forma explícita la función de distribución de pesos moleculares.

Hasta ahora en los tres casos vistos anteriormente se conseguía prescindir de la distribución empleando el método de los promedios aparentes de peso molecular, cuyo resultado nos daba una función analítica que contenía los parámetros de calibración y dispersión que relacionaba los pesos moleculares aparentes (calculados del elugrama experimental) con los pesos moleculares conocidos a priori, medidos por métodos absolutos (ver ec. (23)). Sin embargo, en el caso de tener una función de calibración logarítmica parabólica y una dispersión asimétrica, es imprescindible considerar la distribución del polímero puesto que la misma aparece incluida en la función analítica L.

Con el fin de poder visualizar más claramente la problemática de este caso, se representará a la función L en la ecuación (23) como la contribución de dos sumandos según se deduce del "método de los promedios aparentes de peso molecular" para el caso IV<sup>24)</sup>.

$$\frac{\bar{M}_{k, apar}^{1/k}}{\bar{M}_{p, cal}^{1/p}} = L = L1 + L2 \quad (45)$$

donde:  $L1 = (1+k.z.B.T.V_D)^{1/k} \cdot H1 \cdot \bar{M}_{p, cal}^{z-1}$

y  $L2 = H1 \cdot (T(1-z)/V_D)^{1/k} \cdot H2$

con  $H1 = z^{0,5/k} \cdot \exp p \sqrt{V_D}^2 (B^2/2 - 2.A.C)$

$$y \quad H2 = \frac{\left\{ \int W(y) \cdot \bar{M}^p(y) \cdot y \cdot dy \right\}^{1/p}}{\bar{M}_{p, cal}}$$

siendo  $k.z = p$

$$y \quad z = (1 - 2.k.C. \sigma_D^2)^{-1}$$

El sumando L1, contiene solamente los parámetros de calibración y dispersión, de manera similar a los casos ya vistos, mientras que L2 contiene a la función H2, en cuya integral aparece la distribución de peso molecular desconocida W(y). Se desprende también de la ecuación (45), que L2 es un factor de corrección de la expresión general L en aquellos casos en donde la misma depende explícitamente de la distribución.

Se siguieron dos caminos o aproximaciones para poder calcular H2. El primero supone la distribución aparente ó elugrama experimental f(v), igual a la distribución verdadera W(y). El segundo emplea un método general de iteración ya conocido<sup>71-75)</sup> para hallar W(y).

Para poder comparar y analizar los resultados según estas dos alternativas de cálculo fue necesario, a modo de prueba, darle una funcionalidad definida a W(y) y a la función de dispersión g(y,v).

Las dos funciones supuestas son las siguientes:

$$W(y) = \frac{1 + \gamma_P (y - y_0)}{\sqrt{2\pi} \sigma_P} \exp \left[ -\frac{(y - y_0)^2}{2 \sigma_P^2} \right] \quad (\text{función de distribución asimétrica})$$

$$g(v-y) = \frac{1 + \gamma_D (v-y)}{\sqrt{2\pi} \sigma_D} \exp \left[ -\frac{(v-y)^2}{2 \sigma_D^2} \right] \quad (\text{función de dispersión asimétrica})$$

Usando la ecuación (18), resulta:

$$f(v) = \frac{1 + \gamma_P \gamma_D + (\gamma_D - \gamma_P) (y_0 - v / \sigma) - \gamma_P \gamma_D (y_0 - v / \sigma)^2}{\sqrt{2\pi} \sigma} \exp \left[ -\frac{(v - y_0)^2}{2 \sigma^2} \right]$$

(46)

donde  $\delta_P$  y  $\delta_D^{(*)}$  son los parámetros de asimetría de la distribución y dispersión respectivamente.

$\nabla_P$  y  $\nabla_D$  parámetros de dispersión de la distribución y función dispersión respectivamente.

$$y \quad \tau_D = \frac{\nabla_D^2 \delta_D}{\nabla} \quad , \quad \tau_P = \frac{\nabla_P^2 \delta_P}{\nabla}$$

$$\text{con } \nabla^2 = \nabla_P^2 + \nabla_D^2$$

Por último, dando valores a los parámetros de la curva de calibración  $M(y)$ , se estará en condiciones de calcular  $H_2$  y compararlo con las aproximaciones propuestas.

En las secciones siguientes se describirán y analizarán los resultados para las dos alternativas propuestas como solución al problema.

### I.1.1 Procedimiento de sustitución de $W(y)$ por $f(v)$ en el cálculo de $L$

Este procedimiento como ya se dijo, consiste en reemplazar la distribución  $W(y)$  por la aparente  $f(v)$ , obteniéndose de esta manera un  $H_2$  aproximado.

Con la finalidad de poder interpretar mejor los resultados obtenidos, se definirá  $\rho$  a la integral  $H_2$  con la función  $W(y)$  definida en la sección anterior y  $\rho^*$  a la función aproximada, es decir:

$$\rho = \frac{(\int W(y) \cdot M^p(y) \cdot y \cdot dy)^{2/k}}{(\int W(y) \cdot M^p(y) \cdot dy)^{1/p}} \quad (47)$$

$$(**) \quad \rho^* = \frac{(\int f(v) \cdot M^p(y) \cdot y \cdot dy)^{1/k}}{(\int f(v) \cdot M^p(y) \cdot dy)^{1/p}} \quad (48)$$

(\*) Para evitar confusiones con los parámetros de asimetría de  $f(v)$  ( $\tau_P, \tau_D$ ), de ahora en más al parámetro de asimetría de  $g(y, v)$  se lo denomina  $\delta_D$ .

(\*\*) No se descarta aquí la posibilidad de comparar con una tercera función, en donde se reemplace solamente el numerador por  $f(v)$ . Sin embargo, los resultados hallados para el conjunto de valores utilizados (ver más adelante) en el cálculo, se ajustan mejor para el caso donde se reemplaza  $W(y)$  por  $f(v)$  en el numerador y el denominador.

El cálculo del denominador y numerador de las ecuaciones (47) y (48) fue inmediato con el uso de integrales paramétricas<sup>23)</sup>.

Para poder comparar resultados en (47) y (48), se utilizaron valores teóricos de parámetros de calibración, dispersión y asimetría bastante diferentes a los valores hallados en la experiencia. Esto queda demostrado en la figura 13, donde están representados los puntos experimentales y la curva de calibración teórica, cuyos parámetros fueron elegidos en el cálculo de  $\rho$  y  $\rho^*$ . En la misma figura aparecen también representadas algunas de las funciones  $g(y,v)$  para diferentes valores de los parámetros.

La razón de trabajar con pendientes altas de la curva de calibración y con  $\nabla_D^2$  mucho mayores a lo experimentalmente hallado es para probar el método en condiciones críticas, es decir en condiciones de baja capacidad de separación de las columnas y fenómenos de dispersión muy grandes. De esta manera se intenta dar al método la mayor generalidad posible.

En la tabla 14 se resumen las diferentes combinaciones realizadas entre los parámetros de dispersión y asimetría para el cálculo de  $\rho$  y  $\rho^*$  y las tablas que contienen esos resultados.

TABLA 14

Parámetros de Calibración	$\delta_D$	$\nabla_D^2$	$\gamma_P$	$\nabla_P^2$	Resultados
cte.	variab.	variab.	cte.	cte.	Tabla 15
cte.	cte.	variab.	cte.	cte.	Tabla 16
cte.	cte.	cte.	variab.	variab.	Tabla 17

con  $p = 1$ , para todos los cálculos.

En las tablas 15 y 16 está también tabulado el factor paramétrico del sumando L2 (Ecuación 45 cuyo parámetro  $T$  es aquí llamado  $\delta_D$ ).

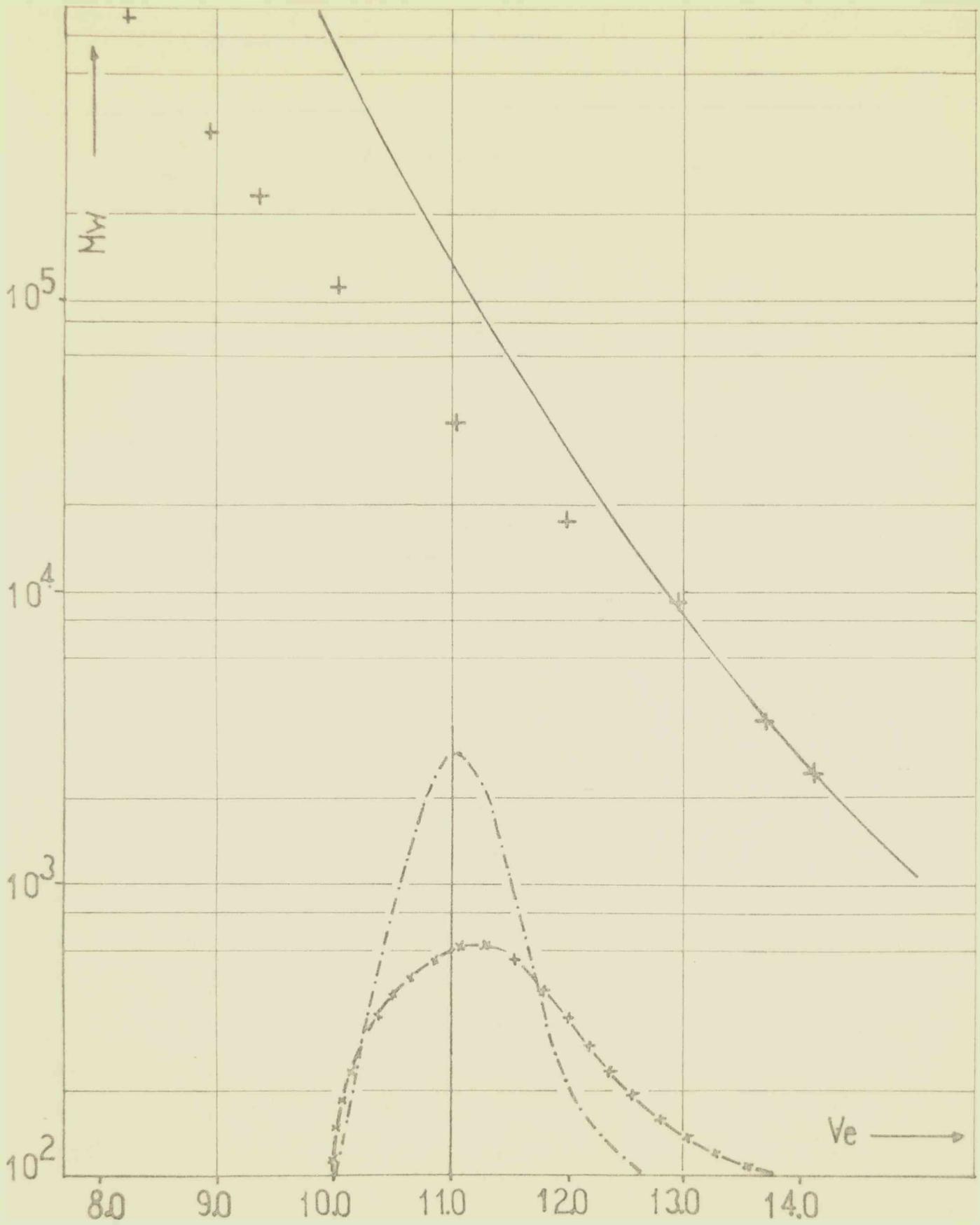


Fig. 1) Curves of nucleation,  $\gamma$  dependence on dimensionless velocity  $Ve$  at various  $\Delta_1, \gamma_1$

+ points experimental data

(—)  $\ln \bar{v} = 11.76$  (solid line)

(- - -)  $\Delta_1 = 1.5, \gamma_1 = 0.5$

(- · -)  $\Delta_1 = 0.5, \gamma_1 = 0.5$

TABLA 15

Cálculo de  $\rho$  y  $\rho^*$  con valores variables de  $\gamma_D$  (parámetro de asimetría) y  $\sqrt{V_D^2}$  (parámetro de dispersión).

$$A = 41,76$$

$$B = 3,82$$

$$C = 0,1$$

$$\gamma_P = 0,11$$

$$\sqrt{V_P^2} = 1,0$$

Cálculo No	$\gamma_D$	$\sqrt{V_D^2}$	z (ec.45)	$\rho$	$\rho^*$	$\gamma_D(1-z)/\sqrt{V_D} \times 10^2$
A1	0,030	0,10	1,02	13,71	34,77	-0,192
A2	0,045	0,20	1,04	18,07	56,74	-0,399
A3	0,051	0,25	1,05	20,74	33,41	-0,508
A4	0,056	0,30	1,06	23,82	26,72	-0,618
A5	0,067	0,40	1,08	31,40	23,41	-0,846
A6	0,077	0,50	1,10	41,39	24,71	-1,080
A7	0,086	0,60	1,12	54,55	28,74	-1,330
A8	0,095	0,70	1,14	71,92	35,64	-1,580
A9	0,103	0,80	1,16	94,80	46,40	-1,850
A10	0,111	0,90	1,18	124,97	62,88	-2,117
A11	0,120	1,00	1,20	164,74	88,27	-2,400
A12	0,128	1,10	1,22	217,16	128,04	-2,682
A13	0,136	1,20	1,24	286,27	191,60	-2,976
A14	0,144	1,30	1,26	377,36	295,54	-3,280

TABLA 16

Cálculos de  $\rho$  y  $\rho^*$  con  $\gamma_D$ ,  $\gamma_P$  y  $\nabla_P^2$  constantes

Cálculo Nº	$\gamma_D = 0,07$			$\gamma_D = 0,12$	
	$\rho$	$\rho^*$	$-\gamma_D(1-z)/\nabla_D \times 10^2$	$\rho^*$	$-\gamma_D(1-z)/\nabla_D \times 10^2$
A1	13,71	31,10	0,443	27,50	0,758
A2	18,07	61,33	0,626	72,66	1,073
A3	20,74	34,02	0,700	35,67	1,200
A4	23,82	26,79	0,767	27,01	1,314
A5	31,40	23,37	0,885	22,78	1,518
A6	41,39	24,85	0,990	23,86	1,697
A7	54,56	29,20	1,084	27,84	1,859
A8	71,92	36,58	1,171	34,79	2,008
A9	94,80	47,98	1,252	45,70	2,147
A10	124,97	65,31	1,328	62,45	2,770
A11	164,74	91,74	1,400	88,27	2,400
A12	217,16	132,56	1,468	128,54	2,517
A13	286,27	196,72	1,533	192,56	2,629
A14	377,36	299,50	1,596	296,35	2,736

TABLA 17

Cálculos de  $\rho$  y  $\rho^*$  con  $\gamma_P$  y  $\nabla_P^2$  variables

$$A = 41,76$$

$$B = 3,82$$

$$C = 0,10$$

$$\gamma_D = 0,12$$

$$\nabla_D^2 = 1,00$$

Cont. Tabla 17

Cálculo N°	$\gamma_p$	$\sqrt{\frac{2}{p}}$	$\rho$	$\rho^*$
B1	0,090	0,10	156,37	17,70
B2	0,097	0,30	158,32	26,63
B3	0,101	0,50	160,25	38,84
B4	0,105	0,70	162,12	55,15
B5	0,110	1,00	164,74	88,27

Las variaciones que se observan en  $\rho^*$  comparando las tablas 15 y 16 son pequeñas, aunque como es lógico suponer son apreciables en el factor paramétrico  $(-\gamma_D(1-z)/\sqrt{D})$ .

Comparando las tablas 15 y 17 se encuentra que las mayores diferencias entre  $\rho$  y  $\rho^*$  ocurren entre valores extremos de  $\sqrt{D}$  y  $\sqrt{p}$ .

Los volúmenes de elución considerados para el cálculo, fueron en todos los casos:  $y_0$  (volumen inicial) = 11,35 ml y  $v$  (volumen del máximo) = 12 ml.

Para relacionar mejor los datos de la tabla 15, con respecto al cálculo de  $\rho$  y  $\rho^*$ , se procedió a calcular los  $L$  correspondientes, según la ecuación (45). Llamamos  $L_{correcto}$  ( $L_{corr}$ ), al  $L$  calculado con la función de distribución asimétrica asignada anteriormente (integral  $\rho$ ) y  $L_{aproximado}$  ( $L_{prox}$ ), al obtenido usando para el cálculo de  $L$  la función de distribución aparente  $f(v)$  (integral  $\rho^*$ ). Los cálculos respectivos, así como el error relativo porcentual están tabulados en la tabla 18.

En la tabla 18 se puede ver que si consideramos los términos no comunes de los sumandos  $L_1$  y  $L_2$ , es decir, comenzando desde la izquierda, los términos de la segunda, cuarta y quinta columna (ver ecuación 45), encontramos que  $L_1$  en todos los casos es bastante mayor a  $L_2$ . Estas diferencias se acentuarían aún más si eligiéramos parámetros de calibración con valores más pequeños. Por lo tanto el término  $L_1$  es el de mayor "peso" en la ecuación general de  $L$ .

La representación de las  $L$  de la tabla 18 en función del factor

TABLA 18  
Cálculos de los L según datos de la tabla 13

Cál. $z = \frac{z - \bar{z}}{s}$	$\frac{z - \bar{z}}{s} \left( \frac{1 + \text{erf} \left( \frac{z - \bar{z}}{s} \right)}{2} \right)^{1/k}$	$\text{erf} \left( \frac{z - \bar{z}}{s} \right)$	$\rho \left( \chi^2_{(1-z)} / \sigma_D^2 \right)^{1/k}$	Lcorr	$\rho^m \left( \chi^2_{(1-z)} / \sigma_D^2 \right)^{1/k}$	Laprox	%Error
A1	1,3049	0,3085	-0,02322	1,1644	-0,06676	1,1245	-3,43
A2	1,7681	0,8263	-0,0578	1,3636	-0,1615	1,2614	-7,49
A3	1,9566	0,7877	-0,0309	1,4760	-0,1302	1,4382	-2,56
A4	2,2404	0,7514	-0,1084	1,6020	-0,1215	1,5921	-0,62
A5	2,9436	0,6830	-0,1815	1,8865	-0,1353	1,9181	1,68
A6	3,8734	0,6216	-0,2843	2,2310	-0,1698	2,3022	3,19
A7	5,1042	0,5657	-0,4320	2,6431	-0,2276	2,7587	4,37
A8	6,7354	0,5145	-0,6358	3,1383	-0,3150	3,3032	5,25
A9	8,8280	0,4683	-0,9262	3,7336	-0,4533	3,9551	5,33
A10	11,4652	0,4147	-1,3137	4,2098	-0,6610	4,4805	6,43
A11	15,5854	0,3580	-1,6747	5,3204	-1,0045	5,6585	6,34
A12	20,6644	0,3396	-2,6272	6,1254	-1,5490	6,4316	5,97
A13	27,4251	0,3051	-3,6710	7,2473	-2,4571	7,6177	5,11
A14	36,4348	0,2777	-5,0011	8,7041	-3,9868	9,0108	3,52

donde % Error =  $\frac{L_{\text{aprox}} - L_{\text{corr}}}{L_{\text{corr}}} \times 100$

paramétrico L2 aparecen en la figura 14, mientras que en la figura 15 se representa el error relativo porcentual en función del factor paramétrico.

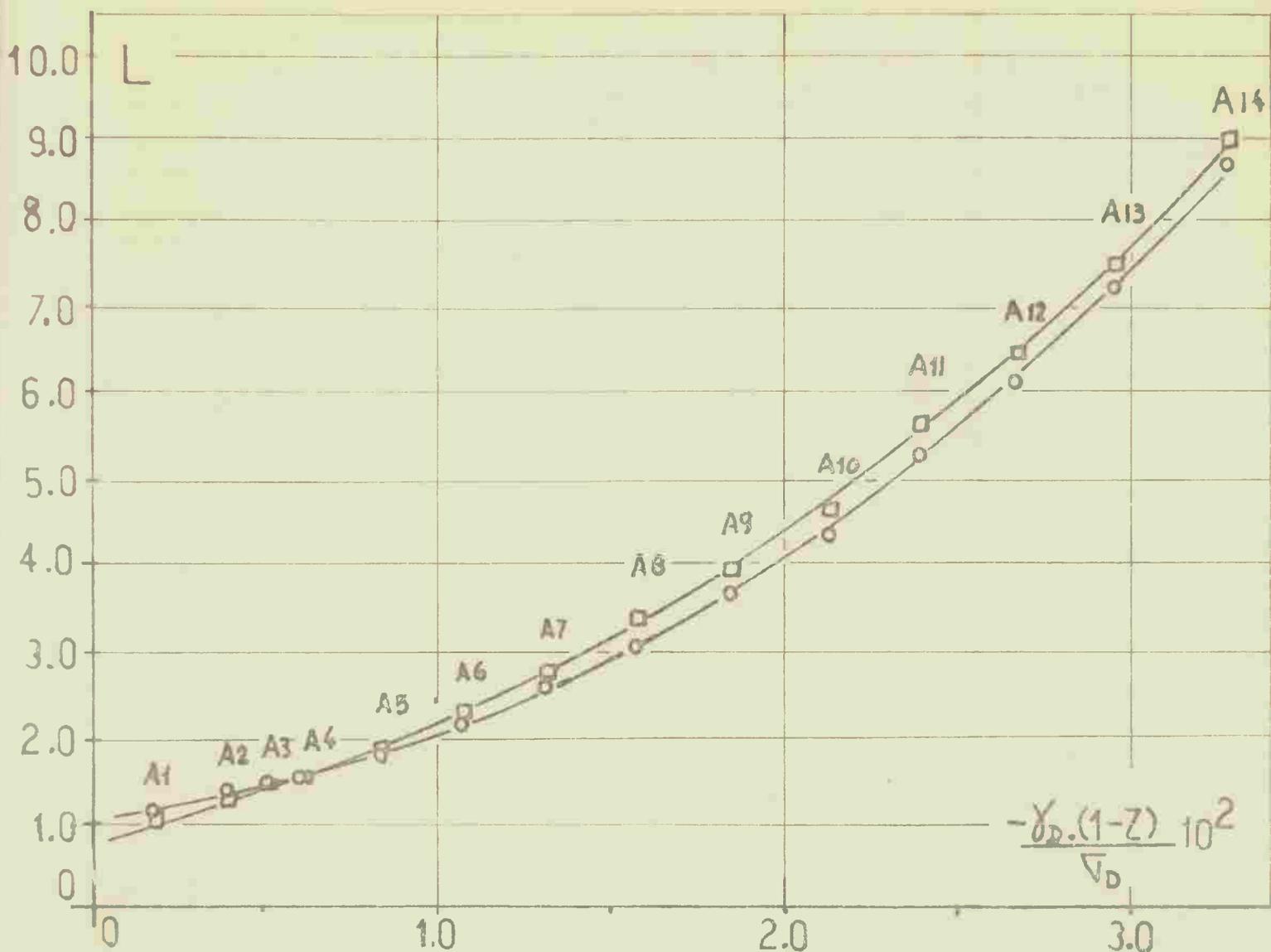


Fig. 14 Representación gráfica de los L según tabla 18

- ( O    Lcorr
- ( □    Lprox

Como se puede apreciar en la figura 14, o mejor aún en la figura 15, las desviaciones no son muy grandes (están por debajo del 10 %), por lo que el método puede ser usado dentro de esa precisión.

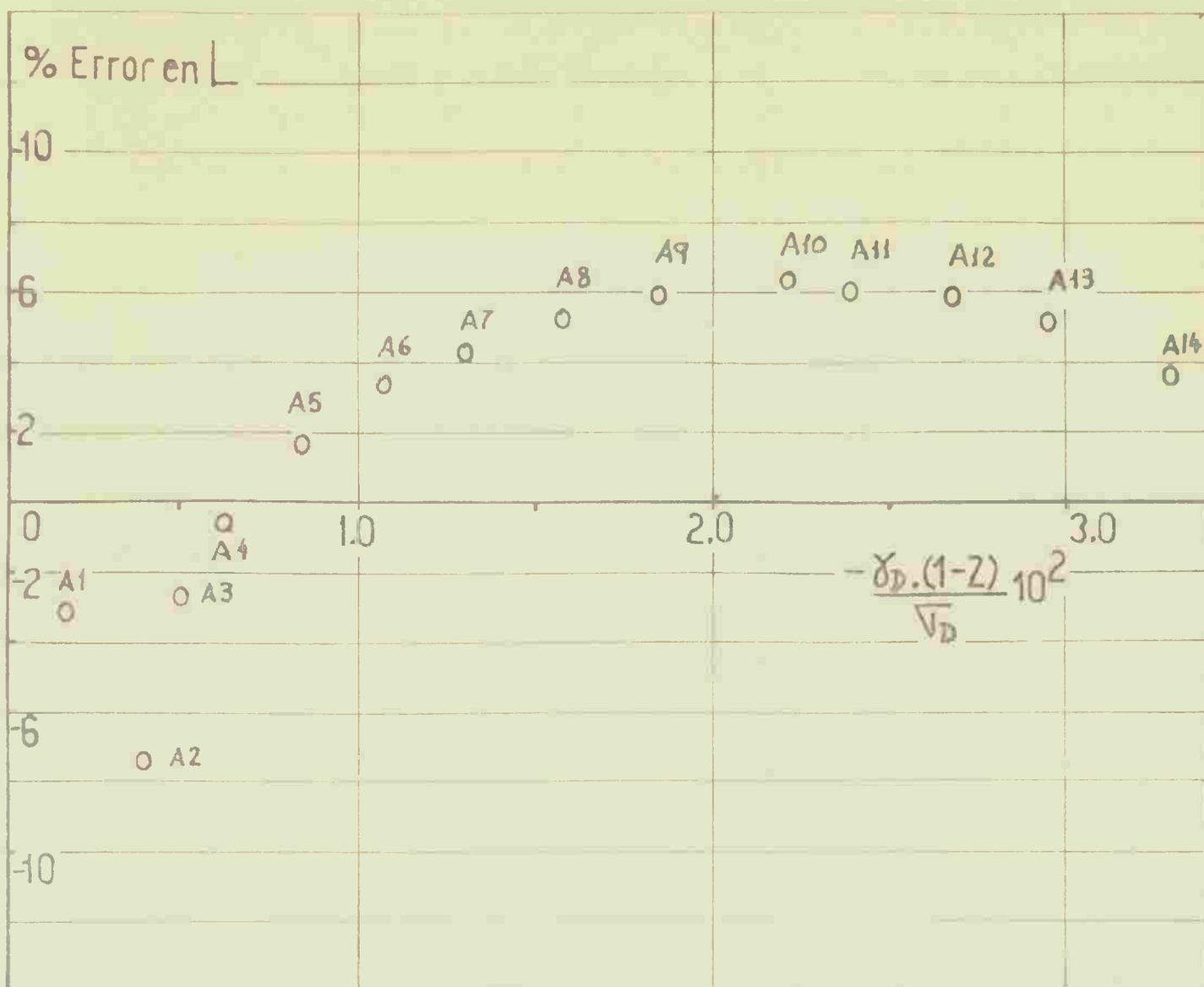


Fig. 15 Representación del error relativo entre Lcorr y Lprox.

1.1.2 Procedimiento iterativo en el cálculo de L

Este método es más general que el anterior pues no está ligado a condiciones especiales de la función L. El procedimiento general es conocido desde hace tiempo <sup>(71), (72)</sup>, y consiste en obtener la función de distribución desconocida W(y) a partir de la curva de elución experimental f(v), y de la función de dispersión g(y,v), por medio de un método de desconvolución iterativo.

El procedimiento es el siguiente: se comienza partiendo de una supuesta distribución Ws(y), que en nuestro caso corresponde al elugrama experimental, y que de acuerdo a la ecuación (18), permite calcular una f(v):

$$f_{\text{cal}}(v) = \int_{-\infty}^{+\infty} W_s(y) \cdot g(y, v) dy = \int_{-\infty}^{+\infty} f_{\text{exp}}(y) \cdot g(y, v) \cdot dy \quad (49)$$

Un mejor valor de  $W(y)$ , al que designamos como  $W_m(v)$ , se obtiene usando una de las dos siguientes expresiones <sup>71-74)</sup>

$$W_m(v) = W_s(v) = f_{\text{exp}}(v) - f_{\text{cal}}(v)$$

o bien <sup>74), 75)</sup>

$$W_m(v)/W_s(v) = f_{\text{exp}}(v)/f_{\text{cal}}(v)$$

Calculando  $W_m(v)$  (en nuestro caso por la segunda expresión, conocida como método dos de Haxielec <sup>74)</sup>, éste se reemplaza en la integral anterior en lugar de  $W_s(y)$ , dando lugar a otra iteración, y así sucesivamente hasta que:

$$\int |f_{\text{exp}}(v) - f_{\text{cal}}(v)| \cdot dv \ll 1 \quad (50)$$

La aplicación de este procedimiento iterativo para resolver el caso IV requerirá además que el mismo sea parte integrante de la iteración general en la que se optimizan los valores numéricos de los parámetros de calibración y dispersión. Es decir, en otras palabras, que el método nos debe garantizar que funciona aún cuando se opere con funciones  $g(y, v)$  que se van modificando. Por tal razón, fue necesario probar que esas modificaciones de la función de dispersión no impiden el carácter convergente del método sobre el cual se basa. Para ello, se partió como en el caso anterior de funciones conocidas  $f(v)$ ,  $W(y)$  y  $g(y, v)$  y se va modificando  $g(y, v)$ . Con ese fin se definieron los siguientes términos:

$$r_{\nabla} = \nabla_D^{2*} / \nabla_D^2$$

$$r_{\gamma} = \gamma_D^* / \gamma_D$$

donde  $\nabla_D^{2*}$  y  $\gamma_D^*$ , corresponden a los parámetros iniciales dados a la función de dispersión en el cálculo de  $f(v)$  mediante la ecuación (49).

Los parámetros sin asterisco responden a los utilizados en el cálculo de la función analítica  $f(v)$  de la ecuación (46), considerada como  $f_{\text{exp}}(v)$ .

Los resultados del análisis para un  $\delta_p = 0,30$  y  $\nabla_D^2 = 0,77$ , con un volumen inicial de 13,1 ml y volumen del máximo de 16 ml, se muestran en la tabla 19. En la misma aparece también indicado el número de iteraciones necesarias para alcanzar un valor absoluto en la diferencia entre los  $f^{(x)}$  (ecuación (50)) de aproximadamente 1 %, que es lo mismo que decir un grado de solapamiento entre las curvas experimental y calculada de aproximadamente 99 %; coincidencia que resulta difícil de conseguir por simple repetición de dos experimentos.

Algunos de esos resultados se representan en la figura 16, en la cual se puede apreciar que el carácter convergente del método no resulta modificado aún cuando se utilicen en la desconvolución valores de los parámetros diametralmente opuestos a los del cálculo directo, es decir que dado un  $f(v)$  y una  $g(y,v)$ , siempre es posible definir una  $W(y)$  con el presente procedimiento.

TABLA 19

Cálculos de  $r_v$  y  $r_\gamma$

Cálculo No	$\nabla_D^2$	$\nabla_D^2^*$	$\delta_D$	$\delta_D^*$	$r_v$	$r_\gamma$	No de Iter.
C1	0,63	0,63	-0,75	0,75	1	-1	14
C2	0,63	0,63	-0,75	-0,75	1	1	7
C3	0,63	0,45	-0,75	-0,75	0,71	1	6
C4	1	0,45	0,12	-0,12	0,45	-1	3
C5	0,63	0,63	-0,75	0	1	0	9
C6	0,63	0,63	0	-0,75	1	$\infty$	7
C7	0,63	0,89	-0,75	-0,75	1,42	1	9

(x) Se tomaron dos cifras significativas para los  $f(v)$  y los diversos  $W(y)$ .

El paso siguiente es introducir este método iterativo en un programa general que permita optimizar los cinco parámetros de calibración y dispersión contenidos en L (ver ecuación (45)).

Para probar este programa general fue necesario generar los dos tipos de datos que necesita, o sea el elugrama experimental ó  $f(v)$  y el promedio de peso molecular conocido. Esto se hizo mediante otro programa, al que se le dieron como datos la función calibración  $M(y)$  y las funciones conocidas  $W(y)$ ,  $g(y,v)$ . Dado un volumen inicial se calcularon así, un total de cuatro elugramas de cincuenta puntos cada uno (según ec. (46)), correspondiéndole a cada elugrama tres promedios de pesos moleculares aparentes (ec.(19)), y calculados (ec. (20)); peso molecular en peso ( $p=1$ ), en número ( $p=-1$ ) y viscosimétrico (se le asignó a  $p$  un valor de 0,76).

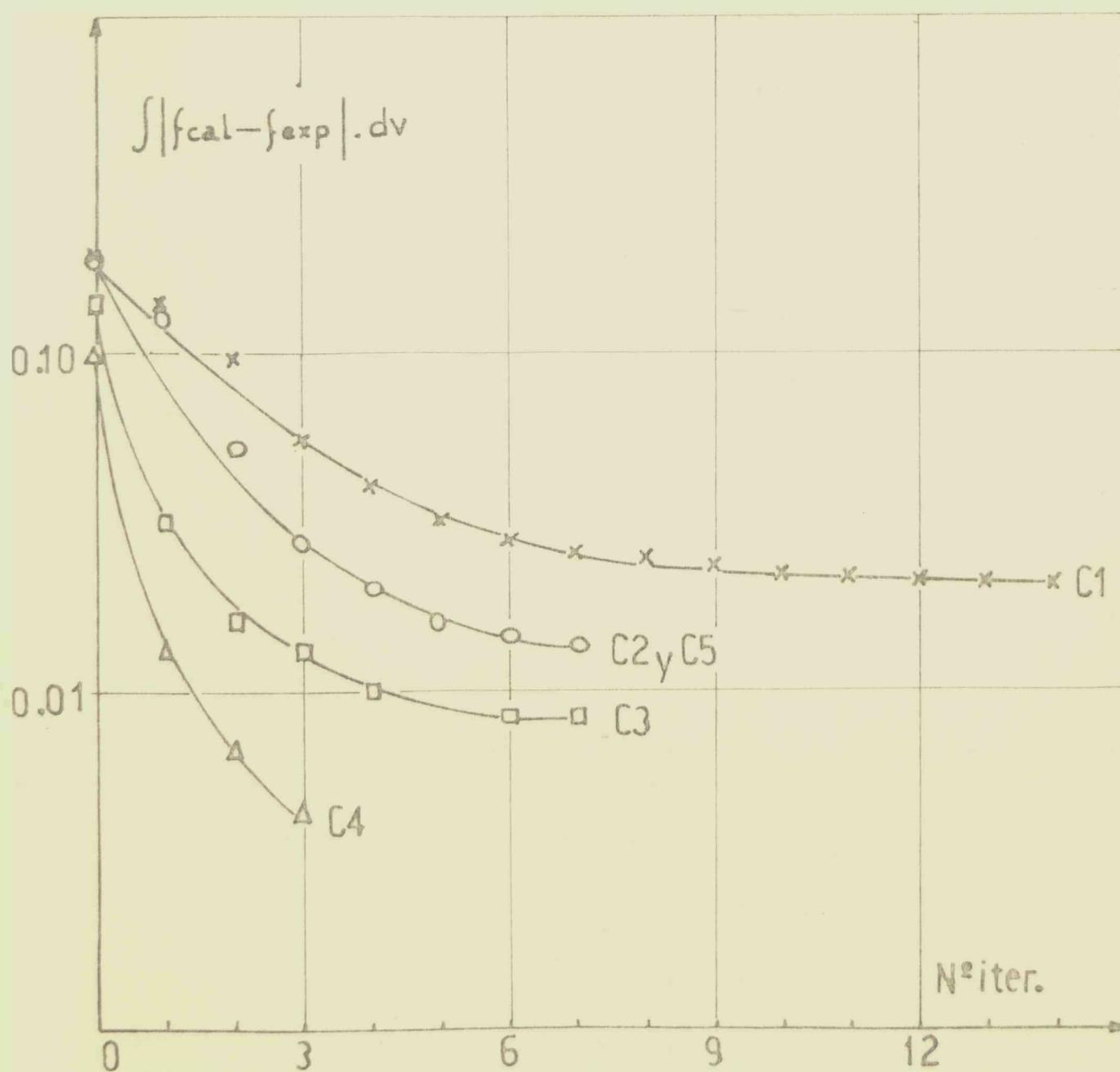


FIG. 16 Representación  $\int |f_{cal}(v) - f_{exp}(v)| . dv$  vs. N° de iteraciones.

Se ha preferido generar  $f(v)$  y sus promedios según el método analítico, o sea el correspondiente al cálculo de la ecuación (46) sobre el método numérico, puesto que este último introduce errores propios del cálculo numérico en las funciones de partida.

Con los cuatro elugramas y los doce promedios de peso molecular calculados, ec. (20), se procedió a optimizar los cinco parámetros, según el programa general, partiendo de valores iniciales diferentes a los correctos, es decir valores distintos a los usados en generar los elugramas y promedios de pesos moleculares.

La tabla 20 nos muestra el resultado de la optimización. En la primera fila de la tabla aparecen los valores iniciales de los parámetros, mientras que al pie de la misma se incluyen los valores correctos. En la última columna se dan los S, ec. (26), correspondientes a las sucesivas iteraciones.

TABLA 20

Cálculo de los parámetros de calibración y dispersión, partiendo de valores iniciales distintos de los correctos.

Número de Iteraciones	A	B	C	$\delta_D$	$\nabla_D^2$	S
Valor inicial	23,7600	1,2000	0	0	0,40	3,570
1	24,1249	1,1880	0,0016	0,44	0,39	1,271
2	23,9319	1,5521	0,0334	0,47	0,59	0,920
3	23,8867	1,6012	0,0354	0,45	0,55	0,130
4	24,0035	1,6220	0,0364	0,43	0,51	0,112
5	24,0159	1,6213	0,0365	0,42	0,48	0,058

Valores correctos:

A = 24,0910

B = 1,6373

C = 0,0381

$\delta_D = 0,50$

$\nabla_D^2 = 0,50$

Inicialmente  $S$  toma un valor grande, para luego ir disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar un mínimo con valores numéricos de los parámetros de calibración-dispersión cercanos a los correctos. La diferencia en el valor de los parámetros obtenidos por iteración con los correctos se debe muy probablemente a la de contar con un número de puntos insuficientes para optimizar tantos parámetros, ya que en realidad se tienen prácticamente ocho puntos o promedios de peso molecular (el peso molecular viscosimétrico es muy parecido al peso molecular en peso), para optimizar cinco parámetros. Pero aún así la tabla 20 nos dice que para el caso de optimización de cinco parámetros simultáneamente (caso IV), el método de Gauss funciona y en principio es posible usarlo.

En las figuras 17 y 18 se comparan respectivamente las curvas de calibración y dispersión, calculadas para los parámetros optimizados por el método de Gauss y los valores correctos.

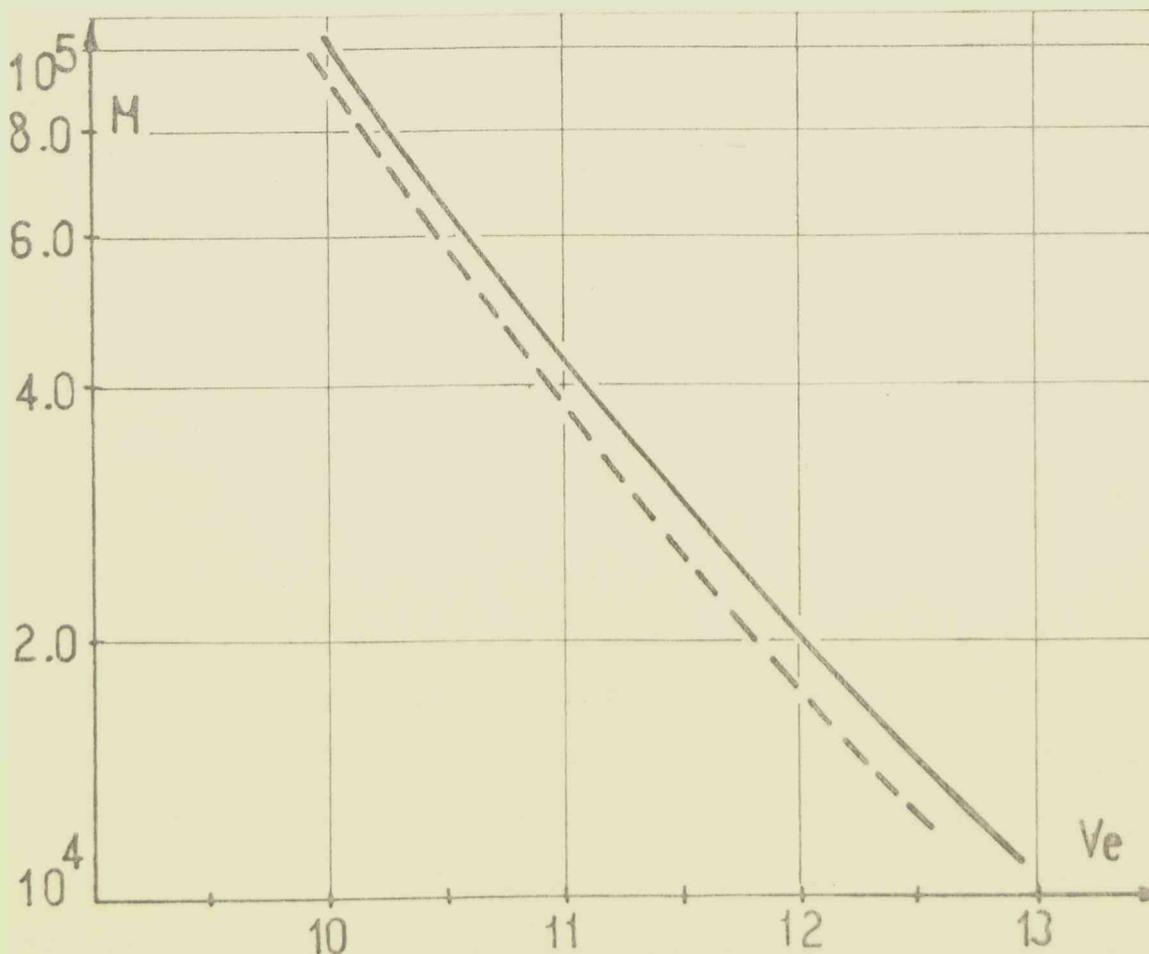


Fig. 17 Representación gráfica de la curva de calibración para los parámetros optimizados según Gauss (----) y los parámetros correctos (—).

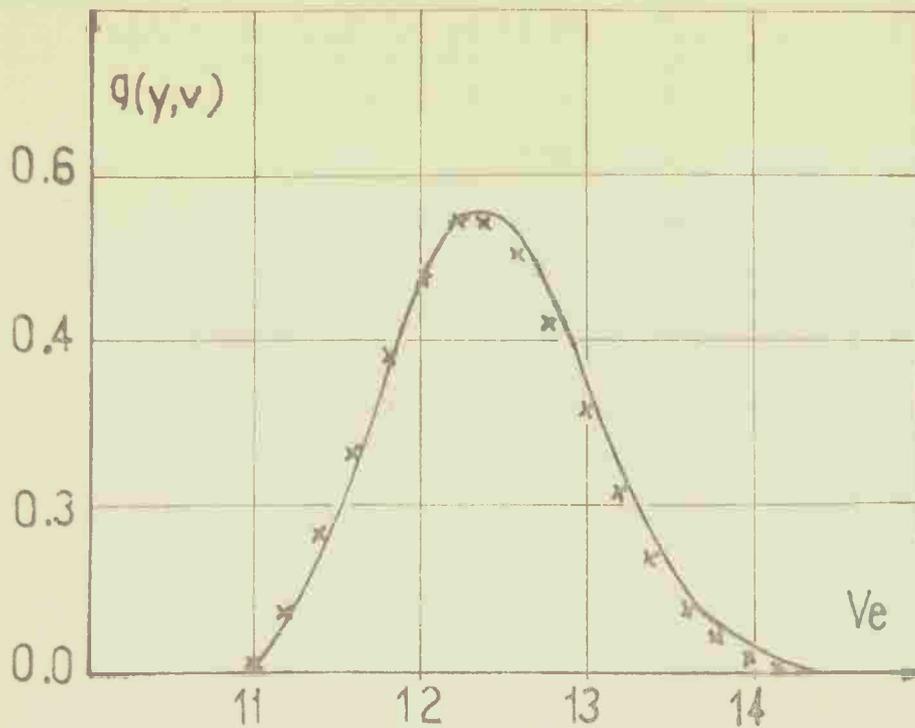


Fig. 18 Funciones de dispersión de los parámetros optimizados (x,x) y los correctos (—).

El intervalo de volúmenes de elución de las abscisas corresponde al rango de  $V_e$  elegidos en el cálculo de los diferentes  $f(v)$  por la ecuación (46).

### I.2 Conclusiones sobre el Caso IV

Si bien no se pueden dar conclusiones finales respecto de los métodos de cálculo del caso IV, los resultados parciales nos indican que la aplicación de los dos procedimientos arriba explicados permiten sus usos con suficiente exactitud.

El método iterativo resulta más indicado ya que no hace tantas suposiciones iniciales como el procedimiento de sustitución. Además respecto del método iterativo, fue demostrado en este trabajo que el mismo siempre converge aún para funciones de dispersión muy diferentes a las correctas. También es importante recalcar aquí, en base a los resultados de la optimización, la aplicabilidad del "método iterativo de Gauss" para un número grande de parámetros como es el del caso tratado.

En resumen, se puede concluir que: ambos procedimientos permiten extender considerablemente los límites de aplicación del método de los "promedios aparentes de peso molecular", permitiendo contemplar cualquier situación experimental referente tanto a la función calibración como a la dispersión, manteniendo las ventajas anteriormente indicadas en las conclusiones de los otros casos.

APENDICE II

II.1 CPG

Históricamente, el primer nombre dado a este tipo de cromatografía fue el de cromatografía por permeación de geles. Actualmente, el nombre cromatografía de exclusión es más usado como puede apreciarse en los libros "Analítica de polímeros", tomo I, de M. Hoffmann, H. Kroemer y R. Kuhn (en alemán), casa editora G. Thieme, Stuttgart (1977) y "Cromatografía líquida de alta performance" de H. Engelhardt (en inglés), casa editora Springer (1979). En ambos casos se consideran los dos términos como sinónimos, uso que seguimos en el presente trabajo.

II.2 R, radio de giro

El radio de giro es la dimensión con que generalmente se expresa la extensión espacial de moléculas poliméricas flexibles en solución. Se puede definir como<sup>62)</sup>:

$$R^2 = \frac{\sum_i m_i \cdot r_i^2}{\sum_i m_i}$$

donde  $m_i$  corresponde a los elementos de masa que forman la macromolécula, localizados a una distancia  $r_i$  del centro de gravedad fijo o centro de masa.

R en cadenas flexibles depende de la conformación, por lo tanto, lo que interesa es conocer el promedio de todas las conformaciones. Esto se expresa comúnmente como radio de giro promedio,  $R_g$ .

$$R_g = \left( \overline{R^2} \right)^{1/2} = \left( \frac{\sum_i (m_i \cdot r_i^2)}{\sum_i m_i} \right)^{1/2}$$

donde  $\left( \overline{R^2} \right)^{1/2}$  es el promedio de la raíz cuadrada media de R.

### II.3 Solvente theta

En las soluciones de polímeros se distinguen tres tipos de fuerzas o interacciones. Las interacciones inter e intra moleculares y las interacciones polímero-solvente. Dentro de las interacciones intramoleculares se encuentran las de corto y largo alcance.

En solventes theta, tanto las fuerzas de largo alcance como las intermoleculares se equilibran con las del polímero-solvente. El resultado de este efecto a esa temperatura y presión (temperatura theta, presión theta), es que estadísticamente la macromolécula puede adoptar todas las conformaciones posibles (es como si la macromolécula se moviera en el vacío), presentando frente a las propiedades coligativas un comportamiento ideal.

### II.4 Conformación

Las diferentes posiciones que puede tomar en el espacio la cadena polimérica alrededor de un centro fijo o centro de gravedad, debido a la libre rotación de las uniones entre los átomos que la componen.

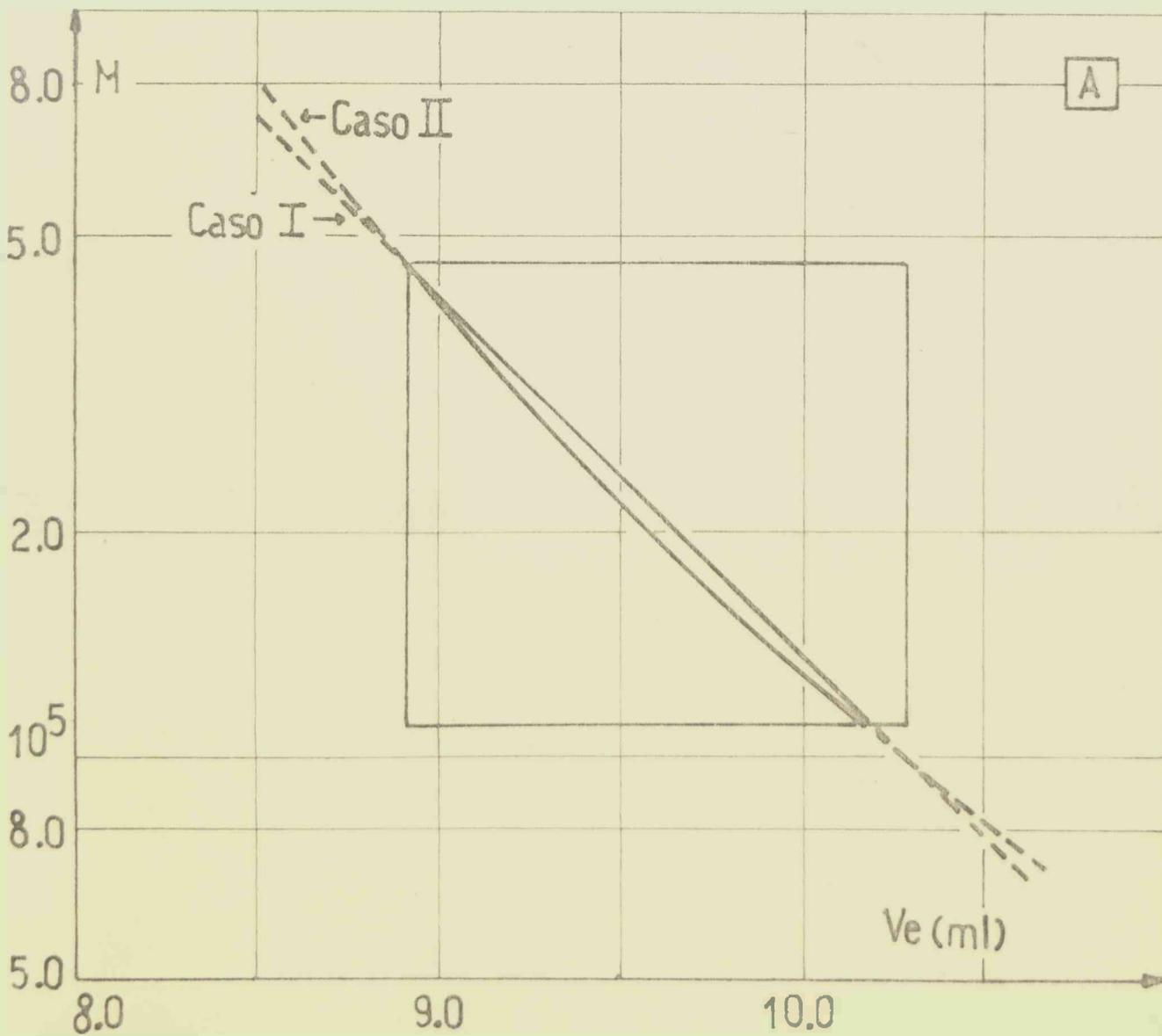
### II.5 Cálculo de $A_{2,1}$

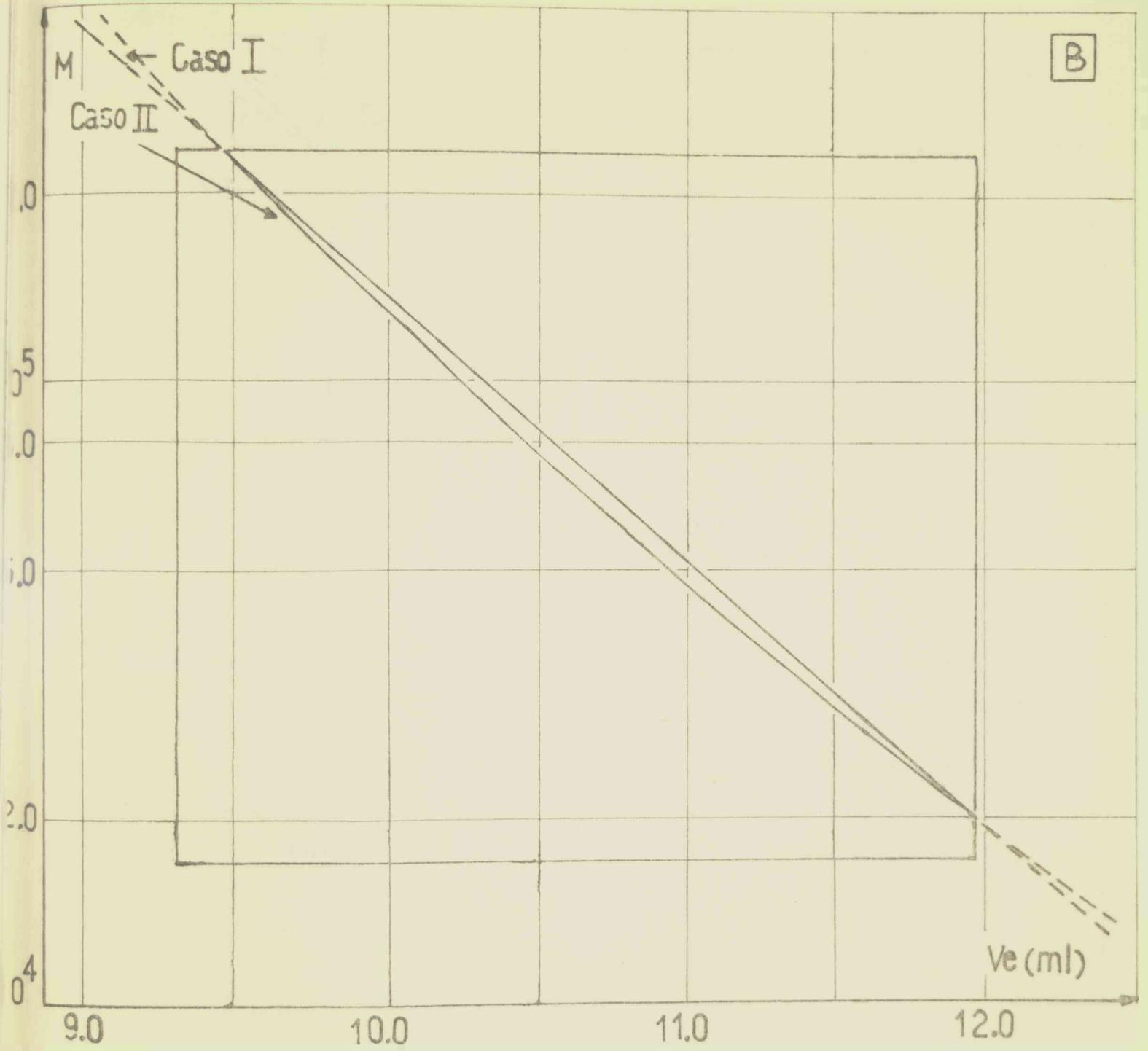
Cuando no se conoce  $A_{2,1}$ , lo que se hace es preparar una serie de soluciones a distintas concentraciones de muestra conocida. Luego se miden los  $R_{\theta,1}$  (siempre a ángulos pequeños) para las distintas concentraciones, graficando  $K \cdot C_1 / R_{\theta,1}$  vs.  $C_1$  (ver ecuación (12a)). De la pendiente se obtiene  $A_{2,1}$  ( $A_2$  para este caso) y de la intercepción al eje de ordenadas el  $M_w$  promedio.

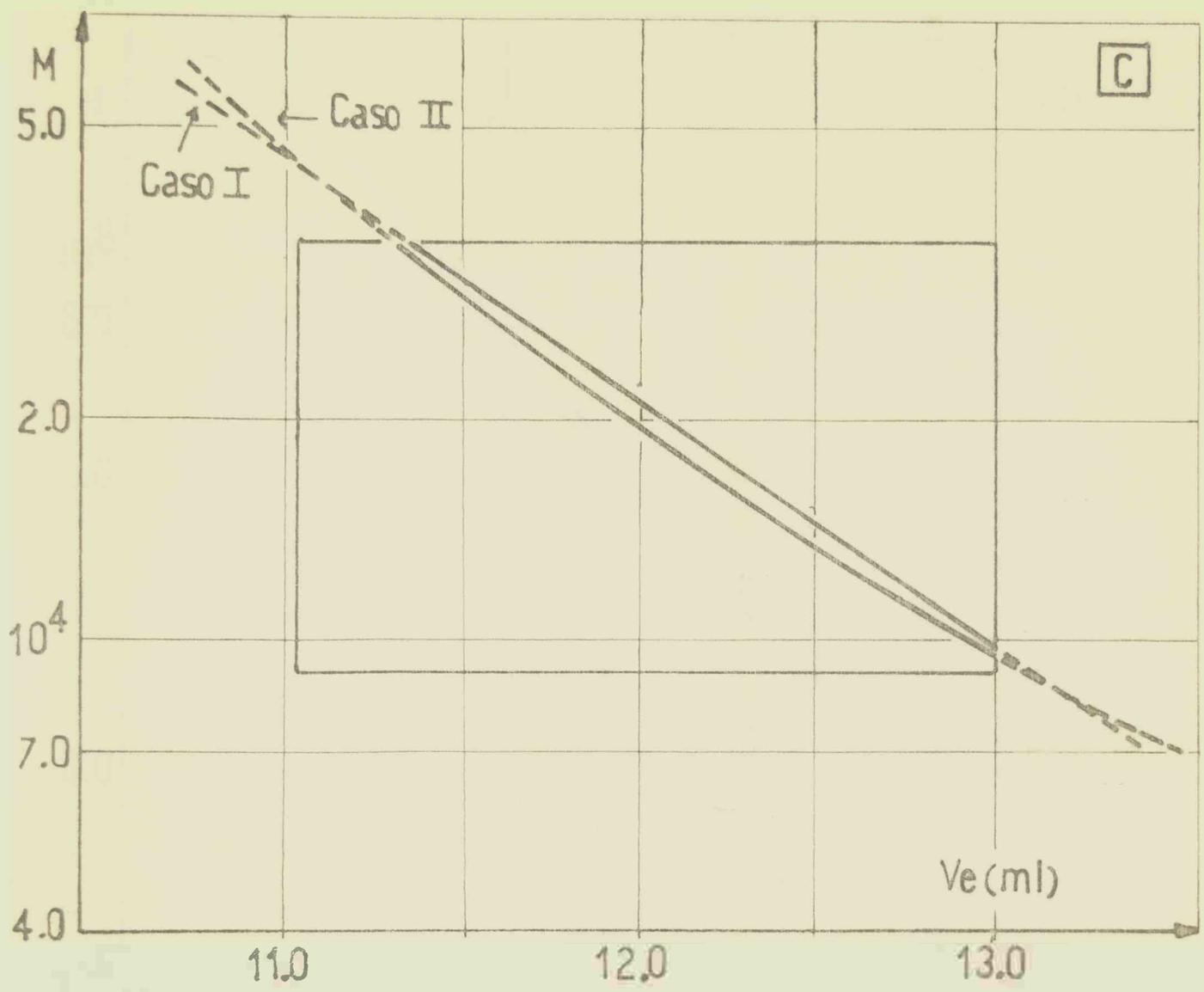
APENDICE III

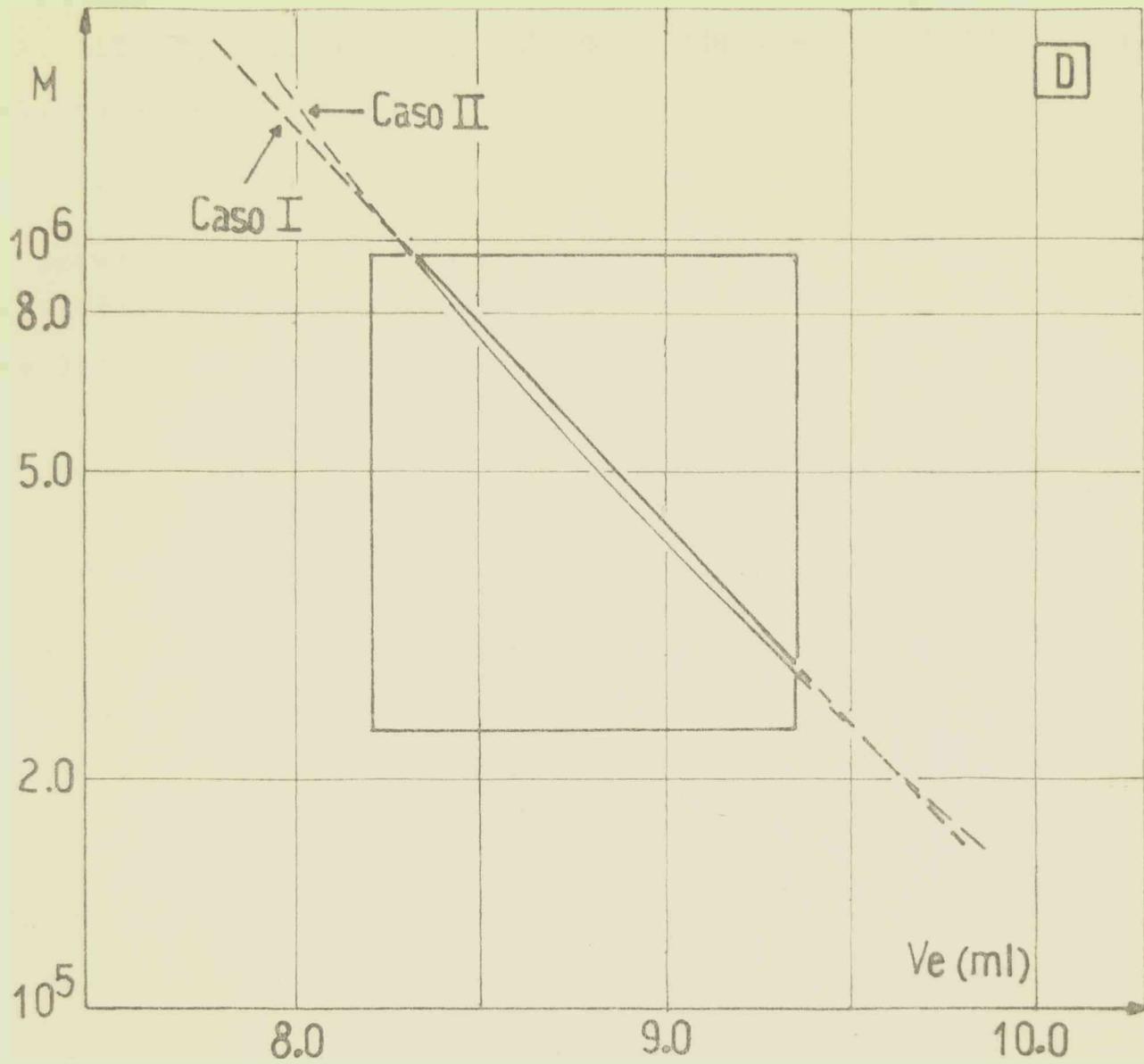
III.1 Representación de  $\ln M$  versus  $V_e$  para los distintos intervalos de peso molecular según los casos I y II:

Polímeros (peso molecular nominal; para más detalles ver tabla 3, secc. 5.1.4)	Figuras
17.000, 233.000, 470.000	A
17.000, 35.000, 110.000, 233.000	B
9.000, 17.000, 35.000	C
233.000, 470.000, 950.000	D









En las diferentes figuras aparecen en recuadros las zonas consideradas en la optimización.









- 64) L. MARAIS, Z. CALLOT y H. BENOIT, J. Appl. Polym. Sci. 21, 7, 1955 (1977)
- 65) L.H. TUNG y R. RUBYON, J. Appl. Polym. Sci. 13, 2397 (1969)
- 66) W.W. YAU, H.J. STOKLOSA y D.D. BLY, J. Appl. Polym. Sci. 21, 1911 (1977)
- 67) T. OGATA y T. INABA, J. Appl. Polym. Sci. 20, 2101 (1976)
- 68) K.S. CHANG y H.Y.M. HUANG, J. Appl. Polym. Sci. 13, 1459 (1969)
- 69) H. DESS y R.F. KRATZ, J. Polym. Sci. Part. A-2 4, 731 (1966)
- 70) I.K. GILLING y A.M. REED y I.N. ASKILL, Polymer (London) 22, 505 (1981)
- 71) H.L. BURGER y F.H. VAN CITTERT, Z.f. Physik 72, 722 (1932)
- 72) H.L. BURGER y F.H. VAN CITTERT, Z.f. Physik 41, 428 (1933)
- 73) J.C. ROBIET y L.A. HIGGS, Proc. Phys. Soc. 70, 87 (1962)
- 74) T. ISHIGE, S.I. LEE y A.E. HAYIBEC, J. Appl. Polym. Sci. 15, 1607 (1971)
- 75) M. DANIELEWICZ, S. VOZKA y M. KUBIN, Coll. Czech. Chem. Communications 42, 2496 (1977)
- 76) G. BEYERHOF y B. JOVANOVIC, J. Polym. Sci. P, 5, 495 (1967)
- 77) W.E. SMITH y A. KOLLMANSEBERGER, J. Phys. Chem. 69, 4157 (1965)
- 78) W.W. YAU y C.F. MAIONE, J. Polym. Sci. B, 5, 663 (1967)
- 79) W.W. YAU, H.L. SUCHAN y C.F. MAIONE, J. Polym. Sci. Part. A-2 6, 1349 (1968)

*J. Co. Co. Co.*

