

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

Departament d'Enginyeria Química E.T.S.E.I.B.

**ANÀLISI I CONTROL DE CIANURS I
PRODUCTES RELACIONATS
PRESENTS EN AIGÜES RESIDUALS I
DISSOLUCIONS DE PROCESSOS
INDUSTRIALS MITJANÇANT
ELECTROFORESI CAPIL·LAR**

Autor: Vivenç Martí i Gregorio
Director: Fernando Canal Bienzobas

Barcelona, novembre de 1996

CAPÍTOL 3:

DISSENYES EXPERIMENTALS APLICATS A L'OPTIMITZACIÓ DE L'ANÀLISI DE CIANURS MITJANÇANT ELECTROFORESI CAPIL·LAR

3.1. INTRODUCCIÓ

Tal i com s'ha posat de manifest en capítols anteriors, un gran nombre de variables i d'interrelacions entre variables afecten l'anàlisi mitjançant electroforesi capil·lar. Al capítol segon s'ha constatat que les variables d'anàlisi (longitud d'ona, voltatge i temps d'injecció) així com les característiques del tampó i de la mostra tenen un efecte important sobre el temps de detecció i el senyal. La taula I.2., basada en la teoria del capítol primer, mostra les relacions entre les principals variables d'una anàlisi i els resultats obtinguts. Les indicades amb el signe +/- necessiten optimització ja que depenen de la zona on es treballi.

Donat que l'objectiu de tota tècnica analítica és obtenir la millor resposta possible, sovint es necessiten dissenys experimentals per realitzar una optimització adequada que permeti assolir les millors condicions d'anàlisi tot i respectant les restriccions imposades (veure taula I.1).

Els mètodes d'optimització que s'apliquen en la Química Analítica instrumental resolutive (HPLC, HPGC, HPCE) es basen en establir dissenys experimentals i models empírics simples per assolir una regió òptima (DEM 83)(MVD 88)(BER 86). Aquest tipus d'optimització, per tant, està centrada en l'experimentació donat que l'aplicació d'un model teòric vàlid i exacte resulta difícil per poder definir alguns dels paràmetres analítics com l'altura del pic, el soroll, etc...

En els mètodes aquí referits es suposa que prèviament es coneix quin conjunt de factors afecten la resposta que es vol optimitzar i per tant no cal fer un estudi previ sobre significància i interacció de factors (HOB 95).

L'establiment de bons criteris d'optimització resulta fonamental a l'hora de fer factible una optimització senzilla en un temps d'anàlisi raonable, per la qual cosa cal realitzar una anàlisi de les diferents alternatives per realitzar una correcta elecció del mètode més addient.

3.1.1. MÈTODES D'OPTIMITZACIÓ

Un primer mètode per assolir la variable òptima força extès en el món de la química consisteix en variar cada vegada un factor mantenint la resta constant. Un cop trobat el millor punt sota aquestes condicions es varia un altre factor mantenint la resta constant i així successivament. Sovint succeeix que els "millors punts" depenen de la resta dels factors i per tant, quan s'han acabat de variar tots els factors, caldria tornar a repetir el procés donat que en un cicle de factors es millora la resposta però no s'assegura l'assoliment de l'òptim (MVD 88). Donat que aquest mètode d'optimització requereix un nombre molt elevat d'experiments en la major part d'aplicacions analítiques i que l'evolució dels valors no permet saber la direcció de l'òptim, la seva utilització és poc recomanable.

Per tal que els experiments realitzats evolucionin cap a l'òptim, s'han desenvolupat mètodes d'optimització mitjançant operacions evolutives (EVOP) que consisteixen en ajustar en una petita regió experimental un model de resposta simple que proporcionï una direcció (recta de màxim pendent en el cas de dos factors) encaminada cap al punt òptim. Seguint aquesta direcció s'han d'aplicar un altre cop els dissenys experimentals en la nova petita regió fins arribar a l'òptim.

En aquest mètode s'utilitzen dissenys factorials de k factors (variables experimentals) per obtenir el punt per ajustar el model. Per tant es requereixen 2^k experiments per cada petita regió i entre 2^{k-1} i $2^k - 1$ nous experiments per avançar cap el següent punt (MVD 88), la qual cosa fa que el seu ús quedi restringit a un nombre de factors baix. Si es vol aplicar aquest mètode per $k > 3$ es poden utilitzar dissenys factorials fraccionaris amb un punt central repetit r cops ($2^{k-1} + r$ experiments en cada disseny factorial), avançar en la direcció del màxim ascens fins a obtenir el millor punt de la direcció i repetir el disseny factorial entorn a aquest nou punt. Tot i que d'aquesta manera s'estalvien experiments, el seu número encara és força elevat (CMD 81).

El mètode seqüencial SIMPLEX és una alternativa als EVOP amb disseny factorial i està basat en realitzar el mínim número d'experiments per ajustar un model de primer ordre amb k factors (resposta com a combinació lineal dels k factors), és a dir $k+1$, que formen el SIMPLEX inicial.

Cada experiment es pot representar com un punt (vèrtex del SIMPLEX) X_i que té com a coordenades les variables escollides per l'optimització.

L'elecció del SIMPLEX inicial es realitza a partir d'un punt central (X_0). Tot i que l'avanç del SIMPLEX no depèn de la uniformitat del SIMPLEX inicial s'acostuma a agafar un SIMPLEX uniforme (triangle equilàter per $k=2$, tetràedre per $k=3$, etc). Un paràmetre fonamental pel correcte avanç del SIMPLEX és la longitud dels costats del SIMPLEX inicial, que ve donada pel quocient entre l'interval de les variables físiques del domini experimental (ΔX) i el número d'unitats en què es divideix aquest interval (e).

Si aquest quocient és molt petit caldrà realitzar un nombre d'experiments important, donat que l'avanç en cada pas serà curt, mentre que si és molt gran el mètode d'avanç oscil·larà prop de l'òptim i per tant, cal trobar una solució de compromís.

L'evolució de procés d'optimització pels factors utilitzats en l'apartat experimental apareix a la figura 3.1.

A partir dels $k + 1$ experiments que formen el SIMPLEX inicial, n'hi ha un que és el que dona la pitjor resposta (X_p). La resta de vèrtexs retinguts (X_1, X_2, X_3 en la figura) permet calcular el centroide (X_c)

$$X_c = (\sum_{k+1} X_i) - X_p \quad (3.1)$$

A partir de X_c es pot calcular un nou vèrtex a provar (X_N) que substituirà el pitjor vector per formar un nou SIMPLEX (format per X_1, X_2, X_3 i X_N en la figura). L'algorisme que es segueix per trobar aquest nou vèrtex és:

$$X_N = X_c + \alpha (X_c - X_p) \quad (3.2)$$

El terme entre parèntesi marca la direcció d'avanç cap a l'òptim. Observi's que, a diferència dels mètodes EVOP de disseny factorial, solament cal un nou experiment per avançar cap al nou SIMPLEX.

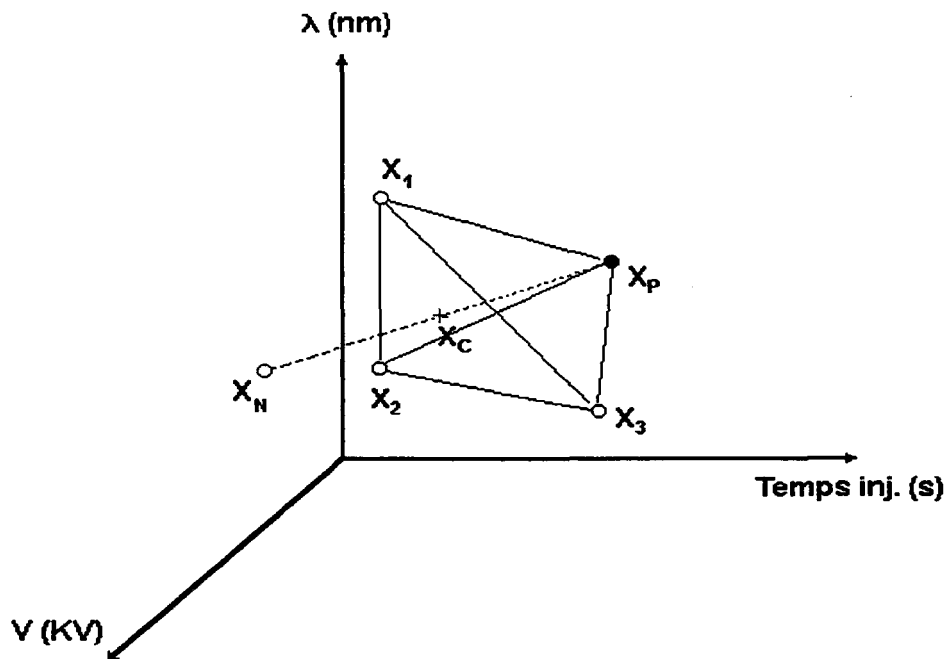


Figura 3.1. Evolució de l'optimització SIMPLEX per tres factors (condicions d'anàlisi en electroforesi capil.lar).

Normalment, el valor d' α és 1, tot i que se li poden donar altres valors per tal de contraure o expandir el SIMPLEX segons la situació de les respostes, donant lloc al mètode SIMPLEX modificat (MVD 88)(TAB 89a). Si es disminueix el valor d' α prop de l'òptim es pot evitar l'oscil.lació.

Quan s'arriba a un nou valor de X que dona la pitjor resposta, es rebutja el segon pitjor valor i es guarda el pitjor valor per rebutjar-lo en el proper càlcul. El procés d'optimització arriba a la zona òptima quan en dos o més moviments successius no hi ha millora en la resposta o bé s'aconsegueix el grau de precisió de les variables desitjat.

Un cop s'ha arribat a aquesta zona es pot reduir el valor d' α , realitzar un disseny en aquesta zona que localitzi l'òptim amb major precisió i expliqui el comportament del sistema prop de la zona òptima, o bé donar per acabat el procés d'optimització.

Aquest mètode d'optimització s'ha aplicat molt en el camp de la Química Analítica resolutive (principalment HPLC) (DEP 78)(DEM 83)(TAB 89b) i destaca per la seva facilitat d'operació, la seva capacitat d'autodireccionament

a l'òptim i el relativament baix nombre d'experiments que cal realitzar per l'optimització. D'altra banda, el principal inconvenient dels mètodes EVOP és que no asseguren un òptim global, a no ser que es conegui que aquest es troba a la regió de treball.

Malgrat tot, el mètode SIMPLEX no permet fer-se una idea de com afecta cada factor a la variable a optimitzar, donat que es canvien totes les variables al mateix temps, ni informa de quines són més significatives que altres.

3.1.2. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA

Una superfície de resposta és una expressió matemàtica obtinguda empíricament que dona la resposta d'un sistema en funció de les variables del sistema (factors). Per ajustar una superfície de resposta a unes dades cal utilitzar un disseny experimental en consonància amb un model matemàtic addient.

Com a millors models matemàtics s'utilitzen polinomis sencers de segon ordre que, per k factors, donen lloc a $(k+1)(k+2)/2$ coeficients de regressió a determinar. Així, pel cas de dos factors ($k=2$) s'obtenen 6 paràmetres ($p=6$) que donen lloc al model :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (3.3)$$

que és l'utilitzat en aquest capítol.

Per tal de poder avaluar estadísticament la significància global de la regressió cal que el número de condicions experimentals diferents (combinacions dels factors, f) sigui superior al de paràmetres d'ajust (p). D'altra banda, cada combinació de factors s'ha de replicar un nombre adequat de cops per obtenir finalment un nombre de punts (n) que permeti l'ajust estadístic correcte (DEM 83).

Entre els dissenys més utilitzats, i que compleixen aquestes característiques, estan els de "composite" central que consisteixen en una combinació de disseny de dos factors (DEM 83)(MVD 88). En el cas genèric de k factors es necessita un valor de $f = 2^k + 2k + 1$, per tant el número de

factors no ha de ser molt elevat si es vol realitzar l'optimització amb pocs experiments. En la figura 3.2. apareix un exemple del disseny de "composite" central per dos factors (longitud d'ona i voltatge) que s'utilitzarà en l'apartat experimental ($f=9$ per $k=2$).

Per avaluar la bondat de l'ajust dels resultats al model s'utilitza la distribució F, s'agafa com hipòtesi nul.la que l'explicació del model no és significativa i aquesta hipòtesi es rebutja si es compleix:

$$F_{\text{cal}} = (\text{SC}_{\text{EXP}} / (p - 1)) / (\text{SC}_R / (n - p)) > F_{(p-1, n-p, \alpha)} \quad (3.4)$$

sent SC_{EXP} la suma dels quadrats de les diferències entre els valors modelats i el valor de Y promig (expressió (2.2)), SC_R la suma dels quadrats de les diferències entre els valors experimentals i els valors modelats (expressió (2.3)) i α el nivell de significació (MVD 88)(DEM 83).

Si el model és globalment bo, es pot avaluar estadísticament la significància de cada un dels coeficients de regressió i de la desviació estàndard (s_{b_i}) utilitzant la distribució t-Student. Si es postula com a hipòtesi nul.la que $b_i=0$, aquesta hipòtesi serà rebutjada si:

$$(b_i - 0) / s_{b_i} > t_{(n-p, \alpha)} \quad (3.5)$$

Un cop s'ha determinat quins paràmetres són significatius i quins són nuls estadísticament, es proven models més senzills que l'exposat en (3.3) fins que tots els paràmetres siguin significatius. La metodologia més senzilla consisteix en partir de models de primer ordre amb les variables que s'han trobat significatives (combinació lineal dels factors), fer la regressió i comparar els paràmetres estadístics de la regressió amb els obtinguts amb un model amb més paràmetres.

Així, si es parteix d'un model senzill de p paràmetres i s'amplia a t paràmetres, per tal de saber si hi ha un guany significatiu de l'ajust del model es formula com a hipòtesi nul.la que l'ampliació no és significativa i aquesta hipòtesi s'accepta si:

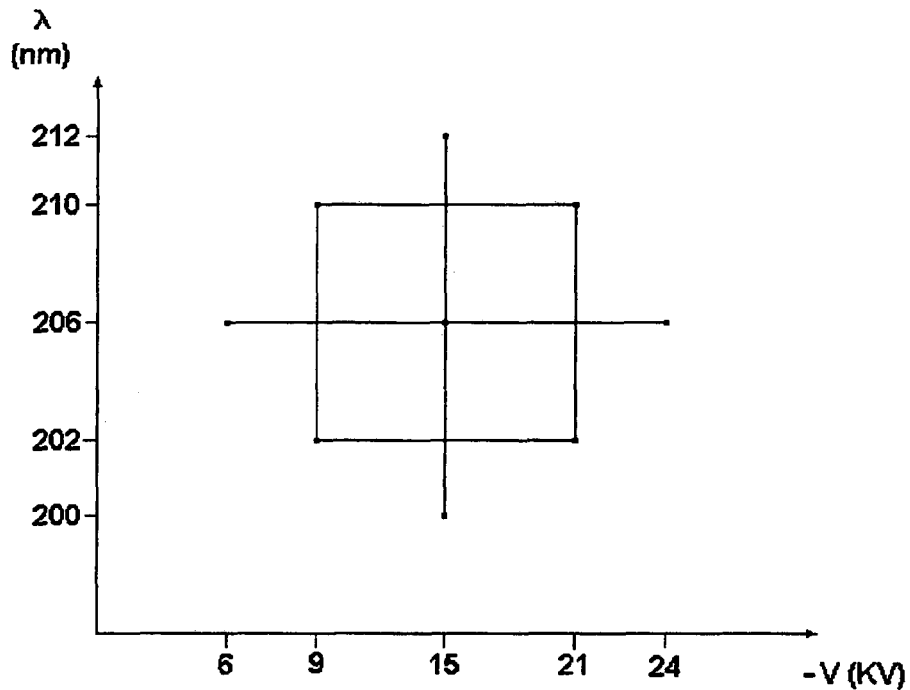


Figura 3.2. Disseny experimental del "composite" central aplicat a l'ajust d'una superfície de resposta de les condicions d'anàlisi en electroforesi capil.lar.

$$(SCR_p - SCR_t) / (t - p) / SCR_t / (n - t) < F_{(t-p, n-t, \alpha)} \quad (3.6)$$

Realitzant el mateix estudi per altres models amb més i menys paràmetres s'arriba finalment a un model en el que tots els paràmetres d'ajust són significatius. A partir d'aquests paràmetres d'ajust és possible veure com es comporta el sistema i establir una zona òptima. Els valors de F_{cal} , b_i , s_{bi} es poden obtenir realitzant la regressió mitjançant un programari adequat.

Dins del camp de la Química Analítica s'ha utilitzat l'ajust de superfícies de resposta per tal d'optimitzar separacions en HPLC (BER 86)(MVD 88) i en HPCE (BMS 95)(JHD 93)(LI 93) ja sigui utilitzant el disseny del "composite" central o altres similars.

3.1.3. APLICACIÓ A ELECTROFORESI CAPIL·LAR

En l'anàlisi mitjançant electroforesi capil·lar, el principal paràmetre analític que resulta interessant optimitzar és el límit de detecció de cada compost, donat que a la introducció s'ha vist que en les anàlisi de cianurs es necessita una sensibilitat considerable. Com que els límits de detecció venen donats per la relació altura de pic/ soroll, aquesta és la variable que s'ha escollit per optimitzar.

L'elecció d'una única variable a optimitzar simplifica el problema, però pot fer variar altres paràmetres de qualitat. Per tal d'evitar aquest fet, en els mètodes d'optimització escollits s'han de poder introduir restriccions de la resta de paràmetres de qualitat per tal d'assegurar que l'anàlisi es realitza de manera correcta.

El nombre de factors que es considerarà en aquests experiments serà de 2 ó 3 (voltatge, longitud d'ona i temps d'injecció) tot i que ja s'ha vist que altres factors, com el tipus i la composició del tampó i de la mostra, també són importants. En el procés d'optimització, per tant, l'estudi es centrarà en aquestes 3 variables i es provaran diferents dissolucions per tal d'assolir l'òptim desitjat.

A part de l'estudi dels límits de detecció, també resultaria interessant optimitzar altres paràmetres analítics com la resolució entre pics o l'eficàcia per tal d'establir un camp d'aplicació que compleixi amb les restriccions. El disseny mitjançant superfícies de resposta permet aprofitar tota la informació de les anàlisis efectuades per realitzar diferents estudis d'optimització (LOD, N, R_s) fet que no permet el mètode SIMPLEX, on s'ha de realitzar un SIMPLEX diferent per cada paràmetre a optimitzar.

A part dels exemples d'aquest capítol, al llarg de la memòria (capítols 5 i 7) s'han desenvolupat altres casos que mostren la utilitat d'aquestes tècniques d'optimització dins del camp de l'electroforesi capil·lar.

3.2. PART EXPERIMENTAL

3.2.1. PATRONS I DISSOLUCIONS

Els reactius Na_2HPO_4 , NaHCO_3 , NaOH , TTAB, NaCN i els ciano-complexos $\text{KAu}(\text{CN})_2$, $\text{KAg}(\text{CN})_2$, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CuCN , $\text{Na}_2\text{Ni}(\text{CN})_4$ i KSCN es van obtenir de les mateixes cases comercials que en el capítol 2.

Els patrons dels ciano-complexos metàl·lics es van dissoldre en 1000 ppm de NaCN ajustat a $\text{pH}=10.5$ amb NaOH . Totes les dissolucions reguladores es van filtrar amb filtres de $0.45 \mu\text{m}$ (Gelman Sciences, Ann Arbor, USA) abans de la seva utilització. Les dissolucions es van preparar en aigua desionitzada mitjançant un sistema purificador d'aigua Millipore Milli-Q.

3.2.2. INSTRUMENTACIÓ

Es va utilitzar un aparell d'electroforesi capil·lar ISCO de les mateixes característiques que en el capítol 2 operant amb injecció per buit i voltatge constant. En els experiments SIMPLEX el capil·lar utilitzat feia 60 cm de longitud total i 33 cm de longitud de detecció mentre que en els de superfícies de resposta les mides van ser 50 cm de longitud total i 30 cm de longitud de detecció

Els senyals de detecció de l'aparell d'electroforesi van ésser integrats utilitzant un integrador Spectra-Physics SP-4270 (San José, CA, USA) o el programari de la Varian Star Workstation (Sugar Land, TX, USA).

Les mesures de les conductivitats es van realitzar en una cel·la conductimètrica connectada a un conductímetre CRISON 525 (Alella, Espanya). Les dades experimentals van ser tractades amb els programes EXCEL™ i MATLAB™ per Windows (Math Works Inc.) de Microsoft™.

El SIMPLEX inicial i les noves condicions SIMPLEX donades per les expressions (3.1) i (3.2) es van calcular amb un programa BASIC similar al publicat per altres autors (TAB 89b) utilitzant un valor d' $\epsilon=10$ i intervals de les variables λ , V i t_{inj} entre 190 i 220 nm, -0.7 i -30.7 KV i 1 i 301 s, respectivament.

3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.3.1. OPTIMITZACIÓ SIMPLEX

En els experiments d'optimització pel mètode SIMPLEX es van estudiar l'elecció de diferents paràmetres a optimitzar (altura del pic, relació altura/soroll) i de l'adopció o no de restriccions sobre els valors òptims escollint com a factors la longitud d'ona, el voltatge i el temps d'injecció. L'estudi es va centrar en els ciano-complexos d'Au i Ag donat que són els que presenten una absortivitat més baixa (figura 2.7.) i els més interessants en l'estudi de la lixiviació de minerals, que es desenvolupa en el capítol 4. En aquests estudis s'han utilitzat tampons de fosfats i de carbonats, i mostres diferents per constatar que el comportament dels pics no depèn d'aquests factors.

3.3.1.1. Optimització no restringida de l'altura de pic

En aquest experiment es va escollir l'altura d'un pic d'una mostra de 20 ppm d'or en forma de ciano-complexe com a paràmetre a optimitzar mitjançant el mètode SIMPLEX i no es va establir cap restricció sobre la resta de paràmetres analítics. El tampó que es va utilitzar va ser una dissolució 50mM de Na_2HPO_4 i 50 μM de TTAB a pH=11 i els resultats, promig de dues mesures, apareixen a la taula III.1.

Els 4 primers conjunts de valors formen el SIMPLEX inicial i es pot observar com l'augment del temps d'injecció i el valor absolut del voltage milloren progressivament l'altura del pic cap a valors cada cop més grans. A l'experiment 9 el voltage va ser el màxim que podia donar l'aparell i, a partir de llavors, es va mantenir fins l'experiment final. En les últimes condicions el corrent que circulava es va tallar després d'uns segons de funcionament de l'aparell.

Experiment	V (KV)	t _{ini} (s)	λ (nm)	h (Au)	Rebuig
1	-25.0	15	210	1509	
2	-27.8	22	211	1999	
3	-25.7	43	211	3396	
4	-25.7	22	213	1568	
5	-27.8	43	213	3072	1
6	-28.5	50	210	4797	4, α=2
7	-29.9	64	209	6737	2
8	-27.8	78	211	6470	6
9	-30.7	80	211	7138	3
10	-30.7	105	208	11665	5
11	-30.7	88	208	9231	8
12	-30.7	118	209	13659	7, α=2
13	-30.7	145	209	-	Corrent es talla

Taula III.1 Optimització SIMPLEX de l'altura del pic de cianur d'or sense restriccions.

Per estudiar la resposta de les condicions properes a aquest punt es va tornar a repetir el SIMPLEX a partir de l'experiment 9 al 12 utilitzant $\alpha=0.33$ i es va comprovar que entre 118 i 137 s de temps d'injecció no es tallava el corrent i la longitud d'ona es dirigia cap a valors per sota de 207 nm.

L'augment de l'altura amb el temps d'injecció corrobora els resultats del capítol 2, i l'augment d'altura amb el voltatge es deu a que la dispersió dels pics és menor si el temps de detecció és baix. Tot i així, si el voltatge és excessiu pot provocar un soroll elevat que restaria altura al pic (DYS 91).

El tall de corrent es pot deure a què, durant la concentració per efecte "stacking" es crea un camp elèctric en la zona de la mostra que supera el de la resta del tampó i provoca un escalfament per efecte Joule que pot superar les condicions crítiques exposades a la secció 1.5 (GOI 90).

L' elevada longitud de la mostra introduïda al capil·lar durant l'injecció i el voltatge elevat afavoririen aquest efecte, ja que en la resta d'experiments, on no s'operava sota aquestes condicions, aquest fenomen no va succeir.

Realitzant el mateix experiment amb una dissolució de 5 ppm d'Au en forma de $\text{KAu}(\text{CN})_2$, 10 ppm de $\text{KAg}(\text{CN})_2$, 10 ppm de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i 10 ppm de KSCN , però utilitzant un tampó 50 mM de NaHCO_3 i $25\mu\text{M}$ de TTAB , es va partir de -25 KV, 60 s i 210nm i es va arribar a -30.7 KV, 184 s i 203nm, millorant l'altura 4.4 cops en 9 experiments i mostrant una tendència similar al cas anterior. El fet de que en aquests cas no es tallés el corrent pot ser degut a la major conductivitat la mostra, que provoca un camp elèctric inferior en la zona de la mostra.

3.3.1.2. Optimització restringida de l'altura de pic

Cal tenir en compte que l'elecció de les condicions que fan òptima l'altura de pic poden donar lloc a valors de temps d'anàlisi, N i R_s superiors als marcats com a restriccions a la taula 1.1 (temps d'anàlisi inferior a 15-20 minuts, resolució mínima entre pics de 1.5 i una eficàcia mínima dels pics de 10000).

Per tal que aquests valors es complissin es va assignar la pitjor resposta al conjunt de variables experimentals que infringien una o més d'una d'aquestes restriccions, i es va seguir el SIMPLEX utilitzant el pitjor segon conjunt de variables experimentals. En aquesta experiència d'optimització es va utilitzar el mateix tampó i la mateixa mostra de cianurs que en l'anterior apartat.

Al llarg de l'experiment es va veure com l'altura dels pics de $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ i $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ va anar creixent paral·lelament i progressiva mentre augmentava el temps d'injecció i com finalment l'eficàcia del pic de $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$ queia per sota del valor fixat a les restriccions. La resolució, l'eficàcia del pic de $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ i el temps d'anàlisi sempre van quedar dins dels valors permesos per les restriccions.

La finalització del procés d'optimització SIMPLEX es va donar quan es van obtenir més de dos pitjors respostes consecutives i quan la variació de les variables entre experiments va ser de l'ordre d'un nm, 1 KV i 10 s o menors.

Els valors del SIMPLEX final es van repetir al dia següent i es va obtenir que els valors experimentals 8 i 15 donaven una eficàcia del cianur de plata inferior a 10000. Escollint com a variables -25 KV, 100 s i 210 nm es va constatar que l'eficàcia del pic era superior a 10000, fet que novament indica que el temps d'injecció es veu limitat a uns 100 s. Al llarg de l'experiment es va constatar com el soroll podia variar considerablement tot i operar en condicions similars.

3.3.1.3. Optimització de la relació altura/soroll amb restriccions.

A la taula III.2 es recullen els resultats de realitzar l'optimització SIMPLEX de la relació altura/soroll utilitzant un tampó 50 mM Na_2HPO_4 i 25 μM deTTAB. En aquest cas, per cada condició es va realitzar una única mesura de l'altura i del soroll. El soroll es va mesurar a partir de 10 mesures de l'amplada de pic a pic del senyal de fons a intervals de 20-30 segons durant 2-3 minuts, dins del mateix assaig i un cop ja s'havien detectat els pics d'Au i Ag, operant amb un temps de pujada (RT) de 0.8 segons (DYS 91)(POS 84).

Els vectors 14, 15, 16, 19 es van tornar a verificar i es va trobar que les condicions 16 donaven una relació altura/soroll de 488 i que en l'experiment va fallar la resolució de l'Ag. Això mostra que les condicions no són altament reproduïbles (principalment per culpa del soroll variable, que és depenent del temps) i per tant les condicions òptimes no queden ben determinades.

Realitzant un estudi de la relació altura/soroll entre 200 i 207 a -12 KV es va veure que el millor senyal s'obtenia a uns 200 nm i la millor relació altura/soroll a uns 204 nm.

A grans trets, doncs, es veu que augmentar el temps d'injecció millora el senyal fins que l'eficàcia del pic de cianur de Ag no compleix les restriccions. L'augment de voltatge augmenta el soroll i per tant, de manera diferent als altres SIMPLEX realitzats, el voltatge es limita a un valor intermedi. Longituds d'ona més properes a 200 nm també milloren l'altura del pic, però no semblen influir en el soroll. L'evolució del pic de cianur d'argent va ser similar.

Exp.	V (KV)	t _{ini} (s)	λ (nm)	h (Au) (comptes)	Soroll (mm)	h /soroll Au (comp./mm)	Rebuig
1	-15.0	30	210	1633	14	117	
2	-17.8	37	211	2054	17	121	
3	-15.7	58	211	3068	15	204	
4	-15.7	37	213	1559	14	111	
5	-16.6	46	208	3173	20	159	4
6	-18.4	64	210	3496	27	129	1
7	-16.0	75	208	5101	13	392	2
8	-13.8	55	208	3611	13	278	6
9	-13.7	79	210	4733	14	338	5
10	-13.3	81	206	6160	13	474	3
11	-11.2	68	208	4354	12	363	8
12	-11.7	97	208	5994	12	499	7
13	-10.4	85	205	6222	11	566	9
14	-12.4	107	205	7488	11	681	11
15	-11.8	125	204	8181	12	682	10, N _{Ag} <10000
16	-11.4	114	201	11018	12	918	12
17	-11.0	79	203	6995	10	700	15
18	-12.8	115	201	10863	20	543	13
19	-13.4	145	202	10429	15	695	N _{Ag} <10000

Taula III.3. Optimització SIMPLEX de la relació h/soroll del pic de cianur d'or restringint , N, R_s i el temps d'anàlisi.

En aquest procés d'optimització s'ha provat un sol tipus de dissolució reguladora. L'obtenció de les condicions òptimes podria dependre de la dissolució utilitzada i, per tant, cal provar diferents dissolucions per tal d'assolir condicions de treball en la zona òptima.

Com a conclusió, el mètode SIMPLEX permet averiguar que l'altura del pic de cianur d'or creix amb el temps d'injecció i el valor absolut del voltatge i que la relació altura/soroll del mateix pic és òptima a valors de voltatge intermedis (-12 KV), valors de temps d'injecció elevats (preferentment per sota de 100 segons) i longituds d'ona entre 200 i 204 nm. Aquests últims paràmetres són concordants amb els resultats del capítol 2.

3.3.2. SUPERFÍCIES DE RESPOSTA

En els experiments de superfícies de resposta s'ha simplificat el nombre de factors a 2, escollint aquells que més influeixen en l'optimització.

A la taula I.2. del primer capítol es mostra com V i λ són el principals factors que influeixen en el soroll i l'altura dels pics i per tant aquests factors s'han escollit per tal d'optimitzar els LOD del cianur d'or. Donat que s'ha mostrat que l'augment del temps d'injecció influeix en el creixement de l'altura dels pics i no influeix en el soroll, s'ha fixat el seu valor en els experiments d'optimització dels LOD.

A la mateixa taula I.2. apareixen el voltatge i el temps d'injecció com a principals factors que influeixen sobre el temps de detecció i l'amplada dels pics i, per tant, sobre N i R_s (la longitud d'ona no té cap influència sobre la separació).

En tots els casos, l'estudi de diferents tampons resulta fonamental des del punt de vista dels efectes estudiats en el capítol 2 i, per tant, cal provar-ne un nombre considerable. Les característiques de la mostra es consideren una restricció d'entrada i, per tant, no són objecte d'optimització. S'han escollit mostres sintètiques similars a les que s'espera trobar en l'anàlisi de lixiviats de minerals d'or.

3.3.2.1. Tampons utilitzats

Es van provar tampons de diferents composicions per tal d'esbrinar quin efecte tenien sobre el soroll i sobre les altures dels pics, concretament sobre el de $\text{Au}(\text{CN})_2^-$. A la taula III.3. apareix un recull dels tipus de tampons que es van assajar.

El fet de què s'hagi d'operar a $\text{pH} \geq 10.5$ limita els tipus de tampons. Així, en primer terme es van provar els tampons A i B de les mateixes característiques però amb la diferència de que un era a base de Na_2CO_3 (BC) i l'altre a base de Na_2HPO_4 (BF). Davant de la sospita que una concentració elevada (50 mM) de tampó donaria un soroll elevat es va provar un tampó C de conductivitat similar a A i B però amb menys Na_2HPO_4 , que es va substituir per NaCl. El NaCl s'ha utilitzat àmpliament en electroforesi per ajustar la força iònica sense cap efecte advers (PED 74).

Els tampons D, E i F tenen una conductivitat major que els A,B,C, per tal de veure si un augment de la conductivitat aplicada a l'anàlisi de la mateixa mostra augmenta l'altura del pic per l'efecte "stacking". En aquest grup es va poder realitzar un estudi del canvi de pH utilitzant tampons amb una concentració elevada de NaCl.

Els tampons G i H tenen la particularitat de que incorporen NaCN en el medi. Alguns autors (BST 93)(BUH 94) han demostrat que l'addició de NaCN al tampó facilita l'anàlisi dels ciano-complexos evitant que aquèsts donin pics deformats i massa amples. En aquest cas s'han utilitzat dues concentracions de NaCN i concentracions intermèdies de fosfats.

3.3.2.2. Estudi del soroll

L'estudi del soroll es va realitzar mesurant l'amplada de pic a pic durant 2-3 minuts en les mateixes condicions que l'apartat anterior.

Tampó	Base	TTAB (μM)	NaCl (mM)	pH	Conduct (mS/cm)	Altres
A	BC 50 mM	20	0	11	7.2	
B	BF 50 mM	20	0	11	7.1	
C	BF 20 mM	25	36	11	6.5	
D	BF 20 mM	25	100	11	11.8	
E	BF 20 mM	100	75	12	10.4	
F	BC 20 mM	25	100	10.6	11.8	
G	BF 25 mM	25	0	11	4.1	1 mM NaCN
H	BF 30 mM	25	0	11	5.1	5 mM NaCN
Mostra	NaOH	0	0	11	2.3	20 mM NaCN

Taula III.3 Propietats dels tampons utilitzats en l'estudi de les superfícies de resposta.

Realitzant 2 rèpliques per cada punt i 5 rèpliques pel punt central de la superfície de resposta, es va constatar que les mesures de soroll no eren reproduïbles sota les mateixes condicions d'anàlisi i donaven lloc a una elevada dispersió de valors. Aquest mateix comportament es va observar per cadascun dels 8 tampons.

Donat que no es va poder expressar amb un valor satisfactori el soroll per unes condicions concretes, es va optar per agrupar les mesures obtingudes en nivells de soroll tal i com expressa la Taula III.4.

Aquests nivells s'han escollit de tal manera que el pas d'un nivell a l'immediatament superior suposi una duplicació de l'interval en el què es pot trobar el soroll i per tant marqui una diferència accentuada. Escollint aquesta classificació no es pot realitzar l'ajust de superfícies de resposta, però sí que es pot tabular el soroll pels diferents tampons i per l'aigua en les condicions de voltatge i longitud d'ona de la superfície de resposta tal i com es mostra a la taula III.5.

Nivell de soroll	Interval (mm AT=1)
1	10-20
2	20-40
3	40-80
4	80-160
5	160-320
6	>320

Taula III.4 Nivells de soroll establerts en l'estudi de les superfícies de resposta.

V (KV)	λ (nm)	A	B	C	D	E	F	G	H	Aigua
-6	206	3	2	2	2	3	3	3	2	2
-9	202	2	3	2	2	3	3	2	2	1
-9	210	2	3	3	3	4	3	3	2	1
-15	200	2	3	2	3	5	4	3	3	2
-15	206	3	3	2	2	4	4	2	3	2
-15	212	3	2	2	3	4	4	2	3	2
-21	202	4	4	3	3	6	6	3	4	2
-21	210	3	3	2	3	4	6	2	3	2
-24	206	4	4	3	3	5	6	4	4	2

Taula III.5. Nivells de soroll mesurats per diferents tampons i condicions escollides en els estudis de superfícies de resposta.

Es pot comprovar com el voltatge fa augmentar de manera important el soroll per cadascun dels tampons mentre que la longitud d'ona no té un efecte clarament definit.

Per veure si l'absorbància de cada tampó influeix en el soroll, tal i com estableixen alguns autors (WAH 92), i permet explicar els resultats de la taula III.5. es va realitzar l'espectre UV de tots els tampons tal i com mostra la figura 3.3.

Es pot constatar com efectivament els tampons que exhibeixen un nivell de soroll més elevat mostren uns espectres amb una absorbància major. El NaCl ha mostrat ser efectiu en la reducció de l'absorbància i els fosfats donen millors resultats que els carbonats. Els pH elevats (12) són negatius de cara a obtenir un soroll baix.

A partir de la taula III.5. i de la figura 3.3. s'obté que els tampons C, D i G es comporten millor de cara al soroll que la resta. Concluint, els tampons que absorbeixen poc i els voltages baixos afavoreixen el soroll baix, tal i com s'ha exposat en el capítol 1.

3.3.2.3. Superfície de resposta de l'altura del pic

L'estudi de la superfície de resposta de l'altura del pic de cianur d'or en funció del voltatge i de la longitud d'ona s'ha realitzat mitjançant el disseny experimental de la figura 3.2.

A la taula III.6. apareixen els resultats del promig de la mesura de les altures del pic d'Au per les nou condicions indicades en l'estudi de superfícies de resposta i pels vuit tampons estudiats injectant durant 50 segons una dissolució de 5 ppm d'Au en forma de $\text{KAu}(\text{CN})_2$ i 10 ppm de $\text{KAg}(\text{CN})_2$. En la última fila apareix el valor de la RSD de les 5 rèpliques del punt central. Excepte pels tampons F i H, es pot observar que, a grans trets, les mesures de l'altura són reproduïbles i permeten aplicar la metodologia de les superfícies de resposta.

Els valors de les altures de pic són similars pels tampons A-F mentre que en els tampons G i H s'observa un augment d'aquest paràmetre que pot ser degut al fet d'haver afegit NaCN al tampó.

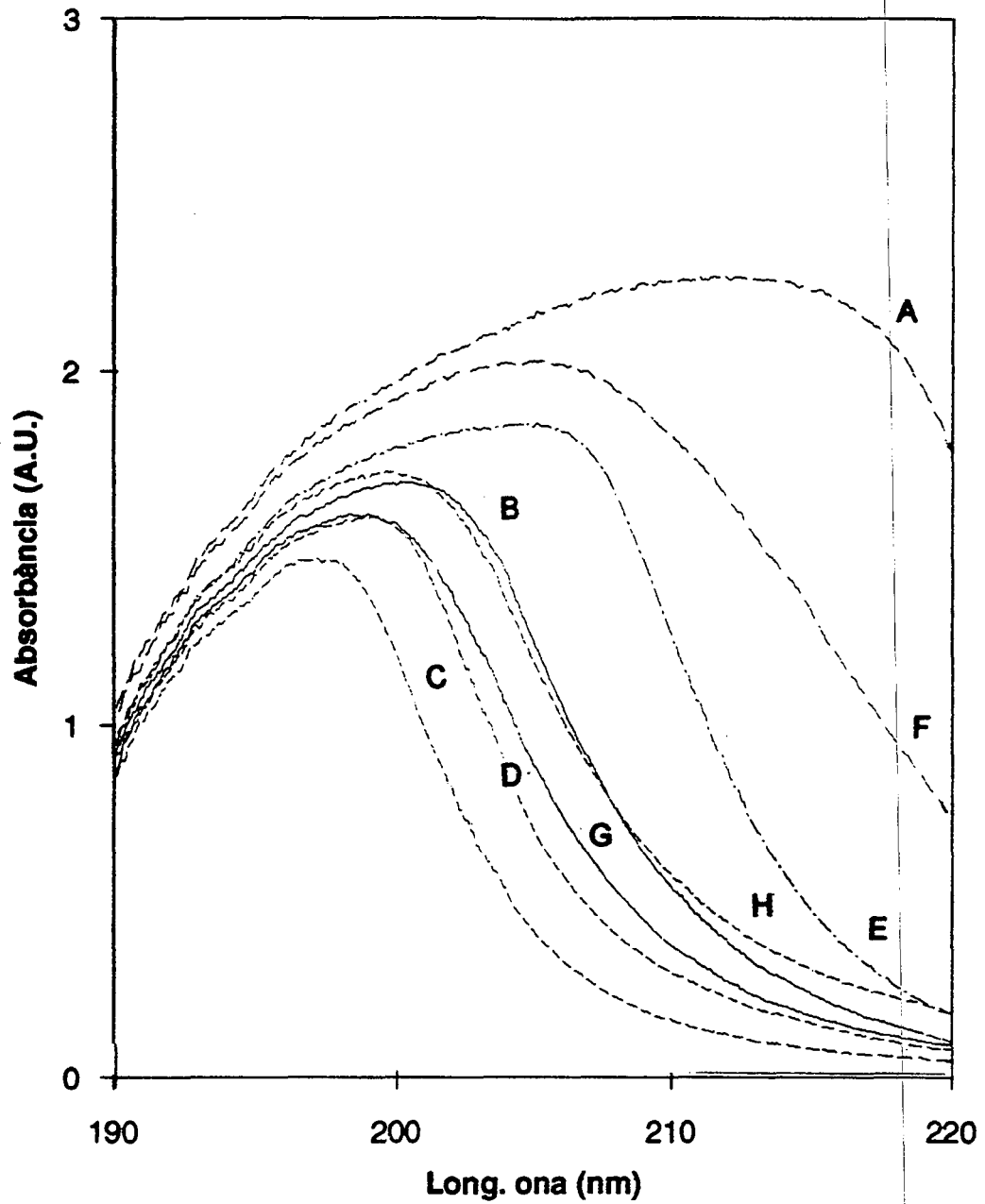


Figura 3.3. Espectres dels tampons utilitzats en l'optimització (veure lletres en text)

V (KV)	λ (nm)	A	B	C	D	E	F	G	H
-15	212	1965	2161	2327	2123	2304	2326	3539	3690
-9	210	2565	2903	2349	2655	2044	2268	3324	4181
-21	210	2529	3375	3054	2357	2810	2812	4391	3009
-6	206	2696	2643	2809	2570	2407	2219	3499	4141
-24	206	3237	3900	3431	2951	2701	3593	5514	4385
-9	202	4181	3932	3384	2916	3061	3439	4436	5457
-21	202	3394	4234	4168	3264	3741	2579	5594	5564
-15	200	3196	3666	4357	3559	3692	4168	5116	6323
-15	206	3577	3456	3477	3423	3258	3138	4303	5863
RSD	(%)	5.6	6.6	5.7	2.6	4.6	15.6	6.7	14.4

Taula III.6. Altures de pic de $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ mesurades per diferents tampons i condicions en els estudis de superfícies de resposta.

Tampó	V	λ	V^2	λ^2	$V\lambda$	Indep	F	h_{Au} (-15, 206)	Valor òptim (V, λ)
A	-	6360	-	-15.75	-	-63860	23.97	3273	(V, < 200)
B	-47.31	-129.3	-	-	-	29330	22.64	3400	(-30, < 200)
C	-160.8	-152.6	-3.757	-	-	33270	104.6	3403	(-21, < 200)
D	-1655	7019	-8.522	-17.03	6.734	-722000	28.08	3414	(-17, 203)
E	-252.1	-118.6	-7.170	-	-	25412	45.13	3152	(-17, < 200)
F	-61.23	-76.06	-	-	-	17580	7.980	2830	(-30, < 200)
G	-98.00	-145.0	-	-	-	32810	122.3	4408	(-30, < 200)
H	-611.8	9480	-20.17	-23.50	-	-954300	20.13	5867	(-15, 202)

Taula III.7. Coeficients de regressió del model per la determinació de la superfície de resposta de l'altura del pic de cianur d'or per diferents tampons.

A partir de la regressió de les variables V , λ , V^2 , λ^2 i $V\lambda$ i utilitzant la metodologia exposada a la introducció, es van obtenir finalment els coeficients de les superfícies de resposta de l'altura del pic de cianur d'or que s'indiquen a la taula III.7. En tots els casos els valors de $F_{cal} > F_{crítica}$ (entre 3.4 per 3 paràmetres i 2.7 per 6 paràmetres) i tots els coeficients van ser significatius en provar els models mostrats. A la mateixa taula es pot veure com els ajusts són capaços de predir l'altura del punt central.

Les figures 3.4. i 3.5. mostren les superfícies teòriques de regressió que donen un millor ajust. En elles s'observa que l'altura millora cap a longituds d'ona de 200 nm i valors absoluts de voltatges intermedis-alts. Per tal d'aconseguir una relació altura-soroll elevada, però, és millor operar a voltatges baixos i longituds d'ona de 200 nm. No és convenient operar per sota de 200 nm donat que l'oxigen comença a absorbir i falseja la lectura.

El fet de que la detecció millori quan es va cap a 200 nm és concordant amb l'espectre del cianur d'or que apareix al capítol 2. La major part de ciano-complexos metàl·lics mostren màxims per aquesta zona i per tant aquestes longituds d'ona són idònies per optimitzar l'altura dels pics.

El fet que la major part de les superfícies s'assemblin a plànols permet utilitzar el mètode d'optimització basat en la variació d'un factor cada cop mantenint la resta constant i assolir el valor òptim amb un sol tanteig. En efecte, a les figures 3.4 i 3.5 es pot optimitzar l'altura seleccionant primer un valor de longitud d'ona tendint cap a 200 nm i més tard fixar l'altura més alta operant amb un voltatge alt en valor absolut. Realitzant l'optimització des de qualsevol punt s'arriba sempre a l'extrem inferior esquerre de la superfície

Per tal d'optimitzar la relació altura/soroll caldria escollir un voltatge intermedi d'uns -15 KV que ens permetria, conjuntament amb un temps d'injecció elevat, optimitzar els LOD pel cianur d'or.

El comportament de l'altura del pic de cianur d'or utilitzant superfícies de resposta és igual que en el SIMPLEX sense restriccions, excepte pel que fa a la longitud d'ona, que en el cas del SIMPLEX era major. En el cas de la relació altura/soroll també s'obtenen resultats similars fins i tot en la longitud d'ona, tant en el mètode SIMPLEX com en el de les superfícies de resposta, fet que verifica els resultats obtinguts per l'optimització dels LOD del cianur d'or.

3.3.2.4. Superfícies de resposta de l'eficàcia i resolució

L'eficàcia (N) i la resolució entre pics (R_s) de les anàlisis són paràmetres que també cal optimitzar a valors de $N > 10000$ i $R_s > 1.5$. Realitzant un muntatge experimental com el de la figura 3.2. però fixant la longitud d'ona a 200 nm i utilitzant 2, 5, 11, 17 i 20 segons de temps d'injecció i analitzant una mescla de cianurs de Fe, Cu, Ni i Au de 20 ppm de cada metall i 4 ppm de Ag amb el tampó C de la taula II.1 es van obtenir els resultats que apareixen a la taula III.8. Les regressions corresponents als pitjors valors de N i R_s d'entre els 5 pics analitzats, que són els valors que poden limitar la qualitat de les anàlisis.

A les figures 3.6 i 3.7 apareixen les superfícies de resposta que estan més a prop de les condicions crítiques de R_s i N . A grans trets, s'observa com cal operar a voltatges absoluts intermedis i en tots els casos cal un temps d'injecció el més baix possible per tal de mantenir els valors sota els límits establerts. Les dues figures tenen una simetria que també fa possible utilitzar el mètode d'optimització d'un factor cada cop optimitzant el temps d'injecció i el voltatge separatament.

De l'anàlisi de la resta de superfícies de resposta (de fet són corbes de regressió en funció del temps) s'extreu que a partir de 9-10 segons de temps d'injecció, la resolució i l'eficàcia cauen per sota dels valors crítics, per tant es conclou que el temps d'injecció és un paràmetre primordial per assolir bons valors d'eficàcia i resolució.

El fet de que el temps d'injecció sigui fonamental en els valors de N i R_s indica que els fenòmens de dispersió depenen del temps d'injecció, tot i que a voltatges absoluts baixos intervenen fenòmens de difusió que disminueixen l'eficàcia i a voltatges elevats dispersions de Taylor (veure apartat 1.5. del primer capítol) que també disminuirien aquests valors. La figura 3.6. solament és vàlida fins $t_{inj} = 20$ s (mímin de la superfície en forma de "cadira de montar"). Probablement, valors superiors de t_{inj} donarien pitjors valors que els mostrats.

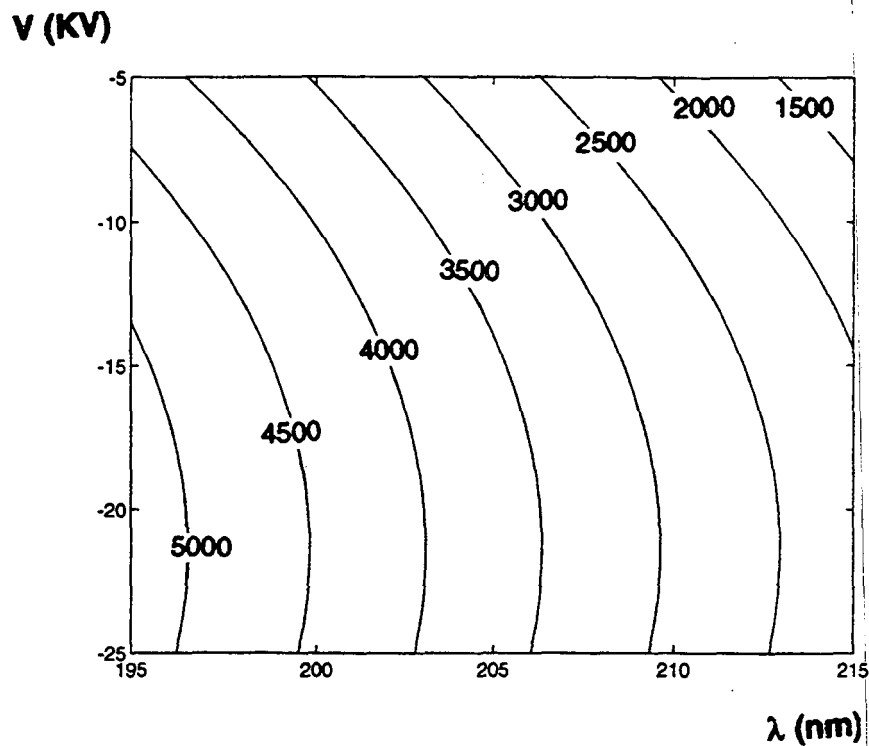


Figura 3.4. Superfície de resposta de l'altura del pic de cianur d'or pel tampó C.

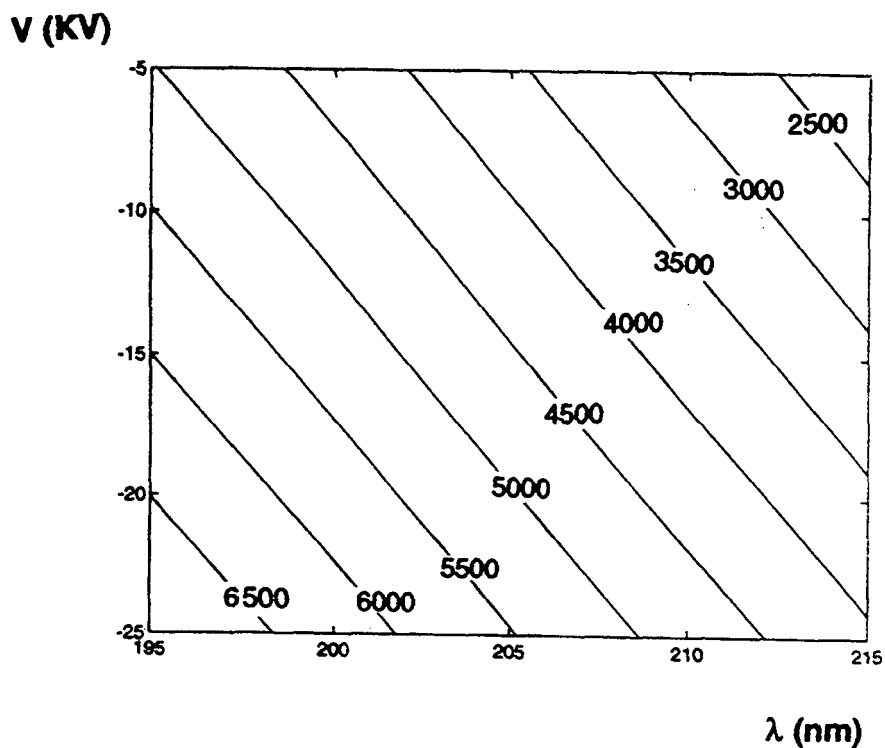


Figura 3.5. Superfície de resposta de l'altura del pic de cianur d'or pel tampó G.

Paràmetre	V	t _{inj}	V ²	t _{inj} ²	Indep.	F _{cal}	Valor central (11,-15)	Valor òptim (t _{inj} ,V)
N cianur Ni	-5048	-5640	-192.4	147.1	45790	58.75	45790	(min., -13)
N cianur Fe	-	-6269	-	204.7	53700	60.59	53700	(min., V)
R _s Cu-Ni	0.3872	0.08164	0.01656	-	1.9690	20.80	1.9690	(min., -12)
R _s Ni-Fe	-	-0.3031	-	0.009852	3.5010	38.66	3.5010	(min, V)

Taula III.8 Coeficients de regressió del model per la determinació de la superfície de resposta l'eficàcia i resolució entre pics.

3.3.3. CONCLUSIONS SOBRE LA METODOLOGIA D'ANÀLISI

Els resultats obtinguts tant en aquest capítol com en el capítol anterior permeten concloure que es pot establir una metodologia general per tal d'optimitzar la detecció, eficàcia i resolució de les anàlisis mitjançant CE.

Les superfícies de resposta han posat de manifest que es pot utilitzar el mètode d'optimització d'un factor cada cop quan s'opera amb voltatge, temps d'injecció i longitud d'ona i que en un sol cicle es poden assolir les condicions òptimes.

Voltatges intermedis-baixos (entre -9 i -15 KV) i temps d'injecció elevats permeten una relació altura/soroll òptima per la detecció del cianur d'or, situació que és extrapolable a altres cianurs. Longituds d'ona properes al màxim dels espectres del capítol 2 per cada cianur (generalment tendint cap a 200 nm) milloren el senyal.

Per tal de millorar l'eficàcia i la resolució dels pics i evitar els valors crítics establerts al primer capítol, s'aconsella operar a voltatges intermedis i seleccionar un temps d'injecció que permeti un bon senyal sense posar en compromís aquests paràmetres.

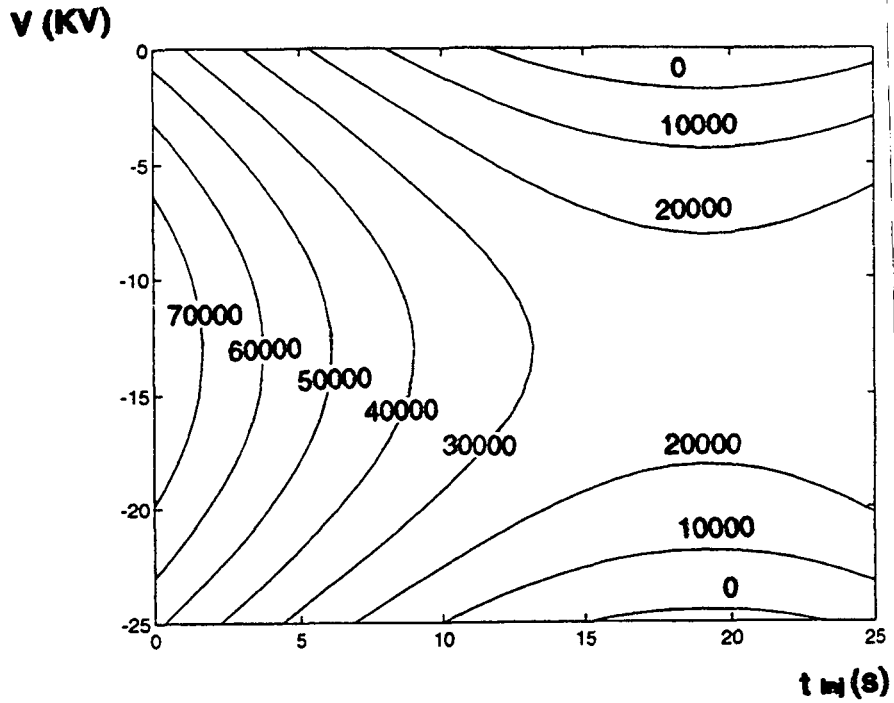


Figura 3.6. Superfície de resposta de l'eficàcia del pic de cianur de níquel

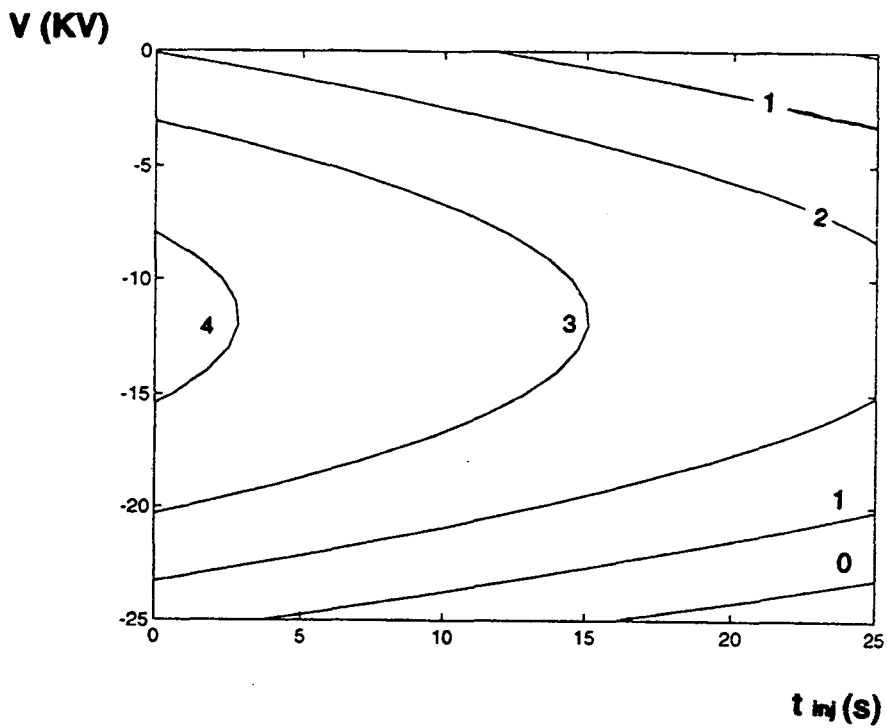


Figura 3.7. Superfície de resposta de la resolució entre els cianurs de Cu i Ni.

El tampó recomanat és el tipus C, que mostra una absorbància i un soroll inferior tot i que, com s'ha vist que el NaCN en els tampons G i H millora les característiques dels pics, caldria afegir al tampó tipus C una concentració entre 1mM i 5 mM. L'elecció de la concentració de TTAB depèn del tipus de tampó i ha de permetre anàlisis de cianurs entre 15 i 20 minuts i comprometre l'eficàcia ni la resolució dels pics.

3.4. REFERÈNCIES

- (BER 86) J. C. Berridge, *Anal. Chim. Acta*, 191 (1986) 243-259.
- (BMS 95) B. Baraj, M. Martínez, A. Sastre, M. Aguilar, *J. Chromatogr.* 695, (1995), 103-111.
- (BST 93) W. Buchberger, O. P. Semenova, A. R. Timerbaev, *J. High Resolut. Chromatogr.*, (1993), 16, 153-156
- (BUH 94) W. Buchberger, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, 687, (1994), 343-349.
- (CMD 81) J. Costa, J. Mata, F. J. Domingo, *Ingeniería Química*, (Oct. 1981), 337-341.
- (DEM 83) S. N. Deming, S. L. Morgan, *Anal. Chim. Acta* 150 (1983), 183-189.
- (DEP 78) S. N. Deming, L. R. Parker, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 7 (1978), 187-202.
- (DYS 91) N. Dyson, "Chromatographic Integration Methods", Royal Society of Chemistry, Letchworth, 1991.
- (GOI 90) W. A. Gobie, C. F. Ivory, *J. Chromatogr.* 516, (1990), 191-198.
- (HOB 95) K. K. Hockman, D. Berengut, *Chem. Eng.*, (Nov. 1995), 142-147.
- (JHD 93) M. Jimidar, T. Hamoir, W. Degezelle et al., *Anal. Chim. Acta* 284, (1993), 217-225.
- (LI 93) S. F. Y. Li, "Capillary Electrophoresis, principles, practice and applications", Elsevier, Amsterdam, 1993.
- (MVD 88) D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, "Chemometrics: a Textbook". *Data Handling in Science and Technology*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1st edition, 1988.

(PED 74) D. D. Perrin, B. Dempsey, " Buffers for pH and Metal Ion Control ".
Chapman and Hall, London, 1974.

(POS 84) C. F. Poole, S. A. Schuette, "Contemporary practice of
chromatography", Elsevier, Amsterdam, 1984.

(TAB 89a) J. Tabera, Cromatografía y técnicas afines, 10, (1989), 139-145.

(TAB 89b) J. Tabera, Cromatografía y técnicas afines, 10, (1989), 147-157.

(WAH 92) T. Wang, R. Hartwick, J. Chromatogr. 607, (1992), 119-125.