

Bryan Frank Velásquez Argomedo

**DETERMINACIÓ DE VITAMINES LIPOSOLUBLES EN MOSTRES D'ORIGEN
ALIMENTARI PER RP-HPLC-UV**

TREBALL DE FI DE GRAU

dirigit per Hector Rodríguez Sánchez/Ivan Muñoz Pascal

Laboratori ISBO S.L.

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2018

AGRAÏMENTS

En primer lloc, agrair al laboratori ISBO i al personal per l'oportunitat de posar en pràctica el que he après al llarg del grau i per dipositar la seva confiança en mi per aquest projecte. Especialment a Iván, Hector i Gerard per la seva ajuda, paciència i comprensió amb mi; creant un ambient de treball òptim per tot el personal present. Sense oblidar a Xavier i Alba que conjuntament m'han fet confirmar que si et dediques a lo que t'agrada, mai es veurà com un treball.

En darrer lloc, agrair a la meva família que han estat per mi i donant-me el suport necessari en tot moment al llarg d'aquest temps. En primer lloc a la meva mare Elsa, i els meus germans Noreen i Erick, gràcies per tot.

ÍNDIX

ABSTRACT	8
1. Objectius	9
2. Introducció	10
2.1 Les Vitamines	10
2.2 Les Vitamines Liposolubles.....	10
2.3 Aliments, suplementos Alimentosos i pinsos per animals.....	11
2.4 Antecedents.....	14
3. Fonament teòric	15
3.1 Tècniques analítiques	15
3.1.1 Mètode patró intern.....	15
3.1.2 Cromatografia Líquida d'alta resolució (HPLC).....	16
3.1.3 Detector UV	17
4. Part experimental	18
4.1 Dissolvents i patrons.....	18
4.2 Equips i software	18
4.3 Metodologia.....	19
4.3.1 Pretractament de la mostra	19
4.3.2 Saponificació de la mostra	19
4.3.3 Extracció Líquid-Líquid.....	21
4.3.4 Evaporació i Reconstrucció	21
4.4 Optimització mètode cromatogràfic	22
4.5 Validació del mètode cromatogràfic	25
4.5.1 Selectivitat.....	25
4.5.2 Límit de detecció (LOD) i límit de quantificació (LOQ)	25
4.5.3 Interval de treball i rang de linealitat.....	26
4.5.4 Recuperació.....	26
4.5.5 Precisió.....	27
5. Discussió de resultats	28
5.1 Condicions inicials e identificació dels pics	28
5.2 Optimització del mètode.....	30
5.2.1 Condicions finals de l'anàlisi.....	33
5.3 Validació del mètode	36
5.3.1 Determinació de LOD i LOQ.....	36

5.3.2	Interval de treball i interval de linealitat	37
5.3.3	Recuperació.....	40
5.3.4	Precisió.....	41
6.	Conclusions	43
7.	Bibliografia	44
8.	ANNEXOS	46
	ANNEX 1.Matriu de treball Plackett-Burman amb 2 factors fictidis.....	46
	ANNEX 2. Relacions [Àrea Vit]/ [Àrea PI]	47
	ANNEX 3. Fitxes tècniques	48

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Substàncies vitamíniques segons la directiva 2002/46/CE	12
Taula 2. Característiques habituals avaluades en la validació del mètode	14
Taula 3. Llistat de dissolvents i reactius	18
Taula 4. Condicions de rotavapor	21
Taula 5. Columnes cromatogràfiques disponibles	22
Taula 6. Composició de dissolvents per la fase mòbil	22
Taula 7. Factors d'influència pel disseny Plackett-Burman	23
Taula 8. Disseny experimental d'optimització del mètode	24
Taula 9. Estructura d'una taula ANOVA d'un factor	28
Taula 10. Condicions inicials HPLC	28
Taula 11. Temps de retenció i longituds d'ona màxima a la columna C18	29
Taula 12. Comparació composició fase mòbil	29
Taula 13. Avaluació de temperatura de saponificació	30
Taula 14. Avaluació del temps de saponificació	31
Taula 15. Avaluació del numero d'extraccions	32
Taula 16. Avaluació del numero de neteges	33
Taula 17. Condicions finals de l'anàlisi amb el mètode desenvolupat	34
Taula 18. Resultats dels anàlisis per la determinació del LOD i LOQ	36
Taula 19. Rectes de calibratge finals per totes 3 vitamines	40
Taula 20. Resultats del càlcul de la recuperació	40
Taula 21. Resultats de les 8 mostres analitzades amb el mètode sota condicions de repetibilitat amb diferents analistes	41
Taula 22. Taula resum de l'anàlisi ANOVA per la vitamina A	42
Taula 23. Resultats dels valors d'ANOVA d'un factor per la vitamina A	42
Taula 24. Resultats de l'avaluació de precisió	43

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Estructura retinol (Vitamina A)	12
Figura 2. Estructura ergocalciferol (Vitamina D ₂)	12
Figura 3. Estructura colecalciferol (Vitamina D ₃)	13
Figura 4. Estructura alfatocoferol (Vitamina E)	13
Figura 5. Kinetex Core-shell	17
Figura 6. Totalment porosa	17
Figura 7. Difusió de partícules en ambdós tipus de tecnologia	17
Figura 8. Reacció d'hidròlisi de triglicèrids mitjançant una hidròlisi bàsica	20
Figura 9. Reacció general d'hidròlisi d'èsters	20
Figura 10. Cromatograma de la determinació simultània Vitamina A, D ₂ , D ₃ i E a 95% MetOH i 5 %H ₂ O	30
Figura 11. Cromatograma d'optimització a 70°C	31
Figura 12. Cromatograma d'optimització 15 minuts	32
Figura 13. Cromatograma d'optimització 2 extraccions	33
Figura 14. Cromatograma superposat dels patrons de la Vitamina D ₂ individual (senyal negre), Vitamina D ₃ individual (senyal blava) i el patró combinat D ₂ i D ₃ (senyal blau cel)	35
Figura 15. Representació de la regressió lineal de l'interval de treball. Recta taronja Vitamina D ₃ , recta blava Vitamina A i recta gris Vitamina E	37
Figura 16. Corba regressió ajustada Vitamina A	38
Figura 17. Primer tràfic de residuals estàndards Vitamina A	38
Figura 18. Corba de regressió Vitamina A sense el punt discrepant	39
Figura 19. Gràfic de residuals estàndards de la Vitamina A sense el punt discrepant	39
Figura 20. Gràfic de residuals estàndards de Vitamina D ₃ amb distribució aleatòria i cap punt discrepant	39
Figura 21. Gràfic de residuals estàndards de Vitamina E amb distribució aleatòria i cap punt discrepant	40

ÍNDIX D'EQUACIONS

Equació 1. Equació de van Deemter	16
Equació 2. Avaluació de resolució cromatogràfica	22
Equació 3. Variància estimada per a cada experiment "i"	23
Equació 4. Desviació estàndard dels efectes emprant repliques	23
Equació 5. Significació estadística dels efectes	24
Equació 6. Determinació del límit de detecció	25
Equació 7. Desviació estàndard calculada pel LOD i LOQ	26
Equació 8. Determinació del límit de quantificació	26
Equació 9. Concentració normalitzada	26
Equació 10. Recuperació per a una matriu	27
Equació 11. Desviació estàndard repetibilitat	28
Equació 12. Desviació estàndard precisió intermitja	28
Equació 13. Contribució a la variació total del factor agrupament	28
Equació 14. Equació per la repetibilitat en tant per cent. Com a quocient de S_r i la mitjana de les concentracions de les vitamines	42
Equació 15. Equació per la precisió intermitja en tant per cent. Com a quocient de S_i i la mitjana de les concentracions de les vitamines	42

ABSTRACT

At the present time, vitamins are becoming quite important due to the high deficits that have emerged throughout history from our awareness of good nutrition. As a result arose the need to compensate for this deficiency with food supplements. The deficit of these can be the cause of certain diseases such as rickets due to the absence of vitamin D or keratomalacia caused by vitamin A deficiency. Vitamin E deficiency is unusual in humans and is almost never associated with low intake but other causes have been observed such as people who can't absorb the nutrient through diet. On the other hand, this interest is also reflected in animal nutrition also given that some legislations equate their nutrition with human.

The purpose of this project is the develop a method to identify and quantify these fat soluble vitamins in foods like animal feeds, food supplements, etc.

The Technique used for the identification and quantification of these vitamins is HPLC-UV.

For the determination of vitamins it is necessary to carry out a sample treatment consisting of saponification and a liquide-liquide extraction from the different matrices.

1. Objectius

Aquest projecte tracta del desenvolupament d'un mètode per la determinació de les vitamines liposolubles A, D3 y E en mostres per l'alimentació com poden ser els suplementos alimentosos, pinsos complementaris per animals, etc. mitjançant HPLC-UV.

Essent aquest l'objectiu del projecte, s'utilitzarà el mètode desenvolupat per a determinar el contingut d'aquestes vitamines en un suplement alimentós i en un pinso per animals.

D'altra banda es calcularà la recuperació quan es realitza l'extracció Líquid-Líquid i es validarà el mètode.

2. Introducció

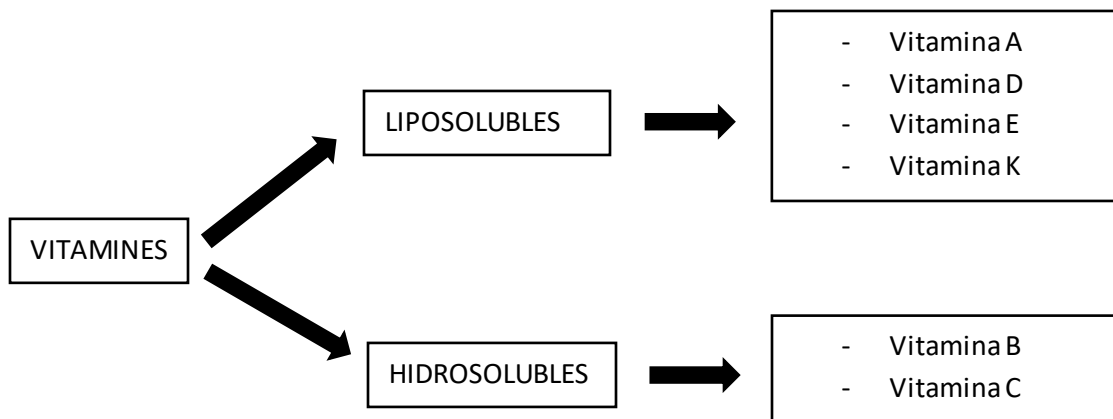
Laboratori Isbo és un laboratori que es troba situat a Salou; està recolzat amb més de 15 anys d'experiència i especialitzat en control de qualitat: aigües, aliments, productes industrials, sòls, etc. El laboratori aporta solucions a les incidències productives, les necessitats i controls mediambientals i sanitaris del sector agrari, ramader, de producció i de l'hostaleria.

Amb una cartera de més de 130 clients, el laboratori es troba en un punt de creixement, tant d'infraestructures, com de personal i equips.

L'objectiu principal del laboratori és l'augment del seu catàleg d'anàlisi i satisfer les necessitats de clients més exigents; a més a més, està treballant per tal d'acreditar-se amb la norma UNE-EN ISO/IEC 17025¹ pels laboratoris d'assaig i calibracions.

2.1 Les Vitamines

Les vitamines son substàncies orgàniques essencials pel bon funcionament de l'organisme, aquestes es poden sintetitzar a l'organisme, però la majoria de vitamines essencials no les podem sintetitzar, llavors s'han d'obtenir per la dieta de manera equilibrada. Aquestes son essencials per la realització de funcions vitals de l'organisme ja que poden actuar com coenzims, antioxidants i hormones. Segons la solubilitat de les mateixes es poden classificar en vitamines liposolubles i hidrosolubles. Un bon exemple d'això son les diferents formes de la vitamina K; com la K1 d'origen vegetal, la K2 d'origen flora intestinal i la K3 que es tracta d'un compost sintètic, les dues primeres son hidrosolubles i l'última és liposoluble¹⁹.



2.2 Les Vitamines Liposolubles

Aquestes es caracteritzen per la seva participació en diferents processos com la coagulació de la sang i la visió. Aquestes a diferència de les vitamines hidrosolubles; son més sensibles a la llum

i calor. S'emmagatzemen al greix i a teixit del nostre organisme, la seva absorció i secreció no és fàcil i l'excés d'aquests pot ser tòxic¹⁹.

2.3 Aliments, suplementos Alimentosos i pinsos per animals

En la fabricació dels aliments poden utilitzar-se una ampla gamma de nutrients i altres ingredients, com vitamines, minerals, àcids grassos essencials, aminoàcids, fibres i diverses plantes i extractes d'origen.

Els fabricants alimentaris afegeixen vitamines i minerals als aliments amb diverses finalitats, un dels motius es que degut al procés de fabricació, emmagatzemament o manipulació es perd una part de la concentració; llavors fan aquest procediment amb la finalitat de donar el valor nutricional aproximat dels aliments dels quals pretenen ésser alternatives.

Una alimentació saludable ha sigut sempre la millor manera d'assegurar un contribució optima de vitamines i nutrients. Però aquesta situació ideal no es porta a terme per totes les vitamines i minerals, ni per tots els grups de població. Tot i així l'addició d'aquestes substàncies als aliments esta regulat pel *Reglamento (CE) Nº 1925/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos.*

Per tal de compensar aquestes necessitats, la industria dels suplementos alimentosos ha estat en creixement i variant constantment. Aquests foren creats amb la finalitat de complementar la nostra alimentació i que tinguin un efecte nutricional o fisiològic.

Segons la directiva *2002/46/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 10 de junio de 2002 relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en materia de complementos alimenticios*, només es pot utilitzar en la fabricació de complementos alimentosos, les substàncies vitamíniques i minerals citats a l'ANEX II d'aquesta directiva, a la taula 1 només es citarà les substàncies d'interès que son les vitamines liposolubles.

Taula 1. Substàncies vitamíniques segons la directiva 2002/46/CE

Vitamina A	Vitamina D	Vitamina E
- Retinol	- Colecalciferol	- D- α tocoferol
- Acetat de retinil	- Ergocalciferol	- DL- α tocoferol
- Palmitat de retinil		- Acetat de D- α tocoferol
- Beta-carotè		- Acetat de DL- α tocoferol
		- Succinat àcid de D- α tocoferil

En aquest cas les vitamines en les quals es centra el treball, son la vitamina A, vitamina D i vitamina E; amb les estructures següents:

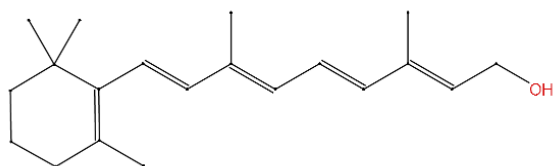


Figura 1. Estructura retinol (vitamina A)

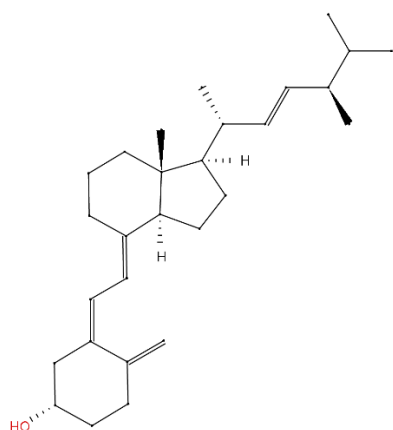


Figura 2. Estructura ergocalciferol (Vitamina D2)

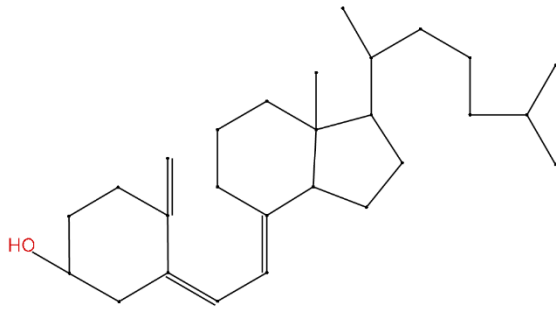


Figura 3. Estructura colecalciferol (Vitamina D3)

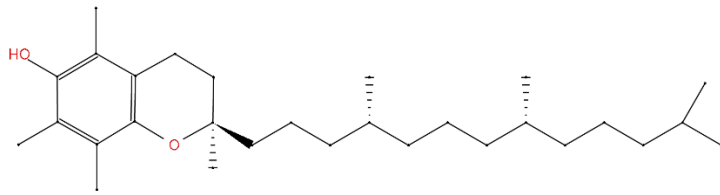


Figura 4. Estructura alfatocoferol (Vitamina E)

En aquestes figures s'observen les estructures de les formes principals de les vitamines, com és el retinol per la vitamina A, l'ergocalciferol per la vitamina D2 d'origen vegetal, el colecalciferol per la vitamina D3 d'origen animal i la D-alfa-tocoferol per la vitamina E; però aquestes formes suposen un cost elevat. Els fabricants solen triar les opcions més econòmiques i es on apareix el paper de les anomenades pro-vitamines o vitamines preformades que son substàncies que es transformen en el cos mitjançant el propi metabolisme, com es el cas de l'acetat de retinil, palmitat de retinil per la vitamina A i Beta-carotè com a pro-vitamina A. Per aquest motiu s'utilitzen els patrons descrits més endavant.

D'altra banda el pinso per animals pot arribar a suplir tot l'aliment que rep, donat que està ideat per cobrir totes les necessitats de l'animal, tot i que existeixen altres pinsos que s'anomenen pinsos complementaris que serveixen com aliment complementari a altres productes de la seva dieta. Les empreses productores de pinso han desenvolupat solucions específiques per cada animal i cada raça, amb aquestes formules es pretén respondre a les necessitats específiques de la nutrició animal.

El Reglament (CE) N^o 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la Seguridad alimentaria, equipara la seguretat de l'alimentació animal a la seguretat de l'alimentació humana. Aquest estableix que els operadors del sector de l'alimentació animal han de disposar d'un sistema de traçabilitat dels aliments, llavors han de tenir sistemes i procediments que permetin conèixer al proveïdor de tots els productes afegits als aliments per animals.

2.4 Antecedents

Prèviament el laboratori havia desenvolupat un mètode per la determinació de vitamines liposolubles, però aquest mètode no tenia una bona separació i identificació per a la vitamina A, però per la resta de vitamines sí era bo. Per tant l'empresa va proposar modificar aquest mètode o fer-ne un altre nou, així doncs es va decidir desenvolupar un de nou, després de la recerca bibliogràfica corresponent es va decidir seguir les normes UNE-EN i UNE-EN ISO per la Vitamina A, per la vitamina D i per la vitamina E; i desenvolupar un mètode per la determinació simultània d'aquestes vitamines.

El fet de desenvolupar aquest mètode a partir de les normes ISO suposa un avantatge degut a que a diferència dels mètodes desenvolupats pels laboratoris, la seva validació es simplifica.

Es pot diferenciar dues definicions, la validació com la definició d'un requisit analític i la confirmació de que aquest mètode té les capacitats consistents amb les aplicacions requerides; per altra banda la verificació com la confirmació mitjançant algun treball experimental de que mètodes validats com les normes ISO compleixen els requisits especificats. En aquest cas el laboratori és l'encarregat de confirmar que aquest mètode és aplicable, aleshores estariem parlant de verificació³.

Taula 2. Característiques habituals avaluades en la validació del mètode

Característiques d'acompliment
Selectivitat
Límit de detecció (LOD) i límit de quantificació (LOQ)
Interval de treball
Sensibilitat analítica
Veracitat <ul style="list-style-type: none">• Biaix, recuperació
Precisió <ul style="list-style-type: none">• Repetibilitat• Precisió intermitja• Reproductibilitat
Incertesa de mesura
Robustesa

3. Fonament teòric

Dintre d'aquest projecte s'ha fet us de diferents tècniques analítiques per tal d'extreure i determinar les vitamines liposolubles, en aquest apartat s'explica breument el fonament de cadascuna d'aquestes.

3.1 Tècniques analítiques

3.1.1 Mètode patró intern

L'objectiu principal d'un mètode quantitatiu, és determinar la quantitat d'una substància desconeguda en una mostra, però per dur-la a terme s'ha de tenir molta cura en la preparació i tractament de la mostra. Sempre que una mostra és traslladada o manipulada aquesta pot patir pèrdues en la concentració dels analits d'interès; però existeixen estratègies per minimitzar la pèrdua o fins i tot tenir aquesta pèrdua en compte i poder fer mesures i càlculs precisos a l'hora de donar un resultat.

L'addició d'un patró intern (PI) a la calibració resulta ésser una eina que serveix per tenir en compte les pèrdues de l'analit en la manipulació de la mostra i disminuir els errors sistemàtics. Aquest PI és una quantitat coneguda d'un compost o element que no es troba present a la matriu i s'addiciona a les mostres problema, aquest no ha de suposar un problema d'interferència a l'anàlisi. Les característiques que ha de tenir un patró intern són tenir compatibilitat amb la mostra i el patró com poden ser la solubilitat, les característiques químiques i fisicoquímiques semblants a l'analit d'interès i també una resposta diferenciada respecte a l'analit; és a dir, que el mètode sigui capaç de diferenciar la senyal d'un i d'altre. La base d'aquest mètode és la proporcionalitat de les senyals de l'analit d'interès i el patró intern, donat que la seva resposta als errors del mètode i la instrumentació emprada són semblants degut a les característiques abans esmentades. A més a més, un dels avantatges de fer ús del patró intern és a l'hora d'avaluar el factor recuperació per a cada matriu, aquest queda implícit dins d'aquest mètode. Per altra banda, éssent aquest un anàlisi de rutina suposa un menor cost pel laboratori a diferència de la utilització de calibració per addicions estàndards⁴.

Inicialment per aquest projecte es van trobar referències de patró intern per la vitamina D i la vitamina E però no per la vitamina A. S'ha fet servir la vitamina D⁵ com a PI de totes les vitamines d'interès del mètode a desenvolupar encara que es tingui referències del PI de la vitamina E⁶ no es va poder accedir a ell.

La calibració de la vitamina A, Vitamina D3 i Vitamina E es va dur a terme amb el patró intern D2, afegint la mateixa concentració a totes les solucions estàndards de la calibració. Conseqüentment s'estableix les relacions entre les àrees de l'analit i el patró intern per la realització de la recta de calibratge.

3.1.2 Cromatografia Líquida d'alta resolució (HPLC)

La cromatografia és una tècnica de separació no quantitativa, aquesta permet separar físicament els diferents components d'una solució per l'adsorció selectiva mitjançant una fase estacionària sòlida o líquida, dels constituents d'una mescla. A diferència de la cromatogràfica de gasos, aquest té una fase mòbil líquida.

Dins aquesta tècnica es pot classificar diferents tipus de cromatografia, una de les maneres de classificació més comuna és segons l'equilibri; és a dir, pot ser de partició, adsorció, intercanvi iònic, exclusió i afinitat. Per altra banda es diferencia també entre una fase estacionària polar; parlem de fase normal, i quan tenim present una fase estacionària apolar; parlem d'una fase reversa⁷.

En aquest cas es treballa amb una cromatografia de partició i fase reversa amb una columna que fa ús d'una nova tecnologia anomenada "Core-shell" que dona millors resultats que les columnes amb revestiment porós.

Per la fabricació de columnes "Core-shell" es fa servir tècniques sol-gel que incorpora nanotecnologia a la seva estructura. Es crea una capa porosa homogènia i resistent sobre el nucli sòlid de sílice per formar una partícula de tipus "Core-shell", aquestes característiques produeixen menys eixamplament de pics en comparació amb columnes que fan ús de partícules totalment poroses i degut això, els nivells d'eficàcia són superiors⁸.

Tal i com descriu l'equació 1 de van Deemter, els motius pels quals l'eixamplament de pics es produeix degut a la difusió per diferents camins dels analits (A), difusió longitudinal (B) i la transferència de massa (C) on μ és la velocitat de flux de la fase mòbil.

$$H = A + B/\mu + C * \mu$$

Equació 1. Equació de van Deemter

Així doncs aquesta nova tecnologia juntament amb la tecnologia d'empaquetament de columnes, permet disminuir les causes de l'eixamplament de pics i poder tenir millors separacions cromatogràfiques amb millor resolució, més sensibilitat i capacitats de pic millorades tal i com s'observa a la figura 7.

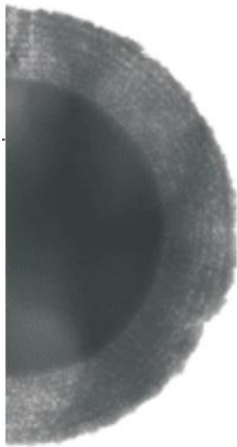


Figura 5. Kinetex Core-shell



Figura 6. Totalment porosa

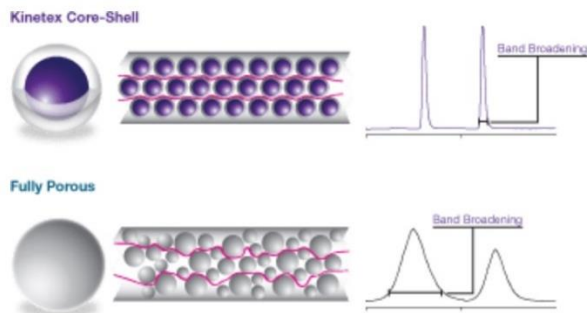


Figura 7. Difusió de partícules en ambdós tipus de tecnologia .

Com s'observa a la figura 5, la Kinetex "Core-shell" té una alta densitat significat d'una estructura molt homogènia, aquesta característica redueix els efectes d'eixamplament de bandes degut a l'efecte multicamí disminuint la diferència entre els camins de difusió. Per altra banda a la figura 6 s'observa l'estructura totalment porosa, aquesta és menys homogènia i per aquest motiu accentua més l'efecte multicamí produint pèrdues de rendiment i limitant els nivells d'eficàcia⁸.

En aquest cas al laboratori es disposa de dues columnes amb aquesta tecnologia, una C18 i una C18 polar que consta d'una superfície polar modificada que proporciona una retenció polar i apolar en un 100% d'estabilitat en medi aquós.

Tot seguit es realitzen proves experimental per tal d'escollir la columna adient ja que els analits que es volen retenir són apolars.

3.1.3 Detector UV

Com ja s'ha parlat prèviament, sense un detector no es pot dir que la cromatografia sigui una tècnica quantitativa. A un equip cromatogràfic s'hi poden acoblar diferents detectors com poden ser el DAD, espectroscòpia de masses, fluorescència, ultraviolada visible, etc. Aleshores estariem

parlant d'una tècnica amb una gran diversitat d'anàlisis. En aquest cas s'utilitza un detector Ultraviolada Visible.

4. Part experimental

4.1 Dissolvents i patrons

La llista dels dissolvents i patrons es poden observar a la següent taula, a més a més es disposa de les fitxes tècniques al ANEX 2 amb la finalitat de saber la seva toxicitat i les precaucions prèvies que s'han de prendre abans de la manipulació.

Taula 3. Llistat de dissolvents i reactius

Dissolvents	Reactius
2-propanol (isopropanol) HPLC gradient (subministrat per Sigma Aldrich)	L-àcid ascòrbic crystalline (subministrat per sigma Aldrich)
Metanol HPLC gradient (subministrat per Sigma Aldrich)	D-L- retinol 97.9 % (HPLC) (subministrat per sigma Aldrich)
Aigua Ultrapura (H ₂ O Mq)	±-Alpha-tocopherol 98 % (HPLC) (subministrat per sigma Aldrich)
n-hexà HPLC gradient (subministrat per sigma Aldrich)	Colecalciferol 99.8 % (HPLC) (subministrat per Sigma Aldrich)
Èter dietílic HPLC Gradient (subministrat per sigma Aldrich)	Ercocalciferol 98.5% (subministrat per sigma Aldrich)
-	Hidròxid de potassi, KOH

A la taula 3 s'observa les diferents solucions emprades pel desenvolupament del mètode. Isopropanol com a dissolvent per l'elaboració dels patrons de calibratge, el metanol com a dissolvent part de la saponificació de la mostra, aigua ultrapura com a dissolvent part de la saponificació de la mostra, amb el reactiu KOH es fa una solució del 50% en pes d'hidròxid de potassi com a medi bàsic alcalí per la reacció de saponificació. D'altra banda en tenim els components del dissolvent d'extracció líquid-líquid i de la fase mòbil. Així també s'utilitza l'àcid ascòrbic com antioxidant i els corresponents patrons en el grau de puresa descrit.

4.2 Equips i software

- Balança analítica ADAM NIMBUS 2000
- Calefactor/Agitador magnètic amb control de temperatura IBX instruments H03D
- Rotavapor Heidolph

- Equip d'osmosi per la fabricació de l'aigua ultrapura in situ, Labolan Direct Pure
- Sistema cromatogràfic subministrat per Perkin Elmer
 - Recipient per les fases mòbils
 - Desgasificador Flexar
 - Mòdul d'injecció automàtica Flexar
 - Mòdul de bombeig Flexar
 - Detector UV flexar
 - Columna Kinetex® 2.6µm C18 100 Å, LC Column 100 x 4.6 mm, Ea i
 - Columna Kinetex® 2.6µm C18 Polar 100 Å, LC Column 100 x 4.6 mm, Ea
 - Forn Flexar
- Adquisició de dades Chromera Speciation software
- Adquisició de dades Totalchrom Workstation software
- Tractament de dades amb Microsoft Excel

4.3 Metodologia

Per tal de realitzar la separació de les vitamines de la part lipídica de la mostra per al seu posterior anàlisi mitjançant HPLC-UV son necessaris uns tractaments previs abans de poder determinar els analits. Aquest mètode s'ha elaborat a partir de les normes UNE-EN 12821 per la vitamina D3⁵ y D2, la UNE-EN 12822 per la vitamina E⁶ i la UNE-EN ISO 14565 per la vitamina A⁹. Com les vitamines d'interès tenen el mateix tractament de mostra i el mateix procediment analític, s'ha elaborat el mètode per la seva determinació simultània.

4.3.1 Pretractament de la mostra

Les matrius que s'estudien són suplementos alimentosos i pinsos per animals. Per aquest motiu es precisa de l'homogeneïtzació d'una part representativa de la mostra, la saponificació d'aquesta amb ajuda d'hidròxid de potassi i així separar els analits de la part lipídica, una posterior extracció líquid-líquid amb el dissolvent adient i finalment una reconstrucció amb el dissolvent adient, havent evaporat prèviament el dissolvent d'extracció mitjançant el rotavapor. En el següents apartats es passa a descriure els diferents tractaments de les matrius per al posterior anàlisi.

S'ha de tenir cura a l'hora de treballar tant amb els patrons com a l'hora de portar a terme el tractament de la mostra, ja que les vitamines liposolubles, son fotosensibles i amb contacte amb l'atmosfera aquestes poden oxidar-se. En aquest projecte s'ha treballat amb la mínima llum possible.

4.3.2 Saponificació de la mostra

Aquest és un procés químic conegut antigament per l'elaboració de sabó. La reacció produïda és una hidròlisi bàsica de greixos i lípids (hidròlisi d'esters) produint sals alcalines dels greixos (sabó) i glicerina. La reacció succeeix mitjançant un mecanisme de substitució nucleòfila al grup

acil, formant un intermedi tetraèdric; a una segona etapa es regenera el grup acil per la pèrdua del grup acil i una posterior reacció àcid-base originant els grups alcohols¹⁰.

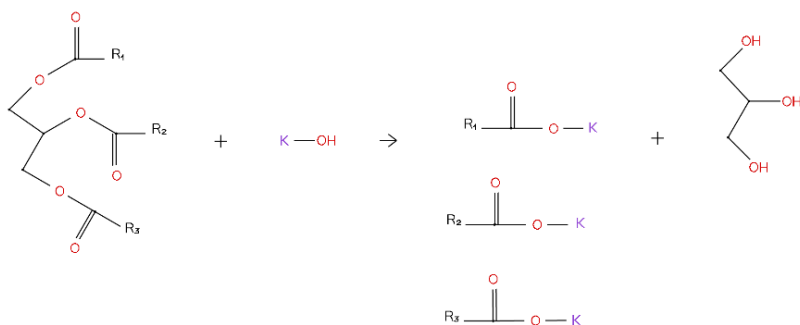


Figura 8. Reacció d'hidròlisi de triglicèrids mitjançant una hidròlisi bàsica

També resulta ésser una bona tècnica d'extracció d'analits liposolubles i per aquest motiu és idoni per el tipus de mostres a analitzar. A més a més com és usual que els fabricants no afegixin les vitamines sinó estructures a partir de les quals es puguin arribar aquestes mitjançant alguna reacció química dins l'organisme com pot ésser la hidròlisi d'aquestes estructures. Es coneix que a molts productes no s'afegeix retinol com a vitamina A, sinó acetat de retinil o palmitat de retinil que son esters de retinol com mostra la taula 1, per això el calibratge es fa amb retinol perquè les estructures estèriques en presència de medi bàsic hidrolitzen cap al retinol com s'observa a la figura 9.

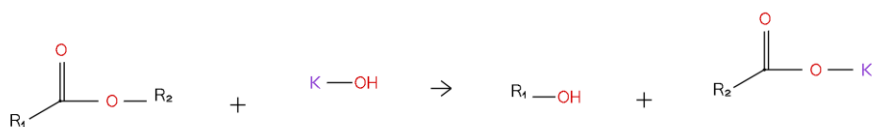


Figura 9. Reacció general d'hidròlisi d'èsters

En aquest cas per dur a terme la saponificació per al nostre mètode, es precisa de :

- De 0.1-3 g de mostra homogeneïtzada mitjançant un molinet
- 30 mL de MetOH HPLC gradient
- 1g d'antioxidant (àcid ascòrbic)
- 10 mL de la solució 50% KOH
 - o 10mL de H2O Ultrapura amb una proveta i 5 g de KOH pesat al granetari
- Deixar reaccionar 15-60 minuts a una temperatura de 70-100°C

NOTA: si encara s'observa greix a la solució, s'addicionarà més quantitat de la solució 50% KOH durant una mica més de temps. I en tot el procediment s'intenta treballar amb la mínima llum possible.

4.3.3 Extracció Líquid-Líquid

Un cop ha finalitzat la saponificació es passa a l'extracció líquid-líquid dels analits, però prèviament s'ha d'afegir 30mL d'aigua ultrapura tal que la composició a la mescla sigui 1:1 amb el metanol afegit⁶.

Seguidament es realitzen de 2-4 extraccions amb 50mL d'una solució de n-hexà amb el 20% d'èter etílic; el fer servir una mescla amb un dissolvent una mica més polar, augmenta la polaritat del primer dissolvent millorant l'extracció i recuperació, s'ha escollit aquest 20% ja que l'optimització d'aquest factor requereix d'una experimentació més exhaustiva⁶.

Amb la fase orgànica recuperada es realitzen de 2-4 neteges amb 50mL d'aigua ultrapura per tal d'eliminar les impureses hidrosolubles que puguin interferir a la quantificació dels analits. Seguidament la fase orgànica s'asseca amb una quantitat adient de sulfat de magnesi penta-hidratat, assecat prèviament a l'estufa a una temperatura de 105-120°C. En aquest procediment experimental es precisa treballar amb la mínima llum possible. Per tant el material adient son un embut de decantació de topazi o un embut de decantació normal però folrat amb paper alumini, i un matràs erlenmeyer folrat amb paper alumini per recollir la fase orgànica.

4.3.4 Evaporació i Reconstrucció

Després d'haver extret els analits, es passa a evaporar la solució d'hexà 20% d'èter dietílic amb l'ajuda d'un rotavapor amb pressió controlada seguint les condicions de la taula 4. Com s'ha mencionat abans, s'ha de treballar amb la mínima llum i a més al matràs rodó de fons rodó ha de contenir una espàtula d'àcid ascòrbic per disminuir les possibilitats d'oxidació de les vitamines durant aquest procediment⁵. Un cop evaporat el dissolvent es reconstruirà amb un volum de 5mL d'isopropanol HPLC gradient.

Taula 4. Condicions de rotavapor

Temperatura de Bany (°C)	40
Pressió (kPa)	20
Revolucions (rpm)	260

4.4 Optimització mètode cromatogràfic

Per tal d'optimitzar aquest mètode s'ha avaluat la separació cromatogràfica de les vitamines a les dues columnes disponibles al laboratori que s'observen a la taula 5, tenint en compte els antecedents.

Taula 5. Columnes cromatogràfiques disponibles

Tipus de Columna
Columna Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å, LC Column 100 x 4.6 mm, Ea
Columna Kinetex® 2.6 µm C18 polar 100 Å, LC Column 100 x 4.6 mm, Ea

Seguidament es va determinar el temps de retenció i les longituds d'ona màximes per cada vitamina. També es va optimitzar la composició de la fase mòbil representat a la taula 6, avaluant el factor de resolució de les vitamines amb l'equació 2; que relaciona els temps de retenció de les vitamines D2 i D3 i la mitjana de l'amplària dels dos pics, que són els que tenen menys separació.

$$R = \frac{T_{r,D3} - T_{r,D2}}{\frac{(W_{D2} + W_{D3})}{2}}$$

Equació 2. Avaluació de resolució cromatogràfica.

Taula 6. Composició de dissolvents per la fase mòbil

Composició %A: H2O	Composició %B: MetOH
5	95
7	93
10	90

D'altra banda per tal d'avaluar els factors que poden influenciar al paràmetre d'interès del mètode que en aquest cas es la resposta de l'equip, s'ha elaborat un disseny experimental Plackett-Burman amb la finalitat de trobar els valors de les variables que donin un valor òptim de resposta.

Aquest disseny permet avaluar el nombre màxim de factors amb el mínim nombre d'experiments. S'efectuen N experiments, amb N múltiple de 4. Aquest disseny de N experiments avalua N-1 factors. Si el nombre de factors a avaluar és inferior a N-1, es completa els experiments amb factors ficticis^{11,12}.

En aquest cas el mètode consta dels factors observats a la taula 7.

Taula 7. Factors d'influència pel disseny Plackett-Burman

Factors d'influències	Domini Experimental	
	Nivell inferior	Nivell superior
Dissolvent d'extracció	n-hexà	n-hexà 20% èter dietílic
Tipus d'antioxidant	Àcid ascòrbic	BHT
Il·luminació	sense llum	amb llum
Atmosfera de treball	Sense atmosfera de nitrogen	Amb atmosfera de nitrogen
Dissolvent de la mostra	Etanol	Metanol
Temperatura de saponificació	70 °C	100 °C
Temps de saponificació	15min	60min
Nº d'extraccions	2	4
Nº de neteges	2	4

Conseqüentment amb l'ajuda de la matriu model per aquest disseny experimental fraccionat, es pot elaborar la matriu de treball tal i com s'observa a l'ANEX 1.X. Així mateix tindrem dotze experiments amb dos factors ficticis. Per avaluar la influència dels factors, es calculen els efectes dels factors¹¹. La interpretació d'aquests es realitza amb els valors absoluts conjuntament amb l'elaboració del gràfic Pareto¹¹.

Per tal d'assignar els factors influents, es realitza un significat estadístic dels efectes. Una de les opcions és la realització de repliques, en aquest cas s'ha decidit fer dues repliques i calcular la variància per cada experiment seguint l'equació 3.

$$s_i^2 = \sum_{j=1}^n \frac{(y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n - 1}$$

Equació 3. Variància estimada per a cada experiment "i"

Es pren un 95% de l'interval de confiança per l'efecte estimat. Amb l'ajuda de l'equació 4 i 5 s'arriba al valor de l'efecte i si aquest interval de confiança conté el 0, aquest efecte no és significatiu¹¹.

$$s_b = \sqrt{\frac{s^2}{n2^{k-2}}} = \sqrt{\frac{4s^2}{N}} = \frac{2s}{\sqrt{N}}$$

$$b \pm 2s_b$$

Una vegada s'ha determinat els factors d'influència, es passa a optimitzar aquests factors mitjançant un disseny experimental de superfície resposta Box-Behnken. Els dissenys de superfície resposta s'utilitzen amb freqüència per tal d'optimitzar els models després d'haver determinat els factors d'influència mitjançant els dissenys experimentals factorials com el de Plackett-Burman. Aquest disseny com el de Plackett-Burman te menys punts de disseny ; és a dir, disminueix el numero d'experiments amb el mateix numero de factors; gràcies a això es pot determinar la configuració més òptima per cada factor¹².

Degut al treball exhaustiu que requereix aquests disseny no es va poder portar a terme, i llavors es va haver d'elaborar un disseny alternatiu suposant que els valors d'influència són la temperatura de saponificació, temps de saponificació, numero d'extraccions i numero de neteges amb un punt central entre el límit inferior i superior tal i com s'observa a la taula 7.

Taula 8. Disseny experimental d'optimització del mètode

Experiments/variables	Temperatura (°C)	Temps (min)	Nº extraccions	Nº neteges
1	70	45	2	2
2	85	45	2	2
3	100	45	2	2
4	85	15	2	2
5	85	45	2	2
6	85	60	2	2
7	85	45	2	2
8	85	45	3	2
9	85	45	4	2
10	85	45	2	2
11	85	45	2	3
12	85	45	2	4

Aquesta taula anirà variant a mesura que avanci l'optimització. per tal de disminuir el temps de cada anàlisi s'ha fixat el numero inicial d'extraccions i de neteges a 2 fins que s'arribi a l'optimització d'aquests factors.

4.5 Validació del mètode cromatogràfic

Un cop el mètode s'hagi optimitzat, és necessari validar-lo i per això es segueix la guia Eurachem³ per la validació de mètodes i temes relacionats conjuntament amb la norma ISO 17025 tal. Aquest és un requisit molt important en la pràctica de qualsevol anàlisi químic i així està indicat a l'apartat 5.4.2 de la ISO/IEC 17025¹, *“el laboratori ha d'utilitzar els mètodes d'assaig o calibració, inclosos els de mostreig, i han de satisfer les necessitats del client i han d'esser apropiats per aquests assaigs...”*.

Així doncs es pot definir la validació d'un mètode com *“la confirmació a través de l'examen i aportació d'evidències objectives, de que es compleix els requisits particular per una finalitat específica prevista”*.¹

Tal i com s'ha parlat prèviament el fet de validar un mètode normalitzat amb petites modificacions té avantatges davant de la validació d'un mètode desenvolupat pel laboratori.

4.5.1 Selectivitat

Es pot definir com *“el grau en el que un mètode pot ser utilitzat per determinar analits particulars en mesclades o matrius, sense interferències d'altres components de comportament similar”*³. És important que el mètode sigui capaç de diferenciar l'analit de les interferències així doncs es podrà evitar causar un biaix en el resultat de mesura que pugui augmentar o disminuir el senyal.

Es determina analitzant una mostra d'assaig i material de referència amb el mètode desenvolupat i altres mètodes independents. Es compara els resultats per avaluar les capacitats del mètode per confirmar la identitat de l'analit i la capacitat per mesurar l'analit aïllat d'altres interferències³.

4.5.2 Límit de detecció (LOD) i límit de quantificació (LOQ)

És important conèixer la concentració més baixa de l'analit que pot ser detectada pel mètode, és a dir, a quina concentració es pot afirmar que existeix analit. D'altra banda és important establir el valor més baix amb el que es pot acceptar la quantificació de l'analit amb el mètode. Per la determinació d'aquests límits és suficient el proveir un valor aproximat d'aquests.

Per tal d'assignar el límit de detecció serà suficient les mesures per duplicat de deu patrons amb una concentració baixa amb les condicions cromatogràfiques establertes, i es calcula la desviació estàndard dels resultats, seguidament es determina el valor amb l'equació 6. On la desviació estàndard calculada s'aconsegueix amb l'equació 7 on “n” es el numero de repliques.

$$LOD = 3s'_0$$

Equació 6. Determinació del límit de detecció

Per altra banda per tal d'assignar el límit de quantificació s'aconsegueix de la mateixa manera que el límit de detecció, mesurant per duplicat 10 patrons de baixa concentració amb les mateixes condicions cromatogràfiques, seguidament es determina el valor amb l'equació 8 on k_Q usualment és 10. On la desviació estàndard calculada s'aconsegueix amb l'equació 7.³

$$s'_0 = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$$

Equació 7. Desviació estàndard calculada pel LOD i LOQ

$$LOQ = k_Q \times s'_0$$

Equació 8. Determinació del límit de quantificació

4.5.3 Interval de treball i rang de linealitat

Aquest és l'interval en el qual el mètode proporciona resultats amb una incertesa acceptable. L'extrem inferior està determinat pel límit de quantificació i el límit superior serà la concentració on s'observen anomalies com pot ser la pèrdua de linealitat. En aquest cas s'avalua l'interval de treball de l'instrument, que està definit per els senyals de les concentracions dels patrons utilitzats per la calibració de l'instrument. En la validació es necessita confirmar que la relació lineal de l'interval de treball i el rang indicat en el mètode són compatibles.

Així doncs, la experimentació consta de dues etapes: una primera analitzant un grup de patrons equiespaiats en un rang molt ampli de concentracions (començant pel LOQ abans calculat, i finalitzant en concentracions més grans a les que s'esperen en les mostres) on la valoració de la linealitat es realitza sense un anàlisi estadístic exhaustiu; i una segona, un cop escollit el rang lineal, on s'analitzen patrons per duplicat, agrupant més d'aquests als extrems per minimitzar l'error de la calibració i fent un anàlisi de residuals per detectar anomalies i possibles *outliers*³.

4.5.4 Recuperació

Com s'ha esmentat abans el fet de no poder treballar amb patró intern obliga a realitzar l'avaluació de la recuperació pel tipus de matriu a tractar.

En aquest cas s'ha analitzat 3 vegades una mostra de rutina sense dopar i 3 més dopant amb concentracions conegudes. Conseqüentment amb l'ajuda de l'equació 9 es calculen les concentracions normalitzades de les vitamines en les diferents mostres esmentades.¹³

$$[Vit]_{ni} = \frac{[Vit]_{instrument}}{massa_{pesada}}$$

Equació 9. Concentració normalitzada

Per tal de calcular les recuperacions es segueix l'equació 10, que relaciona les concentracions normalitzades amb les concentracions afegides en les mostres dopades. Aquest procediment es realitza per totes 3 vitamines.¹³

$$\text{Recuperació (\%)} = \frac{[\text{Vit}]_n - [\text{Vit}]_{n,\text{dopada}}}{[\text{Vit}]_{\text{addicionat}}} \times 100$$

Equació 10. Recuperació per una matriu determinada.

4.5.5 Precisió

La precisió és una mesura per avaluar quan propers son els resultats entre ells. Descriu la propagació dels resultats (desviació estàndard relativa), calculada a partir dels resultat obtinguts mitjançant la mesura replicada en un material adient sota condicions específiques. Es pot dividir la precisió depenent d'aquestes condicions, així doncs es parla de repetibilitat quan els anàlisis es realitzen amb les mateixes condicions (mateix analista, mateix equip, mateix laboratori, mateix dia), de precisió intermitja quan els anàlisis es realitzen amb les mínimes variacions d'aquestes condicions (diferents analistes, mateix equip, mateix laboratori, diferents dies) i reproductibilitat quan els anàlisis es realitzen amb el màxim de variació de condicions possibles (diferents analistes, diferents equips, diferent laboratori, diferents dies). La validació del nostre mètode, només es centrarà en la repetibilitat i la precisió intermitja, degut a que en aquest moment no es possible realitzar anàlisis interlaboratori³.

Per tal d'avaluar la repetibilitat la Eurachem descriu que es necessari l'anàlisi per duplicat de 6 a 15 mostres amb les condicions de repetibilitat i determinar la desviació estàndard dels resultats i seguidament la desviació estàndard de repetibilitat per cada material. Pel que fa l'avaluació de la precisió intermitja es necessari realitzar el mateix numero d'anàlisi per duplicat amb les condicions abans descrites, seguidament determinar la desviació estàndard dels resultats i estimar la desviació estàndard de la precisió intermitja.³

Per tal de disminuir el temps de l'experimentació, seguint l'ANEX C de la guia Eurachem es pot obtenir una sèrie de dades replicades que es poden agrupar d'una mateixa manera, per exemple, per analista, instrument, dia, laboratori, etc. Aquest tipus de disseny rep el nom de "anidado", ja que correspon a un experiment en el que es poden avaluar distintes mesures de precisió³.

La variació total en aquesta sèrie complerta es pot representar com la combinació de variàncies entre grups i dintre de grups. S'utilitza l'anàlisi estadística ANOVA per tal d'avaluar els resultats mitjançant el tipus d'estudi experimental. Conseqüentment, per determinar la precisió s'ha optat per la realització d'anàlisis per duplicat d'una mostra rutina 4 dies diferents amb les condicions de repetibilitat.³

Per tant s'obtenen 4 grups de dades (p) i 16 resultats (N). Amb l'ajuda del software Microsoft Excel es desenvolupa l'estructura de l'ANOVA d'un factor descrit a la taula 9. Conseqüentment es calcula la desviació estàndard de repetibilitat amb l'equació 11 i la desviació estàndard de precisió intermitja amb l'equació 12³.

Taula 9. Estructura d'una taula ANOVA d'un factor

Font de variació	Suma de quadrats (SS)	G.l.l	Quadrat promig (MS)	F	P	F _{crit}
Entre grups	SSe	p-1	MSe = SSe/(p-1)	MSe/MSi		
Intra grups (residuals)	SSi	N-p	MSd = SSd/(N-p)	-		
Total	SStot = SSe+SSi	N-1	-	-		

$$S_r = \sqrt{MS_i}$$

Equació 11. Desviació estàndard repetibilitat

$$S_I = \sqrt{s_r^2 + s_i^2}$$

Equació 12. Desviació estàndard precisió intermitja

$$S_i = \sqrt{\frac{MS_e - MS_i}{n}}$$

Equació 13. Contribució a la variació total del factor agrupament

5. Discussió de resultats

5.1 Condicions inicials e identificació dels pics

Taula 10. Condicions inicials HPLC

Volum d'injecció	20 µL	
Flux Isocràtic	1 mL/min	
Temperatura	35 °C	
Detector	Vitamines	Longituds d'ona (nm)
	Vitamina A	325
	Vitamina D2	265
	Vitamina D3	265

	Vitamina E	292
Temps d'anàlisi	10min	

Tal i com s'ha parlat prèviament, s'ha avaluat el temps de retenció especialment a la vitamina A. El temps de retenció de la vitamina A és molt baix per la columna C18 polar degut a que és més polar i per tant la interacció és menor. Per tant la columna Kinetex C18 és la millor opció i els temps de retenció i longituds d'ona màxima per aquesta columna s'observen a la taula 11.

Taula 11. Temps de retenció i longituds d'ona màxima a la columna C18

Tipus de Vitamina	Temps de retenció (min)	Longitud d'ona màxima (nm)	Temps d'activació (min)
Vitamina A	1.9	325	2,5
Vitamina D2	4.3	265	2,5
Vitamina D3	4.5	265	
Vitamina E	6.0	292	4

Per altra banda s'avalua el factor de resolució de les vitamines mitjançant l'equació 2, on la concentracions de les vitamines s'aproximen a 1ppm, i es conclou que la composició òptima de la fase mòbil és la de 95% MetOH i 5% Aigua ultrapura.

Taula 12. Comparació composició fase mòbil

Composició Fase mòbil	T _r D2	T _r D3	W _{D2}	W _{D3}	R
%MetOH/%H₂O					
90/10	10.31	10.56	0.329	0.442	0.6485
93/7	6.02	6.17	0.291	0.574	0.3468
95/5	4.29	4.40	0.179	0.366	1.17

Com es pot observar a la figura 10 i a la taula 12, la separació de la vitamina D2 y D3 al 95% MetOH i 5% H₂O es pot treballar perquè el valor de la R és més gran que per les altres composicions, i a R més grans millor resolució¹⁴.

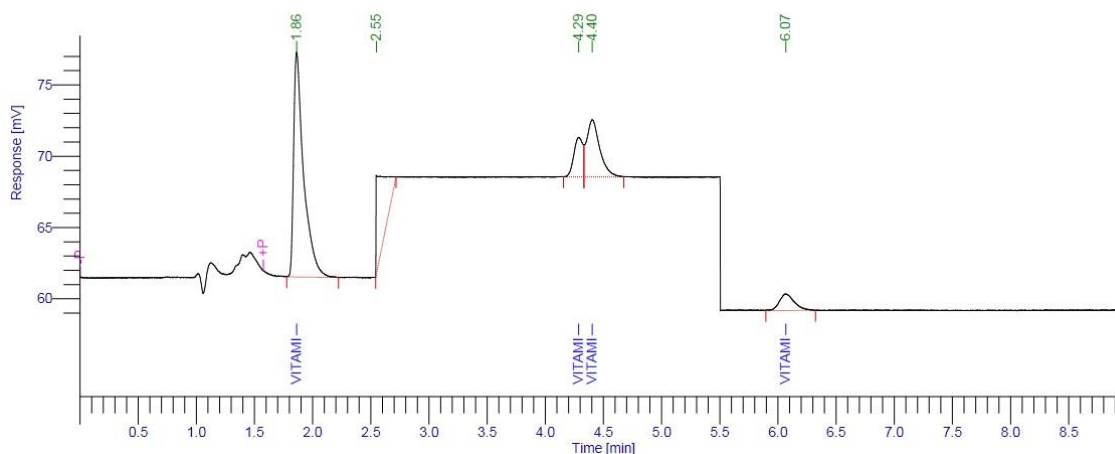


Figura 10. Cromatograma de determinació simultània Vitamina A, D2, D3 i E a 95% MetOH i 5% H₂O

5.2 Optimització del mètode

Com ja s'ha parlat prèviament per tal de realitzar l'optimització del mètode, s'ha portat a terme el disseny experimental descrit a la taula 8 i degut a que no es té cap recta de regressió les comparacions de resultats es porten a terme comparant les Àrees dels cromatogrames obtinguts i la seva relació $[\text{Àrea vitamina}]/[\text{Àrea Vitamina D}_2]$ (PI). A les taules que apareixen a continuació només es veuen reflexats els valors de les àrees de pics, els resultats de la relació esmentada es poden apreciar a l'ANEX 2.

Pel que fa l'avaluació de la temperatura de saponificació tal i com descriu el disseny experimental, avalua el límit superior, el límit inferior i un punt central. Els resultats obtinguts quan s'ha analitzat les vitamines d'interès amb el PI escollit s'observen a la taula 13.

Taula 13. Avaluació de temperatura de saponificació

Vitamina	[mg/L]	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 70°C	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 85°C	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 100°C
Vitamina A	20	710832.15	636244.74	69602.16
Vitamina D2	20	287739.95	241225.98	239706.11
Vitamina D3	50	2679816.75	2634249.92	2653356.62
Vitamina E	28.7	193752.16	172389.03	183695.82

Com s'observa a la taula 13, algunes vitamines comencen a degradar-se quan la temperatura de saponificació augmenta a 100°C. Malgrat això es pot treure la conclusió que la temperatura òptima de la saponificació és 70°C; ja que les relacions amb el PI són aproximadament semblants a 70 i 85°C i per tant s'avalua l'obtenció de més àrea.

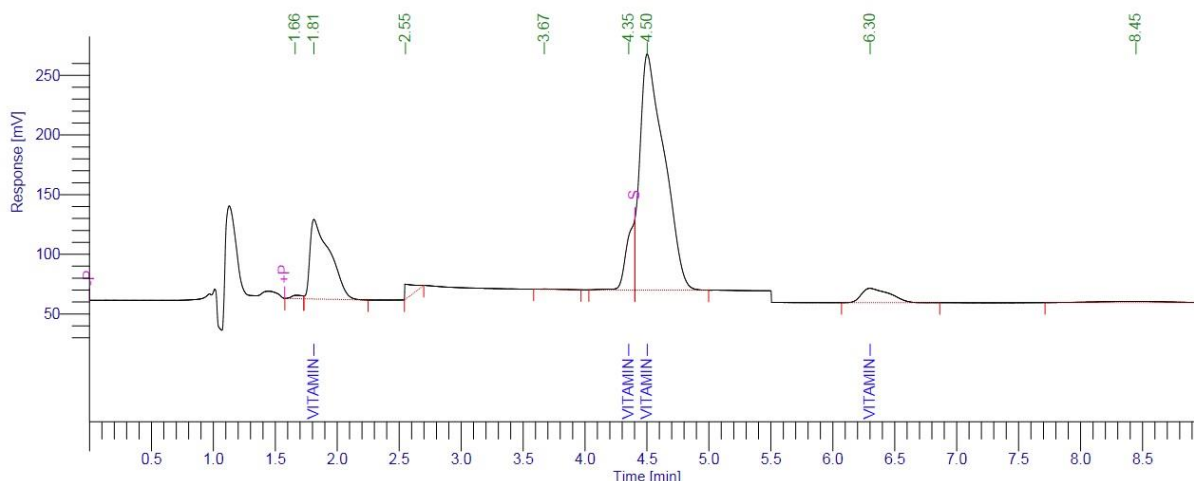


Figura 11. Cromatograma d'optimització a 70°C

Tal i com s'aprecia, la concentració escollida per la vitamina D2 i D3 resulta una mica alta i això fa que la identificació i separació cromatogràfica resulta complicada. Amb aquestes apreciacions s'ha optat per canviar la concentració de la vitamina D2 i D3 a 2 i 5ppm respectivament per els següents factors a optimitzar.

Seguint amb l'optimització dels factors influents es fixa la temperatura òptima de la saponificació a 70°C i en aquest cas s'ha avaluat el temps de la saponificació obtenint els resultats reflexats a la taula 14.

Taula 14. Avaluació del temps de saponificació

Vitamina	[mg/L]	Àrea (µV·s) 15 min	Àrea (µV·s) 45min	Àrea (µV·s) 60min
Vitamina A	20	722193.5	743374.78	708364.61
Vitamina D2	2	27562.69	32704.02	33209.14
Vitamina D3	5	308856.67	315393.73	306824.87
Vitamina E	28.7	-	-	-

Per aquesta avaluació no es va deixar el temps suficient d'equilibri per la columna, per aquest motiu el pic de la vitamina E va sortir molt desplaçat i no es va poder determinar l'àrea que pertanyia aquest pic tal i com s'observa a la figura 12. Cal saber que just abans es va estar treballant amb un mètode on la fase mòbil es una solució tampó la qual cosa feia difícil tenir un temps curt d'equilibri al canviar al mètode que s'està optimitzant.

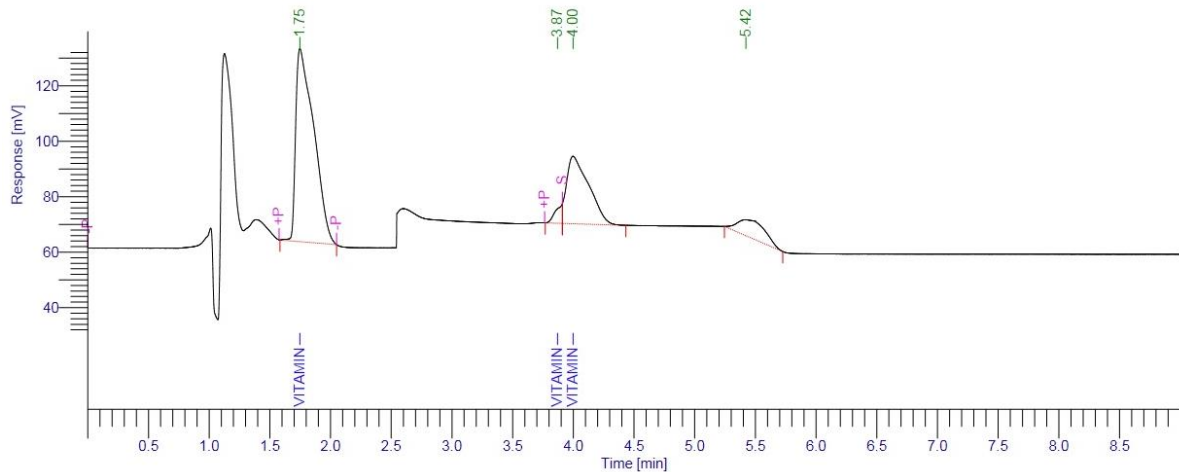


Figura 12. Cromatograma d'optimització 15 minuts

No obstant es va fer la comparació amb els resultats obtinguts de les vitamines A, D2 i D3, i no es te en compte els resultats de la vitamina E. Així doncs es pot concloure que el temps òptim de saponificació és 45minuts, ja que la relació amb el PI és semblant entre els experiments i als 45 min s'obté més àrea.

Per altra banda, a l'optimització dels factors influents a l'extracció d'analits s'ha avaluat el numero d'extraccions que es realitzen, obtenint els resultats reflexats a la taula 15.

Taula 15. Avaluació del numero d'extraccions

Vitamina	[mg/L]	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 2 extraccions	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 3 extraccions	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 4 extraccions
Vitamina A	20	73250.18	73100.71	72990.89
Vitamina D2	2	36679.72	36504.62	36203.34
Vitamina D3	5			
Vitamina E	28.7	18174.84	17990.13	18200.31

En aquest cas per motius que encara no es sabia les vitamines D2 i D3 no van tenir la separació esperada, tot i que els temps de retenció semblen a simple vista no haver-se desplaçat tal i com s'observa en el cromatograma de la figura 13 referent a 2 extraccions. Es va haver d'avaluar la suma de les àrees d'aquestes, però no es va poder avaluar la relació amb el PI.

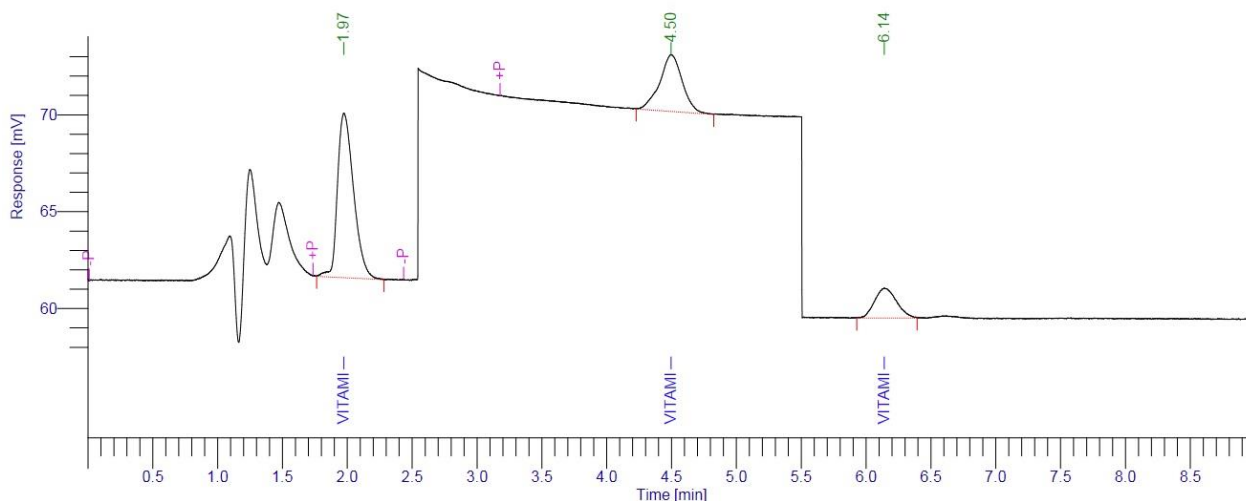


Figura 13. Cromatograma d'optimització 2 extraccions

Malgrat això, s'avaluen els resultats i es conclou que no es troben diferències significatives. Llavors per tal de disminuir el temps d'anàlisi es pren 2 extraccions com a valor òptim per aquest factor d'influència.

Finalment amb l'avaluació del número de neteges que s'ha de realitzar a la fase orgànica recuperada a l'extracció, es finalitza amb l'optimització del mètode. Els resultats es poden observar a la taula 16.

Taula 16. Avaluació del número de neteges

Vitamina	[mg/L]	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 2 extraccions	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 3 extraccions	Àrea ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) 4 extraccions
Vitamina A	20	663572.54	665143.04	513924.15
Vitamina D2	2	34359.57	31205.50	25148.37
Vitamina D3	5	317542.46	316687.86	267049.24
Vitamina E	28.7	-	-	-

Com s'observa, amb 4 extraccions es comença a tenir pèrdues degut als errors sistemàtics del procediment analític. Per altra banda s'observa que entre 2 i 3 neteges no es troben diferències significatives ni amb la relació amb el PI ni amb les àrees, llavors per tal de disminuir el temps d'anàlisi es pren 2 extraccions com a valor òptim per aquest factor d'influència.

5.2.1 Condicions finals de l'anàlisi

Així doncs les condicions per l'anàlisi de mostres consisteix en pesar de 0,1 a 3 grams de mostra homogeneïtzada per un molinet i amb les condicions finals pel tractament de la mostra reflexades a la taula 17.

Taula 17. Condicions finals del l'anàlisi amb el mètode desenvolupat

Condicions saponificació			
Volum metanol (mL)	30		
Àcid ascòrbic (g)	1		
Volum solució KOH 50% (mL)	10		
Temperatura (°C)	70		
Temps de reacció (min)	45		
Volum H₂O per 1:1 MetOH	30		
Condicions Extracció			
Volum extracció solució n-hexà 20% èter dietílic (mL)	50		
Numero d'extraccions	2		
Número de neteges	2		
Condicions evaporació			
Temperatura Bany H₂O (°C)	40		
Pressió (kPa)	20		
Revolucions per minut	260		
Condicions Cromatogràfiques			
Composició Fase mòbil	95:5		
%(MetOH: H₂O)	t_{Equilibri} (min)	t_{Anàlisi} (min)	
isocràtic	10	9	
Flux (mL/min)	1		
Volum d'injecció (µL)	20		
Temperatura Forn (°C)	35		
Detector	Vitamina	Temps (min)	Longitud d'ona (nm)
	A	2.5	325

D3	2.5	265
E	4	292

Finalitzada l'optimització del mètode, van sorgir problemes a l'hora de validar-lo, a causa de que la columna cromatogràfica va començar a donar problemes a l'hora de la separació dels pics del que era el PI; la vitamina D2, i l'analit vitamina D3. En primer lloc, es va pensar que la causa podria ser el poc temps d'equilibri posterior a la utilització de la columna per l'altra mètode mencionat o un error de l'analista. Per tant es van analitzar patrons de 1 ppm de D2 i D3 per separat i combinats. Com es seguia obtenint el mateix resultat es va pensar que el problema podria ser causats pels patrons, com contaminació d'aquests o degradació del patró; per aquest motiu es va tornar a elaborar els patrons de D2 i D3 i realitzar les mateixes proves d'abans. Tot i això es seguia obtenint el mateix resultat.

Un cop descartat aquestes possibles causes, es va pensar que podria ser un problema de la columna, així doncs es va portar a terme la neteja de la columna segons les especificacions del fabricant.

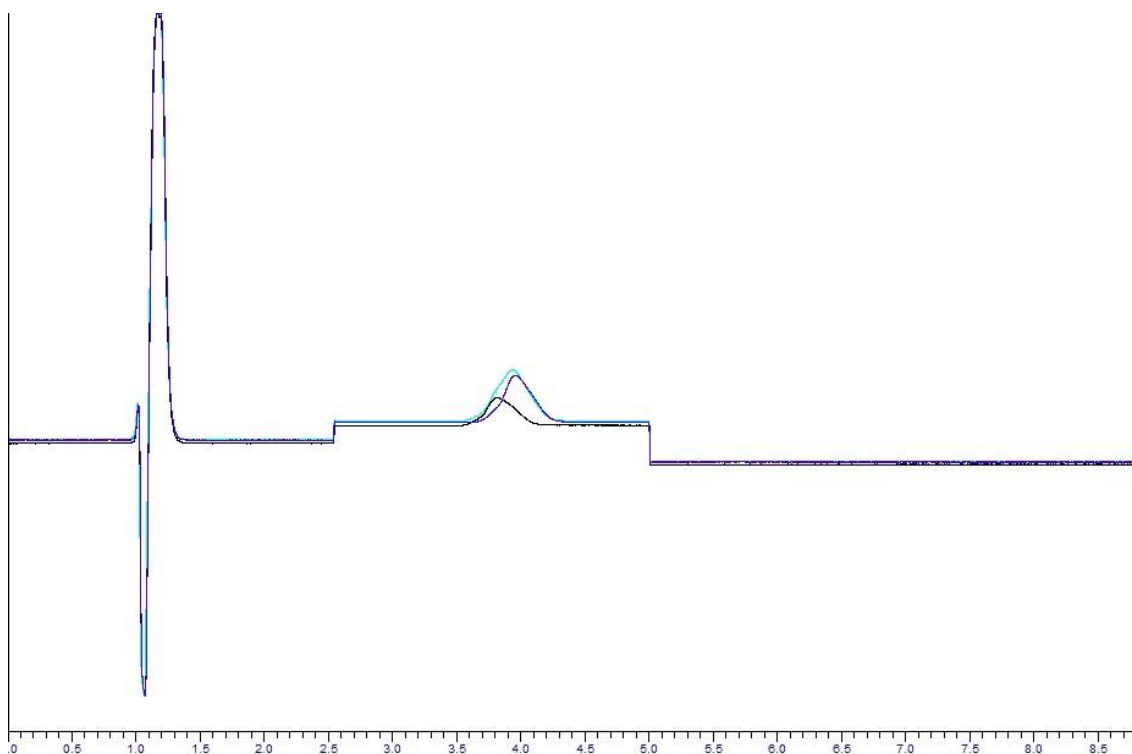


Figura 14. Cromatograma superposat dels patrons de la Vitamina D2 individual (senyal negra), Vitamina D3 individual (senyal blava) i el patró combinat D2 i D3 (senyal blau cel).

Per tant amb aquests resultats es va optar posar-se en contacte amb Phenomenex; el distribuïdor de la columna, que va suggerir regenerar la columna amb les condicions especificades en la informació tècnica facilitada, aquest procediment va tenir una durada de 1 dia. Però com s'observa a la figura 14, la separació cromatogràfica no es va poder recuperar.

Davant aquest inconvenient, les condicions actuals obliga a deixar de costat l'opció d'utilització de patró intern, per aquest motiu les calibracions s'han portat a terme amb una regressió lineal de patrons externs i obligant a determinar la recuperació de cada matriu utilitzada.

5.3 Validació del mètode

La validació d'un mètode com s'ha vist, és molt laboriosa ja que consta d'un procediment experimental exhaustiu. Al laboratori no es va poder disposar de blancs de matriu ni mostres de referència, per aquest motiu la validació completa no va ser possible. Però en un futur proper s'espera l'obtenció d'aquests i poder finalitzar la validació dels paràmetres de selectivitat i biaix d'aquest mètode. Als següents apartats s'exposen els resultats dels paràmetres que s'han pogut validar.

5.3.1 Determinació de LOD i LOQ

Per la determinació d'aquests límits, s'han portat a terme 10 anàlisis de patrons combinats amb concentracions properes al LOD de les 3 vitamines d'interès, seguidament els valors de LOD i LOQ es van calcular amb les equacions 6,7 i 8 i els resultats s'observen a la taula 18.

Taula 18. Resultats dels anàlisis per la determinació de LOD i LOQ

Nº Anàlisi	Vitamina A	Vitamina D3	Vitamina E
	[0.1 mg/L]	[0.2 mg/L]	[1.3 mg/L]
1	0.1603	0.1765	1.3128
2	0.1265	0.2257	1.5083
3	0.1471	0.1948	1.3208
4	0.1372	0.2151	1.4032
5	0.1289	0.1788	1.4941
6	0.1332	0.2246	1.3111
7	0.1477	0.2094	1.3949
8	0.1451	0.1955	1.3117
9	0.1313	0.2002	1.3188
10	0.1437	0.2047	1.2485
DESVIACIÓ ESTÀNDAR	0.0105	0.0169	0.0854

LOD	0.0315	0.0507	0.2562
LOQ	0.1052	0.1696	0.8539

5.3.2 Interval de treball i interval de linealitat

Inicialment es van analitzar 6 patrons combinats (amb totes 3 vitamines), a els següents rangs (començant pel LOQ abans calculat) amb concentracions equidistants³:

- Vitamina A: [0,1-12,5] mg/L
- Vitamina D3: [0,2-12,5]mg/L
- Vitamina E: [0,8-50]mg/L

A la figura 15 es representa les rectes obtingudes. Com es pot observar qualitativament, el rang escollit manté, *a priori*, la linealitat.

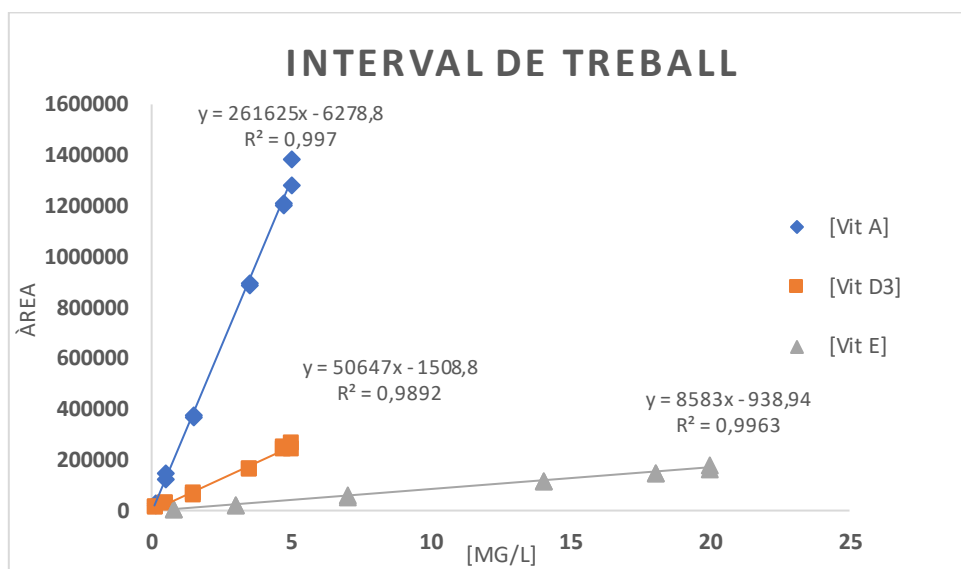


Figura 15. Representació de la regressió lineal de l'interval de treball. Recta taronja Vitamina D3, Recta blava Vitamina A i recta gris vitamina E.

Per acabar de definir l'interval lineal, i conseqüentment la nostra recta de calibració, es va decidir treballar en uns rangs més curts, que s'ajustaven millor a les necessitats del laboratori.

Així doncs, es van analitzar per duplicat patrons a 6 concentracions diferents, però aquest cop definint millor els extrems de la recta de calibració, ja que segons la distribució de errors en una recta, aquesta zona és la més crítica.

Els patrons utilitzats van ser:

- Vitamina A (mg/L): 0.1 – 0.5 – 1.5 – 3.5 – 4.7 – 5.0
- Vitamina D3 (mg/L): 0.2 – 0.5 – 1.5 – 3.5 – 4.7 – 5.0
- Vitamina E (mg/L): 0.8 – 3.0 – 7.0 – 14.0 – 18.0 – 20.0

En aquest cas, per confirmar que el model escollit (calibració amb regressió lineal) és el correcte, es fa un estudi estadístic dels residuals, a més d'una primera avaluació del coeficient de determinació (R^2)¹⁵.

En la calibració de la vitamina A s'obté un R^2 de 0.997. Tradicionalment, i com s'indica a la referència [14], un R^2 superior a 0.99, com en aquest cas, indica la possible linealitat de la recta, però no la confirma. La figura 16, correspon a la calibració obtinguda i el residuals al llarg de la recta. S'observa una desviació gran en l'últim punt de la recta.

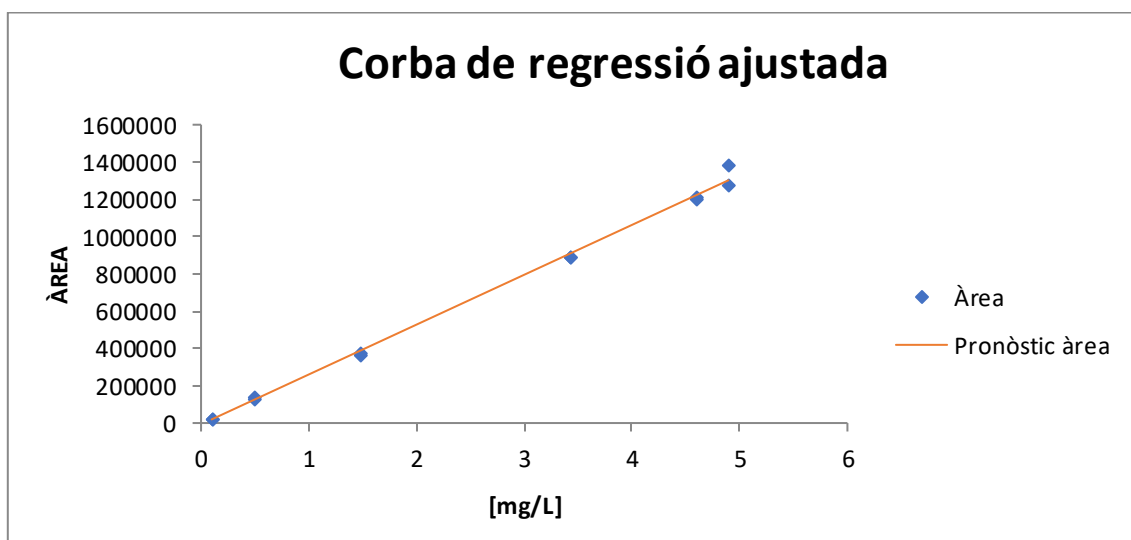


Figura 16. Corba regressió ajustada Vitamina A

Fent un gràfic dels residuals estandaritzats, es pot avaluar possibles tendències i punts discrepants o *outliers* presents. A la figura 17, el gràfic de residuals indica una clara tendència descendent, a excepció de l'últim punt, que té un valor per damunt de 2, confirmant que estem davant d'un *outlier*¹⁵.

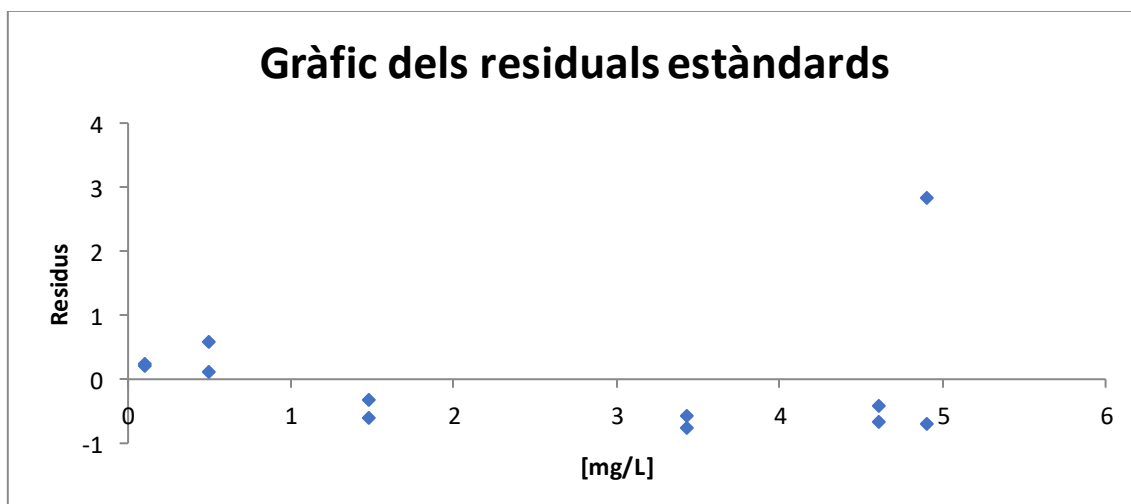


Figura 17. Primer gràfic de residuals Vitamina A

Eliminant aquest punt, s'obté una nova recta de calibració i un nou gràfic de residuals; figura 18 i 19 respectivament. S'observa com la tendència abans esmentada desapareix en el nou gràfic

de control, distribuint-se els punts aleatòriament al voltant del 0. Per tant, es pot confirmar que aquesta última recta és vàlida.

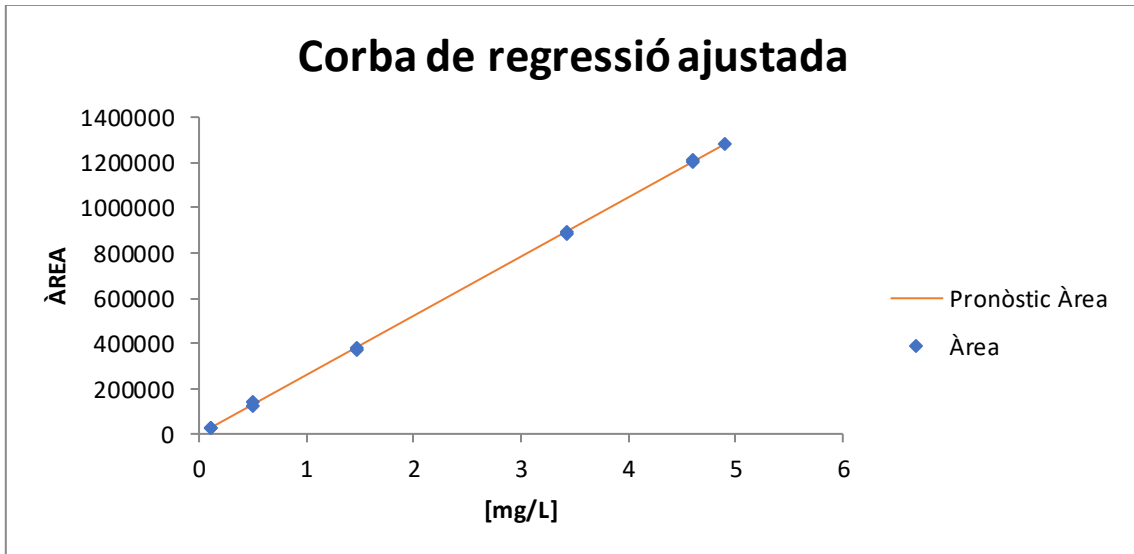


Figura 18. Corba de regressió Vitamina A sense el punt discrepant

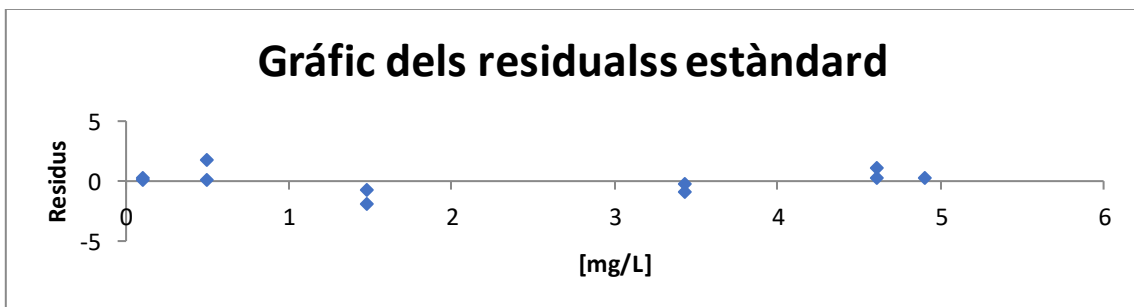


Figura 19. Gràfic de residualls Vitamina A sense el punt discrepant

Seguidament es torna a fer el mateix estudi estadístic per a la vitamina D i E. En aquests casos no es troba cap tendència ni punt discrepant. En la figura 20 i 21 s'observen les distribucions dels residualls estàndard, on no s'observa cap tendència ni cap valor per damunt de 2.

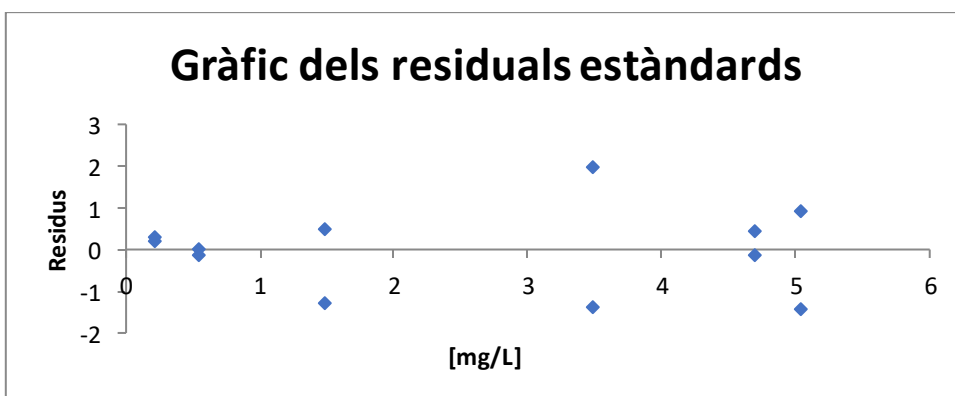


Figura 20. Gràfic de residualls Vitamina D3 amb distribució aleatòria i cap punt discrepant

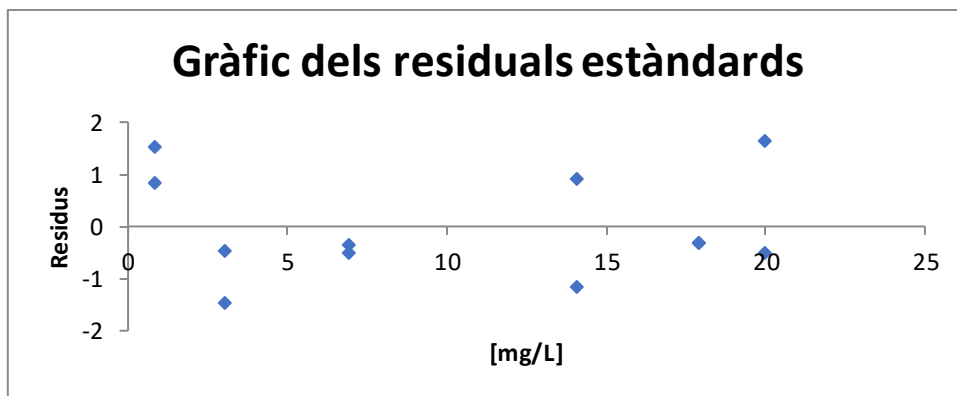


Figura 21. Gràfic dels residuals Vitamina E amb distribució aleatòria i cap punt discrepant.

En darrer terme, es finalitza amb la validació de les rectes de calibratge obtenint els resultats a la taula 19.

Taula 19. Rectes de calibratge finals per totes 3 vitamines

Vitamines	Pendent	Ordenada a l'origen	Coefficient de determinació
Vitamina A	261618x	-1255.4	0.9998
Vitamina D3	51601	-196.88	0.9976
Vitamina E	8427.2	-140.69	1

5.3.3 Recuperació

Amb la recta de calibratge feta, es van analitzar les mostres de rutina de suplementos vitamínics abans esmentat; sense dopar i dopades, essent les concentracions adicionades les següents:

- Vitamina A (mg/L): 0.95
- Vitamina D3 (mg/L): 0.67
- Vitamina E (mg/L): 5.51

A la taula 20 s'observen els resultats de les concentracions normalitzades de les vitamines a les mostres dopades i sense dopar, a més del valor de la recuperació.

Taula 20. Resultats del càlcul de la recuperació

Mostres	[A] _n (mg/L)	[D ₃] _n (mg/L)	[E] _n (mg/L)
Mostra 1	1.29	1.70	13.80
Mostra 2	1.17	1.61	13.43
Mostra 3	1.37	1.71	12.72

Mostra 4 dopada	2.12	2.18	17.99
Mostra 5 dopada	1.97	2.18	18.28
Mostra 6 dopada	2.06	2.34	17.96
Mitjana no dopada	1.27	1.67	13.32
Mitjana dopada	2.05	2.23	18.07
Recuperació (%)	81.34	83.46	86.32

Com s'observa a aquesta taula, els valors de recuperació no son superiors al 90%, però això pot ser degut a que no s'ha realitzat la calibració amb PI com s'havia plantejat inicialment o no haver fet ús d'una corrent de nitrogen per evitar les oxidacions de les vitamines al tractament de la mostra.

5.3.4 Precisió

Com s'ha mencionat prèviament s'ha desenvolupat el disseny "anidado" per tal de disminuir el numero d'experiments per la validació d'aquest paràmetre. A la taula 21 es presenta els resultats havent aplicat el factor de recuperació abans calculat.³

Taula 21. Resultats de les 8 mostres analitzades amb el mètode sota condicions de repetibilitat amb diferents analistes.

Dia	Analista/mostra	[A] mg/L real	[D₃] mg/L real	[E] mg/L real
1	Bryan M1	7.04	9.54	75.76
	Bryan M2	7.16	10.14	76.60
2	Alba M1	8.61	10.37	77.43
	Alba M2	8.34	10.35	81.29
3	Iván M1	7.91	10.19	73.67
	Iván M1	6.95	9.92	75.44
4	Héctor M1	8.44	9.67	80.02
	Héctor M2	8.19	9.94	78.85
	Mitjana	7.83	10.01	77.38

Seguidament amb l'ajuda de les eines d'anàlisi estadístic de Microsoft Excel, es realitza l'anàlisi de variància per cada vitamina i posteriorment calcular la desviació estàndard de repetibilitat i precisió intermitja per cadascuna d'elles.

En primer lloc s'avalua la repetibilitat i precisió intermitja de la vitamina A. Obtenint l'anàlisi ANOVA de la Taula 22 i 23.

RESUM				
Grups	Compte	Suma	mitjana	Variància
ivan	2,00	14,20	7,10	0,01
alba	2,00	16,95	8,48	0,04
bryan	2,00	14,86	7,43	0,47
Hector	2,00	16,63	8,32	0,03

Taula 22. Taula resum de l'anàlisi ANOVA per la vitamina A

ANÀLISIS DE VARIÀNCIA						
Origen de les variacions	Suma de quadrats	Graus de llibertat (g.l)	Mitjana dels quadrats	F	Probabilitat	Valor crític per F
Entre grups	2,69	3,00	0,90	6,58	0,05	6,59
Dintre dels grups	0,54	4,00	0,14			
Total	3,23	7,00				

Taula 23. Resultats dels valors d'ANOVA d'un factor per la vitamina A

Amb aquests resultats, es calcula la desviació estàndard de la repetibilitat amb l'equació 11. On MS_i es calcula amb l'arrel quadrada de la mitjana dels quadrats dintre dels grups obtinguts de la taula 23.

Pel que fa la desviació estàndard de la precisió intermitja es calcula amb l'equació 12. Que presenta l'arrel quadrada de la suma de la variància de la repetibilitat i el quadrat de la variació total del factor agrupament calculat amb l'equació 13³. On MS_e és la mitjana dels quadrats entre grups i MS_i la mitjana dels quadrats dintre dels grups obtinguts a la taula 23.

Conseqüentment es realitza el mateix procediment per les vitamines D₃ i E, obtenint els resultats; a la taula 24, de la precisió en tant per cent mitjançant l'equació 14 i 15.

$$\text{Repetibilitat \%} = \frac{S_r}{[vit]} \times 100$$

Equació 14. Equació per la repetibilitat en tant per cent. Com a quocient de S_r i la mitjana de les concentracions de les vitamines

$$\text{Precisió intermitja \%} = \frac{S_I}{[vit]} \times 100$$

Equació 15. Equació per la precisió intermitja en tant per cent. Com a quocient de S_I i la mitjana de les concentracions de les vitamines

Taula 24. Resultats de l'avaluació de precisió

Vitamines	Precisió	
	Condicions repetibilitat %	Condicions Precisió intermitja %
Vitamina A	4.71	9.17
Vitamina D ₃	2.51	3.11
Vitamina E	2.05	3.45

Els valors de repetibilitat no han de superar el 5% ^{5, 6, 9} i en aquest cas s'obtenen valors acceptables. Per altra part la precisió intermitja acostuma a ésser més elevada degut a que la causa de les desviacions són alienes a les condicions de mesura. Malgrat això, es pensa que aquestes variacions es poden disminuir amb la utilització de patró intern i corrent de nitrogen.

6. Conclusions

Per acabar, es conclou que els objectius del treball han quedat complerts. Malgrat als problemes que van sorgir a l'hora de validar el mètode.

El laboratori queda pendent de trobar una solució amb l'ajuda del fabricant, per la separació cromatogràfica de les vitamines D amb la columna treballada.

Per altra banda queda pendent confirmar que amb la utilització d'un corrent de nitrogen i l'ús de PI pel tractament de la mostra, s'obtenen millors recuperacions i per tant els valors de precisió seran més baixos.

Amb l'adquisició de blancs de mostres i material de referència, queda pendent finalitzar la validació del mètode.

Amb els resultats obtinguts s'accepta l'optimització del mètode.

7. Bibliografía

- (1) Requisitos generales para la competencia de los Laboratorios de ensayo y calibración. UNE-EN ISO/IEC 17025.
- (2) Perez, M.; Ruano, A. Vitaminas y Salud. Elsevier 2013, 23, 24–27.
- (3) Morrillas, P.; Barwick, V.; Ellison Stephen; Engman, J.; Magnusson, B. Guía Eurachem: La Adecuación Al Uso de Los Métodos Analíticos – Una Guía de Laboratorio Para La Validación de Métodos y Temas Relacionados; 2016.
- (4) R, P. J. C. Aplicación Del Método de Estándar Interno a La Cromatografía de Gases. 2003, 1000, 1–2.
- (5) Productos alimenticios. Determinación de vitamina D mediante cromatografía líquida de alta eficacia. UNE-EN 12821
- (6) Productos alimenticios. Determinación de vitamina E mediante cromatografía líquida de alta resolución. EN 12822:2014
- (7) http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf (data de consulta 20-07-2018)
- (8) Phenomenex. Phenomenex breaking with tradition. <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology> (data de consulta 18-07-2018)
- (9) Alimentos para animales. Determinación del contenido de vitamina A Método por cromatografía líquida de alta resolución. ISO 14565:2000
- (10) http://www.eduni.uni.edu.pe/3cera_edi_5_Quimica_III_ultimo.pdf (data de consulta 25-07-2018)
- (11) Professorat Universitat Rovira i Virgili. Tema 4 i 5. Tècniques analítiques avançades. Disseny d'experiments.
- (12) Equipo de Soporte de Minitab 18. Soporte de Minitab 18. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/#what-is-a-box-behnken-design>. (data de consulta 24-07-2018)
- (13) <http://www.aeas.es/documentos/guiafuncionamientolaboratoriosensayoaguas2.pdf> (data de consulta 08-08-2018)
- (14) <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf>. (data de consulta 08-08-2018)
- (15) Riu, J.; Boqué, R. Calibración Lineal. Tec. Lab. 2003, 1–8.
- (16) Alimentos para animales. Determinación del contenido de vitamina E Método por cromatografía líquida de alta resolución. ISO 6867:2000.

- (17) Productos alimenticios. Determinación de vitamina A mediante cromatografía líquida de alta resolución. EN 12823-1:2014.
- (18) Qian, H.; Sheng, M. Simultaneous Determination of Fat-Soluble Vitamins A, D and E and pro-Vitamin D2 in Animal Feeds by One-Step Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Analysis. *J. Chromatogr. A* 1998, 825 (2), 127–133.
- (19) Chotyakul, N.; Pateiro-Moure, M.; Saraiva, J. A.; Torres, J. A.; Pérez-Lamela, C. Simultaneous HPLC-DAD Quantification of Vitamins A and E Content in Raw, Pasteurized, and UHT Cow's Milk and Their Changes during Storage. *Eur. Food Res. Technol.* 2014, 238 (4), 535–547.
- (20) Boyer, F. O.; Romero, J. M. F.; de Castro, M. D. L.; Quesada, J. M. Determination of Vitamins D2, D3, K1 and K3 and Some Hydroxy Metabolites of Vitamin D3 in Plasma Using a Continuous Clean-up Preconcentration Procedure Coupled on Line with Liquid Chromatography UV Detection. *Analyst* 1999, 124, 401–406.
- (21) Rakuša, Z. T.; Srečnik, E.; Roškar, R. Novel HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Fat-Soluble Vitamins and Coenzyme Q10 in Medicines and Supplements. *Acta Chim. Slov.* 2017, 64 (3), 523–529.
- (22) Wang, L. H.; Huang, S. H. Determination of Vitamins A, D, E, and K in Human and Bovine Serum, and β -Carotene and Vitamin A Palmitate in Cosmetic and Pharmaceutical Products, by Isocratic HPLC. *Chromatographia* 2002, 55 (5–6), 289–296.
- (23) López-Cervantes, J.; Sánchez-Machado, D. I.; Ríos-Vázquez, N. J. High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Quantification of Retinol, α -Tocopherol, and Cholesterol in Shrimp Waste Hydrolysate. *J. Chromatogr. A* 2006, 1105 (1–2 SPEC. ISS.), 135–139.
- (24) Chauveau-Duriot, B.; Doreau, M.; Nozière, P.; Graulet, B. Simultaneous Quantification of Carotenoids, Retinol, and Tocopherols in Forages, Bovine Plasma, and Milk: Validation of a Novel UPLC Method. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397 (2), 777–790.
- (25) Chirkin, V. A.; Karpov, S. I.; Selemenev, V. F.; Shumskiy, N. I. Determination of Fat-Soluble Vitamins in Foods, Vitamin and Mineral Formulations, Feed Premixes, and Blood Serum by Reversed-Phase HPLC. *J. Anal. Chem.* 2013, 68 (8), 748–753.
- (26) Repositorio Institucional de la Universidad de Alicante. Tema 2. Cromatografía: Principios Generales. Universidad Alicant. 2006, 1–16.
- (27) Universitat de Barcelona. Tipos de extracciones. http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html. (Data de consulta 28-07-2018)

8. ANNEXOS

ANNEX 1.Matriu de treball Plackett-Burman amb 2 factors ficticis

Matriu de treball														
Experiments/variables	Temperatura (°C)	Temps de sedimentació (min)	Nombre de extraccions	Nombre de reteses	Dissolvent d'extracció	Tipus d'antioxidant	Llum	Atmosfera de Nitrogen	Alcohol de Sferificació	XDI				
1	100	50	2	4	èter de petroli 20% èter dietílic	Prigalol	Sin	Sin	Metanol	+	•			
2	70	50	4	2	èter de petroli 20% èter dietílic	Prigalol	Con	Sin	Metanol	•	+			
3	100	30	4	4	n-hexano 20% èter dietílic	Prigalol	Con	Con	Metanol	•	•			
4	70	50	2	4	èter de petroli 20% èter dietílic	Àcid Ascòrbic	Con	Con	Etanol	•	•			
5	100	30	4	2	èter de petroli 20% èter dietílic	Prigalol	Sin	Con	Etanol	+	•			
6	70	30	2	4	n-hexano 20% èter dietílic	Prigalol	Con	Sin	Etanol	+	+			
7	100	50	2	2	èter de petroli 20% èter dietílic	Àcid Ascòrbic	Con	Con	Metanol	+	+			
8	70	50	2	2	n-hexano 20% èter dietílic	Prigalol	Sin	Con	Etanol	•	+			
9	100	50	4	2	n-hexano 20% èter dietílic	Àcid Ascòrbic	Con	Sin	Etanol	+	•			
10	70	50	4	4	n-hexano 20% èter dietílic	Àcid Ascòrbic	Sin	Con	Metanol	+	+			
11	100	30	4	4	èter de petroli 20% èter dietílic	Àcid Ascòrbic	Sin	Sin	Etanol	•	+			
12	70	30	2	2	n-hexano 20% èter dietílic	Àcid Ascòrbic	Sin	Sin	Metanol	•	•			

ANNEX 2. Relacions [Àrea Vit]/ [Àrea PI]

Temperatura (°C)	[Àrea Vit.A]/ [Àrea PI]	[Àrea Vit D3]/ [Àrea PI]	[Àrea Vit E]/ [Àrea PI]
70	2.47	9.31	0.67
85	2.63	10.90	0.71
100	0.30	11.07	0.76

Taula A. Relacions amb el PI a la temperatura de saponificació.

Temps (min)	[Àrea Vit.A]/ [Àrea PI]	[Àrea Vit D3]/ [Àrea PI]	[Àrea Vit E]/ [Àrea PI]
15	26.20	11.20	-
45	22.12	9.7	-
100	21.33	9.24	-

Taula B. Relacions amb el PI al temps de saponificació.

ANNEX 3. Fitxes tècniques

Fichas Internacionales de Seguridad Química





METANOL		ICSC: 0057	
		Abril 2000	
Alcohol metílico		Carbínol	
CAS:	67-56-1	CH₄O / CH₃OH	
RTECS:	PC1400000	Masa molecular: 32.0	
NU:	1230		
CE Índice Anexo I:	603-001-00-X		
CE / EINECS:	200-659-6		
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	Altamente inflamable. Ver Notas.	Evitar las llamas, NO producir chispas y NO fumar. NO poner en contacto con oxidantes.	Polvo, espuma resistente al alcohol, agua en grandes cantidades, dióxido de carbono.
EXPLOSIÓN	Las mezclas vapor/aire son explosivas.	Sistema cerrado, ventilación, equipo eléctrico y de alumbrado a prueba de explosión. NO utilizar aire comprimido para llenar, vaciar o manipular. Utilizarse herramientas manuales no generadoras de chispas.	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.
EXPOSICIÓN		¡EVITAR LA EXPOSICIÓN DE ADOLESCENTES Y NIÑOS!	
Inhalación	Tos. Vértigo. Dolor de cabeza. Náuseas. Debilidad. Alteraciones de la vista.	Ventilación. Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	¡PUEDE ABSORBERSE! Piel seca. Enrojecimiento.	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar con agua abundante o ducharse. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor.	Gafas ajustadas de seguridad, o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal. Jaqueo. Vómitos. Convulsiones. Pérdida del conocimiento (para mayor información, véase Inhalación).	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Provocar el vómito (¡UNICAMENTE EN PERSONAS CONSCIENTES!). Proporcionar asistencia médica.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
Evacuar la zona de peligro. Ventilar. Recoger el líquido procedente de la fuga en recipientes precintables. Eliminar el residuo con agua abundante. Eliminar vapor con agua pulverizada. Traje de protección química, incluyendo equipo autónomo de respiración.		No transportar con alimentos y piensos. Clasificación UE Símbolo: F, T R: 11-23/24/25-39/23/24/25; S: (1/2)-7-16-36/37-45 Clasificación NU Clasificación de Peligros NU: 3 Riesgos Subsidiarios de las NU: 6.1; Grupo de Envasado NU: II	
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO	
Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-30S1230. Código NFPA: H 1; F 3; R 0;		A prueba de incendio. Separado de oxidantes fuertes, alimentos y piensos. Mantener en lugar fresco.	
<p>  </p> <p>Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © IPCS, CE 2000</p>			

VEASE INFORMACIÓN IMPORTANTE AL DORSO

Fichas Internacionales de Seguridad Química

PROPAN-2-OL




ICSC: 0554

 <p style="text-align: center;"> MINISTERIO DE TRABAJO Y ASUNTOS SOCIALES ESPAÑA PROPAN-2-OL 2-Propanol Alcohol isopropílico Isopropanol $C_3H_8O/(CH_3)_2CHOH$ Masa molecular: 60.1 </p>			
Nº CAS 67-63-0 Nº RTECS NT8050000 Nº ICSC 0554 Nº NU 1219 Nº CE 603-117-00-0			
TIPOS DE PELIGRO/ EXPOSICION	PELIGROS/ SINTOMAS AGUDOS	PREVENCION	PRIMEROS AUXILIOS/ LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	Altamente inflamable.	Evitar llama abierta, NO producir chispas y NO fumar.	Polvos, espuma resistente al alcohol, agua en grandes cantidades, dióxido de carbono.
EXPLOSION	Las mezclas vapor/aire son explosivas.	Sistema cerrado, ventilación, equipo eléctrico y de alumbrado a prueba de explosiones.	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones por pulverización con agua.
EXPOSICION			
• INHALACION	Dolor de garganta, tos, dolor de cabeza, vértigo, somnolencia. (Ver Ingestión)	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo y someter a atención médica.
• PIEL	Piel seca.	Guantes protectores.	Quitar las ropas contaminadas, aclarar la piel con agua y jabón.
• OJOS	Enrojecimiento.	Gafas ajustadas de seguridad o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después consultar a un médico.
• INGESTION	Dolor abdominal, dificultad respiratoria, náusea, pérdida del conocimiento, vómitos. (Además, ver Inhalación).	No comer, beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. NO provocar el vómito y someter a atención médica.
DERRAMAS Y FUGAS	ALMACENAMIENTO	ENVASADO Y ETIQUETADO	
Protección personal: filtro para gases y vapores orgánicos. Recoger el líquido procedente de la fuga en recipientes herméticos, absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro.	A prueba de incendio. Separado de oxidantes fuertes. Mantener en lugar frío. Bien cerrado.	símbolo F símbolo Xi R: 11-36-67 S: (2-)7-16-24/25-26 Nota 6 Clasificación de Peligros NU: 3 Grupo de Envasado NU: II CE:	
 			
VEASE AL DORSO INFORMACION IMPORTANTE			
ICSC: 0554		Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión de las Comunidades Europeas © CCE, IPCS, 2005	

Fichas Internacionales de Seguridad Química

HEXANO

ICSC: 0279






 <p style="text-align: center;"> HEXANO n-Hexano C_6H_{14} Masa molecular: 86.2 </p>			
N° CAS 110-54-3 N° RTECS MN9275000 N° ICSC 0279 N° NU 1208 N° CE 601-037-00-0			
			
TIPOS DE PELIGRO/ EXPOSICION	PELIGROS/ SINTOMAS AGUDOS	PREVENCION	PRIMEROS AUXILIOS/ LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	Aitadamente inflamable.	Evitar las llamas, NO producir chispas y NO fumar.	Polvo, AFFF, espuma, dióxido de carbono.
EXPLOSION	Las mezclas vaporaire son explosivas.	Sistema cerrado, ventilación, equipo eléctrico y de alumbrado a prueba de explosiones. NO utilizar aire comprimido para llenar, vaciar o manipular. Utilícense herramientas manuales no generadoras de chispas.	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.
EXPOSICION			
• INHALACION	Vértigo, somnolencia, dolor de cabeza, embotamiento, náuseas, debilidad, pérdida del conocimiento.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo y proporcionar asistencia médica.
• PIEL	Piel seca, enrojecimiento, dolor.	Guantes protectores.	Quitar las ropas contaminadas, aclarar y lavar la piel con agua y jabón y proporcionar asistencia médica.
• OJOS	Enrojecimiento, dolor.	Gafas ajustadas de seguridad, pantalla facial o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad) y proporcionar asistencia médica.
• INGESTION	Dolor abdominal, (para mayor información véase inhalación).	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca, NO provocar el vómito, reposo y proporcionar asistencia médica.
DERRAMAS Y FUGAS	ALMACENAMIENTO	ENVASADO Y ETIQUETADO	
Consultar a un experto. Eliminar toda fuente de ignición. Recoger, en la medida de lo posible, el líquido que se derrama y el ya derramado en recipientes herméticos, absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro. NO verterlo al alcantarillado, NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente. Protección personal: filtro respiratorio para gases y vapores orgánicos.	A prueba de incendio. Separado de oxidantes fuertes. Mantener bien cerrado.	símbolo F símbolo Xn símbolo N R: 11-38-48/20-51/53-62-65-67 S: (2)-9-16-29-33-36/37-51-62 Clasificación de Peligros NU: 3 Grupo de Envasado NU: II CE:	
			

VEASE AL DORSO INFORMACION IMPORTANTE

Fichas Internacionales de Seguridad Química

DIETILETER


ICSC: 0355


MINISTERIO DE TRABAJO Y ASUNTOS SOCIALES ESPAÑA

DIETILETER
Eter dietílico
Eter etílico
C₄H₁₀O

Masa molecular: 74.1



Nº CAS 60-29-7
Nº RTECS KI5775000
Nº ICSC 0355
Nº NU 1155
Nº CE 603-022-00-4



TIPOS DE PELIGRO/ EXPOSICION	PELIGROS/ SINTOMAS AGUDOS	PREVENCION	PRIMEROS AUXILIOS/ LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	Extremadamente inflamable.	Evitar las llamas, NO producir chispas y NO fumar. NO poner en contacto con superficies calientes.	Espuma resistente al alcohol, polvo, dióxido de carbono.
EXPLOSION	Las mezclas vapor/aire son explosivas.	Sistema cerrado, ventilación, equipo eléctrico y de alumbrado a prueba de explosiones. Evitar la generación de cargas electrostáticas (por ejemplo, mediante conexión a tierra). NO utilizar aire comprimido para llenar, vaciar o manipular. Utilícense herramientas manuales no generadoras de chispas.	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.
EXPOSICION			
• INHALACION	Dolor de cabeza, somnolencia, vómitos, narcosis, pérdida del conocimiento.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo, respiración artificial si estuviera indicada y proporcionar asistencia médica.
• PIEL	Piel seca.	Guantes protectores.	Quitar las ropas contaminadas, aclarar la piel con agua abundante o ducharse.
• OJOS	Enrojecimiento, dolor.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad) y proporcionar asistencia médica.
• INGESTION	Vértigo, somnolencia, vómitos.	No comer, ni beber ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. Dar a beber uno o dos vasos de agua. Proporcionar asistencia médica.
DERRAMAS Y FUGAS	ALMACENAMIENTO	ENVASADO Y ETIQUETADO	
Evacuar la zona de peligro. Consultar a un experto. Eliminar toda fuente de ignición. Recoger el líquido procedente de la fuga en recipientes herméticos, absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro. Protección personal adicional: respirador de filtro para gases y vapores orgánicos.	A prueba de incendio. Separado de oxidantes fuertes. Ver Peligros Químicos. Mantener en lugar fresco y en la oscuridad. Almacenar solamente si está estabilizado.	Hermético. símbolo F+ símbolo Xn R: 12-19-22-66-67 S: (2-)9-16-29-33 Clasificación de Peligros NU: 3 Grupo de Envasado NU: I	
		