

**Elvira Oliva López**

**Desarrollo de un método analítico por GC-FID para la determinación de  
escualeno en la fracción insaponificable del aceite de oliva**

**TREBALL DE FI DE GRAU**

**dirigit per la Dra. Maribel Matheu Malpartida**

**Grau de Química**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Tarragona**

**2014**

## **ABSTRACT**

The olive oil squalene is a compound which is getting relevance in cosmetics. It contributes interesting properties as anti-aging effect, hydration, sunscreen and others. It is also important in other fields, for example, in medicine, where it is used as chemopreventive agent for some type of cancers.

Clariant is involved in the cosmetic field and they produce a lot of products for cosmetics. Here is where the interest in producing squalene for cosmetics applications appears. For the time being, they are studying the possibility, and one of the means needed is a method which determinates the squalene content in samples.

The aim of this project is to develop a method for the squalene determination in the unsaponifiable fraction of olive oil samples by GC-FID. During the development of optimal conditions, a permanent distortion on the squalene peak forced to change the capillary column for another wider. This distortion was due to the capillary column saturation, probably because too much sample was being injected. Dissolving the sample made the smaller peaks disappeared. Changing the column fixed the distortion problem without dissolving the sample.

The identification of the sample peaks was carried out by injecting different standards. Not all peaks have been identified by lack of standards.

The choice of the appropriate solvent and internal standard was done by repeatability studies. Two solvents were tested, chloroform and ethyl acetate. Both of them are more or less volatile, but ethyl acetate gave better repeatability results, so it was chosen. Two different internal standards were tested, too: 1-octadecanol and 1-octadecene. Taking into account the premises that an internal standard must accomplish, 1-octadecene proved to be the adequate for squalene determination.

Once the accuracy and the linearity of the chromatograph were checked, the method accuracy and linearity were studied. Both gave optimal results, making the developed method useful for squalene determination. However, not all the validation parameters have been studied due to the limited time, so it would be interesting to continue optimizing the method.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. **Ámbito de trabajo y empresa**

Este trabajo se ha desarrollado en la empresa Clariant Ibérica Producción S.A. (Tarragona), concretamente en el laboratorio del Departamento de Control de Calidad.

La empresa Clariant es líder en el campo de especialidades químicas. Opera a nivel mundial, en los cinco continentes. Su sede se encuentra en Muttenz, cerca de Basilea (Suiza). Se fundó en el 1996 como un spin off de la compañía química *Sandoz*, la cual se estableció en Basel en el 1886. Clariant se expandió a través de la incorporación del negocio de productos químicos de especialidad de *Hoechst* (Alemania) en 1997, y las adquisiciones de *BTP Plc* (UK) en el 2000, y la división de *Ciba's Masterbatches* en 2006. En 2008 adquirió el proveedor líder de colorantes *Rite Systems and Ricon Colors* (U.S). La última adquisición se llevó a cabo en Abril del 2011, con la compra de la compañía de alta innovación en química especial, *Süid-Chemie*.

En España, Clariant cuenta con centros de producción en Tarragona, El Prat de Llobregat, Castellbisbal, Sant Andreu de la Barca, Yuncos (Toledo) y Artziniega (País Vasco); donde se fabrican productos para diferentes divisiones de productos.

Clariant en Tarragona tiene tres plantas de producción: la planta ETHOX, dedicada a la obtención de productos derivados del óxido de etileno y óxido de propileno (por reacciones de éstos con alcoholes, ácidos, aminas, etc.); la planta MPP ("Planta Multi-Propósitos"), que permite la producción de múltiples productos, y la planta AMPS (denominada así por el monómero principal que se usa en la planta, ácido 2-acrilamida-2-metilpropano sulfónico), destinada a la producción de determinados productos para cosmética y petróleo.

Los campos de aplicación de los productos que fabrica Clariant en Tarragona son muy variados: detergencia, cosmética, fitosanitarios, metalurgia, lubricantes industriales, pinturas y recubrimientos, refinería, minería, etc.

Dentro de los proyectos que tiene en estudio la empresa Clariant se encuentra el de la obtención y comercialización del escualeno para el sector de cosmética.

### 1.2. **El escualeno**

El escualeno es el 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, un hidrocarburo alifático cuya fórmula se presenta en la Figura 1. Tiene peso molecular de 422,81 y su punto de ebullición es de 285 °C. <sup>(1)</sup>

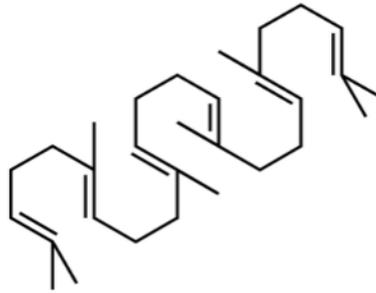


Figura 1: Fórmula del escualeno

El escualeno es una materia prima natural que se encuentra en el aceite de oliva. El aceite de oliva está constituido por dos fracciones: una fracción saponificable (98% del aceite) y otra insaponificable (entre el 0,5 y 1,5%). En la fracción saponificable se encuentran los triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres. Los constituyentes de la fracción insaponificable son los esteroides, hidrocarburos terpénicos (escualeno), compuestos fenólicos y flavonoides, pigmentos y compuestos volátiles, que son los responsables de los aromas de los aceites. El escualeno es el principal componente de la fracción insaponificable, pudiendo llegar hasta el 40% del peso total. <sup>(2)</sup>

Una de las principales diferencias entre el aceite de oliva y otros aceites vegetales radica en la cantidad de escualeno que contienen. El aceite de oliva contiene entre el 0,2 y 0,7% mientras que otros aceites vegetales contienen entre el 0,002 y 0,03%. La cantidad de escualeno en el aceite de oliva virgen se considera un indicador de adulteración <sup>(3)</sup> y dicho contenido depende del cultivo del olivo, de la tecnología de extracción del aceite y se ve enormemente reducida durante el proceso de refinamiento. <sup>(4)</sup>

La obtención de escualeno se puede resumir según el Esquema 1. Se trata de un proceso de separación física, evitando así el uso de posibles reactivos de extracción. Dado que el escualeno está destinado a aplicaciones cosméticas, la separación física evita posibles contaminaciones del escualeno con dichos reactivos.



Esquema 1: Proceso de obtención de escualeno a partir del aceite de oliva

El escualeno se usa en diferentes campos de aplicación. Es un producto de gran interés en investigación bioquímica y farmacéutica, ya que es el precursor natural de la biosíntesis del colesterol *in vivo*. También tiene interés en el sector cosmético, donde se usa en su forma natural o hidrogenada como agente emoliente o hidratante en preparaciones cosméticas<sup>(5)</sup>, para productos “anti-edad”, cremas de protección solar, y, en el médico, donde se utiliza, principalmente, como vehículo para los principios activos.<sup>(2)</sup> El escualeno es al que se le atribuyen los efectos beneficiosos del aceite de oliva contra algunos cánceres. Estudios recientes sugieren que el escualeno posee actividad quimiopreventiva contra algunos tipos de cánceres.<sup>(4)</sup>

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Fundamentos de la cromatografía gas<sup>(6)</sup>

La cromatografía de gases es una técnica muy utilizada en la separación de compuestos volátiles de una muestra (hasta  $T_{eb} \approx 450$  °C) y de bajo peso molecular (<1000). La muestra se volatiliza y es inyectada en la cabeza de la columna cromatográfica. La elución de los analitos se produce por el flujo de la fase móvil, que es un gas inerte y no interacciona con las moléculas de analito; su función es simplemente transportar el analito a través de la columna. En la columna se encuentra la fase estacionaria, con la que los diferentes analitos establecen equilibrios de interacción. Los analitos se van separando según su afinidad por la fase estacionaria y su volatilidad.

El inconveniente de la cromatografía de gases es que la temperatura influye mucho en la distribución del equilibrio de los analitos con la fase estacionaria, por lo que se considera una limitación en los casos de tener compuestos poco volátiles (PM > 300), compuestos termolábiles y compuestos en forma iónica, ya que suelen ser poco volátiles.

La cromatografía de gases dispone de detectores mucho más universales, lo cual es una ventaja. Además, para muchas aplicaciones, los métodos son simples, rápidos y más sensibles que otras técnicas, como por ejemplo la cromatografía de líquidos.

### 2.2. Punto de partida

Como se ha mencionado anteriormente, Clariant (Tarragona) tiene en estudio un proceso de obtención y comercialización del escualeno a partir de la fracción insaponificable del aceite de oliva. Uno de los pasos necesarios para el control del proceso y caracterización del producto final es la determinación del contenido de escualeno, por lo tanto, se necesita desarrollar un método para tal fin.

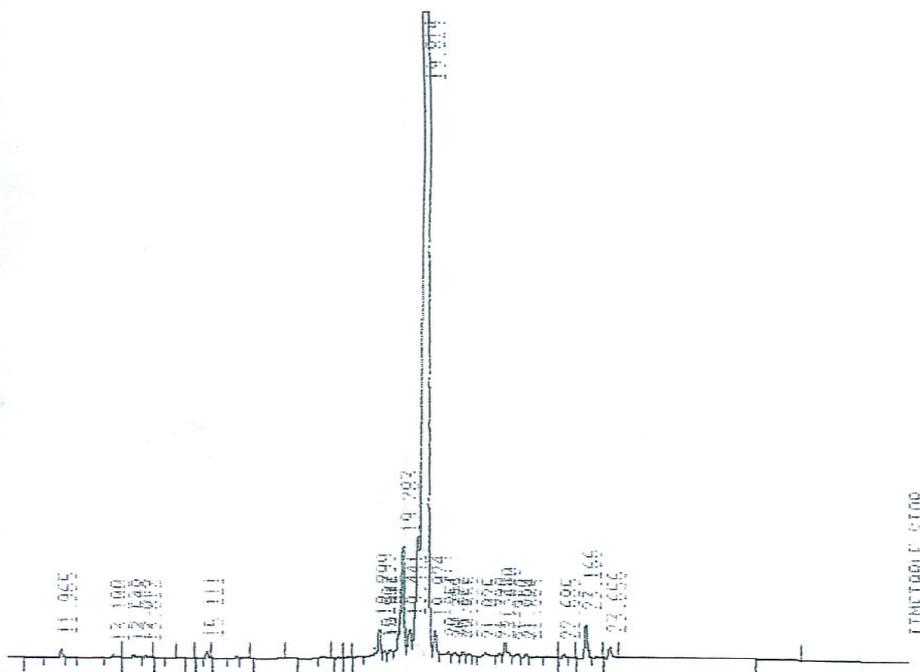
Se tomó como referencia un método (Tabla 1) en el que se determina el contenido de escualeno en muestras de aceite de oliva, concretamente, en la fracción insaponificable del aceite de oliva, y del que se disponía de un cromatograma como el que se muestra en la Figura 2. La técnica instrumental utilizada es la cromatografía gas (GC), con detector de ionización de llama (FID).

En un principio, el método parecía idóneo dadas las necesidades. Sin embargo, los cromatogramas obtenidos con el cromatógrafo *Perkin Elmer* (el utilizado en este trabajo), siguiendo las condiciones de ese método, no presentaban ni buena resolución ni buena separación. A modo de ejemplo, en la Figura 3, se muestra uno de los cromatogramas que se obtuvieron.

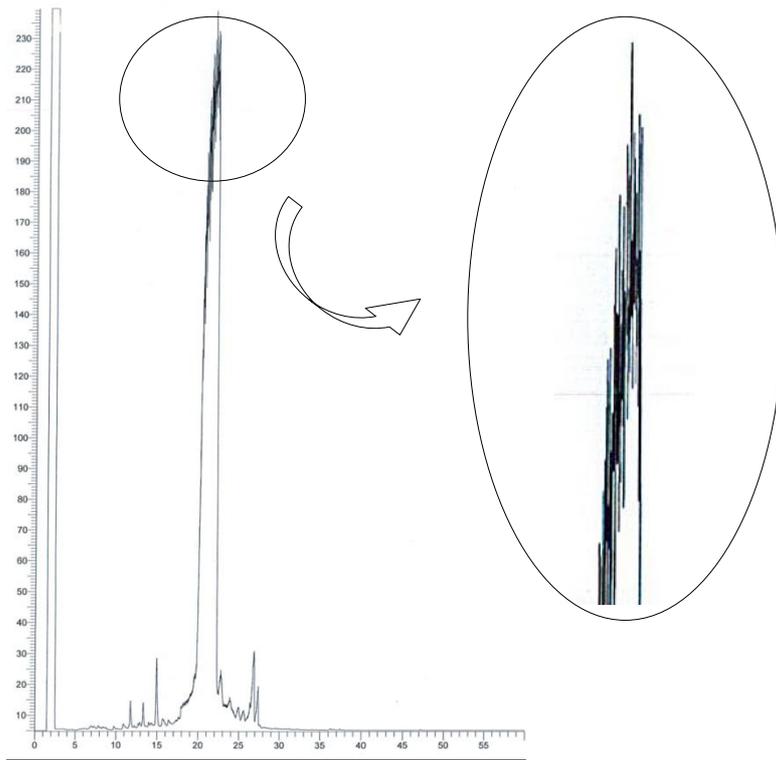
**Tabla 1:** Condiciones del método tomado como referencia

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <b>Aparatos y reactivos</b>     | - <u>Equipo:</u> HP 4890 <i>gas chromatograph</i><br>- <u>Columna capilar:</u> BP1-25 m largo, diámetro exterior 0,32 mm, diámetro interior 0,25 mm |
| <b>Condiciones cromatógrafo</b> | - <u>T horno:</u> 180 °C a 280 °C, con rampa de 5 °C/min durante 40 min   |
| <b>Preparación muestra</b>      | 1gota de muestra (fracción insaponificable) en 15 gotas de solvente ( <i>Relación 1:15*</i> )   |

\*A lo largo del trabajo se hablará de "Relación 1:X" para hacer referencia a la preparación de la muestra.



**Figura 2:** Cromatograma del método tomado como referencia



**Figura 3:** Cromatograma obtenido bajo las condiciones del método tomado como referencia con el cromatógrafo *Perkin Elmer*

El principal problema que se observa en el cromatograma de la Figura 3 es que el pico mayoritario sale distorsionado. Además, los dos últimos picos no están resueltos y la separación de los picos en general no es muy buena.

### **3. OBJETIVO**

En este contexto, y con los antecedentes expuestos en el apartado anterior, el objetivo de este trabajo es desarrollar y validar un método para la determinación del contenido de escualeno en la fracción insaponificable purificada del aceite de oliva, utilizando la técnica instrumental de cromatografía gas.

### **4. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO**

El trabajo consta de dos partes: la primera sería la puesta a punto del cromatógrafo *Perkin Elmer*; familiarización con el equipo y el software y uso de los mismos. La segunda parte sería el desarrollo del método en sí.

Teniendo en cuenta qué supone cada parte se elaboró un calendario preliminar organizando las diferentes partes a lo largo de los días de los que se disponía (ver Anexo 1).

Como soporte en el desarrollo del método también se consultaron diferentes métodos consultados en la bibliografía, detallados en el Anexo 2.

## 5. APARATOS Y REACTIVOS

En la Tabla 2 se detalla el equipo, columnas, etc., y reactivos que se han utilizado a lo largo del desarrollo del método de este trabajo.

**Tabla 2:** Reactivos, equipo, material, etc. utilizado en el desarrollo del método

|  |  |
|--|--|
| <b>Equipo GC</b>                         | <i>Perkin Elmer Clarus 500 GC</i>  |
| - Software                               | <i>TotalChrom Version 6. 3. 1. 0504</i>  |
| <b>Columna capilar</b>                   | 1º) HP-5; 30 m; I.D. 0,320 mm; espesor de película 0,25 µm, fase estacionaria (5% difenil 95% dimetilsiloxano copolímero)<br>( <i>Agilent 19091J-413</i> )<br><br>2º) HP-5; 30 m; I.D. 0,530 mm; espesor de película 1,50 µm, fase estacionaria (5% difenil 95% dimetilsiloxano copolímero)<br>( <i>Agilent 19095J-323</i> ) |
| <b>Jeringuilla (inyector automático)</b> | <i>SGE Analytical Science 5 µL Syringe</i>   |
| <b>Solventes*</b>                        | -n-Hexano HPLC<br>-Cloroformo HPLC<br>-Acetato de etilo HPLC   |
| <b>Patrones*</b>                         | -Escualeno p.a. 98,0% (Ref. B20944,22 <i>Alfa Aesar</i> )<br>-α-Tocoferol ≥97% (Ref. A17039,30 <i>Alfa Aesar</i> )<br>-Alcohol esteárico ≥98,0% (C-18) (MP Planta CAS: 36653-82-4, SASOL)<br>-1-octadeceno (C18+ α-olefina), 99,56% (MP Planta, Chevron)   |
| <b>Material</b>                          | -Viales cromatografía, filtros PTFE 0,45 µm<br>-Balanza analítica (±0,0001g)<br>-Filtros PTFE, 0,45 µm<br>-Jeringuillas de 1mL   |

\*Para la información toxicológica Ver ANEXO 3

## **6. PUESTA A PUNTO DEL CROMATÓGRAFO**

El cromatógrafo con el que se ha trabajado en el desarrollo del método es un cromatógrafo *Perkin Elmer Clarus 500*, inyector automático, detector FID, con software *TotalChrom Version 6.3.1.0504*.

Este cromatógrafo no estaba en uso en el laboratorio de Control de Calidad de Clariant hasta el momento. Por lo tanto, una parte del trabajo consistió en aprender el funcionamiento del software y del equipo en general. Fue necesaria una puesta a punto del equipo, familiarizarse y aprender el software y a trabajar con el mismo.

## **7. DESARROLLO DEL MÉTODO**

### **7.1. Establecimiento de las condiciones cromatográficas**

Como se ha comentado en los antecedentes, las primeras pruebas se realizaron siguiendo las condiciones cromatográficas del método tomado como referencia. No obstante, probablemente por el hecho de trabajar con un cromatógrafo y columna diferentes (*Perkin Elmer Clarus 500 GC*; HP-5; 30 m; I.D. **0,32 mm**; espesor de película **0,25 µm**, fase estacionaria 5% difenil 95% dimetilsiloxano copolímero), los cromatogramas obtenidos no permitían una buena identificación de los picos de interés ya que éstos no presentaban buena resolución ni buena separación, y el pico mayoritario salía distorsionado. Por ello, se fueron introduciendo cambios en las condiciones del método con el fin de optimizar los resultados.

En la Tabla 3 se resumen los experimentos llevados a cabo, qué preparación de muestra se siguió, el método del que se partía en cada experimento, los cambios en la temperatura del horno y las observaciones en cada uno de los casos. El solvente utilizado en estos experimentos fue n-hexano.

En los nueve primeros experimentos se mantuvo la preparación de la muestra con la relación 1:15, introduciendo cambios únicamente en las condiciones de temperatura del horno. También se probaron las condiciones de los métodos 1 y 2, consultados en la bibliografía.

Los resultados en estos nueve experimentos fueron bastantes similares en todos los casos: el pico del escualeno salía distorsionado. La separación de los picos, sin embargo, sí se consiguió mejorar a través de los cambios en la temperatura del horno. La hipótesis planteada al problema del pico del escualeno fue que, probablemente, la muestra estaba demasiado concentrada y que debido a ello se saturaba la columna. La cantidad de escualeno que se inyectaba no tenía suficiente superficie de contacto con la

fase estacionaria de la columna como para establecer correctamente los equilibrios con ésta, dando como respuesta esa distorsión en el pico del escualeno. Así pues, como posible solución, en los siguientes experimentos se diluyó la muestra (relaciones de 1:45 y 1:90) y se probaron, también, diferentes condiciones de temperatura.

**Tabla 3:** Experimentos realizados para el desarrollo de las condiciones cromatográficas

| <b>Exp.</b> | <b>Relación</b> | <b>Método</b>     | <b>Cambios realizados</b>   | <b>Observaciones</b>   |
|-------------|-----------------|-------------------|---|--|
| 1           | (1:15)          | Método referencia | _____   | Pico del escualeno <u>distorsionado</u> , picos muy juntos y anchos            |
| 2           | (1:15)          | Método referencia | Rampa a 8 °C/min  | Pico del escualeno <u>distorsionado</u> y picos muy juntos, menos anchos       |
| 3           | (1:15)          | Método referencia | De 180 a 230 °C, 2 °C/min (20 min); y de 230 a 280 °C, 8 °C/min (10 min)                  | Picos muy separados, pico del escualeno <u>distorsionado</u>                   |
| 4           | (1:15)          | Método referencia | De 180 a 276 °C, 8 °C/min (20 min); y de 276 a 280 °C, 4 °C/min (10 min)                  | Picos muy juntos, pico del escualeno muy ancho y <u>distorsionado</u>          |
| 5           | (1:15)          | Método referencia | 180 °C (1 min). De: 180 a 240 °C, 2 °C/min (20 min); y de 240 a 280 °C, 8 °C/min (10 min) | Los picos sales muy tarde, pico del escualeno muy ancho y <u>distorsionado</u> |
| 6           | (1:15)          | Método referencia | 200 °C (1 min). De 200 a 250 °C, 2 °C/min (20 min); y de 250 a 280 °C, 8 °C/min (10 min)  | Picos muy bajos y anchos, pico del escualeno <u>distorsionado</u>              |
| 7           | (1:15)          | Método referencia | 200 °C (1 min). De 200 a 250 °C, 2 °C/min (15 min); y de 250 a 280 °C, 8 °C/min (10 min)  | Picos muy bajos y anchos, pico del escualeno <u>distorsionado</u>              |
| 8           | (1:15)          | Met. 1*           | Rampa a 2 °C  | Pico del escualeno <u>distorsionado</u>  |
| 9           | (1:15)          | Met. 2*           | _____   | Pico del escualeno <u>distorsionado</u>  |
| 10          | (1:45)          | Método referencia | _____   | Picos muy juntos y pico del escualeno <u>distorsionado</u>                     |
| 11          | (1:45)          | Método referencia | Rampa a 2 °C, mantener 10 min   | Buena separación pero pico del escualeno <u>distorsionado</u>                  |
| 12          | (1:45)          | Método referencia | Rampa a 2 °C (mantener 10 min) y presión columna a 14,5 psig                              | Pico del escualeno <u>distorsionado</u> . Picos bastante juntos                |
| 13          | (1:45)          | Método referencia | 180 °C (1 min). De 180 a 240 °C, 2 °C/min (20 min); y de 240 a 280 °C, 8 °C/min (10 min)  | Buena separación pero pico del escualeno <u>distorsionado</u>                  |
| 14          | (1:90)          | Método referencia | Rampa a 2 °C, mantener 10 min   | Buena separación pero pico del escualeno <u>distorsionado</u>                  |

\*Ver Anexo 1.

Los cromatogramas obtenidos en los experimentos realizados con dilución de la muestra (1:45 y 1:90) seguían presentando distorsión en el pico del escualeno. Además,

con las diluciones probadas los picos minoritarios desaparecían, por lo tanto, no interesaba diluir la muestra sino encontrar otra solución.

Así pues, se descartó la opción de diluir la muestra y se planteó la siguiente opción: cambiar la columna cromatográfica por una de diámetro interno superior, más ancha. Esto podría solucionar la distorsión del pico del escualeno, ya que habría suficiente superficie de contacto con la fase estacionaria para establecer correctamente los equilibrios. Con este razonamiento, se pinchó la muestra en otro cromatógrafo gas (*Hewlett Packard HP6890-3*, detector FID, pinchazo directo) con columna HP-5; 30 m; I.D. **0,530 mm**; espesor de película **1,50 µm**, fase estacionaria (5% difenil 95% dimetilsiloxano copolímero), es decir, una columna más ancha que con la que se estaba trabajando.

Las condiciones en las que se pinchó la muestra en el nuevo cromatógrafo fueron las iniciales del método tomado como referencia, sin ningún cambio. La única variación fue el volumen inyectado, que pasó a ser un 1 µL, ya que el análisis se realizaba por pinchazo directo y 0,18 µL, que es el volumen de inyección del método tomado como referencia, suponía más error a la hora de coger la muestra con la jeringa.

El cromatograma obtenido con el nuevo cromatógrafo presentaba buena resolución, buena separación y desapareció la distorsión en el pico del escualeno. Se confirmó, así, que la columna instalada en el cromatógrafo *Perkin Elmer* era demasiado estrecha para la cantidad de muestra necesaria que se inyectaba y provocaba que la muestra no estableciera los equilibrios necesarios con la fase estacionaria de la columna cromatográfica.

Encontrada la causa de la distorsión en el pico del escualeno, se instaló una columna de características idénticas a la probada en el cromatógrafo *Hewlett Packard* y se acondicionó siguiendo estas condiciones: 40 °C durante 15 min; rampa de 40 °C a 300 °C a 0,5 °C/min, manteniendo una hora a 300 °C.

Con la nueva columna se realizaron nuevos experimentos, detallados en la Tabla 4, introduciendo cambios en las condiciones de temperatura del horno, en el split y en la relación de la preparación de la muestra.

**Tabla 4:** Experimentos realizados con la nueva columna cromatográfica

| Exp. | Relación | Método            | Cambios realizados                 | Split | Observaciones  |
|------|----------|-------------------|------------------------------------|-------|--|
| 1    | (1:15)   | Método referencia | _____                              | _____ | Picos simétricos, buena separación, <u>tiempo análisis demasiado largo (60 min) y pico del escualeno no integrable (se sale del cromatograma)</u>            |
| 2    | (1:15)   | Método referencia | De 230 a 280 °C, 5 °C/min (10 min) | _____ | Se acorta considerablemente el tiempo de análisis, los picos salen igual de bien (tiempos de retención menores) pero <u>pico del escualeno no integrable</u> |

|   |        |                   |  |       |   |
|---|--------|-------------------|--|-------|---|
| 3 | (1:15) | Método referencia | De 230 a 280 °C, 5 °C/min (10 min)                                     | 4,5:1 | <u>Pico del escualeno no integrable</u>   |
| 4 | (1:15) | Método referencia | De 230 a 280 °C, 5 °C/min (10 min)                                     | 50:1  | <u>Pico del escualeno no integrable</u>   |
| 5 | (1:15) | Método referencia | De 230 a 250 °C, 5 °C/min; y de 250 a 280 °C, 2 °C/min (10 min)        | 50:1  | <u>Pico del escualeno no integrable.</u> Se acorta aún más el tiempo de análisis. Cromatograma óptimo |
| 6 | (1:20) | Método referencia | <b>De 230 a 250 °C, 5 °C/min; y de 250 a 280 °C, 2 °C/min (10 min)</b> | 50:1  | <b>Pico del escualeno integrable y cromatograma óptimo. Tiempo de análisis: 23 min.</b>               |

El problema de la simetría del pico del escualeno quedó resuelto con la instalación de la nueva columna, por lo que el objetivo principal de los nuevos experimentos fue acortar el tiempo de análisis, definir exactamente qué dilución era la más adecuada, para que el pico del escualeno no se saliera del cromatograma, y el split.

Una vez se llegó a las condiciones de temperatura óptimas y el tiempo de análisis se quedó en 23 minutos, tiempo razonablemente corto, se trató de solventar que el pico de escualeno no se saliera del cromatograma. Primero, se introdujo un split a 4,5:1, pero no se solventó, y después un split de 50:1, pero tampoco se solventó. Finalmente, no quedó más opción que diluir la muestra, pero lo menos posible para evitar que los picos minoritarios no desaparecieran del cromatograma. Se probó diluyendo con una relación de 1:20, con la que el pico del escualeno fue integrable. Así se llegó, finalmente, a las condiciones definitivas del método desarrollado, las cuales se recogen en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Condiciones definitivas del método desarrollado

| <i>CONDICIONES FINALES DEL MÉTODO DESARROLLADO</i> |   |
|--|---|
| <i>Columna</i>                                     | HP-5; 30 m; I.D. 0,530 mm; espesor de película 1,50 µm, fase estacionaria (5% difenil 95% dimetilsiloxano copolímero) ( <i>Agilent 19095J-323</i> ) |
| <i>Relación y preparación muestra</i>              | (1:20)<br>Siempre filtrar la muestra antes de pinchar, con un filtro PTFE, 0,45 µm, con ayuda de una jeringuilla de 1mL.                            |
| <i>Temperatura del horno</i>                       | Rampa 1: De 230 a 250 °C, 5 °C/min<br>Rampa 2: De 250 a 280 °C, 2 °C/min (mantener 10 min)  |
| <i>Split</i>                                       | 50:1  |
| <i>Temperatura inyector y detector</i>             | 280 °C  |
| <i>Volumen inyectado</i>                           | 1µL   |

A modo de ejemplo y como prueba de la mejora en los cromatogramas con el nuevo método, en la Figura 4 se muestra un cromatograma obtenido bajo las condiciones finales del método desarrollado.

Como se puede apreciar, el pico del escualeno tiene junto a él un pequeño pico que no se consiguió separar más. Probablemente se trate de un isómero del escualeno. En el método tomado como referencia también se mencionan isómeros del escualeno, concretamente dos, que eluyen previa y posteriormente al pico del escualeno. En cualquier caso, y dado que no se ha podido demostrar que se trate de isómeros, ninguno de los dos picos ha sido considerado como escualeno.

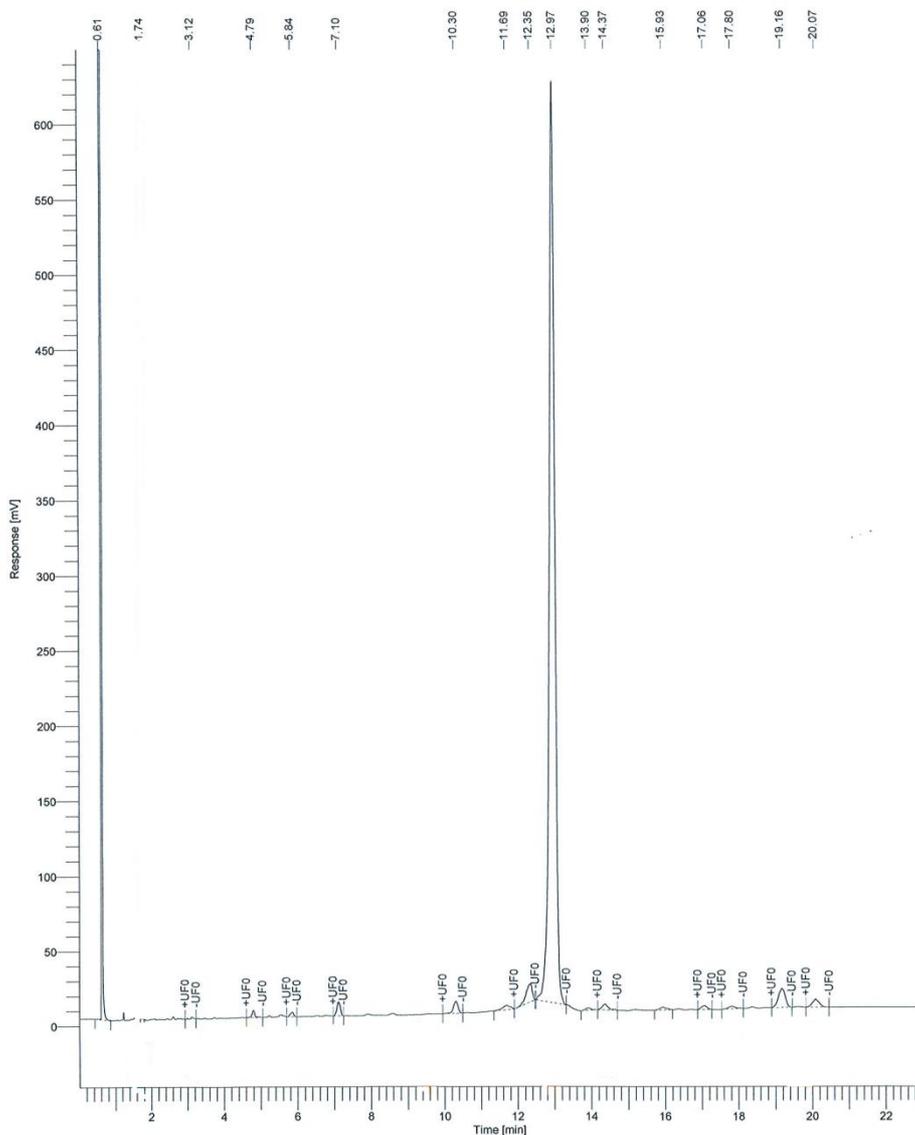


Figura 4: Ejemplo de cromatograma obtenido bajo las condiciones definitivas del método desarrollado

## 7.2. Elección del disolvente

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas del método, el siguiente paso en el desarrollo del método era identificar los picos de la muestra. Con ayuda de la bibliografía, se escogieron diferentes patrones que podían resultar adecuados para la identificación. Como se ha mencionado anteriormente, el solvente utilizado para el desarrollo de las condiciones cromatográficas fue el n-hexano. No obstante, el n-hexano resultó no ser adecuado para proseguir con el método ya que varios patrones de los escogidos no eran solubles en él. Así pues, se realizaron diferentes pruebas hasta encontrar el disolvente adecuado. La identificación de los picos está explicada ampliamente en el punto 3.

### 7.2.1. Utilización de cloroformo como solvente

Las primeras pruebas se realizaron con cloroformo. En él, todos los patrones y la muestra eran solubles. Además de comprobar la solubilidad, se realizaron estudios de repetitividad con el cloroformo como disolvente.

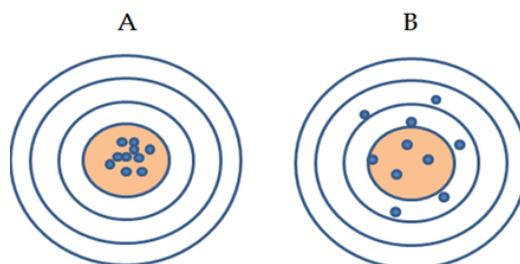
#### 7.2.1.1. Repetitividad instrumental con el cloroformo como disolvente

La repetitividad es un componente de la precisión. La precisión se define como la proximidad o dispersión entre datos o resultados independientes en unas condiciones determinadas. Las estimaciones de precisión dependen de dichas condiciones, y hay tres tipos:

- **Repetitividad ( $s_r$ ):** Las condiciones de repetitividad son: mismo analista, mismo laboratorio, mismo equipo y en un tiempo corto.
- **Precisión intermedia ( $s_i$ ):** Las condiciones de precisión intermedia son: mismo laboratorio y equipo, analista o tiempo diferentes.
- **Reproducibilidad ( $s_R$ ):** Las condiciones de reproducibilidad son: diferentes laboratorios, por consiguiente, diferentes analistas, equipos y tiempo.

La precisión está relacionada con la estimación del error aleatorio, en términos cuantitativos como desviación estándar ( $s$ ), varianza ( $s^2$ ) o desviación estándar relativa (%RSD), y con la incertidumbre. La precisión permite decidir si la diferencia entre dos medidas consecutivas es significativa. <sup>(7)</sup> Estudiar este parámetro aportaba corroborar si el disolvente era adecuado, ya que dada su alta volatilidad ( $P_{eb} = 61,26 \text{ °C}$ ) podría no serlo, y a la vez si el equipo era preciso a la hora de ofrecer resultados.

En la Ilustración 1 se representa gráficamente el significado de precisión. Con el estudio de la repetitividad se buscaba un resultado como el representado en A, es decir, que los resultados no fueran dispersos entre ellos sino que todos estuvieran lo más juntos posibles.



**Ilustración 1:** Representación gráfica de precisión. A: resultados precisos; B: resultados dispersos, no precisos

Para ello, se preparó un vial con una concentración determinada de escualeno y de patrón interno<sup>1</sup>, y se llevaron a cabo 10 inyecciones consecutivas del mismo. Los resultados se presentan en la Tabla 6 por orden de relación de áreas, de menor a mayor, y en la primera columna se indica en qué orden tuvieron lugar los pinchazos.

La repetitividad se expresó como Desviación Estándar Relativa (%RSD) utilizando la Ecuación 1 para obtenerla:

$$\%RSD = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{media}} \times 100$$

**Ecuación 1:** Fórmula para el cálculo de la %RSD

El valor máximo aceptado para la repetitividad en el laboratorio donde se realizó el trabajo era de un 2%.

**Tabla 6:** Resultados para la determinación de la repetitividad usando cloroformo como disolvente

| Repetitividad cloroformo<br>(se indica el orden de inyección) | Área escualeno | Área P.I   | Relación áreas | Q <sub>calculada</sub> |
|---|----------------|------------|----------------|------------------------|
| (5 <sup>º</sup> )   | 3459954,87     | 1528302,43 | 2,26           | 0,212                  |
| (3 <sup>º</sup> )   | 3652328,18     | 1572395,07 | 2,32           |                        |
| (2 <sup>º</sup> )   | 3643247,65     | 1558426,39 | 2,34           |                        |
| (1 <sup>º</sup> )   | 3651293,47     | 1552471,20 | 2,35           |                        |
| (4 <sup>º</sup> )   | 3711666,15     | 1568982,37 | 2,37           |                        |
| (6 <sup>º</sup> )   | 3762232,71     | 1578039,04 | 2,38           |                        |
| (7 <sup>º</sup> )   | 3746485,89     | 1554149,53 | 2,41           |                        |
| (8 <sup>º</sup> )   | 3884719,53     | 1597270,92 | 2,43           |                        |
| (9 <sup>º</sup> )   | 3891335,84     | 1588429,69 | 2,45           |                        |

<sup>1</sup> La elección del patrón interno se explica posteriormente en el apartado 7.4.

|                     |            |            |           |       |
|---------------------|------------|------------|-----------|-------|
| (10°)               | 4028849,71 | 1585197,61 | 2,54      | 0,419 |
| Media               | 3743211,40 | 1568366,43 | 2,39      |       |
| Desviación estándar | 160505,437 | 20521,4477 | 0,0773    |       |
| %RSD                | 4,28790737 | 1,30846002 | 3,24 > 2% |       |

#### 7.2.1.1.1. Cálculo de outliers

Los resultados se presentan ordenados de menor a mayor relación de área para facilitar el cálculo de la presencia de *outliers* mediante un test Q de Dixon. Ese fue el primer paso. Las fórmulas correspondientes para el cálculo de *outliers*, con un número de muestras comprendido entre 8 y 12, se muestran en la Ecuación 2. La condición que debe cumplirse para confirmar que no hay outliers es que la  $Q_{tab}$  debe ser mayor que la  $Q_{cal}$ . La Q tabulada para este caso, con un  $\alpha = 0,05$ , corresponde a **0,530**.

$$\text{Para } 8 \leq n \leq 12 \quad Q_{11} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1} \quad \text{o} \quad Q_{10} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_2} \quad Q_{tab} > Q_{cal}$$

**Ecuación 2:** Fórmulas para el cálculo de outliers mediante el test Q Dixon

“ $x_n$ ” corresponde al posible valor *outlier*. Se calculó la Q del valor de relación de áreas más pequeño (0,212) y la del más grande (0,419). Ninguno de los dos superaba la Q tabulada, por lo tanto, ninguno de los dos era *outlier*. Se confirmaba así que no existía ningún valor *outlier*.

#### 7.2.1.1.2. Discusión de la %RSD obtenida

La primera conclusión es que la %RSD obtenida no era óptima. Con un valor del 3,24% superaba el 2% máximo aceptado, por lo tanto, se podría concluir que el cromatógrafo no ofrece resultados precisos.

Sin embargo, prestando atención a los cinco últimos pinchazos, se ve una clara tendencia de aumento en el área del escualeno y, por consiguiente, en la relación de áreas. Este hecho se justifica de la siguiente manera: dada la volatilidad del cloroformo ( $P_{eb} = 61,26 \text{ }^\circ\text{C}$ ), una vez el vial que contiene la muestra es pinchado por la aguja de la jeringa, el cloroformo se va evaporando poco a poco, provocando que la muestra en el vial se vaya concentrando. A medida que se va concentrando las áreas van aumentando, provocando que los resultados, efectivamente, no sean precisos. Por lo tanto, no es que el cromatógrafo ofrezca resultados no precisos sino que el cloroformo no era adecuado dada su volatilidad.

## 7.2.2. Utilización de acetato de etilo como solvente

Descartado el cloroformo, el siguiente disolvente escogido fue el acetato de etilo. Es menos volátil que el cloroformo, con un  $P_{eb} = 77\text{ °C}$  y diluía todos los patrones correctamente. Así pues, se prosiguió con el estudio de la repetitividad.

### 7.2.2.1. Repetitividad instrumental con acetato de etilo como solvente

El procedimiento fue el mismo que con el cloroformo. Se preparó un vial con una determinada concentración de escualeno y patrón interno y se realizaron 10 inyecciones consecutivas del mismo. Los resultados se presentan en la Tabla 7. En la columna de relación de áreas se han indicado más número de decimales expresamente para apreciar las diferencias entre las relaciones de área.

**Tabla 7:** Resultados para la determinación de la repetitividad usando acetato de etilo como disolvente

| <i>Repetitividad acetato de etilo<br/>(se indica el orden de inyección)</i> | Área escualeno | Área P.I   | Relación áreas       | $Q_{calculada}$ |
|---|----------------|------------|----------------------|-----------------|
| (1º)  | 1164356,61     | 958326,54  | 1,21499              | <b>0,877</b>    |
| (3º)  | 989878,84      | 931179,94  | 1,06304              |                 |
| (4º)  | 993317,39      | 937105,58  | 1,05998              |                 |
| (8º)  | 1000356,3      | 946141,13  | 1,05730              |                 |
| (6º)  | 987942,25      | 934959,93  | 1,05663              |                 |
| (10º)   | 991982,73      | 941666,64  | 1,05343              |                 |
| (5º)  | 976866,49      | 930150,06  | 1,05022              |                 |
| (2º)  | 985587,52      | 941823,19  | 1,04647              |                 |
| (9º)  | 978464,36      | 935183,97  | 1,04628              |                 |
| (7º)  | 976746,27      | 937660,60  | 1,04168              | <b>0,215</b>    |
| <i>Media</i>  | 3743211,40     | 1568366,43 | 1,05                 |                 |
| <i>Desviación estándar</i>  | 160505,437     | 20521,4477 | 0,0771               |                 |
| <i>%RSD</i>   | 4,28790737     | 1,30846002 | <b>0,675 &gt; 2%</b> |                 |

#### 7.2.2.1.1. Cálculo de outliers y discusión de la %RSD

En este caso, con el acetato de etilo, la %RSD obtenida fue de 0,675, muy inferior al 2% máximo, es decir, muy óptima. Además, no hay ninguna tendencia de aumento de áreas ni de relaciones de áreas. También se calculó la presencia de outliers de la misma forma que en el caso del cloroformo, y solo el primer pinchazo resultó ser outlier, con una  $Q_{cal}$  de 0,877. La media, la desviación estándar y la %RSD están calculadas sin el valor outlier. De esta forma quedó establecido como disolvente del método el acetato de etilo y se confirmó que la respuesta instrumental era repetitiva.

### 7.3. Identificación de los picos

Como se puede apreciar en la Figura 5, además del pico mayoritario, también aparecen otros picos en el cromatograma que son minoritarios.

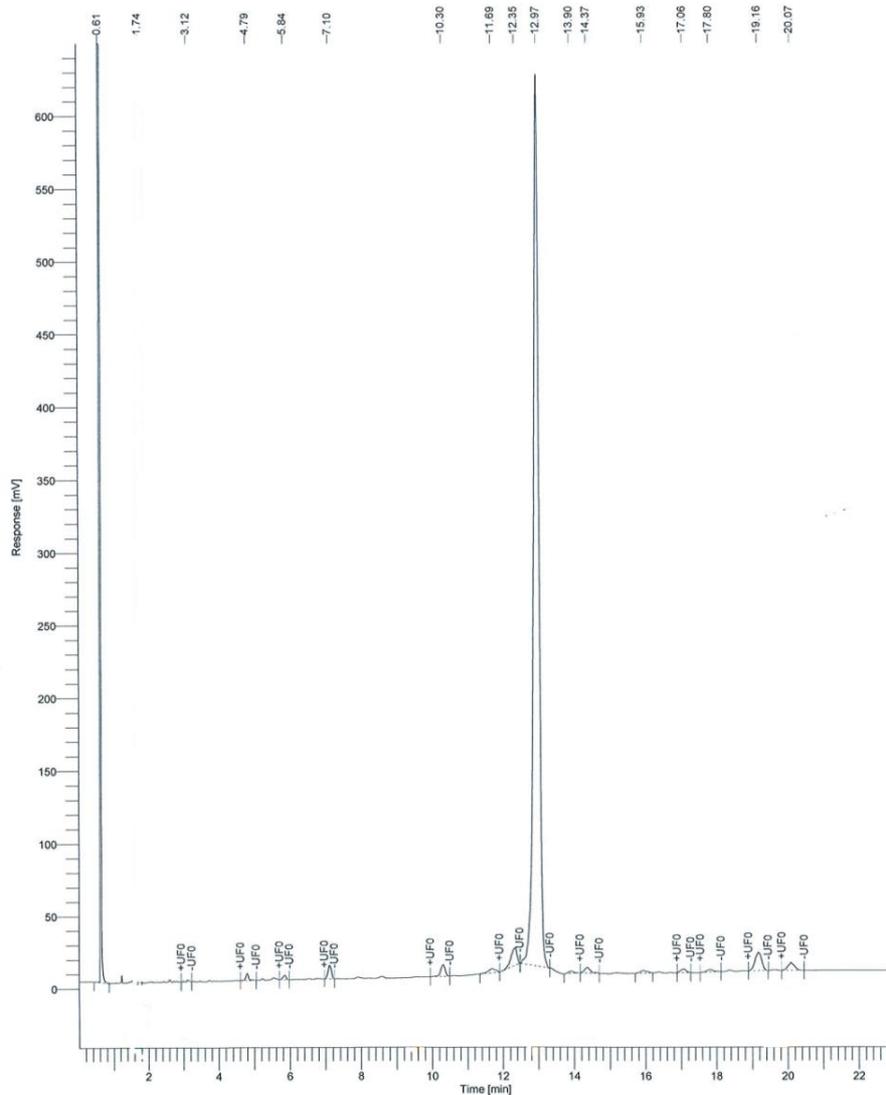


Figura 5: Cromatograma de la muestra

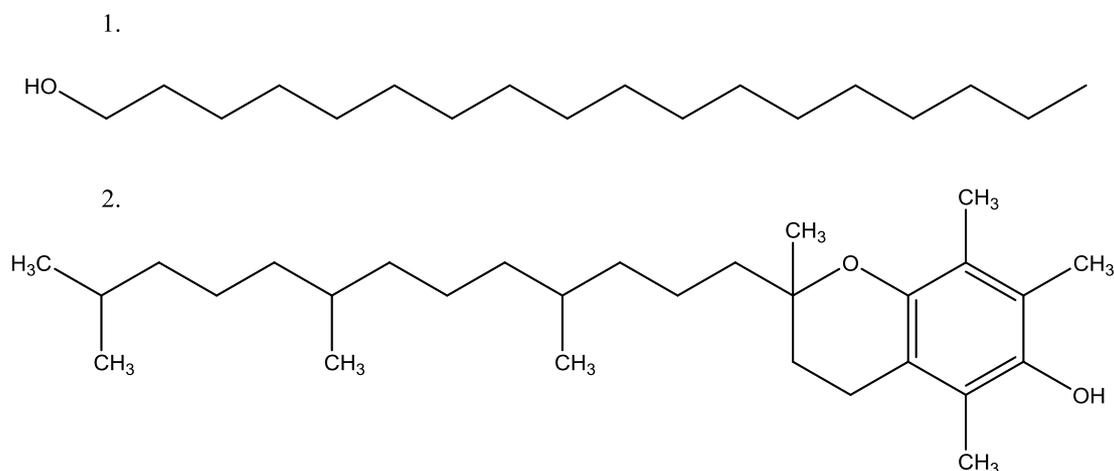
Como se ha mencionado en el apartado anterior, con ayuda de la bibliografía se escogieron varios patrones para intentar identificar los picos. Todos ellos estaban disponibles en el laboratorio de Clariant.

Los patrones escogidos fueron:

- Escualeno 98,0% (Ref. B20944,22 Alfa Aesar)
- $\alpha$ -Tocoferol  $\geq 97\%$  (Ref. A17039,30 Alfa Aesar)
- 1-Octadecanol 99,7% (Ref. 424412/1 33601 Fluka)

- NAFOL 2022 (C20-OH 62,8%; C22-OH 34,0%) (Ref. 134585 Sasol Germany GmbH)

En la Ilustración 2 están las estructuras del  $\alpha$ -tocoferol y del 1-octadecanol. El patrón Nafol 2022 es una mezcla formada, básicamente, por alcoholes de cadena C20 y C22.



**Ilustración 2:** Estructuras del 1-octadecanol (1) y del  $\alpha$ -tocoferol (2)

Todos los patrones se pincharon bajo las condiciones del método desarrolladas y con acetato de etilo como disolvente. Cabe decir que previamente se pinchó la muestra disuelta con acetato de etilo y no hubo ningún cambio en los tiempos de retención de los picos ni en el cromatograma.

El patrón de escualeno, tal y como se esperaba, correspondía al pico mayoritario, con un tiempo de retención de 12,9 minutos. El patrón de  $\alpha$ -tocoferol correspondía al último pico, con un tiempo de retención de 20,0 minutos. El patrón de 1-octadecanol, con un tiempo de retención de 3,2 minutos, no coincidía con ningún pico del cromatograma.

El patrón Nafol 2022 fue el patrón que no resultó ser soluble en hexano y por lo que se tuvo que llevar a cabo el estudio del disolvente (apartado 2.) Mostraba dos picos, el correspondiente al alcohol de cadena C20 y al alcohol de cadena C22. Cada uno de ellos correspondía, respectivamente, al pico con tiempo de retención 4,8 minutos y al pico con tiempo de retención 7,1 minutos.

El resto de picos no se pudieron identificar por falta de patrones. Es por ello que se definieron como "Pico X", según el orden de elución. En la Tabla 8 están resumidos todos los picos del cromatograma con sus tiempos de retención y el porcentaje de área aproximada de cada uno de ellos. Se omite el tiempo de retención del acetato de etilo.

**Tabla 8:** Tiempos de retención y porcentajes de área aproximada de los picos que aparecen en el cromatograma

| <i>Pico</i>      | <i>Tiempo retención (tr)</i> | <i>% Área</i> |
|------------------|------------------------------|---------------|
| <b>C20</b>       | 4,79                         | 0,388         |
| <i>Pico 2</i>    | 5,84                         | 0,270         |
| <b>C22</b>       | 7,10                         | 0,825         |
| <i>Pico 4</i>    | 10,31                        | 0,961         |
| <i>Pico 5</i>    | 12,32                        | 1,921         |
| <b>Escualeno</b> | <b>12,95</b>                 | <b>90,701</b> |
| <i>Pico 6</i>    | 14,36                        | 0,681         |
| <i>Pico 7</i>    | 17,06                        | 0,460         |
| <i>Pico 8</i>    | 17,81                        | 0,399         |
| <i>Pico 9</i>    | 19,15                        | 2,442         |
| <b>Tocoferol</b> | 20,08                        | 0,954         |

#### 7.4. Selección del patrón interno <sup>(10,11)</sup>

##### 7.4.1. Introducción teórica

En la técnica de cromatografía de gases cuantitativa se obtiene mayor precisión usando patrones internos ya que el uso de los mismos minimiza errores debidos a la inyección de la muestra, el flujo o las condiciones de la columna. Además, en el caso de encontrarse ante un disolvente volátil o relativamente volátil, como es el caso del acetato de etilo, la concentración de analito irá aumentando a medida que se evapore el disolvente. Si además del analito se añade un patrón interno, ambas concentraciones seguirán siendo idénticas a pesar de la evaporación del disolvente. La cuantificación se lleva a cabo a partir de la relación de áreas y concentración entre el analito y el patrón interno.

Un patrón interno debe cumplir los siguientes requisitos:

- a. No debe ser uno de los analitos presentes en la muestra
- b. Tiene que presentar buena resolución
- c. Tiene que sufrir interacciones similares a las de los solutos con la fase estacionaria
- d. No tiene que contener impurezas
- e. No debe interactuar con los analitos ni con la matriz de la muestra

Con el patrón interno adecuado se pueden llegar a obtener precisiones entre el 0,5 y 1%.

Para poder determinar el escualeno, y dado que la técnica utilizada es la técnica de cromatografía gas, era necesario emplear un patrón interno.

#### 7.4.2. Elección del patrón interno

Como se ha mencionado en el apartado 3., el patrón 1-octadecanol no coincidía con ningún pico de la muestra, presentaba buena resolución y tenía una pureza del 99,7%, por lo que se escogió como candidato para utilizarlo como patrón interno.

Inicialmente, se estudió la repetitividad del 1-octadecanol como patrón interno junto con el patrón de escualeno. A partir de soluciones madre de ambos patrones, se preparó un vial del que se realizaron 5 inyecciones consecutivas. Los resultados están resumidos en la Tabla 9. La repetitividad está expresada como %RSD.

**Tabla 9:** %RSD de 5 inyecciones para el estudio de la repetitividad del 1-octadecanol como patrón interno

| <i>P.I: 1-octadecanol</i>  | <i>Área escualeno</i> | <i>Área P.I</i> | <i>Relación áreas</i> |
|----------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| <b>Media</b>               | 2459200,95            | 1689208,45      | 1,46                  |
| <b>Desviación estándar</b> | 293043,539            | 230012,345      | 0,0617                |
| <b>%RSD</b>                | 11,9162095            | 13,6165755      | <b>4,23 &gt; 2%</b>   |

Admitiendo como máximo una %RSD del 2%, la repetitividad obtenida, 4,23%, no se aceptó dado que era muy superior al máximo aceptable.

Se probó de nuevo con una concentración mayor y se realizaron otras 5 inyecciones (Tabla 10), pero los resultados continuaban sin ser óptimos.

**Tabla 10:** %RSD de 5 inyecciones con concentración superior para el estudio de la repetitividad del 1-octadecanol como patrón interno

| <i>P.I: 1-octadecanol</i>  | <i>Área escualeno</i> | <i>Área P.I</i> | <i>Relación áreas</i> |
|----------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| <b>Media</b>               | 6626554,91            | 1524427,98      | 4,35                  |
| <b>Desviación estándar</b> | 677167,467            | 109600,354      | 0,288                 |
| <b>%RSD</b>                | 10,2189973            | 7,18960527      | <b>6,63 &gt; 2%</b>   |

Esta vez, la repetitividad obtenida fue mucho mayor a la anterior, con un resultado del 6,63%.

Aún y habiendo comprobado que la repetitividad instrumental era óptima, para descartar definitivamente que la poca repetitividad fuera problema del inyector automático del cromatógrafo, se estudió la repetitividad en el mismo cromatógrafo pero por pinchazo. El valor de %RSD seguía siendo alto, 3,15%, así que se probó con otro cromatógrafo diferente, también por pinchazo directo. Esta vez la %RSD, 2,22, disminuía bastante pero no lo suficiente. Los resultados se recogen en la Tabla 11.

**Tabla 11:** %RSD de cinco inyecciones, por pinchazo directo, en el cromatógrafo *Perkin Elmer* y en el *Hewlett Packard*

| <i>Perkin Elmer</i>        | Área escualeno | Área P.I   | Relación áreas      |
|----------------------------|----------------|------------|---------------------|
| <b>Media</b>               | 11890922,5     | 2592557,68 | 4,59                |
| <b>Desviación estándar</b> | 1061282,38     | 244799,667 | 0,144               |
| <b>%RSD</b>                | 8,92514758     | 9,44240003 | <b>3,15 &gt; 2%</b> |
| <i>Hewlett Packard</i>     |                |            |                     |
| <b>Media</b>               | 6148,63306     | 1316,92578 | 4,67                |
| <b>Desviación estándar</b> | 319,621073     | 62,7918057 | 0,104               |
| <b>%RSD</b>                | 5,19824605     | 4,76805956 | <b>2,22 &gt; 2%</b> |

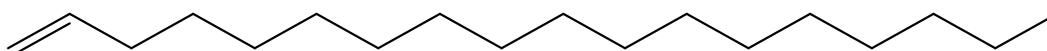
El problema, en efecto, no era de equipo. Atendiendo a las características que debe cumplir un patrón interno se llegó a la conclusión de que, dada su naturaleza química, el 1-octadecanol no era el patrón interno más adecuado para determinar escualeno, ya que posee un grupo hidroxilo mientras que el escualeno no posee ninguno. Esto podría estar causando que los dos interaccionaran de forma diferente con la fase estacionaria y, como consecuencia, que se obtuvieran valores altos de %RSD.

Para corroborar lo anterior, se pinchó el patrón Nafol 2022, que es una mezcla de alcoholes, con el 1-octadecanol como patrón interno. Ambos tienen una naturaleza química muy similar y sus interacciones con la fase estacionaria de la columna deberían ser similares. Tal y como muestra la Tabla 12, esta vez la %RSD obtenida fue del 1%, un resultado muy óptimo que corroboraba que el 1-octadecanol sí servía como patrón interno para la mezcla de alcoholes C20 y C22, pues ambos poseen la misma funcionalidad e interaccionan de forma similar con la fase estacionaria.

**Tabla 12:** %RSD de cinco inyecciones de Nafol 2022 y 1-octadecanol como patrón interno

| PATRÓN NAFOL               | Área C22    | Área P.I    | Relación áreas      |
|----------------------------|-------------|-------------|---------------------|
| <b>Media</b>               | 3808564,864 | 1498500,11  | 2,54                |
| <b>Desviación estándar</b> | 188927,4698 | 87020,62112 | 0,0256              |
| <b>%RSD</b>                | 4,960594778 | 5,807181497 | <b>1,01 &lt; 2%</b> |

Para el escualeno se buscó otro compuesto que cumpliera con los requisitos de patrón interno. Se propuso el 1-octadeceno, o  $\alpha$ -olefina C18, que es un hidrocarburo de 18 carbonos con una insaturación en la posición alfa (Ilustración 3). El 1-octadeceno tiene un peso molecular de 252,48 y su punto de ebullición es de 314,4 °C.



**Ilustración 3:** Estructura química del 1-octadeceno

El 1-octadeceno, de pureza 99,52%, no era uno de los analitos de la muestra ya que se pinchó bajo las condiciones desarrolladas, igual que el resto de patrones, y no coincidía con ningún pico de la muestra. Además, no solo no era uno de los analitos de la muestra (tiempo de retención 1,7 minutos) sino que presentaba buena resolución.

El 1-octadeceno es un hidrocarburo de 18 carbonos y con un doble enlace en la posición alfa. Su interacción con la fase estacionaria se puede afirmar que es similar a la del escualeno, el cual también es un hidrocarburo, aunque con más dobles enlaces. La única diferencia es que el 1-octadeceno eluye antes que el escualeno, dado que su peso molecular es casi la mitad que el peso molecular del escualeno.

#### 7.4.2.1. Repetitividad del 1-octadeceno como patrón interno

La repetitividad estudiada del 1-octadeceno como patrón interno con el escualeno se realizó de la misma forma que con el 1-octadecanol, realizando 5 inyecciones consecutivas de un vial con una concentración determinada de escualeno y patrón interno. Las inyecciones se realizaron con el cromatógrafo *Perkin Elmer*, con el inyector automático. En la Tabla 13 se resumen los resultados.

**Tabla 13:** %RSD de cinco inyecciones utilizando 1-octadeceno como patrón interno

| <i>P.I: 1-octadeceno</i>   | <i>Área escualeno</i> | <i>Área P.I</i> | <i>Relación áreas</i> |
|----------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|
| <b>Media</b>               | 5902235,99            | 1831405,33      | 3,22                  |
| <b>Desviación estándar</b> | 231241,943            | 42095,9165      | 0,0557                |
| <b>%RSD</b>                | 3,91787016            | 2,29855815      | <b>1,73 &lt; 2%</b>   |

En este caso, la %RSD obtenida fue 1,73, menor al máximo aceptado. De esta forma quedó establecido el 1-octadeceno como patrón interno para la determinación de escualeno.

## 7.5. Recta de calibrado

### 7.5.1. Linealidad instrumental

Se conoce como linealidad la capacidad que posee un método de producir, en el intervalo lineal, una señal directamente proporcional a la concentración de analito. Hace referencia al tipo de modelo matemático ("lineal") que relaciona la señal con la concentración. Hay que evaluarlo estadísticamente. <sup>(7)</sup> En el apartado 7.5.1.1 se hace la evaluación de algunos parámetros de la validación de la recta de calibrado.

El intervalo de trabajo que se escogió para realizar la recta estaba comprendido entre purezas del 60 al 100% ya que las purezas de las muestras que se recibirán en el laboratorio serán de ese orden, por lo tanto, no tenía sentido ampliar el intervalo. En concreto, los niveles fueron del 60, 70, 80, 90 y 100%, cada uno con tres réplicas.

Como el objetivo de este método es determinar el contenido de escualeno expresado como pureza, no tenía sentido calcular los límites de detección y cuantificación, pues no interesaba saber qué concentración mínima se podía cuantificar o detectar. Además, según el ICH (*“International Conference on Harmonisation”*), no siempre es necesario evaluar todas las características: en el caso de un método para la determinación de un analito de nivel de concentración mayoritario no es necesario evaluar los límites de detección y cuantificación. <sup>(7)</sup>

En primer lugar, para estudiar si la respuesta del cromatógrafo era lineal en el intervalo de trabajo escogido, se elaboró una recta de calibrado únicamente con patrones, sin presencia de muestra. Todos los patrones se prepararon a partir de soluciones madre de escualeno y de 1-octadeceno. La preparación de las soluciones madre y de los patrones se realizó por peso, no se utilizó en ningún momento material volumétrico.

Cada patrón contenía: solución madre de escualeno, solución madre de patrón interno y acetato de etilo, en las cantidades adecuadas para que el total de gramos en cada patrón fuera 10 g. En la Tabla 14 se resumen las cantidades teóricas de soluciones madre y acetato de etilo para cada patrón.

**Tabla 14:** Cantidades teóricas para cada nivel de la recta de calibrado

| <b>Solución madre escualeno: 0,0067 g/g</b> |                               | Pureza patrón escualeno: 98%       |                     |                       |
|---|-------------------------------|------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| <b>Solución madre P.I.: 0,1005 g/g</b>      |                               | Pureza patrón 1-octadeceno: 99,52% |                     |                       |
| <i>PATRÓN</i>                               | <b>g sol. madre escualeno</b> | <b>g sol. madre P.I.</b>           | <b>g cloroformo</b> | <b>g totales vial</b> |
| <b><i>P1 (100%)</i></b>                     | <b>8,69</b>                   | 0,3                                | 1,01                | 10                    |
| <b><i>P2 (90%)</i></b>                      | <b>7,82</b>                   | 0,3                                | 1,88                | 10                    |
| <b><i>P3 (80%)</i></b>                      | <b>6,96</b>                   | 0,3                                | 2,74                | 10                    |
| <b><i>P4 (70%)</i></b>                      | <b>6,09</b>                   | 0,3                                | 3,61                | 10                    |
| <b><i>P5 (60%)</i></b>                      | <b>5,22</b>                   | 0,3                                | 4,48                | 10                    |

Una vez preparados los 15 viales, se pincharon en orden aleatorio bajo las condiciones desarrolladas. El aspecto de la recta de calibrado obtenida fue el que se muestra en la Figura 6.

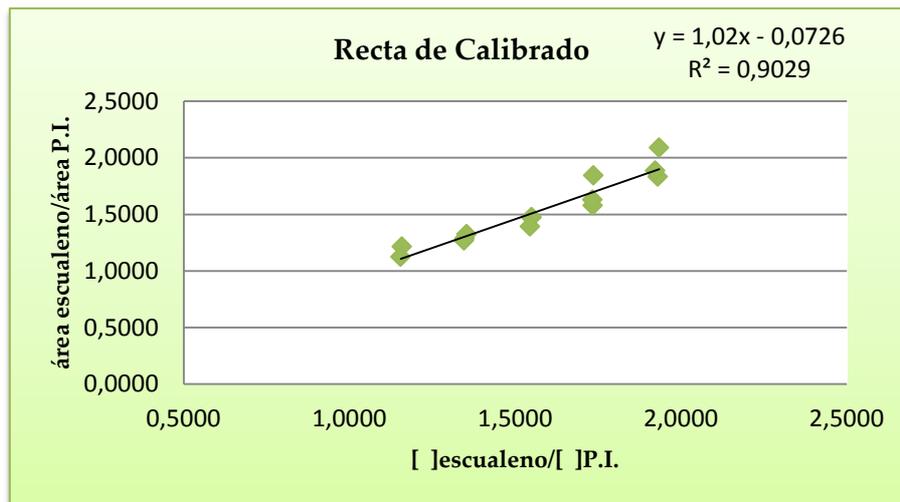


Figura 6: Recta de calibrado. Linealidad instrumental

#### 7.5.1.1. Validación de la recta de calibrado

A partir de las indicaciones transmitidas por Clariant, se evaluaron los siguientes parámetros de validación:

a) Coeficiente de correlación ( $r$ )<sup>(9)</sup>

El coeficiente de correlación estima la bondad con la que se ajustan los puntos experimentales a una línea recta. Así, un coeficiente de correlación muy próximo a 1 indica que hay muy buena correlación positiva, es decir, que los puntos experimentales están sobre una recta de pendiente positiva. Si es muy próximo a -1 significa que los puntos se encuentran sobre una recta de pendiente negativa. En cambio, si no hay correlación entre las variables  $x$  e  $y$  el valor de  $r$  es cero. Generalmente, los valores comunes de  $r$  se encuentran entre 0,90 y 0,99.

En el caso de la recta obtenida, el coeficiente de correlación es de 0,957. Atendiendo a este valor, se podría dudar de la linealidad de la recta por lo que se decidió emplear un contraste estadístico, test  $t$ , para ver si realmente el coeficiente de correlación es significativo.

La hipótesis nula,  $H_0$  = correlación cero, es la que se plantea para comprobar una correlación significativa. La fórmula para el cálculo de  $t$  es la que se muestra en la Ecuación 2.

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Ecuación 1: Fórmula para el cálculo de  $t$

El valor obtenido de  $t$  se compara con el valor  $t$  tabulado utilizando un contraste  $t$  de dos colas y  $(n-2)$  grados de libertad. La hipótesis nula en este caso es que no existe correlación entre  $x$  e  $y$ . Si el valor calculado es mayor que el tabulado,  $t_{cal} > t_{tab}$ , se rechaza esa hipótesis y se concluye que sí hay correlación significativa. Si fuera al revés,  $t_{cal} < t_{tab}$ , la hipótesis nula se aceptaría y no habría correlación significativa.

El valor de  $t$  que se obtuvo de la Ecuación 2 fue 11,9 y el valor tabulado ( $\alpha=0,05$ ) corresponde a 2,18. Así pues, se rechaza la hipótesis nula y se afirma que sí hay correlación significativa.

b) Homogeneidad de varianzas. Homocedasticidad

Este parámetro es una forma de evaluar la homogeneidad de las concentraciones de los patrones preparados, es decir, se evalúa de alguna forma la preparativa de los patrones por parte del analista. La forma de evaluarlo es mediante las varianzas de cada nivel de concentración.

Para evaluar la homogeneidad de varianzas se realiza un test Cochran. Se evalúa con la siguiente fórmula (Ecuación 3):

$$C_{cal} = \frac{s_{i\max}^2}{\sum s_i^2}$$

**Ecuación 3:** Fórmula para el cálculo de homocedasticidad de varianzas

“ $s_i^2$ ” corresponde a la varianza de cada nivel de concentración y “ $s_{i\max}^2$ ” corresponde a la varianza máxima del conjunto de varianzas. La condición que debe cumplirse para afirmar que existe homogeneidad de varianzas es que  $C_{cal} < C_{tab}$ .

Para obtener el valor de  $C_{cal}$ , se calculó la varianza de cada nivel de concentración, como muestra la Tabla 15 y se aplicó la Ecuación 3.

**Tabla 15:** Cálculo de las varianzas de cada nivel de concentración

| Patrón | [ ]escualeno/[ ]P.I | Varianza ( $s_i^2$ ) |
|--------|---------------------|----------------------|
| 1      | 1,930535454         | 3,30709E-05          |
| 1      | 1,934236860         |                      |
| 1      | 1,922955493         |                      |
| 2      | 1,736742565         | 2,323E-06            |
| 2      | 1,734659434         |                      |
| 2      | 1,733773716         |                      |
| 3      | 1,550581221         | 6,51869E-06          |
| 3      | 1,549192401         |                      |
| 3      | 1,545631290         |                      |
| 4      | 1,347937709         | 1,66838E-05          |

|                  |             |             |
|------------------|-------------|-------------|
| 4                | 1,354276432 | 5,64825E-06 |
| 4                | 1,346644248 |             |
| 5                | 1,158420710 |             |
| 5                | 1,159464250 |             |
| 5                | 1,154926511 |             |
| <i>Sumatorio</i> |             | 6,42446E-05 |

La  $s^2_{i \max}$  corresponde al nivel 1, con un valor de  $3,30709 \cdot 10^{-5}$ . Dividiéndolo por el sumatorio de las varianzas se obtiene la  $C_{cal}$ , que en este caso es igual a 0,515. El valor de  $C_{tab}$  tabulado es de 0,684, por lo tanto,  $C_{tab} > C_{cal}$ . De esta forma se confirmó que había homocedasticidad de varianzas.

## 7.6. Determinación del escualeno en una muestra problema

Previamente a determinar la pureza de escualeno en una muestra problema había que comprobar que la repetitividad del método era óptima y que el método era lineal en el intervalo de trabajo escogido. Además, el resultado que se obtuviera de pureza debía ir acompañado por una incertidumbre que equivale a la precisión intermedia del método (ver apartado 2).

### 7.6.1. Repetitividad del método

Del mismo modo que se comprobó la repetitividad instrumental y se afirmó que la respuesta del cromatógrafo era precisa, también se quiso evaluar si las respuestas obtenidas bajo las condiciones desarrolladas seguían siendo precisas, es decir, si el método desarrollado era preciso en condiciones de repetitividad.

Para ello, se prepararon soluciones madre de muestra y de patrón interno. Se preparó un vial que contenía solución madre de muestra y de patrón interno y se llevaron a cabo 10 inyecciones consecutivas. Las cantidades se detallan en la Tabla 16. En la columna de relación de áreas se han detallado más decimales para apreciar la diferencia entre las relaciones de áreas.

**Tabla 16:** Resultados para la determinación de la repetitividad del método

| <i>Solución madre muestra: 0,03511 g/g</i><br><i>Solución madre P.I: 0,10038 g/g</i><br><i>Cantidades en el vial: 0,2039 g ; 0,3013 g ; 5,8077 g acetato de etilo</i> |                |             |                |                        |
|---|----------------|-------------|----------------|------------------------|
| (se indica el orden de inyección)   | Área escualeno | Área P.I    | Relación áreas | Q <sub>calculada</sub> |
| (1º)  | 9893522,58     | 1789195,03  | 5,529594       | 0,836                  |
| (3º)  | 7524203,50     | 1472710,56  | 5,109086       |                        |
| (4º)  | 7506637,71     | 1477438,08  | 5,080848       |                        |
| (8º)  | 7479941,77     | 1473868,47  | 5,075040       |                        |
| (6º)  | 7429522,45     | 1465946,11  | 5,068073       |                        |
| (10º)   | 7453264,50     | 1474043,05  | 5,056341       |                        |
| (5º)  | 7472019,62     | 1477843,15  | 5,056030       |                        |
| (2º)  | 7362745,81     | 1457622,52  | 5,051202       |                        |
| (9º)  | 7478976,11     | 1486646,59  | 5,030769       |                        |
| (7º)  | 7458263,60     | 1483748,39  | 5,026636       |                        |
| <i>Media</i>  | 7462841,674    | 1474429,66  | 5,06           |                        |
| <i>Desviación estándar</i>  | 46853,98617    | 8765,44989  | 0,0255         |                        |
| <i>%RSD</i>   | 0,627830366    | 0,594497665 | 0,503 < 2%     |                        |

Previamente, se comprobó si había *outliers* mediante un test Q de Dixon. En este caso, el primer valor resultó ser *outlier* y se descartó para el cálculo de la media, la desviación estándar y la %RSD. La %RSD obtenida fue muy óptima, menor al 2% aceptado por la empresa, así que se concluyó que el método era preciso en condiciones de repetitividad.

### 7.6.2. Linealidad del método

En este caso, la linealidad que se estudiaba correspondía a la del método desarrollado y los patrones para tal fin contenían una matriz diferente a solo acetato de etilo como en el caso del calibrado con patrones, contenían la matriz de la muestra. Por eso era necesario realizar otro calibrado.

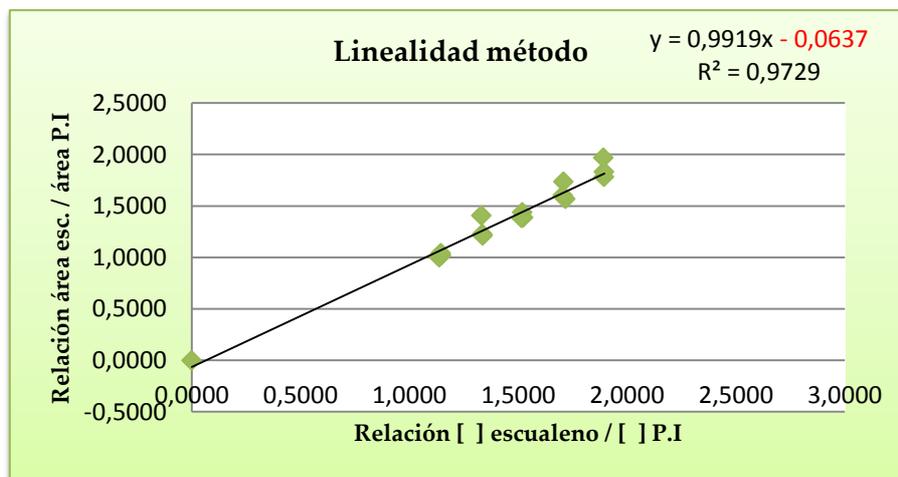
El intervalo de trabajo siguió siendo el mismo que el calibrado instrumental, con puntos correspondientes a 60, 70, 80, 90 y 100%. Se prepararon 6 patrones, tres réplicas de cada uno, que contenían muestra, solución madre de escualeno, solución madre de patrón interno y acetato de etilo. Las cantidades correspondientes a cada patrón están recogidas en el Tabla 17.

**Tabla 17:** Cantidades teóricas de cada patrón para la recta de calibrado del método

| PATRÓN          | <i>g sol. madre<br/>escualeno</i> | <i>g sol. madre<br/>P.I.</i> | <i>g.sol.madre<br/>muestra</i> | <i>g acetato<br/>etilo</i> | <i>g totales<br/>vial</i> |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>P1(100%)</b> | 8,69                              | 0,3                          | 0,1                            | 0,91                       | 10                        |
| <b>P2 (90%)</b> | 7,82                              | 0,3                          | 0,1                            | 1,78                       | 10                        |
| <b>P3 (80%)</b> | 6,96                              | 0,3                          | 0,1                            | 2,64                       | 10                        |
| <b>P4 (70%)</b> | 6,09                              | 0,3                          | 0,1                            | 3,51                       | 10                        |
| <b>P5 (60%)</b> | 5,22                              | 0,3                          | 0,1                            | 4,38                       | 10                        |
| <b>P0 (0%)</b>  | 0                                 | 0,3                          | 0,1                            | 9,6                        | 10                        |

El patrón 0 sirve para contrarrestar la cantidad de escualeno de más que está presente en la muestra y, por defecto, en todos los patrones. La relación de áreas entre el escualeno de la muestra y el patrón interno del patrón 0 se resta a la relación de áreas del resto de patrones, de manera que la recta resultante pasa por el origen de coordenadas y permite una relación directa a la hora de determinar una muestra problema. El patrón 0 se pinchó 3 veces y se tomó como área de escualeno la media de los tres pinchazos, de igual modo el área del patrón interno.

La recta obtenida se muestra en la Figura 7.



**Figura 7:** Recta de calibrado del método

El valor de la ordenada, habiéndole restado la relación de áreas a todos los patrones, debería haber sido aproximadamente 0. En este caso, el valor de ordenada obtenido fue de -0,0637.

Igual que en el caso de la calibración instrumental, también se validó la recta siguiendo las indicaciones de Clariant.

### 7.6.2.1. Validación de la recta de calibrado

Los parámetros de validación de la recta de calibrado del método coinciden con los del calibrado instrumental: se evaluó el coeficiente de correlación y la homogeneidad de varianzas.

a) Coeficiente de correlación ( $r$ )

El coeficiente de correlación de la recta correspondía a 0,971. Aunque resultó ser más alto que el coeficiente de correlación del calibrado instrumental, se quiso realizar del igual modo el test  $t$  para confirmar que la correlación era significativa. La ecuación utilizada corresponde a la Ecuación 2. El valor de  $t$  tabulado era 2,14 y el valor de  $t$  calculado fue de 63,7. De nuevo,  $t_{cal} > t_{tab}$ , por lo tanto se descartaba la hipótesis nula (que no hay correlación significativa) y se afirmaba que existía correlación significativa.

b) Homocedasticidad

La homogeneidad de varianzas de los niveles de concentración se llevó a cabo de la misma forma que en la validación de calibrado instrumental. En la Tabla 18 se presentan los resultados de las varianzas de cada nivel de concentración.

**Tabla 18:** Cálculo de las varianzas de cada nivel de concentración para el calibrado del método

| <i>Patrón</i>    | <i>[ ]escualeno/[ ]P.I</i> | <i>Varianza (<math>s_i^2</math>)</i> |
|------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| 1                | 1,8949                     | 3,96446E-06                          |
| 1                | 1,8952                     |                                      |
| 1                | 1,8916                     |                                      |
| 2                | 1,7080                     | 3,37733E-05                          |
| 2                | 1,7173                     |                                      |
| 2                | 1,7058                     |                                      |
| 3                | 1,5195                     | 1,29023E-05                          |
| 3                | 1,5238                     |                                      |
| 3                | 1,5167                     |                                      |
| 4                | 1,3315                     | 9,58697E-06                          |
| 4                | 1,3362                     |                                      |
| 4                | 1,3373                     |                                      |
| 5                | 1,1468                     | 2,21205E-05                          |
| 5                | 1,1377                     |                                      |
| 5                | 1,1442                     |                                      |
| <i>Sumatorio</i> | 8,59475E-05                |                                      |

La  $C_{tab}$  era la misma, 0,684 y la  $C_{cal}$  obtenida, a través de la Ecuación 3, fue de 0,435. De nuevo se cumplía que  $C_{tab} > C_{cal}$  pudiendo confirmar que había homogeneidad de varianzas.

### 7.6.3. Incertidumbre

El valor de incertidumbre que acompaña al resultado de la pureza es, básicamente, la precisión intermedia del método. Debido a la disposición de tiempo, no se pudo calcular la precisión del método como tal. Sí se calculó, sin embargo, la precisión intermedia con patrones variando el factor tiempo, es decir, entre días. Aunque estrictamente son conceptos diferentes, se ha cogido la precisión intermedia con patrones como valor de incertidumbre, dado que el tratamiento que se le hace a la muestra es una dilución únicamente, el mismo que se le hace a los patrones.

#### 7.6.3.1. Precisión intermedia

La precisión intermedia con patrones se fue calculando a lo largo de los días, concretamente durante 6 días ( $p$ ). El procedimiento consistía en preparar cada día nuevas soluciones madre de escualeno y patrón interno y pinchar dos réplicas ( $n$ ) de tres patrones diferentes: 100%, 80% y 60%. El tiempo entre pinchazo y pinchazo siempre era el mismo, media hora, ya que al disponer de inyector automático los viales se preparaban y se dejaban en el "carroussel" para que el equipo fuera analizándolos progresivamente.

Para el cálculo de la precisión intermedia se necesitan las siguientes fórmulas: <sup>(8)</sup>

$$\frac{\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^2 (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p \cdot (n - 1)} \text{ donde } p = \text{días y } n = \text{réplicas}$$

**Ecuación 2:** Fórmula de repetitividad

$$\frac{\left( \frac{n \cdot \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(p - 1)} \right) - \left( \frac{\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^2 (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p \cdot (n - 1)} \right)}{p - 1}$$

**Ecuación 3:** Fórmula de la precisión entre días

$$s^2_I = s^2_{serie} + s^2_r$$

**Ecuación 4:** Fórmula de la precisión intermedia final

Los valores teóricos que deben cumplirse para cada caso son:

- Repetitividad: %RSD < 2%
- Entre días: %RSD < 3%
- Intermedia: %RSD < 2%

Los resultados obtenidos durante los 6 días se resumen en la Tabla 19. Están expresados como la relación de áreas del escualeno y del patrón interno.

**Tabla 19:** Estudio de la precisión intermedia durante 6 días de los patrones 1, 3 y 5

|              |                  | <i>Patrón 1</i> | <i>Patrón 3</i> | <i>Patrón 5</i> |                      |                |                |
|--------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|----------------|----------------|
| <i>Día 1</i> | <i>Réplica 1</i> | 2,08581144      | 1,66418611      | 1,19148818      |                      |                |                |
|              | <i>Réplica 2</i> | 2,08963937      | 1,66652462      | 1,21498942      |                      |                |                |
| <i>Día 2</i> | <i>Réplica 1</i> | 1,80012614      | 1,36607923      | 1,05112522      |                      |                |                |
|              | <i>Réplica 2</i> | 1,82565392      | 1,44558341      | 1,02437516      |                      |                |                |
| <i>Día 3</i> | <i>Réplica 1</i> | 1,83316854      | 1,47530194      | 1,09932259      | <b>Repetitividad</b> | <b>0,00406</b> | <b>&lt; 2%</b> |
|              | <i>Réplica 2</i> | 1,88687090      | 1,47120094      | 1,12551978      | <b>Entre días</b>    | <b>0,402</b>   | <b>&lt; 3%</b> |
| <i>Día 4</i> | <i>Réplica 1</i> | 2,01344543      | 1,55491842      | 1,29290060      | <b>Intermedia</b>    | <b>0,406</b>   | <b>&lt; 2%</b> |
|              | <i>Réplica 2</i> | 2,03467471      | 1,57210913      | 1,12368041      |                      |                |                |
| <i>Día 5</i> | <i>Réplica 1</i> | 1,83249952      | 1,48676496      | 1,06915893      |                      |                |                |
|              | <i>Réplica 2</i> | 1,88161884      | 1,43742070      | 1,08971698      |                      |                |                |
| <i>Día 6</i> | <i>Réplica 1</i> | 1,83589282      | 1,47049593      | 1,06611226      |                      |                |                |
|              | <i>Réplica 2</i> | 1,84381235      | 1,50630871      | 1,09555771      |                      |                |                |

A partir de esos resultados, y siguiendo la Ecuación 3, se calcula la media de cada patrón para cada día, obteniendo 18 medias en total. A continuación, se calcula la diferencia cuadrática de cada réplica con su media correspondiente. Se calcula el sumatorio total de todas esas diferencias cuadráticas y se divide por el producto de días por réplicas menos uno. Así se obtiene la repetitividad, que en este caso es igual a 0,00406. Este valor cumple con la condición de que la repetitividad debe ser menor al 2%.

El siguiente paso es el cálculo de la precisión entre días, siguiendo la Ecuación 4. Previamente, se debe calcular la media global de las 18 medias encontradas para la repetitividad. A continuación, se calcula la diferencia cuadrática entre cada una de esas medias y la media global, y se suman todas las diferencias. Ese sumatorio se multiplica por  $n$  (réplicas) y se divide por el número de días menos uno. De esa forma se llega a la precisión entre días, que en este caso es igual a 0,40175, cumpliendo también con la condición de que sea menor al 3%.

Finalmente, el último paso es el cálculo de la precisión intermedia, siguiendo la Ecuación 5, que consiste en sumar los resultados de repetitividad y precisión entre días. El resultado fue de 0,40581, menor del 2%. Como se ha mencionado, este valor fue el escogido como incertidumbre del método.

#### 7.6.4. Análisis de una muestra de escualeno

Para determinar el contenido de escualeno en una muestra problema, se preparó un vial con las cantidades especificadas en la Tabla 20. La concentración de la solución madre de patrón interno era de 0,0725 g/g.

Tabla 20: Cantidades de muestra y patrón interno para la determinación de la pureza

|                         | (g)     | Concentración en el vial (g/g) |
|-------------------------|---------|--------------------------------|
| <i>muestra</i>          | 0,1767  | 0,0175                         |
| <i>patrón interno</i>   | 0,5020  | 0,0036                         |
| <i>acetato de etilo</i> | 9,4002  |                                |
| <i>g totales</i>        | 10,0789 |                                |

A partir de la recta de calibrado del método (Figura 7), conociendo la concentración de patrón interno y la relación de áreas proporcionada por el equipo se calcula la concentración de escualeno en la muestra problema.

$$y = 0,9919x - 0,0637$$

$$y = \frac{\text{Área escualeno}}{\text{Área patrón interno}}; \quad x = \frac{[ ] \text{ escualeno}}{[ ] \text{ patrón interno}}$$

Así,

$$\frac{\text{Área escualeno}}{\text{Área patrón interno}} = 0,9919 \times \frac{[ ] \text{ escualeno}}{[ ] \text{ patrón interno}} - 0,0637$$

Figura 8: Cálculo de la concentración de escualeno a través de la recta de calibrado

Las áreas de patrón interno y de escualeno fueron:

- Área escualeno ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) = 6333067,50
- Área patrón interno ( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) = 1891533,59

Sustituyendo en las ecuaciones de la Figura 8:

$$\frac{6333067,50}{1891533,59} = 0,9919 \times \frac{[ ] \text{ escualeno}}{0,0036}$$

$$[ ] \text{ escualeno} = \mathbf{0,0122 \text{ g/g}}$$

La concentración de escualeno obtenida es de 0,0122 g/g, que corresponde a la concentración de escualeno dentro de la muestra preparada, 0,0175 g/g. Para obtener la pureza, basta con aplicar la siguiente ecuación:

$$\frac{[ ]_{escualeno}}{[ ]_{muestra}} \times 100 = \frac{0,0122}{0,0175} \times 100 = \mathbf{69,71\%}$$

La pureza encontrada para esta muestra problema en concreto, bajo las condiciones del método desarrolladas en este trabajo y aplicando la recta de calibrado del método, es igual a:

$$\mathbf{69,71 \pm 0,41\%}$$

## 8. CONCLUSIONS

The conclusions of this project are:

- The squalene is an olive oil component that is increasingly getting impulse in the cosmetic field and its applications. Since Clariant works with a lot of products destined for cosmetics, the squalene production has become a new project for them. That is how the necessity of developing a method for squalene determination arose.
- One of the parts of this project was the tuning of the chromatograph *Perkin Elmer*. This task and the familiarization with its software supposed a hard work and it took an important dedication before starting the method development.
- The better solution for solving the problem of distortion on the squalene peak at the beginning of the experimentation was changing the column for another wider. This change avoided the dilution of the sample and permitted that the minor peaks were still visible on the chromatogram.
- Introducing changes on the oven temperature allowed reaching the optimal conditions to obtain a good separation and resolution of the peaks. The final conditions were: First ramp: 230 °C to 250 °C, with a rate of 5 °C/min. Second ramp: 250 °C to 280 °C, with a rate of 2 °C/min, holding 10 minutes at 280 °C.
- The identification of the minor peaks was not completed due to the lack of standards and the limitation of time of the project. The peaks which were identified were squalene,  $\alpha$ -tocopherol and C20 and C22 alcohols.
- A study of the solvent was necessary since the initial solvent, n-hexane, presented solubility problems with some standards used in the peak identification. Two more solvents were tested: chloroform and ethyl acetate. The chosen was ethyl acetate after a few repeatability and solubility studies. This study also concluded that the instrumental repeatability was optimal, that is, the chromatograph offers accurate results.
- Paying attention to the internal standard characteristics, and after a few repeatability studies, the internal standard chosen was 1-octadecene. It accomplished with all the requirements of an internal standard and gave better repeatability results.

- The instrumental linearity studied in the work interval had a significant correlation after evaluating the correlation coefficient. It can be said that the chromatograph offers lineal results in this interval.
- The method repeatability was enough optimal to conclude that, in specific conditions, the method gives accurate results.
- The method linearity was also studied in the same interval as in the instrumental linearity. The evaluation of the correlation coefficient proved that the lineal correlation was significant. The calibration line was useful to determinate squalene in a test sample.
- The method uncertainty chosen corresponds to intermediate accuracy studied with standards. The treatment of the sample is just a dilution, the same as with standards, so it has been considered that both intermediate accuracies may not be much different.
- A test sample was used to determinate the squalene content. The result was the expected: the purity was inside the lineal interval studied so it can be concluded that the method developed in this project is useful for its objective.
- Finally, it would be interesting to continue evaluating the rest of the validation parameters that are not studied in this project. It is why this method remains opened for future optimizations.

## 9. TRATAMIENTO DE RESIDUOS EN EL LABORATORIO

En la Tabla 21 se ha resumido cómo se eliminan los residuos que se generan a escala de laboratorio y la gestión que Clariant lleva de los mismos.

**Tabla 21:** Gestión de residuos en el laboratorio de Control de Calidad de Clariant

| <i>Residuo</i>  | <i>Tratamiento previo en el laboratorio</i>                        | <i>Eliminación</i>   |
|---|--|--|
| Vidrio  | Lavado   | Contenedor de vidrio limpio  |
| Plástico  | Lavado   | Contenedor de plástico limpio  |
| Papel/Cartón  | Se deposita en las papeleras del laboratorio etiquetadas para ello | Contenedor de banales.<br>En el caso de cartones de gran volumen, contenedor de papel/cartón   |
| Piezas metálicas y chatarra   | Depositar en el recipiente etiquetado para ello                    | Contenedor de fábrica  |
| Material sucio de producto químico (absorbentes, trapos, jeringas, vidrio sucio...) | Depositar en las bombonas etiquetadas para ello                    | Clariant tiene establecido un sistema de recogida selectiva en sus instalaciones. Hay puntos de recogida y almacenamiento de residuos disponibles previo a su trámite externo mediante gestor autorizado   |
| Disolventes orgánicos Halogenados   | Depositar en las bombonas etiquetadas para ello                    | Una vez llenas, o a los 5 meses de la fecha de control, avisar al Responsable de Medioambiente del <i>Site</i> y al gestor autorizado para iniciar los trámites  |
| Disolventes orgánicos No Halogenados  | Depositar en las bombonas etiquetadas para ello                    | Una vez llenas, o a los 5 meses de la fecha de control, avisar al Responsable de Medioambiente del <i>Site</i> y al gestor autorizado para iniciar los trámites  |
| Frascos de muestras y materias primas   | Depositar en bombonas de plástico rotuladas convenientemente.      | Las tapas se vacían en el contenedor de chatarra. Los frascos de vidrio se introducen en el "vaporizador". Se vaporiza durante 2 horas. Los frascos limpios se devuelven al laboratorio y las que quedan con restos de suciedad se vacían en el contenedor de vidrio |
| Cubetas DQO   | Se reúnen todas en cajas   | El mismo suministrador de las cubetas recoge las cajas periódicamente para su tratamiento  |

Para la eliminación de vidrio, plástico, papel o cartón y piezas metálicas, básicamente, se deposita cada residuo en su contenedor correspondiente. En cuanto al material sucio de producto químico, se disponen de puntos de recogida y almacenamiento en las instalaciones y su eliminación se tramita externamente por gestor autorizado. Los disolventes orgánicos halogenados y no halogenados se van depositando en bombonas específicas para ello. Una vez llenas, el Responsable de Medioambiente avisa al gestor autorizado para proceder a su eliminación. Los frascos de muestras y materias primas

se almacenan en bombonas y se llevan al vaporizador donde se elimina mediante vapor el contenido de los frascos. Este proceso tiene lugar en la misma empresa.

Finalmente, las cubetas de DQO, que sirven para conocer la DQO (Demanda Química de Oxígeno) de las aguas residuales de toda Clariant, se recolectan todas y son recogidas por el mismo suministrador para su tratamiento.

## 10. VALORACIÓN ECONÓMICA APROXIMADA DE UN ANÁLISIS

Se quiso hacer una pequeña valoración aproximada de lo que le costaría a la empresa un análisis realizado por el método desarrollado en este trabajo. Se ha considerado que el tiempo total de un análisis (desde que se recibe la muestra hasta la obtención del resultado final) es de 1 hora. Las cantidades que se tuvieron en cuenta para el cálculo se resumen en la Tabla 22.

**Tabla 22:** Valoración económica aproximada de un análisis

|   | Precio (€)   | Cantidad o Unidades             | Precio/cantidad o unidad         | Cantidad o unidades necesarias | Precio 1 análisis (€/h) |
|---|--------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| <b>Personal</b>                         |              |                                 |                                  |                                |                         |
| Analista                                | 40.000 €/año | 1752 horas/año                  | 23,00 €/hora                     | 1 hora                         | <b>23,00</b>            |
| <b>Material</b>                         |              |                                 |                                  |                                |                         |
| Cloroformo                              | 24,86        | 2,5 L                           | 9,94 €/L                         | 10 g                           | <b>0,07</b>             |
| Viales cromatografía                    | 237,58       | 1000 u.                         | 0,24 €/vial                      | 1                              | <b>0,24</b>             |
| Filtros PTFE 0,45 µm                    | 418,26       | 500 u.                          | 0,84 €/filtro                    | 1                              | <b>0,84</b>             |
| Jeringuillas 1 mL                       | 6,11         | 100 u.                          | 0,06€/jeringuilla                | 3                              | <b>0,18</b>             |
| Viales 20 mL                            | 20,34        | 100 u.                          | 0,20 €/vial                      | 1                              | <b>0,20</b>             |
| Tapones viales 20 mL                    | 27,56        | 100 u.                          | 0,28 €/tapón                     | 1                              | <b>0,28</b>             |
| <b>Gases cromatógrafo</b>               |              |                                 |                                  |                                |                         |
| Helio                                   | 144,235      | 1 botella (9,1 m <sup>3</sup> ) | 1,5 botellas se gastan en 1 mes; | 1 hora                         | <b>0,30</b>             |
| Hidrógeno                               | 78,77        | 1 botella (8,9 m <sup>3</sup> ) | 1,5 botellas se gastan en 1 mes; | 1 hora                         | <b>0,16</b>             |
| Aire                                    | 62,40        | 1 botella (10 m <sup>3</sup> )  | 2,5 botellas se gastan en 1 mes; | 1 hora                         | <b>0,22</b>             |
| <b>Equipo e instrumental</b>            |              |                                 |                                  |                                |                         |
| Cromatógrafo Perkin Elmer               | 21.460       | Amortización de 10 años         | 2.146 €/año                      | 1 hora                         | <b>0,52</b>             |
| Mantenimiento (sin contar reparaciones) | 2.373,36     | 1 vez al año                    | —————                            | 1 hora                         |                         |
| Columna                                 | 587,27       | Amortización 1 año              | —————                            | 1 hora                         | <b>0,07</b>             |
| Jeringa                                 | 32,27        | Amortización 1 año              | —————                            | 1 hora                         |                         |
| <b>TOTAL</b>                            |              |                                 |                                  |                                | <b>26,07 €/análisis</b> |

El precio de un análisis está alrededor de los 26 €, teniendo en cuenta que 23 € es lo que se gasta la empresa en el analista que lo realiza.

## 11. ANEXO 1

### Planificación inicial del trabajo

| Lunes  | Martes   | Miércoles   | Jueves | Viernes                               |
|--|--|---|--------|---------------------------------------|
| 31   | 1  | 2   | 3      | 4                                     |
|  | <b>INICIO</b>  | Puesta a punto del cromatógrafo y familiarización con el software |        |                                       |
| 7  | 8  | 9   | 10     | 11                                    |
| Puesta a punto del cromatógrafo y familiarización con el software.<br>Desarrollo de las condiciones del método |  |   |        |                                       |
| 14   | 15   | 16  | 17     | 18                                    |
| Desarrollo de las condiciones del método   |  |   |        |                                       |
| 21   | 22   | 23  | 24     | 25                                    |
|  | Selección del patrón interno. Identificación de los picos. |   |        |                                       |
| 28   | 29   | 30  | 1      | 2                                     |
| Repetitividad instrumental. Recta de calibrado   |  |   |        | Recta de calibrado                    |
| 5  | 6  | 7   | 8      | 9                                     |
| Precisión intermedia instrumental  |  |   |        |                                       |
| 12   | 13   | 14  | 15     | 16                                    |
| Repetitividad del método. Linealidad del método. Precisión intermedia del método                               |  |   |        |                                       |
| 19   | 20   | 21  | 22     | 23                                    |
| Precisión intermedia del método  |  |   |        | <b>ÚLTIMO<br/>DÍA EN<br/>CLARIANT</b> |

## 12. ANEXO 2

### Métodos consultados en la bibliografía

|                            |                     | Met. 1 <sup>(12)</sup>   | Met. 2 <sup>(13)</sup>  | Met. 3 <sup>(14)</sup>   |
|----------------------------|---------------------|--|---|--|
| <b>Columna capilar</b>     | Tipo                | SPB-5  | DB-5MS fused silica   | BPX 5 fused silica   |
|                            | Longitud            | 30 m   | 30 m  | 15 m   |
|                            | Diám. exterior      |  |   | 0,32 mm  |
|                            | Diám. interior      | 0,53 mm  | 0,25 mm   |  |
|                            | Espesor película    | 0,5 µm   | 0,25 µm   | 0,25 µm  |
|                            | Polaridad           |  |   | 5% fenilo/95% polisilfenil-siloxano  |
| <b>Gas portador</b>        |                     | He (100:1)   | He (15:1)   | He   |
| <b>Flujo</b>               |                     |  | 1 mL/min, cte   | 2 mL/min   |
| <b>T inyector</b>          |                     | 290 °C   | 270 °C  | 45 °C  |
| <b>T detector</b>          |                     | 300 °C   | 280 °C  | 370 °C   |
| <b>Solvente</b>            |                     | Cloroformo   | Mezcla sililante  | Mezcla sililante   |
| <b>Horno</b>               |                     | 180 °C a 270 °C (8 °C/min), luego isot. 65 min   | 250 °C a 300 °C (2 °C/min), luego mantener 12 min                   | 100 °C (1 min), a 10 °C/min hasta 360 °C, mantener 16 min                      |
| <b>Derivatización</b>      | <b>Condiciones</b>  | SÍ   | SÍ  | SÍ   |
|                            |                     | Sililación <sup>(9)</sup> , 2 mg muestra en cloroformo. 0,033 mL mezcla sililante + 0,1 mL muestra. Agitar, centrifugar, sobrenadante se inyecta | 125 µL BSTFA (con 1% TMCS) + 125 µL piridina + residuo seco muestra | 0,02 g muestra + 1,2 mL diclorometano + 0,3 mL BSTFA. Calentar 2 horas a 60 °C |
| <b>Preparación muestra</b> |                     |  |   |  |
| <b>Volumen inyectado</b>   |                     | 1 µL   | 1 µL  | 1 mL   |
| <b>Tiempos retención</b>   | Escualano           |  |   |  |
|                            | <i>fitosteroles</i> |  |   |  |
|                            | <i>tocoferoles</i>  |  |   |  |
|                            | <b>Escualeno</b>    | <b>22,05 min</b>   |   | <b>17,2 min</b>  |
|                            | <i>Isómeros</i>     |  |   |  |
|                            | <i>fitosteroles</i> |  |   |  |
|                            | <i>tocoferoles</i>  | 40,52 min  |   |  |

### 13. ANEXO 3

A continuación se resume la toxicidad de los productos que se han utilizado en este trabajo y su manipulación.

- n-Hexano

*Toxicidad:* Altamente inflamable. Provoca irritación de nariz, garganta, y en la piel y los ojos en caso de contacto.

*Manipulación:* En campana extractora, con guantes, bata y gafas de seguridad.

- Cloroformo

*Toxicidad:* Moderadamente tóxico. Carcinógeno. En contacto con los ojos ocasiona conjuntivitis. Sustancia CMR.

*Manipulación:* En campana extractora, con guantes, bata y gafas de seguridad.

- Acetato de etilo

*Toxicidad:* Inflamable. Provoca irritación en ojos, nariz y tráquea. El contacto con la piel puede provocar dermatitis y agrietamiento. Provoca oscurecimiento de las córneas.

*Manipulación:* En campana extractora, con guantes, bata y gafas de seguridad.

- Escualeno

*Toxicidad:* Puede causar irritación en contacto con los ojos y con la piel. Puede ser nocivo si se inhala.

*Manipulación:* En campana extractora, con guantes, bata y gafas de seguridad.

- $\alpha$ -Tocoferol

*Toxicidad:* La ingestión puede provocar alteraciones gástricas. Irritante.

*Manipulación:* En campana extractora, con guantes, bata y gafas de seguridad.

- 1-Octadecanol

*Toxicidad:* No presenta ningún peligro especial.

*Manipulación:* Ninguna en especial, solo las precauciones comunes en un laboratorio.

- 1-Octadeceno

*Toxicidad:* Puede ser nocivo para los organismos acuáticos

*Manipulación:* En campana extractora, con guantes, bata y gafas de seguridad.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Sigma-Aldrich.  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3626?lang=es&region=ES> (01/03/2014).
- (2) Aguado Ramos, M; Martín Martín, A; Chica Pérez, A; Martín Santos, M.A; Berrios Caballero, M, y Siles López, J.A. Procedimiento de obtención de escualeno. ES 2 308 924 A1. 1, diciembre, 2008.
- (3) Cevdet Nergiz; Deniz Çelikkale. The effect of consecutive steps of refining on squalene content of vegetable oils. *Association of Food Scientists & Technologists* **2010**, Vol. 48, 382-385
- (4) Eleni Psomiadou; Maria Tsimidou. On the role of Squalene in Olive Stability. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, Vol. 47, 4025-4032
- (5) W. Moreda; M.C. Pérez-Camino; A. Cert. Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. *Journal of Chromatography A.* **2001**, Vol. 936, 159-171
- (6) Linda L. Ng, Ph.D. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. *Center for Drug Evaluation and Research (CDER)* **1994**, 4
- (7) Salvador Sagrado; María José Medina; Emilio Bonet; Yolanda Martín. *Manual práctico de calidad en los laboratorios Enfoque ISO 17025: Validación interna de métodos*. 1ª ed; Ed. AENOR: Madrid, 2004; 84-97
- (8) David M. Bliesner. *Validating Chromatographic Methods. A Practical Guide: "Appendix II, Attachment III: Recommended experimental procedures and acceptance criteria for category I methods (assay)"*. New Jersey, Ed. Wiley; 1ª ed.; 2006; pág. 99
- (9) James N. Miller; Jane C. Miller. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ª ed.; Isabel Capella; Ed. Prentice Hall: España, 2002; 115-118
- (10) Douglas A. Skoog; Donald M. West; F. James Holler; Stanley R. Crouch. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8ª ed.; S. Kiselica, A. White Eds.; Thomson Brooks/Cole: Canada, 2004. pp 967
- (11) David Harvey. *Química Analítica Moderna*. 1ª ed.; Concepción Fernández Madrid Eds.; McGraw-Hill: Madrid, 2002. pp 84
- (12) Jasminka Giacometti. Determination of aliphatic alcohols, squalene,  $\alpha$ -tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst*, **2001**, 126, 472-475
- (13) Sara S. Cunha; José O. Fernandes; M. Beatriz P.P. Oliveira. Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1128, 220-227.

- (14) Harrison Lik Nang Lau; Chiew Wei Puah; Yuen May Choo; Ah Ngan Ma; Cheng Hock Chuah. Simultaneous Quantification of Free Fatty Acids, Free Sterols, Squalene, and Acylglycerol Molecular Species in Palm Oil by High-Temperature Gas Chromatography-Flame Ionization Detection. *Lipids* **2005**, *40*, 523-528.



Desarrollo de un método analítico por GC-FID para la determinación de escualeno en la fracción insaponificable del aceite de oliva by [Oliva López, Elvira Carrasco Campos, Ariadna](#) is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](#).

Puede hallar permisos más allá de los concedidos con esta licencia en <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>