

Mariona Roigé Galceran

DETERMINACIÓ DE LA METOXIAMINA RESIDUAL EN MOSTRES AQUOSES DE PROCÉS PER CROMATOGRÀFIA IÒNICA

TREBALL DE FI DE GRAU

Dirigit per Enric Matas i Jordi Paisano

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2019

ÍNDIX

Abstract.....	1
1. Objectiu	2
2. Introducció.....	2
2.1. Kresoxim-metil	2
Etapa 1 – Síntesi del PBS	3
Etapa 2 – Síntesi del PBC.....	3
Etapa 3 – Síntesi del BCN.....	3
Etapa 4 – Síntesi del cetoèster i la cetoamida.....	4
Etapa 5 – Formació de la oximaèter.....	4
Etapa 6 – Isomerització	5
2.2. Analítica actual	6
3. Fonaments	6
3.1. Cromatografia iònica	6
3.1.1. Cromatografia d'intercanvi iònic.....	7
3.2. Funcionament ICS-5000	9
4. Desenvolupament del mètode	11
4.1. Columna C18 i precolumna CG18.....	11
4.2. Columna Zorbax 300-SCX	15
5. Mètode analític	17
5.1. Equips i material.....	17
5.2. Reactius	17
5.2.1. Propietats dels reactius.....	18
5.3. Procediment d'anàlisi	18
5.3.1. Preparació de la fase mòbil.....	18
5.3.2. Preparació de la dissolució de calibratge	18
5.3.3. Preparació de la mostra tècnica (MT)	19
5.3.4. Preparació de la mostra problema.....	19
5.3.5. Seqüència d'anàlisi	19
5.4. Condicions cromatogràfiques	20
5.5. Càlculs.....	20
5.6. Mesures de seguretat i higiene	20
5.7. Mesures mediambientals	21

5.8. Cromatogrames tipus.....	21
5.8.1. Cromatograma d'estàndard	21
5.8.2. Cromatograma de mostra	21
6. Validació del mètode	22
6.1. Injeccions principals	22
6.2. Exactitud.....	23
6.3. Linealitat.....	24
6.4. Precisió	28
6.5. Robustesa	31
6.6. Estabilitat.....	33
6.7. Límits de detecció i quantificació	34
6.8. Resum dels paràmetres de la validació de MAH.....	36
7. Comparació de mètodes	37
8. Conclusions	38
9. Bibliografia.....	40
10. Annexes	42
Annex 1. Resum d'injeccions de la validació.....	42
Annex 2. Cromatogrames de les injeccions principals.....	43
Annex 3. Rang de recuperació permesa.....	45
Annex 4. Taula de Dixon.....	46
Annex 5. Taula de Grubbs	47

Abstract

Aquest treball d'investigació consisteix en el desenvolupament i validació d'un mètode analític aplicat al laboratori per a la quantificació d'Hidroclorur de Metoxiamina (MAH) mitjançant Cromatografia iònica en mostres d'aigües residuals del procés de la planta de Kresoxim, per tal d'assegurar que es compleixen les especificacions de BASF.

El disseny d'aquest nou mètode serveix de guia a la indústria química per a la quantificació d'aquest additiu en una mostra determinada; basant-se en la cromatografia iònica com una tècnica automatitzada que permet analitzar de forma ràpida i eficient la separació, detecció i quantificació de les mostres per mitjà de la identificació dels pics en els cromatogrames.

Per assegurar la veracitat del mètode es verifica el compliment de certs paràmetres de validació requerits per l'empresa que inclouen exactitud, linealitat, precisió, robustesa, estabilitat i límits de detecció i quantificació.

This research work consists in the development and validation of an analytical method applied to the laboratory for the quantification of Methoxyamine Hydrochloride (MAH) by Ion Chromatography in samples of wastewater from the process in Kresoxim plant, to ensure that the specifications of BASF are met.

The design of this new method serves as a guide to the chemical industry for the quantification of this additive in a given sample; based on ion chromatography as an automated technique that allows the separation, detection and quantification of samples to be analyzed quickly and efficiently by identifying peaks in chromatograms.

To ensure the veracity of the method, that must be validated using the internal guideline. This parameters guideline includes accuracy, linearity, precision, robustness, stability and limits of detection and quantification.

1. Objectiu

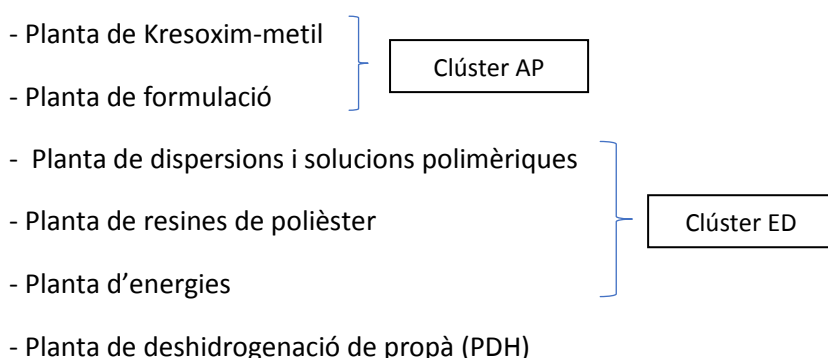
L'objectiu d'aquest treball ha estat desenvolupar i validar un mètode analític que permeti determinar Metoxiamina, MAH, en un anàlisi curt i amb un pretractament de mostra senzill i ràpid en mostres aquoses del procés industrial de la planta de Kresoxim-metil de l'empresa BASF Española S.L. del *site* de Tarragona.

2. Introducció

He realitzat l'assignatura Treball Fi de Grau a un laboratori d'una de les plantes químiques de l'empresa BASF Española S.L., més concretament al laboratori de fitosanitaris del Clúster AP.

Distribució de les diferents plantes industrials del *site*

Dins al *site* de Tarragona veurem que les diferents plantes estan distribuïdes de la següent manera:



Aquest estudi es centra en la planta de Kresoxim-metil ja que el mètode desenvolupat està creat per mostres aquoses amb Metoxiamina residual d'aquesta planta.

2.1. Kresoxim-metil

En aquesta planta un dels processos que hi té lloc és la obtenció d'un principi actiu anomenat Kresoxim-metil, que s'utilitzarà per a la producció de fungicides a partir de 17 matèries primeres.

El procés està compost de 6 etapes de producció, així com varies etapes de recuperació de dissolvents i tractament de residus.

Etapa 1 – Síntesi del PBS

La síntesi del PBS es realitza a partir de O-Cresol, metòxid sòdic i ftalida. En una primera reacció es combinen el O-Cresol i el metòxid sòdic per formar el cresòxid sòdic, que en una segona reacció es combina amb la ftalida per formar el PBS. En la primera reacció es forma addicionalment metanol mentre que en la segona s'obté com a subproducte hidròxid sòdic.

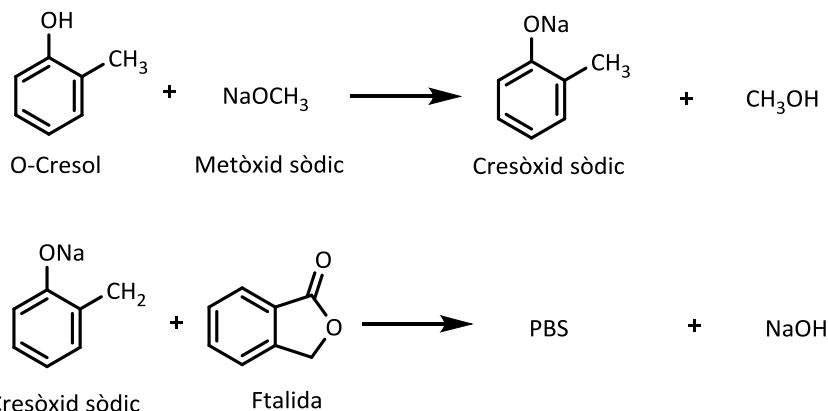


Figura 1. Reaccions de la síntesi del PBS

Etapa 2 – Síntesi del PBC

La síntesi del PBC es realitza fent reaccionar el PBS en un medi de toluè amb clorur de tionil. La reacció final a banda del PBC, té com a subproductes diòxid de sofre i àcid clorhídric.

La major part dels gasos produïts durant la reacció, diòxid de sofre, àcid clorhídric i toluè, es condensen i es reciclen.

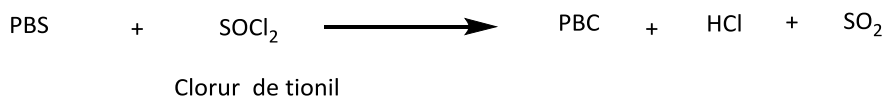


Figura 2. Reacció de la síntesi del PBC

Etapa 3 – Síntesi del BCN

La síntesi del BCN es realitza fent reaccionar el PBC, produït en la segona etapa, amb cianur sòdic. A part del BCN es produeix com a subproducte clorur sòdic.

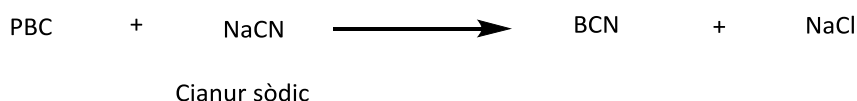


Figura 3. Reacció de síntesi del BCN

Etapa 4 – Síntesi del cetoèster i la cetoamida

La síntesi del cetoèster i la cetoamida es realitza fent reaccionar el BCN amb metanol i aigua dissolt en toluè i en medi fortament àcid. Tindrem com a subproducte de la reacció, clorur d'amoni.

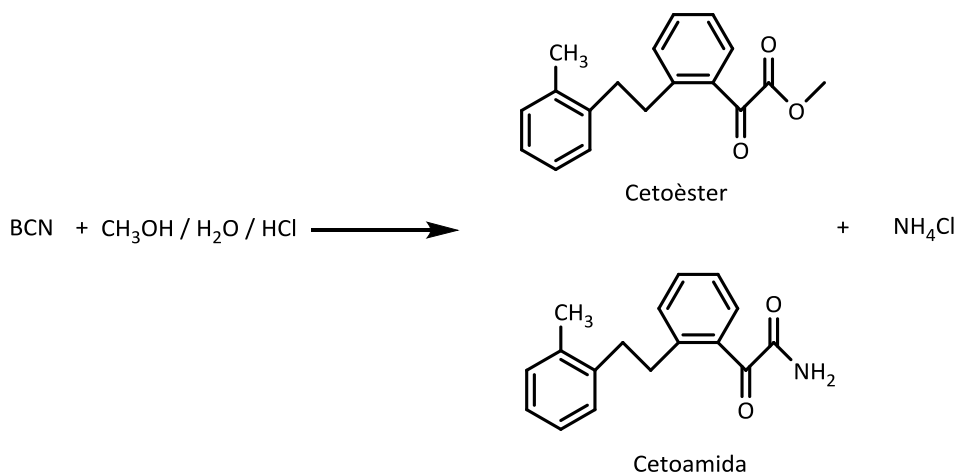


Figura 4. Reacció de síntesi del cetoèster i la cetoamida

Etapa 5 – Formació de la oximaèter

La formació de l'oximaèter (o oxímetr) té lloc al reaccionar la mescla produïda en l'etapa 4 amb Hidroclorur de Metoxiamina (MAH). Els productes resultants són els isòmers iso(E) i trans(Z).

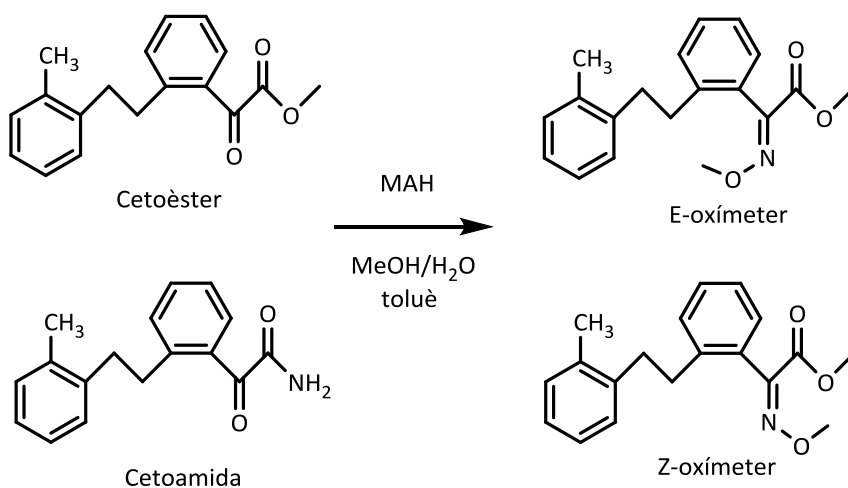


Figura 5. Reacció de formació de la oximaèter

Seguint l'esquema de la figura 6, la suspensió toluènica de cetoèster i cetoamida s'envia juntament amb una dissolució de MAH dissolta en metanol per tal de que es mescli a reflux i es produeixi la reacció. Aquesta mescla està constituïda per dos fases. S'afegeix aigua per dissoldre el clorur d'amoni produït com a subproducte de l'etapa 4 i després d'aquest rentat es separen les fases i ens quedem amb la fase orgànica que és on hi haurà el nostre producte.

Aquesta fase orgànica està sotmesa a un procés d'evaporació per tal d'eliminar solvents com ara el toluè i el metanol i aquesta solució serà la que s'enviarà a la següent etapa.

La fase aquosa té l'excés de MAH restant que, aquesta, s'aprofita per a la següent etapa de la reacció mitjançant una destil·lació i s'analitzen les fraccions resultants.

La Metoxiamina és un estimulant adrenèrgic, que es defineix com un medicament o substància que produeix efectes similars o idèntics als de l'adrenalina. Més concretament és un antiarítmic, per això aquesta analítica és important ja que una de les fraccions obtingudes de la destil·lació s'envia a la planta d'aigües biològiques i els límits de la Metoxiamina en aquestes aigües estan limitats per llei.

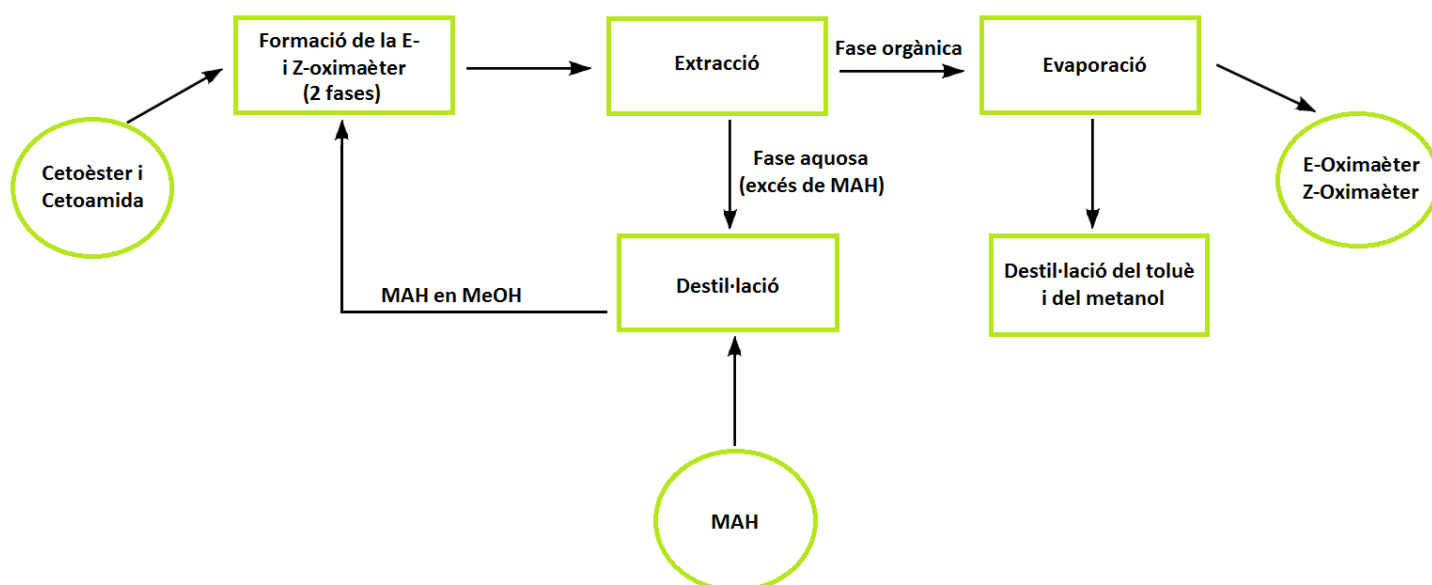


Figura 6. Esquema del procés de la formació de l'oximaèter

Etapa 6 – Isomerització

La mescla dels isòmers E i Z de l'etapa 5 es tracta amb una dissolució de HCl concentrat en metanol i aigua i d'aquesta manera la major part es transforma en l'isòmer iso(E).

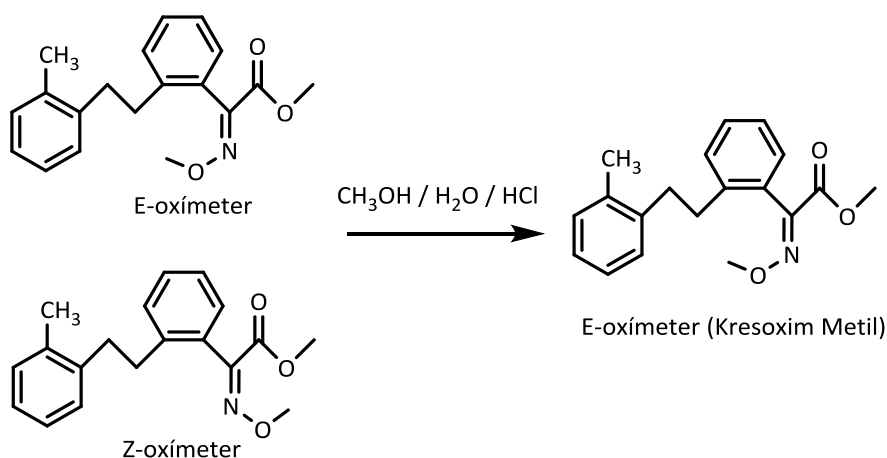


Figura 7. Reacció d'isomerització

2.2. Analítica actual

Actualment el mètode que s'utilitza per determinar Metoxiamina en mostres aquoses és a partir de cromatografia de gasos (GC) i ve precedit per un pretractament de mostra de temps llarg que fa que el temps d'obtenció dels resultats sigui aproximadament de dues hores.

El pretractament de la mostra es basa en una extracció líquid-líquid per tal d'eliminar el màxim d'analits no desitjats, seguida d'una destil·lació de 40 minuts al rotavapor i finalment la solució resultant s'analitza per GC per un mètode de 36 minuts.

En aquest procés d'extracció hi ha la transformació de la Metoxiamina en Oxima que consisteix en una reacció d'amines primàries amb aldehids o cetones (en aquest laboratori amb Ciclohexanona) tal i com s'observa a la figura 8. El mecanisme és anàleg al de la formació d'imes.

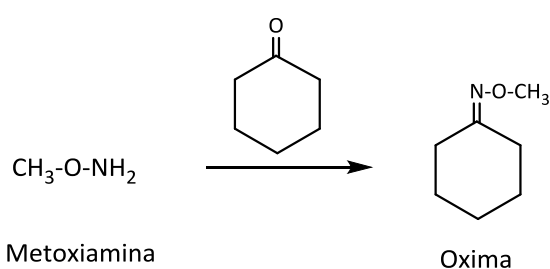


Figura 8. Reacció d'obtenció de l'oxima

El que es pretén en aquest estudi és eliminar el pretractament de la mostra i que es pugui analitzar la mostra amb un mètode de temps més curt.

3. Fonaments

3.1. Cromatografia iònica

La cromatografia iònica es realitza amb columnes plenes d'un material sòlid d'intercanvi iònic. Es considera una eina indispensable en les anàlisis modernes del laboratori. Permet separar mesclures complexes d'anions o cations i quantificar els ions individualment en un temps relativament curt. Les mostres amb concentracions molt altes d'ions requereixen un procés de dilució abans d'injectar-ho a l'instrument i, alhora, la cromatografia iònica és molt bona per determinar ions a concentracions molt baixes, fins a l'ordre de magnitud de part per milió (µg/L).^[2]

Es defineix generalment com un mètode analític en el qual els anions o cations se separen per diferències en la velocitat a la que passen a través d'una columna empaquetada amb partícules d'intercanvi aniònic o catiònic. No obstant això, també es poden obtenir excel·lents separacions d'analits iònics mitjançant cromatografia d'ions en una columna d'HPLC de fase inversa.^[2]

Hi ha 3 tipus de cromatografia iònica^{[2][3]}:

- ❖ Intercanvi iònic (IC): es basa en una reacció química estequiomètrica entre ions en una solució i una substància normalment sòlida que porta grups funcionals que poden fixar els ions com a resultat de les forces electrostàtiques. En el cas més simple de la cromatografia de cations, aquests són grups d'àcid sulfònic i en el cas de l'intercanvi aniònic grups d'amoni quaternari. El procés d'intercanvi iònic condueix a una condició d'equilibri, el costat cap al qual es troba l'equilibri depèn de l'afinitat dels ions participants als grups funcionals de la fase estacionària.
- ❖ Exclusió d'ions (IEC): s'utilitza principalment per a la separació d'àcids o bases febles. La major importància de l'IEC és l'anàlisi d'àcids febles com àcids carboxílics, hidrats de carboni, fenols o aminoàcids.
- ❖ Formació de parells iònics (IPC): Amb l'ajut de la cromatografia de parells iònics és possible separar els mateixos analits que en la cromatografia d'exclusió iònica, però el mecanisme de separació és completament diferent. Les fases estacionàries utilitzades són materials de fase inversa completament polars. Als eluents se li afegeix l'anomenat regent de parells iònics; consisteix en tensioactius aniònics o catiònics. Juntament amb els ions analítics carregats de manera oposada, els reactius formen un parell de ions sense càrrega, que pot ser retardat en la fase estacionària per interaccions hidrofòbiques. La separació és possible a causa de les constants de formació dels parells iònics i els seus diferents graus d'adsorció.

Els mètodes de cromatografia es defineixen pel mecanisme principal de separació utilitzat. Avui en dia, la cromatografia d'intercanvi iònic s'anomena simplement cromatografia d'ions, que és el mètode que s'ha fet servir en aquest estudi, mentre que la cromatografia de parells iònics i la cromatografia d'exclusió iònica es consideren aplicacions més especialitzades.^[3]

3.1.1. Cromatografia d'intercanvi iònic

Com que la formació d'ions s'afavoreix en solucions aquoses, la fase mòbil en IC és aquosa, normalment amortida a un pH determinat. Els llocs d'intercanvi iònic queden immobilitzats en la fase estacionària, representada en la següent figura com a R en un exemple d'intercanvi catiònic.^[4]

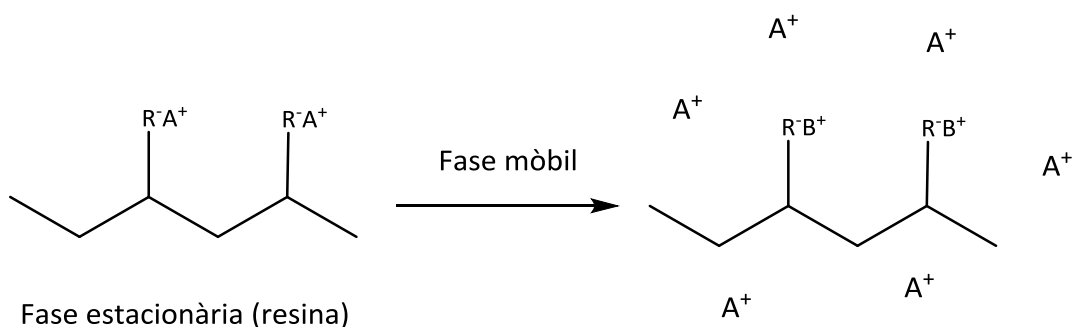


Figura 9. Intercanvi iònic de la resina

Observant la figura 9 l'ió B^+ representa l'analit separant-se d'altres cations, per exemple com C^+ i D^+ . Els cations es separaran entre si, si la resina (fase estacionària) té una afinitat selectiva per als diversos cations analítics. El catió A^+ , que era el catió que ja hi havia a la resina, no hauria d'estar fortament sostingut per la resina o l'intercanvi no es produirà.^[4]

La fase estacionària o la resina comunament utilitzada en IC és el copolímer d'estirè-divinilbenzè, que es mostra a la figura 10.

- Els grups funcionals es col·loquen en els anells fenil per proporcionar llocs iònics.
- El nombre de llocs iònics posats a la resina determinarà la capacitat de la resina.
- Les mides de les mostres han de ser prou petites com per no superar aquests límits.

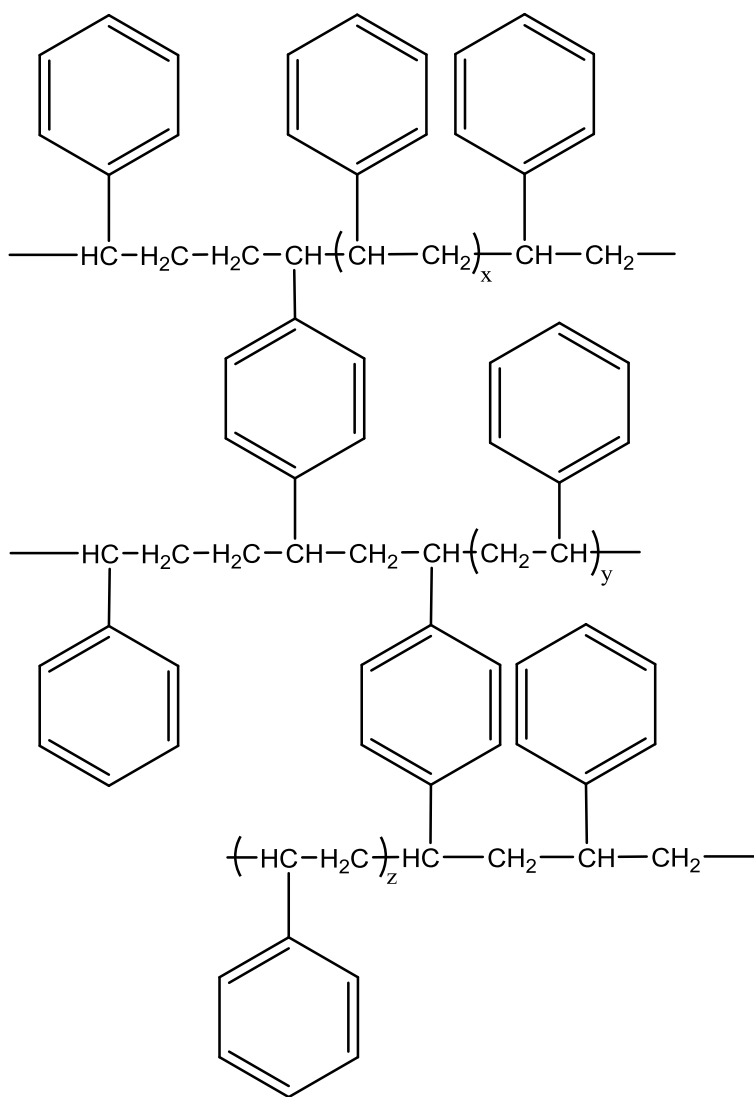


Figura 10. Copolímer d'estirè-divinilbenzè

S'han utilitzat molts altres substrats per a l'IC, a més dels poliestirens. Alguns són productes naturals com la cel·lulosa, sovint reticulats per obtenir més rigidesa, i altres es fabriquen, com ara gels de povidexan.^[4]

3.2. Funcionament ICS-5000

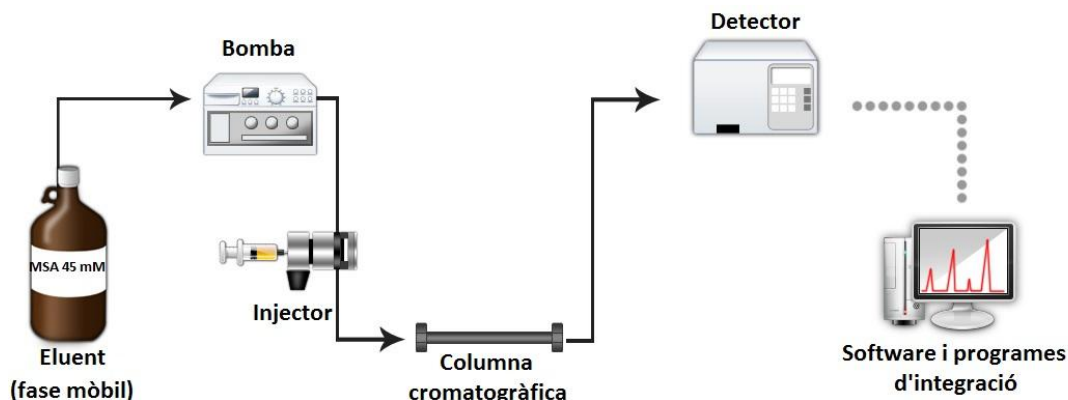


Figura 11. Esquema del funcionament d'un cromatògraf iònic

Seguint l'esquema de la figura 11, la missió de la bomba serà transportar l'eluent per tot el sistema cromatogràfic amb un flux constant i sense polsos. Aquest eluent passarà per la vàlvula d'injecció on s'introduirà la mostra, ja sigui de manera automàtica o manual, que seguidament passarà a la columna cromatogràfica on es produirà la separació dels analits. Finalment, passarà pel detector conductimètric que a partir d'un software ens proporcionarà un cromatograma.^{[4][5]}

Eluent: Aquest paràmetre és el més fàcil d'alterar per tal d'influir en la separació. L'elecció d'un sistema d'elució adequat es pot fer utilitzant un ampli ventall de criteris entre els quals hi trobem que sigui compatible amb el mètode de detecció.

Bomba: Com ja hem dit anteriorment la missió principal de la bomba és transportar l'eluent per tot el sistema. També ha de complir uns requisits per un bon funcionament:

- Ha d'estar composta de materials químicament inerts davant la fase mòbil.
- Ser capaç de treballar a pressions elevades.
- Tenir un flux constant lliure de polsos ja que podria contribuir en el soroll de fons del detector i disminuir la sensibilitat.
- Si la bomba ens permet treballar en la modalitat de gradient, és necessari que l'equip cromatogràfic tingui un dispositiu capaç de realitzar mescles de dissolvents amb un control precís i reproducible.

Injector: el mètode d'injecció és fonamental, ja que un mal sistema pot donar lloc a eixamplament de les bandes cromatogràfiques que deteriorarien l'eficàcia del sistema cromatogràfic. Trobarem dos tipus d'injector: els de vàlvula i els de xeringa.

En aquest estudi s'ha disposat d'un injector de vàlvula que consisteix en una vàlvula de sis vies, dos de les quals estan connectades entre sí a través d'un capil·lar (*loop*). Aquest capil·lar és un tub de volum conegut i el seu propòsit és el de mantenir la mostra abans de fer-se la injecció.

El procés d'injecció té lloc amb dues etapes; la primera consisteix en carregar la mostra en el *loop* amb l'ajuda d'una xeringa i en la segona, a partir d'un gir de la vàlvula, es fa passar eluent a través d'aquest capil·lar cap a la columna.

Columna cromatogràfica: La columna és l'element fonamental d'un cromatògraf, ja que és en aquesta on té lloc la separació, per tant resulta fonamental una correcta elecció per a cada separació. En aquest estudi s'ha utilitzat una columna d'intercanvi catiònic^[5]:

ZORBAX 300-SCX té unes partícules de sílice de 5 µm i 300 Å de mida de porus i enllaçades químicament amb un grup d'àcids sulfònics aromàtics. Aquesta columna s'utilitza per a la separació de compostos bàsics, solubles en aigua i biomolècules usat per a la cromatografia líquida d'alt rendiment d'intercanvi de cations.^[6]

Les columnes d'intercanvi iònic ZORBAX presenten un alt grau d'estabilitat mecànica. Per tant, es poden utilitzar a grans fluxos i pressions. Les columnes són compatibles amb canvis ràpids en la força iònica, de manera que són possibles temps de degradació curts, reequilibri ràpid i és compatible amb gradient d'elució.^[7]

Detector: Un detector per a cromatografia és un dispositiu que permet mesurar, a la sortida de la columna, una propietat física de l'eluent, que dependrà de la composició d'aquest. S'ha de tenir en compte que el detector compta amb una sèrie de característiques que no afecten a l'eficàcia de la separació dels analits:

- Resposta – ha de ser proporcional a la variació de concentració que surt de la columna.
- Soroll – és qualsevol pertorbació de la senyal generada pel detector i que no és originada per la sortida d'un analit de la columna.
- Deriva – és la variació de la senyal de base al llarg del temps, que origina una variació lenta i progressiva de la línia base.
- Sensibilitat – indica la quantitat mínima que és possible detectar, és dependent del soroll del detector.

En la cromatografia iònica s'han utilitzat amb èxit els detectors de conductivitat on es mesura de manera continuada la conductivitat de la fase mòbil que elueix de la columna, indicant-se la presència d'un analit per mitjà d'un canvi en la conductivitat. L'únic inconvenient d'aquests detectors és la seva inestabilitat degut a variacions de temperatura, per tant, s'ha de disposar d'un bon sistema tèrmic.^[5]

Software i programes d'integració: ha de ser compatible amb l'equip i tenir un bon sistema d'integració. El software que s'ha utilitzat en aquest estudi és Chromeleon 7 i ha sigut adequat per realitzar totes les proves que s'han fet.

4. Desenvolupament del mètode

Els recursos que tenien disponibles a l'entitat col·laboradora van ser:

- Columna CS18 i precolumna CG18 – intercanvi catiònic
- Columna Zorbax 300SCX – intercanvi catiònic
- DIONEX ICS-5000

El primer que es va fer va ser condicionar tot l'equip deixant passar aigua durant 6 hores sense columna connectada, per tal de que es netegessin a fons tots els capil·lars i de forma que, si quedava algun residu d'anàlisis anteriors, pogués ser eliminat. Seguidament es va connectar la columna i la precolumna perquè d'aquesta manera estiguessin totalment acondicionades juntament amb l'equip i es va deixar passar aigua 18 hores.

4.1. Columna C18 i precolumna CG18

Proves amb patrons

Les condicions inicials que es van utilitzar van ser a partir de les recomanacions que teníem de la columna de la casa comercial *Vertex*, amb un estàndard d'hidroclorur de Metoxiamina(MAH) al 98% de puresa, mostrades a la taula 1.

Taula 1. Primeres condicions del mètode

Condicions del mètode

<i>Eluent</i>	Aigua ultrapura i àcid metansulfònic (MSA) 20 mM
<i>Flux</i>	0,28 mL/min
<i>Temperatura</i>	Columna – 35°C Compartiment – 30°C Cel·la – 40°C
<i>Loop</i>	20µL
<i>Temps d'anàlisi</i>	180 min
<i>Estàndard (patró)</i>	127,78 mg MAH / 25 mL aigua

El resultat d'aquest anàlisi va ser la presència d'un únic pic a l'inici del cromatograma tal com es veu en la figura 12. S'observa que podia ser una senyal de la injecció degut a que en altres mètodes també ens trobem amb aquest fenomen al principi, però no s'havia de descartar que es pogués tractar del nostre analit problema. Degut a la falta de pics més enllà del minut 4 es va establir un temps d'anàlisi d'entre 5 i 10 minuts per les següents proves.

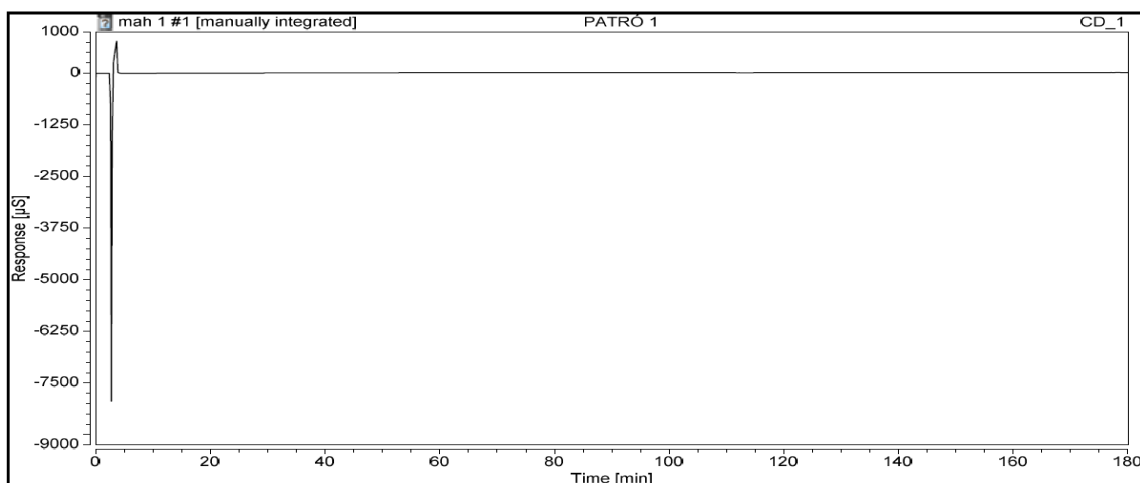


Figura 12. Primer cromatograma del patró de MAH

Es va fer una segona prova pesant més quantitat de patró, fent una seqüència de 4 vials d'aigua i 4 vials de l'estàndard (per comprovar les diferències entre cromatogrames), obtenint el que es mostra en la figura 13.

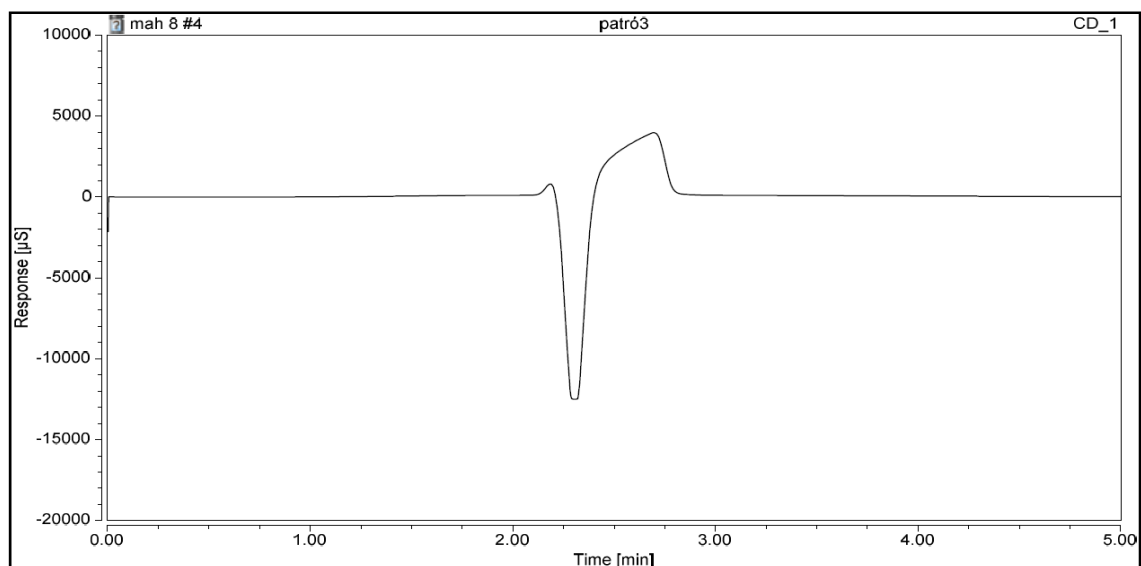


Figura 13. Cromatograma de patró de MAH

Amb aquestes condicions s'havia aconseguit diferenciar dos pics diferents però encara no es separaven adequadament i no es podia extreure cap resultat favorable. A partir d'aquí i per intentar separar i optimitzar aquest pic es van fer les següents proves modificant diferents variables del mètode:

Es va canviar el flux des de 0,20 mL/min fins a 0,35 mL/min, diferents eluents com àcid nítric, àcid sulfúric, acetona, àcid oxàlic, acetonitril i àcid fòrmic en diferents concentracions, un volum d'injecció des de 5 µL fins a 25 µL i finalment es van provar diferents pesades de patró que anaven des de 500 ppm fins a 4000 ppm.

Les conclusions que es van extreure d'aquest procés experimental és que a un flux de 0,3 mL/min i pesant una quantitat de 700 ppm obteníem un cromatograma com el de la figura 14

amb dos pics ben diferenciats. Si pesàvem una quantitat de mostra superior a 2500 ppm era quan s'obtenia un sol pic en el cromatograma perquè estava tot solapat.

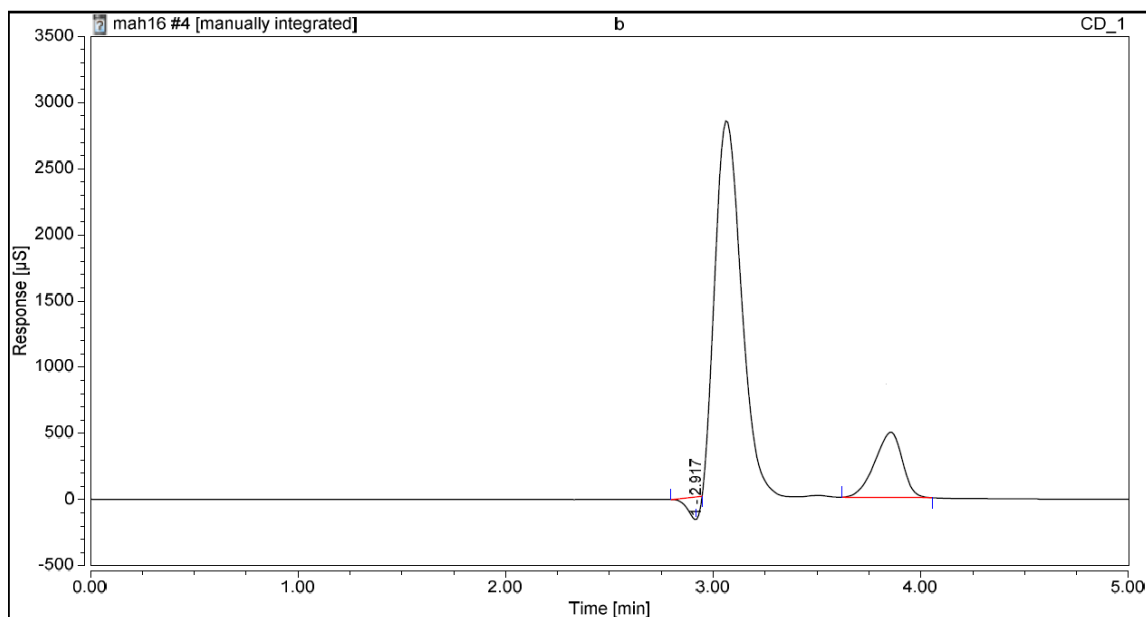
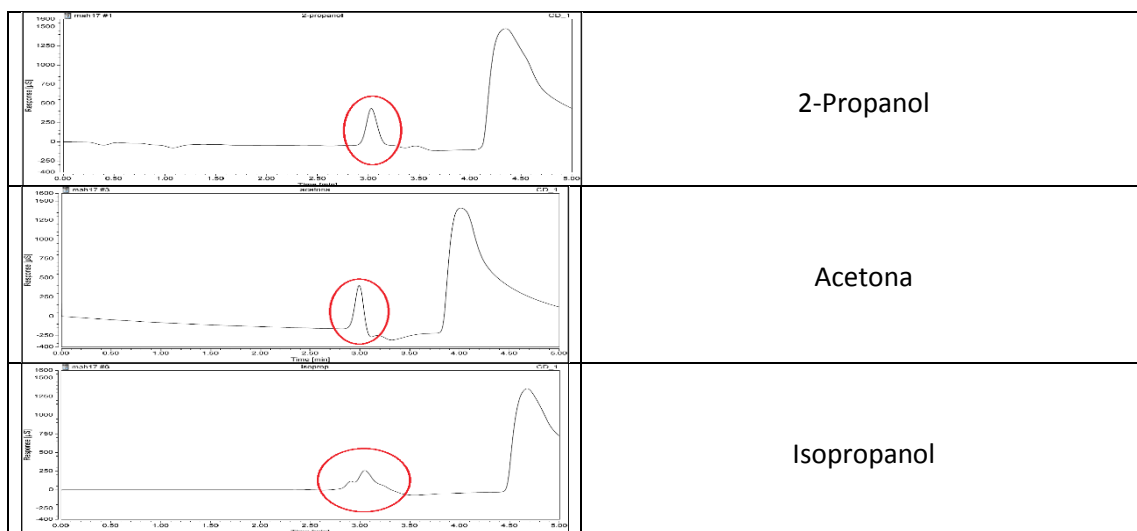


Figura 14. Cromatograma de patró de MAH

Es va intentar separar més els dos pics presents per tal que augmentés l'eficàcia però no es va aconseguir degut a que les proves que es van realitzar sortien igual de separats però variant lleugerament els seus temps de retenció.

Un cop teníem el mètode encaminat per separar bé les espècies presents, vam voler intentar eliminar el primer pic que podia ser degut a la fase mòbil (al moment de la injecció). Es van realitzar diferents injeccions de dissolvents orgànics però no n'hi va haver cap que no tingués un pic en aquell temps de retenció tal i com es pot observar en la figura 15, per tant no vam canviar el mètode.



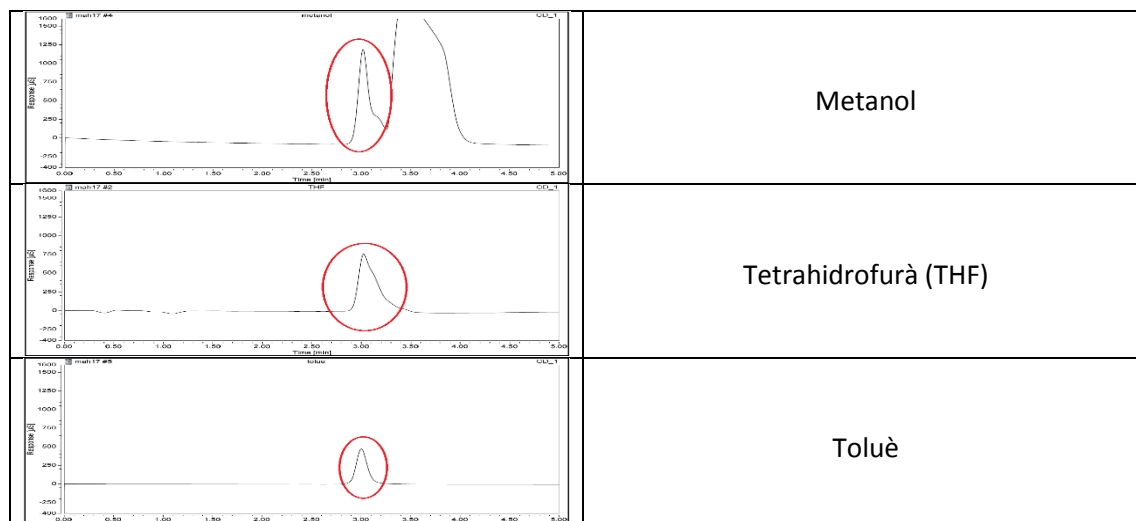


Figura 15. Cromatogrames dels dissolvents de prova

Quan es va tenir el mètode definit amb les condicions més òptimes que havíem trobat, les que s'observen en la taula 2, vam començar a fer proves amb la mostra de procés.

Taula 2. Condicions òptimes trobades per patrons

Condicions del mètode òptim

<i>Eluent</i>	Aigua i àcid metansulfònic (MSA) 45 mM
<i>Flux</i>	0,30 mL/min
<i>Temperatura</i>	Columna – 35°C Compartiment – 30°C Cel·la – 40°C
<i>Loop</i>	20µL
<i>Temps d'anàlisi</i>	10 min

Proves amb mostra de procés

Els analits presents de la mostra en qüestió eren (entre altres) metanol, Metoxiamina, clorur sòdic, clorurs amoniacals, aigua i toluè. Primer de tot s'havia de decidir si s'analitzava la mostra directe, es diluïa o se li feia algun tractament previ per tal de que es separés millor dels altres analits. L'última opció la vam descartar ja que actualment el mètode que s'utilitza al laboratori té un tractament de mostra de temps elevat i és això el que es volia eliminar completament.

Després de provar diferents dilucions, mostra directa i diferents condicions de flux i temperatura vam concloure que amb la columna que estàvem utilitzant no es podien separar tots els compostos de la mostra de procés ja que no ens sortia cap pic ben definit, com s'aprecia en la figura 16, ni seguia una linealitat de creixement al tenir la solució més concentrada.

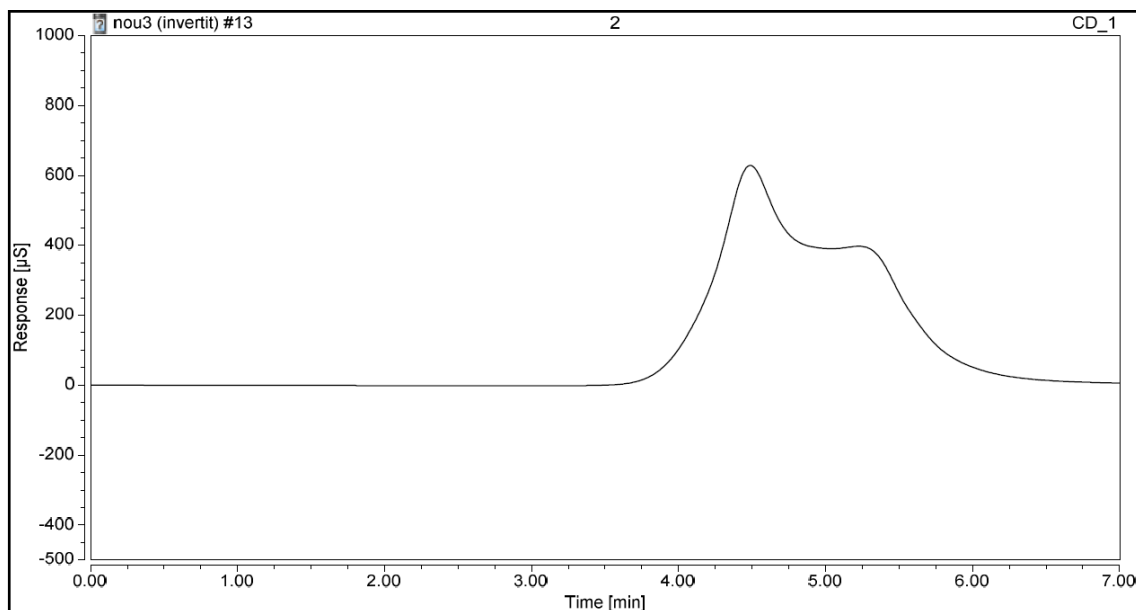


Figura 16. Cromatograma de mostra de procés

4.2. Columna Zorbax 300-SCX

Ja que es disposava d'una altra columna, es va decidir canviar-la. La nova columna seria la Zorbax 300SCX, també d'intercanvi catiònic.

Al ser d'unes característiques tan semblants a l'anterior, es va provar el mètode que s'havia obtingut com a òptim amb l'altra columna però es van haver de canviar els pesos d'estàndard (patró) ja que amb aquesta columna vam comprovar que la sensibilitat era major i que amb menys quantitat de patró teníem respostes amb eficiència i resolució alta.

També es va haver de canviar el flux ja que aquesta columna treballava amb fluxos més alts que exercien menys pressió, es va començar per 1,2 mL/min seguint les recomanacions de la casa comercial *Vertex*. Es va determinar que a partir de 40 ppm s'obtenia un bon cromatograma amb una bona resposta per tant, es van fer les proves pesant una quantitat aproximada d'entre 40 i 400 ppm.

Es van obtenir resultats amb una bona eficàcia i resolució a l'hora de determinar patrons com es pot comprovar a la figura 17. El següent pas va ser condicionar el mètode per a la determinació de mostra de procés que fins ara no s'havia pogut fer.

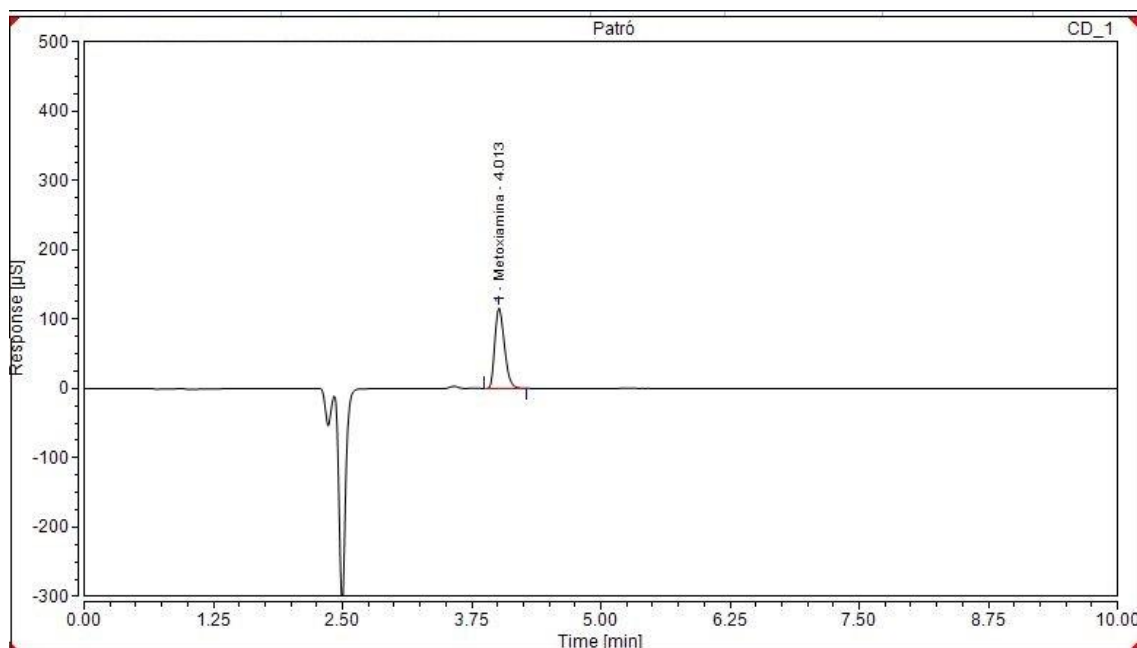


Figura 17. Cromatograma de patró de MAH

Es van haver de fer les mateixes comprovacions anomenades anteriorment de dilucions i es va determinar que es podia analitzar mostra directe i que els pics que no eren del nostre analit d'interès no afectaven en la quantificació d'aquest.

Una vegada es va definir que tant en l'estàndard com en la mostra de procés la Metoxiamina es podia detectar i quantificar sense interferents, es va seguir optimitzant el mètode, però el que es va adaptar més correctament va ser el que ja teníem definit, tal com s'observa en la figura 18, i es va decidir que aquell era l'òptim.

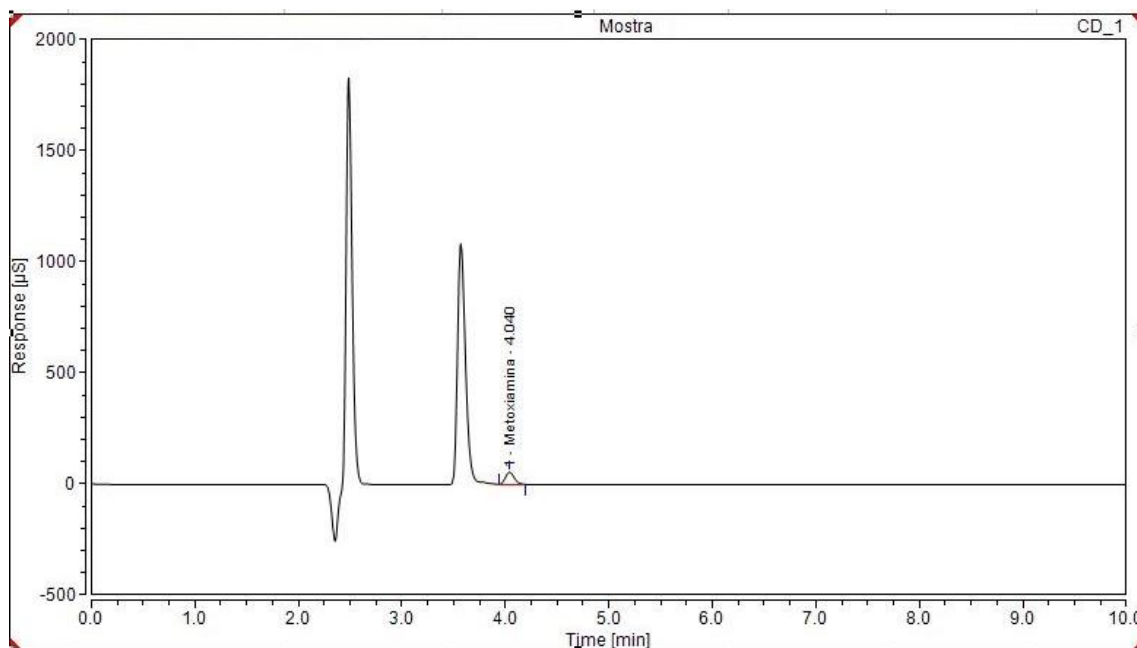


Figura 18. Cromatograma de mostra de procés

Taula 3. Condicions definitives del mètode

Condicions definitives del mètode

<i>Eluent</i>	Aigua i àcid metansulfònic (MSA) 45 mM
<i>Flux</i>	1,2 mL/min
<i>Temperatura</i>	Columna – 35°C Compartiment – 30°C Cel·la – 40°C
<i>Loop</i>	20µL
<i>Temps d'anàlisi</i>	10 min

5. Mètode analític

5.1. Equips i material

Cromatògraf iònic ICS-5000

Balança analítica de precisió 0,01 mg

Espàtules metàl·liques

Pipeta Pasteur d'un sol ús

Matrassos aforats de 50 mL

Bany d'ultrasons

Xeringues de 5 mL d'un sol ús

Vials per a cromatografia (amb tap pre-tallat)

Filtres de 0,22 µm

Micropipeta de 5 mL

Proveta 1000 mL

Vas de precipitats

Ampolles per eluents de l'equip

5.2. Reactius

Hidroclorur de Metoxiamina (MAH) (CAS 593-56-6)

Àcid metansulfònic (MSA) 70% (CAS 814-63-7)

Aigua MQ (CAS 7732-18-5)

5.2.1. Propietats dels reactius

Taula 4. Propietats dels reactius

	MAH	MSA
Puresa	90-99%	70%
Toxicitat	 - Pot ser corrosiu pels metalls - Nociu en cas d'ingestió o contacte amb la pell - Provoca cremades greus a la pell i lesions oculars greus - Pot irritar les vies respiratòries - Risc d'aspiració - Cancerigen - Perillós pel medi aquàtic	 - Pot ser corrosiu pels metalls - Nociu en cas d'ingestió o contacte amb la pell - Provoca cremades greus a la pell i lesions oculars greus - Pot irritar les vies respiratòries
Manipulació	Ulleres de seguretat Guants Manipular-ho en campana d'extracció Cobrir tot el cos amb roba adequada	

5.3. Procediment d'anàlisi

5.3.1. Preparació de la fase mòbil

En un matràs aforat de 1000 mL, afegir 4,6 mL de MSA al 70% en aigua i enrasar amb aigua MQ per tal que ens quedi una concentració de 45 mM.

$$1L \text{ solució} \cdot \frac{0,045 \text{ mols MSA}}{1 L \text{ solució}} \cdot \frac{96,11 g \text{ MSA}}{1 \text{ mol MSA}} \cdot \frac{100 g \text{ solució}}{70 g \text{ MSA}} \cdot \frac{1 mL \text{ solució}}{135 g \text{ solució}} = 4,6 \text{ mL MSA}$$

Equació 1: Càlcul del volum d'àcid metansulfònic per la fase mòbil

5.3.2. Preparació de la dissolució de calibratge

1. En un matràs aforat de 50 mL i en balança analítica de precisió 0,01 mg, es pesen les quantitats de substància requerides segons la taula adjunta:

Taula 5. Taula de calibratge

Nivell de calibratge	Component	Pes [mg]
Estàndard 1 (STD1)	Hidroclore de Metoxiamina	7,5
Estàndard 2 (STD2)	Hidroclore de Metoxiamina	12,5

2. S'afegeix aigua MQ fins aproximadament 1 cm de la línia d'enràs.
3. S'introdueix el matràs durant 5 min en el bany d'ultrasons fins la completa dissolució de l'estàndard.
4. Es tempera el matràs en el bany de 20°C.

5. S'acaba d'enrasar amb aigua MQ.
6. S'omple el vial per cromatografia, filtrant la mostra.
7. S'injecta el vial segons el mètode definit.

NOTA: Els pesos de la taula 5 s'hauran de referir a mg / 50 mL i s'haurà de multiplicar per la puresa del patró per tenir el pes net, seguint l'equació 2.

Càlcul dels ppm reals d'estàndard:

$$mg \text{ pesats} \cdot \frac{\% \text{ puresa patró}}{100} \cdot \frac{1}{0,050 \text{ L volum total}} = ppm \text{ estàndard}$$

Equació 2: Càlcul dels ppm reals d'estàndard

NOTA: Les dissolucions d'estàndard de calibratge es conservaran a la nevera i s'utilitzaran fins que s'acabin però es renovarà el calibratge fix al software, punxant de nou els estàndards, cada vegada que es canviï la fase mòbil.

5.3.3. Preparació de la mostra tècnica (MT)

1. En un matràs aforat de 50 mL i en balança analítica de precisió 0,01 mg, es pesen 10 mg de patró de MAH.
2. S'afegeix blanc (matriu de la mostra sense analit d'interès) fins aproximadament 1 cm de la línia d'enràs.
3. S'introdueix el matràs durant 5 min en el bany d'ultrasons fins la completa dissolució de l'estàndard.
4. Es tempera el matràs en el bany de 20°C.
5. S'acaba d'enrasar amb aigua MQ.
6. S'omple el vial per a cromatografia, filtrant la mostra.
7. S'injecta el vial segons el mètode definit.

5.3.4. Preparació de la mostra problema

1. S'agafa mostra directa (sense dilució) i s'omple un vial per a cromatografia, filtrant la mostra.
2. S'injecten els vials segons el mètode definit.

5.3.5. Seqüència d'anàlisi

La seqüència de calibratge està composta per:

- STD1 (es deprecia el resultat)
- STD1 (nivell de calibratge 1)
- STD2 (nivell de calibratge 2)
- MT (mostra tècnica)

La seqüència d'anàlisi està composta per:

- M1, M2, M3 . . .

5.4. Condicions cromatogràfiques

Taula 6. Condicions cromatogràfiques

Nom del mètode														
Columna	Zorbax 300SCX													
Eluent	Àcid Metansulfònic 45 mM en aigua MQ (isocràtic)													
Flux de fase mòbil	1,2 mL/min													
Temperatura de columna	35°C													
Volum d'injecció	20 µL													
Pressió	1050 psi													
Detector	Conductimètric													
Taula de calibratge	<table><tr><th>Temps de retenció</th><th>Component</th><th>Nivell</th><th>Pes [mg]</th><th>Àrea</th></tr><tr><td rowspan="2">4,01</td><td rowspan="2">MAH</td><td>1</td><td>7,45</td><td>7,24</td></tr><tr><td>2</td><td>12,72</td><td>12,50</td></tr></table>	Temps de retenció	Component	Nivell	Pes [mg]	Àrea	4,01	MAH	1	7,45	7,24	2	12,72	12,50
Temps de retenció	Component	Nivell	Pes [mg]	Àrea										
4,01	MAH	1	7,45	7,24										
		2	12,72	12,50										

5.5. Càlculs

1. Amb les dissolucions d'estàndard es calcula una recta de calibratge (recta de regressió lineal). Cada resultat de la dissolució estàndard és un punt de la recta de calibratge, inclòs l'origen. El coeficient de correlació ha de ser superior a 0,999.
2. S'actualitza el càlcul de les rectes de calibratge cada cop que s'injecten les dissolucions estàndard de calibratge.
3. Es calcula el contingut de cada substància en cada mostra problema interpolant l'àrea de l'analit en la seva recta de calibratge i obtenint directament ppm de substància en la mostra.

5.6. Mesures de seguretat i higiene

S'ha de complir amb totes les normes de seguretat establertes al laboratori.

- Protecció de vies respiratòries: treballar en una zona amb una ventilació adequada.
- Protecció de les mans: guants de protecció química de trilites.
- Protecció dels ulls: ulleres de seguretat.
- Protecció corporal: roba de treball.
- Indicacions addicionals: atendre les indicacions recollides a les fitxes de seguretat dels productes. Evitar tot contacte innecessari amb productes. Rentar-se les mans abans de les pauses i al finalitzar la feina. Una incorrecta utilització pot ser perjudicial per la salut.

5.7. Mesures mediambientals

Els residus sòlids resultants de la manipulació i preparació de la mostra, tals com pipetes de plàstic, paper de neteja contaminat de producte, etc. seran dipositats en les papereres per a aquest fi. Aquestes papereres estan identificades com a “Material Contaminat”.

Els residus líquids obtinguts com a conseqüència de la preparació de mostra i anàlisi de la mateixa, són eliminats a través de les piques identificades per aquest fi. Aquestes estan identificades amb un cercle vermell.

5.8. Cromatogrames tipus

5.8.1. Cromatograma d'estàndard

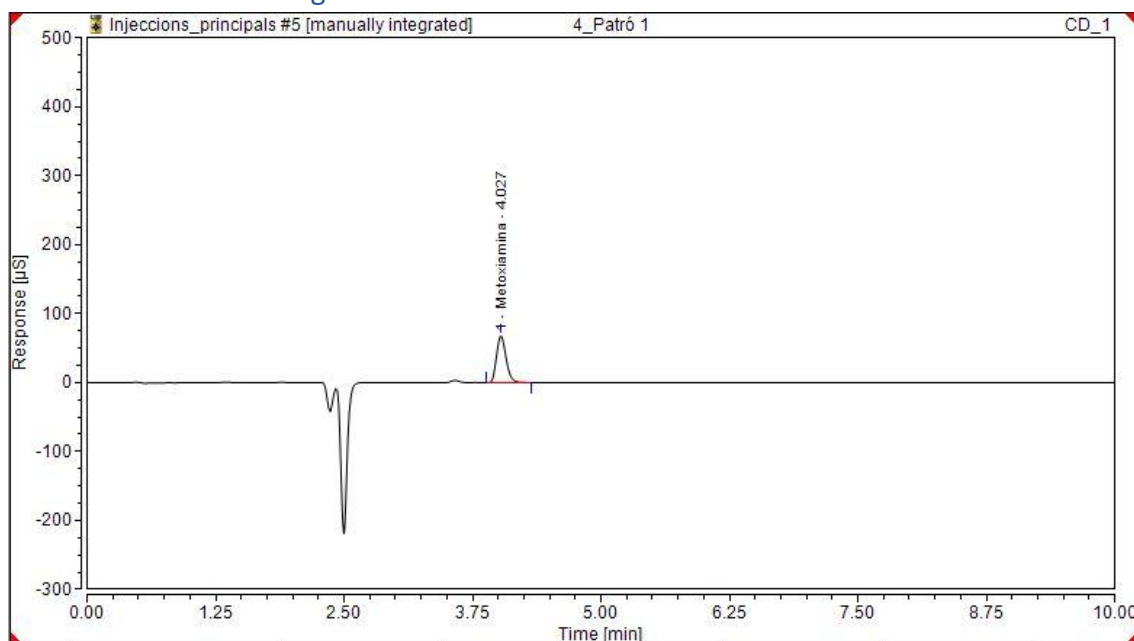


Figura 19. Cromatograma de patró de MAH

5.8.2. Cromatograma de mostra

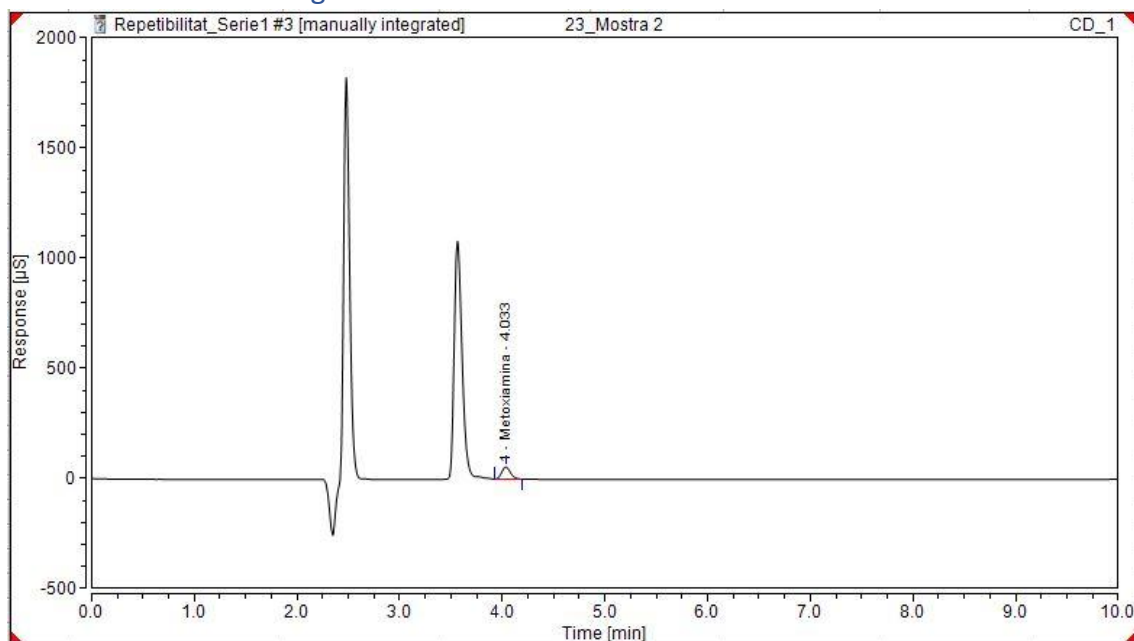


Figura 20. Cromatograma de mostra de procés

6. Validació del mètode

El procediment que es va utilitzar per validar aquest mètode va ser el mateix que tenen al laboratori de BASF: totes les validacions en aquest laboratori queden recollides en un Excel on, posant els resultats, et dona per vàlida la validació o no, ja que té un sistema de càlcul automàtic.

A partir d'introduir la puresa del patró i la concentració nominal, retorna un resum d'injeccions que estan inclosos els pesos dels patrons en cada cas que es podrà observar a l'annex 1.

6.1. Injeccions principals

El mètode que s'utilitza per a la validació inclou una primera seqüència per tal d'observar com seran els cromatogrames de blanc, de patró, com afectarà la fase mòbil a la seqüència i quin aspecte tindran els estàndards de calibratge. Obtindrem els cromatogrames de l'annex 2.

Taula 7. Temps de retenció dels analits d'injeccions principals

Espècie	Temps de retenció (min)		
<i>Blanc</i>	2,48	3,57	
<i>Mostra tècnica (MAH)</i>	2,36	3,58	4,01
<i>MSA 70%</i>	2,49	3,58	
<i>Estàndard 1</i>	2,50	3,58	4,03
<i>Estàndard 2</i>	2,50	3,58	4,01

A partir de la taula 7 es pot observar com no tenim cap espècie que faci d'interferent amb el nostre analit d'interès ja que totes les espècies presents en cada anàlisi tenen un temps de retenció diferent i no tenen sub-productes que afectin en la determinació i quantificació de la Metoxiamina.

Si analitzem més a fons cada cromatograma s'observa que en totes les anàlisis veiem un pic molt proper a 2,5 minuts però no correspon a cap espècie, és una senyal de la fase mòbil i és un fenomen característic d'aquesta columna.

A continuació es troba un segon pic molt petit, d'àrea inferior a $1 \mu\text{S} \cdot \text{min}$, en totes les injeccions que es van fer al minut 3,58 que, es va comprovar, que surt en les injeccions que s'han fet al llarg de les proves amb el cromatògraf iònic quan hi ha de fase mòbil MSA. Per tant, es pot determinar amb seguretat que aquest pic és degut a la fase mòbil.

Finalment, trobem en alguns casos un tercer pic. En la mostra tècnica de MAH i en els dos estàndards hi ha la presència d'una espècie en el minut 4 aproximadament que, es pot afirmar, correspon a la Metoxiamina.

6.2. Exactitud

L'exactitud d'un mètode està definida com la proximitat del resultat de la mesura respecte el valor real. En un mètode amb un gran grau d'exactitud, la mostra (la qual té una concentració real coneguda) s'analitza i el valor de la mesura idealment hauria de ser idèntic al del valor real. Normalment, l'exactitud és representada i determinada per diversos estudis, però hi ha 3 maneres de determinar-la:

- Comparació amb un valor de referència
- Patró d'analit en un blanc
- Addicions estàndard d'analit

Preparació de mostres

- Seguint l'esquema de la taula d'exactitud de l'annex 1 s'ha de preparar un total de 6 mostres amb patró sobre un blanc (2 mostres per una concentració del 80% del valor nominal, 2 mostres per concentració de 100% i 2 mostres per concentració de 120%). Els resultats s'introdueixen en ppm detectats de substància.

Criteris de valoració

- Cada una de les injeccions ha de complir els criteris de la taula de l'annex 3.

❖ Resultats i discussió

Taula 8. Resultats de l'exactitud

Concentració				95%
Pes [mg / 50 mL]	Pes net [mg]	Concentració [ppm]	Resultat [ppm]	Recuperació
8,42	8,00	159,98	148,97	93,12%
8,34	7,92	158,46	147,83	93,29%
10,84	10,30	205,96	191,27	92,87%
9,35	8,88	177,65	167,34	94,20%
12,25	11,64	232,75	225,83	97,03%
12,04	11,44	228,76	216,13	94,48%
Mitjana				94,16%

Tots els paràmetres d'acceptació són correctes

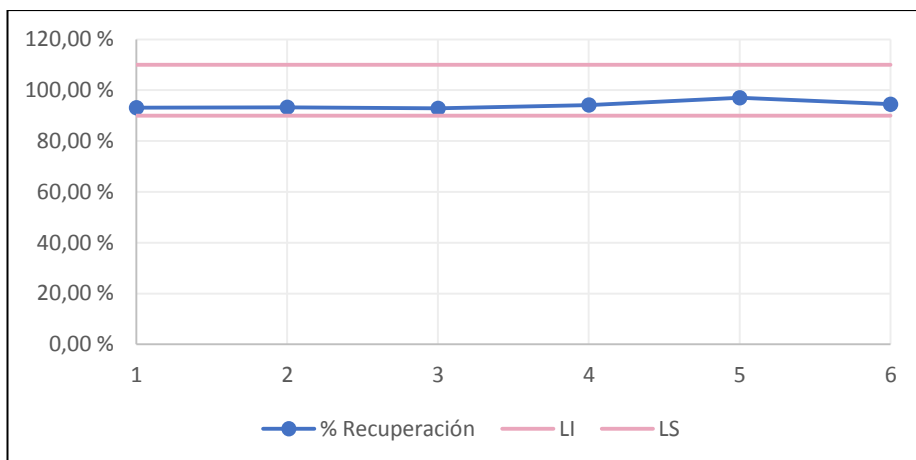


Figura 21. Gràfica representativa de la recuperació de les mostres preparades

Segons ens indica la taula de l'annex 3, la recuperació que hem d'obtenir per cada una de les mostres, tenint en compte que la concentració nominal és del 0,02 % (corresponent a 200 ppm), és del 90% al 110%. Aquest és un criteri de valoració de BASF seguint la norma SANCO/3030/99 rev. 4 (11/07/00) i com es pot comprovar a la taula 8 cada un dels patrons preparats ho compleix. Per tant, donem per vàlid aquest paràmetre.

La norma que es segueix està fixada per al control i seguiment d'una mostra, segons la directiva 91/414 CEE que s'ha analitzat de forma robusta, precisa i exacte. Segueix el criteri de requerir mètodes per identificar i quantificar la substància activa en el material tècnic i el producte formulat.^[8]

Cal destacar que encara que ens doni uns resultats que entren dins els límits fixats de la validació, tenint en compte que és una mostra on l'únic tractament previ que se li fa és la dilució, té una recuperació baixa. Aquest fet pot ser degut a què la concentració real de Metoxiamina del patró és més baixa del que indica.

La figura 21 ens mostra un resum de la recuperació de totes les mostres amb els límits (inferior i superior) fixats seguint el criteri de la taula de l'annex 3.

6.3. Linealitat

La linealitat d'un mètode és la proporcionalitat entre la concentració de l'analit i la resposta del mètode en un interval o rang de concentracions. Es poden avaluar 3 paràmetres de la recta de calibratge obtinguda:

- Coeficient de correlació (r) i determinació (r^2): És el grau de relació entre la variable de concentració (x) i la variable resposta (y). És recomanable que sigui igual o major a 0,999 tot i que en el cas de concentracions traça s'accepta un valor igual o major a 0,99.

- Gràfic de residuals (scores): La correlació entre dues variables pot ser alta tot i que la relació entre les dues sigui fortament no lineal. Es poden utilitzar els residus per veure si el model de regressió lineal és adequat. Quasi sempre és útil fer gràfics de residuals (davant de x o y) per veure si els suposats del model lineal de regressió són justificats o no. Per considerar un bon model haurem d'observar que no hi hagi tendències en els *scores*:
 - Els residuals han de ser aleatoris
 - Els residuals (e_i) positius han de ser aproximadament els mateixos en número que els negatius^[9]

$$e_i = y_i - \hat{y} \quad \text{Equació 3: càlcul dels residuals}$$

$\hat{y}$ valor predit d'àrea a partir de la recta de regressió

y_i valor d'àrea de cada mesura

- Test Dixon i Grubbs (outliers): S'hauria de valorar si tenim *outliers* o resultats discrepants. Es descriu que quan es realitzen repeticions d'un anàlisi, els resultats segueixen habitualment una distribució Gaussiana. Existeix, per tant, una probabilitat d'obtenir resultats allunyats del valor mitjà però que formen part del conjunt i que poden formar part del tractament estadístic posterior sense que siguin tractats com a punts discrepants i eliminats injustificadament.^[10]

Els resultats discrepants s'han definit com aquells que no pertanyen a una població o que existeix una probabilitat inferior a un determinat valor per que pertanyin a ella. Normalment es produeixen al cometre equivocacions o errades en la metodologia aplicada. S'han descrit diversos criteris per detectar *outliers*, entre ells es pot citar el test Q de Dixon o el criteri R de Grubbs.

- *Q de Dixon.* Si el valor absolut de Q_{cal} és major que el valor teòric de Q_{tab} , es considera el valor sospitós x_q com resultat discrepant pel nivell de confiança(α) escollit. Per comprovar la Q_{tab} utilitzarem $\alpha=0,05$.

$$Q_{cal} = \frac{x_q - x_{q-1}}{x_n - x_1} \quad \text{Equació 4: càlcul de Q de Dixon}$$

- *R de Grubbs.* Si el valor R és major que el valor tabulat pel nivell de confiança(α) i els graus de llibertat corresponents, es confirma la presència del valor discrepant x_q . Per comprovar la R_{tab} utilitzarem $\alpha=0,05$ i $n-1$ graus de llibertat.

$$R = \left| \frac{x_q - \bar{x}}{SD} \right| \quad \text{Equació 5: càlcul de R de Grubbs}$$

x_q valor sospitós

x_{q-1} resultat anterior del valor sospitós

x_1 primer valor de la sèrie

x_n últim valor de la sèrie

n número de mostres

Preparació de mostres

- Seguint l'esquema de la taula de linealitat de l'annex 1 s'han de preparar 5 mostres amb patró (estàndard amb el 50% de la concentració nominal, estàndard del 75%, estàndard del 100%, estàndard del 125% i estàndard del 150%).
- Cada una de las mostres s'injectarà dues vegades.
- S'introdueix el pes de patró i les àrees detectades.

Criteris de valoració

- Coeficient de correlació per damunt de 0,99.
- Si no es compleix el criteri s'ha de descartar valors amb Dixon o Grubbs amb l'ajuda de les taules de l'annex 4 i l'annex 5.
- Bon model de regressió lineal (a partir del gràfic de residuals).

❖ Resultats i discussió

Taula 9. Resultats de la linealitat

Concentració		95%			
Pes [mg / 50 mL]	Pes net [ppm]	Àrea 1r injecció	Àrea 2na injecció	Àrea mitjana	Factor resposta
5,75	109,25	5,59	5,59	5,59	19,54
7,45	141,55	7,23	7,24	7,24	19,56
11,08	210,52	10,68	10,68	10,68	19,72
12,72	241,68	12,50	12,50	12,50	19,33
17,16	326,04	16,77	16,77	16,77	19,44
Correlació	0,9997			Mitjana	19,518
Pendent	0,0517			RSD	0,742

Tots els paràmetres d'acceptació són correctes

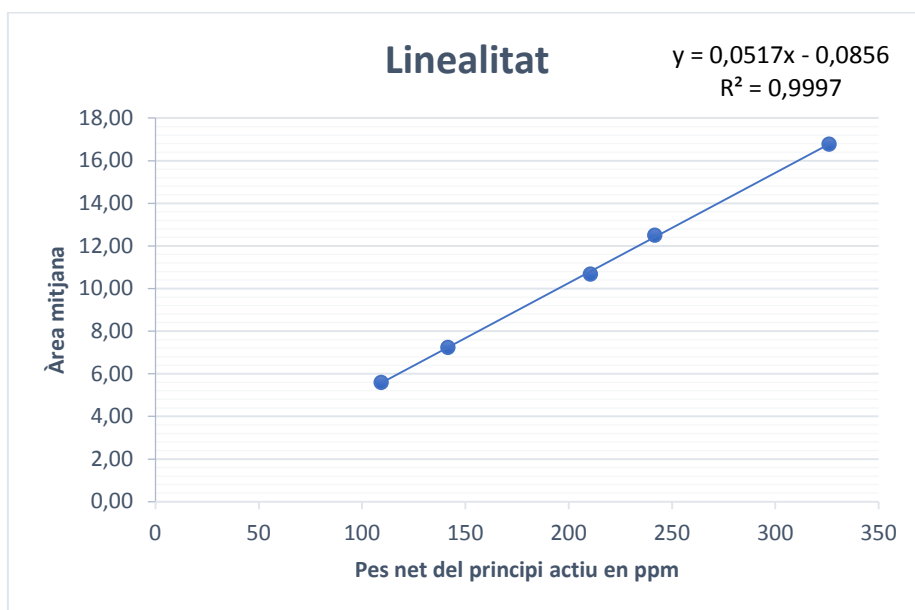


Figura 22. Recta de regressió lineal dels patrons de MAH

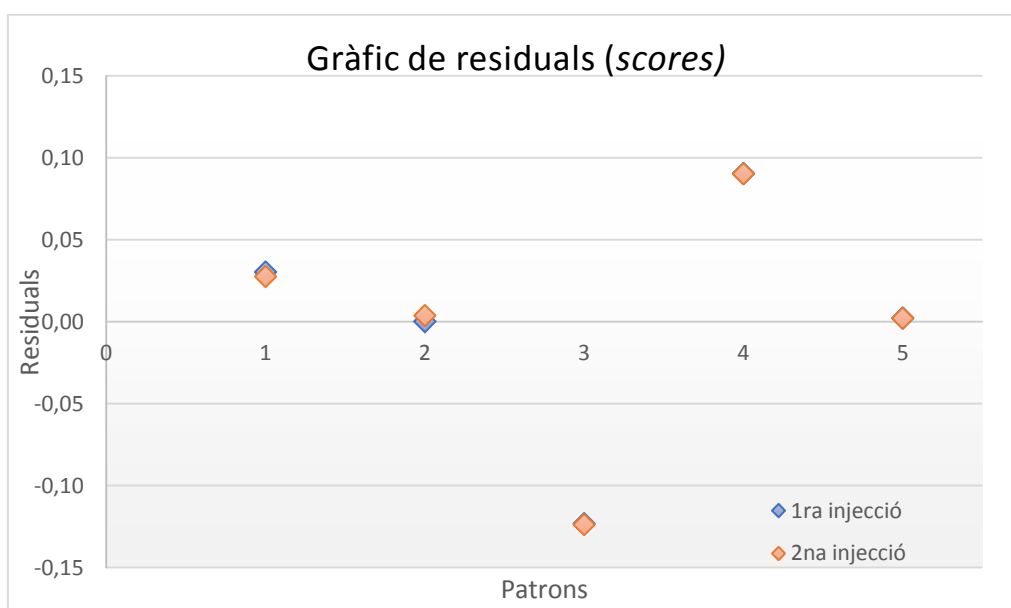


Figura 23. Gràfic de residuals (scores)

Tal i com es pot veure a la recta de calibratge, figura 22, a simple vista s'observa una bona linealitat, que, si ens fixem, a la taula 9, amb el valor de la correlació podem reafirmar-ho. Encara que els criteris de validació ens indiquin que al tractar-se de concentracions traça s'acceptaria un valor igual o major a 0,99, sempre s'intentarà que la regressió s'ajusti al màxim, s'obté una correlació del 0,9997 el qual ens indica que el grau de relació entre les variables concentració i resposta és correcte.

Si ens fixem en el gràfic de residuals, a la figura 23, també es podrà afirmar que és correcte ja que els residuals que trobem són aleatoris i no segueixen cap tendència. Per tant, es pot afirmar que el model de regressió lineal és adequat.

6.4. Precisió

Es pot desenvolupar el concepte general de precisió en tres sub-conceptes més concrets:

- Repetibilitat: La repetibilitat estableix que s'obtinguin resultats d'assajos mútuament independents a partir del mateix mètode aplicat a la mostra a analitzar en el mateix laboratori amb els mateixos equips i el mateix operador en un interval curt de temps. S'accepta com una mesura de variància interna i reflexa la precisió màxima que es pot obtenir amb un cert mètode. D'aquesta seqüència en direm Sèrie 1.^[10]
- Precisió mitja: és la concordança entre diferents mesures (inclosos patrons) quan el mateix mètode és aplicat diverses vegades dins del mateix laboratori, però amb la preparació de múltiples mostres o estàndards, en diferents dies, instruments o analista.
- Reproductibilitat: Les condicions establertes per la reproductibilitat indiquen que s'obtinguin resultats d'assaig independents a partir del mateix mètode aplicat a la mostra a analitzar, en diferents condicions tal com diferents laboratoris, diferents equips o diferents operadors. Hi ha diferents factors que es poden aplicar a la mesura quantitativa de reproductibilitat, entre ells la reproductibilitat entre dies, entre laboratoris o entre analistes. D'aquesta seqüència en direm Sèrie 2.^[10]

Preparació de mostres

- Seguint l'esquema de la taula de precisió de l'annex 1 han de realitzar-se dos sèries de 7 vials de mostra, en dies diferents per analistes diferents.
- Es posa mostra directa (sense dilució) filtrada en un vial i s'introdueixen els resultats en ppm.

Criteris de valoració

- La RSD total ha d'ajustar-se a la fórmula: $\%RSD \leq RSD_r = 0,67 * 2^{(1-0,5\log C)}$, on C es la concentració nominal de la substància en tant per 1.^{[11][12]}

L'equació de Horwitz s'utilitza per entitats de la Unió Europea que l'han incorporat com a criteri d'acceptació per mètodes d'anàlisi amb fins reguladors. Exposa que el comportament de la dispersió dels resultats en proves d'un laboratori pot presentar-se amb un gràfic que es coneix com la trompeta de Horwitz.^[13]

L'expressió utilitzada és apte per realitzar una prova de variàncies per avaluar la seva homogeneïtat i comprovar si els resultats són comparables amb el paràmetre de reproductibilitat del mètode.

$$\%RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)} \text{ Equació 6: Equació de Horwitz entre laboratoris}$$

$$\%RSD_r = 0,67 * \%RSD_R \text{ Equació 7: Equació de Horwitz en el mateix laboratori}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \text{ Equació 8: Càlcul de la concentració mitjana}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \text{ Equació 9: Càlcul de la desviació estàndard}$$

$$RSD (\%) = \frac{100SD}{\bar{x}} \text{ Equació 10: Càlcul de la desviació estàndard relativa}$$

$\bar{x}$ concentració mitjana de totes les mostres

x_i concentració de cada mostra

n número total de mostres

SD desviació estàndard

RSD desviació estàndard relativa

- Si no es compleix el criteri s'ha de descartar valors amb Dixon o Grubbs.
- Són necessaris un mínim de 5 valors correctes en el gràfic de control per cada una de les sèries: gràfic de control de Shewhart.^[10]

Un gràfic de control, com el de la figura 24, és una eina gràfica que mostra una magnitud d'una característica que ha sigut obtinguda a través d'un procés de mostreig. L'eix vertical mostra la concentració (la magnitud) i l'eix horitzontal representa el número de mostra.

La línia central representa el valor mitjà de la concentració (de la característica que s'està estudiant). Les línies inferiors i superiors (3S i -3S) són uns límits que, si són sobrepassats, indica que el procés probablement haurà perdut estabilitat estadística i que, probablement, no hi hagi un control lineal. Mentrestant aquests límits no siguin sobrepassats, s'assumeix que el procés està sota un control estadístic i no és precís desenvolupar cap correcció. Hi ha unes segones línies de límits (2S i -2S) que s'avaluen de manera que si 3 resultats consecutius sobrepassen aquests, s'haurà de revisar el mètode ja que hi ha una tendència en estar al límit dels resultats acceptats i ens indicarà una possible pèrdua d'estabilitat estadística.

Els límits inferior i superior es calculen a partir de la desviació estàndard (SD):

$$\text{Límit inferior } (-2S) = \bar{x} - 2SD$$

$$\text{Límit superior } (2S) = \bar{x} + 2SD$$

$$\text{Límit inferior } (-3S) = \bar{x} - 3SD$$

$$\text{Límit superior } (3S) = \bar{x} + 3SD$$

Equació 11: Càlcul del límit inferior del gràfic

Equació 12: Càlcul del límit superior del gràfic

❖ Resultats i discussió

Taula 10. Resultats precisió

Resultats sèrie 1 [ppm]		Resultats sèrie 2 [ppm]	
	108,15		102,92
	108,08		104,15
	108,05		102,59
	108,18		101,6
	107,37		104,22
	108,09		102,95
	108,31		101,09
Mitjana	108,03	Mitjana	102,79
RSD	0,28	RSD	1,14

Mitjana total	105,41	RSD total	2,70 %
Conc. Nominal [ppm]	200	RSDr	4,83 %

Tots els paràmetres d'acceptació són correctes

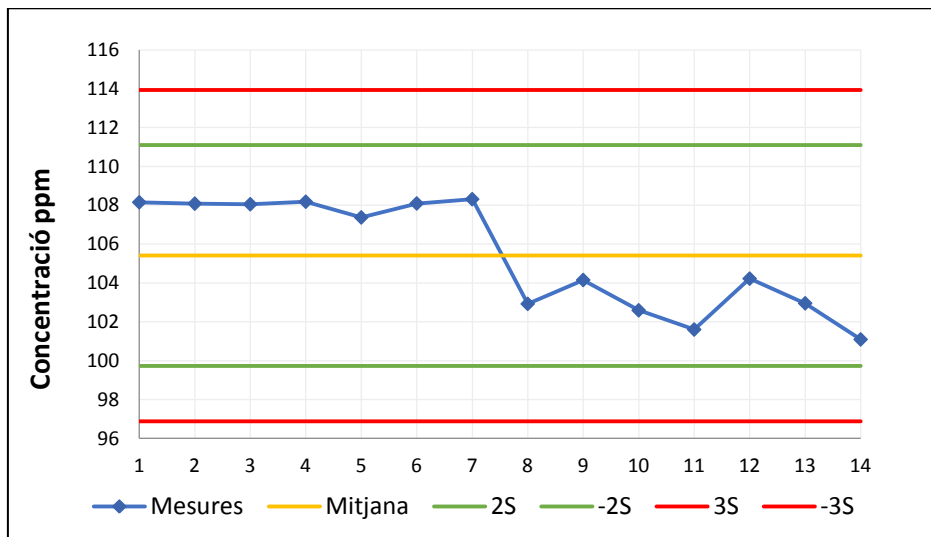


Figura 24. Gràfic de control de Shewhart

Si avaluem el primer paràmetre, la repetibilitat, es pot observar a la taula 10, que els resultats entre mostres de cada una de les sèries no es desvien significativament en cap dels dos casos i si s'avalua la desviació estàndard es pot apreciar que no és un valor significativament elevat: 0,28 pel primer i 1,14 pel segon.

També cal destacar que encara que els dos resultats siguin vàlids, les respostes de la sèrie 1 van ser amb una repetibilitat més alta i per tant es consideren més bons resultats.

En aquesta validació no s'ha pogut avaluar el paràmetre de la precisió mitja ja que aquest mateix mètode no s'ha aplicat diverses vegades amb diferents mostres o estàndards, sempre s'ha aplicat amb les mateixes mostres i quasi sempre pel mateix analista.

En segon lloc s'aprecia el paràmetre de la reproductibilitat, que ens indica que amb el mateix mètode aplicat i diferents condicions s'han de mantenir les respostes d'una mateixa mostra. Les variables en les condicions que es van utilitzar van ser:

- 48 h de diferència entre anàlisis
- Analistes diferents en la preparació de nous vials de la mostra

Seguint la taula 10, podem apreciar que la sèrie 2 va obtenir unes respostes lleugerament més baixes que la sèrie 1, la mitjana és de 6 ppm menors, però valorant a trets generals la reproductibilitat s'obté una desviació estàndard total inferior a la desviació estàndard de l'equació de Horwitz el que ens indica és que la dispersió dels resultats s'ajusta als criteris de valoració establerts.

Finalment, s'observa en el gràfic de control de Shewhart, figura 24, que no es sobrepassen els límits establerts i per tant tot indica que el procés té una estabilitat estadística i no és precís desenvolupar correcció alguna.

6.5. Robustesa

La fiabilitat d'un mètode es defineix com la capacitat de mantenir l'exactitud i la precisió al llarg del temps. La disminució de la fiabilitat amb el temps es deu als efectes que produeixen petits canvis tals com canvis de reactius, de pH o de condicions ambientals. Si un mètode s'ha d'utilitzar durant un cert període de temps, és molt útil conèixer a priori la seva resistència al canvi de resposta quan s'introdueixen petites variacions en el procediment, en altres paraules, la seva robustesa. Una forma de conèixer aquest criteri de qualitat consisteix en introduir deliberadament petits canvis i observar els resultats amb la finalitat de determinar les variables importants.

Normalment es tenen diversos factors o variables que poden incidir en el resultat final, per tant, proposarem un disseny experimental modificant totes les variables alhora.^[10]

Preparació de mostres

- Per l'anàlisi de robustesa s'ha de modificar el mètode lleugerament (flux, temperatura, gradient...).

Taula 11. Condicions mètode robustesa

Variables	Condicions mètode	Condicions modificades
Flux	1,2 mL/min	1,3 mL/min
Eluent	0,045 MSA	0,044 MSA
Temperatura	Columna – 35°C Compartiment – 30°C Cel·la – 40°C	Columna – 34°C Compartiment – 29°C Cel·la – 39°C

- Les mostres d'una de les sèries de repetibilitat es tornen a injectar amb el mètode modificat.

Criteris de valoració

- La RSD total ha d'ajustar-se a la fórmula de Horwitz: $\%RSD \leq RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$, on C és la concentració nominal de la substància en tant per 1.
- Si no es compleix el criteri s'ha de descartar valors en Dixon o Grubbs.
- Són necessaris un mínim de 5 valors correctes en el gràfic de control per cada una de les sèries.

❖ Resultats i discussió

Taula 12. Resultats robustesa

	Sèrie Repetibilitat [ppm]	Resultats Robustesa [ppm]
	102,92	101,06
	104,15	96,36
	102,59	101,79
	101,6	101,77
	104,22	109,06
	102,95	95,57
	101,09	97,57
Mitjana	102,79	100,45
RSD	1,14	4,58

Mitjana total	101,62	RSD total	3,39
Conc. Nominal [ppm]	200	RSD _R	7,21

Tots els paràmetres d'acceptació són correctes

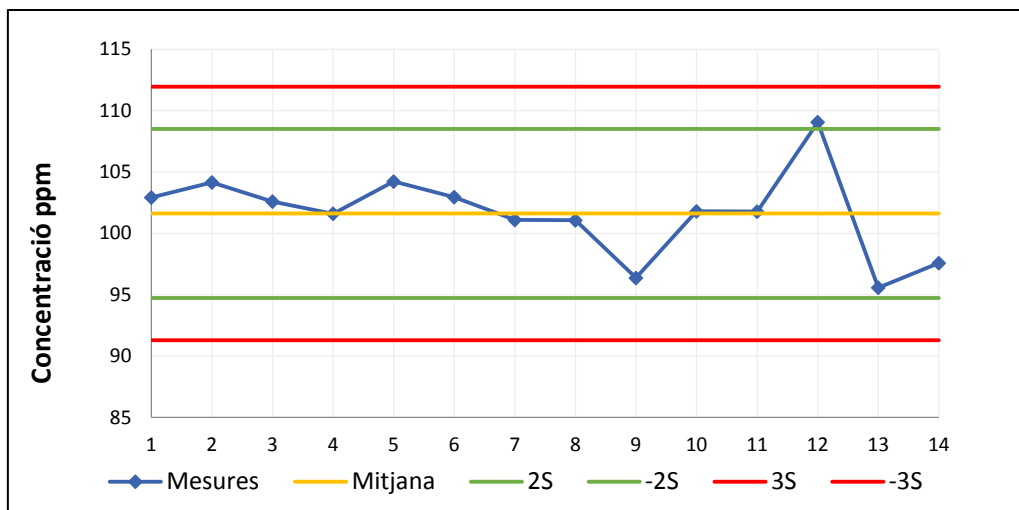


Figura 25. Gràfic de control de Shewhart

El primer que es va fer en valorar la robustesa va ser canviar el mètode amb les condicions especificades a la taula 11, s'ha de destacar que aquest paràmetre avalua resultats amb canvis petits, el que significa que un canvi massa gran no ho permetria.

Al veure els resultats obtinguts en la taula 12, s'observa que la majoria dels resultats són lleugerament inferiors tot i que algun és superior. Aquest fet és una senyal de que el mètode amb aquestes condicions té una repetibilitat més baixa.

Al calcular la desviació estàndard total s'ha comprovat que s'ajusta al criteri d'avaluació i el valor és inferior a la desviació estàndard de l'equació de Horwitz i per tant no cal descartar cap valor amb Dixon o Grubbs.

Finalment, si ens fixem en el gràfic de control, figura 25, es pot observar que només una mostra sobrepassa el primer límit (2S) però com que aquest límit s'avalua a partir de que tres mostres consecutives el sobrepassen, en aquest cas es donarà com a vàlid. El límit que no s'ha de sobrepassar ni una sola vegada no és aquest, sinó és el 3S i -3S. Veient aquests resultats es pot considerar el paràmetre de la robustesa com a vàlid degut a que té estabilitat estadística.

6.6. Estabilitat

Per generar resultats reproduïbles i fiables, les mostres i estàndards han de ser estables durant un temps raonable (un dia, una setmana, un mes, depèn de perquè es necessiti). L'estabilitat de tots els agents i solucions és important per considerar el temps i la temperatura de conservació i d'anàlisi.^[14]

Preparació de mostres

- Havent realitzat la preparació de l'Exactitud i Repetibilitat, es preparen vials addicionals seguint l'esquema de la taula d'estabilitat de l'annex 1, de la injecció d'un estàndard i de la injecció d'una mostra.

- Es conservaran a temperatura ambient i s'injectaran aquests vials passat un mínim de 48 hores.
- Els resultats s'introdueixen en ppm detectats de substància.

Criteris de valoració

- Cada una de les injeccions ha de complir els criteris de la taula de l'annex 3.

❖ Resultats i discussió

Taula 13. Resultats estabilitat

	Resultat [ppm]		Recuperació
	Inicial	Després de 48h	
Estàndard	192,75	190,07	98,61%
Mostra	108,05	107,44	99,44%

Fixant-nos en els resultats de la taula 13, s'observa que la recuperació després de 48 hores tant d'estàndard com de mostra, està dins els criteris de valoració ja que la taula de l'annex 3 ens indica que per una concentració nominal del 0,02% (200 ppm) la recuperació que s'haurà d'obtenir és d'entre el 90% i el 110%.

Hi ha un lleuger canvi en les respostes tot i que no és significatiu i, per tant, es dona el paràmetre d'estabilitat com a vàlid.

6.7. Límits de detecció i quantificació

El concepte de límit de detecció (LOD) es defineix com la quantitat o concentració mínima de substància que pot ser detectada amb fiabilitat per un mètode analític determinat i en una definició més recent s'introdueix el terme general "concentració neta mínima detectable".^[15]

El límit de quantificació (LOQ) està definit com el límit de concentració més baix per mesures quantitativament precises.

La relació senyal-soroll (S/N) és un paràmetre útil d'aptitud del sistema. La S/N es calcula segons s'indica a l'equació 13.^[16]

$$S/N = \frac{2H}{h} \text{ Equació 13: Càlcul de la relació senyal-soroll}$$

H altura del pic mesurat a partir del centre del pic fins la línia base

h diferència entre el valor de soroll més gran i més petit

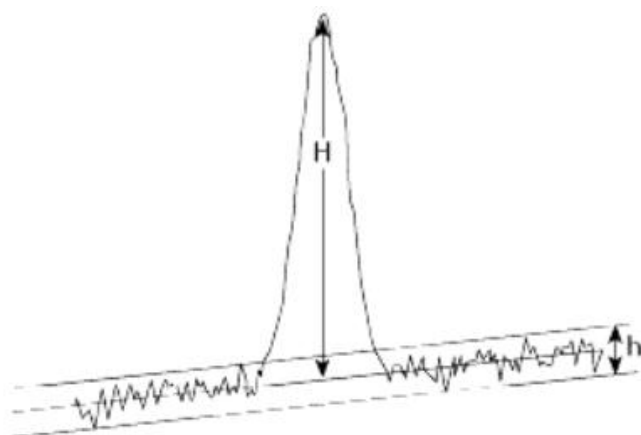


Figura 26. Esquema de la relació senyal-soroll

Per fixar aquests límits seguirem el següent criteri ^[12]:

- LOD: $S/N = 3$
- LOQ: $S/N = 10$

Preparació de mostres

- Es preparen diferents dilucions d'una mostra fins que la relació S/N és la indicada en cada paràmetre.

Criteris de valoració

- S'ha de poder determinar la concentració de LOQ quan S/N sigui adequada.

❖ Resultats i discussió

Es va punxar una mostra per determinar la concentració de MAH i posteriorment es va procedir a fer les dilucions apropiades. A la taula 14 es mostra els resultats obtinguts de LOD i LOQ per la Metoxiamina.

Taula 14. Resultats de LOD i LOQ

Metoxiamina	ppm en la dilució	ppm a la mostra	Àrea
LOD	0,81	103,2	0,04
LOQ	2,90	103,2	0,15

Tal i com es pot observar a la taula anterior l'àrea dels límits de detecció i quantificació està molt per sota del primer patró però això no esdevindrà una mala quantificació ja que a l'hora de fer la recta amb els estàndards de calibratge s'afegeix la opció d'obligar a la recta a passar pel 0 i d'aquesta manera totes les mostres que tinguin una concentració inferior al primer patró ens assegurarem que es puguin determinar amb el mínim error possible. S'ha comprovat aquesta afirmació a partir de fer proves amb patrons més petits i que el resultat ens donés lineal.

6.8. Resum dels paràmetres de la validació de MAH

Taula 15. Resultats de la validació

Paràmetre de validació	Resultat
Exactitud	Mitjana (n=2)
8,38 mg	93,20 %
10,10 mg	93,54 %
12,15 mg	95,75 %
La massa correspon aproximadament al 80%, 100% y 120% en relació a un contingut d'ingredient actiu.	Mitjana (n=6) 94,16 % RSD (n=6) 1,63 %
Linealitat	Correlació
[109,25 ppm – 326,04 ppm] [0,1093 mg/mL - 0,3260 mg/mL]	r = 0,9998
Precisió	RSD (n=14)
Repetibilitat - Reproductibilitat	2,70 %
Estabilitat	Conforme per 48h a temperatura ambient
Robustesa	Conforme
Límit de detecció	0,81 ppm
Límit de quantificació	2,90 ppm

7. Comparació de mètodes

Una vegada es va acabar la validació del nou mètode es va voler comprovar si s'obtenien millors resultats que amb el mètode anterior.

El procediment experimental que es va seguir va ser preparar 7 mostres tècniques de concentració coneguda de MAH. Cada mostra es va analitzar de dues maneres:

- Per dos cromatògrafs de gasos (GC) diferents, en el cas del mètode actual del laboratori, amb la deriva de la Metoxiamina a Oxima.
- En dos vials diferents pel cromatògraf iònic (IC), en el cas del mètode nou.

El que es va pretendre era calcular l'error en cada una de les anàlisis i l'error mitjà total per cada un dels mètodes.

L'error es va calcular seguint l'equació 14.

$$\text{error \%} = \frac{|\text{concentració real} - \text{concentració predita}|}{\text{concentració real}} \cdot 100 \quad \text{Equació 14: Càlcul de l'error}$$

Els resultats expressats en ppm que es van obtenir amb aquesta última comprovació van ser els que es mostren a la taula 16.

Tal i com es pot observar l'error del mètode a partir del GC té un error de més del 10% superior al mètode realitzat en aquest projecte.

Aquest error de 18,7% pot ser degut al pretractament de mostra i per aquest motiu l'empresa estava interessada en eliminar-lo ja que es redueixen els factors d'error.

Taula 16. Resultats de la comparació dels mètodes

Mostra	Concentració real	GC(1)	GC(2)	Mitjana GC	Error GC (%)	IC (1)	IC (2)	Mitjana IC	Error IC(%)
B910_280319	117,2	138,4	137,7	138,0	17,7	123,4	123,8	123,6	5,4
B910_290319	225,0	240,1	240,6	240,3	6,8	213,8	211,0	212,4	5,6
B910_010419	226,4	349,0	341,3	345,1	52,4	222,8	221,8	222,3	1,8
B910_020419	92,3	105,5	102,0	103,8	12,4	84,8	84,2	84,5	8,5
B910_030419	249,7	304,5	304,1	304,3	21,9	254,8	249,0	251,9	0,9
B910_040419	188,5	179,9	174,3	177,1	6,0	200,8	198,0	199,4	5,8
B910_050419	199,7	226,3	227,4	226,9	13,6	182,4	180,3	181,4	9,2
Mitjana					18,7				5,3

8. Conclusions

En aquest projecte s'ha desenvolupat, per primera vegada en el laboratori, un mètode cromatogràfic per determinar Metoxiamina en aigües residuals a través de IC sense cap pretractament de la mostra.

En primer lloc, els paràmetres de qualitat que s'han determinat són exactitud, linealitat, precisió, robustesa, estabilitat i LOD i LOQ, donant tots uns resultats dins dels límits establerts del laboratori.

El que s'hauria d'intentar fer a partir d'ara és determinar la puresa exacta del patró ja que en alguns d'aquests paràmetres hem tingut recuperacions baixes i s'ha deduït que podia ser degut a que es contemplava una puresa que realment no era adequada, ja que si calculàvem la concentració obtinguda pel mètode, tenint en compte una puresa més baixa, ens donava millors resultats generals i no es feia cap operació prèvia a l'anàlisi per a que la recuperació fos més baixa.

En segon lloc, si mirem amb més detall la comparació dels dos mètodes s'observa que la variabilitat del mètode és major en GC que en IC.

Es parla de variabilitat i no de pèrdua de la recuperació de l'extracció (en el pretractament de la mostra de l'extracció líquid-líquid) o menor rendiment de la reacció ja que els resultats de concentració que ens dona per GC, majoritàriament són més alts que la concentració real, per tant no s'està perdent analit. El mètode per GC té més dispersió en els resultats i això pot ser degut a què hi ha més operacions durant tot el pretractament de la mostra. Un altre motiu per la variabilitat dels mètodes podria ser el problema que s'ha comentat anteriorment de la riquesa del patró o degut a una pesada errònia.

Aquesta comparació ens demostra que el mètode desenvolupat s'ajustaria a resultats més reals que l'actual mètode del laboratori.

Com a conclusió final es pot dir que l'objectiu principal d'aquest treball s'ha complert ja que s'ha registrat un mètode per determinar concentració en ppm (mg/L) de MAH i que tots els paràmetres de validació han donat correctes.

In this project, a chromatographic method has been developed for the first time in the laboratory to determine Methoxyamine in wastewater using IC without doing any pretreatment of the sample.

First of all, the quality parameters that have been determined are accuracy, linearity, precision, robustness, stability and LOD and LOQ, all of them giving results within the established limits of the laboratory.

What we should try to do now is to determine the exact purity of the standard since in some of these parameters we have had low recoveries and it has been deduced that it could be because we contemplated a purity that was not really adequate, since if we calculated the concentration obtained by the method taking into account a lower purity it gave us better overall results and no pre-analysis operation was carried out so that the recovery was lower.

Then, if we look in more detail with the comparison in both methods, it is observed that the variability of the method is bigger in GC than in IC.

We talk about variability, which is not related to a loss of recovery from the extraction or to a lower yield of the reaction. The reason is that concentration results obtained by GC are mostly higher than the actual concentration. Therefore, there is no analyte loss. Results from GC are more dispersive, and this may be due to the fact that more operations are conducted during the sample pretreatment. Another reason concerning the variability of the methods could be the previously mentioned problem with the standard purity or due to an error during the weighting process.

This comparison shows that the method developed would adjust to more real results than the current method.

The final conclusion could fulfill the main objective of this work since a method to determine concentration in ppm (mg/L) of MAH has been registered and that all the validation parameters have been properly achieved.

9. Bibliografia

- [1] Morillo, M.; Serra, T. *Descripción del proceso de producción de Kresoxim Metil*. Internal technical Report for BASF: Tarragona, Juliol 2017.
- [2] Fritz, J. S.; Gjerde, D. T. *Ion chromatography*, 4th ed; John Wiley & Sons, Incorporated: Germany, 2009.
- [3] Eith, C., Kolb, M.; Seubert, A. *Practical Ion Chromatography - An Introduction*, 1st ed; Metrohm Monograph: Herisau, Switzerland, 2001.
- [4] Miller, J. *Chromatography. Concepts and Contrasts*, 2nd ed; John Wiley & Sons, Incorporated: Hoboken, New Jersey, 2005; Vol 2.
- [5] Laboratorio de Cromatografía, Cromatografía líquida de alta eficacia. <http://www.mncn.csic.es/index.jsp?seccion=1325&id=2011071211330001&activo=12#> (consultat el 7 de maig de 2019), part de Museo Nacional de Ciencias Naturales <http://www.mncn.csic.es>
- [6] *Agilent ZORBAX - Column Selection - Guide for HPLC*; Technical report for Agilent Technologies, July 2007.
- [7] *Agilent ZORBAX Bio Series GF-450 Column*; Technical report for Agilent Technologies, December 2013.
- [8] Directorate General Health. *Technical Material and Preparations : Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II and Annex III*. Technical report for European Commission, July 2000.
- [9] Bassett, E. *Statistics: Problems and Solutions*, 2nd ed; Singapore: World Scientific: New Jersey, 2000.
- [10] Valcárcel, M.; Ríos, A. *La calidad en los laboratorios analíticos*, 1ª ed; Editorial Reverté, S.A: Madrid, 1992.
- [11] Thompson, M. *Limitations of the Application of the Horwitz equation: A rebuttal*. Trends in Analytical Chemistry: 2007; Vol 6.
- [12] Roos, H., Scholtissek, M., & Schaefer, W. *Validation and Verification of Test methods*. Internal technical Report for BASF: Ludwigshafen, December 2017.
- [13] Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M.; Sandoval, S. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos*. Instituto de Salud Pública de Chile: Santiago de Chile, 2010.
- [14] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. *Practical HPLC method development*, 2nd ed; Wiley Interscience: Canada, 1997.
- [15] Trullols, E.; Rius, X.; Rius, X. Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Anal. Chem.* **2004**, 23, 137-145.

[16] Ministerio de Salud y Desarrollo Social.
http://www.anmat.gov.ar/webanmat/mercosur/ACTA01-14/AGREGADO_XVI/uni_11/Anexo_6_Cromatografia_V2.pdf (Consultat el 24 d'abril de 2019)

10. Annexes

Annex 1. Resum d'injeccions de la validació

Injeccions principals			MAH	Repetibilitat [Sèrie 1]			
Injecció	1	Blanc		Injecció	22	Mostra 1	Mostra directe
Injecció	2	MAH	8 mg	Injecció	23	Mostra 2	
Injecció	3	MSA		Injecció	24	Mostra 3	
Injecció	4	Estàndard de calibratge 1	7,5 mg	Injecció	25	Mostra 4	
Injecció	5	Estàndard de calibratge 2	12,5 mg	Injecció	26	Mostra 5	
Exactitud			MAH	Injecció	27	Mostra 6	
Injecció	6	Estàndard 1 [0,80] + Blanc	8 mg	Injecció	28	Mostra 7	
Injecció	7	Estàndard 2 [0,80] + Blanc		Reproductibilitat [Sèrie 2]			
Injecció	8	Estàndard 3 [1,00] + Blanc	10 mg	Injecció	29	Mostra 1	Mostra directe
Injecció	9	Estàndard 4 [1,00] + Blanc		Injecció	30	Mostra 2	
Injecció	10	Estàndard 5 [1,20] + Blanc	12 mg	Injecció	31	Mostra 3	
Injecció	11	Estàndard 6 [1,20] + Blanc		Injecció	32	Mostra 4	
Linealitat			MAH	Injecció	33	Mostra 5	
Injecció	12	Mostra d'estàndard 1 [0,5]	5 mg	Injecció	34	Mostra 6	
Injecció	13	"		Injecció	35	Mostra 7	
Injecció	14	Mostra d'estàndard 2 [0,75]	7,5 mg	Robustesa			
Injecció	15	"		Injecció	36	Mostra repetibilitat 1	Injectar les mateixes mostres que una de les sèries 1 o 2
Injecció	16	Mostra d'estàndard 3 [1,00]	10 mg	Injecció	37	Mostra repetibilitat 2	
Injecció	17	"		Injecció	38	Mostra repetibilitat 3	
Injecció	18	Mostra d'estàndard 4 [1,25]	12,5 mg	Injecció	39	Mostra repetibilitat 4	
Injecció	19	"		Injecció	40	Mostra repetibilitat 5	
Injecció	20	Mostra d'estàndard 5 [1,50]	15 mg	Injecció	41	Mostra repetibilitat 6	
Injecció	21	"		Injecció	42	Mostra repetibilitat 7	
			Estabilitat				
			Injecció	43	Mateixa mostra que injecció 14		
			Injecció	44	Mateixa mostra que injecció 30		

Figura 27. Taules resum de les injeccions de validació

Annex 2. Cromatogrames de les injeccions principals

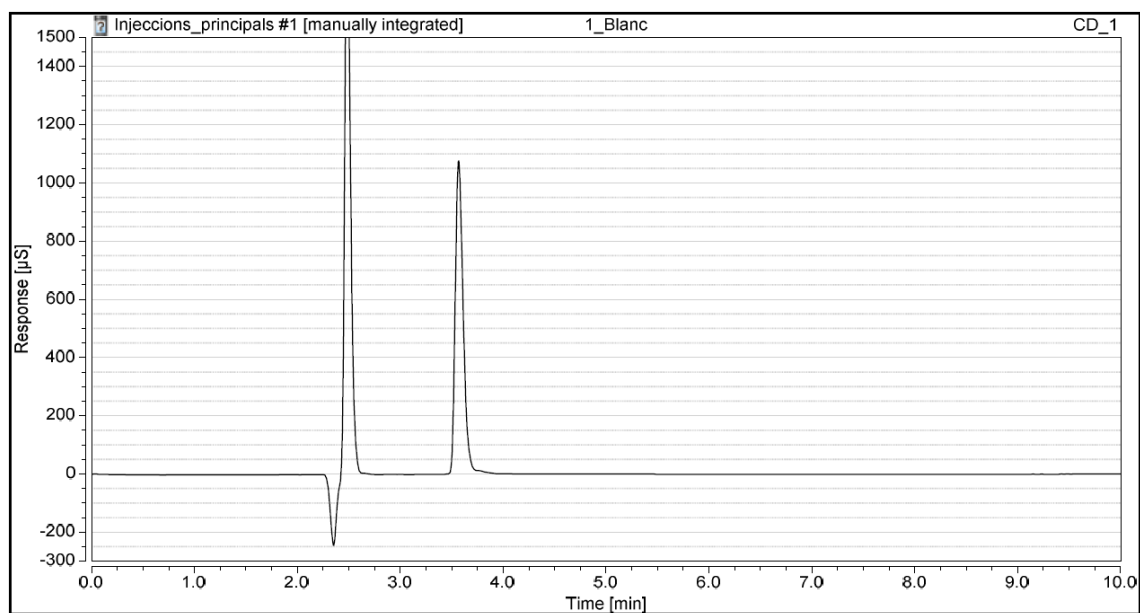


Figura 28. Cromatograma de blanc de mostra

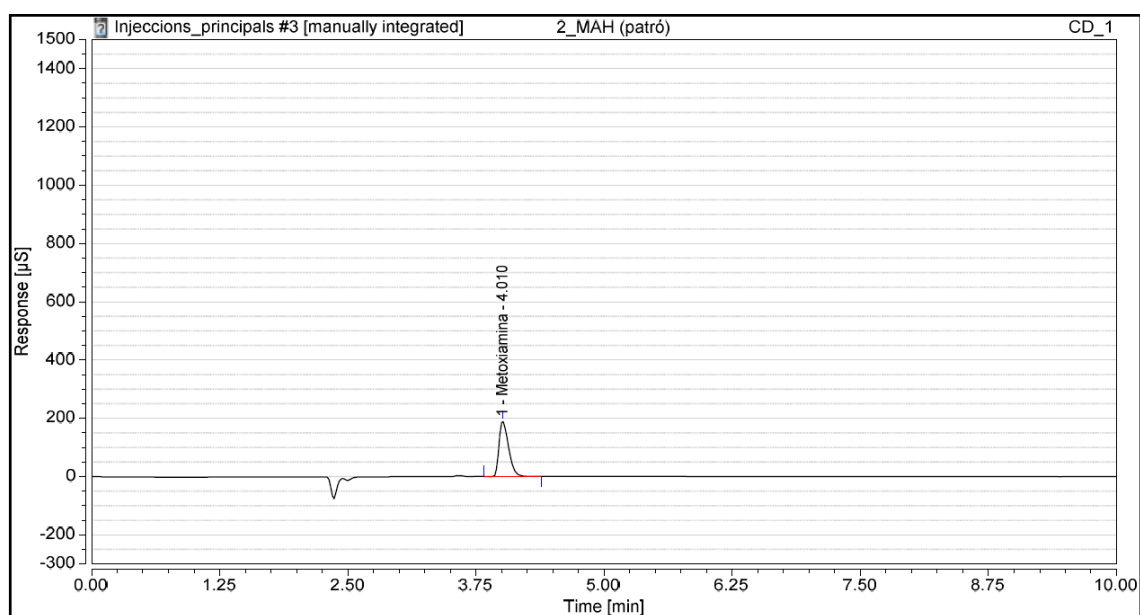


Figura 29. Cromatograma de patró MAH

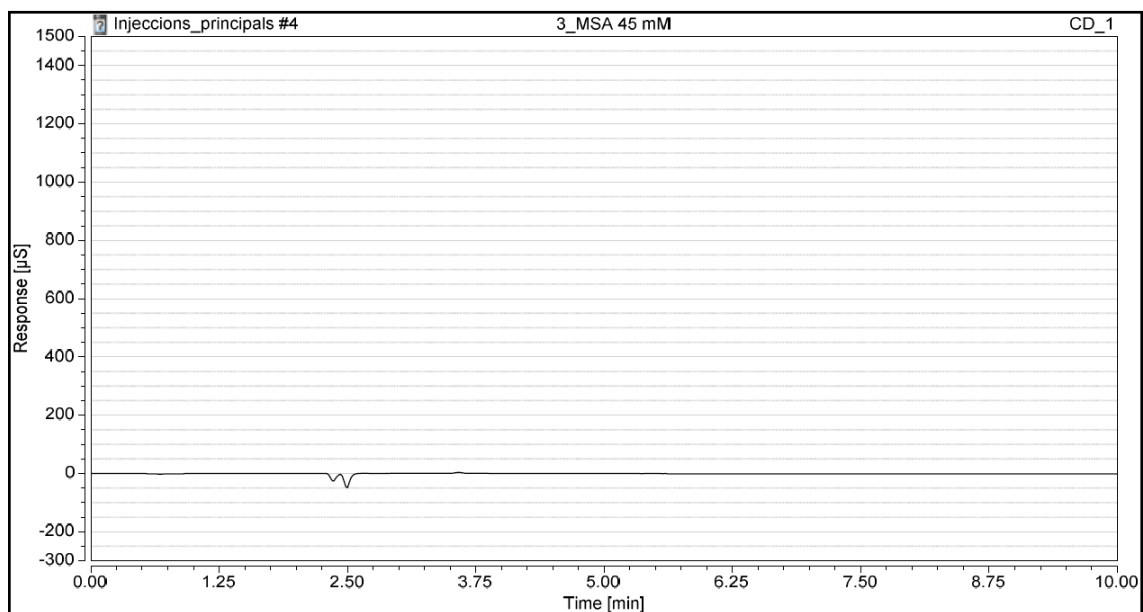


Figura 30. Cromatograma de la fase mòbil àcid metansulfònic (MSA) 45 mM

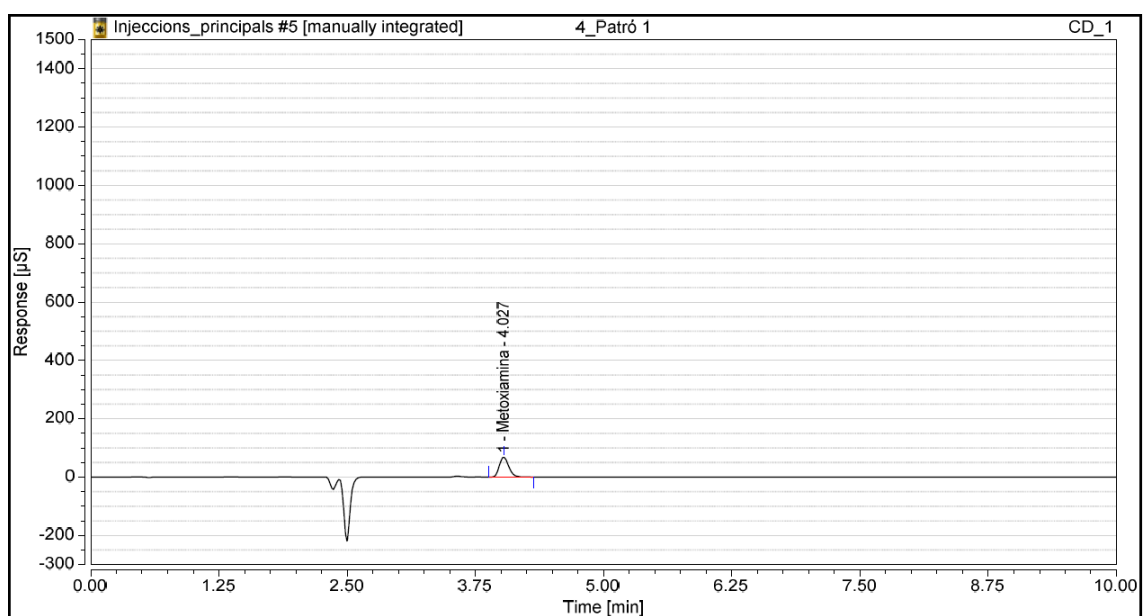


Figura 31. Cromatograma del patró de MAH del límit inferior

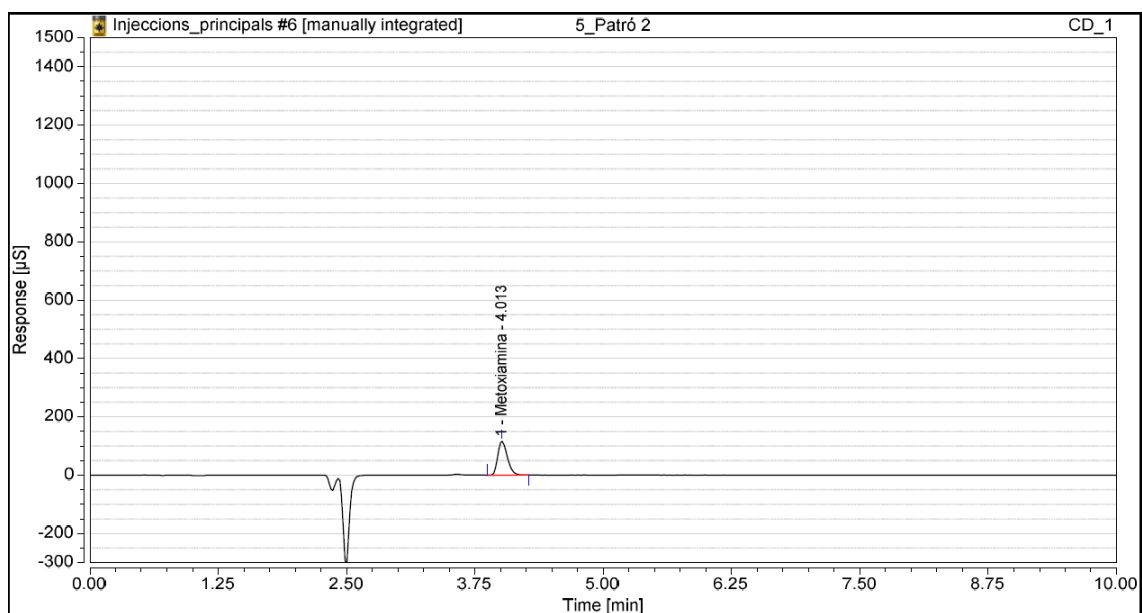


Figura 32. Cromatograma del patró de MAH del límit superior

Annex 3. Rang de recuperació permesa

Taula 17. Rang de recuperacions per a la validació segons valor nominal

Límits seguint la norma SANCO/3030/99 rev, 4 (11/07/00)	
Contingut de principi actiu (% pes nominal)	% rang de recuperació
≥ 10	98-102
≥1 - <10	97-103
≥0,1 - <1	95-105
≥0,01 - <0,1	90-110
<0,01	80-120

Annex 4. Taula de Dixon

Critical Values of Expanded Dixon Outlier Test
Taken from Verma and Quiroz-Ruiz, Table 2

<i>n</i>	CL SL <i>α</i>	70% 30% 0.30	80% 20% 0.20	90% 10% 0.10	95% 5% 0.05	98% 2% 0.02	99% 1% 0.01	99.5% 0.5% 0.005
3		0.6836	0.7808	0.8850	0.9411	0.9763	0.9881	0.9940
4		0.4704	0.5603	0.6789	0.7651	0.8457	0.8886	0.9201
5		0.3730	0.4508	0.5578	0.6423	0.7291	0.7819	0.8234
6		0.3173	0.3868	0.4840	0.5624	0.6458	0.6987	0.7437
7		0.2811	0.3444	0.4340	0.5077	0.5864	0.6371	0.6809
8		0.2550	0.3138	0.3979	0.4673	0.5432	0.5914	0.6336
9		0.2361	0.2915	0.3704	0.4363	0.5091	0.5554	0.5952
10		0.2208	0.2735	0.3492	0.4122	0.4813	0.5260	0.5658
11		0.2086	0.2586	0.3312	0.3922	0.4591	0.5028	0.5416
12		0.1983	0.2467	0.3170	0.3755	0.4405	0.4831	0.5208
13		0.1898	0.2366	0.3045	0.3615	0.4250	0.4664	0.5034
14		0.1826	0.2280	0.2938	0.3496	0.4118	0.4517	0.4869
15		0.1764	0.2202	0.2848	0.3389	0.3991	0.4385	0.4739
16		0.1707	0.2137	0.2765	0.3293	0.3883	0.4268	0.4614
17		0.1656	0.2077	0.2691	0.3208	0.3792	0.4166	0.4504
18		0.1613	0.2023	0.2626	0.3135	0.3711	0.4081	0.4423
19		0.1572	0.1973	0.2564	0.3068	0.3630	0.4002	0.4333
20		0.1535	0.1929	0.2511	0.3005	0.3562	0.3922	0.4247

Figura 33. Taula dels valors tabulats del test de Dixon

Grubbs' test for a single outlier using mean and SD		
Degrees of freedom	Significance level	
	5% (0.05)	1% (0.01)
2	1.15	1.15
3	1.48	1.50
4	1.71	1.76
5	1.89	1.97
6	2.02	2.14
7	2.13	2.27
8	2.21	2.39
9	2.29	2.48
10	2.36	2.56
11	2.41	2.64
12	2.46	2.70
13	2.51	2.76
14	2.55	2.81
15	2.59	2.85
16	2.62	2.89
17	2.65	2.93
18	2.68	2.97
19	2.71	3.00
20	2.73	3.03
30	2.92	3.26
40	3.05	3.39
50	3.14	3.49
100	3.38	3.75

Figura 34. Taula dels valors tabulats del test de Grubbs