

MARIA ESTALELLA RODRÍGUEZ

Determinació de l'SE-2 per cromatografia iònica

Treball de fi de grau

DIRIGIT PER LA DRA. ARIADNA CAMPOS CARRASCO

GRAU DE QUÍMICA



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

TARRAGONA
2015

Índex

Abstract	5
1. Objectiu	6
2. Introducció	6
2.1. Hostapon SI	6
2.2. Mètodes actuals	7
3. Fonaments	8
3.1. Cromatografia iònica	8
3.1.1. Tipus de cromatografia iònica	8
3.1.2. Parts d'un cromatògraf iònic	9
3.1.3. Factors determinants en la separació cromatogràfica	11
3.1.4. DIONEX ICS-2000	11
3.2. Validació de mètodes analítics	12
3.2.1. Paràmetres a avaluar en la validació	13
A. Selectivitat	13
B. Linealitat	13
C. Sensibilitat	14
D. Límits	14
E+F. Exactitud	15
E. Precisió	16
F. Veracitat	18
G. Robustesa	19
4. Part experimental i discussió de resultats	19
4.1. Desenvolupament del mètode	19
❖ Discussió de resultats	25
4.2. Mètode analític	25
4.2.1. Material, reactius i equips	25
4.2.2. Preparació de fase mòbil	26
4.2.3. Preparació de mostra	26
4.2.4. Preparació de solució mare	26
4.2.5. Preparació de patrons	27
4.3. Validació del mètode	27
A. Linealitat del mètode (recta de calibratge)	27
❖ Discussió de resultats	34
B. Límit de detecció i quantificació	34
❖ Discussió de resultats	35

C.	Repetibilitat instrumental-----	35
❖	Discussió de resultats -----	36
D.	Repetibilitat del mètode-----	37
❖	Discussió de resultats -----	38
E.	Reproductibilitat-----	40
❖	Discussió de resultats -----	41
F.	Recuperació-----	41
❖	Discussió de resultats -----	42
5.	Comparació de mètodes-----	43
6.	Conclusions-----	44
7.	Annexes-----	I
	Annex 1. Linealitat del mètode (recta de calibratge) -----	I
	Annex 2. Repetibilitat instrumental -----	II
	Annex 3. Repetibilitat de mètode -----	III
	Annex 4. Reproductibilitat -----	IV
	Annex 5. Recuperació-----	V
	Annex 6. Taules de valors tabulats-----	VI
8.	Bibliografia -----	45

Abstract

One of the main products is required to have its quality determinate since it is expected to be introduced to quality control programmes. Therefore, the aim of this project is to develop and validate not only a method that allows the determination of SE-2, sulphites and sulphates from Hostapon SI, which is an anionic surfactant, but also all of them at once. It has been carried out by ionic chromatography. The SE-2 is formed as a result of a secondary reaction in which the Hostapon SI reacts with a second mole of ethylene oxide. As far as sulphites are concerned, they are starting reagents that haven't reacted, and the oxidation process of that results in the formation of sulphates. The first thing that was done was the preparation of the equipment, seeing as it was second-hand and had not been in use for years. Since there was no chromatographic method for this equipment it was necessary to find the chromatographic conditions. Three separation columns and two types of mobile phase have been evaluated, carbonate/bicarbonate and NaOH, and it has been noted that the best option was 5mM NaOH. The flow of the mobile phase, the dilution of the sample and the temperature of the oven has been also optimised. Finally, the key to create a good separation of SE-2 has been to dilute the sample more. Once the chromatographic condition had been met, the next step was the validation. The limit of detection, the limit of quantification, the instrumental repeatability, the method repeatability, the reproducibility and the recuperation parameters have been evaluated. The obtained values have been acceptable except the reproducibility and the recuperation, something that could have been caused by some issues in the injection or integration problems. In order to improve the data obtained in the validation, the conditions should be optimised to obtain a more suitable separation and integration of the peaks.

1. Objectiu

L'objectiu d'aquest treball ha estat desenvolupar i validar un mètode analític que permeti determinar l'SE-2 (hidroxi-isetionat sòdic), sulfits i sulfats en un sol anàlisi per cromatografia iònica en el producte Hostapon SI-57% (isetionat de sodi) de l'empresa Clariant Ibérica Producción, S.A.

L'aparell de cromatografia iònica emprat és un DIONEX ICS-2000 preparat per l'anàlisi d'anions. Aquest cromatògraf és de segona mà, per tant, abans de començar a desenvolupar el mètode analític ha estat necessària una posada a punt exhaustiva.

2. Introducció

Aquest mètode ha estat desenvolupat en l'empresa Clariant al *site* de Tarragona, en el laboratori de control de qualitat. L'empresa Clariant és líder en el sector de productes químics d'alt valor afegit. Opera a nivell mundial i té la seu a Basilea (Suïssa). Es va fundar al 1996 com un *spin-off* de la companyia química Sandoz. Va esdevenir líder en el seu sector quan va incorporar la divisió de productes químics especials de Hoechst al 1997.

A Espanya, Clariant disposa de centres de producció a Tarragona, Sant Andreu de la Barca, Yuncos (Toledo) i Artziniega (País Basc), on es fabriquen varis productes per a les diferents divisions de la empresa. A Tarragona, Clariant, disposa de tres plantes de producció: la més nova, la de AMPS (denominada així pel principal monòmer que utilitza, l'àcid 2-acrilamida-2-metilpropà sulfònic) destinada a la fabricació de productes per al sector cosmètic i petrolier, la planta MPP (planta multi-propòsit) en la que es fan gran diversitat de productes i la planta ETHOX on s'obtenen productes derivats de l'òxid d'etilè i de l'òxid de propilè.

2.1. Hostapon SI

L'Hostapon SI-57% (isetionat de sodi) és un dels principals productes que fabrica l'empresa Clariant. En produeix 30.000 tones/any i el ven a la multinacional Unilever, la qual el fa servir per a la formulació dels gels de bany Dove.

El 57% indica el percentatge d'Hostapon SI que porta el producte. La resta del percentatge (43%) és majoritàriament aigua.

L'Hostapon SI és un tensioactiu aniònic amb la fórmula molecular $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$, com es mostra en la Figura 1.

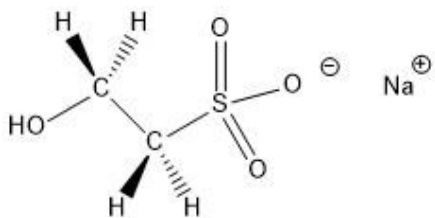


Figura 1. Hostapon SI

Les reaccions que tenen lloc en seva fabricació són les que s'indiquen en la Figura 2.

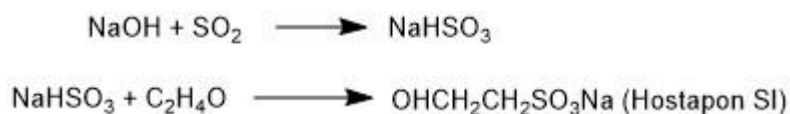


Figura 2. Reaccions per a la síntesi industrial de l'Hostapon SI.

L'hidròxid de sodi (NaOH) reacciona amb l'òxid de sofre donant lloc a bisulfit de sodi (NaHSO₃). Tot seguit el bisulfit de sodi reacciona amb l'òxid d'etilè (C₂H₄O) donant lloc a l'actiu (l'Hostapon SI).

Durant la síntesi també es donen reaccions no desitjades:

- Quan no hi ha suficients sulfits (SO₃⁻², procedents del bisulfit de sodi) l'òxid d'etilè comença a reaccionar amb l'aigua present en la mescla de reacció donant lloc a glicols (etilenglicol). Aquests són determinats per valoració, tal i com el pla de control de qualitat ho requereix.
- L'alcohol terminal de l'Hostapon SI pot tornar a reaccionar amb l'òxid d'etilè (reacció tipus SN2) donant lloc a SE-2 (hidroxi-isetionat sòdic) tal i com s'indica en la Figura 3. Aquest és un producte no desitjat i el volem quantificar per a saber la qualitat de l'Hostapon SI.

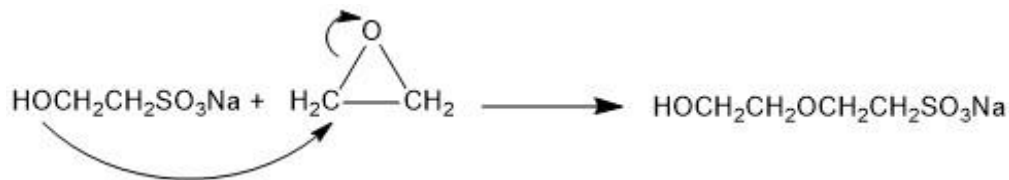


Figura 3. Reacció de formació de l'SE-2.

Per a conèixer la qualitat de l'Hostapon SI també es determinen, entre d'altres coses, els sulfits restants que no han reaccionat i els sulfats (SO₄⁻², en forma de bisulfat de sodi), producte de la oxidació dels sulfits.

Aquests tres paràmetres (SE-2, sulfits i sulfats) són els que, en aquest treball, es pretenen determinar amb un únic anàlisi per tal de reduir la feina, el temps i el cost que comporta analitzar l'Hostapon SI.

2.2. Mètodes actuals

Actualment el pla de control de qualitat de l'Hostapon SI no requereix la quantitat d'SE-2 que conté el producte, tot i això, en vista de que en un futur pot ser requerit, s'han fet algunes proves de determinació de l'SE-2 a l'Hostapon SI. Les proves també s'han fet per cromatografia iònica (amb un cromatògraf que es té destinat a un altre mètode), però en aquest cas amb un aparell de la casa Metrohm amb una columna no equivalent a la que es fa servir en el mètode que es desenvolupa en aquest treball.

Els sulfits i els sulfats es determinen amb dues valoracions. En el cas dels sulfits per iodometria i en el dels sulfats per complexometria valorant amb EDTA.

3. Fonaments

3.1. Cromatografia iònica

La cromatografia iònica actual és una subdivisió del HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Es distingeixen tres mecanismes diferents de separació dels analits, els quals donen lloc a la nomenclatura de cada una de les tècniques cromatogràfiques iòniques ^[1].

3.1.1. Tipus de cromatografia iònica

El mètode que es desenvolupa en aquest treball és per cromatografia d'intercanvi iònic.

Els tres tipus de cromatografia iònica són ^{[1] [2]}:

- Cromatografia d'intercanvi iònic (IC o HPIC, High Performance Ion Chromatography).
Aquest mètode de separació es basa en el procés d'intercanvi iònic entre la fase mòbil i els grups d'intercanvi iònic que estan units a una fase estacionària. Aquesta consisteix en un polímer (poliestirè, etilvinilbenzè o resines de metacrilat copolimeritzades amb divinilbenzè) modificat amb grups d'intercanvi iònic. En el cas de separació d'anions es fa amb grups amoni quaternaris (cations).

En la Figura 4 ^[2] es veu representat de manera esquemàtica el procés d'intercanvi iònic i s'observa el fonament d'aquesta tècnica. Els anions de l'analit (A^-) interaccionen amb els grups amoni quaternaris i queden "retinguts". Depenent de l'afinitat iònica entre A^- i el grup d'intercanvi iònic de la columna, els anions de l'analit (A^-) seran intercanviats pels anions de la fase mòbil (E^-) més o menys ràpid fent així que els analits (A^-) vagin eluint en diferents temps de retenció (separació dels analits).

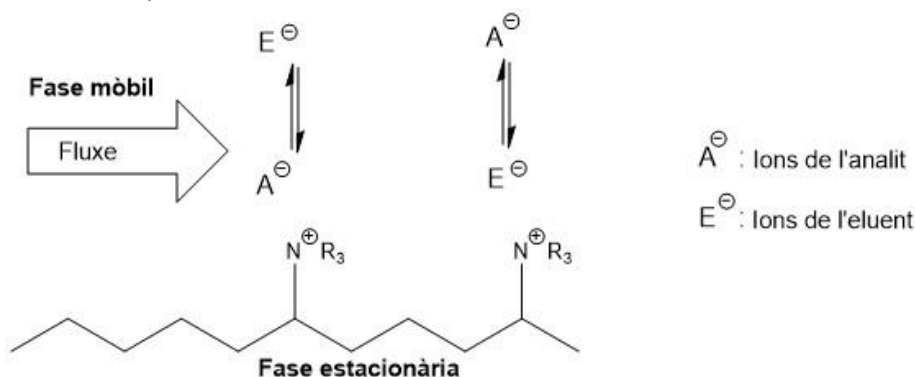


Figura 4. Cromatografia d'intercanvi iònic (determinació d'anions).

- Cromatografia de formació de parells iònics (IPC o MPIC, Mobile Phase Ion Chromatography).
El principal mecanisme de separació en la cromatografia de parell iònic és l'adsorció. La fase estacionària consisteix d'una resina de divinilbenzè, amb poca polaritat i una alta especificitat de superfície, que forma porus sense càrrega iònica. La selectivitat de la columna ve determinada per la fase mòbil. A més s'afegeix un modificador orgànic (ion pair reagent) a l'eluent. Aquests modificadors consisteixen en anions o cations (amb la càrrega contrària a l'analit que es vol

determinar) que interaccionen amb l'analit i l'altra part de la molècula interacciona amb la superfície de la fase estacionària per adsorció. La separació es possible gràcies a les diferents constants de formació entre el modificador orgànic i l'analit (que conforma el parell iònic) i entre els diferents graus d'adsorció.

- Cromatografia d'exclusió iònica (IEC o HPICE, High Performance Ion Chromatography Exclusion). El mecanisme de separació de la cromatografia d'exclusió iònica ve donada per la exclusió de Donnan, exclusions estèriques, processos de sorció i depenent de la columna també interaccions de pont d'hidrogen. Aquest tipus de cromatografia iònica és usada per la separació d'àcids i bases febles com serien àcids carboxílics, carbohidrats, fenols o aminoàcids.

Avui dia la cromatografia d'intercanvi iònic és la més usada i de vegades s'anomena tan sols cromatografia iònica. Els altres dos tipus de cromatografia iònica estan restringits a usos més concrets i definits.

3.1.2. Parts d'un cromatògraf iònic

Els components generals d'un cromatògraf d'intercanvi iònic són els que es mostren en la Figura 5 ^[1].



Figura 5. Esquema d'un cromatògraf d'intercanvi iònic amb supressió.

L'eluent arriba a la bomba que l'introdueix al sistema cromatogràfic. Tot seguit passa a la vàlvula d'injecció, on s'injecta la mostra, que pot provenir d'un autoinjector (com és el cas d'aquest treball) o de punxada directa. Seguidament arriba a la columna de separació, on es dona la separació dels analits. Una vegada la fase mòbil surt de la columna de separació entra a la columna supressora abans d'anar cap al detector.

Una de les parts més característiques dels cromatògrafs iònics respecte els HPLC és la columna supressora. Té la funció de disminuir la conductivitat de la fase mòbil i d'augmentar el senyal dels analits.

Hi ha dos tipus de supressió. La química, en la que es fa passar una solució que contingui protons (com seria una solució d'àcid sulfúric) o l'electroquímica, on la supressora necessita una connexió a la corrent per a fer l'electròlisi de l'aigua i així obtenir protons per fer la supressió.

La supressió electroquímica pot ser autorregenerada (com és el nostre cas). Això consisteix en que l'eluent que surt de la cel·la de detecció, que ja ha estat neutralitzat prèviament per la supressora, es fa servir com a font d'aigua per a fer funcionar la supressora ^[3].

El funcionament de la supressió electroquímica es veu en la Figura 6. L'eluent (Na^+OH^-) circula pel canal central amb els analits ja separats. Un cop a l'interior de la columna, els ions Na^+ (que provenen de l'eluent) i tots els cations (que provenen de la mostra) travessen les membranes i es dirigeixen cap a l'elèctrode de càrrega negativa. Els ions positius passen a la càmera del regenerant (les càmeres laterals) per a anar a residus, per tant, no es detecten en l'anàlisi. En l'interior de la columna s'ha generat un defecte de càrrega positiva que ha de ser compensat d'alguna manera. Per això, els ions H^+ generats en la càmera del regenerant travessen la membrana. Com que de camí a l'elèctrode de càrrega negativa troben un defecte de càrrega (en el canal central), es queden allí i el compensen. En el canal central queden els ions OH^- de l'eluent, que a l'unir-se als H^+ que venen de la càmera del regenerant formen una substància amb una conductivitat molt més baixa que l'eluent de partida (NaOH), aigua. Per tant, la conductivitat de fons disminueix.

La conductivitat equivalent del Na^+ és de $50 \text{ S}\cdot\text{cm}^2/\text{eq}$, mentre que la del protó és de $350 \text{ S}\cdot\text{cm}^2/\text{eq}$. Donat que mitjançant el mecanisme d'autosupressió hem substituït el Na^+ per H^+ , ara tenim els analits acompanyats per protons. Per tant el senyal dels analits augmenta de manera considerable [3].

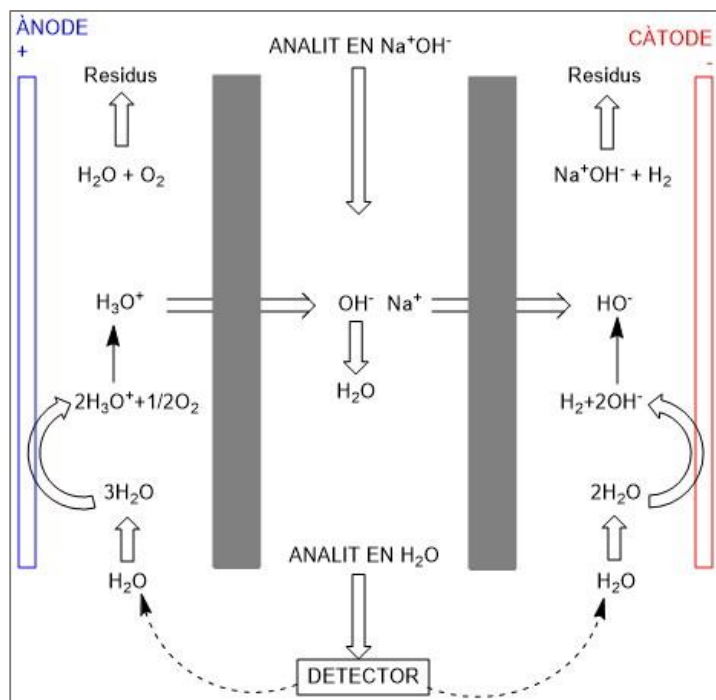


Figura 6. Esquema d'una columna supressora en mode autosupressió (en detecció d'anions).

El detector més usat és de conductivitat. Mesura la conductivitat elèctrica dels ions de la solució que li arriba. Ha de ser capaç de respondre a petits canvis relatius a la conductivitat del eluent que són produïts per l'analit. Altres tipus de detectors serien fotomètrics (UV) o amperomètrics.

3.1.3. Factors determinants en la separació cromatogràfica

Els factors que influeixen més en la separació dels analits en la cromatografia iònica són els següents ^[4] ^[5]:

Factors relacionats amb la fase estacionària (columna): El tipus de polímer que compona la columna i el grup d'intercanvi iònic que hi ha unit és un factor clau per a la separació dels analits. Segons com sigui aquest, la columna serà més adequada per un tipus d'aplicacions o unes altres.

Factors relacionats amb la fase mòbil:

- Selecció de l'eluent i la seva concentració
- pH
- Temperatura
- Flux
- Presència de modificadors orgànics

3.1.4. DIONEX ICS-2000

El cromatògraf que s'ha fet servir en aquest treball ha estat un DIONEX ICS-2000, amb una columna de separació cromatogràfica IonPac AS18. La fase estacionària de la columna (AS18) que es fa servir és etilvinilbenzè copolimeritzat amb un 55% de divinilbezè. Està funcionalitzat amb grups amoni quaternaris (carregats positivament) ^[6].

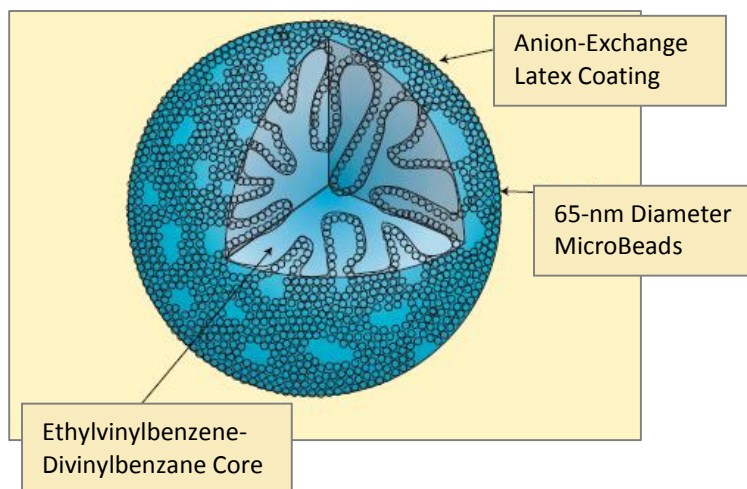


Figura 7. Estructura d'una partícula de la columna del IonPac AS18

En la Taula 1 es mostren les característiques del cromatògraf que s'ha fet servir en aquest treball. Al llarg del desenvolupament del mètode analític algunes d'aquestes parts han anat variant tal i com s'explicarà en l'apartat "*Desenvolupament del mètode*". Aquí s'indiquen les característiques del cromatògraf usat en les condicions definitives.

Taula 1. Característiques del cromatògraf iònic usat.

Columna de separació	AG18 +AS18 Amb una capacitat de 285µeq (4x250mm)
Columna supressora	AERS 500 4mm Dionex
Detector	DS6 Hated Conductivity Cell Dionex
Software	Chromeleon 6.60 SP8 Build 1544
Autosampler	AS40 Automated Sampler

La versió actual del software és el Chromeleon 6.8, el qual té millores importants (sobretot amb la integració de pics) respecte el que s'ha fet servir.

3.2. Validació de mètodes analítics

La validació de mètodes proporciona una idea de les capacitats i limitacions que posseeix un mètode analític quan s'utilitza en l'anàlisi diari segons uns determinats requisits prèviament establerts, i això ens permet verificar que el mètode és adequat per a la seva finalitat, per tant, és adequat per a resoldre el problema analític en qüestió ^[7].

Un mètode analític s'ha de validar en els següents casos ^[7]:

- Quan s'ha desenvolupat un mètode nou per a una aplicació específica (com seria el cas que avarca aquest treball).
- Quan es té un mètode establert en un altre laboratori amb analistes i/o instrumentació diferent.
- Quan el mètode ja està establert però s'ha adaptat a un nou problema.
- Un mètode que canvia al llarg del temps.

Els paràmetres de qualitat d'un mètode analític són els que es mostren en la Taula 2. Com s'observa poden ser de tipus científic o de caire més econòmic.

Taula 2. Paràmetres de qualitat d'un mètode analític.

Tipus científic	Tipus econòmic
Exactitud (precisió + veracitat)	Inversió
Representativitat	Manteniment
Sensibilitat	Simplicitat
Selectivitat	Despeses directes i indirectes
Límits del mètode	Rapidesa
Robustesa	Facilitat d'ús

Entre els paràmetres fonamentals de la validació de mètodes tenim l'exactitud, que comporta precisió (relacionada amb la incertesa), i la veracitat (relacionada amb la traçabilitat). En els paràmetres secundaris d'una validació es troben la sensibilitat, la selectivitat, els límits de detecció i quantificació del mètode i la robustesa. Tots aquests paràmetres s'expliquen a continuació.

Els paràmetres de tipus econòmic comprenen la simplicitat del mètode, la rapidesa d'aquest, el manteniment, etc.

3.2.1. Paràmetres a avaluar en la validació

- A. Selectivitat
- B. Linealitat
- C. Sensibilitat
- D. Límits
- E. Precisió
- F. Veracitat
- G. Robustesa

A. Selectivitat

La selectivitat és el grau en que un mètode pot quantificar o qualificar l'analit en presència d'interferents. Aquests analits normalment es troben en la matriu de la mostra que es vol analitzar.

Les proves de selectivitat es dissenyen d'acord amb el tipus de mètode que s'estigui validant. En el cas de la cromatografia la resolució del cromatograma dona informació sobre la selectivitat del mètode ^[8].

B. Linealitat

La linealitat és la capacitat d'un mètode d'anàlisi, dins d'un determinat interval, de donar una resposta o resultats que siguin proporcionals a la quantitat d'analit que s'haurà de determinar en la mostra ^[8].

Per comprovar la linealitat d'un mètode es determinen diferents característiques en la recta de calibratge.

- Coeficient de correlació (r) i coeficient de determinació (r^2): Indica el grau de relació entre la variable concentració (x) i la variable resposta (y) de la recta de calibratge.
Es fan un mínim de 5 concentracions i 3 mesures de cada una. Es fa un ajust per mínims quadrats i es calculen els coeficients de correlació i determinació.
Diem que un mètode és lineal quan $r=0.98$ fins $r=1$ i/o quan $r^2>0.99$.
- Distribució dels scores (residuals): La representació dels residuals permet avaluar la homogeneïtat de les variàncies. Avalua la distància (la diferència) entre la resposta (y) trobada experimentalment i el valor de la resposta (y) predit per la nostra recta de calibratge.
Es diu que un mètode és lineal quan no s'observen tendències en els scores, es a dir:
 - El nombre de residuals positius és aproximadament el mateix que de negatius.
 - Els residuals estan distribuïts a l'atzar.
 - Els residuals tenen aproximadament el mateix valor absolut.
- Test Q de Dixon (outliers): El que es mira amb el test Q de Dixon és que no hi hagi valors discrepants entre repeticions d'un mateix punt. Per a que aquestes repeticions siguin comparables han de provenir d'una mateixa preparació, totes les repeticions, en teoria, haurien de donar exactament el mateix.

El valor de $Q_{calculada}$ es calcula de la següent manera que s'indica en la Equació 1.

$$Q_{calculada} = \frac{|Valor sospitós - Valor més proper|}{Valor més gran - Valor més petit}$$

Equació 1. Càlcul de la $Q_{calculada}$ en el test Q de Dixon

El valor de la $Q_{tabulada}$ es troba en les taules de la Q de Dixon, Figura 27 ^[9] (*Annex 6. Taules de valors tabulats*).

C. Sensibilitat

Es diu que un mètode és sensible quan una petita variació de concentració comporta una gran variació de la resposta. La sensibilitat permet observar la capacitat de resposta instrumental davant d'una determinada quantitat d'analit.

En una regressió lineal ($y=ax+b$) la sensibilitat correspon a la pendent (a) de la recta de calibratge. En la Figura 8 s'observa que com més pròxima és la recta a l'eix de les Y (major pendent) els lleugers canvis en les concentracions esperades comportaran canvis més grans en els resultats obtinguts ^[8].

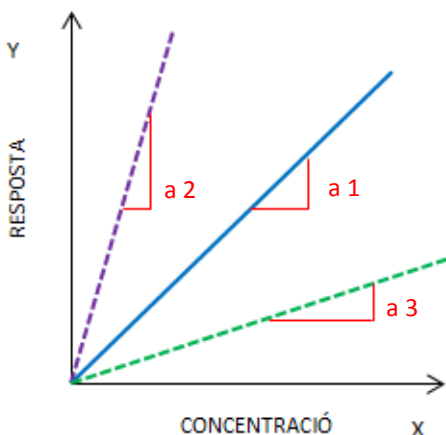


Figura 8. Sensibilitat en una regressió lineal (el pendent).

D. Límits

El límit de detecció (LOD) es defineix habitualment com la quantitat o concentració mínima de substància que pot ser detectada amb fiabilitat per un mètode analític determinat. Intuïtivament, el LOD seria la concentració mínima obtinguda a partir de la mesura d'una mostra (que conté l'analit) que seríem capaços de discriminar de la concentració obtinguda a partir de la mesura d'una mostra sense analit present ^[10].

El límit de quantificació (LOQ) es defineix com la mínima quantitat de concentració de l'analit que pot ser determinat amb una exactitud acceptable sota unes condicions indicades pel mètode.

Els mètodes per a determinar el límit de detecció i quantificació són diversos i varien depenent de si el procediment és instrumental o no instrumental. Hi ha mètodes basats en l'avaluació visual, en la desviació estàndard de la resposta i la pendent, en la relació senyal-soroll, etc.

Un cas particular important el constitueixen les tècniques que originen una senyal continua en el temps, com les tècniques cromatogràfiques. En aquests casos les mostres o patrons es manifesten com un pic transitori sobreposat a un soroll de fons. Per estimar els LOD i els LOQ en aquests casos s'han desenvolupat estratègies basades en la magnitud del soroll de fons i l'altura dels pics dels analits. Generalment es defineix l'LOD com la concentració que dona una relació de senyal/soroll (S/N) d'entre 2 i 3. Anàlogament, l'LOQ correspon a una relació S/N de 10. Es recomana, a poder ser, mesurar la magnitud del soroll al llarg d'un interval que sigui 20 vegades l'amplada del pic ^[11] ^[10].

Per poder mesurar la magnitud del soroll es necessari posar l'equip en la mínima atenuació. S'utilitzen diversos criteris per a mesurar la magnitud del soroll ^[11]:

- Mesurar la desviació estàndard del soroll.
- Mesurar l'amplitud, es a dir, la diferència entre el valor màxim i mínim del soroll. La *European Pharmacopoeia* defineix la relació S/N com està expressat en la Equació 2. On H és l'altura del pic i h la del soroll tal i com es veu en la Figura 9.

$$S/N = 2H/h$$

Equació 2. Relació senyal/soroll per a definir l'LOD i l'LOQ.

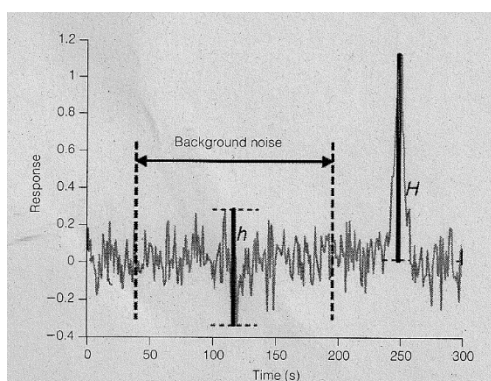


Figura 9. Representació de h i H em el càlcul de S/N.

- Mesura de la semiamplitud del soroll.

E+F. Exactitud

Quan es diu que un mètode d'anàlisi és exacte es refereix a una combinació de precisió (apartat de "Precisió") i veracitat (apartat de "Veracitat"). En el següent diagrama de "tir al blanc" (Figura 10), àmpliament utilitzat per a explicar aquest concepte, els punts o orificis equivalen als resultats analítics i el cercle vermell al centre del rang en el qual s'espera que estigui el valor de la resposta ^[8].

Com es pot observar, com més precís i veraç sigui un resultat analític més exacte serà.

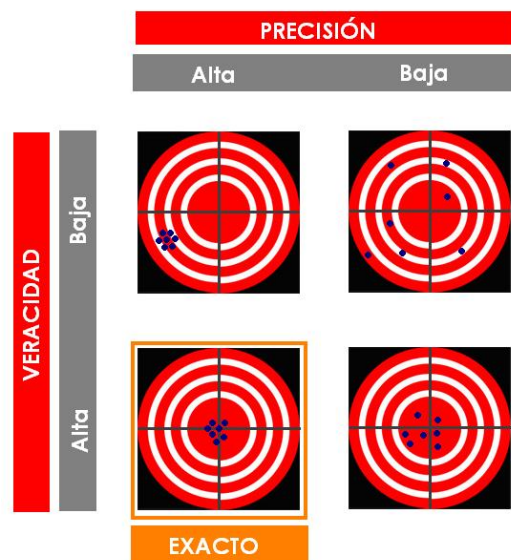


Figura 10. Diagrama de precisió i veracitat.

E. Precisió

La precisió és definida com el grau de concordança entre assaigs independents obtinguts sota unes condicions estipulades segons la ISO 3534-1 [ISO, 1993], tal i com es mostra gràficament en la Figura 11. S'avalua que les respostes obtingudes amb el mètode siguin repetitives.



Figura 11. Precisió

Hi ha dues característiques que avaluen la precisió.

- **Repetibilitat:** La repetibilitat d'un mètode reflexa la precisió quan es desenvolupa sota les mateixes condicions, fent servir la mateixa mostra, el mateix analista, mateix equip, mateixos reactius i durant un període de temps reduït (el mateix dia) ^[8].

Hi ha dos tipus de repetibilitat:

- **Repetibilitat instrumental:** El que s'avalua en aquest cas és que l'equip sigui repetitiu, perquè si hi ha problemes en el mètode poder distingir si la font d'imprecisió és el cromatògraf o no. Per tal de fer això es punxa unes 10 vegades seguides la mateixa preparació i s'estudia la desviació estàndard relativa (RSD (%)).

Les formules per a calcular l'RSD (%) i la desviació estàndard (necessària per al càlcul del RSD (%)) són les següents les que es mostren en la Equació 3 ^[12]:

$$RSD(\%) = \frac{\text{Desviació est.}}{\text{Mitjana}} \times 100 \quad \text{Desviació estàndard} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_m)^2}{n - 1}}$$

Equació 3. Càlcul de la desviació estàndard relativa (RSD (%)) i la desviació estàndard.

On X_i és cada un dels valors dels quals es vol calcular la desviació estàndard, X_m la mitja dels valors que es volen avaluar i la n el nombre d'anàlisis realitzats, dit d'altra manera, el nombre de valors que es volen comparar.

Per a donar com a vàlid un valor de RSD (%) l'empresa ha establert que ha de tenir un valor menor o igual que un 5%.

- **Repetibilitat del mètode:** En aquest cas el que s'avalua és la repetibilitat del mètode en si. Es té en compte la preparació de la mostra, l'anàlisi que fa l'equip i la recta de calibratge del mètode.

Per determinar la repetibilitat del mètode el que es fa és analitzar tres patrons, un proper al límit inferior, un al centre i un proper al límit superior de l'interval de linealitat. Cada patró s'analitza diverses vegades durant el mateix dia, i cada repetició és una preparació diferent.

La repetibilitat del mètode s'avalua de la mateixa manera que la repetibilitat instrumental (calculant l'RSD(%)) i seguint els mateixos criteris.

- **Reproductibilitat:** En realitzar un anàlisi de la reproductibilitat o precisió intermèdia el que es fa és avaluar la repetibilitat del mètode al llarg de diferents dies.

Per avaluar els resultats de la reproductibilitat es fa la desviació estàndard relativa, de la manera que em vist en la Equació 3. Des de l'empresa s'ha establert que els valors de l'RSD (%) de la reproductibilitat poden ser iguals o menors al doble de la recuperació obtinguda en el mètode.

F. Veracitat

La veracitat és el grau de coincidència existent entre el valor mig obtingut d'una sèrie de resultats i un valor de referència acceptat (el punt vermell del centre), aquesta definició es veu representada de manera gràfica en la Figura 12.



Figura 12. Veracitat

La veracitat pot ser determinada per la Recuperació. Amb la recuperació el que avaluem és si el resultat (concentració) és el que hauria de donar sabent la concentració teòrica que hauria de donar (sabem la pesada de solució mare que s'ha fet i per tant sabem els ppm que hi ha). Es a dir, tal i com es representa en la Figura 12, no s'estudia la dispersió dels resultats (cosa que es fa en la repetibilitat i reproductibilitat) sinó que realment els resultats donats pel mètode s'ajustin a la realitat (que siguin verços).

La recuperació es calcula de la següent manera que indica la Equació 4.

$$\%recuperació = \frac{\text{concentració real}}{\text{concentració teòrica}} \cdot 100$$

Equació 4. Càlcul de la recuperació

En un mètode com el que s'està validant en el que a la mostra no se li fa cap pretractament (tan sols es dilueix) com seria una extracció, evaporació, etc. la recuperació hauria de tenir un valor del 100% (o molt proper).

Per avaluar els resultats de la recuperació s'aplica un test *de Student*. El que indicarà aquest test estadístic és si els valors de recuperació s'accepten com bons ($t_{calculada} < t_{tabulada}$) en relació a un valor de referència que hauria de donar (100%). La $t_{calculada}$ es calcula de la manera que s'indica a en la Equació 5.

$$t_{calc} = \frac{|100 - \%Recuperació mitja|}{Desviació estàndard/\sqrt{n}}$$

Equació 5. Càlcul $t_{calculada}$ per al test t

El valor de la $t_{tabulada}$ es troba en taules com la que es mostra en la Figura 28 (*Annex 6. Taules de valors tabulats*).

G. Robustesa

La robustesa és una mesura de la capacitat d'un procediment analític de no ser afectat per variacions petites però deliberades dels paràmetres del mètode. Proporciona una idea de la fiabilitat del procediment en un ús normal. En aquest sentit l'objectiu de posar a prova la robustesa és optimitzar el mètode analític desenvolupat o implementat pel laboratori, i descriure sota quines condicions analítiques es poden obtenir resultats fiables.

Un mètode d'anàlisi és més robust com menys es vegin afectats els resultats davant de la modificació de condicions com serien l'analista, els reactius, pH, temperatura ambiental, estabilitat de la mostra, etc. [8]

4. Part experimental i discussió de resultats

4.1. Desenvolupament del mètode

Abans de començar a fer proves per intentar separar, localitzar i quantificar els analits desitjats el que es va fer va ser deixar el cromatògraf 24 hores passant H₂O desionitzada per tal d'acondiar l'equip ja que va arribar al *site* de Tarragona amb la columna connectada al cromatògraf i aparentment sense haver estat tractada amb la solució d'emmagatzematge corresponent. Aquest equip és de segona mà i va estar entre 2 i 3 anys emmagatzemat sense fer-se servir.

Per trobar les condicions del mètode analític que ens permetin determinar l'SE-2, sulfits i sulfats per cromatografia iònica s'han pres de referència les condicions amb les que es van estar fent proves de determinació de l'SE-2 amb el cromatògraf iònic de Metrhom. Per tant, es va començar provant amb la mateixa fase mòbil que es feia servir en les proves esmentades, i les condicions cromatogràfiques que es mostren en la Taula 3.

Els paràmetres que s'han estat variant i avaluant al llarg de tot el desenvolupament han estat: el tipus de columna, la fase mòbil i la concentració d'aquesta, la temperatura de la columna, el flux, l'addició de modificadors orgànics a la fase mòbil i/o la mostra, la supressió i la dilució de la mostra.

El valor de supressió que es va prendre inicialment va ser per recomanacions externes ja que no es tenia cap referència perquè l'altre cromatògraf iònic que hi ha en la fàbrica de Tarragona treballa amb supressió química.

El volum d'injecció al llarg de tot el desenvolupament del mètode sempre serà 25µl, ja que es tracta d'un volum adequat per les columnes que es fan servir al llarg del procés.

Taula 3. Primeres condicions de prova (basades en el mètode de referència).

Columna de separació cromatogràfica	AS18
Fase mòbil	NaHCO ₃ 1.7mM/Na ₂ CO ₃ 1.8mM
Flux	1 ml/min
Temperatura de la columna	40°C
Supressió	100 mA
Dilució mostra	0.5g Hostapon en 100ml d'H ₂ O desionitzada

Amb aquestes condicions es distingien l'actiu (l'Hostapon SI), que donava una banda molt ampla als primers minuts del cromatograma ($t_R=3.813\text{min}$) tal i com s'observa en la Figura 13, i més tard, els pics dels sulfits i els sulfats. L'SE-2 no es veia (es va comprovar que no es tractava del pic que surt abans de l'actiu) i es va suposar que es trobava sota de la banda de l'actiu.

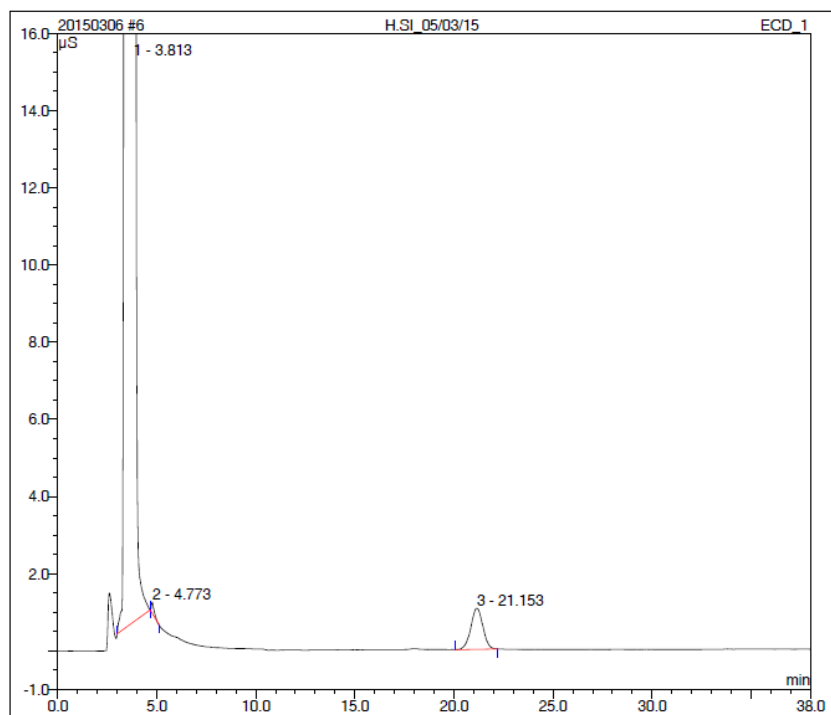


Figura 13. Primer cromatograma de l'Hostapon SI

Per determinar si un pic és o no el que es creu que és, el que es fa és, després d'haver punxat l'Hostapon, punxar la mateixa solució d'Hostapon amb patró d'SE-2, sulfits i/o sulfats.

Es va provar de variar les concentracions de bicarbonat (NaHCO_3)/carbonat (Na_2CO_3) i d'addicionar algun dissolvent orgànic (acetonitril) per tal d'intentar definir millor els pics dels sulfits i sulfats ja que sortien molt aplanats ^[5].

Després de diverses proves (amb variació de flux, temperatura de la columna i concentració de la fase mòbil) sense cap millora i d'investigar més a fons la columna en qüestió (AS18), es va decidir fer servir com a fase mòbil NaOH començant per una concentració de 23mM i posteriorment es van fer proves amb 5mM ^[13].

Com que s'intenten determinar sulfits i sulfats s'ha de tenir en compte el fet de que els primers s'oxiden a sulfats. Per tal d'estabilitzar els sulfits es prova d'afegir isopropanol (IPA) a la mostra. Aquesta metodologia ha estat extreta d'un mètode de determinació de sulfats per cromatografia de l'empresa Clariant (Tarragona). En el moment de desenvolupar el mètode mencionat la casa comercial Methrom

els hi ho va recomanar. Es va observar que els pics sortien una mica més definits, així doncs es va seguir estudiant les condicions del mètode adoptant aquesta metodologia.

En aquest punt els pics començaven a sortir molt amples i més endavant la pressió va començar a no ser estable. Això ens va fer pensar que la columna no estava bé, el motiu d'aquests problemes podria ser que la columna estigués bruta de contaminants previs. Vist això es va decidir canviar a una altra columna que havia dins el conjunt de components del cromatògraf.

Es tractava d'una columna AS9-HC. És una columna d'alta capacitat ^[14], cosa que vol dir que separa els pics més ràpidament. Això va fer pensar que escurçaria els temps de retenció dels sulfits i els sulfats i així sortirien més definits. El que va fer és ajuntar tots els pics, avançant els sulfits i els sulfats fins els 12 minuts. D'altra banda, però, el pic de l'Hostapon i el de l'SE-2 (que es pensa que es troba sota de l'Hostapon) encara sortien més aprop dels pics del seu entorn. Per tant es va descartar usar la columna AS9-HC.

Es va tornar a la columna AS18. Després de tenir-la acondicionant per un llarg temps (ja va ser canviada perquè semblava que no estava del tot bé) es van fer algunes proves (amb flux 1ml/min i temperatura 30°C) amb NaOH 5mM i es va observar una millor separació dels pics i una intenció de l'SE-2 ($t_R=3.457\text{min}$) de separar-se de l'actiu (l'Hostapon) tal i com es veu en la Figura 14.

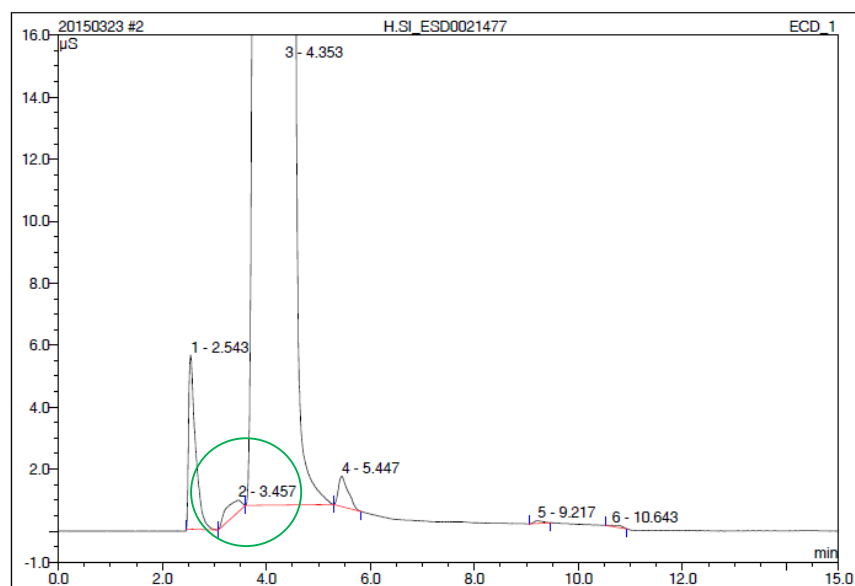


Figura 14. Cromatograma de l'Hostapon SI

Amb la columna neta de nou es va procedir a fer més proves per intentar separar l'SE-2. Després de diversos dies tenint la conductivitat sobre 11μS, quan hauria d'estar entre 1μS i 4μS, i de parlar-ho amb el departament tècnic de la casa Vertex Technics es va arribar a la conclusió que la columna supressora s'havia fet malbé, per tant no suprimia bé i per això la conductivitat era més alta. Des de Clariant es va decidir comprar una supressora nova i una columna ja que semblava que la AS18 estava començant a

donar senyals que indicaven que no li quedava molt temps d'ús. La columna AS18 ja no està al mercat, per tant es va comprar una tenint en compte les recomanacions de la casa comercial, la columna AS11.

Es va fer el canvi de supressora i la conductivitat va tornar a valors adequats. El departament tècnic de Vertex ens va dir que no era recomanable tenir la supressora treballant a més mA dels necessaris (mA als que ha de treballar la supressora depenen de la fase mòbil i la concentració d'aquesta), així que a partir de llavors el valor de la supressió es va adequar al recomanat pel software de l'equip.

Es va continuar fent proves per a separar l'SE-2 de l'actiu mentre arribava la nova columna. Com amb la columna AS18 ja s'havia vist (Figura 14) que amb fase mòbil NaOH 5mM, flux 1ml/min, i 30°C hi havia un "pic" que començava a separar-se de l'actiu es va seguir a partir d'aquí. Com que el problema semblava que era que la banda de l'Hostapon és tant ampla que ocupava el temps de retenció al que surt l'SE-2, hi havia dos canvis que farien que hi hagués menys actiu dins la columna. Una era fer una preparació de la mostra més diluïda i l'altra era posar un *loop* de menys volum.

Es va optar per provar de punxar una mostra més diluïda. Fins ara totes les proves (de fase mòbil, flux i temperatura) havien estat amb la dilució inicial de la mostra, 0.5g d'Hostapon en 100ml. Es van fer dues proves de dilució amb les condicions de fase mòbil, flux i temperatura que fins ara havia donat millors resultats (fase mòbil NaOH 5mM, flux 1ml/min, i 30°C). Les dilucions van ser de 0.25g d'Hostapon en 100ml d'aigua desionitzada i 0.5g d'Hostapon en 500ml d'aigua desionitzada.

Amb la dilució de 0.5g d'Hostapon en 500ml d'aigua desionitzada van separar-se dos pics tal i com es veu en la Figura 15.

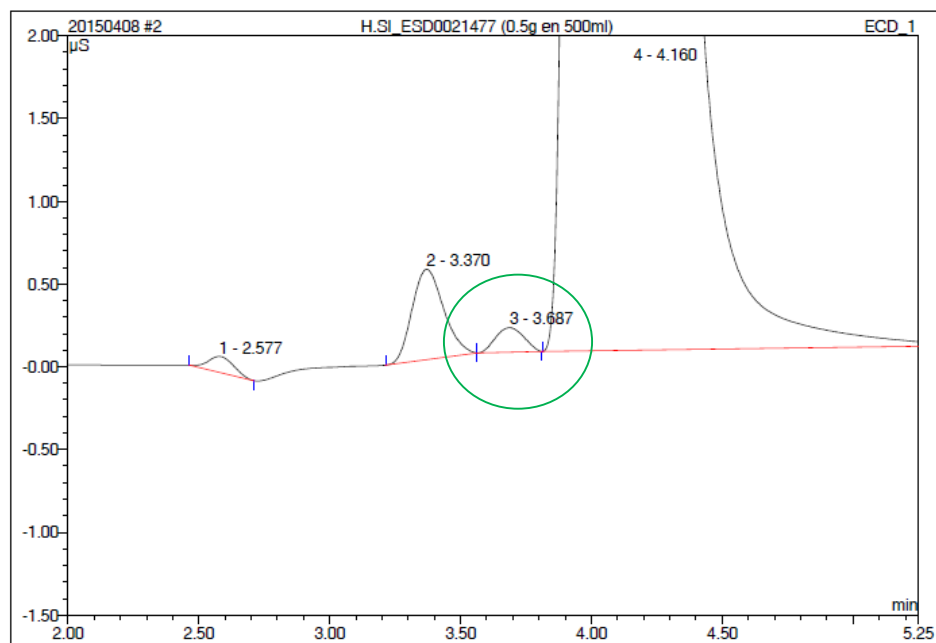


Figura 15. Cromatograma d'Hostapon SI 0.5g en 500ml d'aigua desionitzada

En un primer moment es va pensar que l'SE-2 era el pic de $t_R=3.370\text{min}$, però en punxar un patró d'SE-2 es va veure que era el pic de $t_R=3.687\text{min}$ el que es tractava de l'SE-2 (ja que els temps de retenció concordaven més) tal i com es pot veure en la Figura 16.

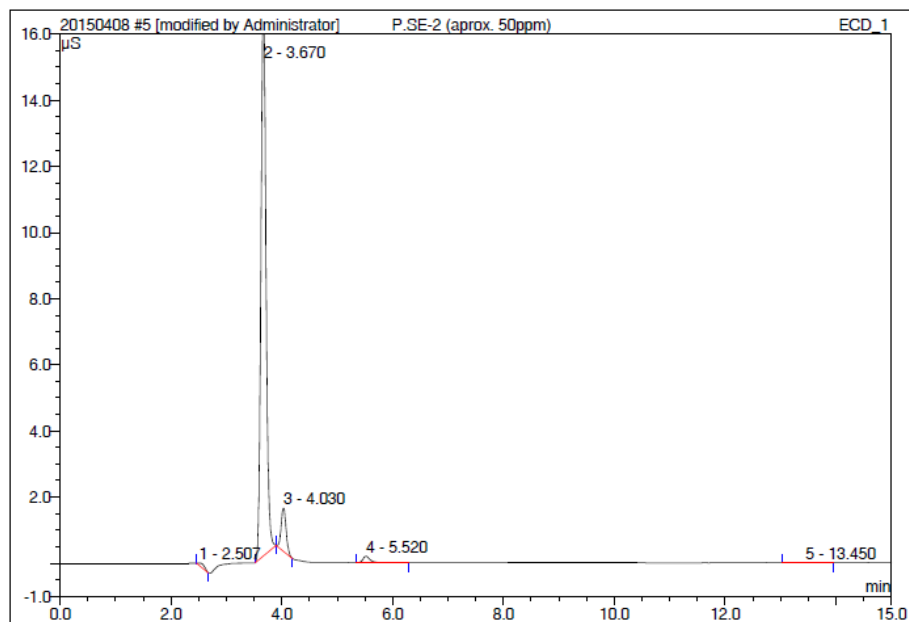


Figura 16. Cromatograma de patró de l'SE-2

En arribar la columna AS11 el primer que es va fer va ser aplicar les condicions que s'havien trobat amb la AS18 (havien comentat que no eren molt diferents una de l'altra). Els temps de retenció dels sulfit i els sulfats es van escurçar considerablement. En canvi el pic de l'SE-2 i el que hi ha a la seva esquerra sortien com un sol pic. Es va intentar separar baixant fins a NaOH 4mM la concentració de la fase mòbil, però no es va aconseguir veure els dos pics separats tal com s'havia vist amb l'altra columna.

Com que el temps del treball és limitat es va decidir tornar a la columna AS18 per poder seguir amb el mètode i la validació. Així doncs, les condicions definitives del mètode són les que es mostren en la Taula 4.

Taula 4. Condicions cromatogràfiques del mètode analític.

Columna de separació cromatogràfica	AS18
Fase mòbil	NaOH 5mM
Flux	1ml/min
Règim	Isocràtic
Volum del loop	25μl
Temperatura de la columna	30°C
Supressió	20mA
Temps d'anàlisi	40 minuts
Dilució mostra	0.1g Hostapon SI en 100ml d'H ₂ O desionitzada + 0.5g d'IPA

En la Figura 17 el que es mostra són dos cromatogrames fets en les condicions definitives trobades. El cromatograma en negre fa referència a una mostra d'Hostapon SI amb una dilució de 0.1g en 100g d'aigua desionitzada.

Per tal d'identificar els pics el que s'ha fet és afegir damunt de la solució anterior, en un cas, patró d'SE-2, en un altre patró de sulfits i en un altre patró de sulfats. Una vegada identificats el que es va fer va ser afegir en la solució d'Hostapon amb aigua desionitzada els tres patrons al mateix temps (cromatograma de color blau) per tal de localitzar-los tots en un mateix cromatograma, tal i com es mostra en la Figura 17.

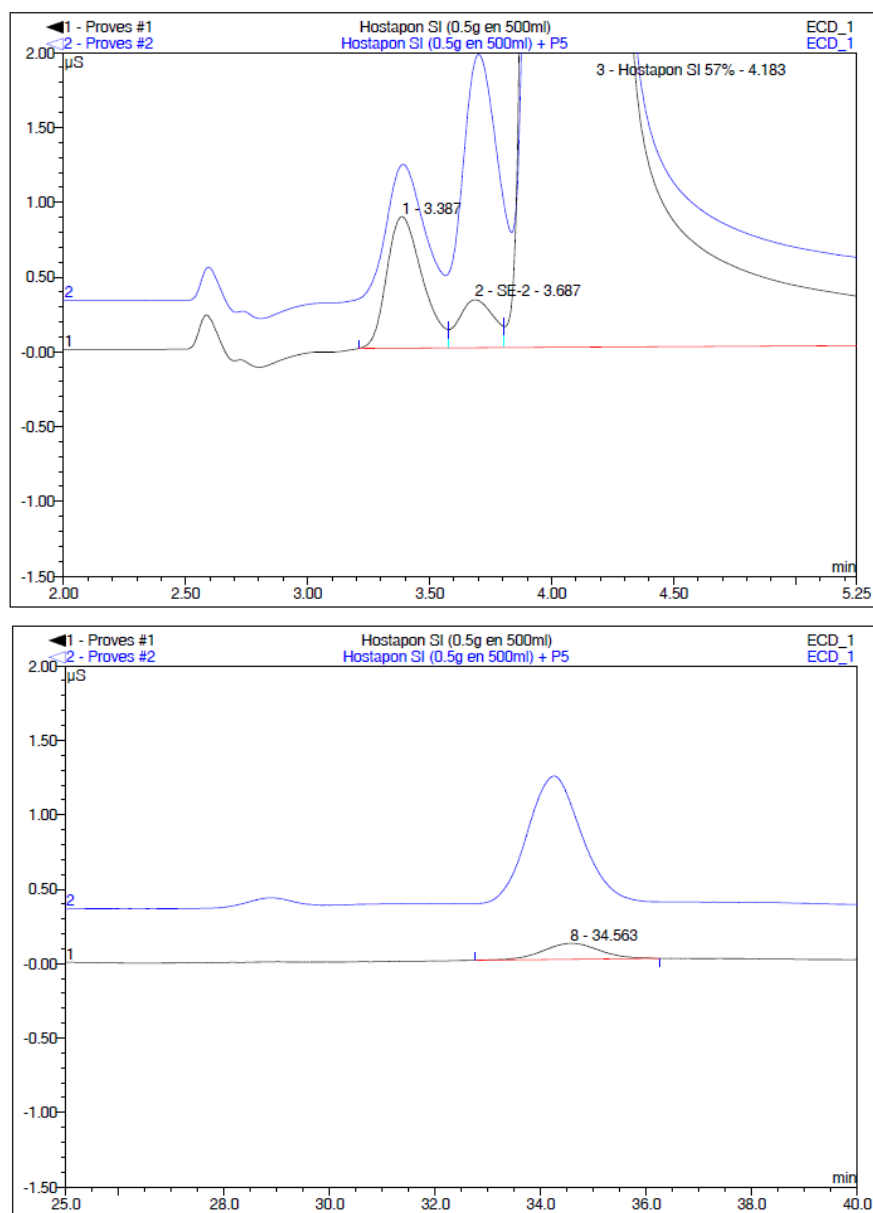


Figura 17. Cromatogrames en les condicions definitives del mètode. Hostapon SI diluït 1000 vegades (en negre) i la mateixa solució havent-li afegit patró de SE-2, sulfits i sulfats (en blau).

S'observa com els pics de l'SE-2 ($t_R=3.687\text{min}$), dels sulfit ($t_R=28.903\text{min}$) (en la mostra sense patró, cromatograma de color negre, no es detecten sulfit) i el dels sulfats ($t_R=34.563\text{min}$) augmenten al afegir els tres patrons, tal i com era d'esperar.

❖ *Discussió de resultats*

Amb les condicions trobades el que s'observa és que els sulfit i els sulfats surten molt ben separats, tot i que amb temps de retenció molt grans. Això comporta que els pics no tinguin una forma molt aguda i definida. A més el fet de tenir temps de retenció tant grans comporta que no siguin molt repetitius i es moguin més del desitjat entre diferents anàlisis.

Respecte l'SE-2, es veu que podria estar més ben separat, però com el temps de treball és limitat no es s'ha pogut seguir fent proves. D'altra banda, amb l'equip que es té sembla complicat aconseguir una separació millor.

Per tant, les condicions finals del mètode són les que es veuen en la Taula 4. On es treballa amb un règim isocràtic de NaOH 5mM a un flux de 1ml/min i una temperatura de 30°C.

4.2. Mètode analític

4.2.1. Material, reactius i equips

Material:

- Matràs aforat de 1000ml ($\pm 0.4\text{ml}$)
- Matràs aforat de 100ml ($\pm 0.1\text{ml}$)
- Matràs aforat de 50ml ($\pm 0.06\text{ml}$)
- Sistema de filtració al buit
- Ampolles per la fase mòbil del cromatògraf
- Xeringa de plàstic de dos cossos d'1ml + agulla
- Embut pesasubstàncies
- Xeringa de dos cossos de 5ml
- Filtres de nylon per la xeringa de 0.45 μm de porus
- Vials per l'*autosampler* Dionex de 5ml

Reactius i toxicitat ^[15] ^[16]:

- NaOH 1M → Efectes locals greus per exposició cutània, ocular, inhalació i ingestió.
- Isetionat de sodi (Hostapon SI) → No es coneix cap toxicitat per als humans.
- Isopropanol (IPA) → Es pot absorbir per inhalació, ingestió, contacte amb la pell i amb els ulls. Pot comportar irritació de les mucoses i en cas d'inhalació somnolència, mal de cap i marejos.
- Hidroxi-isetionat sòdic (SE-2) amb una puresa del 85% → No s'ha trobat informació al respecte.
- Sulfit de sodi → Pot ser absorbit per inhalació i per ingestió. Una exposició breu pot produir irritació del tracte respiratori, i un exposició prolongada pot originar asma.

- Sulfat de sodi → Es pot absorbir per ingestió i a través de la pell. Hi ha risc d'inhalar-lo, especialment quan està en forma de pols. Els efectes d'una exposició breu són irritació dels ulls, la pell i el tracte respiratori. Pot produir dermatitis en cas d'una exposició prolongada.

Equips:

- Cromatògraf iònic DIONEX ICS-2000
- Balança analítica
- Agitador magnètic

4.2.2. Preparació de fase mòbil

Per a la preparació d'un litre de solució de NaOH 5mM (fase mòbil) a partir de NaOH 1M s'han de pesar els grams que ens indiquen els següents càlculs:

$$1l \times \frac{5 \times 10^{-3} \text{ mols NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} \times \frac{1l \text{ NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} \times \frac{1Kg}{1l} \times \frac{10^3 g}{1Kg} = 5g \text{ solució NaOH}$$

El procediment a seguir és:

- Tarar un matràs de 1000ml. Afegir-hi 5g de NaOH 1M.
- Enrasar amb aigua desionitzada.
- Homogeneïtzar durant 2 minuts mitjançant un agitador magnètic.
- Filtrar a través d'una membrana de 0.45µl de porus fent us d'un equip de filtració al buit.
- Posar la fase mòbil en l'ampolla del cromatògraf.

4.2.3. Preparació de mostra

- Pesar 0.1g d'Hostapon SI en un matràs de 100ml.
- Afegir 50g d'isopropanol.
- Enrasar amb aigua desionitzada.
- Homogeneïtzar durant 2 minuts mitjançant un agitador magnètic.
- Filtrar la mostra a través d'un filtre de nylon de 0.45µm de porus.

4.2.4. Preparació de solució mare

- Pesar la quantitat adequada de SE-2, sulfits o sulfats en l'embut pesasubstàncies i posar-ho al matràs adequat per a que tingui la concentració desitjada. La concentració de la solució mare es calcula de la manera que s'indica en la Equació 1:

$$ppm \text{ d'X en SM} = \frac{g \text{ d'X}}{g \text{ solució}} \times \frac{Riquesa \text{ d'X}}{100} \times 10^3 \times 10^3$$

Equació 6. Càlcul dels ppm de la solució mare

- Enrasar amb aigua desionitzada.
- Homogeneïtzar durant 2 minuts mitjançant un agitador magnètic.

4.2.5. Preparació de patrons

- Pesar la quantitat adequada de solució mare de SE-2, sulfits i sulfats en un matràs de 50ml per a qui tingui la concentració desitjada. La concentració del patró es calcula de la manera que s'indica en la Equació 7:

$$ppm \text{ d'X en patró} = \frac{g \text{ de SM d'X}}{g \text{ solució (aprox. 50g)}} \times ppm \text{ d'X en SM}$$

Equació 7. Càlcul dels ppm dels patrons

- Afegir 25ml d'isopropanol (IPA).
- Enrasar amb aigua desionitzada.
- Homogeneïtzar durant 2 minuts mitjançant un agitador magnètic.
- Filtrar el patró a través d'un filtre de nylon de 0.45µm de porus.

4.3. Validació del mètode

A. Linealitat del mètode (recta de calibratge)

La linealitat del mètode s'estudia avaluant la linealitat de la recta de calibratge. Les rectes que s'han establert tenen entre 5 i 6 patrons, on el segon o el tercer punt és una concentració al voltant del que acostuma a donar i el punt de concentració més elevada (o el segon de concentració més elevada) és el valor màxim permès pel pla de control de qualitat del producte.

Els límits permesos pel pla de control de qualitat del producte són: de sulfits un 0.07% i de sulfats no hi ha un valor màxim a no superar, però si la reacció ha anat bé no hauria de superar el 0.3%. Tal com s'ha dit en apartats anteriors l'SE-2 no és un paràmetre a controlar segons el pla de qualitat actual, ara bé, si s'hagués d'introduir aquest paràmetre en el pla de control el valor màxim estipulat seria aproximadament un 1%.

Per fer l'estudi de la linealitat del mètode tenim tres rectes de calibratge, una per a cada analit que volem determinar. Es preparen les tres rectes proposades i es fan tres repeticions de cada punt de la recta.

Per tal de poder fer els patrons es preparen les solucions mare de SE-2 (220ppm), sulfits (100ppm) i sulfats (500ppm). El càlcul de la concentració de la solució mare d'SE-2 (0.026g d'SE-2 (85%) en un matràs de 100ml) és el següent:

$$0.026g \times \frac{1000mg}{1g} \times \frac{85}{100} \times \frac{1}{100ml} \times \frac{1000ml}{1l} = 221ppm$$

Es preparen els patrons d'SE-2 (0.5ppm, 1ppm, 2ppm, 3ppm, 6ppm, 20ppm), sulfits (0.1ppm, 0.25ppm, 0.6ppm, 1ppm, 1.5ppm, 2ppm) i sulfats (2ppm, 3ppm, 4ppm, 5ppm, 6ppm, 7ppm). El càlcul de la concentració del primer patró d'SE-2 (0.1136g de solució mare en un matràs de 50ml) es fa de la següent manera, seguint les indicacions de la Equació 7:

$$\frac{221ppm \times 0.1136g \text{ SM SE} - 2}{50g \text{ patró}} = 0.5ppm$$

Les concentracions de les solucions mare usades per fer la recta de calibratge són les que es mostren en la Taula 5. Per als altres paràmetres de validació no són els mateixos valors ja que cada dia es preparava solució mare nova de sulfits (són inestables i s'oxiden a sulfats amb molta facilitat) i sulfats. La solució mare de SE-2 es preparava cada vegada que s'acabava (durant el temps d'ús es guardava a la nevera) ja que d'SE-2 només es disposa d'un petit vial d'uns 6 grams que es va sintetitzar fa anys a un laboratori de l'empresa Clariant a Alemanya.

Taula 5. Solucions mare utilitzades en la recta de calibratge.

Solució mare SE-2	220,0822ppm
Solució mare sulfits	98,7119ppm
Solució mare sulfats	503,3737ppm

Les concentracions dels patrons i les àrees obtingudes de l'anàlisi cromatogràfic són les que es mostren a continuació. Els valors del SE-2 es mostren en la Taula 6, els dels sulfits en la Taula 7 i els dels sulfats en la Taula 8.

Taula 6. Concentracions i àrees dels patrons de la recta del SE-2.

Patrons SE-2	g SM SE-2	Concentració SE-2 (ppm)	Àrea SE-2 ($\mu\text{S} \cdot \text{min}$)
1	0.1215	0.5262	0.018
2	0.2344	1.0252	0.033
3	0.4599	1.9875	0.057
4	0.6850	2.9999	0.082
5	2.0899	9.0084	0.263
6	4.5004	19.7497	0.639
1	0.1296	0.5663	0.015
2	0.2326	1.0213	0.031
3	0.4631	2.0294	0.061
4	0.6892	3.0272	0.088
5	1.3808	5.9440	0.177
6	4.5501	19.9067	0.662
1	0.1159	0.5112	0.019
2	0.2311	0.9980	0.034
4	0.7021	3.0762	0.087
5	1.3718	6.0077	0.176
6	4.5633	19.8407	0.656

Taula 7. Concentracions i àrees dels patrons de la recta dels sulfits.

Patrons Sulfits	g SM Sulfits	Concentració Sulfits (ppm)	Àrea Sulfits ($\mu\text{S} \cdot \text{min}$)
2	0.1722	0.3400	0.007
3	0.3050	0.5912	0.018

4	0.5095	1.0008	0.029
5	0.7602	1.4697	0.048
6	1.0108	1.9896	0.080
2	0.1347	0.2670	0.004
3	0.3349	0.6583	0.019
4	0.5127	1.0101	0.033
5	0.7854	1.5164	0.054
6	1.0097	1.9813	0.071
2	0.1466	0.2853	0.004
4	0.5174	1.0168	0.033
5	0.8011	1.5736	0.058
6	1.0613	2.0697	0.074

Taula 8. Concentracions i àrees dels patrons de la recta dels sulfats.

Patrons Sulfats	g SM Sulfats	Concentració Sulfats (ppm)	Àrea Sulfats ($\mu\text{S} \cdot \text{min}$)
1	0.2078	2.0583	0.203
2	0.3103	3.1004	0.313
3	0.4016	3.9696	0.396
4	0.5116	5.1245	0.538
5	0.6008	5.9232	0.619
6	0.7119	7.1455	0.724
1	0.2012	2.0108	0.222
2	0.3068	3.0774	0.313
3	0.4203	4.2127	0.432
4	0.5061	5.0844	0.544
5	0.6262	6.1655	0.645
6	0.7073	7.0776	0.760
1	0.2094	2.1124	0.217
2	0.3115	3.0337	0.348
4	0.5284	5.2952	0.548
5	0.6272	6.2824	0.658
6	0.7378	7.3371	0.792

La tercera repetició del patró 3 no es va injectar bé, motiu pel qual no tenim valors. El patró 1 dels sulfits es va observar que es trobava per sota del límit de detecció i per tant no es considera en la recta.

Les rectes obtingudes abans d'aplicar-li cap paràmetre per determinar si tots els punts s'ajusten a la linealitat son els que es mostren en la Taula 9.

Taula 9. Rectes de calibratge abans de discriminar cap punt (preliminars).

Equació preliminar recta SE-2	$y=ax+b$
Pendent (a)	0,0330
Ordenada origen (b)	-0,0083
R ²	0,99795

Equació preliminar recta Sulfits	$y=ax+b$
Pendent (a)	0,0406
Ordenada origen (b)	-0,0077
R ²	0,98944

Equació preliminar recta Sulfats	$y=ax+b$
Pendent (a)	0,1058
Ordenada origen (b)	-0,0053
R ²	0,99430

Tal i com es pot observar, no en tots tres casos el valor del coeficient de desviació (R²) és major que 0.99.

Per tal d'avaluar la correlació entre la concentració i l'àrea dels mètodes es fa la representació dels residuals. El que representem és la diferència entre l'àrea obtinguda com a resposta cromatogràfica i l'àrea predita per la recta que estem avaluant. En les taules Taula 10, Taula 25 (*Annex 1. Linealitat del mètode (recta de calibratge)*) i Taula 26 (*Annex 1. Linealitat del mètode (recta de calibratge)*) tenim els càlculs i els valors que aquest han donat, que posteriorment, en la Figura 18, Figura 19 i Figura 20 es veuen representats.

L'àrea predita es calcula de la manera que es s'indica en la Equació 8, mostrant el càlcul de la primera repetició del patró 1 de l'SE-2:

$$y_{predita} = (a \times concentració) + b = (0.0330 \times 0.5262) + (-0.0083) = 0.009$$

Equació 8. Càlcul de l'àrea predita per la recta

Taula 10. Càlcul de residuals per l'SE-2.

Patrons SE-2	Concentració	Àrea SE-2 (μS*min)	Àrea predita SE-2	Resposta-Predita
1	0,5262	0,018	0,0090	0,0090
2	1,0252	0,033	0,0255	0,0075
3	1,9875	0,057	0,0572	-0,0002
4	2,9999	0,082	0,0906	-0,0086
5	9,0084	0,263	0,2888	-0,0258
6	19,7497	0,639	0,6430	-0,0040
1	0,5663	0,015	0,0104	0,0046

2	1,0213	0,031	0,0254	0,0056
3	2,0294	0,061	0,0586	0,0024
4	3,0272	0,088	0,0915	-0,0035
5	5,9440	0,177	0,1877	-0,0107
6	19,9067	0,662	0,6482	0,0138
1	0,5112	0,019	0,0085	0,0105
2	0,9980	0,034	0,0246	0,0094
4	3,0762	0,087	0,0931	-0,0061
5	6,0077	0,176	0,1898	-0,0138
6	19,8407	0,656	0,6460	0,0100

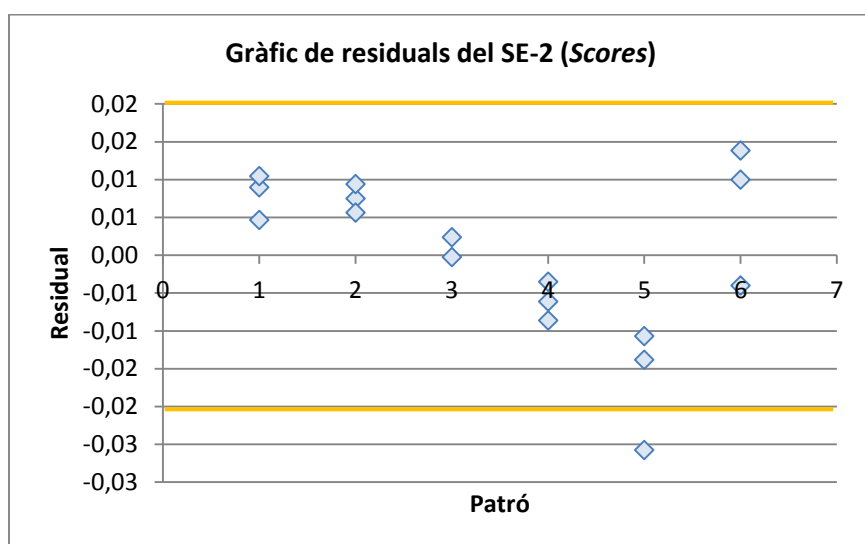


Figura 18. Gràfic de residuals de l'SE-2.

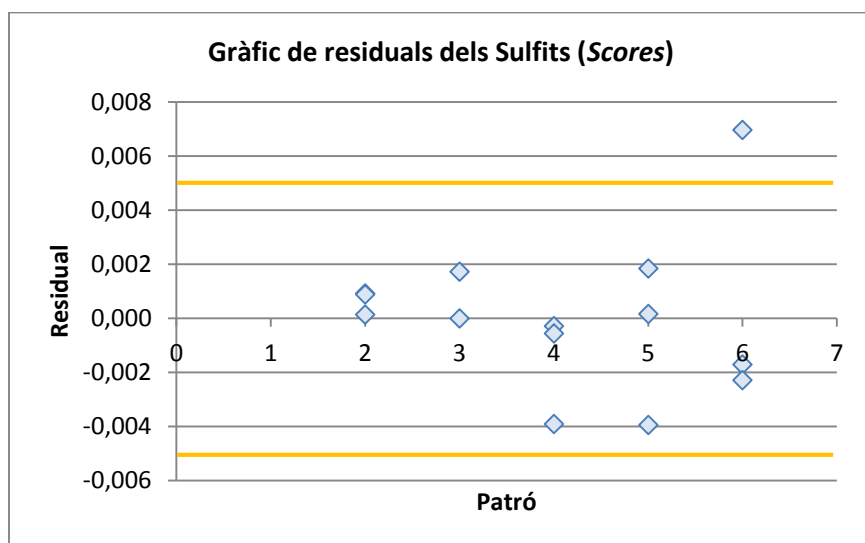


Figura 19. Gràfic de residuals dels sulfits.

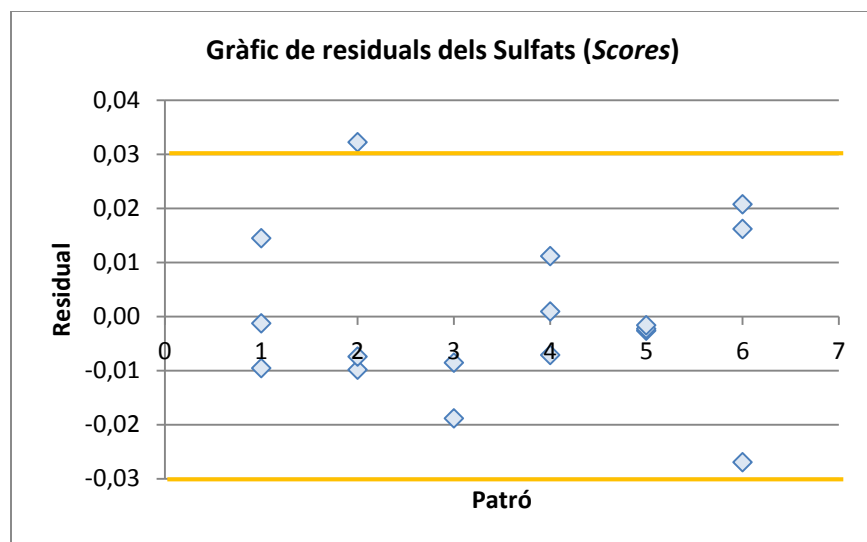


Figura 20. Gràfic de residuals dels sulfats.

El que podem observar és que no es veu cap tendència i que els punts estan repartits equitativament per damunt i per sota del 0. En canvi si que s'observen alguns punts discrepants. Segons els valors de residuals que ens donen i les directius de Clariant s'estipula que es posa el límit dels residuals en ± 0.02 en el mètode de l'SE-2, en ± 0.005 en el mètode dels sulfits i en ± 0.03 en el de sulfats. Per tant la primera repetició del patró 5 en l'SE-2 queda per fora del límit estipulat, així com la primera repetició del patró 6 en els sulfits i la tercera repetició del patró 2 en els sulfats.

Eliminant els punts que acabem d'anomenar les rectes de calibratge queden tal i com es veu en la Figura 21, Figura 22 i Figura 23.

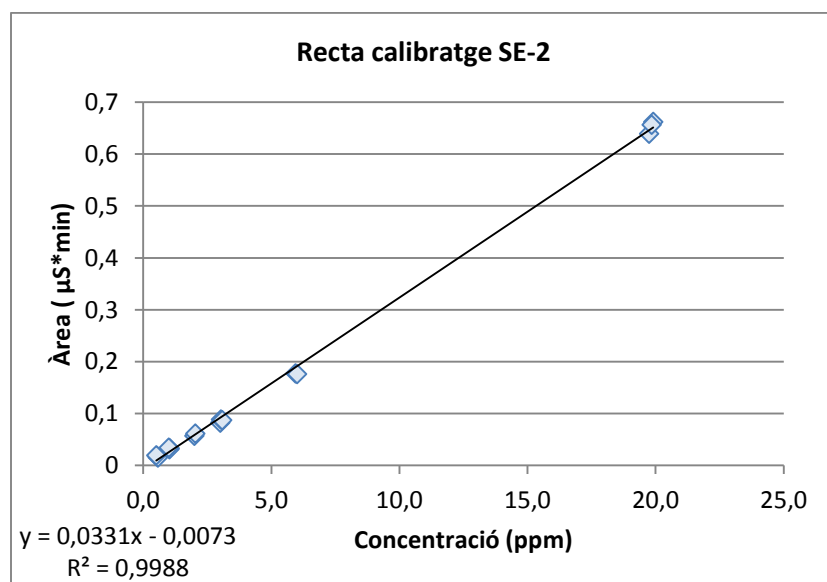


Figura 21. Recta de calibratge de l'SE-2.

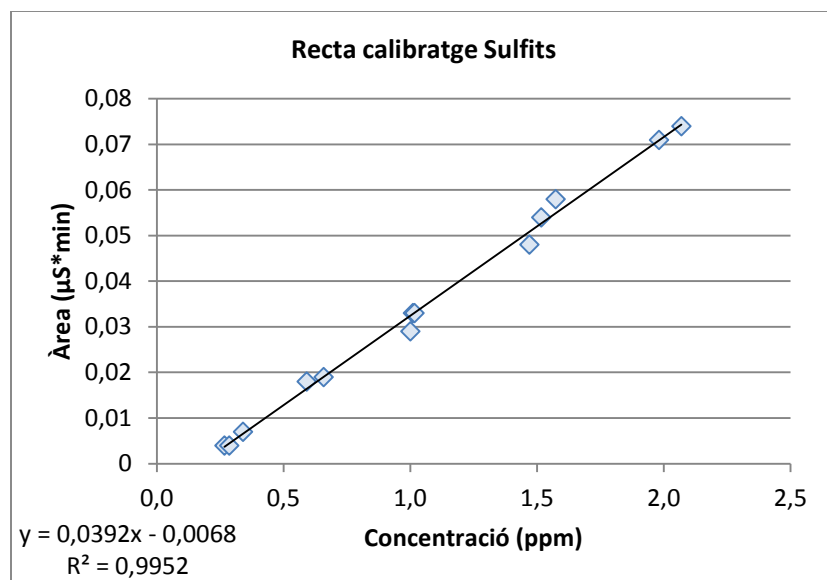


Figura 22. Recta de calibratge dels sulfits.

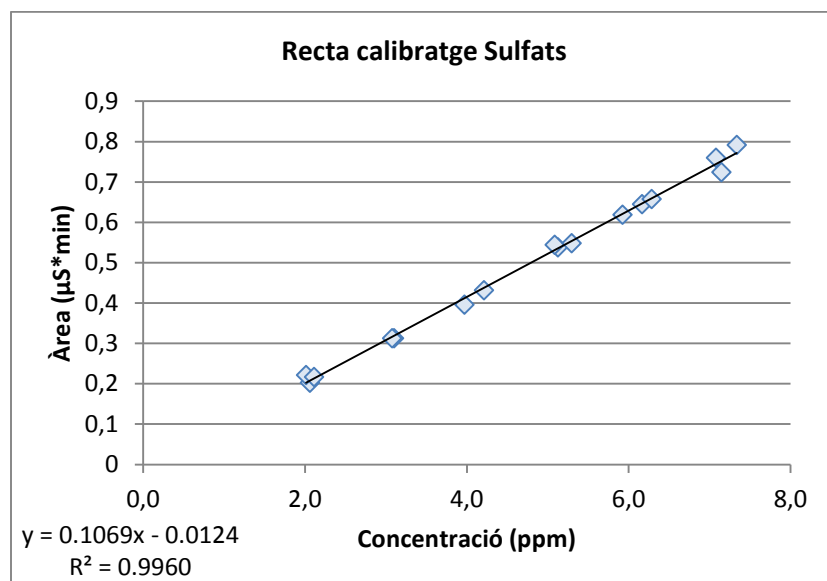


Figura 23. Recta de calibratge dels sulfats

Les rectes definitives del mètode són els que es mostren en la Taula 11.

Taula 11. Rectes de calibratge

Equació recta SE-2	$y=ax+b$
Pendent (a)	0.0331
Ordenada origen (b)	-0.0073
R^2	0.9988

Equació recta Sulfit	$y=ax+b$
Pendent (a)	0.0392
Ordenada origen (b)	-0.0068
R^2	0.9952

Equació recta Sulfat	$y=ax+b$
Pendent (a)	0.1069
Ordenada origen (b)	-0.0124
R^2	0.9960

No podem aplicar un test Q de Dixon per avaluar els punts discrepants ja que les repeticions de cada punt són preparacions diferents, i per tant “no són respostes d’una mateixa pregunta” i no les podem comparar.

❖ Discussió de resultats

Després d’eliminar els punts que s’han acordat al diagrama de residuals no s’observen punts discrepants, per tant es pot afirmar que el mètode dona una bona relació entre l’àrea (la resposta de l’equip) i la concentració que la recta de calibratge dona.

El coeficient de determinació de les rectes dels tres mètodes és major que 0.99, per tant podem dir que en els tres mètodes tenen una bona linealitat.

B. Límit de detecció i quantificació

Per tal de trobar el límit de detecció i el límit de quantificació s’ha procedit de dues maneres diferents.

En el cas dels sulfit i els sulfat el que s’ha fet ha estat punxar una mostra d’Hostapon SI. Es calcula la quantitat de sulfit i sulfat que hi ha a la mostra punxada interpolant a la recta de calibratge. Posteriorment fent dilucions de la preparació anterior s’ha mirat quan la relació S/N és 3 (LOD) i és 10 (LOQ).

En la Taula 12 i la Taula 13 es mostren els resultats de LOD i LOQ dels sulfit i els sulfat.

Taula 12. LOD i LOQ dels sulfit

	ppm en la dilució	ppm en la mostra	% en la mostra
LOD Sulfit	0.1994	19.89	0.00198%
LOQ Sulfit	0.2450	245.87	0.0246%

Taula 13. LOD i LOQ dels sulfat

	ppm en la dilució	ppm en la mostra	% en la mostra
LOD Sulfat	0.1572	145.67	0.0145%
LOQ Sulfat	0.3193	274.98	0.0270%

Com que l'SE-2 surt en una zona del cromatograma que està molt afectada per la presència de l'Hostapon SI, s'ha determinat l'LOD i l'LOQ punxant tant sols patró s'SE-2 en lloc de fer-ho amb una mostra del producte tot i que és millor procedir tal i com s'ha fet amb els sulfits i els sulfats ^[10]. Els resultats de LOD i LOQ de l'SE-2 són els que es mostren en la Taula 14.

Taula 14. LOD i LOQ de l'SE-2

	ppm en la dilució	ppm en la mostra	% en la mostra
LOD SE-2	0.0580	57.97	0.0060%
LOQ SE-2	0.1035	103.41	0.0103%

❖ *Discussió de resultats*

El que es pot observar és que en el cas dels sulfats i l'SE-2 tant el límit de detecció com el de quantificació es troben molt per sota de la concentració del primer patró de les rectes de calibratge. En canvi en el cas dels sulfits el límit de detecció està entre el patró 1 i 2, per això en fer la recta de calibratge s'ha hagut d'eliminar el primer patró. El límit de quantificació d'aquests és molt proper al patró 2, per tant els sulfits podrien ser més sensibles a l'hora de ser determinats.

C. Repetibilitat instrumental

Per dur a terme la repetibilitat instrumental s'ha preparat un patró. El patró a punxar és indiferent ja que el que es vol determinar és la repetibilitat de l'anàlisi en funció de l'aparell, per tant a qualsevol concentració hauria de donar el mateix. El que determinarem serà la desviació estàndard relativa (RSD (%)) produïda pel cromatògraf iònic. El resultat només vindrà condicionat per la precisió del instrument.

Com que només volem avaluar el cromatògraf el que farem serà avaluar les àrees que ens dóna, d'aquesta manera només fem referència a la resposta de l'equip. El patró que s'ha triat per fer la repetibilitat instrumental ha estat el patró 4 de la recta de calibratge.

Els càlculs de l'RSD (%) i la desviació estàndard es fan tal i com s'explica en l'apartat de "Precisió".

En les Taula 15, Taula 27 (*Annex 2. Repetibilitat instrumental*) i Taula 28 (*Annex 2. Repetibilitat instrumental*) es mostren els càlculs realitzats per a determinar l'RSD(%) de la repetibilitat del instrument i els resultats d'aquests (Taula 16).

Taula 15. Repetibilitat instrumental de l'SE-2

Anàlisi	Àrea SE-2	$(X_i - X_m)$	$(X_i - X_m)^2$
1	0.096	-0.0022	4.69E-06
2	0.098	-0.0002	2.78E-08
3	0.097	-0.0012	1.36E-06
4	0.099	0.0008	6.94E-07
5	0.100	0.0018	3.36E-06
6	0.099	0.0008	6.94E-07
7	0.097	-0.0012	1.36E-06

8	0.099	0.0008	6.94E-07		
9	0.099	0.0008	6.94E-07	Nº anàlisis (n)	12
10	0.099	0.0008	6.94E-07	Mitjana (X_m)	0.0982
11	0.097	-0.0012	1.36E-06	Desv. est.	0.0012
12	0.098	-0.0002	2.78E-08	RSD (%) SE-2	1.2157%

Taula 16. Repetibilitat instrumental del mètode

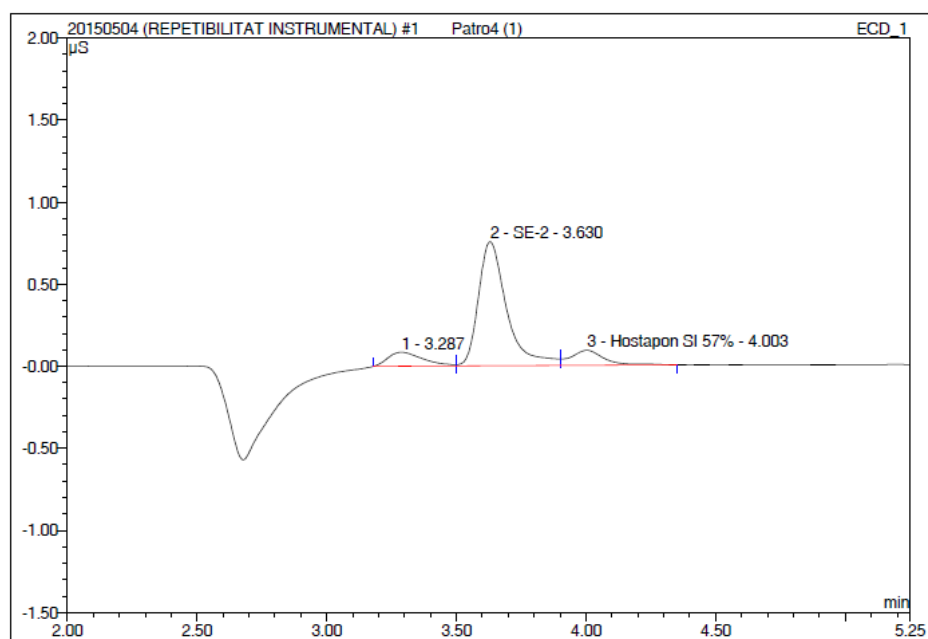
RSD (%) SE-2	1.2157%
RSD (%) Sulfits	7.0950%
RSD (%) Sulfats	0.8492%

❖ Discussió de resultats

Es considera una RSD (%) acceptable quan aquest valor és igual o inferior al 5%. Tal i com es veu en les taules anteriors l'RSD (%) de l'SE-2 i els sulfats la repetibilitat instrumental és bona ja que és molt inferior a 5%, això és positiu ja que ens indica que els resultats de SE-2 i sulfats en principi no vindran influenciats per la precisió de l'aparell.

En canvi el valor del RSD(%) dels sulfits ja no es tant proper al valor desitjat. És superior al 5%, això ens indica que per a la determinació de sulfits l'equip que estem fent servir no presenta una repetibilitat acceptable.

Es creu que aquest fet pot venir donat perquè l'àrea dels sulfits ($t_R = 26.170\text{min}$) és bastant més petita que la de l'SE-2 ($t_R = 3.630\text{min}$) i la dels sulfats ($t_R = 31.247\text{min}$), tal i com es mostra en la Figura 24, i per tant, petits errors en la integració afecten molt més a la determinació de la seva àrea.



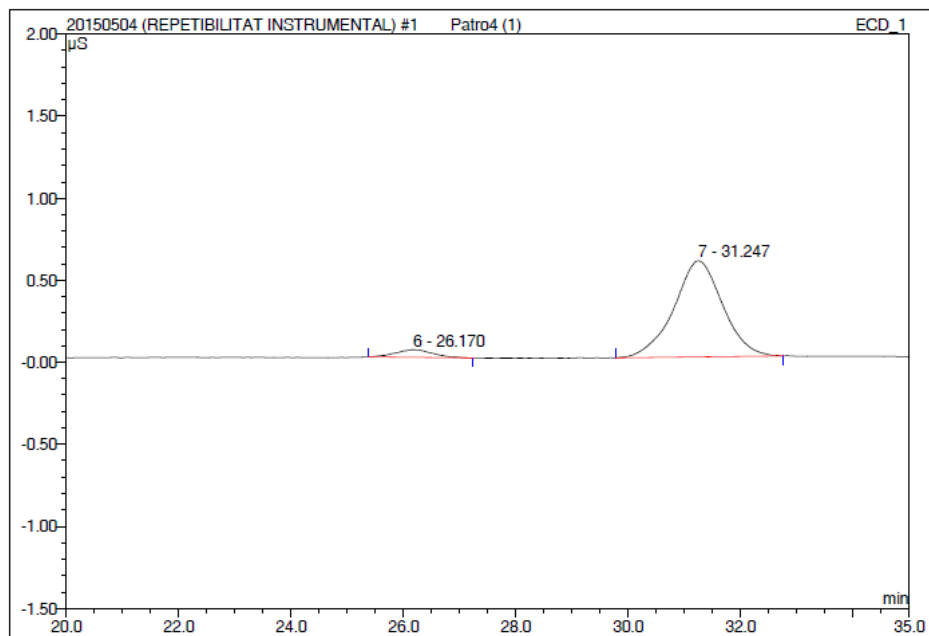


Figura 24. Cromatograma del patró 4

D. Repetibilitat del mètode

Tal i com s'indica en l'apartat de "*Precisió*", es preparen tres patrons i es punxen 10 vegades. Cada repetició dels patrons és una preparació nova ja que el que es vol és veure la repetibilitat del mètode i això comporta la preparativa dels patrons o mostres.

La recta de calibratge també forma part del mètode, per això ara s'avaluen les concentracions i no les àrees com s'ha fet en la repetibilitat instrumental. Amb les rectes de calibratge obtingudes amb anterioritat (Figura 21, Figura 22 i Figura 23) es calcula la concentració a partir de les àrees que ha donat el cromatògraf i es determina l'RSD (%) de cada una d'aquestes. Després es calcula la RSD (%) total de cada mètode, que és la suma de les RSD (%) obtingudes a cada concentració per tal de saber l'RSD (%) total del mètode.

La manera de realitzar els càlculs de RSD (%) i desviació estàndard estan explicats en l'apartat de "*Precisió*".

Els càlculs realitzats i els resultats obtinguts són els que es mostren a continuació en les taules Taula 17, Taula 29 (*Annex 3. Repetibilitat de mètode*), Taula 30 (*Annex 3. Repetibilitat de mètode*) i Taula 18.

Taula 17. Repetibilitat del mètode d'SE-2.

Anàlisi	Àrea SE-2	Concentració SE-2
1	0.032	1.1885
2	0.032	1.1885
3	0.031	1.1582
5	0.033	1.2187
6	0.032	1.1885

7	0.030	1.1280	Nº anàlisis (n)	9
8	0.033	1.2187	Mitjana (X_m)	1.1817
9	0.032	1.1885	Desv. est.	0.0294
11	0.031	1.1582	RSD (%) SE-2 (P2)	2.4852%
1	0.092	3.0017		
2	0.091	2.9715		
3	0.093	3.0319		
4	0.092	3.0017		
5	0.093	3.0319		
6	0.093	3.0319		
7	0.091	2.9715		
8	0.088	2.8808	Nº anàlisis (n)	11
9	0.092	3.0017	Mitjana (X_m)	2.9824
10	0.092	3.0017	Desv. est.	0.0545
11	0.088	2.8808	RSD (%) SE-2 (P4)	1.8280%
1	0.683	0.9044		
3	0.690	0.9114		
4	0.694	0.9154		
5	0.687	0.9084		
6	0.694	0.9154		
7	0.684	0.9054	Nº anàlisis (n)	8
8	0.662	0.8834	Mitjana (X_m)	0.9041
9	0.668	0.8894	Desv. est.	0.0118
			RSD (%) SE-2 (P6)	1.3043%
			RSD SE-2 total (%)	5.6175%

Taula 18. Repetibilitat del mètode

	RSD% P2	RSD% P4	RSD% P6	RSD% total
SE-2	2.4852%	1.8280%	1.3043%	5.6175%
Sulfits	13.1201%	7.0388%	6.2926%	26.4514%
Sulfats	2.4379%	1.9539%	1.9895%	6.3813%

❖ Discussió de resultats

Com es pot observar en les taules anteriors hi ha patrons que no s'han considerat a la hora de fer el càlcul de la repetibilitat del mètode. Això és degut a que el cromatògraf no els ha injectat bé. Sabem que no estan ben injectats perquè tot el cromatograma surt reduït. Un exemple d'un patró 6 ben injectat és el que mostra la Figura 25, i un patró 6 mal injectat és el que mostra la Figura 26, tots dos en la mateixa escala de senyal i temps d'anàlisi. Es fa una ampliació de la zona del SE-2 perquè si es mostrés tot el cromatograma no s'apreciaria bé la diferència.

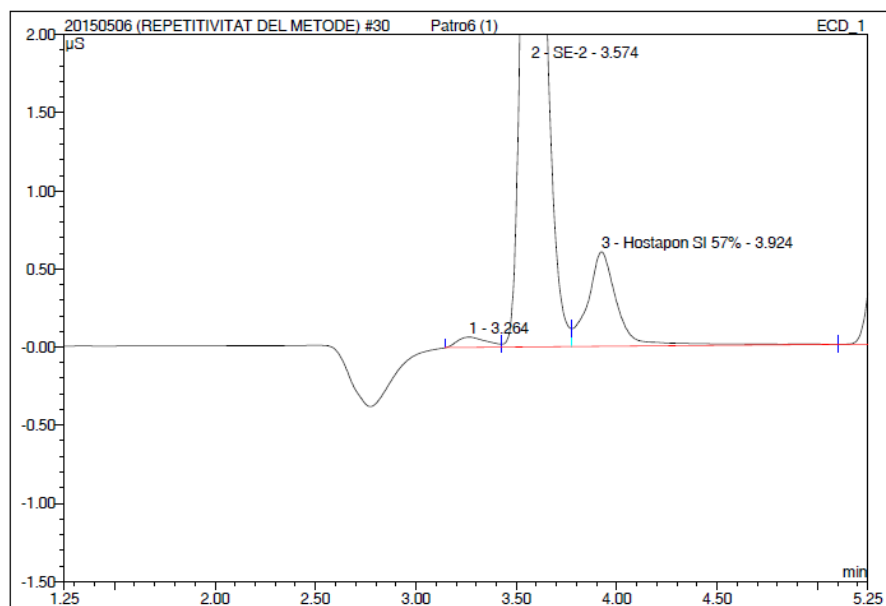


Figura 25. Patró 6 injectat correctament.

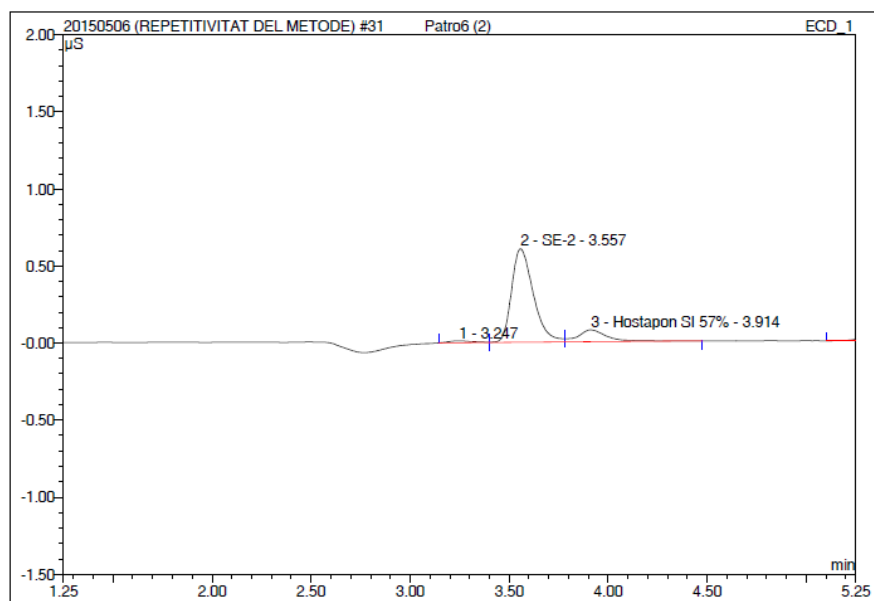


Figura 26. Patró 6 injectat incorrectament.

Per a considerar acceptable el valor de RSD (%) aquest ha de ser igual o inferior a un 5%. En cap dels tres mètodes passa això. Ara bé, en l'SE-2 i els sulfats és lleugerament major que el valor límit, i l'empresa considera que serien acceptables per al que es necessita.

En canvi l'RSD (%) de la repetibilitat del mètode de sulfits és major que un 5%.

Segons aquest resultat, es pot deduir que hi ha problemes amb la repetibilitat del mètode, tot i que la falta de repetibilitat és més important en la determinació dels sulfits, de la mateixa manera que passa amb el la repetibilitat instrumental.

E. Reproductibilitat

Per tal de veure si el mètode és repetitiu entre diferents dies el que fem és analitzar 3 patrons (de concentracions baixes, intermèdies i altes) de la recta de calibratge al llarg de diferents dies.

El procediment seguit cada dia ha estat preparar solució mare de sulfits i sulfats (i SE-2 en cas que fos necessari) i després fer la preparació dels patrons corresponents, patró 2, patró 4 i patró 6. Els càlculs realitzats per a avaluar la precisió intermèdia i els resultats obtinguts es mostren en les taules Taula 19, Taula 29 (Annex 4. Reproductibilitat), Taula 30 (Annex 4. Reproductibilitat) i Taula 20.

Taula 19. Reproductibilitat de l'SE-2

Anàlisi	Àrea SE-2	Concentració SE-2		
1	0.033	1.2187		
2	0.032	1.1885		
3	0.033	1.2187		
4	0.030	1.1280	Nº anàlisis (n)	7
5	0.034	1.2489	Mitjana (X_m)	1.2057
6	0.033	1.2187	Desv. est.	0.0385
7	0.033	1.2187	RSD (%) SE-2 (P2)	3.1892%
1	0.082	2.6995		
2	0.092	3.0017	Nº anàlisis (n)	5
4	0.092	3.0017	Mitjana (X_m)	2.8264
6	0.072	2.3973	Desv. est.	0.2757
7	0.093	3.0319	RSD (%) SE-2 (P4)	9.7528%
1	0.639	19.5322		
2	0.683	20.8619		
3	0.692	21.1339		
4	0.701	21.4059	Nº anàlisis (n)	7
5	0.760	23.1889	Mitjana (X_m)	21.4275
6	0.750	22.8867	Desv. est.	1.2535
7	0.687	20.9828	RSD (%) SE-2 (P6)	5.8501%
			RSD SE-2 total (%)	18.79214%

Taula 20. Reproductibilitat

	RSD% P2	RSD% P4	RSD% P6	RSD% total
SE-2	3.1892%	9.7528%	5.8501%	18.7921%
Sulfits	20.5381%	11.2277%	5.1359%	36.9017%
Sulfats	7.8098%	14.2965%	8.8110%	30.9173%

❖ *Discussió de resultats*

Els valors de l'RSD (%) de la reproductibilitat per a que siguin acceptables han de ser entre 2 i 3 vegades l'RSD (%) de la repetibilitat del mètode.

La reproductibilitat mostrada no compleix aquest requeriment. El valor de la reproductibilitat dels sulfits ja es veu que és molt elevat, tal i com ha passat amb l'RSD(%) de la repetibilitat instrumental i del mètode.

Els valors de RSD(%) de l'SE-2 és unes 4 vegades el valor de l'RSD (%) de la repetibilitat del mètode i en el cas dels sulfats unes 5 vegades.

El fet que la recuperació es faci al llarg de diferents dies comporta que la fase mòbil sigui diferent en cada una de les mesures d'aquest paràmetre. La línia base depèn de la fase mòbil, ja que la supressió sempre és la mateixa, però la composició d'aquesta varia, lleugerament, d'un dia a l'altre. Al llarg dels anàlisis d'un mateix dia s'observa com la línia base augmenta fins a 0.8µS degut a la carbonatació del NaOH. Aquestes diferències amb els valors obtinguts al llarg de dies diferents poden ser degudes a que la línia base no estigui sempre al mateix nivell. Això es podria resoldre, o com a mínim, millorar tenint la fase mòbil pressuritzada amb nitrogen.

D'altra banda també s'ha de tenir en compte el fet de que els pics dels sulfits i els sulfats tenen una forma molt poc definida i per tant, la integració que fa el software pot no ser la millor.

Amb tot això, també s'ha de tenir en compte el fet de que l'equip no sempre injecta bé. Els cromatogrames d'aquestes injeccions dolentes es descarten, però quan no injecta bé no sempre injecta el mateix volum erroni. Per tant, també s'hauria de tenir en compte la possibilitat que algunes injeccions no estiguin ben fetes però que el volum injectat s'apropa molt al correcte i no ha estat possible veure l'error d'injecció, cosa que portaria a donar errors de repetibilitat.

F. *Recuperació*

Per tal d'avaluar la veracitat del mètode s'ha calculat la recuperació. S'ha punxat una mostra i tot seguit la mateixa mostra amb un patró (s'ha triat el patró 5). Restant l'àrea de la mostra a l'àrea de la mostra més patró es podrà saber l'àrea del patró que s'ha posat.

El càlcul de la recuperació es realitza amb la Equació 4.

La concentració real es calcula a partir de les àrees que ha donat el cromatògraf amb la recta de calibratge i la concentració teòrica es calcula a partir dels grams que s'han pesat de solució mare i amb els ppm d'aquesta.

En les Taula 21, Taula 33 (*Annex 5. Recuperació*) i Taula 34 (*Annex 5. Recuperació*) es mostren els càlculs fets per a la determinació de la recuperació i el resultat final d'aquesta per a cada un dels tres mètodes (Taula 22).

Taula 21. Recuperació de l'SE-2

Nº de lot	àrea SE-2 en mostra	àrea SE-2 en mostra+patró	àrea SE-2 en patró	ppm SE-2 reals	ppm SE-2 teòrics	%Recuperació
1_ESD0021890	0.053	0.243	0.190	4937.3965	6083.5362	81.1600%
2_ESD0021961	0.043	0.242	0.199	5584.4186	6077.4868	91.8870%
3_ESD0021975	0.044	0.241	0.197	5665.5306	6012.6177	94.2274%
4_ESD0021991	0.048	0.247	0.199	5741.2748	6121.3538	93.7909%
7_ESD0022074	0.026	0.220	0.194	5835.7831	6209.3866	93.9832%
8_ESD0022339	0.037	0.217	0.180	4603.6601	5824.1960	79.0437%
1_ESD0021890	0.053	0.258	0.205	5981.7991	6039.9874	99.0366%
9_ESD0022108	0.044	0.214	0.170	5116.9895	5620.7487	91.0375%
10_ESD0022114	0.038	0.225	0.187	5766.9611	6020.4199	95.7900%
						91.1063%

Taula 22. Recuperacions del mètode

SE-2	91.1063%
Sulfits	104.3820%
Sulfats	105.1814%

Per avaluar els resultats de la recuperació s'aplica el test t . La $t_{\text{calculada}}$ es calcula tal i com indica la Equació 5. El valor de la t_{tabulada} per 8 graus de llibertat ($n-1$) i dos cues, és 2.30600 tal i com es veu en la taula de la Figura 28 (*Annex 6. Taules de valors tabulats*). Els resultats del test t són els que es mostren en la Taula 23.

 Taula 23. Test t per la recuperació

	n	$t_{\text{calculada}}$	t_{tabulada}
SE-2	9	4.00474 >	2.30600
Sulfits		2.14310 <	
Sulfats		1.76173 <	

❖ Discussió de resultats

Com s'ha explicat en l'apartat de "Veracitat" es considera que la recuperació és bona quan la $t_{\text{calculada}} < t_{\text{tabulada}}$. El primer que s'aprecia és que la recuperació de l'SE-2 no és bona. Això pot venir donat perquè el pic de l'SE-2 no surt del tot ben separat de l'Hostapon SI, i per aquest motiu la integració no és del tot bona.

Respecte a la recuperació dels sulfits i els sulfats el que s'observa és que el test t afirma que la recuperació és bona, però, que surti major del 100% (en la majoria d'anàlisis) indicaria que no és acceptable ja que no hi ha motiu per a que sigui major de 100%.

Aquest fet pot venir donat perquè els pics dels sulfits i els sulfats surten molt aplanats, això comporta que el software tingui més variació a l'hora de determinar el punt inicial i final de la integració.

5. Comparació de mètodes

Per tal de comparar els mètodes tradicionals, per valoració, de sulfits i sulfats amb el nou mètode per cromatografia iònica, el que es fa és comparar els resultats obtinguts amb un mètode i l'altre, per a veure si els resultats són comparables i si es pot substituir un mètode per l'altre. La comparació dels resultats es fa mitjançant un test *t*.

El pla de comparació de mètodes consisteix en agafar 10-12 mostres dels lots més recents del magatzem i analitzar-les pel mètode de cromatografia iònica, i comparar aquests resultats amb els resultats dels plans de control que hi ha disponibles.

Es va començar el pla de comparació de mètodes amb els lots més recent de tots. Els sulfits i els sulfats van ser analitzats pel mètode tradicional en arribar al laboratori de control de qualitat. Posteriorment es va fer l'anàlisi per cromatografia iònica. El resultat va ser que no s'observaven sulfits i en canvi el valor de sulfats era més elevat del que havia donat pel mètode tradicional. Vists aquests resultats es va tornar a analitzar els sulfits i els sulfats de la mostra pel mètode tradicional. El resultat d'aquest darrer anàlisi van ser que els sulfits havien disminuït i els sulfats havien augmentat.

Els resultats que es van obtenir en cada un dels anàlisis són els que es mostren en la Taula 24.

Taula 24. Comparació mètode tradicional i cromatogràfic de sulfits i sulfats

	t=0 h (21h dia 1)	t=19h (16h dia 2)	t=31h (12h dia 3)
	Anàlisi tradicional	Anàlisi cromatogràfic	Anàlisi tradicional
Sulfits	0.06%	-	0.014%
Sulfats	0.21%	0.32%	0.26%
Transformació de sulfits a sulfats	- 0.046%		+0.05%

Es va observar que els sulfits s'oxiden a sulfats molt més ràpid del que es tenia entès.

Després del que s'ha exposat, ja no es pot seguir el pla de comparació de mètodes perquè els resultats que obtindríem no seien comparables degut a la oxidació dels sulfits. El que s'hauria de fer és fer l'anàlisi per cromatografia i repetir l'anàlisi pels mètodes tradicionals. Així s'obtindrien resultats comparables de sulfits i sulfats.

Ja que el temps de treball és limitat no s'han pogut tornar a analitzar les mostres pels mètodes tradicionals.

6. Conclusions

The reason that the instrumental and method repeatability of sulphites have given unsatisfactory results, compared with those of SE-2 and sulphates, is due to the fact that it's the smaller peak and what is more it is flatter. This causes great changes in the integration area with slight variations in the type of integration.

The poor reproducibility results could be because of the variations in the baseline from one day to another. It has been perceived that, during the analyses on the same day, the baseline value increases because of the carbonation of NaOH. Therefore, a way to solve this problem would be to pressure the mobile phase with nitrogen. An expensive solution would be to connect an eluent generator to the chromatograph, in which case the mobile phase would be prepared *in situ* and the carbonation will not affect the results.

Having an eluent generator would make easier to work with gradient which would solve several problems. The chromatogram would start with a mobile phase amount lower than 5 mM until the SE-2 and Hostapon SI eluted. Hence the SE-2 integration would improve. After that, the NaOH amount would be incremented in order to elute sulphites and sulphates in a lower retention time. As a result of that, the peaks would be more definite and easier to integrate.

The fact that the recuperation is not suitable and give unacceptable values could be due to faulty injections. In order to try to restore this problem it will be necessary to have the injector valve checked by a technician. The valve is believed to be the problem because there was nothing left in the vial after the injection, so all the sample ended up in the chromatograph.

After all that has been observed in the validation it can be said that there is no tendency to say that the method (implementing the correct optimizations) will not be useful to determine the SE-2 and sulphates, depending on the grade of optimization, to determinate the sulphites.

7. Annexes

Annex 1. Linealitat del mètode (recta de calibratge)

Taules dels càlculs per al gràfic de residuals dels sulfits i els sulfats en l'apartat “Linealitat del mètode (recta de calibratge)”.

Taula 25. Càlcul de residuals pels sulfits.

Patrons Sulfits	Concentració	Àrea Sulfits ($\mu\text{S} \cdot \text{min}$)	Àrea predita Sulfits	Resposta-Predita
2	0,3400	0,007	0,0061	0,0009
3	0,5912	0,018	0,0163	0,0017
4	1,0008	0,029	0,0329	-0,0039
5	1,4697	0,048	0,0519	-0,0039
6	1,9896	0,08	0,0730	0,0070
2	0,2670	0,004	0,0031	0,0009
3	0,6583	0,019	0,0190	0,0000
4	1,0101	0,033	0,0333	-0,0003
5	1,5164	0,054	0,0538	0,0002
6	1,9813	0,071	0,0727	-0,0017
2	0,2853	0,004	0,0039	0,0001
4	1,0168	0,033	0,0335	-0,0005
5	1,5736	0,058	0,0562	0,0018
6	2,0697	0,074	0,0763	-0,0023

Taula 26. Càlcul de residuals pels sulfats.

Patrons Sulfats	Concentració	Àrea Sulfats ($\mu\text{S} \cdot \text{min}$)	Àrea predita Sulfats	Resposta-Predita
1	2,0583	0,203	0,2125	-0,0095
2	3,1004	0,313	0,3228	-0,0098
3	3,9696	0,396	0,4148	-0,0188
4	5,1245	0,538	0,5371	0,0009
5	5,9232	0,619	0,6216	-0,0026
6	7,1455	0,724	0,7510	-0,0270
1	2,0108	0,222	0,2075	0,0145
2	3,0774	0,313	0,3204	-0,0074
3	4,2127	0,432	0,4405	-0,0085
4	5,0844	0,544	0,5328	0,0112
5	6,1655	0,645	0,6472	-0,0022
6	7,0776	0,760	0,7438	0,0162
1	2,1124	0,217	0,2182	-0,0012
2	3,0337	0,348	0,3158	0,0322

4	5,2952	0,548	0,5551	-0,0071
5	6,2824	0,658	0,6596	-0,0016
6	7,3371	0,792	0,7712	0,0208

Annex 2. Repetibilitat instrumental

Taules dels càlculs de la repetibilitat instrumental dels sulfits i els sulfats en l'apartat "Repetibilitat instrumental".

Taula 27. Repetibilitat instrumental dels sulfits

Anàlisi	Àrea Sulfits	$(X_i - X_m)$	$(X_i - X_m)^2$	
1	0.036	-0.0041	1.67E-05	
2	0.039	-0.0011	1.19E-06	
3	0.046	0.0059	3.49E-05	
4	0.039	-0.0011	1.19E-06	
5	0.040	-0.0001	8.26E-09	
6	0.040	-0.0001	8.26E-09	
7	0.037	-0.0031	9.55E-06	
8	0.042	0.0019	3.64E-06	Nº anàlisis (n) 11
9	0.043	0.0029	8.46E-06	Mitjana (X_m) 0.0401
10	0.038	-0.0021	4.37E-06	Desv. est. 0.0028
12	0.041	0.0009	8.26E-07	RSD (%) Sulfits 7.0950%

Taula 28. Repetibilitat instrumental dels sulfats

Anàlisi	Àrea Sulfats	$(X_i - X_m)$	$(X_i - X_m)^2$	
1	0.593	-0.0021	4.34E-06	
2	0.587	-0.0081	6.53E-05	
3	0.591	-0.0041	1.67E-05	
4	0.599	0.0039	1.53E-05	
5	0.602	0.0069	4.78E-05	
6	0.599	0.0039	1.53E-05	
7	0.596	0.0009	8.40E-07	
8	0.590	-0.0051	2.58E-05	
9	0.591	-0.0041	1.67E-05	Nº anàlisis (n) 12
10	0.592	-0.0031	9.51E-06	Mitjana (X_m) 0.5951
11	0.602	0.0069	4.78E-05	Desv. est. 0.0051
12	0.599	0.0039	1.53E-05	RSD (%) Sulfats 0.8492%

Annex 3. Repetibilitat de mètode

Taules dels càlculs de la repetibilitat del mètode dels sulfits i els sulfats en l'apartat "Repetibilitat del mètode".

Taula 29. Repetibilitat del mètode de sulfits

Anàlisi	Àrea Sulfits	Concentració Sulfits		
1	0.002	0.2240		
2	0.005	0.3005		
3	0.005	0.3005	Nº anàlisis (n)	6
5	0.003	0.2495	Mitjana (X_m)	0.2750
8	0.005	0.3005	Desv. est.	0.0361
11	0.005	0.3005	RSD (%) Sulfits (P2)	13.1201%
1	0.034	1.0404		
2	0.031	0.9638		
3	0.032	0.9894		
4	0.031	0.9638		
5	0.035	1.0659		
6	0.030	0.9383		
7	0.037	1.1169		
8	0.031	0.9638	Nº anàlisis (n)	11
9	0.030	0.9383	Mitjana (X_m)	1.0051
10	0.030	0.9383	Desv. est.	0.0707
11	0.038	1.1424	RSD (%) Sulfits (P4)	7.0388%
1	0.081	2.2395		
4	0.084	2.3160		
5	0.089	2.4436		
6	0.080	2.2140	Nº anàlisis (n)	7
7	0.082	2.2650	Mitjana (X_m)	2.2670
8	0.089	2.4436	Desv. est.	0.1426
9	0.080	2.2140	RSD (%) Sulfits (P6)	6.2926%
			RSD Sulfits total (%)	26.4514%

Taula 30. Repetibilitat dem mètode de sulfats.

Anàlisi	Àrea Sulfats	Concentració Sulfats		
1	0.316	3.0718		
2	0.312	3.0344		
3	0.336	3.2589		
5	0.318	3.0905		
6	0.320	3.1092		
7	0.312	3.0344	Nº anàlisis (n)	9

8	0.317	3.0812	Mitjana (X_m)	3.0721
9	0.309	3.0063	Desv. est.	0.0749
11	0.312	3.0344	RSD (%) Sulfats (P2)	2.4379%
1	0.537	5.1391		
2	0.547	5.2327		
3	0.526	5.0362		
4	0.542	5.1859		
5	0.537	5.1391		
6	0.536	5.1298		
7	0.524	5.0175		
8	0.542	5.1859	Nº anàlisis (n)	11
9	0.554	5.2981	Mitjana (X_m)	5.1455
10	0.554	5.2981	Desv. est.	0.1005
11	0.531	5.0830	RSD (%) Sulfats (P4)	1.9539%
1	0.766	7.2813		
3	0.782	7.4309		
4	0.774	7.3561		
5	0.753	7.1597		
6	0.757	7.1971		
7	0.776	7.3748	Nº anàlisis (n)	8
8	0.760	7.2251	Mitjana (X_m)	7.2323
9	0.743	7.0661	Desv. est.	0.1439
			RSD (%) Sulfats (P6)	1.9895%
			RSD Sulfits total (%)	6.3813%

Annex 4. Reproductibilitat

Taules dels càlculs de la reproductibilitat dels sulfits i els sulfats en l'apartat "Reproductibilitat".

Taula 31. Reproductibilitat dels sulfits

Anàlisi	Àrea Sulfits	Concentració Sulfits		
1	0.007	0.3655		
2	0.002	0.2379		
3	0.007	0.3655		
5	0.003	0.2634		
7	0.003	0.2634		
1	0.029	0.9268	Nº anàlisis (n)	5
2	0.034	1.0543	Mitjana (X_m)	1.0288
4	0.039	1.1819	Desv. est.	0.1155
6	0.028	0.9013	RSD (%) Sulfits (P4)	11.2277%
7	0.035	1.0799		
1	0.080	2.2279		

2	0.081	2.2534	Nº anàlisis (n)7 Mitjana (X_m)2.3300 Desv. est.0.1197 RSD (%) Sulfits (P6)5.1359% RSD Sulfits total (%)36.9017%
3	0.088	2.4320	
4	0.088	2.4320	
5	0.085	2.3555	
6	0.077	2.1514	
7	0.089	2.4575	

Taula 32. Reproductibilitat dels sulfats

Anàlisi	Àrea Sulfats	Concentració Sulfats		
1	0.313	3.0438		
2	0.316	3.0718		
3	0.364	3.5208		
4	0.375	3.6237	Nº anàlisis (n)	7
5	0.349	3.3805	Mitjana (X _m)	3.3337
6	0.373	3.6050	Desv. est.	0.2604
7	0.318	3.0905	RSD (%) Sulfats (P2)	7.8098%
1	0.538	5.1485		
2	0.537	5.1391	Nº anàlisis (n)	5
4	0.633	6.0371	Mitjana (X _m)	5.0905
6	0.414	3.9885	Desv. est.	0.7278
7	0.537	5.1391	RSD (%) Sulfats (P4)	14.2965%
1	0.724	6.8884		
2	0.766	7.2813		
3	0.867	8.2260		
4	0.879	8.3383	Nº anàlisis (n)	7
5	0.851	8.0764	Mitjana (X _m)	7.8078
6	0.916	8.6844	Desv. est.	0.6879
7	0.753	7.1597	RSD (%) Sulfats (P6)	8.8110%
			RSD Sulfats total (%)	30.9173%

Annex 5. Recuperació

Taules dels càlculs de la recuperació dels sulfits i els sulfats en l'apartat "Recuperació".

Taula 33. Recuperació sulfits

Nº de lot	àrea Sulfits en mostra	àrea Sulfits en mostra+patró	àrea Sulfits en patró	ppm Sulfits reals	ppm Sulfits teòrics	%Recuperació
1_ESD0021890	0.00	0.064	0.064	1490.7018	1498.0256	99.5111%
2_ESD0021961	0.00	0.070	0.070	1749.9637	1544.6206	113.2941%
3_ESD0021975	0.00	0.063	0.063	1629.0079	1489.1638	109.3908%

4_ESD0021991	0.00	0.061	0.061	1587.8176	1534.3886	103.4821%
7_ESD0022074	0.00	0.054	0.054	1482.9236	1532.6186	96.7575%
8_ESD0022339	0.00	0.065	0.065	1484.8075	1458.9190	101.7745%
1_ESD0021890	0.00	0.055	0.055	1464.9394	1504.0782	97.3978%
9_ESD0022108	0.00	0.059	0.059	1598.0418	1428.8120	111.8441%
10_ESD0022114	0.00	0.060	0.060	1668.6505	1574.4109	105.9857%
						104.3820%

Taula 34. Recuperació sulfats

Nº de lot	àrea Sulfats en mostra	àrea Sulfats en mostra+patró	àrea Sulfats en patró	ppm Sulfats reals	ppm Sulfats teòrics	%Recuperació
1_ESD0021890	0.137	0.849	0.712	5610.4061	6121.5374	91.6503%
2_ESD0021961	0.135	0.857	0.722	6152.6041	6051.1311	101.6769%
3_ESD0021975	0.106	0.851	0.745	6500.4711	6151.0179	105.6812%
4_ESD0021991	0.136	0.893	0.757	6626.8825	6160.0995	107.5775%
7_ESD0022074	0.226	0.963	0.737	6723.8101	6089.2050	110.4218%
8_ESD0022339	0.330	1.069	0.739	5715.8243	5798.7995	98.5691%
1_ESD0021890	0.133	1.015	0.882	7799.4571	6306.2704	123.6778%
9_ESD0022108	0.149	0.796	0.647	5889.6878	5755.5137	102.3312%
10_ESD0022114	0.135	0.802	0.667	6240.8421	5940.9958	105.0471%
						105.1814%

Annex 6. Taules de valors tabulats

Taules dels valors tabulats per als testos de Q de Dixon en l'apartat "Linealitat" i el de *t* de Student en l'apartat "Veracitat".

TABLE 5.5
Critical *Q*-values for testing outliers (extracted from a more extensive table by Beyer [6])

<i>n</i>		One-sided α		Two-sided α	
		0.05	0.01	0.05	0.01
3	Q_{10}	0.941	0.988	0.970	0.994
4		0.765	0.889	0.829	0.926
5		0.642	0.780	0.710	0.821
6		0.560	0.698	0.628	0.740
7		0.507	0.637	0.569	0.680
8	Q_{11}	0.554	0.683	0.608	0.717
9		0.512	0.635	0.564	0.672
10		0.477	0.597	0.530	0.635
11		0.450	0.566	0.502	0.605
12		0.428	0.541	0.479	0.579
13	Q_{22}	0.570	0.670	0.611	0.697
14		0.546	0.641	0.586	0.670
15		0.525	0.616	0.565	0.647

Figura 27. Taules de valors tabulat de la Q de Dixon.

Tabla A.2. La distribución t .

Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de $ t $ para valores de P de número de grados de libertad	90%	95%	98%	99%
	0.10	0.05	0.02	0.01
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Figura 28. Taula de la t_{tabulada} per al test t .

8. Bibliografia

- [1] Weiss, J. *Handbook of Ion Chromatography*, Third, Completely Revised and Enlarged Edition; Wiley-VCH: Federal Republic of Germany, 2004, Vol. I; pp 1-275.
- [2] Eith, C.; Kolb, M.; Rumi, A.; Seubert, A.; Viehweger, K. H. *Practical Ion Chromatography, An Introduction*; Technical Report for Metrohm Monograph: Herisau, 2009.
- [3] *Guía General de Cromatografía Iónica*; Technical Report for Vertex Technics: Barcelona, September 2009.
- [4] *A Practical Guide to Ion Chromatography, An introduction and troubleshooting manual*; Technical Report for SeQuant AB: Sweden, March 2007.
- [5] Pohl, C. A.; Stillian, J. R.; Jackson, P. E. Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1997, 789, 29-41.
- [6] *IonPac AS18 Anion-Exchange Column*; Technical Report for DIONEX Corporation; Columns.
- [7] Rius, F. X.; Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J. La validación de métodos analíticos. *Artículos de divulgación*, May 18, 2015.
- [8] Duffau, B.; Rojas, F.; Guerrero, I.; Roa, L.; Rodríguez, L.; Soto, M.; Aguilera M.; Sandoval, S. *Aspectos generales sobre la validación de métodos*; Instituto de salud pública de Chile; Sección Meteorología Ambiental y de Alimentos del Departamento de Salud Ambiental: Santiago de Chile, 2010.
- [9] Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J.; Cmeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Third edition; Elsevier: Amsterdam, 2003; Part A.
- [10] Boqué, R.; Heyden, Y. V. The limit of detection. *LC-GC Europe*. February 2008.
- [11] Campañó, R.; Ríos, A. *Garantía de la calidad en los Laboratorios analíticos*; Editorial Síntesis: Madrid.
- [12] Miller, J.C.; Miller J. *Statistics and Chemometrics of Analytical Chemistry*, Sixth edition; Pearson Education: Englewood Cliffs, NJ, 2005.
- [13] *Product Manual for Dionex IonPac AS18 Fast*; Technical report for Thermo Scientific, June 2012.
- [14] *Product Manual for Dionex IonPac AS9-HC*; Technical report for Thermo Scientific, 2014.
- [15] PubChem. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed May 22, 2015).
- [16] Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. <http://www.insht.es/portal/site/Insht/> (accessed May 22, 2015).