

Daniel Fernández Linares

**DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE ANALÍTIC PER HPLC-DAD PER LA
DETERMINACIÓ D'ESQUALÈ EN MOSTRES DE DOD**

TREBALL DE FI DE GRAU

dirigit per el Dr. José Javier Ruiz Martí

Grau de Química



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2017

ABSTRACT

Clariant has just started a project in order to create a new plant, which will produce squalene. Squalene is a compound which demand is increasing in recent years in the cosmetics industry. Because it is considered to have interesting properties as anti-aging effect, hydration, and so on.

The aim of this project is to develop a method to determinate the squalene's content in the raw material samples by liquid chromatography (HPLC-DAD). The raw material from which squalene is obtained is DOD, a byproduct obtained during the stages of refining olive oil process.

We took a reference method as a starting point to begin to make the first tests. Some parameters were modified in order to find the right chromatographic conditions. Once the optimal conditions were found, it was created a calibration curve with the purpose to quantify the future sample that will be analyzed. The results were compared with another method (GC-FID) which was developed at the same time that this to know if the results were comparable. Finally, some statistical parameters were studied to validate the method.

RESUM

Clariant ha iniciat un projecte per a la construcció d'una nova planta de producció d'esqualè, un compost d'origen natural, la demanda del qual ha augmentat considerablement al llarg dels últims anys dintre del món de la cosmètica, degut a les seves propietats antioxidants i hidratants, entre d'altres.

El següent treball té com a objectiu el desenvolupament d'un mètode analític per cromatografia de líquids (HPLC-DAD), amb el que es pugui determinar el contingut d'esqualè present en la matèria prima a partir de la qual s'iniciarà el procés. Aquesta matèria prima s'anomena DOD, un subproducte que s'obté durant les etapes de refinament de l'oli d'oliva.

Es va prendre un mètode de referència com a punt de partida per començar a fer les primeres proves, i es van anar modificant diversos paràmetres per tal de trobar les condicions cromatogràfiques idònies que s'adaptessin a les necessitats. Un cop determinades les condicions òptimes del mètode, es va realitzar una recta de calibratge amb patrons per poder quantificar les futures mostres. Els resultats obtinguts es van poder comparar amb un altre mètode cromatogràfic (GC-FID) que es va desenvolupar paral·lelament a aquest, per comprovar si els resultats obtinguts eren comparables. Finalment, es van estudiar alguns paràmetres estadístics per tal de validar el mètode.

ÍNDIX DE CONTINGUTS

I. ÍNDIX DE FIGURES I TAULES.....	4
II. ABREVIATURES.....	5
1. INTRODUCCIÓ	6
1.1. Presentació de l'empresa col·laboradora	6
1.2. Esqualè. Característiques i propietats	7
2. OBJECTIU	9
2.1. Punt de partida	9
3. ANTECEDENTS	10
3.1. Principi de la cromatografia de líquids	10
3.2. Fonament del detector de díodes en fila (DAD)	11
4. METODOLOGIA I PLA DE TREBALL	12
4.1. Posada a punt del cromatògraf	12
5. PART EXPERIMENTAL. DESENVOLUPAMENT DEL MÈTODE	13
5.1. Material i reactius	13
5.2. Desenvolupament de les condicions cromatogràfiques del mètode	14
5.2.1 Optimització de la fase mòbil.....	15
5.2.1.1. Estudi de la repetibilitat en la integració.....	17
5.2.1.1.1. Càlcul d' <i>outliers</i>	19
5.2.2. Identificació de pics.....	19
5.3. Pretractament de la mostra.....	20
5.4. Recta de calibratge	22
5.4.1. Linealitat instrumental.....	22
6. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT D'ESQUALÈ EN UNA MOSTRA PROBLEMA	26
6.1. Comparació dels resultats amb un altre mètode	27
6.1.1. ANOVA d'un factor	28
7. PARÀMETRES DE VALIDACIÓ DEL MÈTODE	31
7.1. Repetibilitat.....	31
7.1.1. Repetibilitat instrumental	31
7.1.2. Repetibilitat del mètode	32
7.2. Precisió intermèdia.....	33
8. CONCLUSIONS	35
9. BIBLIOGRAFIA.....	36

I. ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

Figura 1. Estructura molecular de l'esqualè ($C_{30}H_{50}$).

Figura 2. Esquema de les parts del detector DAD.

Figura 3. Equip amb el que s'ha desenvolupat el mètode per HPLC.

Figures 4 i 5. A l'esquerra el cromatograma d'una mostra de DOD, a la dreta l'ampliació dels pics.

Figures 6 i 7. A l'esquerra el cromatograma d'una mostra sense cristal·litzar. A la dreta el cromatograma d'una mostra cristal·litzada.

Figura 8. Recta de calibratge obtinguda amb els set nivells de concentracions.

Figura 9. Representació del gràfic de residuals de la recta de calibratge.

Taula 1. Propietats de l'esqualè.

Taula 2. Paràmetres del mètode de referència.

Taula 3. Característiques del cromatògraf amb el que s'ha treballat.

Taula 4. Reactius i material que s'han utilitzat al llarg del treball.

Taula 5. Condicions cromatogràfiques del mètode de referència.

Taula 6. Estudi de la repetibilitat en la integració automàtica realitzada pel software.

Taula 7. Resultats de la recuperació després de realitzar el pretractament.

Tabla 8. Quantitats utilitzades per la preparació dels patrons de la recta de calibratge.

Taula 9. Contingut d'esqualè en diferents mostres de DOD.

Taula 10. Comparació dels resultats de percentatge (%) total d'esqualè entre els dos mètodes.

Taula 11. Resultats de l'anàlisi d'esqualè en la mateixa mostra de DOD, per dos mètodes independents (HPLC i GC).

Taula 12. Taula ANOVA creada a partir d'un full de càlcul Excel per als resultats de la taula 11.

Taula 13. Mateixa mostra, mateix dia. Repetibilitat instrument.

Taula 14. Diferents mostres, mateix dia. Repetibilitat del mètode.

Taula 15. Resultats de les rèpliques al llarg dels 6 dies.

Taula 16. Resultats de l'ANOVA per determinar la precisió intermèdia.

II. ABREVIATURES

AMPS: Sulfonat de 2-acrilamida-2-metilpropà.

ANOVA: Anàlisi de la variància (Analysis of Variance).

DAD: Detector de díodes en fila (Diode-Array Detector).

DOD: destil·lat desodoritzat de l'oli vegetal (Deodorizer Oil Distillate).

FID: Detector d'ionització de flama (Flame Ionization Detector).

GC: Cromatografia de gasos (Gas Chromatography).

HPLC: Cromatografia de líquids d'alta eficàcia (High-Performance Liquid Chromatography).

ICH: Conferència internacional sobre l'harmonització (International Conference on Harmonisation).

IUPAC: Unió Internacional de Química Pura i Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry).

MPP: Planta multi propòsits (Multi Propose Plant)

MS: Espectroscòpia de masses (Mass Spectrometry)

RSD: Desviació estàndard relativa (Relative Standard Deviation)

SQE: Esqualè (Squalene)

UV-Vis: Espectroscòpia Ultraviolada-Visible (Ultra Violet Visible Spectroscopy).

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Presentació de l'empresa col·laboradora

Aquest treball de fi de grau ha estat realitzat al laboratori de planta del Departament de Control de Qualitat de l'empresa química Clariant Ibérica Producción S.A. (Tarragona), situada al complex petroquímic de la Canonja, a l'autovia Tarragona-Salou.^[1]

La seu oficial de Clariant es troba a Muttenz (Suïssa), a prop de la capital, Basilea. Al llarg dels darrers anys aquesta empresa ha crescut considerablement i actualment existeixen diferents plantes distribuïdes per tots els continents. Aquesta empresa destaca en el camp d'especialitats químiques, compostos amb un alt valor afegit.

Clariant neix el 1995 després de produir-se la divisió dintre de la companyia química Sandoz (1886 – Basilea). Les primeres expansions de l'empresa es van produir el 1997 a partir de la incorporació al negoci dels químics especialistes, a Hoechst (Alemanya), les adquisicions de BTP plc (Regne Unit) el 2000, i la divisió Masterbatches de Ciba el 2006. El 2008 va adquirir el proveïdor líder de colorants dels Estats Units Rite Systems and Ricon Colors. La darrera gran adquisició va ser a l'abril de 2011 amb la compra de la companyia Süd-Chemie (Alemanya), altament innovadora en química especial. A Espanya, es troben centres de producció a Tarragona, El Prat de Llobregat, Castellbisbal, Sant Andreu de la Barca, Yuncos (Toledo) i Artziniega (País Basc), on es produeixen diferents productes en cadascun d'ells.

Clariant Tarragona, es divideix en tres plantes de producció: planta ETHOX, planta MPP (Multi-Propòsits) i planta AMPS.

La planta ETHOX parteix de l'òxid d'etilè i de l'òxid de propilè com a principals matèries primes, i s'encarrega de produir productes derivats d'aquets compostos. Es duen a terme diferents reaccions mitjançant alcohols, àcids i amines, principalment, per a produir els productes desitjats.

La planta MPP, rep aquest nom per estar destinada a la producció de múltiples productes (Multi Propose Plant), amb aplicacions en diferents sectors, com ara la mineria, additius per la indústria del petroli (extracció i refinament), fitosanitaris, sabons i cosmètica, entre d'altres.

Finalment, la planta AMPS (anomenada així pel monòmer principal que es fa servir a la reacció, el sulfonat de 2-acrilamida-2-metilpropà) està destinada majoritàriament a la producció de productes amb finalitats cosmètiques.

Clariant Tarragona té en marxa un projecte de construcció d'una nova planta d'obtenció d'esqualè. Aquest producte, en els darrers anys, està agafant molta importància en el món de la cosmètica per les seves propietats antioxidants, utilitzant-se en moltes cremes "anti-edat". Per aquest motiu Clariant vol entrar a ser un competidor en el mercat d'aquest producte.

La matèria primera de la qual s'extreu l'esqualè és l'oli d'oliva, concretament el DOD (destil·lat desodoritzat de l'oli vegetal), un subproducte del refinat d'aquest oli. En funció de la qualitat de l'oliva, de la seva procedència, i del tipus de refinat, aquest DOD tindrà una major o menor riquesa en esqualè, per tant, interessarà que el DOD que s'utilitzi tingui la màxima concentració d'esqualè possible. Existeix un gran nombre de subministradors d'aquesta matèria primera, pel que serà important conèixer bé quines característiques i propietats del producte proporciona cadascun. És per això, que a banda de tot el projecte d'enginyeria que requereix la construcció d'una nova planta, també cal tenir molt ben definits totes les anàlisis químiques que es faran durant el procés. Unes de les moltes anàlisis que es duran a terme serà el de caracteritzar la matèria primera, i saber quina riquesa d'esqualè conté.

1.2. Esqualè. Característiques i propietats

L'esqualè és un hidrocarbur alifàtic de fórmula molecular ($C_{30}H_{50}$) amb sis insaturacions, tal i com es representa a la **Figura 1**. Segons la IUPAC, el nom sistemàtic que fa referència a la seva nomenclatura oficial és 2,6,10,14,18,22-tetracosahexè.^[2]

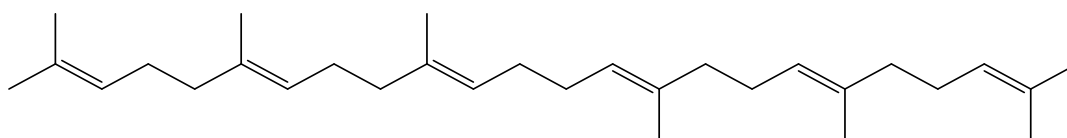


Figura 1. Estructura molecular de l'esqualè ($C_{30}H_{50}$)

Les seves principals propietats es troben resumides en la **Taula 1**:

Taula 1. Propietats de l'esqualè

Pes Molecular	422.81 g·mol ⁻¹
Aparença	Líquid translúcid, groc pàl·lid
Densitat	0.858 g/cm ³
T^a Punt de fusió	-5°C (268K)
T^a Punt ebullició	285°C (558K)
T^a Punt inflamabilitat	110°C (383K)
T^a Autodescomposició	245°C (518K)
Viscositat	12 cP (a 20°C)

L'oli d'oliva és la principal font d'origen vegetal d'on s'extreu l'esqualè, a partir dels destil·lats del seu refinament, el DOD. L'esqualè forma part de la fracció insaponificable de l'oli, juntament amb esterols, altres hidrocarburs terpènics, compostos fenòlics i flavonoides, compostos volàtils (responsables de l'aroma de l'oli) o pigments, entre d'altres. Aquesta fracció insaponificable és molt minoritària, ja que a l'oli d'oliva solament es pot trobar al voltant d'un 0,5% – 1,5%. L'esqualè, però, és el principal constituent de la fracció insaponificable podent arribar fins al 40% del pes total. La fracció majoritària d'aquests olis s'anomena fracció saponificable, i es on s'hi troben els tri i diglicèrids, alcohols terpènics i altres àcids grassos lliures, com a compostos majoritaris. S'ha demostrat que l'oli d'oliva conté molta més quantitat d'esqualè que altres tipus d'olis vegetals, tot i que també existeix una font d'origen animal de la qual es podria extreure l'esqualè, es tracta d'un oli característic present al fetge dels taurons.^[3]

L'esqualè s'utilitza en diversos camps d'aplicació. Per una banda, és un producte de gran interès en la investigació bioquímica i farmacèutica ja que és el precursor natural de la biosíntesis del colesterol "*in vivo*". També destaca en el sector cosmètic on s'utilitza com agent emulsionant o hidratant en cremes "anti-edat". Sembla que actua com a recol·lector de radicals d'oxigen, protegint d'aquesta manera la pell de la peroxidació lipídica deguda a l'exposició a raigs UV i a altres fonts de radiacions ionitzants. En el camp mèdic s'utilitza com a vehicle per als principis actius, i

recentment s'ha estudiat que pot tenir propietats quimiopreventives contra alguns tipus de càncer. [4]

2. OBJECTIU

L'objectiu d'aquest treball és desenvolupar un mètode analític per a la determinació d'esqualè en mostres de DOD mitjançant la cromatografia de líquids amb detecció per DAD. Una vegada s'hagi desenvolupat el mètode, es realitzarà la validació mitjançant tots els paràmetres analítics i estadístics necessaris.

2.1. Punt de partida

El punt de partida d'aquest treball, com s'ha comentat anteriorment, sorgeix de la necessitat de tenir a punt totes les anàlisis abans de que es posi en marxa la nova planta.

Per tal de començar a realitzar les primeres proves, es va prendre com a referència un mètode en el que es determina esqualè directament de l'oli d'oliva.^[5] Els paràmetres d'aquest mètode es troben resumits en la **Taula 2**. L'equip amb el qual s'ha treballat en aquest article és un equip d'HPLC com el del laboratori de Clariant, tot i que la columna que s'utilitza és diferent.

Taula 2. Paràmetres del mètode de referència

Equip	Agilent 1220 Infinity
Columna	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C 18, 4.6x250 mm, 5 µm
Flux	1 mL/min
Solvent fase mòbil	Acetonitril:Acetona (60:40)
Volum Injecció	1-10 µL
Temperatura	30°C

A partir d'aquest mètode de referència, es van reproduir les mateixes condicions al nostre equip, però en aquest cas utilitzant una mostra de DOD. Amb aquestes condicions els cromatogrames obtinguts no eren bons ja que la resolució dels pics no estava optimitzada. A més, el pic d'esqualè se sortia d'escala, per la qual cosa seria impossible, en aquestes condicions, quantificar-lo.

Una vegada realitzada aquesta prova, ja es van poder extreure algunes conclusions qualitatives a partir de les quals ens van permetre tenir una base per a començar a realitzar noves proves i posar en marxa el desenvolupament del nou mètode al laboratori.

3. ANTECEDENTS

3.1. Principi de la cromatografia de líquids

La cromatografia de líquids és una tècnica que permet separar físicament els diferents components d'una solució gràcies a l'adsorció selectiva dels constituents d'una mescla. Aquesta separació és possible gràcies als equilibris que duen a terme els components de la solució entre dues fases, la fase estacionària (fixa) i la fase mòbil (flux). El fonament es basa en que els components de la mescla, al passar per la fase estacionària (columna), formen diferents equilibris i s'hi adsorbeixen amb més o menys força segons les propietats de cada component i la seva polaritat. Al fer passar la fase mòbil per la columna, els compostos que tinguin més afinitat per aquesta fase se separaran, i avançaran juntament amb el flux d'aquesta fase mòbil, mentre que els que tinguin menys afinitat per aquesta fase seguiran retinguts a la fase estacionària i per tant trigaran més en sortir, aconseguint així separar tots els components de la mostra.

3.2. Fonament del detector de díodes en fila (DAD)

El detector de díodes en fila (DAD) és un tipus de detector molt utilitzat en la cromatografia líquida. En la **Figura 2** es mostra un esquema del seu fonament. El principi es basa en que una làmpada de tungstè emet llum en el rang del visible i entra a la làmpada de deuteri, on s'hi afegeix llum UV. D'aquesta forma, hi haurà un feix de UV-visible. Aquest feix de llum policromàtic passa per la cèl·lula de flux. La reixeta divideix el feix policromàtic a diferents longituds d'ona, les intensitats de les quals es mesuren mitjançant una matriu o fotodíodes. Es mesuren simultàniament totes les longituds d'ona disponibles, per tant, es poden adquirir espectres múltiples de longituds d'ona individuals al mateix temps.

Les principals avantatges del DAD són:

- La làmpada de tungstè ofereix una gamma de longitud d'ona visible molt estesa.
- La unitat òptica del DAD es controlada per la temperatura per oferir una qualitat òptima del senyal.
- El DAD no necessita un díode de referència.

El DAD utilitza una longitud d'ona de referència on no es produeix absorció durant la mesura cromatogràfica completa. Els canvis relatius de la intensitat de referència s'utilitzen per corregir els canvis proporcionals d'altres longituds d'ona.

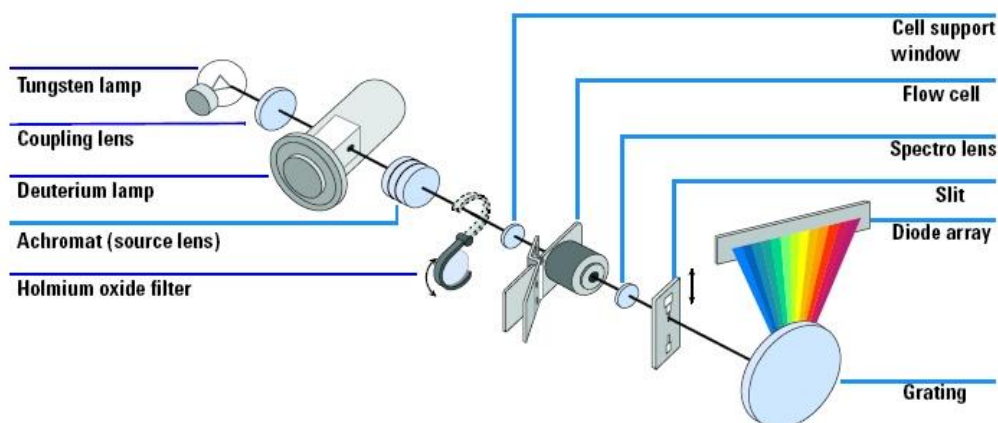


Figura 2. Esquema de les parts del detector DAD. (Font: Agilent Technologies. (2017). *The DAD and MWD principle*. Recuperat el 04/04/2017, de URL: http://www.team-cag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/detectors/dadPrinciple.html)

4. METODOLOGIA I PLA DE TREBALL

Degut a que el cromatògraf era nou i ningú l'havia utilitzat fins aleshores, els primers dies van estar enfocats a aprendre com funcionava l'equip, per a posteriorment poder començar a realitzar les primeres proves. La segona part del treball ja va consistir en desenvolupar el mètode.

4.1. Posada a punt del cromatògraf

Les especificacions del cromatògraf amb el qual es va realitzar el treball i que es pot veure a la **Figura 3** es troben resumides en la **Taula 3**.

Taula 3. Característiques del cromatògraf amb el que s'ha treballat

Equip:	LC DAD Agilent 1220 infinity II
Columna:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 4.6 x 100 mm, 2.7 µm (apolar)
Injector:	Injecció automàtica (Autosampler)
Detector:	Diode Array Detector (DAD)
Software:	OpenLAB CDS Chem Station Edition



Figura 3. Equip amb el que s'ha desenvolupat el mètode per HPLC







Aquest cromatògraf havia estat instal·lat recentment al laboratori, i únicament havia estat utilitzat pel tècnic d'Agilent que el va instal·lar, per tant va ser necessari familiaritzar-se i aprendre com funcionava l'equip. A més, la versió de software que portava incorporat estava actualitzada respecte a la resta de cromatògrafs Agilent del laboratori i amb els que s'havia pogut treballar amb anterioritat. Durant aquets dies es va fer us dels diferents manuals que venien incorporats amb l'equip.^{[6][7]}

5. PART EXPERIMENTAL. DESENVOLUPAMENT DEL MÈTODE

5.1. Material i reactius

En la **Taula 4** es mostren els solvents, patrons i material que s'han utilitzat durant la realització del treball. S'ha obviat introduir a la taula l'equip utilitzat, ja que les seves característiques es troben resumides en la **Taula 3** de l'apartat 3.1.

Taula 4. Reactius i material que s'han utilitzat al llarg del treball

Solvents	Acetona grau HPLC $\geq 99.9\%$ (Ref. 9017 Baker)	 
	Acetonitril grau HPLC $\geq 99.9\%$ (Ref. 8003 Baker)	 
Patrons	Esqualè $\geq 98\%$ (Ref. B20944 Alfa Aesar)	No perillós
	Oleat de Metil, 96% (Ref. H31358 Alfa Aesar)	
	Oleat d'Etil, 98% (Ref. 41029 Acros Organics)	
Material	<ul style="list-style-type: none"> - Balança analítica (precisió 0.1 mg). - Kit de filtració pel solvent, amb filtres PTFE de 0.45 μm. - Filtres de xeringa PTFE 0.45 μm. - Micropipeta automàtica de 100-1000 μL. - Vials de cromatografia de 2 mL. 	

5.2. Desenvolupament de les condicions cromatogràfiques del mètode

Tal i com s'ha comentat a l'apartat 2.1, les primeres proves es van realitzar seguint les condicions d'un mètode de referència. En aquest mètode s'utilitzava una columna diferent de la que hi havia instal·lada al cromatògraf del laboratori de Clariant, ja que era una mica més ample i la mida de partícula era major (4.6 x 250 mm, 5 µm). A més, aquest mètode estava pensat per analitzar mostres d'oli d'oliva, així que les característiques no seran exactament iguals que les del DOD. A continuació, en la **Taula 5**, es troben resumides les condicions cromatogràfiques del mètode de referència.

Taula 5. Condicions cromatogràfiques del mètode de referència

Columna:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 250 mm, 5 µm
Solvent:	Acetonitril:Acetona (60:40)
Flux:	1 mL/min
Temps anàlisi:	Isocràtic durant 20'
Volum injecció:	1-10 µL
Temperatura forn:	30°C
Detector DAD:	208 nm / 4 nm
Temps retenció esqualè:	15' aprox.

Degut a aquestes diferències, a l'hora de reproduir aquest mètode al nostre laboratori, els cromatogrames obtinguts no presentaven bona resolució, ja que el pic majoritari sortia distorsionat. Per això, es van anar introduint canvis en les condicions del mètode amb la finalitat d'optimitzar els resultats.

Un primer canvi va ser variar la temperatura del forn. Es va augmentar fins a 35°C, ja que la temperatura és un factor que afecta a la separació cromatogràfica. Gràcies a la temperatura, la sensibilitat dels pics pot augmentar. Tenint en compte que la temperatura de degradació de l'esqualè és molt elevada, aquest canvi no afectaria de cap manera a l'estructura de l'analit.

L'optimització del mètode cromatogràfic i de l'adquisició al DAD es va realitzar a partir d'un patró d'esqualè amb una puresa del 98 %. Es va preparar una solució mare d'esqualè d'aproximadament uns 1700 ppm en un matràs de 10 mL, on s'hi van afegir

10 mg de producte i es van enrasar amb acetona. Al llarg de tot el treball, els càlculs de les concentracions es realitzaran en p/p. Es va punxar una alíquota d'aquesta solució mare directament al cromatògraf. El resultat, però, no va ser satisfactori, es va veure que la dilució no era suficient gran per a que el pic quedés ben definit, ja que la quantitat d'esqualè present era massa gran. A més, el pic també sortia d'escala, raó per la qual la integració del pic no seria possible. Tenint en compte això es va fer una segona dilució a partir d'aquesta solució mare prenent 1000 µL de la solució mare d'esqualè i enrasant-los amb acetona en un matràs de 10 mL. La concentració d'aquesta nova solució contenia aproximadament uns 150 ppm d'esqualè. A partir d'aquesta solució el cromatograma obtingut sí que presentava un pic ben definit i integrable.

Amb aquestes dades es va tenir la base per a poder realitzar els càlculs corresponents per tal de realitzar els patrons de la recta de calibratge.

5.2.1 Optimització de la fase mòbil

El fet de que l'esqualè presenti sis insaturacions en la seva estructura (*Figura 1*), li proporciona un cert caràcter lleugerament apolar. Interessa, per tant, que la columna també sigui apolar per a que es puguin donar lloc els equilibris necessaris per a que sigui adsorbit per la fase estacionària i per tant es quedi retingut. D'altra banda, interessarà que la fase mòbil també tingui un cert caràcter apolar per tal de poder eluir l'esqualè que haurà quedat retingut a la columna.

La fase mòbil que s'utilitzarà estarà formada per dos solvents: acetona i acetonitril. L'acetonitril té un caràcter lleugerament més apolar que l'acetona, per tant, variant les proporcions de la composició d'aquesta fase mòbil s'aconseguirà separar millor els components de la mostra.

Havent identificat anteriorment que el pic de l'esqualè en la proporció d'acetonitril:acetona (60:40), tal i com s'utilitzava en el mètode de referència, apareixia sobre els 4.5 minuts, l'optimització de la fase mòbil es va realitzar utilitzant una mostra de DOD en la que s'observessin, a banda del pic de l'esqualè, tots els altres pics presents a la mostra que absorbissin a la mateixa longitud d'ona de l'esqualè (208 nm).

D'aquesta anàlisi es va observar que en totes les mostres de DOD apareixia el pic de l'esqualè fàcilment detectable sobre els 4.5 minuts. També es va veure, que a l'inici del cromatograma apareixien una sèrie de pics bastant solapats que pel moment no es tenien identificats, però que més endavant utilitzant patrons s'intentarien identificar.

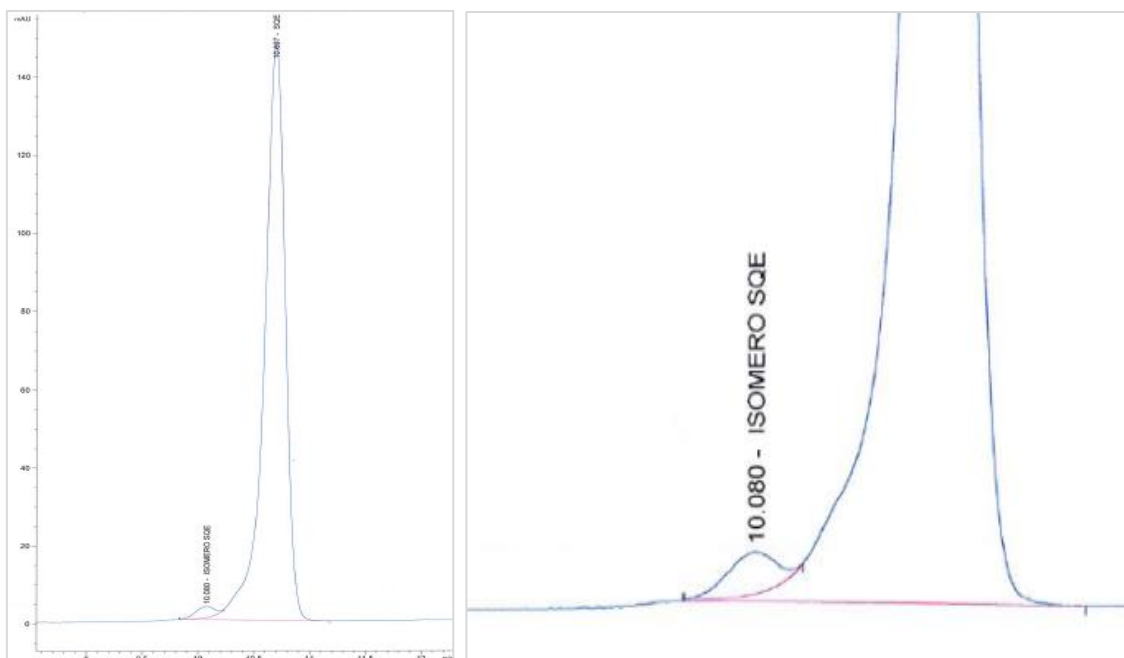
També es va observar en totes les mostres de DOD que justament abans del pic d'esqualè en totes elles hi apareixia solapat un petit pic. Es va modificar la proporció de fase mòbil acetonitril:acetona a 70:30, 80:20 i 90:10 per intentar separar-lo, i a mesura que s'augmentava la proporció d'acetonitril s'aconseguia separar cada cop més el pic, tot i que sempre quedava una mica solapat. La separació completa d'aquest pic no va ser possible fer-la.

Es coneix que l'esqualè presenta diversos isòmers, pel que es va decidir identificar aquest pic com a possible isòmer de l'esqualè. Per aquest motiu, al tenir pràcticament les mateixes característiques estructurals, el pic no s'aconseguia separar completament ja que els temps de retenció eren pràcticament idèntics.

Es va decidir que la manera en que se separava millor aquest pic era amb la proporció acetonitril:acetona 90:10, per la qual cosa el temps de retenció del pic de l'esqualè en aquestes condicions apareixeria sobre els 10,6 minuts, mentre que el de l'isòmer el es detectaria als 10 minuts.

Un altre factor que calia tenir en compte a partir d'aquest moment és que a l'hora de donar els resultats seria necessari també anotar la quantitat d'isòmer que contenia la mostra, per la qual cosa la integració dels pics s'hauria de fer sempre de la mateixa manera. Per tal de solucionar aquest problema, i per evitar que aquesta integració variés de cromatograma en cromatograma, es van poder modificar a través del software de l'equip diversos paràmetres de la integració per tal de que l'equip sempre la fes de la mateixa manera.

En les **Figures 4 i 5** es pot observar dos cromatogrames, un en el que s'identifiquen el pic de l'isòmer i el de l'esqualè, amb la integració ampliada que realitza automàticament el software.



Figures 4 i 5. A l'esquerra el cromatograma d'una mostra de DOD, a la dreta l'ampliació dels pics

5.2.1.1. Estudi de la repetibilitat en la integració

Per tal de dir si la integració del software era correcta, es va estudiar el terme de la precisió. Aquesta precisió defineix la proximitat o la dispersió entre dades o resultats independents, en unes condicions determinades. Hi ha tres tipus de condicions que serveixen per mesurar la precisió:

- Repetibilitat (s_r): Mateix analista, mateix laboratori, mateix equip i en un temps curt.
- Precisió intermèdia (s_i): Mateix laboratori i equip, analista o temps diferents.
- Reproductibilitat (s_R): diferents laboratoris, per tant diferents analistes, equips, temps.

La precisió permet dir si la diferència entre dos mesures consecutives és significativa, ja que està relacionada amb l'estimació de l'error aleatori, en termes quantitius com a desviació estàndard (s), variància (s^2) o desviació estàndard relativa (%RSD). Pel fet de que el que es volgués determinar fos la precisió en la integració, es van utilitzar les condicions de repetibilitat per tal de determinar-la. [8]

Es va preparar un vial de mostra d'una concentració d'esqualè determinada, i es van realitzar 10 injeccions consecutives del mateix vial. Els resultats obtinguts es mostren en la **Taula 6**. Es van prendre els valors de les àrees del pic de l'esqualè i del pic de l'isòmer.

Taula 6. Estudi de la repetibilitat en la integració automàtica realitzada pel software

Nº anàlisis	Àrea Isòmer	Àrea Esqualè	Relació àrees
1	65.35	1569.73	24.02
2	66.63	1586.93	23.81
3	67.48	1571.35	23.29
4	67.95	1569.57	23.10
5	66.81	1571.14	23.51
6	67.81	1564.96	23.01
7	68.65	1574.66	22.93
8	65.97	1571.75	23.83
9	69.49	1592.19	22.91
10	67.65	1565.81	23.14
Mitjana	67.57	1572.90	23.22
Des. estàndard	1.17	13.46	0.38
% RSD	1.73	0.86	1.64

La repetibilitat s'expressa com la Desviació Estàndard Relativa (%RSD) utilitzant la següent equació per obtenir-la:

$$\%RSD = \frac{\text{desviació estàndard}}{\text{mitjana}} \times 100$$

Equació 1. Fórmula per calcular la desviació estàndard relativa

El valor màxim de repetibilitat acceptat per Clariant en els seus mètodes analítics era un 2 %, i es va decidir que en aquestes condicions la resposta instrumental era repetitiva, ja que la %RSD calculada va ser de 1.64 %, inferior al límit marcat.

5.2.1.1.1. Càlcul d'*outliers*

Per a que els càlculs de la %RSD siguin correctes, prèviament sempre es realitza un pretractament de les dades per trobar valors *outliers* (errors aberrants). Es realitza a partir d'un test Q de Dixon. S'utilitza la següent equació per al càlcul d'*outliers*, quan el número de mostres està comprès entre 8 i 12:

$$Q_{11} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_2}$$

Equació 2. Fórmula per calcular el valor de $Q_{calculada}$

El valor x_n fa referència al valor sospitós, que es creu que pot ser un *outlier*, el valor x_{n-1} fa referència al valor més proper al sospitós, mentre que el x_2 és el valor més llunyà al sospitós. Per tal d'acceptar aquest valor, caldrà que la Q tabulada sigui major a la Q calculada.

5.2.2. Identificació de pics

En totes les mostres de DOD, a banda del pic majoritari d'esqualè (10,6 minuts), apareixen uns altres pics comuns en tots els cromatogrames.

La matèria primera de DOD és molt variada en quant a la quantitat de compostos que pot contenir. Alguns d'aquests components que es coneix que hi poden ser són els èsters metàlics i etílics. Per això, es van utilitzar dos patrons d'aquests compostos per tal d'identificar si apareixien els pics als cromatogrames de les mostres de DOD. Els patrons utilitzats van ser:

- Metil Oleat: 96% (Ref. H31358 Alfa Aesar)
- Etil Oleat: 98% (Ref. 41029 Acros Organics)

Aquests patrons van ser punxats seguint les condicions desenvolupades del mètode.

Pel cas del primer patró de Metil Oleat, es va observar que apareixia un pic en un temps de retenció de 3 minuts, mentre que pel cas del patró d'Etil Oleat, apareixien fins a 3 pics destacables, a 2.1, 2.6 i 3.4 minuts.

D'aquesta manera es van poder identificar aquests 4 pics que sortien juntament amb l'esqualè a tots els cromatogrames.

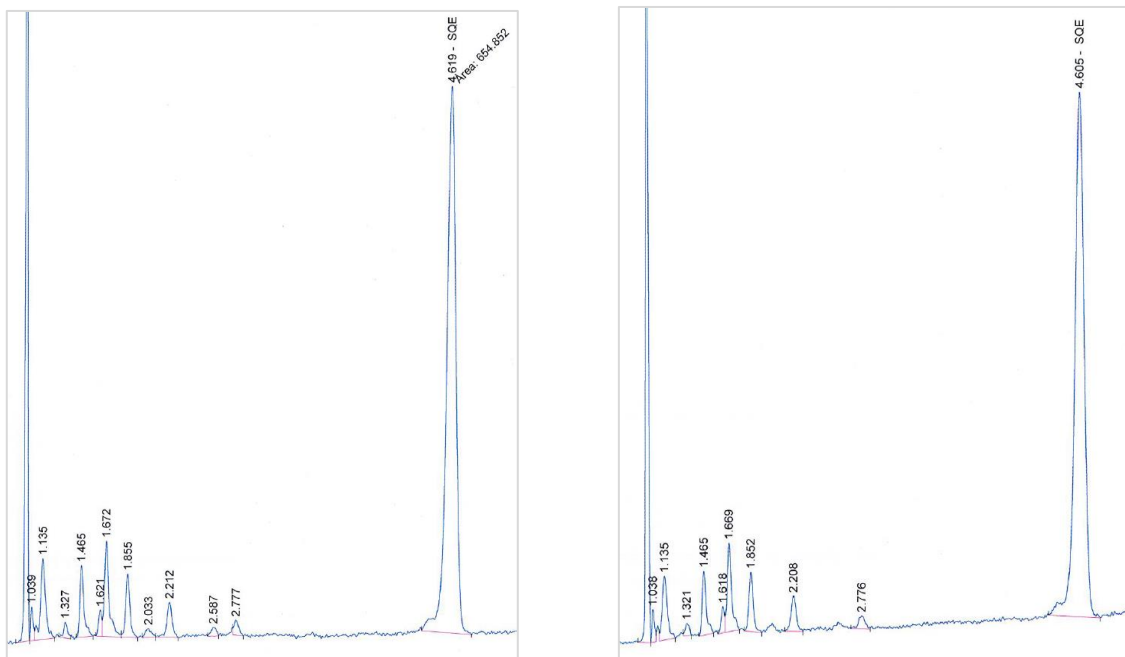
5.3. Pretractament de la mostra

En el mètode de referència existia un pretractament que realitzaven a la mostra per a que el cromatograma sortís més net, i per evitar fer passar tantes espècies per la columna.

Aquest mètode consistia en diluir la mostra amb 20 mL d'una mescla de metanol:acetona en una proporció de 7:3. Una vegada dissolta completament la mostra, es congelava a -20 °C durant 24 hores, per a que es produís un procés de cristal·lització de les ceres presents a la mostra. Transcorregut aquest temps les mostres es filtren amb un embut de vidre i paper de filtre sobre un baló de rotavapor, i s'eliminarà el dissolvent fins a sequedat a una temperatura programada de 40 °C i un buit de 200 Bar. Un cop eliminat tot el dissolvent, es realitzarà la dilució corresponent per poder punxar la mostra.

Es va fer aquest procés de cristal·lització per tal de demostrar tant qualitativament com quantitativament si era necessari o no realitzar-lo, tenint en compte que és un pretractament molt llarg i que faria que el temps d'anàlisi del mètode s'allargués fins a dos dies. Aquest fet no interessaria en un laboratori de control de qualitat, ja que diàriament reben desenes de mostres per a realitzar diferents anàlisis.

En les **Figures 6 i 7** es mostra la comparativa qualitativa dels cromatogrames d'una mostra sense haver-li realitzat el pretractament, i l'altra després d'haver-li fet el pretractament.



Figures 6 i 7. A l'esquerra el cromatograma d'una mostra sense cristal·litzar. A la dreta el cromatograma d'una mostra cristal·litzada.

De manera qualitativa, es veu que aquest pretractament no afecta a la forma del cromatograma, ja que com s'observa a les figures anteriors, els cromatogrames són pràcticament idèntics. Això és degut a que molt probablement els compostos que s'aconsegueixen separar amb aquest pretractament no absorbeixen a la longitud d'ona fixada per l'equip, que és on absorbeix l'esqualè (208 nm).

Per tal de dir quantitativament si realment era adequat fer-li aquest pretractament es va calcular el percentatge de recuperació. D'aquesta manera, ens assegurariem si després de tot el procediment les mostres perdien o no quantitat d'esqualè.

Es va decidir determinar aquest percentatge de recuperació a partir de les àrees del pic de l'esqualè, ja que no va ser possible fer-ho a partir dels grams inicials i finals de producte.

Després d'haver realitzat el procediment per triplicat a una mateixa mostra (tenint en compte fer les mateixes dilucions en els dos casos) es van obtenir els resultats que es mostren a la **Taula 7**, on es comparen les àrees obtingudes amb la mateixa mostra però sense haver-li fet cap pretractament:

Taula 7. Resultats de la recuperació després de realitzar el pretractament

Sense pretractament	Àrea esqualè	Amb pretractament	Àrea esqualè
1	2829.32	1	2412.48
2	2836.45	2	2394.38
3	2854.42	3	2428.94
Mitjana	2836.45	Mitjana	2415.48
% Recuperació = 85.16 %			

Tenint en compte aquests resultats, finalment es va optar per no realitzar cap pretractament a la mostra, perquè aquest procediment implicava un temps d'anàlisi molt llarg i una recuperació baixa, ja que es perdia part de l'esqualè durant les successives etapes del procediment.

Un factor que s'haurà de tenir en compte en un futur és que a conseqüència d'estalviar fer aquest pretractament, la columna tindrà un temps de vida més curt, ja que la contaminació per altres espècies que s'hi farà passar en cada anàlisi li afectarà al llarg del temps.

5.4. Recta de calibratge

5.4.1. Linealitat instrumental

La linealitat instrumental està relacionada amb la capacitat d'un mètode de donar senyals directament proporcionals a la concentració de l'analit. Aquesta linealitat fa referència al tipus de model matemàtic amb el que es relaciona el senyal obtingut amb un valor de concentració, i s'ha d'avaluar estadísticament.

L'interval de treball amb el que es va construir la recta estava comprès entre 10 i 150 ppm, concretament, els nivells amb els que es va construir la recta van ser de 10, 20, 50, 70, 80, 100 i 150 ppm.

Segons la ICH (International Conference on Harmonisation) ^[8] no sempre s'han d'avaluar totes les característiques de la linealitat de les rectes de calibratge, i en el nostre cas degut a que l'objectiu del mètode es determinar el contingut d'esqualè expressat com a tant per cent, no calia calcular els límits de detecció ni de quantificació, ja que no interessa saber quina és la concentració mínima que es podria quantificar o detectar. La linealitat del mètode, però, sí que és un paràmetre que s'ha d'avaluar, i en aquest cas es va estudiar si la resposta del cromatògraf era lineal o no. Es va realitzar una recta de calibratge amb els set patrons de diferents nivells de concentració esmentats anteriorment.

Els patrons es van preparar a partir d'una solució mare d'esqualè d'aproximadament 1500 ppm, de la qual es van fer dues dilucions per a tenir dues solucions més diluïdes, una de 100 ppm, amb la que es prepararien els nivells de 10 a 100 ppm, i una altra solució de 150 ppm. La concentració de totes les solucions i dels patrons es va realitzar en pes. En la **Taula 8** es mostren els set nivells de concentracions (P1-P7) que es van utilitzar per realitzar la recta de calibratge, amb la concentració d'esqualè real que tindria cada nivell un cop preparats tots els patrons.

Taula 8. Quantitats utilitzades per la preparació dels patrons de la recta de calibratge

Nivell	[concentració] SQE teòrica	Volum S.T (μ L)	Volum Acetona (μ L)	g mostra afegits	g solució totals	[concentració] SQE real (ppm)
P1	10	100	900	0.0636	0.6869	11.81
P2	20	200	800	0.1353	0.7482	23.08
P3	50	500	500	0.3674	0.7506	62.47
P4	70	700	300	0.5283	0.7728	87.25
P5	80	800	200	0.6320	0.7907	102.02
P6	100	1000	0	0.7372	0.7372	127.63
P7	150	1500	0	0.6940	0.6940	201.82

Una vegada preparats tots els patrons, es van punxar en ordre aleatori sota les condicions del mètode desenvolupat, obtenint una recta de calibratge com la que es representa a la **Figura 8**.

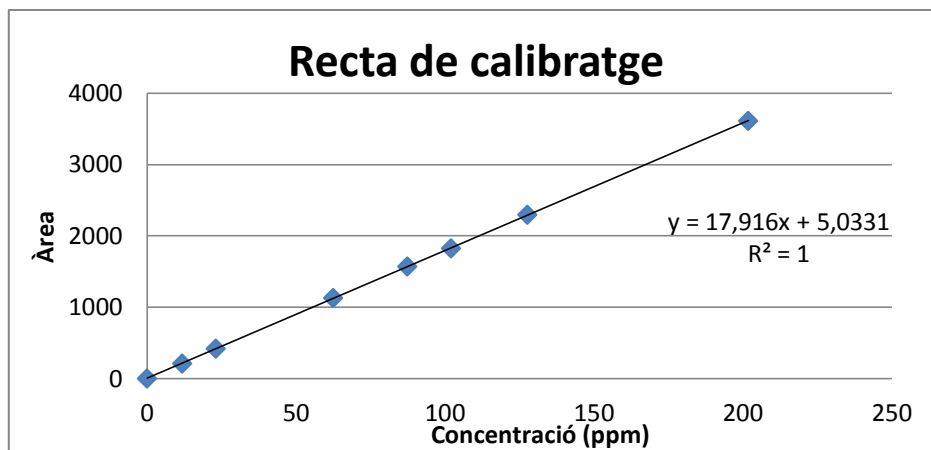


Figura 8. Recta de calibratge obtinguda amb els set nivells de concentracions

Segons l'empresa Clariant, per tal de validar la recta caldria solament avaluar el paràmetre del coeficient de determinació (r^2). Tot i això, també es va realitzar un estudi dels residuals per acabar de confirmar que la recta era vàlida. [9]

El coeficient de determinació determina si els punts experimentals s'ajusten a una línia recta o no, es a dir, ens determina la correlació entre las variables x i y. Aquest valor s'obté a partir del quadrat del coeficient de correlació (r). Si el coeficient de determinació és molt pròxim a 1 indica que hi ha una correlació positiva, es a dir, que els punts experimentals es troben sobre una recta de pendent positiu, mentre que si el valor és pròxim a -1, indica que el pendent de la recta és negatiu. En canvi, si no existeix correlació entre les variables x i y, vol dir que el coeficient de determinació és zero. Generalment, el valor d'aquest coeficient a partir de la qual es pot determinar que la recta és bona és de 0.995.

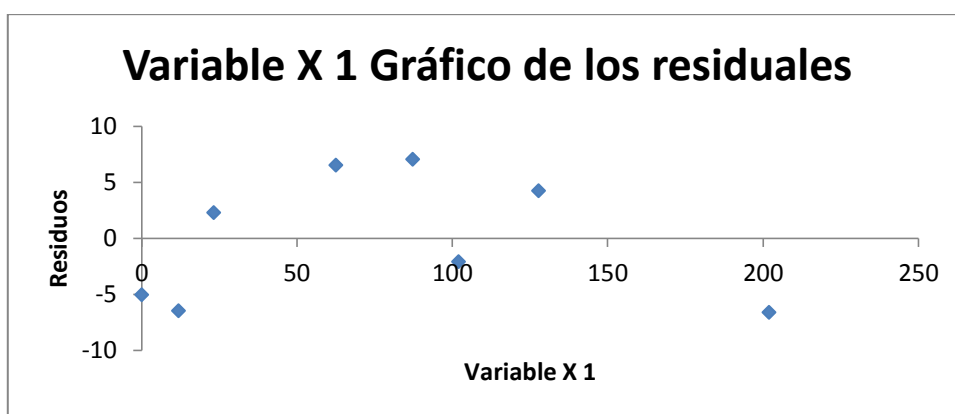
En el cas de la recta obtinguda, el coeficient de correlació és 1, per la qual cosa es pot dir que la recta és correcta i es podrà utilitzar per quantificar, posteriorment, una mostra problema.

Si analitzem aquest coeficient de determinació juntament amb un examen visual del gràfic dels residuals, ens donarà una visió conjunta molt més completa de la validesa de la recta obtinguda. El residual de cada punt experimental es determina a través de la distància vertical de cada punt a la recta de calibratge. Un gràfic de residuals no és res més que una representació de la coordenada x de cada punt experimental respecte al seu

valor residual. Per poder considerar que un model de línia recta és vàlid, en el gràfic de residuals s'ha d'observar que:

- El número de residuals positius és aproximadament igual al número de residuals negatius.
- Els residuals estan distribuïts aleatòriament.
- Tots els residuals tenen aproximadament el mateix valor absolut.
- Els residuals no mostren tendències.

Figura 9. Representació del gràfic de residuals de la recta de calibratge



Observant la **Figura 9**, i tenint en compte els punts que s'han esmentat anteriorment, veiem que el número de residuals positius (4) és igual als residuals negatius (4), que la distribució és aleatòria, i que els residuals no mostren cap tendència, per tant, es pot dir que la recta de calibratge serà vàlida per a futures quantificacions.

Per altra banda, Clariant té previst en futurs projectes comprovar si realment el pic que apareix pròxim a l'esqualè és un isòmer o no a partir d'un GC acoblat a un MS, però en aquest treball finalment es va decidir optar per quantificar el contingut d'isòmer en la mostra utilitzant la mateixa recta de calibratge que per l'esqualè, ja que al cap i a la fi els compostos al ser isòmers són pràcticament iguals i la resposta cromatogràfica seria la mateixa.

6. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT D'ESQUALÈ EN UNA MOSTRA PROBLEMA

Per tal de determinar el contingut d'esqualè en una mostra problema de DOD, el tractament que s'hauria de fer a la mostra seria el següent:

Primer, tenint en compte que el DOD a temperatura ambient és un líquid molt dens, es podria dir que casi sòlid, caldria escalfar la mostra a l'estufa a uns 70 – 80°C fins que es tornès completament líquida, i agitar-la fins que s'homogeneïtzés completament. La quantitat de mostra a pesar serà de 0,16 grams, ja que s'ha calculat que aquesta és la quantitat de mostra òptima a pesar pel fet de que s'espera que el DOD tingui un contingut d'entre un 5 – 20 % d'esqualè. Pesant aquesta quantitat ens assegurem que l'àrea del pic de l'esqualè entra dintre del rang de la recta de calibratge, tenint en compte les dues dilucions que es realitzaran seguidament.

D'igual manera que es van preparar els patrons, serà necessari fer dues dilucions a la mostra, per tal de tenir la quantitat d'esqualè idònia per a poder quantificar amb la recta de calibratge. En la primera dilució (solució 1) s'enrasaran els 0.16 grams de mostra (*g mostra*) en 50 ml d'acetona (*g solució 1*), tenint en compte no fer cap tara entre pesades. La segona dilució (solució 2) es farà agafant una alíquota de 250 µL de la solució anterior (*g alíquota*), i s'afegiran 750 µL d'acetona (*g solució 2*), com en l'anterior cas, sense haver tarat entre pesades. Aquesta segona dilució es realitzarà directament en un vial de 2 ml per a cromatografia.

Serà important anotar totes les pesades que es realitzaran, ja que el software de l'equip demanarà introduir el càlcul que es mostra en *l'Equació 3*, que té en compte les dilucions de la mostra que s'han realitzat.

$$\frac{\text{g solució 2}}{\frac{\text{g mostra}}{\text{g solució 1}} \times \text{g alíquota}}$$

Equació 3. Càlcul corresponent a la dilució de la mostra

El resultat final que s'obtéindrà del software vindrà donat en ppm, pel que caldrà dividir el resultat entre 10^4 per tal de tenir el resultat en %.

Es va determinar el contingut d'esqualè en diverses mostres de DOD de diferents procedències, tal i com es mostra en la **Taula 9**.

Taula 9. *Contingut de d'esqualè en diferents mostres de DOD*

DOD	% isòmer	% total esqualè
Mengibar	0.92	6.05
Sovena	0.22	8.42
Borges	0.50	5.84
Salov	no detectable	3.13
Taris	no detectable	4.83
Ffaiges	0.68	19.35
La Pedriza	0.24	12.53

6.1. Comparació dels resultats amb un altre mètode

Paral·lelament a aquest mètode, al laboratori de Clariant també s'estava desenvolupant un mètode per a la determinació d'esqualè en mostres de DOD per GC-FID. Un cop establerts els paràmetres definitius dels dos mètodes, es van comparar els resultats de l'anàlisi de diferents mostres de DOD entre els dos mètodes per veure si realment els resultats eren coherents. En la **Taula 10** es mostren la comparació dels resultats dels dos mètodes:

Taula 10. Comparació dels resultats de % total d'esqualè entre els dos mètodes

DOD	Mètode GC		Mètode HPLC	
	% isòmer	% total esqualè	% isòmer	% total esqualè
Mengibar	1.49	6.80	0.92	6.05
Sovena	0.44	8.50	0.22	8.42
Borges	0.31	6.11	0.50	5.84
Salov	no detectable	3.14	no detectable	3.13
Taris	no detectable	4.99	no detectable	4.83
Ffaiges	1.40	19.35	0.68	19.35
La Pedriza	0.68	13.04	0.24	12.53

Tal i com es pot observar a la taula anterior, els resultats entre els dos mètodes s'aproximen molt, i en algun cas fins i tot el resultat és idèntic, fet que a priori confirmaria que els dos mètodes són comparables. Tot i això, aquest fet s'estudiarà al següent apartat, en el que es realitzarà un test estadístic ANOVA per tal de confirmar-ho.

6.1.1. ANOVA d'un factor

L'anàlisi de variància (ANOVA) és una eina estadística de gran utilitat tant en la indústria, per a control de processos, com en el laboratori d'anàlisi, per el control de mètodes analítics.^[10] Hi ha múltiples exemples d'aplicació, que es poden agrupar segons l'objectiu que persegueixen en dos grups: la comparació de múltiples columnes de dades i l'estimació dels components de variació d'un procés. Hi ha dos tipus de possibles fonts de variació: l'error aleatori en la mesura, i el factor controlat (tipus de mètode, condicions, analista...).

Per tal de poder utilitzar l'ANOVA de forma correcta s'han de complir tres tipus d'hipòtesis, tot i que s'accepten lleugeres desviacions de les condicions ideals:

1. Cada conjunt de dades ha de ser independent de la resta.
2. Els resultats obtinguts per cada conjunt han de seguir una distribució normal.
3. Les variàncies de cada conjunt de dades no han de diferir de forma significativa.

En aquest treball, s'utilitzarà l'ANOVA d'un factor per tal de determinar si dos mètodes diferents proporcionen resultats comparables a l'hora d'analitzar una mateixa mostra. Els mètodes que es compararan seran el desenvolupat durant aquest treball per HPLC-DAD, i un altre per GC-FID que s'ha desenvolupat paral·lelament a aquest treball.

Es va analitzar el contingut d'esqualè en una mateixa mostra de DOD (SOVENA 143A) n_k vegades amb el mateix procediment per cada mètode. L'objectiu de l'ANOVA aquí és comparar els errors sistemàtics amb els aleatoris obtinguts al realitzar diversos anàlisis en cada mètode. En la **Taula 11** es mostren els resultats obtinguts (expressats en % d'esqualè total).

Taula 11. Resultats de l'anàlisi d'esqualè en la mateixa mostra de DOD, per dos mètodes independents (HPLC i GC)

Resultat	Mètode GC-FID	Mètode HPLC-DAD
1	8.16	8.05
2	8.09	8.06
3	8.03	7.93
4	8.07	7.83
5	8.08	7.97
6	8.08	8.09
7	8.04	8.06
8	8.00	8.02
9	8.02	8.05
10	7.95	8.03
Suma	80.54	80.09
Valor Mig X_k	8.05	8.01
n_k	10	10
Mitjana total de tots els resultats = 8.03		
K = 2		
Nº total resultats N = 20		

Observant els valors mitjans de cada mètode, tot sembla indicar que no existeixen diferències entre els dos mètodes. Tot i això, s'ha d'avaluar si les diferències són significatives o no.

Al cap i a la fi, l'objectiu de l'ANOVA era comparar els valors mitjans i dir si difereixen significativament. Estratègia: si els resultats proporcionats pels diversos mètodes no contenen errors sistemàtics, els valors mitjans respectius no diferiran l'un de l'altre i la seva dispersió, deguda als errors aleatoris, serà comparable a la dispersió present individualment en cada laboratori.

A partir d'un full de càlcul Excel es va realitzar el test estadístic, que es troba resumit en la **Taula 12**:

Taula 12. Taula ANOVA creada a partir d'un full de càlcul Excel per als resultats de la taula 11.

Origen de les variàncies	Suma de quadrats	Graus de llibertat	Mitjana dels quadrats	F cal	Probabilitat
Entre mètodes	0.010147639	1	0.01	2.133948301	0.16130558
Dins del mètode	0.085596027	18	0.005		
Total	0.095743665	19			
F tab = 4.413873419 ($\alpha=0.05$, 4, 23, 1 cua)					

Els dos mètodes proporcionen resultats on les seves mitjanes no difereixen de forma estadísticament significativa, ja que $F_{cal} < F_{tab}$. Per tant es pot dir que els resultats proporcionats pels mètodes són comparables.

7. PARÀMETRES DE VALIDACIÓ DEL MÈTODE

Una vegada es tenen les condicions establertes en el mètode, i després d'haver comparat els resultats amb un altre mètode, es va acabar de validar alguns paràmetres més. Els paràmetres que es van validar van ser la repetibilitat (tant la instrumental, com la del mètode), i la precisió intermèdia.

7.1. Repetibilitat

7.1.1. Repetibilitat instrumental

Per tal de determinar si la resposta del cromatògraf era precisa, es va avaluar la repetibilitat instrumental. Per validar aquest paràmetre, es va preparar una única mostra de DOD de Sovena fent les dues dilucions corresponents, i es va punxar successivament 10 cops, en les mateixes condicions.

Taula 13. Mateixa mostra, mateix dia. Repetibilitat instrument

Mostra	% isòmer	%SQE	% total
1	0.19	8.20	8.39
2	0.23	8.21	8.44
3	0.23	8.23	8.46
4	0.25	8.19	8.44
5	0.31	8.20	8.51
6	0.26	8.20	8.46
7	0.28	8.24	8.52
8	0.29	8.25	8.54
9	0.33	8.23	8.56
10	0.35	8.21	8.56
Mitjana	0.27	8.22	8.49
Desviació	0.02	0.05	0.06
%RSD	18.24	0.24	0.68

Mitjançant el test Q de Dixon es va comprovar que no hi havia cap valor *outlier*, per la qual cosa es van utilitzar tots els valors per a calcular la mitjana i la desviació. A partir d'aquests dos valors es va calcular el %RSD, obtenint un valor per sota del 2 % acceptat per l'empresa segons les seves normatives. Per tant es va concloure que l'instrument era precís en condicions de repetibilitat.

7.1.2. Repetibilitat del mètode

De la mateixa manera que es va comprovar la repetibilitat instrumental i es va afirmar que la resposta del cromatògraf era precisa, es va avaluar si les respostes obtingudes sota les condicions desenvolupades també ho eren, és a dir, si el mètode desenvolupat era precís en condicions de repetibilitat.

Per a comprovar-ho, es va utilitzar la mateixa mostra de DOD de Sovena, i es van preparar 11 mostres diferents en un mateix dia. En la **Taula 14**, es mostren els resultats de la repetibilitat del mètode.

Taula 14. Diferents mostres, mateix dia. Repetibilitat del mètode

Mostra	% isòmer	% SQE	% total
1	0.24	8.27	8.51
2	0.22	8.20	8.42
3	0.24	8.16	8.41
4	0.24	8.18	8.42
5	0.22	8.17	8.39
6	0.25	8.29	8.54
7	0.24	8.24	8.49
8	0.25	8.24	8.49
9	0.22	8.21	8.43
10	0.26	8.26	8.52
11	0.25	8.25	8.50
Mitjana	0.24	8.22	8.46
Desviació	0.01	0.04	0.05
% RSD	5.44	0.53	0.62

D'igual forma que en el cas anterior, es va realitzar el test Q de Dixon i es va comprovar que no hi havia cap valor *outlier*. El valor obtingut de %RSD era inferior al 2 %, per tant es va concloure que el mètode desenvolupat era precís en condicions de repetibilitat.

7.2. Precisió intermèdia

Hi ha diferents maneres d'avaluar la precisió intermèdia, en funció del paràmetre del mètode que es vulgui variar. En aquest treball la precisió intermèdia es va calcular variant el factor temps, és a dir, entre dies. Es va calcular durant 6 dies (K), realitzant 6 rèpliques per dia (N), seguint el mateix procediment de preparativa a la mateixa mostra.

Per calcular la precisió intermèdia es van utilitzar les següent equacions corresponents a la repetibilitat, la precisió entre dies i la precisió intermèdia final, que serà una suma de les dues anteriors. Per a que els valors siguin acceptats s'ha de complir que el %RSD de la precisió intermèdia sigui menor de 2 %.

Es va realitzar en un full de càlcul Excel una ANOVA de dos factors amb les dades de la **Taula 15**, obtenint els resultats de la **Taula 16**.

Taula 15. Resultats de les rèpliques al llarg dels 6 dies

Rèplica	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
1	8.51	8.45	8.42	8.50	8.49	8.38
2	8.52	8.49	8.45	8.45	8.42	8.40
3	8.48	8.46	8.40	8.49	8.42	8.39
4	8.45	8.48	8.39	8.51	8.43	8.45
5	8.46	8.46	8.44	8.46	8.50	8.36
6	8.48	8.48	8.45	8.44	8.45	8.41

Taula 16. Resultats de l'ANOVA per determinar la precisió intermèdia

Origen de les variàncies	Suma de quadrats	Graus de llibertat	Mitjana dels quadrats
Entre mètodes	0.03258889	5	0.006517778
Dins del mètode	0.0234	30	0.00078
Total	0.055988889	35	

Llavors, per tal de calcular la %RSD, es van utilitzar les següents equacions: ^[11]

$$s_r = \sqrt{Mw}$$

Equació 4. Desviació estàndard de la repetibilitat

$$s_b = \sqrt{\frac{Mb - Mw}{n}}$$

Equació 5. Desviació estàndard de la precisió entre dies

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_b^2}$$

Equació 6. Desviació estàndard de la precisió intermèdia final

A partir d'aquestes equacions, es va calcular la desviació estàndard intermèdia final,

$$s_r = \sqrt{0,00078} = 0.02792848$$

$$s_b = \sqrt{\frac{0,006517778 - 0,00078}{6}} = 0.030924041$$

$$s_I = \sqrt{0.02792848^2 + 0.030924041^2} = 0.041668889$$

amb la qual es va calcular la %RSD,

$$RSD = \frac{s_I}{\bar{X}} \times 100 = 0.49 \%$$

un valor per sota del límit marcat pel 2 %, per tant, la precisió intermèdia del mètode va quedar perfectament validada.

8. CONCLUSIONS

This section, provides the main conclusions that may be deduced from the current research:

- One of the parts of this project was the tuning of the chromatograph Agilent 1220 Infinity. This task and the familiarization with its software supposed a hard work and it took an important dedication before starting the method development
- Introducing changes on the mobile phase mixture allowed separate the squalene peak.
- The identification of the minor peaks was not completed due to the lack of standards. The peak, which appears partially underhanded with the main peak, was identified as an isomer of squalene. This minor peak also was used to quantify the total content of squalene.
- The instrumental linearity studied in the work interval had a significant correlation after evaluating the correlation coefficient and the residual graphics. It can be said that the chromatograph offers lineal results in this interval.
- A test sample was used to determinate the squalene content. It was determined that the purity was within the lineal interval studied.
- The results of the developed method were compared with another method, which determined squalene by GC-FID, using an ANOVA test.
- The instrument repeatability, method repeatability and intermediate precision was optimal enough to conclude that, under specific conditions, the method gives accurate results.
- Finally, it was concluded that the method developed in this project is useful for its objective.

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] Clariant Ltd. **2017**. *Corporate*. [Online] Disponible a: <http://www.clariant.com> [Data consulta: 03/04/2017].
- [2] Sigma-Aldrich. *Squalene S3626*. **2017**. [Online] Disponible a: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3626?lang=es®ion=ES> [Data consulta: 04/04/2017].
- [3] Aguado Ramos, M.; Martín Martín, A.; Chica Pérez, A.; Martín Santos, M.A.; Berrios Caballero, M.; Siles López, J.A.. *Procedimiento de obtención de escualeno*. WO 2008 102032 A1. **2008**.
- [4] Warleta, F.; Ruiz-Mora, J.; Campos-Segura, M.; Serrano, M.J.; Gaforio, J.J. *Aceite de Oliva y salud. El Escualeno, componente minoritario del aceite de oliva, y su relación con el càncer*. Universidad de Jaén. pg 765-782.
- [5] Schneider, S. *Quality Analysis of Extra Virgin Olive Oils – Part 5 Nutritive Benefits – Determination of Squalene in Virgin Olive Oil*. **2016**. Waldbron, Germany.
- [6] *Agilent InfinityLab LC Series 1220 Infinity II LC System. User Manual*. **2016**.
- [7] *Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition. Concepts and Workflows* **2016**.
- [8] Sagrado, S.; Medina, M.J.; Bonet, E.; Martín, Y. *Manual práctico de calidad en los laboratorios Enfoque ISO 17025: Validación interna de métodos*. 2ª ed; AENOR. **2004**. Madrid. pg 84-97.
- [9] Riu, J.; Boqué, R.. *Técnicas de Laboratorio. Calibración lineal*. **2003**. [Online] Disponible a: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/callin.pdf> [Data consulta: 27/05/2017].
- [10] Boqué, R; Maroto, A.. *Técnicas de Laboratorio. El anàlisis de la varianza (ANOVA) 1. Comparación de múltiples poblaciones*. **2004**. [Online] Disponible a: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/anovacast.pdf> [Data consulta: 27/05/2017].
- [11] Ellison, S.L.R.; Barwick, V.J.; Duguid Farrant, T.J.. *Practical Statistics for the Analytical Scientist. A Bench Guide. Chapter 9 Validation and Method Performance*. 2ª ed; RSC Publishing. **2009**. pp 146-149.