

Determinació de Formaldehid en emulsions polimèriques mitjançant HPLC-DAD



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Guillem Perpinyà París
Grau en Química
Treball de Fi de Grau
2018-2019
Tutoritzat per Maria Besora



Agraïments

M'agradaria donar les gràcies a *IQOXE Emulsions Polimèriques* per permetre'm dur a terme aquest projecte en les seves instal·lacions i per tota la confiança que han dipositat en mi. En especial al Josetxo i a la Ana, que sempre han estat pendents de l'evolució de la meva feina i al Jose i la Alicia, que han estat els meus companys de laboratori durant aquests últims quatre mesos i han fet que l'ambient de treball sigui immillorable.

Per altra banda, també m'agradaria destacar l'atenció i consells que m'ha brindat la meva tutora del treball, Maria Besora, sempre que l'he necessitat.

Moltes gràcies.



Índex

Abstract	5
1 Objectiu	6
2 Introducció	6
2.1 IQOXE Emulsions Polimèriques.....	6
2.2 Cromatografia líquida d'alta eficàcia(HPLC).....	7
2.2.1 Fonament teòric de la tècnica.....	7
2.2.1.1 Retenció i selectivitat.....	8
2.2.1.2 Fase mòbil.....	11
2.2.1.3 Fase estacionaria.....	11
2.2.1.4 Detector.....	12
2.2.2 Instrumentació usada.....	12
2.3 El Formaldehid.....	13
2.3.1 Dades físiques i químiques.....	14
2.3.2 Fitxa de seguretat i perillositat.....	14
2.3.3 Formació de Formaldehid en emulsions polimèriques.....	15
2.3.4 Preparació de la 3,5-Diacetil-1,4-dihidrolutadina.....	15
3 Experimental	16
3.1 Objectiu	16
3.2 Reactius i material.....	17
3.3 Procediment experimental.....	19
3.3.1 Preparació del reactiu de Nash.....	20
3.3.2 Preparació dels patrons.....	21
3.3.2.1 Optimització de la preparació dels patrons.....	23
3.3.2.2 Optimització en l'anàlisi dels patrons.....	24
3.3.3 Preparació de les mostres.....	25
3.3.3.1 Optimització en la preparació de les mostres.....	26
4 Resultats	29



4.1	Determinació de l'interval de linealitat.....	29
4.2	Calibratge del mètode.....	32
4.3	Validació del mètode.....	35
4.3.1	Selectivitat i especificitat.....	35
4.3.2	Exactitud.....	35
4.3.2.1	Veracitat.....	36
4.3.2.2	Precisió.....	37
4.3.2.2.1	Repetibilitat.....	37
4.3.2.2.2	Precisió intermèdia.....	42
4.3.3	Límit de detecció.....	43
4.3.4	Límit de quantificació.....	44
5	Resultats d'estudis complementaris.....	45
6	Conclusions.....	47
7	Bibliografia.....	49



Resum

IQOXE Emulsions Polimèriques produeix emulsions polimèriques en base aquosa. Aquestes emulsions contenen quantitats variables de Formaldehid, ja sigui format com a subproducte de reacció o per impureses en la matèria prima. L'objectiu d'*IQOXE* és implantar un mètode per a determinar i quantificar aquest compost en les emulsions.

Per a fer-ho s'ha fet ús d'un aparell d'HPLC acoblat a un detector de díodes en fila (DAD). El Formaldehid és un compost no actiu en l'espectre UV/VIS, per la qual cosa ha fet falta derivatitzar-lo en un compost que si que és detectable.

El procediment ha consistit a grans trets en el calibratge i validació del mètode en termes de LOD, LOQ, selectivitat i exactitud, així com determinar l'interval de linealitat del mètode. Per a fer-ho ha calgut un procés d'optimització en la preparació dels patrons i de les mostres.

Per últim s'ha posat en marxa el mètode per a la seva finalitat en diferents lots de productes de planta.

Abstract

IQOXE Polymeric Emulsions produces emulsions on a watery basis. These emulsions contain variable amounts of Formaldehyde, either formed by reaction by-products or impurities in the raw material. The purpose of IQOXE is to implement a method to determine and quantify this compound in the emulsions.

To do this, a HPLC device coupled to a diode array detector (DAD) has been used. Formaldehyde is a non-active compound in the UV / VIS spectrum, so it has been necessary to derivative it into a compound that it's detectable.

The procedure consisted in the calibration and validation of the method in terms of LOD, LOQ, selectivity and accuracy, as well as determining the linearity interval of the method. To do this, an optimization process has been necessary in the preparation of the standards and samples.

Finally, the method for its purpose in different batches of plant products has been implemented.



1. Objectiu

El Formaldehid és un compost orgànic que es troba present en concentracions variables en les emulsions polimèriques. La quantificació d'aquest component és essencial per a poder assegurar una segura manipulació de les emulsions en qüestió, principalment degut al seu comportament tòxic i carcinogen, i també per a comprovar que els productes compleixen la legislació necessària per a que puguin ser venuts.

L'objectiu del present treball és la posada en marxa i optimització d'un mètode per a detectar i quantificar Formaldehid en emulsions polimèriques de base aquosa produïdes a la planta d'*IQOXE*. S'usarà per a tal fi, la tècnica de cromatografia líquida (HPLC).

2. Introducció

2.1 IQOXE Emulsions Polimèriques

El present treball s'ha realitzat en la seva totalitat en les instal·lacions del departament d'I+D de la planta d'*IQOXE Emulsions Polimèriques*.

IQOXE és una empresa petroquímica dedicada a la producció d'òxid d'etilè, glicols i derivats situada al polígon petroquímic de Tarragona. En l'actualitat és l'única empresa que produeix òxid d'etilè a Espanya, amb una producció de 140.000 tones anuals. La major part d'aquest òxid va dedicat a la producció de glicol, precursor del polietilenglicol. ^[1]

Tot i això, *IQOXE* té una planta secundària, que és on he estat realitzant el TFG durant aquestes últimes setmanes.

IQOXE Emulsions polimèriques, és una divisió de l'empresa *IQOXE*. Pertany al Grup Industrial Cristian Lay (CL). Aquest grup va néixer l'any 1981 a l'empresa de disseny i producció de joies, bijuteria i complements Cristian Lay.

Com indica el seu nom, l'empresa es dedica a la producció i venda d'emulsions per al seu ús posterior. Les principals aplicacions de les emulsions produïdes a la planta són: fabricació de pintures (tant d'exterior com decoratives), arrebossats i imprimacions. Per altra banda també s'usen per a produir adhesius, coles i altres tipus de segellants.

La planta de producció es troba ubicada a Tarragona i va ser construïda originalment al 1976 per la companyia química alemanya *Hoechst*.

Després de la seva escissió, el 1997 *Clariant* va adquirir la titularitat del centre de producció i després de 6 anys gestionant el negoci, l'any 2003, *Celanese* es va fer càrrec de la unitat d'emulsions polimèriques. Al desembre de 2015, *IQOXE* adquireix el centre de producció d'emulsions, juntament amb un acord de llicència tecnològica per a la producció de dispersions Acríliques, copolímers Acrílic-Estirè, Acetat de Polivinil i co polímers Vinil-Ester.



La planta, com he comentat, esta situada dins del recinte de l'empresa *Clariant*. Consta de la zona de producció, la zona d'emmagatzematge de matèries primeres així com la zona d'oficines i dos laboratoris, el de control de qualitat i el d'I+D. En la zona de control de qualitat es duen a terme controls rutinaris per assegurar la qualitat del producte i donar el vist-i-plau previ a la venda d'aquest.

L'altre laboratori (I+D), duu a terme tasques de recerca, fent reaccions a petita escala i caracteritzant-les, ja sigui per produir una nova emulsió o per intentar millorar un producte ja existent.



Figura 1. Vista aèria de la planta de producció d'IQOXE Emulsions Polimèriques.^[2]

A la fotografia es veu el recinte de *Clariant* des de dalt. La planta d'*IQOXE* correspon a l'edifici de color verd que es veu a la dreta de la imatge

2.2 Cromatografia líquida (HPLC)

Per al desenvolupament d'aquest projecte s'ha usat la tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

2.2.1 Fonament teòric

La cromatografia líquida d'alta resolució és una tècnica de separació, que consisteix en separar anàlits segons la seva afinitat amb la fase estacionària o la fase mòbil. Les bases teòriques de la cromatografia líquida i la cromatografia líquida d'alta eficàcia són les mateixes,



i han estat desenvolupades en la instrumentació i especialment en la preparació de noves columnes cromatogràfiques que han configurat l'HPLC com una tècnica en certa manera nova i deixant enrere els mètodes convencionals de treball.

En la taula següent, podem veure alguns paràmetres característics de les diferents variants de cromatografia líquida. Ens fixem especialment en les diferències que presenta l'HPLC respecte la resta de tècniques.^{[3][4]}

Paràmetre	LC Convencional	HPLC	Micro LC	LC capilar	Nano LC
Diàmetre intern	10-15 mm	1,5-4,5 mm	0.8 mm	0,18-0,32 mm	0,075-0,1 mm
Longitud de la columna	50-200 cm	3-30 cm	5-25 cm	5-25 cm	15-25 cm
Diàmetre mitjà de partícula	>150-200 µm	3-40 µm	3-5 µm	3-5 µm	5 µm
Flux de fase mòbil	1-2 mL/min	0,2-2,5 mL/min	10-100 µl/min	1-10 µl/min	0,1-1µm /min

Taula 1. Comparativa entre diferents variants de la cromatografia líquida.^[3]

Bàsicament a l'hora de modificar el resultat d'una separació cromatogràfica, se sol actuar sobre:

- L'amplada dels pics, és a dir, millorar l'eficàcia del sistema cromatogràfic.
- La distància entre els màxims dels pics cromatogràfics, és a dir millorar la separació o la selectivitat.

2.2.1.1 Retenció i selectivitat

Cada anàlit en funció de les seves característiques té més tendència a separar-se amb una fase apolar o polar, això depèn de les interaccions, que són majoritàriament interaccions iòniques, ponts d'hidrogen o forces de van der Waals. Segons la força d'aquestes interaccions l'anàlit en qüestió quedarà més o menys retingut en la fase estacionària i per tant variarà el seu temps de retenció.

El temps de retenció es pot definir com el temps que passa des de que l'anàlit entra a la columna fins que en surt d'ella. Cada substància interaccionarà de manera diferent amb la columna, fent que totes tinguin temps de retenció diferents i per tant fent que les puguem diferenciar al analitzar el corresponent cromatograma.

Sota unes condicions i paràmetres definits, un mateix anàlit hauria de sortir sempre en el mateix temps de retenció, és a dir, cada anàlit té un temps de retenció característic que permet diferenciar-lo de la resta.



La retenció en cromatografia es mesura usualment mitjançant el denominat factor de retenció o factor K , expressat com:

$$k_i = \frac{t_i - t_0}{t_0}$$

Equació 1. Càlcul del factor de retenció (k).

t_0 = Temps mort, és a dir el temps de retenció de la pròpia fase mòbil, o dit d'una altra manera el temps que tarda el màxim volum de fase mòbil capaç de ser contingut en la columna en sortir d'ella.^[4]

El resultat de la utilització de certs paràmetres, conjuntament amb les característiques de la fase mòbil i la fase estacionaria, donarà lloc a una separació massa petita, bona o massa gran. Si la interacció dels analits amb la columna és mínima, serà impossible separar-los, per altra banda, si la retenció és molt elevada, no solament el factor temps limitarà la aplicabilitat del procediment sinó que també provocarà un eixamplament de les bandes obtingudes.^[3]

Normalment, per conveni s'estableix (i s'aconsella), que la polaritat del solut sigui aproximadament el valor mitjà de la polaritat de la columna i de la fase mòbil, de manera que normalment se solen combinar fases mòbils polars amb columnes apolars o viceversa. Aquesta condició es pot expressar de la següent manera:

$$\delta_i = \frac{\delta_m + \delta_s}{2}$$

Equació 2. Càlcul del paràmetre de solubilitat del solut.

δ_i = Paràmetre de solubilitat (polaritat) del solut

δ_m = Paràmetre de solubilitat (polaritat) de la fase mòbil

δ_s = Paràmetre de solubilitat (polaritat) de la fase estacionaria

Tot i aquesta equació, cal tenir en compte que no sempre parlarem de dissolvents purs sinó ben al contrari, gairebé sempre treballarem amb mescles de dissolvents. El paràmetre de solubilitat resultant es podrà extreure de la següent equació:

$$\delta_m = \sum_j \delta_j * \varphi_j$$

Equació 3. Variació de l'equació 2 per casos on s'usi mescla de dissolvents.

φ_j = Fracció en volum de cada dissolvent

Fins ara hem parlat de retenció, però aquesta va lligada a un altre paràmetre molt important, la selectivitat.

Totes les mesures de selectivitat es basen en quantificar la retenció relativa (factor de separació) entre soluts per a un cert sistema cromatogràfic, és a dir, medir fins a quin punt el



sistema distingeix dos soluts. Per tant, la retenció relativa de dos soluts i l'èxit de la separació d'aquests depèn de la diferència de polaritat entre la fase mòbil i la fase estacionària.

La conclusió fonamental arribats fins aquest punt és que no podem considerar aïlladament retenció i selectivitat. Una separació i anàlisi satisfactoris s'aconseguiran sempre que les dues variables estiguin optimitzades.

Una de les formes més usual per expressar l'eficàcia d'una columna cromatografia és el nombre de plats teòrics, que ve definit per la següent equació^{[3][4]}:

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 = 16 * \left(\frac{t_r}{w}\right)^2$$

Equació 4. Càlcul del nombre de plats teòrics.

El número de plats teòrics, és una manera efectiva d'estimar el grau d'eixamplament d'una banda cromatogràfica. Com es pot veure, l'equació presentada anteriorment no té en compte el volum mort de la columna, per la qual cosa les dimensions d'aquesta no es veuen reflectides. Aquest fet és important, degut a que el valor de N obtingut no resultarà útil si busquem una finalitat comparativa.

És per això que l'equació anterior rep la següent modificació, i passem a anomenar N com N_{eff} , una mesura independent de les característiques físiques de la columna (com es pot observar el factor de retenció (k) ens serveix per relacionar els dos paràmetres.)

$$N_{eff} = 16 \left(\frac{t'_r}{w}\right)^2 = \left(\frac{k}{k+1}\right)^2 * N$$

Equació 5. Equació 4 expressada de manera que no depèn de les dimensions de la columna.

Independentment d'aquesta equació podem analitzar qualitativament l'eficàcia esperada en cromatografia líquida. Aquesta serà molt més baixa que en CG, bàsicament degut al considerable augment de viscositat de la fase mòbil i la seva lenta difusió.

Tot aparell d'HPLC té un gran nombre de parts i dispositius, però consta bàsicament d'aquests elements essencials:

- Un sistema capaç de gestionar i impulsar la fase mòbil
- La columna cromatogràfica
- Un sistema que permeti la inserció de les mostres
- Un sistema de detecció
- Un sistema capaç d'informar del resultat de la separació.

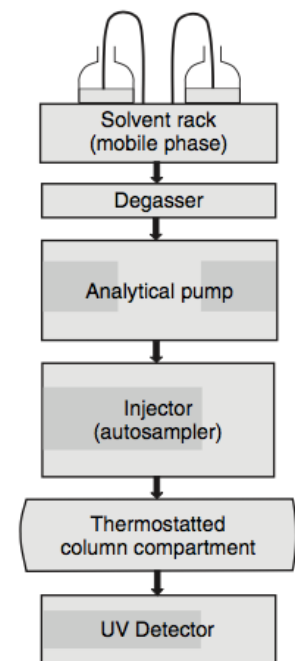


Figura 2. Esquema general d'un aparell d'HPLC modular^[4].

Tot i això, considero que hi ha 3 elements diferenciats en importància respecte la resta, dels quals dono informació general a continuació



2.2.1.2 Fase mòbil

La fase mòbil és el solvent que s'encarrega de transportar el/s analits a través de la columna cromatogràfica (fase estacionaria). Normalment els solvents més emprats en HPLC són l'aigua, el Metanol i l'Acetonitril. Tots tres són polars, i jugant amb les seves concentracions podem obtenir una fase mòbil més o menys polar.

A partir del paràmetre de solubilitat es pot arribar a calcular la polaritat d'una mescla de dissolvents. En principi, dues mescles amb solvents diferents que tinguin una polaritat igual, tindran també la mateixa força d'elució.^[3]

Una bona fase mòbil ha de complir els següents requeriments:

- No ha d'interaccionar amb la fase estacionaria.
- Ha de ser compatible amb el detector
- No ha de donar senyal

Per escollir els solvents adequats, cal fixar-se en els anàlits, la columna, així com el detector del qual disposem per tal de no tenir variacions en la línia base.

Un altre factor a tenir en compte es la estabilitat. En moltes ocasions, es pot afegir un àcid per a controlar el pH i millorar l'estabilitat. També es important desgasificar bé la fase mòbil. En canviar la pressió, la solubilitat dels solvents varia, fet que pot provocar distorsions en la línia base.

2.2.1.3 Fase estacionaria

La fase estacionaria és possiblement l'element més important del cromatògraf. Tanta és la seva importància que depenent del tipus de columna que usem, la tècnica cromatogràfica canvia completament. Podem parlar de cromatografia d'intercanvi iònic, cromatografia d'exclusió per mida etc.

En aquest projecte s'ha usat una columna químicament lligada, i concretament s'ha treballat amb fase invertida. Tot i això, i independentment del tipus de columna que estiguem usant, l'empaquetat d'una columna ha de^{[3][4]}:

- Tenir una mida de partícula ben definida i per tant, trobar-se en una distribució el més estreta possible.
- Ser rígid i disposar de suficient resistència mecànica per evitar que la columna col·lapsi durant l'empaquetament o qualsevol operació normal de la columna.
- Ser químicament resistent i estable en front a la fase mòbil.

La fase estacionaria, igual que la fase mòbil també pot variar en polaritat. Si treballem amb una columna polar estem parlant de fase normal, mentre que si usem una fase estacionaria apolar, estem parlant de fase invertida. Aquesta última és la mes usada.



Els factors més importants a l'hora d'escollir una columna són:

- Llargada de la columna
- Diàmetre intern
- Mida de partícula
- Pressió suportada

Generalment, la disminució de la llargada, el diàmetre intern o la mida de partícula de la columna s'associa a aparells molt més sensibles i de cost més elevat. A més, la variació d'un dels paràmetres anteriors, sol anar lligat a la resta, per exemple, treballar amb partícules més petites dona lloc a millors eficàcies i permet treballar amb columnes més curtes, tot i això cal tenir en compte que es produirà un augment de la pressió que l'aparell ha de ser capaç de suportar.

2.2.1.4 Detector

L'últim dels 3 elements essencials de qualsevol aparell d'HPLC és el detector. L'objectiu del detector és reconèixer quan una substància elueix de la columna per tal de monitoritzar el canvi en la composició de la fase mòbil i transformar-ho en un senyal elèctric mesurable.

Un detector ha de complir les següents característiques^[5]:

- Ha de ser selectiu, és a dir, ha de ser capaç de distingir l'anàlit de la resta de substàncies que podem trobar en la mostra.
- Ha de ser sensible, és a dir, ha de permetre detectar concentracions baixes
- No ha de generar soroll de fons, quan no hi ha mostra en la columna el nostre aparell no ha de detectar res.
- Ha de donar una resposta universal per tots els soluts
- No ha de contribuir en l'eixamplament de pics, clarament lligat amb la pèrdua de sensibilitat i selectivitat.
- No ha de ser destructiu, és a dir, no ha de degradar el compost que estiguem analitzant. Això és especialment important en aparells que tenen 2 detectors en sèrie, ja que normalment el segon és un masses que necessita obligatòriament fragmentar la molècula.

2.2.2 Instrumentació usada

Per a dur a terme el projecte s'ha usat un aparell d'HPLC modular. Tots els mòduls mencionats es troben comentats al detall a la pagina oficial de Shimadzu:



Figura 3. Fotografia de l'aparell d'HPLC usat per a dur a terme el projecte.

- Sistema de bombeig: LC-20AD^[6]
- Sistema de desgasificació: DGU-20As
- Sistema de mostreig automàtic: SIL 20-A
- Sistema de detecció (Photodiode array detector (PDA)): SPD-M20A
- Forn de la columna: CTO-10AS VP
- Columna: Thermo Scientific Hypersil gold, 250x4.6 (mm), dp: 5µm.
- Fases mòbils disponibles: Aigua i Metanol qualitat HPLC.

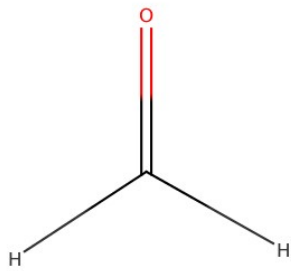
El detector és possiblement l'element més determinant de l'aparell, ja que és el que ens obliga a derivar el Formaldehid per detectar-lo. El detector PDA o DAD, consta d'un patró de díodes i un prisma. A mesura que la mostra arriba al detector, aquesta rep una llum d'entre 200-1100 nm i qualsevol llum transmesa a través de la mostra arriba al prisma on es dispersa, de manera que la llum de diferents longituds d'ona es absorbeix pels díodes. Aquest succés s'utilitza per construir un espectre d'absorció. Alternativament, en la majoria d'aquests detectors es pot seleccionar un únic díode per controlar una longitud d'ona específica.^[4]

2.3 El Formaldehid

Com he comentat amb anterioritat el meu treball es basarà en la determinació de Formaldehid, per la qual cosa, a continuació exposo informació de les seves dades físiques i químiques, els perills de la seva manipulació, una breu explicació dels motius pels quals genera Formaldehid en les emulsions polimèriques, i per últim, l'objectiu de fer reaccionar el Formaldehid amb el reactiu de NASH.



2.3.1 Dades físiques i químiques



Formula empírica: CH₂O

Massa molecular: 30,03 g

Densitat líquida (-20 °C): 0,8153 g/cm³

Densitat relativa del gas: 1,04

Punt d'ebullició: -19,2 °C

Punt de fusió: entre -92 °C i -118 °C

Altres noms: Metanal, metil aldehyd, óxid de metilè

Límits d'explosivitat: 7-73% de volum en aire

Temperatura d'auto-ignició: 430 °C

Solubilitat en aigua: molt elevada ^{[7][8]}

Figura 4. Estructura molecular del Formaldehid.

El Formaldehid és un compost orgànic molt reactiu de la família dels aldehyds que es presenta com un gas incolor. El seu principal mètode de formació és a partir de l'oxidació del metanol. Es troba present a nivells traça en un gran nombre de productes per al consum humà, des de mobles fins a adhesius. Les seves aplicacions més importants es troben en el camp dels desinfectants i fixadors histològics.

2.3.2 Fitxa de seguretat i perillositat

El Formaldehid té una olor penetrant característica i en nivells alts pot produir una sensació de cremor als ulls, el nas i els pulmons.

Els símptomes més comuns d'exposició són irritació ocular, nasal, a la gola i llagimeig, sempre que l'exposició sigui d'entre 0,5-3 ppm. El NIOSH exposa que una concentració de Formaldehid de 20 ppm en aire representa un perill immediat per a la vida.^[9]

Tot i això, els símptomes més preocupants del Formaldehid són els que es produeixen a mitjà i llarg termini. Alguns estudis d'éssers humans exposats a quantitats relativament baixes de Formaldehid en l'aire de la feina van concloure que aquesta exposició augmentava considerablement el nombre de casos de càncer de nas i de gola^[9]. Altres estudis realitzats pel CIIT (Chemical Industry Institute of Toxicity) van demostrar un augment d'un 32% en morts produïdes per càncer de pulmó en persones que havien estat 20 anys o més exposades al Formaldehid. ^[10] L'Agència Internacional per a la Investigació del Càncer (IARC)^[11] i l'EPA^[12] l'han classificat com agent carcinogènic en éssers humans.

Sempre hi ha petites quantitats de Formaldehid en l'aire, per la qual cosa la exposició és gairebé inevitable. El Formaldehid que es troba en l'ambient s'origina tant per fonts naturals com per activitats humanes, sent aquesta la font principal. En les zones poc poblades la concentració es d'aproximadament 0.2 ppb a l'atmosfera. En àrees urbanes, la concentració varia enormement, des de 2-20 ppb.. Tot i això, l'aire que es respira dins de qualsevol vivenda sol contenir més quantitat de Formaldehid que l'aire exterior, això es degut, (tal i com s'ha



comentat breument en l'apartat 2.3.1) a que aquesta substància es troba en mobles, pintures i una gran quantitat de productes per a l'ús humà.

Cal tenir també en compte la alta solubilitat del Formaldehid en aigua, cosa que també suposa una via d'exposició important.

En els següents pictogrames es mostra visualment la toxicologia del Formaldehid.



Figura 5. Pictogrames toxicologia del Formaldehid^[13].

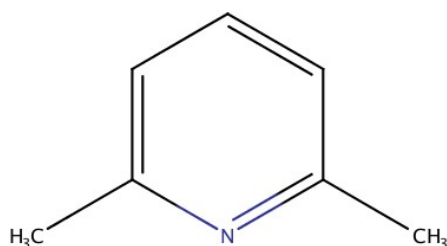
2.3.3 Formació de Formaldehid en emulsions polimèriques

El Formaldehid es forma com a subproducte en una gran quantitat de reaccions orgàniques. Aquest és el principal motiu pel qual es genera en emulsions polimèriques. En la majoria de casos els monòmers de partida a partir dels quals s'aconsegueixen els polímers finals, contenen un percentatge determinat d'impureses que desencadenen reaccions secundàries paral·leles a la polimerització desitjada, deixant en molts casos com a subproducte el Formaldehid. Especialment i com a monòmer més destacat que desencadena formació de Formaldehid trobem l'Acetat de Vinil. L'ús de biocides (substàncies afegides a les emulsions per evitar activitat biològica) també contribueix d'una forma important en la formació d'aquest.

Per altra banda, l'ús de medis de reacció dràstics en moltes ocasions, o la presència de metanol en el medi (que s'oxida a Formaldehid irremeiablement) de reacció també serien causes importants, de la mateixa manera que les condicions que s'indueixen a l'emulsió quan se li duu a terme la reacció redox.

2.3.4 Preparació de la 3,5-Diacetil-1,4-dihidrolutidina

La Lutidina es un compost heterocíclic i aromàtic que es presenta com un líquid incolor. És membre de la família de les metil-piridines, en el seu cas te les posicions 2 i 6 substituïdes amb un metil.



Formula molecular: C₇H₉N

Massa molecular: 107,156 g

Punt de fusió: -6°C

Densitat: 0,9252 g/cm³

Pressió de vapor (25°C): 5,65 mmHg

Solubilitat en aigua: 27%^[14]

Figura 6. Estructura molecular de la Lutidina.



Existeix una gran varietat de compostos derivats de la Lutidina, i una característica que presenten gairebé tots aquests és que tenen activitat en l'espectre UV-VIS. Degut a que el detector del qual dispo és un detector de díodes, necessitem que el compost que vulguem detectar tingui activitat en aquesta regió de l'espectre, característica que no compleix el Formaldehid. Es per això que mitjançant l'ús del reactiu de NASH (del qual s'explica la seva preparació en l'apartat 3.3.1) es prepara un compost derivat de la Lutidina, la 3,5-Diacetil-1,4-dihidrolutadina, activa en l'espectre UV-VIS i que per tant serà detectable i en conseqüència quantificable. La reacció que es produeix es la següent [15]:

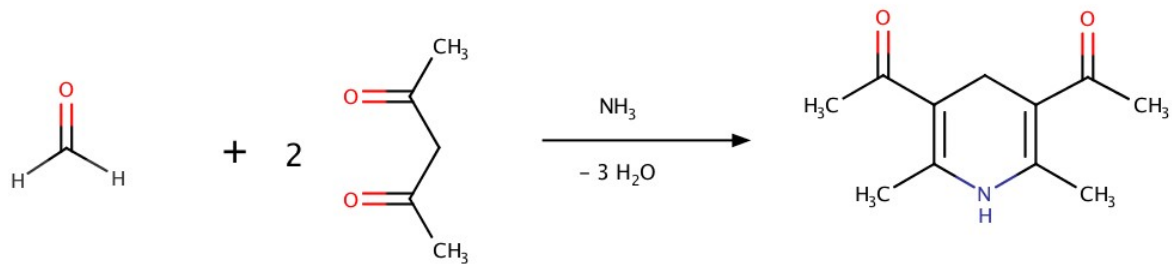


Figura 7. Reacció de derivació del Formaldehid [16].

El compost resultant presenta un color groc intens i presenta la màxima absorbància a una longitud d'ona de 410 nm.

La pròpia empresa va ser qui em va proporcionar l'informació d'un mètode que s'havia usat per *Celanese* a Alemanya, on usaven aquest reactiu per a derivar Formaldehid procedent de diferents fonts, com tèxtils o mostres aquoses. També em van proporcionar l'interval de linealitat que hauria d'obtenir de la 3,5-Diacetil-1,4-dihidrolutadina en la seva determinació per HPLC.

3 Experimental

3.1 Objectiu

La finalitat d'aquest treball, com s'ha comentat anteriorment, és la posada en marxa d'un mètode per determinar Formaldehid en emulsions polimèriques de base aquosa fabricades a *IQOXE*. Per a tal objectiu caldrà:

- Entendre i aplicar el fonament teòric de funcionament d'un aparell d'HPLC.
- Dur a terme un procés de conversió de l'anàlit en un derivat per a poder detectar-lo.
- Optimitzar el mètode, tenint en compte que la matriu de les emulsions és molt complexa en la majoria d'ocasions.
- Calibrar i validar el mètode.
- Posar-lo en marxa per la seva finalitat principal: la determinació de Formaldehid en productes de planta i analitzar els resultats.





3.2 Reactius i material

En el següent apartat llisto tot el material, solvents i reactius usats. No incloc l'aparell d'HPLC ni les seves parts, les quals ja han estat comentades anteriorment.

Fase mòbil:


- Metanol MERCK LiChrosolv
- Aigua MERCK qualitat HPLC
- Àcid acètic glacial MERCK

Fase mòbil		
	Metanol Merck LiChrosolv (qualitat HPLC)	Àcid acètic glacial MERCK
Perillositat		
Manipulació	Bata i ulleres. Guants. Guardar en un espai suficientment ventilat.	Bata i ulleres. Treballar dins la campana d'extracció. Guants. Guardar dins d'un espai preparat per a productes inflamables.

Taula 2. Perillositat i manipulació de substàncies químiques usades com a fase mòbil¹³⁾

Preparació de patrons:

- Matrassos aforats de 10 mL
- Matrassos aforats de 100 mL
- Matràs aforat de 1000 mL
- Pipetes aforades d'1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL.
- Solució de Formaldehid (MERCK) en aigua (37%) estabilitzada amb un 10% de Metanol

Preparació de patrons	
	Solució de Formaldehid en aigua (37%)
Perillositat	
Manipulació	Bata i ulleres.





	<p>Guants. Guardar en un espai suficientment ventilat. Treballar sempre dins la campana d'extracció. Treballar amb mascareta.</p>
--	--

Taula 3. Perillositat i manipulació de substàncies químiques usades per a preparar els patrons^[13]

Preparació del reactiu de NASH :

- Matràs aforat de 500 mL
- Àcid acètic glacial MERCK
- Acetat d'amoni
- 2,4- Pentadiona (Acetilacetona) MERCK

Preparació del reactiu de NASH		
	Acetat d'amoni	2,4- Pentadiona
Perillositat		
Manipulació	Bata i ulleres. Guants.	Bata i ulleres. Treballar dins la campana d'extracció. Guants. Guardar dins d'un preparat per a productes inflamables.

Taula 4. Perillositat i manipulació de substàncies químiques usades per a preparar el reactiu de Nash^[13]

Preparació de les mostres:

- Emulsió polimèrica
- Xeringues
- Filtres de xeringa (0,1 micròmetres)
- Centrifugadora Heraeus Biofuge Stratos
- Aigua ultra-pura
- Matrassos aforats de 100 ML
- Bany d'ultrasons Branson 1200
- Thermo Finnipipette (micropipeta)

Validació del mètode:

- Material de referència certificat de Sigma Aldrich, solució de Formaldehid en aigua al 37% estabilitzada amb un 10% en Metanol. (La perillositat i manipulació d'aquest MRC és la mateixa que en el cas de la solució estàndard de Formaldehid).



3.3 Procediment experimental

El procediment experimental es basarà en la optimització en la preparació dels patrons i de les mostres (procediment que ha estat especialment difícil). Pel que fa a les variables cromatogràfiques, aquestes no han cobrat gaire importància, ja que al poder obtenir cromatogrames a una lambda concreta, i al estar tractant amb només un anàlit, la selectivitat serà gairebé sempre adequada. En tots els cromatogrames sembla aparèixer una petita interferència que es veu reflexada en la següent imatge. Apareix tant en les mostres, com en els patrons, com en el blanc, a un temps de retenció de 3,9 min i la seva posició no canvia si canviem la polaritat de la fase mòbil, fet que fa pensar que pot ser una petita tara de la columna cromatogràfica, possiblement degut a l'ús d'aquesta.

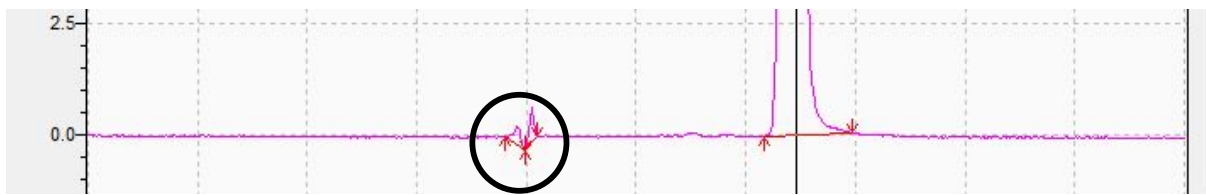


Figura 8. Interferència present en tots els cromatogrames realitzats.

Aquesta petita interferència és la que ha fet de guia en una petita optimització de les variables cromatogràfiques. A la dreta es pot veure el pic que resulta del derivat del Formaldehid. L'interferència dona un pic extremadament petit en comparació al pic de l'anàlit. Un patró d'1 ppm dona un pic d'una intensitat aproximada de 20 mAU, i tal com es pot veure en la imatge aquest pic té una intensitat inferior a 1 mA. Tot i que l'interferència és molt petita i si es trobés solapada amb el pic del Formaldehid no seria una gran font d'error, es va sacrificar el temps d'anàlisi (que després de l'optimització, segueix sent un temps relativament curt) en front una major selectivitat, la qual després d'evitar aquesta interferència es pot dir que es gairebé perfecta, com es comenta en l'apartat 4.3.1. Les condicions establertes, i que s'han usat en tots els anàlisis realitzats en aquest projecte són les següents:

- **Volum d'injecció:** 10 μ L
- **Flux:** 0,8 mL/min
- **Fase mòbil :** 50:50 Metanol/Aigua
- **Temps total d'anàlisi:** 10 minuts
- **Temperatura del forn:** 30°C
- **Temps de retenció obtingut:** 6,35 min.
- **Longitud d'ona (PDA):** 410 nm

Seguidament es va procedir al calibratge del mètode, prèviament havent determinat l'interval de linealitat (apartat 4.1)

Per últim es va procedir a la validació d'aquest i a la seva posada en marxa davant de situacions reals.



3.3.1 Preparació del reactiu de Nash

La preparació d'aquest reactiu és essencial per a l'èxit del procés, tal i com s'ha explicat en l'apartat 2.3.4. El procés s'ha mantingut invariable al llarg de tot el projecte, degut a que des d'un bon inici ha donat bons resultats.

Pesem 15.0 g d'Acetat d'Amoni dins d'un vas de precipitats i el dissolem amb aigua ultra pura. A continuació es transfereix la dissolució a un matràs aforat de 500 mL amb l'ajuda d'un embut. Seguidament s'afegeixen 0.3 mL d'Àcid Acètic glacial i deixem agitar 15 minuts amb un agitador magnètic. Per últim, afegim 0,6 mL d'Acetilacetona i enrasem fins a 500 mL.

Les concentracions usades d'ambdós reactius han estat una mica superiors a les marcades en color verd (concretament 0,011 M d'Acetilacetona i 0,38 M d'Acetat d'amoni), degut a que es la quantitat mínima dels dos reactius amb la que s'aconsegueix un bon percentatge de conversió del Formaldehid com es pot veure en la següent taula.:

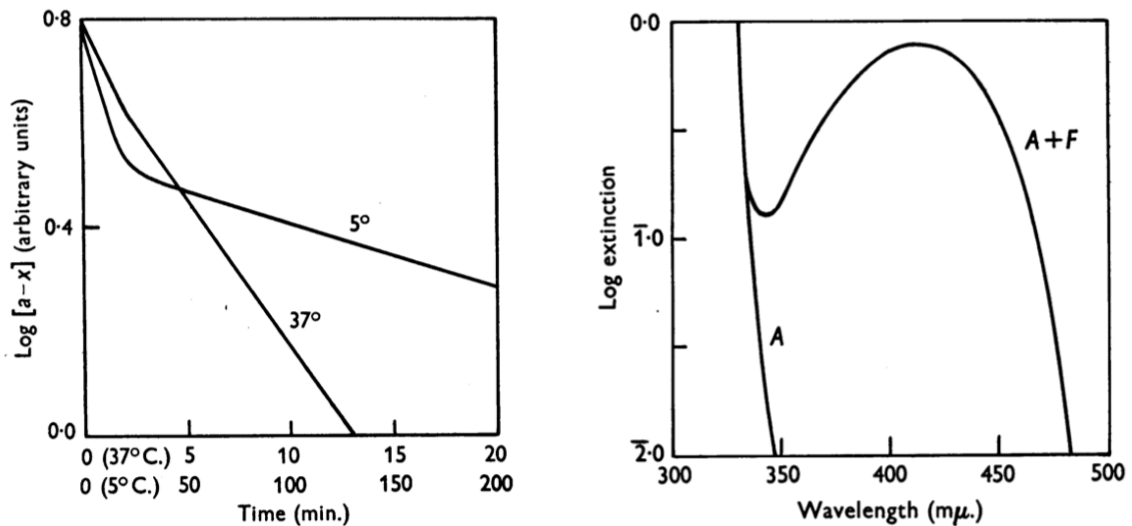
Molaritat Acetilacetona	Molaritat d'Acetat d'Amoni				
	3	1	0,33	0,1	0,033
0,1	99%	97%	94%	81%	44%
0,033	103%	100%	97%	88%	48%
0,01	103%	100%	100%	90%	51%
0,0033	102%	101%	98%	89%	53%
0,001	98%	98%	95%	79%	45%
0,00033	74%	88%	77%	61%	35%

Taula 5. Conversió del Formaldehid respecte les concentracions d'acetilacetona i acetat d'amoni usats en una mostra amb una concentració de Formaldehid de 5 ppm [15]

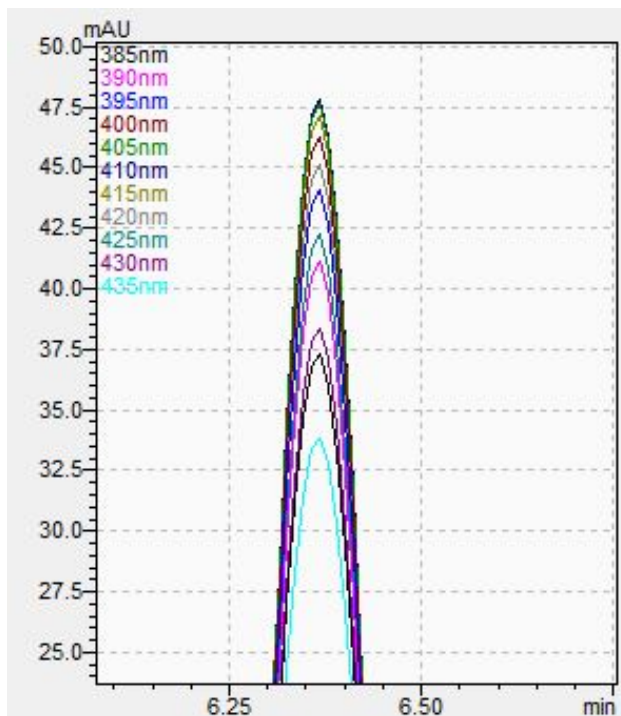
La dissolució s'ha mantingut a la nevera i s'ha renovat cada quatre setmanes.

A banda de usar concentracions adequades d'Acetat d'Amoni i Acetilacetona, s'estableix també que en tots els patrons o mostres, la meitat del volum total serà de reactiu de NASH, per assegurar un gran excés de reactiu que desplaci la reacció per complet cap al derivat del Formaldehid. Aquesta condició es va establir al principi del projecte, i al haver donat també bons resultats, no va ser necessari canviar-la.

Per altra banda, en gràfic de l'esquerra podem veure el gran efecte que té la temperatura en la velocitat a la que es produeix la reacció. És per això que la mostra s'introdueix al forn durant 30 minuts a 40 °C. En el de la dreta veiem una corba d'absorció a diverses lambdes. Veiem clarament que A+F (Acetilacetona + Formaldehid) presenta la màxima absorció a 410 nm.



Gràfic 1. A l'esquerra, conversió del Formaldehid respecte temps variant la temperatura. A la dreta, màxima absorptivitat del derivat de la Lutadina (A+F) [15].



Gràfic 2. Superposició de pics obtinguts del mateix patró en diferents longituds d'ona.

Complementàriament, es va dur a terme (amb el software del cromatògraf) una superposició del pic d'un patró obtingut a diferents longituds d'ona, fet que va confirmar que la màxima resposta, i per tant la longitud d'ona més adequada per treballar amb aquest compost es troba a 410 nm.

3.3.2 Preparació dels patrons

El procediment que es va seguir per a preparar els patrons que s'usen per calibrar el mètode és el següent:

Es va preparar una dissolució mare de 100 ppm (A) en un matràs d'1 litre, pesant 0,27 grams de la solució estàndard de Formaldehid al 37%. S'ha d'apuntar el pes exacte, ja que aquesta és la dissolució mare a partir de la qual es prepararan tots els patrons.



$$\text{Concentració sol. A} = 0,27g * 0,37 \frac{1000mg}{1g} * \frac{1}{1L} = 100 \text{ ppm}$$

Equació 6. Càlcul de la concentració de Formaldehid de la solució A.

D'aquesta dissolució (A) s'en va preparar un altra (B) en un matràs de 100 mL, de manera que s'obté una dissolució 10 vegades menys concentrada.

$$\text{Concentració sol. B} = 100 \text{ ppm} * \frac{10}{100} = 10 \text{ ppm}$$

Equació 7. Càlcul de la concentració de Formaldehid de la solució B.

De la mateixa dissolució (A), s'en va preparar un altra diluïda a la meitat en un matràs de 100 mL.

$$\text{Concentració sol. C} = 100 \text{ ppm} * \frac{50}{100} = 50 \text{ ppm}$$

Equació 8. Càlcul de la concentració de Formaldehid la solució C.

La concentració dels patrons preparats es veu exemplificada en la següent taula. Tots ells van ser preparats en matrassos de 10 mL, motiu pel qual la suma de totes les columnes independentment de la concentració suma 10 mL. També es pot apreciar la presència fixa de 5 mL de reactiu de Nash, és a dir la meitat del volum total:

Patró	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mL de solució B	1	2	3	4	5	1	2	3	4	0
mL de solució C	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2
mL Aigua ultra-pura	4	3	2	1	0	3	2	1	0	3
mL Reactiu Nash	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ppm Formaldehid	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Taula 6. Preparació i concentració dels patrons.

Un cop preparats, els patrons es deixen dins d'un forn a 40°C durant 30 minuts i després es deixen refredar durant 50 minuts abans d'analitzar-los. Aquest pas assegura la reacció de tot el Formaldehid amb el reactiu de Nash. Un cop finalitzat el procés es transfereixen 1,5 mL de cada patró en vials de cromatografia i seguidament s'analitzen.

En la següent fotografia es pot apreciar el color groc que adopten les solucions preparades un cop realitzat tot el procediment anterior.

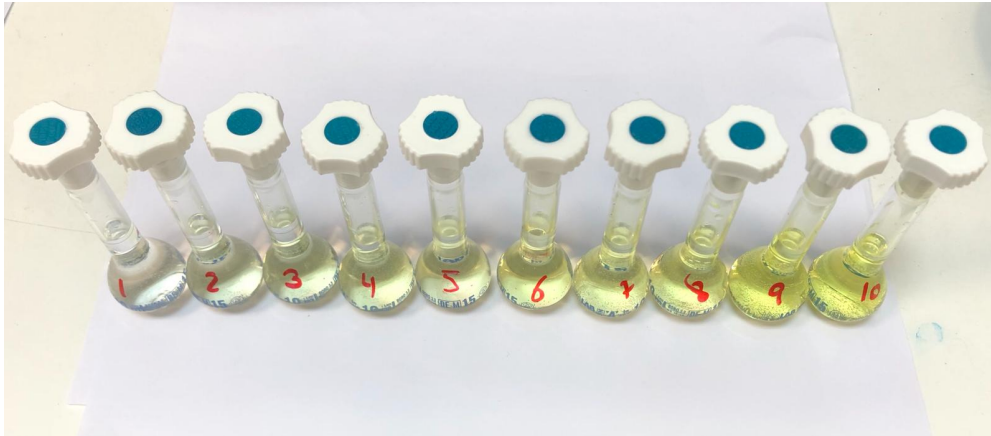


Figura 9. Patrons llestos per a ser a ser analitzats.

Els patrons van ser usats pel calibratge del mètode, usant el procediment que s'explica en l'apartat 4.2.

La concentració dels patrons de 1-10 ppm es troba justificada en l'apartat 4.1, amb la determinació de l'interval de linealitat del mètode.

3.3.2.1 Optimització de la preparació dels patrons

Prèviament a la preparació dels patrons tal i com s'ha explicat en l'anterior apartat, es van preparar patrons usant les solucions que es presentaran a continuació. El motiu pel qual es va intentar preparar els patrons d'aquesta manera va ser per intentar minimitzar l'error comés en pesar petites quantitats de dissolució estàndard (0,27 g). Fent-ho d'aquesta manera, totes les mostres es preparen a partir d'una mateixa dissolució mare (A) molt concentrada, fet que en la meua opinió suposaria menor error a l'hora de preparar els patrons, fet que després va resultar ser erroni. A més es van intentar establir relacions entre els patrons, de manera que es van preparar 4 dilucions per a assegurar que els patrons 6-10 fossin exactament 10 vegades més concentrats que els patrons 1-5.

Solució de Formaldehid A: Pesem 10 g de la dissolució estàndard al 37%, els transvasem a un matràs de 100 mL i enrasem amb aigua ultra-pura . S'ha d'apuntar el pes exacte, ja que aquesta és la dissolució mare de totes les que venen a continuació.

$$\text{Concentració sol. A} = 10g * 0,37 * \frac{1000mg}{1g} * \frac{1}{0,1L} = 37.000 \text{ ppm}$$

Equació 9. Càlcul de la concentració de Formaldehid de la solució A.

Solució de Formaldehid B: Pipetegem 10 mL de la solució A en un matràs aforat de 1000 mL i enrasem.

$$\text{Concentració sol. B} = 37.000\text{ppm} * \frac{10}{1000} = 370 \text{ ppm}$$

Equació 10. Càlcul de la concentració de Formaldehid la solució B.



Solució de Formaldehid C: pipetegem 5 mL de solució B en un matràs aforat de 100 mL i enrasem.

$$\text{Concentració sol. C} = 370\text{ppm} * \frac{5}{100} = 18,5 \text{ ppm}$$

Equació 11. Càlcul de la concentració de Formaldehid de la solució C.

Solució de Formaldehid D: pipetegem 5 mL de solució B en un matràs aforat de 1000 mL i enrasem.

$$\text{Concentració sol. D} = 370\text{ppm} * \frac{5}{1000} = 1,85 \text{ ppm}$$

Equació 12. Càlcul de la concentració de Formaldehid de la solució D.

Els patrons es van preparar tal i com es mostra en la següent taula:

Patrò	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mL de solució D	1	2	3	4	5	0	0	0	0	0
mL de solució C	0	0	0	0	0	1	2	3	4	5
mL Aigua ultra-pura	4	3	2	1	0	4	3	2	1	0
mL Nash	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ppm Formaldehid	0,19	0,37	0,56	0,74	0,93	1,86	3,72	5,58	7,44	9,30

Taula 7. Taula de preparació i concentració dels patrons prèvia a ser optimitzada.

En vista dels mals calibratges obtinguts , es va procedir a preparar patrons d'una manera alternativa (procediment que va resultar exitós (apartat 3.2.2)) amb els objectius següents:

- Partir d'una solució mare no tant concentrada. Es sacrificarà treballar amb pesos grans per obtenir valor enters de concentració en ppm.
- Es reduirà el nombre de solucions mare a una, de manera que si es comet un error en la preparació de la primera solució aquest no es multipliqui.

3.3.2.2 Optimització de l'anàlisi dels patrons

Un dels factors que es va estudiar és el temps que cal deixar reposar el patró abans de que sigui analitzat. En un principi, el temps a l'estufa ha de ser suficient per a que tot el Formaldehid reaccioni donant la 3,5-Diacetil-1,4-dihidrolutadina . Tot i això es van dur a terme certes proves per assegurar-se de que això es complia.

Es van preparar 3 patrons (1 ppm, 5 ppm, 10 ppm de Formaldehid). Un cop trets de l'estufa, es van deixar a temperatura ambient. Es van deixar reposar 20 minuts degut a que és el temps aproximat que tarda el vial en refredar-se (aquest és un temps que no podem estalviar-nos), i seguidament es van analitzar a temps 20 min, 30 min, 40 min i 50 min, tots ells respecte el moment en el que el vial es va extreure de l'estufa.

L'objectiu va ser determinar si la mesura es mantenia estable en el temps, cosa que significaria que la reacció del Formaldehid ja s'havia produït per complet i que durant el temps de repòs no s'estava generant derivat. En cas que la mesura no sigui estable al principi, cal



determinar a partir de quin punt (temps) si que ho és, i aquell serà el temps de repòs establert per als patrons. La prova es va realitzar per duplicat i els resultats van ser els següents:

Patró 1 ppm	[ppm] 1	[ppm] 2	Patró 5 ppm	[ppm] 1	[ppm] 2
Mesura 1 (20 min)	0,99	1,11	Mesura 1 (20 min)	4,56	4,37
Mesura 2 (30 min)	1,01	1,15	Mesura 2 (30 min)	4,89	4,80
Mesura 3 (40 min)	0,97	1,09	Mesura 3 (40 min)	4,95	4,91
Mesura 4 (50 min)	1,05	1,09	Mesura 4 (50 min)	4,91	4,87

Patró 10 ppm	[ppm] 1	[ppm] 2
Mesura 1 (20 min)	9,77	9,31
Mesura 2 (30 min)	9,98	9,70
Mesura 3 (40 min)	10,05	9,87
Mesura 4 (50 min)	10,01	9,80

Taula 8. Dades extretes de l'anàlisi de patrons a diferents temps de repòs.

Sembla ser que en el patró d'1 ppm, la concentració es va mantenir estable en totes les mesures. No obstant, en els patrons més concentrats veiem que la concentració obtinguda en la primera mesura augmenta significativament després de 20 min (40 min), mesura que després es manté estable. En vista d'aquest resultat, es va determinar que tots els patrons/mostres analitzades es deixaran reposar un mínim de 40-50 minuts abans de ser analitzats. Aquest estudi es va fer posteriorment al calibratge del mètode. El primer calibratge es va dur a terme deixant reposar els patrons dues hores.

3.3.3 Preparació de les mostres

Es pesen els grams d'emulsió polimèrica (normalment un 50% de les emulsions es troba en forma de sòlid dispers) desitjats depenent del factor de dilució que es vulgui aplicar, directament dins d'un matràs aforat de 100 mL. Cal apuntar el pes amb exactitud. Diluïm la mostra fins a 50 mL aproximadament. Deixem la mostra en el bany d'ultrasons durant 15 minuts per a dispersar completa i homogèniament la mostra, seguidament enrasem fins a 100 mL i agitem vigorosament.

A continuació, transferim 10 mL de la solució preparada a un tub de centrifuga i centrifuguem sota les condicions comentades en l'apartat 3.3.3.1. El sèrum ha de ser completament transparent, si no ho és cal deixar centrifugar més estona.

Un cop realitzat tot el procés, omplim la meitat d'un vial de cromatografia (0,75 mil·lilitres) amb el sèrum extret de la centrifugació. Per extreure el sèrum ens ajudem d'una xeringa convencional amb un filtre de 0,1µm per evitar el pas de qualsevol partícula sòlida. Seguidament i amb l'ajuda d'una micro-pipeta, transferim els 0,75 mil·lilitres al vial. A continuació afegim 0,75 mil·lilitres del reactiu de NASH. De la mateixa manera que els patrons, el vial es deixarà a l'estufa durant 30 minuts a 40°C i es deixarà reposar durant 50 minuts a temperatura ambient abans de ser analitzat al cromatògraf.



En la següent imatge es mostra l'abans i el després un vial al qual se li ha realitzat tot el procediment anterior:

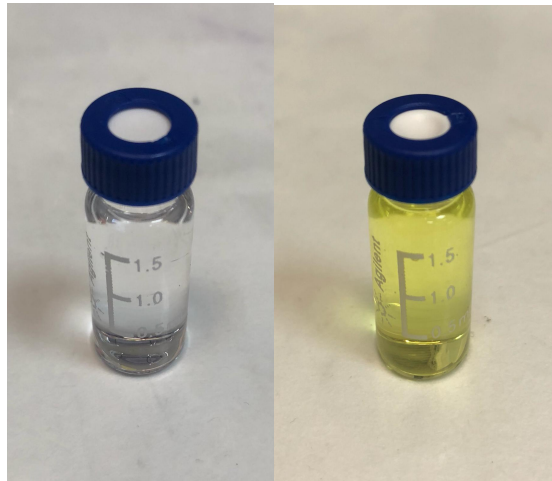


Figura 10. Abans: vial previ a ser col·locat al forn, Després: vial colorejat previ a la seva injecció.

3.3.3.1 Optimització de la preparació de les mostres

Les emulsions polimèriques consten d'un percentatge aproximat de 50% de sòlid dispers en aigua, i a més solen tenir viscositats molt superiors a l'aigua. Per a poder analitzar mostres al cromatògraf, cal extreure el Formaldehid de manera que no quedi cap resta de partícula sòlida en suspensió, fet que impediria l'anàlisi per HPLC. És per això que es va decidir diluir i centrifugar les mostres abans de que fossin analitzades.

El primer que es vol comprovar és si l'èxit de la centrifugació depèn de la dilució que se li faci a la mostra (evidentment, la quantitat de emulsió afegida sí que influirà en la centrifugació, però es vol veure fins a quin punt). Ens interessa que no en depengui, ja que en mostres on la concentració de Formaldehid sigui indetectable, o per sota del límit de quantificació, es pot procedir a obtenir una mostra més concentrada simplement realitzant una dilució més petita de la emulsió en qüestió. Per aquest motiu es van agafar 3 productes de planta (IQLIT Q, IQLIT E, IQLIT M) als quals se'ls va aplicar un factor de dil·lució de 200, 100 i 5. Totes les dilucions es van preparar en matrassos de 100 i es van deixar dins un bany d'ultrasons durant 15 minuts, previs a transvasar-los als tubs de centrifugació. Els resultats de les centrifugacions van ser els següents (l'anàlisi es va realitzar per triplicat sota unes condicions de 15.000 rpm, 20°C i 40 min, donant el mateix resultat en les 3 ocasions):



IQLIT Q:

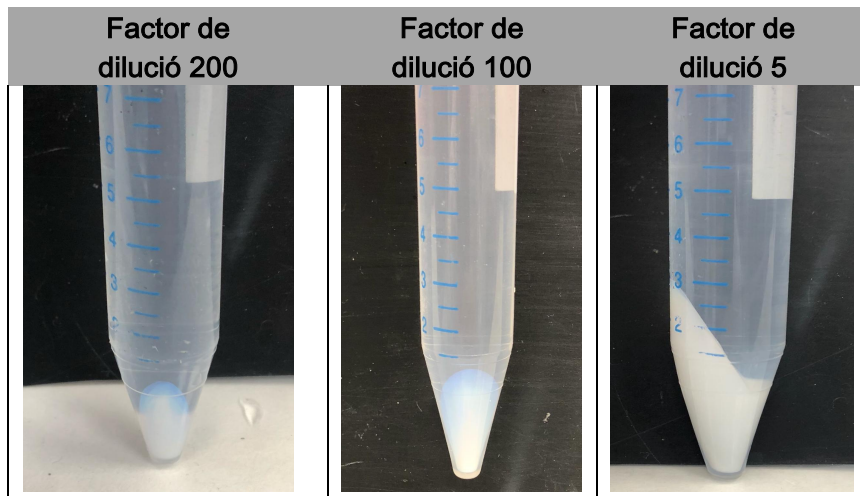


Figura 11. Mostres correctament centrifugades d'IQLIT Q.

IQLIT E:

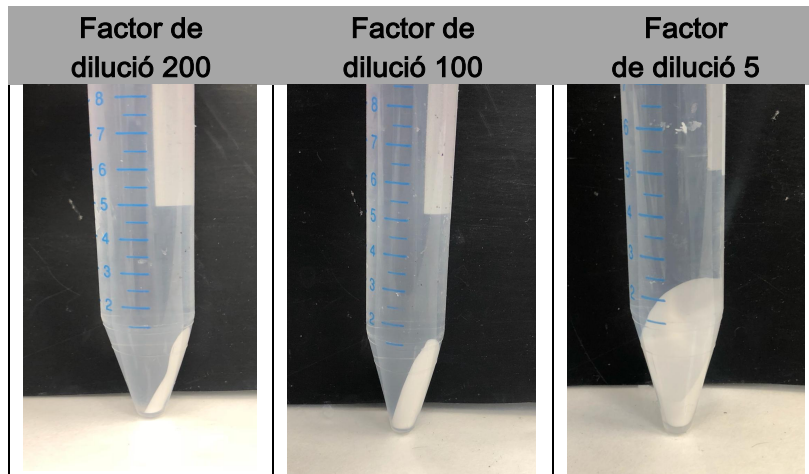


Figura 12. Mostres correctament centrifugades d'IQLIT E.

IQLIT M:

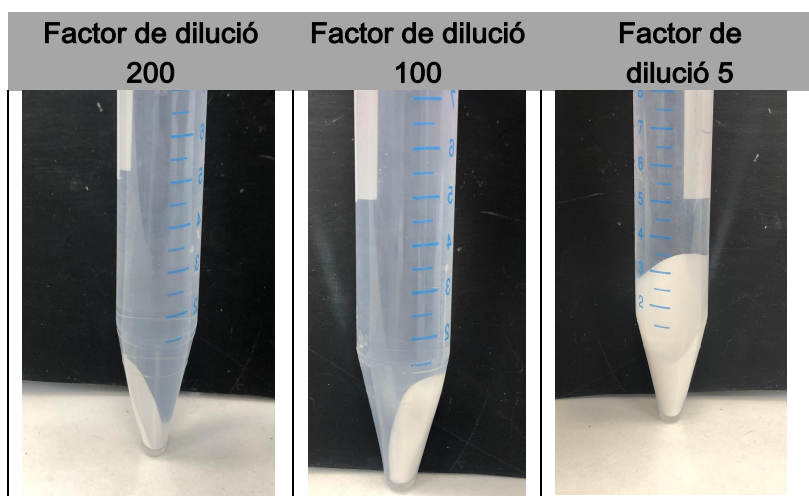


Figura 13. Mostres correctament centrifugades d'IQLIT M.



La conclusió extreta és que en principi, qualsevol dilució superior a 5, s'ha de separar correctament, i que per tant, la quantitat d'emulsió afegida sembla que no afecta en la correcta centrifugació de la mostra (o almenys no ho fa fins al factor 5). Apuntar que en les imatges el sèrum sembla tèrbol, però es degut a que el plàstic no és del tot transparent, sinó que té un caire. Per tant, cal primer comprovar que tenim dues fases ben separades, i després, extraient el sèrum del tub, comprovar que sigui completament transparent.

Per altra banda, una de les característiques que presenten les emulsions produïdes a la planta, és una gran variabilitat pel que fa a la viscositat i diàmetre de partícula. Aquest serà el segon paràmetre a estudiar. Es va comprovar si les condicions de centrifugat idònies eren les mateixes per totes les mostres, o si pel contrari, caldria adaptar el centrifugat al tipus de mostra. A priori, el factor que provocarà diferències en la separació serà el diàmetre de partícula, ja que al diluir la mostra, les viscositats acaben sent molt semblants entre elles i no seran un paràmetre determinant. Es van escollir 9 productes de planta, de densitats i diàmetre de partícula diversos. Es van introduir totes les mostres (amb un factor de dilució de 10) sota les mateixes condicions de centrifugació. Un cop finalitzada cada centrifugació, es va comprovar cada tub, i aquells en que la separació va ser exitosa es van retirar. Aquells en que la separació no va ser adequada es van preparar de nou seguint tot el procediment comentat amb anterioritat i es van tornar a introduir en unes noves condicions. S'han realitzat proves des de 4.000 fins a 15.000 rpm, des de 5 minuts fins a 45 minuts i des de 20°C fins a 40°C en un gran nombre de combinacions. El motiu pel qual no es va sobrepassar de les 15.000 rpm és que els tubs de centrifugació es degradaven molt, fins i tot alguns arribant-se a trencar. En la següent taula, s'adjunten els productes estudiats, amb la seva corresponent viscositat i diàmetre de partícula així com les condicions que van ser necessàries per a la seva correcta centrifugació (considerant correcta centrifugació la mostrada en imatges anteriors):

Producte	Diàmetre de partícula (nm)	Viscositat (MPas)	r.p.m	Temps (min)	Temp.(°C)
IQLIT A	200	1500	12.000	30	25
IQLIT M	300-700	15000	10.000	30	25
IQLIT B	130	2500	15.000	40	25
IQLIT N	200	500	12.000	30	25
IQLIT C	130	3000	15.000	40	25
IQLIT O	130	7500	15.000	45	25
IQLIT G	160	2500	15.000	30	25
IQLIT P	120	500	15.000	45	25
IQLIT H	600	1500	10.000	20	25

Taula 9. Condicions mínimes per a la correcta centrifugació dels productes esmentats.

Per a establir un procediment el més genèric possible, podem dividir la centrifugació de les mostres en 2 grans grups:



Mostres amb d.p menor a 200 nm	Mostres amb d.p major a 200 nm
Rpm: 15.000	Rpm: 12.000
Temps: 45 min	Temps: 30 min
Temperatura: 25°C	Temperatura: 25°C

Taula 10. Procediment genèric final per a la centrifugació de mostres.

Per últim, es va estudiar la qualitat del filtratge de les mostres comparant dos tipus de filtres. El primer amb una mida de porus de 0,1 μm i el segon amb una mida de 0,2 μm . Òbviament, el filtre de 0,1 μm a priori hauria de donar millors resultats, tot i això i degut a l'elevat preu d'aquests filtres(i la gran diferència de preu respecte els de 0,2 μm), es va comprovar si es podia apreciar diferència a simple vista entre una mostra filtrada amb el filtre de 0,1 μm i la mateixa filtrada amb el segon filtre. Per a tal finalitat es va centrifugar una mostra durant un temps molt breu (10 min), de manera que el sèrum obtingut no era transparent, per a així poder comprovar el canvi en la terbolesa de la fase aquosa després del filtratge. Els resultats van ser molt clars. El filtre de 0,2 μm mantenia la mostra tèrbola, fins i tot després de ser filtrada 3 vegades. El filtre de diàmetre de porus més petit deixava la mostra 100% transparent i sense cap resta de partícules. Es va concloure que era indispensable la compra i ús de filtres de 0,1 μm per a dur a terme un correcte filtratge de la mostra, molt important per a evitar obturacions a l'aparell d'HPLC.

4. Resultats

4.1 Determinació de l'interval de linealitat

Tot i que l'interval de linealitat es considera sovint com un terme de validació d'un mètode, cal determinar-lo abans de calibrar el mateix. L'interval de linealitat correspon a l'interval on el resultat d'un anàlisi (en el cas de la cromatografia l'àrea del pic obtingut) és proporcional a la concentració de l'anàlit en qüestió.^[17] Per norma general, el procediment a seguir per a determinar l'interval de linealitat és efectuar anàlisis sobre mostres (patrons) de concentració creixent i veure tant numèricament com gràficament, la pèrdua de linealitat de la recta a partir d'un patró en concret. A partir d'aquesta pèrdua de linealitat es pot establir un rang de concentracions en el que la resposta serà proporcional i que per tant serà adequat per a treballar. Tot i això, com es pot apreciar en la taula, les solucions usades són les que es van determinar com a adequades després de l'optimització en la preparació de patrons per a calibrar. La metodologia per preparar els patrons és la que es va determinar com a òptima en l'apartat 3.3.2 Això es degut a que tal i com s'ha comentat en l'apartat 2.3.4. l'empresa em va proporcionar la informació referent a l'interval de linealitat que hauria d'obtenir, de manera que prèviament a la determinació d'aquest interval vaig realitzar les proves en la preparació dels patrons comentades en els apartats 3.3.2.1.

Per a determinar l'interval de linealitat, els patrons preparats van ser els següents:



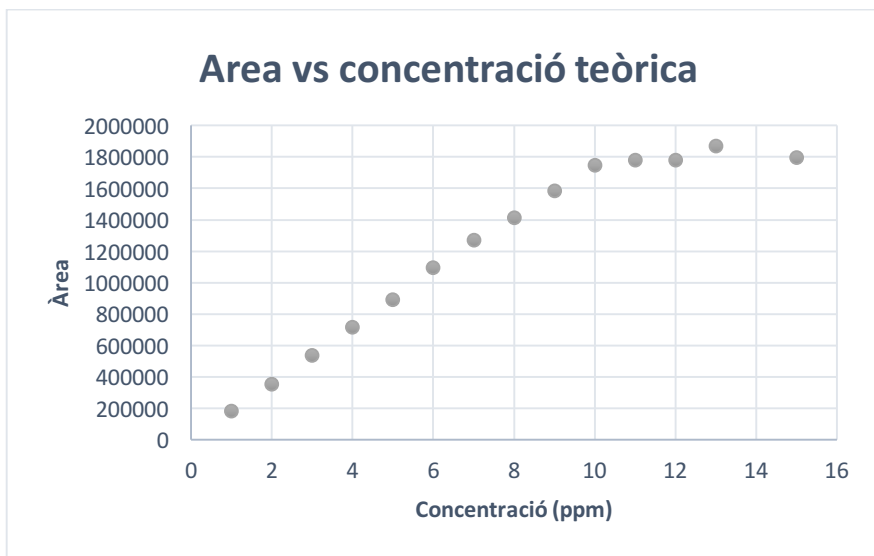
Patrò	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ML de solució B	1	2	3	4	5	1	2	3	4	0	1	2	3	3
ML de solució C	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3
ML Aigua ultra-pura	4	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	2
ML Nash	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Ppm Formaldehid	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15

Taula 11. Taula de preparació i concentració dels patrons usats per a determinar l'interval de linealitat.

Tot i tenir la informació sobre l'interval de linealitat, es van analitzar patrons preparats de 1000 ppm, 500 ppm, 100 ppm i 50 ppm de Formaldehid. Per a fer-ho es va preparar una dissolució de Nash molt més concentrada, per assegurar l'excés d'aquest reactiu. Els resultats obtinguts de les àrees eren clarament no proporcionals entre ells, per la qual cosa l'interval de linealitat es trobava com a màxim entre 0 i 50.

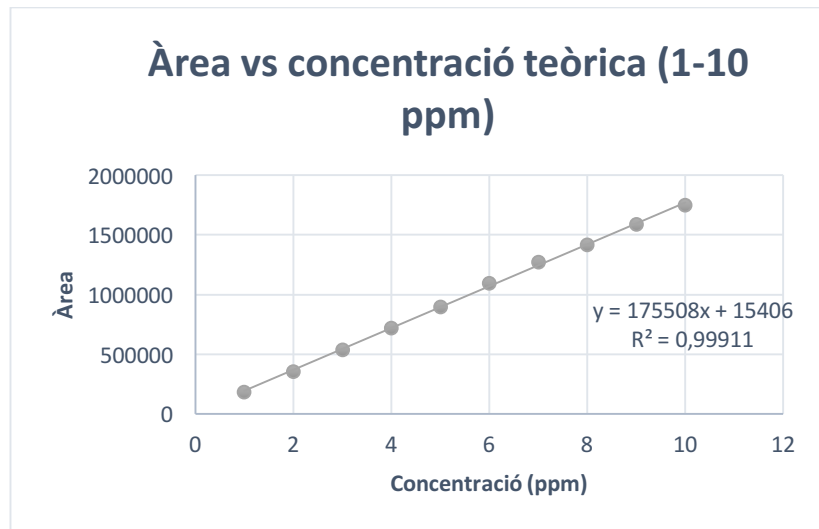
Un cop preparats tots els patrons exemplificats en la taula 11, aquests es van dur a cromatografia líquida i es va mesurar la seva resposta a una lambda de 410 nm (lambda a la qual absorbeix el compost derivat de la Lutidina).

Seguidament es van plasmar en un gràfic les respostes de l'àrea obtingudes de l'HPLC, juntament amb la concentració teòrica en ppm de Formaldehid. Els resultats van ser els següents:



Gràfic 3. Mostra la tendència lineal entre la resposta instrumental i la concentració i el trencament d'aquesta.

Com es pot observar, la tendència lineal de la recta es talla bruscament a partir dels 10 ppm. La resposta deixa de ser proporcional en aquell punt, per la qual cosa sembla a simple vista que l'interval de linealitat es troba entre 1 i 10 ppm de Formaldehid. Si retirem els punts que trenquen la linealitat, obtenim la següent recta de regressió.



Gràfic 4. Recta resultants de la retirada de punts que incompleixen la proporcionalitat en la Figura 18.

Complementàriament a la recta de regressió, si representem els pics obtinguts de tots els patrons a la mateixa escala, veiem efectivament una clara proporció ascendent.

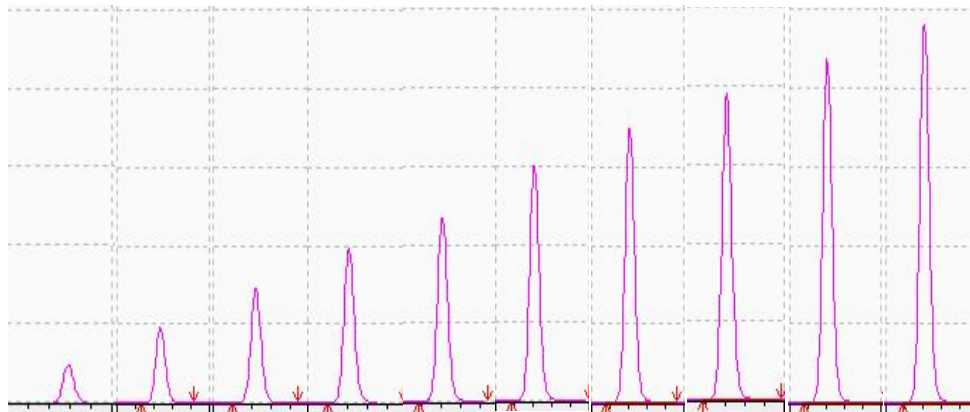


Figura 14. Muntatge fotogràfic a escala dels pics (software del cromatògraf) resultant de l'anàlisi de patrons de 1-10 ppm.

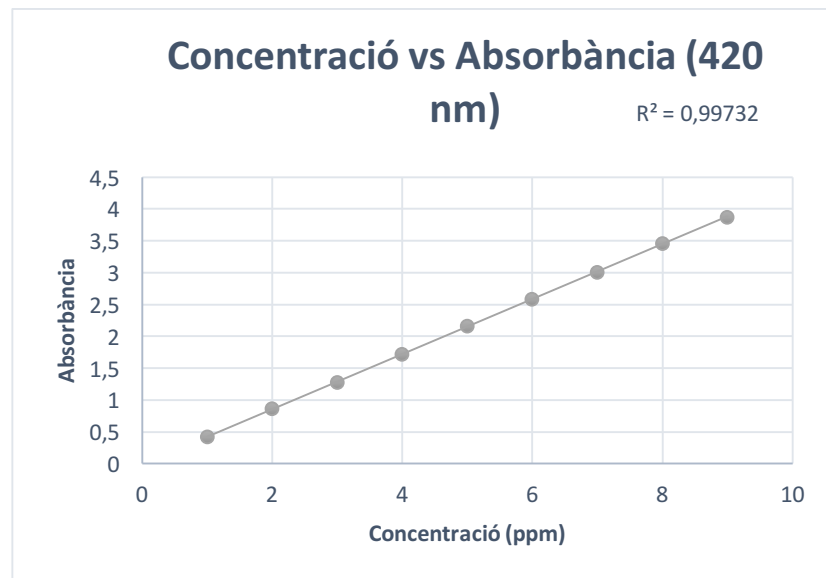
Per tant, després d'aquest estudi es va concloure que la linealitat del mètode es troba entre 0,25 i 10 ppm, sempre referint-nos a concentració de Formaldehid (el nostre anàlit). Òbviament el Formaldehid ja no es troba com a tal en els patrons utilitzats, sinó que es troba en forma de derivat. Si calculem l'interval de linealitat respecte la concentració de 3,5-Diacetil-1,4-dihidrolutadina el resultat seria el següent:

Interval de linealitat del mètode respecte el Formaldehid	0,25-10,00 ppm
Interval de linealitat del mètode respecte el derivat	1,60-64,34 ppm

De tota manera, durant tot el treball es parlarà de l'interval entre 0,25-10, principalment per comoditat i degut a que el nostre anàlit real és el Formaldehid. Per altra banda el límit inferior s'ha establert a partir del càlcul del límit de quantificació, exposat en l'apartat 4.3.4



Com a estudi complementari, i utilitzant els mateixos patrons, es va fer ús d'un Fotòmetre Hanna. En aquest cas, l'aparell emet una lambda de 420 nm, que tot i no ser l'adequada, és propera a 410 i al tractar-se del mateix compost en tots els patrons hauria de seguir donant un resultat proporcional. La recta resultant va ser la següent:



Gràfic 5. Recta de regressió obtinguda amb l'espectrofotòmetre.

La recta de regressió resultant va esdevenir visualment correcta. El coeficient de correlació no va resultar gaire ajustat, i de fet, sent crítics, si aquesta fos l'única manera de comprovar l'interval de linealitat, no es podria donar com a bo. Al ser un estudi complementari, va ajudar a la confirmació de que com a mínim l'interval entre 1-9 ppm es lineal. Per altra banda, no es van poder analitzar els patrons de mes alta concentració amb aquest aparell, degut a que el seu límit màxim pel que fa a l'absorbància es de 4.

4.2 Calibratge del mètode

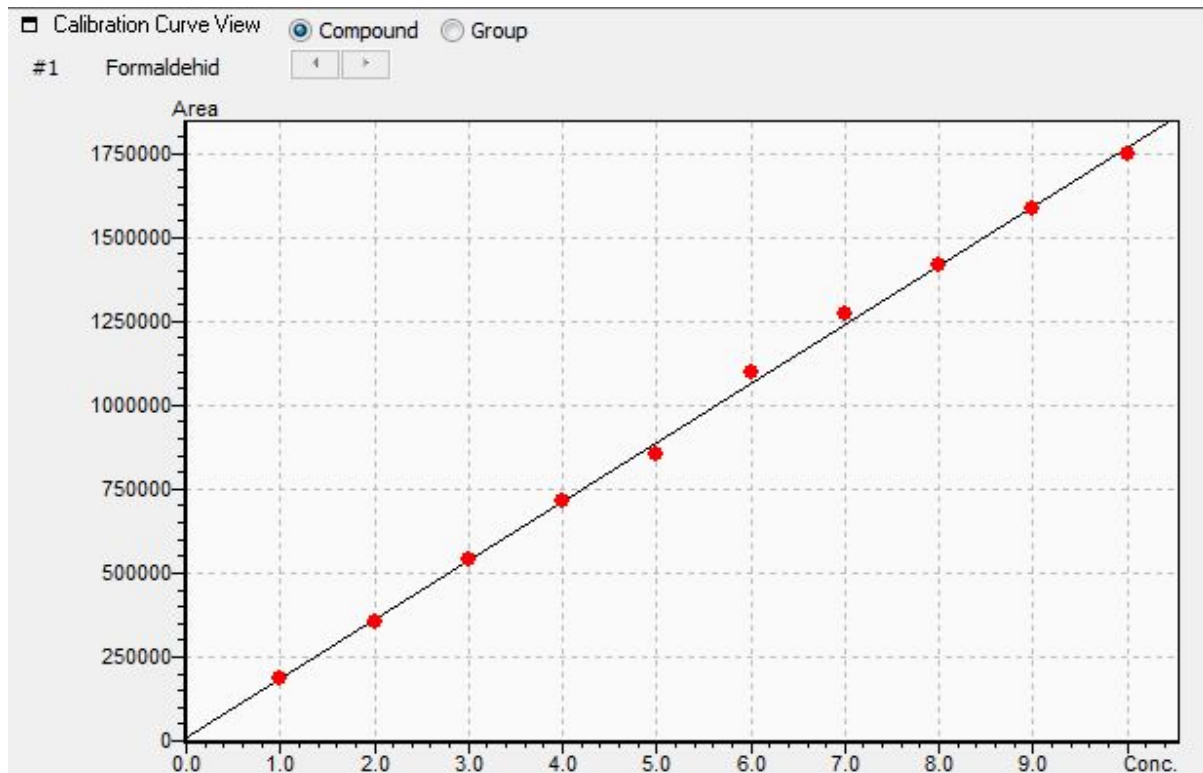
Un cop realitzat l'estudi de les variables cromatogràfiques dels últims apartats i havent extret conclusions sobre quina configuració i quines variables són les més adequades, així com la manera de preparar els patrons més adequada es va procedir al calibratge del mètode.

En l'apartat 4.1 es va concloure que l'interval en el qual es prepararien i s'analitzarien els patrons seria entre 0-10 ppm. La taula de concentracions dels patrons que es van usar per a calibrar es pot veure en l'apartat 3.3.2.

Un cop preparats els patrons seguint el procediment exemplificat en el mateix apartat, es va configurar el software, indicant-li que les mostres estaven col·locades en ordre creixent de concentració i es va procedir a analitzar consecutivament els patrons per a obtenir la recta de calibratge. Per a tal fi, es va introduir la concentració teòrica de cada patró. Com ja s'ha indicat amb anterioritat, el detector usat treballa en un espectre ampli de longituds d'ona, per la qual cosa s'obtenen un gran nombre de cromatogrames, de manera que també va caldre indicar que la recta es generés a partir dels cromatogrames obtinguts a una lambda de 410 nm.



Una de les rectes de calibratge obtingudes va ser la següent:



Gràfic 6. Recta de regressió procedent d'un dels calibratges.

Equació de la recta: $y = 175751x + 10072,3$

R²: 0,9989

% de desviació estàndard relativa: 2,1 %

Pel que fa a aspectes superficials com la linealitat a ull nu o el coeficient de regressió, sembla que tots dos són correctes, no obstant per a confirmar un calibratge exitós és necessari realitzar un anàlisi de residuals de la recta. Pel que fa a la desviació estàndard relativa, és un paràmetre molt interessant, ja que dona una idea de si la desviació estàndard es gran o petita en comparació a les dades. Sembla que també és baixa, i per tant és un altre punt a favor de la recta. Per calcular la RSD s'han usat les següents formules (sent s la desviació estàndard i $|\bar{x}|$ el valor mitjà obtingut de les àrees:

$$s = \frac{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

Equació 13. Càlcul de la desviació estàndard.

$$\%RSD = \frac{100 * s}{|\bar{x}|}$$

Equació 14. Càlcul de la desviació estàndard relativa.

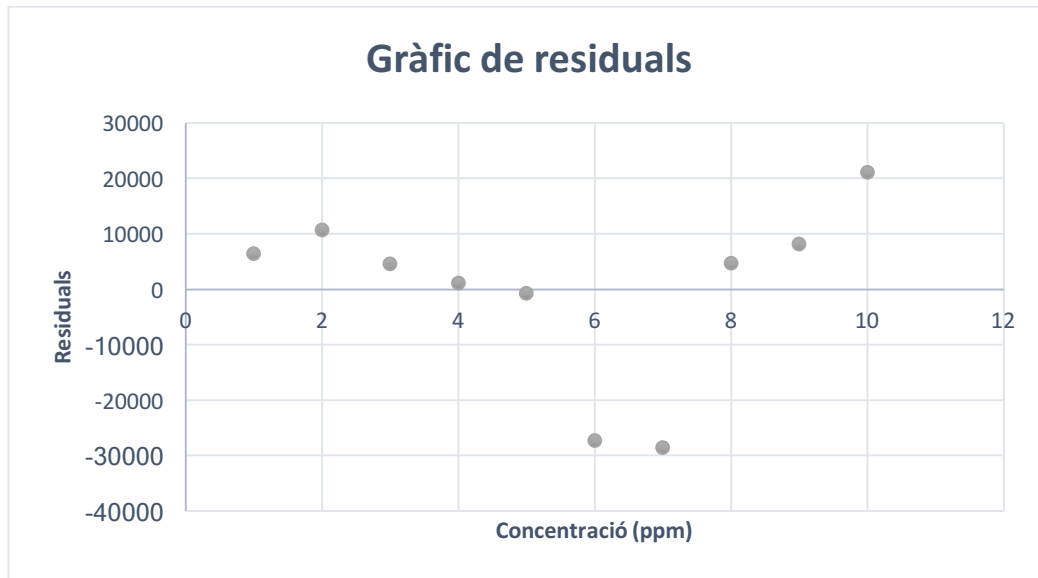


Es van calcular els residuals, fent servir l'àrea obtinguda i l'equació de la recta. Restant el valor real al valor teòric obtindrem un valor positiu o negatiu anomenat residu. La fórmula usada ha estat la següent, sent y_i el valor d'àrea obtingut i sent \hat{y} el valor extrapolat (teòric).

$$e_i = y_i - \hat{y}$$

Equació 15. Càlcul de residuals.

El gràfic de residuals resultant va ser el següent:



Gràfic 7. Gràfic de residuals obtinguts de la recta de regressió representada en el Gràfic 6.

Per a considerar correcte o acceptable un gràfic de residuals cal comprovar que:

- Els residuals en qüestió no mostren cap tendència clara, és a dir estan distribuïts aleatòriament
- Aproximadament tots els residuals tenen el mateix valor absolut.
- Aproximadament trobem el mateix nombre de residuals positius i negatius.

El gràfic compleix totes les condicions mencionades anteriorment. El valor més alt en positiu és molt semblant al valor més baix en negatiu i la diferència tant negativa com positiva respecte el valor teòric no supera mai les 30.000 unitats d'àrea. Pot semblar un valor molt gran però no ho és, ja que estem tractant amb valors enormes d'àrea. Els punts en el gràfic estan distribuïts aleatòriament. L'únic factor del que es pot dubtar, és del fet de que tenim 7 residuals positius i 3 de negatius, però en la meua opinió, aquest factor es pot considerar intrínsec en la pròpia aleatorietat. Si el resultat hagués estat més dràstic, (9:1, 8:2, per exemple), no s'hagués donat el calibratge com a correcte.

Previ al càlcul de residuals s'ha realitzat un càlcul d'outliers, un càlcul estadístic que permet determinar la presència de punts discrepants, és a dir punts que es determina que no pertanyen a la població. Normalment aquests punts discrepants provenen d'errors humans. Aquest estudi es realitza mitjançant un test Q de Dixon, sent X_S el valor sospitós, X_A el valor més proper al sospitós i X_B el valor més llunyà al sospitós.



$$Q_{cal} = \frac{X_S - X_A}{X_S - X_B}$$

Equació 16. Fórmula usada per al càlcul del valor a comparar amb les taules Q de Dixon.

Un cop obtinguda la Q_{cal} , caldrà comparar-la amb la Q_{tab} , la qual es troba tabulada. El valor tabulat dependrà del número total de patrons o mostres analitzades i del nivell de confiança. En cas que la $Q_{cal} < Q_{tab}$, el valor en qüestió queda acceptat, mentre que si el resultat es l'invers cal rebutjar el valor.

En 2 dels calibratges es va detectar un punt discrepant. Tot i que no va succeir, davant el fet d'haver-ne detectat 2 o més s'hauria descartat la regressió automàticament.

La freqüència de calibratge es va establir en un cop cada 30 dies, ja que és la freqüència amb la que es canvia el reactiu de NASH.

4.3 Validació del mètode

4.3.1 Selectivitat i especificitat

En moltes ocasions, i en una gran variabilitat de mètodes analítics, la presència d'altres compostos de naturalesa semblant al anàlit poden donar certa senyal, que moltes vegades pot contribuir a augmentar la senyal de l'anàlit i per tant, causar un error sistemàtic. D'aquí sorgeix el concepte de selectivitat, és a dir, el paràmetre que defineix de forma qualitativa, la manera o la influència que tenen altres substàncies sobre l'anàlit quan s'usa un mètode determinat. Un mètode selectiu és aquell el qual la senyal de l'anàlit prové només del propi anàlit sense que altres elements interfereixin en la resposta. [17]

Pel que fa al mètode desenvolupat i com s'ha pogut comprovar fins ara, la longitud d'ona usada (410 nm) només dona resposta al nostre anàlit, per la qual cosa a priori el mètode és molt selectiu. Tot i això, en les emulsions polimèriques s'afegeixen unes substàncies anomenades biocides, que també són actives en l'espectre UV-VIS, les quals s'encarreguen de mantenir la emulsió en bon estat i sense presència biològica. Els biocides usats absorbeixen a longituds d'ona molt diferents al nostre anàlit, però s'ha realitzat un estudi per comprovar si concentracions altes de biocides podrien provocar alguna interferència en un cromatograma a una longitud d'ona de 410 nm. En altres paraules, es va voler comprovar que tot i que la senyal que donen aquestes substàncies a 410 nm sigui molt poca, si concentracions molt altes poden arribar a donar una senyal suficientment intensa com per a provocar interferències en la senyal del Formaldehid. Els resultats van ser negatius en totes les ocasions, per la qual cosa es va determinar que el mètode era selectiu i específic.

4.3.2 Exactitud

La exactitud es defineix com la proximitat entre el resultat obtingut amb un mètode i el valor real. Es tracta d'un paràmetre qualitatiu (un mètode serà molt o poc exacte) per descriure l'error associat a un resultat. Es divideix en dos paràmetres, la veracitat i la precisió. [17]



4.3.2.1 Veracitat

La veracitat es el paràmetre que s'encarrega de determinar la semblança entre el valor real i el valor obtingut usant el mètode en qüestió. Per comprovar la veracitat es sempre necessari comparar amb un valor de referència, normalment provinent d'un material de referència certificat o bé comparant amb un mètode ja validat (exercici d'inter-comparació).^[18]

Per a tal fi i degut a que a l'empresa no es té coneixement de cap d'aquests mètodes, s'usarà un material de referència certificat. Per a fer-ho es van preparar 10 patrons, de les mateixes concentracions dels que es van preparar per a calibrar el mètode (1-10 ppm). Un cop preparats es van analitzar per cromatografia, i es va extrapolar el punt obtingut en la recta de calibratge mostrada en l'apartat 4.2. Els resultats van ser els següents (el pes del material certificat ha estat apuntat amb cura i per tant els valors teòrics mostrats no són enters degut a que s'ha recalculat la concentració teòrica amb el pes exacte que s'ha usat (0,24 grams)):

Número de patró (MRC)	[ppm] teòrics	[ppm] reals	Diferència (V.A)
1	0,89	0,77	0,12
2	1,78	1,65	0,13
3	2,67	2,57	0,1
4	3,56	3,72	0,16
5	4,45	4,25	0,20
6	5,34	5,24	0,1
7	6,23	6,44	0,21
8	7,12	7,08	0,04
9	8,01	8,14	0,13
10	8,9	9,11	0,21

Taula 12. Preparació de patrons amb MRC i comparació amb el valor teòric en valor absolut.

Per altra banda es van preparar 5 patrons de la mateixa concentració a partir de la mateixa solució mare, motiu pel qual de nou el valor teòric no és enter:

Repetició	Valor teòric	Valor real
1	5,34	5,07
2	5,34	5,23
3	5,34	5,19
4	5,34	5,33
5	5,34	5,39

Taula 13. Valors de obtinguts després d'analitzar 5 patrons de la mateixa concentració

La preparació d'aquests 5 patrons iguals es va dur a terme a fi de comparar mitjanes amb un test t-Student. El test t-Student s'utilitza per a comparar dos mitjanes de poblacions independents i determinar si hi ha diferències significatives entre elles.^[19] En aquest cas les dues poblacions que es compararan són els valors obtinguts del material de referència i el valor teòric d'aquest. Per a dur a terme correctament un test t-Student cal:



- Que les mostres segueixin una distribució normal
- Que les variàncies no difereixin en excés.

Una vegada s'ha realitzat el test t-Student (s'ha dut a terme amb el programa EXCEL), cal fixar-se en tres paràmetres:

- Valor de t calculat.
- Valor de t crític.
- Valor de probabilitat.

Per a determinar que no hi ha diferències entre les mitjanes de les dues poblacions cal:

- $t_{cal} < t_{crític}$
- Probabilitat $> 0,05$

Els resultats extrets del test t van ser els següents:

	Grup 1	Grup 2
Mitjana	5,34	5,24
Variància	0,00	0,01

t.cal	1,75
t.crit (dos cues)	2,30
Valor de probabilitat	0,11

$t_{cal} < t_{crític}$	$1,75 < 2,30$
------------------------	---------------

Valor de prob.	$0,11 > 0,05$
----------------	---------------

Taula 14. Resultats test t-Student

En vista dels resultats obtinguts s'estableix que les mitjanes de les dues poblacions són comparables i per tant es demostra la veracitat del mètode.

4.3.2.2 Precisió

Per altra banda, quan es realitza una mesura, aquesta es pot replicar, i a partir dels resultats obtinguts es pot observar el grau de concordança que tenen els resultats entre si. Aquest grau de concordança s'anomena precisió. La precisió es divideix en tres paràmetres, la repetibilitat, la precisió intermèdia i la reproduïbilitat, la qual no s'ha estudiat. ^[17]

4.3.2.2.1 Repetibilitat

La repetibilitat és la desviació resultant d'analitzar una mateixa mostra en diverses ocasions consecutives sense canviar de reactius, material, analista i equip. ^[17] Una altra condició fonamental és que aquests anàlisis es realitzin en un temps curt. L'estudi es va realitzar amb els productes IQLIT A, IQLIT B, IQLIT C, IQLIT D, els quals són els més susceptibles a



contenir quantitats no desitjades de Formaldehid i probablement els que més s'analitzaran mitjançant aquest mètode. Els resultats d'analitzar un mateix vial de mostra (és a dir un sol vial procedent d'una sola centrifugació analitzat 10 vegades consecutives) en condicions de repetibilitat van ser els següents (resultats extrets directament del cromatògraf sense desfer la dilució):

IQLIT A		IQLIT B		IQLIT C		IQLIT D	
Rep.	[ppm]	Rep.	[ppm]	Rep.	[ppm]	Rep.	[ppm]
1	4,70	1	1,81	1	0,57	1	3,24
2	4,80	2	1,83	2	0,52	2	3,19
3	4,73	3	1,90	3	0,66	3	3,17
4	4,70	4	1,69	4	0,60	4	3,27
5	4,67	5	1,89	5	0,49	5	3,14
6	4,69	6	1,70	6	0,64	6	3,10
7	4,79	7	1,91	7	0,55	7	3,22
8	4,60	8	1,74	8	0,57	8	3,30
9	4,70	9	1,91	9	0,62	9	3,19
10	4,67	10	1,89	10	0,55	10	3,23
Mitjana	4,70	Mitjana	1,82	Mitjana	0,58	Mitjana	3,2
%RSD	1,29	%RSD	4,82	%RSD	10,88	%RSD	1,85

Taula 15. Dades extretes en condicions de repetibilitat de quatre productes de planta.

Un cop extretes les dades i calculada tant la desviació estàndard com la RSD (%), podem extreure varies conclusions:

- La primera conclusió que extraiem (fixant-nos en la desviació estàndard relativa) és que en mostres menys concentrades l'error que cometem és bastant major, i que per tant obtenim valors més fiables en mostres de l'interval alt de concentracions.
- A més l'RSD és una mica elevat, sobretot en el cas de les mostres que contenen poc Formaldehid.

Per altra banda es pot establir un valor d'RSD anomenat RSD de Horwitz que serveix per a determinar quins valors de precisió (en aquest cas de repetibilitat) són acceptables. Aquesta equació ha estat proposada com un valor de referència per a, per exemple, comparacions inter-laboratori [20]. L'equació de Horwitz és la següent:

$$\%RSD_R = 2^{1-0,5\log C}$$

Equació 17. Fórmula usada per al càlcul del valor RSD de Horwitz en condicions de reproduïbilitat.

C: concentració expressada en tant per 1, de manera que és una mesura adimensional.

Tot i això, la fórmula anterior serveix per a condicions de reproduïbilitat. El criteri que s'estableix considerar acceptable la repetibilitat d'un mètode és el següent:



$$\%RSD < \frac{1}{2} \%RSD_R$$

Equació 18. Condició usada per a l'acceptació del valor RSD en condicions de repetibilitat.

Els resultats extrets han estat els següents:

Producte	%RSD	$\frac{1}{2} \%RSD_R$
IQLIT A	1,29	6,33
IQLIT B	4,82	7,28
IQLIT C	10,88	8,68
IQLIT D	1,85	6,71

Taula 16. Comparació dels valors d'RSD amb els valors d'RSD d'acceptació.

La comparació de l'RSD confirma les suposicions anteriors. La repetibilitat és bona en mostres més concentrades, mentre que en mostres on la concentració és menor, aquesta empitjora significativament, apropant-se a valors més propers al valor crític i superant-lo en el cas de l'IQLIT C.

Podríem considerar la repetibilitat analitzada anteriorment com la repetibilitat instrumental, és a dir la repetibilitat de l'anàlisi cromatogràfic. Cal tenir en compte, però, que realitzem un procés de centrifugació, el qual també caldrà comprovar que tingui una repetibilitat adequada. El que es va fer va ser determinar el contingut de Formaldehid d'una mateixa mostra, però analitzant deu vials, que provenien de deu centrifugacions per separat. Evidentment, es va aplicar el mateix factor de dilució a tots els tubs de centrifugat. La prova es va realitzar amb 4 productes l'IQLIT B, l'IQLIT A, l'IQLIT E. Un cop obtingudes les dades de les 10 centrifugacions, aquestes es van comparar amb 10 mesures repetides d'un mateix vial per valorar si hi havia diferències significatives entre els resultats extrets d'un mateix tub/ de diferents tubs. En aquest cas les dades presentades no són extretes directament del cromatògraf sinó que a cada dada se li ha desfet la dilució corresponent per a que les dades siguin comparables, ja que en el cas dels vials provinents de diferents centrifugacions el factor de dilució varia lleugerament al ser impossible pesar la mateixa quantitat exacta per a tots ells. En aquest cas els resultats es mostren a continuació:

IQLIT B (Mesura rep)		IQLIT B (Dif. centrifugacions)		IQLIT A (Mesura rep)		IQLIT A (Dif. centrifugacions)	
Rep.	[ppm]	Rep.	[ppm]	Rep.	[ppm]	Rep.	[ppm]
1	10,3	1	10,5	1	95,6	1	94,1
2	9,9	2	11,3	2	94,6	2	97,0
3	10,4	3	12,0	3	95,2	3	90,7
4	9,7	4	8,8	4	96,0	4	94,3
5	10,1	5	10,1	5	94,8	5	93,8
6	10,0	6	11,7	6	94,7	6	99,1
7	9,2	7	9,1	7	95,4	7	98,4
8	10,0	8	8,7	8	95,3	8	93,9
9	10,3	9	13,1	9	95,0	9	98,3



10	9,2	10	9,8	10	94,8	10	94,7
9,2-10,4		8,7-13,1		94,7-96,0		90,7-99,1	

IQLIT E (Mesura rep)		IQLIT E (Dif. centrifugacions)	
Rep.	[ppm]	Rep	[ppm]
1	8,1	1	6,9
2	8,7	2	5,4
3	7,5	3	7,4
4	8,2	4	5,9
5	7,6	5	6,7
6	7,9	6	8,5
7	7,7	7	7,0
8	8,0	8	7,2
9	8,4	9	8,9
10	8,6	10	8,3
7,5-8,7		5,4-8,9	

Taula 17. Dades extretes en condicions de repetibilitat en tres productes de planta.

La primera conclusió que podem extreure és que en la centrifugació de les mostres resideix una font d'error, ja que en tots els casos l'interval de valors obtinguts augmenta en els vials procedents de diferents centrifugacions respecte el mateix vial analitzat consecutivament. De la mateixa manera que abans, aquest error és més acusat en mostres menys concentrades, ja que tot i que l'interval augmenta aproximadament de la mateixa manera en tots els casos, en les mostres poc concentrades, aquest interval representa un percentatge més elevat respecte al valor en ppm de la mostra.

Per a analitzar estadísticament les dades, es duu a terme un anàlisi ANOVA, per a determinar si els valors obtinguts de diferents centrifugacions són comparables amb els valors obtinguts d'analitzar la mateixa mostra consecutivament.

L'ANOVA és una eina de molta utilitat en diferents sectors de la indústria i mètodes analítics. Per a dur-la a terme hi ha tres condicions indispensables :

- Els conjunts de dades en qüestió han de ser independents de la resta. (En aquest cas al provenir una columna de diferents centrifugacions i l'altra d'una sola centrifugació s'ha considerat que les dades són independents i que no depenen d'altres valoracions. S'ha considerat que el valor extret d'un vial no té cap mena d'influència en el valor que es pugui extreure d'un altre vial).
- Els resultats obtinguts han de seguir una distribució normal
- Les variàncies de cada conjunt no han de diferir significativament l'una de l'altra^[19]

Un cop realitzat l'anàlisi d'ANOVA, caldrà comparar el valor F calculat amb el valor crític d'F, els quals es troben tabulats. En aquest cas per a buscar el valor tabulat (tot i que ens el



proporciona el programa EXCEL), caldria anar a les taules i extreure el punt amb una $\alpha = 0,05$ i amb 19 graus de llibertat.

Els resultats han estat els següents:

IQLIT B

Font de la variança	Sum. quadrats	Graus de llibertat	Mitjana de quadrats	F cal	Probabilitat	F crític
Entre grups	1,18	1	1,18	1,04	0,319	4,413
Dins del grup	20,46	18	1,136			
Total	21,65	19				

Taula 18. ANOVA de les dades representades en la taula 17.

F cal < F crític	1,04 < 4,41
------------------	-------------

IQLIT A

Font de la variança	Sum. quadrats	Graus de llibertat	Mitjana de quadrats	F cal	Probabilitat	F crític
Entre grups	0,3848	1	0,348	0,115	0,761	4,413
Dins del grup	66,1725	18	3,67			
Total	66,5255	19				

Taula 19. ANOVA de les dades representades en la taula 17.

F cal < F crític	0,115 < 4,41
------------------	--------------

IQLIT E

Font de la variança	Sum. quadrats	Graus de llibertat	Mitjana de quadrats	F cal	Probabilitat	F crític
Entre grups	3,6125	1	3,6125	5,13	0,035	4,413
Dins del grup	12,657	18	0,7031			
Total	16,2695	19				

Taula 20. ANOVA de les dades representades en la taula 17.

F cal > F crític	5,13 > 4,41
------------------	-------------

En aquest cas l'ANOVA ens dona conclusions confuses, ja que en dues de les tres mostres usades per aquest estudi, es conclou que la centrifugació no es un paràmetre que afecti significativament al resultat d'un anàlisi, mentre que en l'altre cas es conclou que els resultats extrets de diferents centrifugacions no són comparables amb els extrets de l'anàlisi consecutiu del mateix vial.

El fet de que en els dos primers casos l'ANOVA hagi resultat positiu es deu principalment a que les mitjanes difereixen molt poc entre les dues columnes.



Com a resultat general penso que caldria realitzar més anàlisis pel que fa a la repetibilitat de la centrifugació, tot i això, òbviament sembla que la centrifugació és una font d'error important en aquest mètode.

4.3.2.2.2 Precisió intermèdia

La precisió intermèdia es tot el contrari a la repetibilitat, per tant, es la desviació resultant d'analitzar una mateixa mostra en diferents dies, podent variar d'analista o fins i tot de reactius. [17]

La precisió intermèdia del mètode no es bona. L'objectiu inicial era donar valors numèrics igual que en el cas de la repetibilitat. S'ha observat certa degradació en alguns patrons d'alta concentració al cap de 24 hores de la seva preparació. Apareixen una espècie de fils molt prims dins la solució. Aquest fet ha provocat que no s'hagin analitzat mostres de més d'un dia d'antiguitat, degut a la gran facilitat d'obstrucció que presenta qualsevol aparell d'HPLC. Com he dit això només s'ha observat en patrons molt concentrats, però es molt probable que això succeeixi també en les mostres i que degut al fet de que solen tenir una concentració menor no s'apreciïn els fils a simple vista. Per altra banda es va plantejar l'estudi de precisió intermèdia realitzant tot el procés de centrifugació i preparació del vial dia rere dia per dos analistes diferents. Tot i això, l'estudi no es va arribar a realitzar degut a l'absència d'analistes que em poguessin dedicar tant de temps.

De fet, durant la realització del projecte l'aparell d'HPLC es va obturar en dues ocasions. No es va arribar a aclarir si la conseqüència de l'obturbació va ser el llarg temps de desús de l'aparell o pels fils formats en les mostres (figura 15), tot i això i per assegurar que l'aparell no tornava a obturar-se, es va plantejar la necessitat de netejar la agulla d'injecció automàtica de manera regular. Cada un màxim de dos injeccions de mostres/patrons es realitzava una injecció d'aigua amb el màxim volum que permet l'agulla (100µl), així com tres injeccions consecutives d'aigua cada dia abans d'apagar el cromatògraf. D'aquesta manera sembla que el problema de l'obturbació es va solucionar.

En la següent fotografia es pot apreciar la presència de filaments prims dins del vial de cromatografia, fet que impossibilita el seu anàlisi:



Figura 15. Degradació al cap de 48h en un patró de 10ppm.



4.3.3 Límit de detecció

El límit de detecció (LOD) és un paràmetre directament relacionat amb la sensibilitat del mètode, i es defineix com la quantitat d'anàlit de la qual en deriva la menor senyal possible per detectar-lo amb certesa diferenciant-la de la senyal que proporciona un blanc.^[21]

Hi ha varies maneres i força controvèrsia sobre com calcular el límit de detecció/quantificació, però la que he usat s'ha basat en analitzar varies vegades un blanc per a obtenir la senyal mitjana del blanc (h). Un cop obtinguda, es considera una senyal distingible al blanc aquella que sigui igual a almenys 3 vegades la senyal del blanc ($3H$). És a dir el límit de detecció correspondrà al pic que compleixi una relació senyal: soroll de 3:1.^{[22][23]} Un cop obtinguda la senyal només cal extrapolar a la recta de calibratge per a obtenir la concentració mínima d'anàlit detectable amb certesa:

$$S/N = \frac{3H}{h}$$

$$Y_{lod} = 3 * h_{mitj}$$

$$X_{lod} = \frac{Y_{lod} - a}{b}$$

Equació 19. Fórmules usades per al càlcul del LOD.

Els blancs que es van fer servir per determinar el límit de detecció eren simplement aigua ultra-pura mes reactiu de NASH (reactiu el qual es troba en excés durant tots els anàlisis). En total es van analitzar 10 blancs Seguidament es van realitzar mesures de l'altura mitjana de la senyal de la línia base. Cal anar en compte, ja que considerem alçada del blanc tant per sobre com per sota de la línia base com s'aprecia en aquesta imatge:

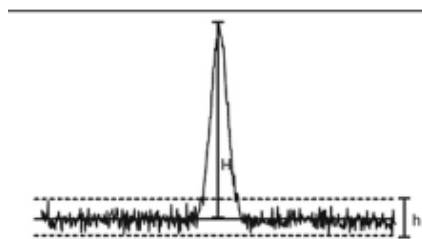
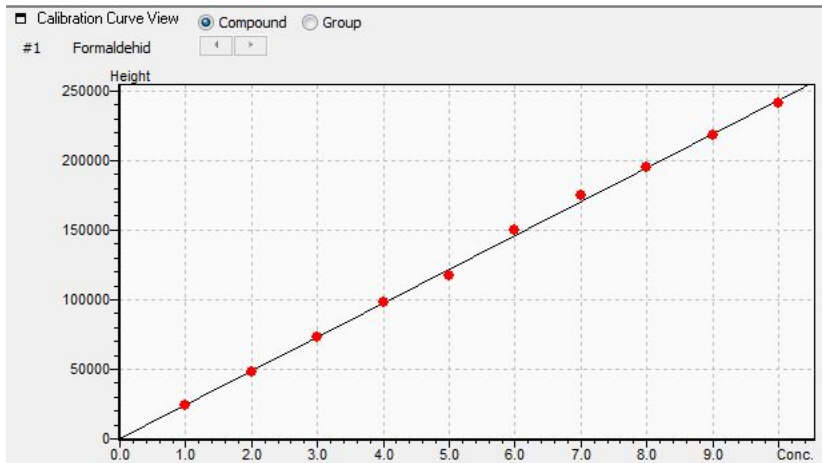


Figura 16. Manera idònia de calcular h .

Rep	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
h	637	648	653	653	635	637	632	651	632	643

Taula 21. Mesures d'alçada extretes de 10 blancs.

Un cop aconseguides les dades, la mitjana de la senyal del blanc es va construir una nova recta, en la qual la variable Y va deixar de ser l'àrea per passar a ser altura. D'aquesta manera, extrapolant a la recta resultant una altura 3 cops major a la del blanc es pot extreure el LOD. La recta resultant va ser la següent:



$$y = 24309,6x + 259,26$$

$$R^2: 0,9989$$

$$\%RSD: 2,1 \%$$

Gràfic 8. Recta de regressió, sent l'eix de les Y altura dels pics.

Un cop extretes les dades els resultats són els següents:

$$h_{mitj} = 642$$

$$Y_{lod} = 642 * 3 = 1926$$

$$X_{lod} = 0,068 \frac{mg}{L} = 68 \mu g/L$$

Equació 20. Càlcul del LOD.

4.3.4 Límit de quantificació

El límit de quantificació (LOQ) , també esta directament relacionat amb la sensibilitat i es defineix com la quantitat mínima d'anàlit que pot ser mesurada amb un grau d'exactitud i precisió acceptables. En aquest cas s'ha establert el límit de quantificació en la senyal mínima igual a 10 vegades la senyal del blanc, és a dir una relació senyal soroll 10:1^[23]

$$Y_{loq} = 10 * h_{mitj}$$

$$X_{loq} = \frac{Y_{loq} - a}{b}$$

Equació 21. Fórmula usada per al càlcul del LOQ.

Per a determinar el límit de quantificació s'han usat les mateixes dades usades en l'apartat 4.3.3. Els resultats extrets han estat els següents:

$$h_{mitj} = 642$$

$$Y_{loq} = 642 * 10 = 6420$$

$$X_{loq} = 0,25 \frac{mg}{L} = 250 \mu g/L$$

Equació 22. Càlcul del LOQ.



5. Resultats d'estudis complementaris

Un cop posat en marxa el mètode, l'empresa vol realitzar diversos estudis a partir de la determinació de la concentració de Formaldehid.

Un d'ells és l'efecte que té la temperatura respecte la formació d'aquest component en les emulsions. El mateix es vol comprovar amb el factor temps.

Per altra banda també es vol estudiar la variabilitat en el contingut de Formaldehid en diferents lots de producció del mateix IQLIT per a poder establir un interval de concentració en cada producte. Degut al gran ventall de productes disponibles, aquest estudi ha restat inacabat. A part de no haver pogut analitzar tots els productes de planta, caldria analitzar més lots de cadascun d'ells per a arribar a un resultat molt més fiable. Tot i això, els resultats que s'han obtingut es presenten a continuació:

IQLIT E		IQLIT B	
LOT	[ppm]	LOT	[ppm]
1	6,87	1	27,72
2	4,55	2	20,31
3	9,11	3	37,82
Valor mitjà	6,84	Valor mitjà	28,62

IQLIT C		IQLIT F	
LOT	[ppm]	LOT	[ppm]
1	12,66	1	17,12
2	19,86	2	16,37
3	7,71	3	10,81
Valor mitjà	13,41	Valor mitjà	14,76

IQLIT G		IQLIT H	
LOT	[ppm]	LOT	[ppm]
1	6,24	1	201,42
2	7,25	2	216,73
3	9,97	3	252,20
Valor mitjà	7,82	Valor mitjà	223,44

IQLIT D		IQLIT I	
LOT	[ppm]	LOT	[ppm]
1	83,91	1	21,02
2	23,17	2	16,35
3	56,20	3	19,77
Valor mitjà	54,42	Valor mitjà	19,04



IQLIT J		IQLIT K	
LOT	[ppm]	LOT	[ppm]
1	133,21	1	102,45
2	110,85	2	120,25
3	149,40	3	133,20
Valor mitjà	131,15	Valor mitjà	118,63

Taula 22. Valors de concentració obtinguts en diferents productes i lots de planta

Per a dur a terme l'estudi de temperatura, s'ha usat l'IQLIT A, producte que durant tot el projecte ha donat resultats alts de Formaldehid. No caldrà preocupar-se per la dilució, ja que a priori ja sabem que la dilució 1:10 dona bons resultats, i que per tant com a molt caldrà usar dilucions més grans que sabem del cert que se centrifuguen correctament. Per altra banda cal comentar que no totes les emulsions alliberen Formaldehid amb la temperatura (s'ha escollit també l'IQLIT A perquè se sap amb certesa que n'alliberarà), però no puc donar-ne informació al respecte per motius de confidencialitat. L'estudi s'ha realitzat durant un període de 3 setmanes, degut al temps limitat de realització del projecte. Els resultats extrets en un període tant curt de temps no són concloents ni molt menys, però com s'aprecia, els resultats mostren certa tendència a l'augment en la concentració del Formaldehid :

IQLIT A	
Setmana	[ppm]
1	110,21
2	214,52
3	607,08

Taula 23. Valors de concentració obtinguts d'analitzar una mateix lot en tres setmanes diferents.

A la planta hi ha certs productes que són sotmesos a un procés de desvolatilització, per eliminar components orgànics volàtils i aconseguir emulsions molt més respectuoses amb el medi ambient i lliures de qualsevol olor. Tot i que el Formaldehid és en gran mesura soluble en aigua, en un principi una gran part del Formaldehid present en la emulsió hauria de desaparèixer (o baixar en concentració) durant aquest procés d'eliminació de VOC's. Un exemple el trobem amb el parell de productes IQLIT C/L. El producte original sense desvolatilitzar és el L, per la qual cosa si comparem un mateix lot de L abans de desvolatilitzar i després (passaria a anomenar-se IQLIT C), podríem aconseguir determinar quina quantitat/percentatge de Formaldehid s'elimina i si per tant el procés es efectiu, almenys en l'eliminació d'aquest compost.

Lot	Abans de desv. [ppm]	Després de desv. [ppm]
1	9,23	5,19
2	6,98	4,82
3	13,71	4,24

Taula 24. Valors de concentració extrets de mostres d'IQLIT C i d'IQLIT L.

Hi ha certs productes de planta, susceptibles a contenir Formaldehid, o productes l'ús dels quals requereix nivells molt baixos d'aquest. És per aquest motiu que en algunes emulsions



s'afegeix una substància (de la qual no puc donar informació), la qual s'encarrega de fer polimeritzar el Formaldehid, de manera que perd toxicitat. També s'ha estudiat la eficàcia d'aquest agent, analitzant mostres prèvies i posteriors a la seva adició.

Els resultats obtinguts en les 3 proves realitzades en el laboratori d'I+D han estat les següents:

Mostra	Abans [ppm Form]	Després [ppm Form]
1	10,6	4,1
2	16,5	3,5
3	12,1	4,5

Taula 25. Valors de concentració extrets de mostres anteriors i posteriors a l'adició de l'agent polimeritzant.

6. Conclusions

El principal objectiu d'aquest projecte s'ha complert, ja que s'ha posat en marxa amb èxit un mètode de detecció de Formaldehid en emulsions polimèriques a IQOXE.

La tècnica usada ha estat l'HPLC. L'optimització de les variables cromatogràfiques ha tingut molt poca importància, degut a que no s'ha tingut la necessitat de separar anàlits. A més, el fet de derivar el Formaldehid en un compost colorejat i treballar en una longitud d'ona concreta ens ha proporcionat cromatogrames molt selectius amb un únic pic i sense interferències.

La importància que no ha pres la tècnica cromatogràfica en si mateixa, l'ha cobrat l'optimització en la preparació de patrons i mostres, sent l'optimització en la preparació d'aquestes últimes especialment complicada.

Per altra banda el mètode s'ha validat en termes de selectivitat i especificitat, veracitat, repetibilitat, precisió intermèdia, LOD i LOQ. La selectivitat ha esdevingut molt bona pels motius comentats amb anterioritat. Pel que fa a la repetibilitat instrumental, aquesta sembla ser adequada, tot i que sembla que empitjora quan tractem amb valors baixos de Formaldehid. La repetibilitat de centrifugació dona resultats confusos, i s'ha conclòs que caldria allargar aquest estudi per tal d'arribar a resultats més fiables. La precisió intermèdia del mètode sembla ser la debilitat més gran del mètode, degut a que les mostres presenten certa degradació amb el temps, fet que impossibilita el seu anàlisi per HPLC en diferents dies. L'anàlisi de patrons preparats a partir d'un material de referència certificat, ha determinat que els valor de concentració obtinguts amb aquest mètode són verços. Per últim els valors de límit de quantificació i detecció són suficientment baixos per a detectar/quantificar quantitats gairebé imperceptibles de Formaldehid.



The main objective of this project has been fulfilled, as a method for detecting Formaldehyde in polymeric emulsions has been successfully implemented at IQOXE.

The technique used was the HPLC. The optimization of the chromatographic variables has been very unimportant, since there was no need to separate analytes. In addition, the fact of deriving Formaldehyde into a colored compound and working at a specific wavelength has given us highly selective chromatograms with a single peak and without interferences.

The importance that has not taken the chromatographic technique in itself, has been earned by the optimization in the preparation of patterns and samples, being the optimization in the preparation of samples especially complicated.

On the other hand, the method has been validated in terms of selectivity and specificity, veracity, repeatability, intermediate accuracy, LOD and LOQ. The selectivity has become very good for the reasons previously mentioned. Regarding instrument repeatability, this seems to be adequate, although it seems to get worse when we deal with low values of Formaldehyde. The repeatability of centrifugation gives confusing results, and it has been concluded that this study should be extended in order to achieve more reliable results. The intermediate accuracy of the method seems to be the most important weakness of the method, because the samples show a certain degradation over time, which makes it impossible for HPLC to be analyzed in different days. The analysis of patterns prepared from a certified reference material has determined that the concentration values obtained with this method are comparable to the real ones. Finally the quantification and detection limit values are sufficiently low to detect / quantify almost imperceptible quantities of Formaldehyde.



7. Bibliografia

- [1] Iqoxe Emulsions Polimèriques.
<http://www.iqoxe-emulsiones.com/es/> (Consultat el 03/04/2019)
- [2] Google Maps.
<https://www.google.com/maps> (Consultat el 05/04/2019)
- [3] Cela ,R.; Lorenzo,R.A.; Casais, M.C.; *Técnicas de separación en química analítica*, Síntesis: Espanya, 2002.
- [4] Rouessac, F.; Rouessac, A.; *Chemical analysis. Modern instrumental and techniques*, John Wiley & Sons Inc: Nova Jersey, 2000; Vol.2.
- [5] Veronika, R.; *Practical High Performance Liquid Cromatography*, John Wiley & Sons Inc: Nova Jersey, 2004. Vol.5.
- [6] Shimadzu, Science and Analytical Lab Equipment.
<https://www.ssi.shimadzu.com> (Consultat el 16/04/2019)
- [7] U.S National Center for Biotechnology information.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/formaldehyde> (Consultat el 12/04/2019)
- [8] National Institute Of Standards And Technology.
<https://webbook.nist.gov/> (Consultat el 12/04/2019)
- [9] National Institute for ocupational Safety and Health; *Recomendations for occupational safety and Health*: Estats Units,1992.
- [10] Blair, A.; Litte evidence for Formaldehyde/Cancer link; *Chem. Eng. News Archive*. **1986**, 64, 10.
- [11] International Agency for Research on Cancer, Monographs, Formaldehyde (Exposure Data).
<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono88-6.pdf> (Consultat el 28/04/2019)
- [12] Enviromental Protection Agency, *Health Effects Notebook for Hazardous Air Pollutants: Formaldehyde*: Estats Units, 2000.
- [13] Pubchem, GHS Classification.
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ghs/#_prec (Consultat el 29/04/2019)
- [14] U.S National Center for Biotechnology information.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7937> (Consultat el 15/04/2019)



[15] Nash, T., The Colorimetric Estimation of Formaldehyde by Means of the Hantzsch Reaction, *Biochem J.* **1953**, 5, 416-421.

[16] Loev, B.; Snaeder, K.M.; The Hantzsch Reaction: Oxidative dealkylation of certain Dihydropyridines, *J. Of Org. Chem.* **1964**, 30, 1914-1916.

[17] Green, J.M.; A Practical Guide to Analytical Method Validation. *Anal. Chem. News & Features.* **1996**, 68.

[18] Pérez, V.; Figueroa, E.; Durán, J.; *Materiales de referencia y comparaciones interlaboratorio. Herramientas para el control de calidad en Laboratorios de ensayo*, Manuel A. Leiva Guzmán, Santiago de Chile: 2006.

[19] Miller, J.N.; Miller, J.C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education: Edinburgh, 2010, pp 43-45, 52-56.

[20] Horwitz, H.; Albert, R.J.; The Horwitz Ratio (HorRat): A useful Index of Method Performance with respect to Precision: 2006, *J.AOAC.* Vol 89; pp 1095-1109

[21] Trullols, E.; Ruisánchez, I.; Rius, X., Validation of qualitative analytical methods. *Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 137-145.

[22] Desimoni, E.; Brunetti, B., About Estimating the Limit of Detection by the Signal to Noise Approach. *Pharm. Anal. Acta*, **2015**, 6, 1-4.

[23] Shrivastava, A.; Vipin Gupta, B., Methods for the determination of limit of detection and quantification of analytical methods, *Chron. Young Sci.*, **2011**, 2, 20-25