

300627

11
24



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
Incorporada a la U. N. A. M.

**IMPLEMENTACION DE UN METODO PARA LA
DETERMINACION DE VITAMINAS A, D Y E POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA
EN UN PRODUCTO VETERINARIO.**

TESIS PROFESIONAL
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
Presenta
RITA CLARISA HAM LEYCHEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

CAPITULO I	OBJETIVO	1
CAPITULO II	INTRODUCCION	4
	2.1 Características de las vitaminas	7
	2.2 Síntomas de deficiencias	10
	2.3 Causas de deficiencias vitamínicas	13
CAPITULO III	GENERALIDADES	15
	3.1 Técnicas de análisis	20
	3.2 Cromatografía de Líquidos de alta eficiencia (HPLC)	24
CAPITULO IV	METODO EXPERIMENTAL	33
	4.1 Material y equipo	34
	4.2 Reactivos	34
	4.3 Condiciones de operación	35
	4.4 Preparación de Patrones de Referencia	35
	4.5 Procedimiento	37
CAPITULO V	RESULTADOS Y DISCUSION	40
CAPITULO VI	CONCLUSIONES	62
CAPITULO VII	BIBLIOGRAFIA	64

CAPITULO I

OBJETIVO

1.0 OBJETIVO

El objetivo principal de éste trabajo es la implementación de un método para la determinación simultánea de Vitaminas A, D y E por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, buscando las condiciones, reactivos y equipos más apropiados como una alternativa a las técnicas tradicionales para la determinación de éstas vitaminas. Tomando en cuenta que las ventajas que ofrece la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) son muchas en relación con las técnicas usadas actualmente, se han propuesto además, los siguientes objetivos secundarios:

- 1) REDUCCION DE COSTOS.- Con la implementación de una técnica por HPLC, se trata de reducir drásticamente el costo del análisis, ya que se disminuye el uso de reactivos y material.
- 2) REDUCCION DEL TIEMPO DE ANALISIS.- El manejo de las técnicas tradicionales para la determinación de las vitaminas antes señaladas consumen un tiempo aproximado de 24 horas de un químico analista, mientras que las técnicas por HPLC, por el hecho de ser automatizadas dan una considerable ventaja en cuanto al ahorro de tiempo y se estima que se ocuparan solamente 8 horas en promedio para la cuantificación de ellas.

- 3) **TECNICA MENOS COMPLEJA.**- Actualmente para la cuantificación de vitaminas liposolubles se requiere de un mayor estudio, preparación y experiencia que las que se proponen por HPLC, ya que en aquellas van diferentes etapas de extracción del principio activo y reacciones con otros componentes que implica una mayor complejidad, mientras que el método por HPLC, elimina muchos pasos y es relativamente más fácil de manejar.

- 4) **MAYOR PRECISION Y SEGURIDAD.**- Como en la técnica la intervención del factor humano para la separación, cualificación y cuantificación de los principios activos es mínima, ésta técnica ofrece - una mayor reproducibilidad puesto que es más factible conservar las mismas condiciones de trabajo entre una y otra determinación. Ofrece también una mayor seguridad para el analista ya que el uso y manejo de disolventes y reactivos algunas veces de alta toxicidad se ve disminuido.

- 5) **TECNICA MAS ADAPTABLE.**- Con los grandes avances y el impulso que actualmente tiene el HPLC, y debido a que cada día se está investigando y dando un mayor interes e importancia, es de mucha utilidad contar con técnicas de acuerdo al avance y dinámica de la tecnología actual, con lo que el método ofrece una mayor adaptabilidad y renovación de acuerdo a las mejoras que se vayan logrando (como son detectores más sensibles, columnas más eficientes y selectivas, etc.).

CAPITULO I I

INTRODUCCION

2.0 INTRODUCCION

Para la adecuada nutrición de cualquier especie animal es necesario un conocimiento cuantitativo de los requerimientos nutricionales en las diferentes etapas de vida y de sus funciones fisiológicas, - ésta clase de información es esencial para alcanzar una eficiencia óptima y económica en el uso de los recursos nutricionales (1).

Anteriormente la producción animal dependía principalmente de los forrajes disponibles. En estado fresco, estos forrajes pudieron satisfacer las necesidades de los animales en nutrientes básicos de - proteínas, grasas y carbohidratos, pero les faltaba, como hoy se - sabe, una necesaria compensación de sales minerales, oligoelementos y principalmente de vitaminas, debido a que, aunque en el pienso están presentes en cantidades suficientes, sufren considerables pérdidas - durante su elaboración y almacenamiento (2). Aún el proceso de alimentos a escala industrial inevitablemente implica pérdidas en los - ingredientes esenciales, especialmente de vitaminas y esto puede - alcanzar proporciones considerables. Pérdidas similares también ocurren cuando tales alimentos se conservan en presencia de la luz, aire, humedad y trazas de metales pesados tales como plomo, mercurio, etc.

Muchos alimentos para el tiempo en que son consumidos no conservan una composición óptima en lo que respecta al contenido de vitaminas (3).

Las vitaminas son un grupo de sustancias orgánicas esenciales, las cuales el cuerpo no puede sintetizar y que cumplen funciones catalíticas. Su intervención facilita la formación y eliminación de las principales sustancias alimenticias y dirige así el metabolismo.

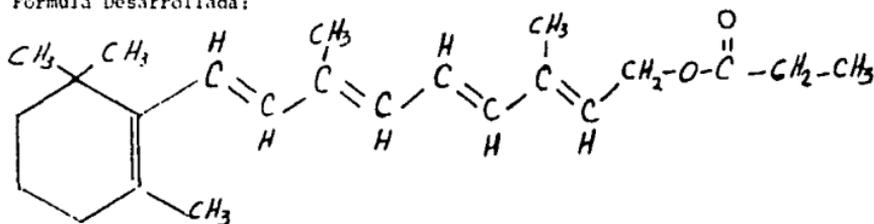
Si el organismo dispone de una o varias vitaminas en cantidad insuficiente o no dispone de ellas en lo absoluto, se ven interferidos algunos procesos del metabolismo, lo cual conduce a trastornos del rendimiento e inhibición del crecimiento. Adicionalmente, la carencia vitamínica origina trastornos en la reproducción y aumenta la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas y parasitarias.

La lista de vitaminas necesarias varía con las especies. Los mamíferos difieren en su habilidad para sintetizar tales sustancias orgánicas esenciales para sus necesidades metabólicas (4).

2.1 CARACTERISTICAS DE LAS VITAMINAS

Propionato de Vitamina A

Fórmula Desarrollada:



Fórmula Condensada: $C_{23}H_{34}O_2$

Peso Molecular: 342.5

Descripción: Aceite viscoso, de color amarillo, con olor sui géneris.

Solubilidad: Insoluble en agua, soluble en aceites vegetales y animales, soluble en alcohol, éter, cloroformo, etc.

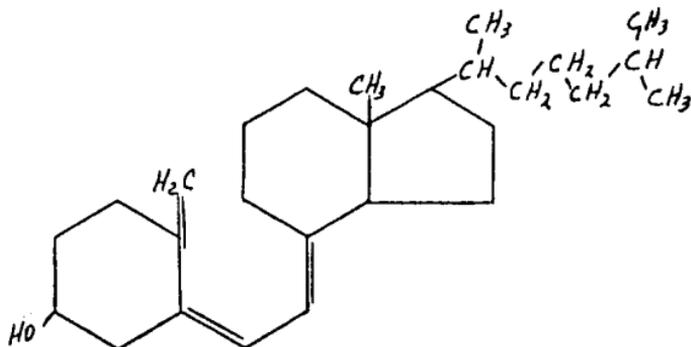
Absorbancia máxima en forma de alcohol 325-328 nm.

Reacciones: No se altera con los ácidos diluidos ni con los alcalis, inestable al calor y a la oxidación. Se destruye por la acción de los rayos ultravioleta.

Estandarización: 0.358 mcg. de propionato de vitamina A corresponde a 1 unidad U.S.P.

COLECALCIFEROL (Vitamina D₃)

Fórmula Desarrollada:



Formula Condensada:

$C_{27}H_{44}O$

Peso Molecular:

384.65

Descripción:

Cristales finos de color blanco.

Solubilidad:

Insoluble en agua. Soluble en éter, cloroformo, alcohol, grasas, etc.

Absorbancia máxima como alcohol:

265 nm.

Reacciones:

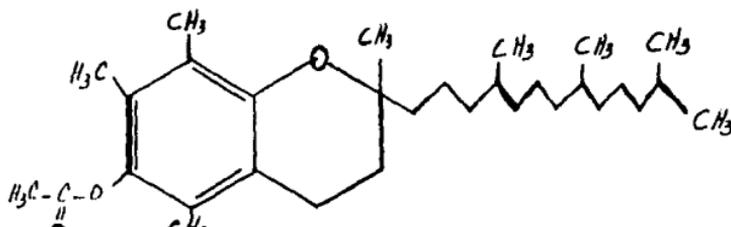
Estable al calor, a ácidos y alcalis inestable a la oxidación y a la luz.

Estandarización:

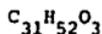
0.025 mcg. de colecalciferol equivalen a 1 unidad U.S.P.

ACETATO DE DL-ALFA TOCOFEROL

Fórmula Desarrollada:



Fórmula Condensada:



Peso Molecular:

472.8

Descripción:

Aceite viscoso de color amarillo pálido, prácticamente inodoro.

Solubilidad:

Insoluble en agua, soluble en alcohol, aceites, cloroformo, éter, etc.

Absorbancia máxima en forma de alcohol:

292 nm.

Reacciones:

Estable a los ácidos y a los agentes reductores, inestable al calor, a los alcalis, a la oxidación y a la luz.

Estandarización:

1 mg. de acetato dl- α -tocopherol equivale a 1 unidad U.S.P. (5)

2.2 SINTOMAS DE DEFICIENCIA.

PROPIONATO DE VITAMINA A

La actividad de la vitamina A, esta asociada con la reproducción, la formación de nuevas células y con la visión normal (6), la vitamina interviene además en la formación y función de las células epiteliales de la piel, donde el principal efecto es la atrofia del tejido epitelial, la cual va seguida por proliferación de las células basales con la consecuente queratinización de las nuevas células. Este cambio - reduce la fuerza del epitelio para resistir la invasión bacteriana (4) También desempeña un papel importante en el proceso de la visión al participar en la formación de la púrpura visual (RODOPSINA), que es el receptor para la visión con poca intensidad de luz. Por esta razón la deficiencia de vitamina A origina un trastorno en la regeneración de la púrpura visual que se manifiesta como ceguera nocturna. La deficiencia causa además xeroftalmia y el crecimiento anormal y lento de los huesos, sequedad general de la piel y el pelo y la conjuntivitis. En general el cuadro patológico final se verá influenciado por las especies, la duración de la deficiencia, la naturaleza de la dieta, el desarrollo bacteriano, sexo, etc. (7)

VITAMINA D

Mejora la absorción de calcio por la mucosa intestinal y estimula la incorporación de calcio y fósforo en la matriz del hueso, por esta causa, una deficiencia de vitamina D, conduce a trastornos en la calcificación de la matriz del hueso, de forma que los huesos se vuelven blandos y se deforman al esfuerzo. Además la vitamina D, influye en la eliminación del fósforo por el riñón, mejorando marcadamente la absorción de fósforo en los tubulos renales, de aquí que la carencia de vitamina tenga como consecuencia un aumento en la eliminación de fósforo en la orina.

VITAMINA E

(Acetato d l Alfa Tocoferol)

Tiene efecto como antioxidante, protegiendo en el organismo a la vitamina A de la desintegración oxidativa y mejora así la administración de vitamina A al organismo. Además es un importante factor protector de la membrana de los eritrocitos porque aumenta su resistencia contra los agentes hemolíticos. En las hembras, una deficiencia ocasiona la eliminación del feto, la implantación del óvulo se lleva a cabo de una manera normal pero hay cambios en la placenta y el feto muere. En el macho hay una degeneración del epitelio germinal, la cual va seguida de una inactividad de los espermatozoides y posteriormente esterilidad e impotencia.

Parece ser que el efecto primario en la deficiencia de vitamina E en virtualmente todos los animales es una degeneración muscular nutricional (2). Una administración deficiente y crónica de esta vitamina se agrava si va acompañada de un aporte insuficiente de proteína - (aparición de anemias) o si a la vez se administran mayores cantidades de grasa que contengan ácidos grasos insaturados.

2.3. CAUSAS DE DEFICIENCIAS VITAMINICAS

La deficiencia de vitaminas puede resultar por uno o varios de los siguientes factores:

- 1) Deficiencias de vitaminas en el alimento.- Cantidades inadecuadas del alimento pueden ser la causa de deficiencia vitamínica, sin embargo los síntomas de enfermedad no se desarrollan hasta que el estado general de malnutrición esta muy avanzado.
- 2) Falta de absorción de vitaminas de los alimentos.- Esta es una complicación común de las enfermedades del tracto digestivo, por ejemplo: la diarrea puede evitar la absorción de componentes vitamínicos. El uso prolongado de aceite mineral puede interferir con la absorción de vitamina A (y de otras vitaminas liposolubles) disolviendo el caroteno, el cual después es excretado en las heces. Como regla general, la falta en la absorción de grasas incluye la falta de absorción de vitaminas liposolubles.
- 3) Incremento de las necesidades vitamínicas.- En animales pequeños y en las hembras durante el embarazo y lactación, las necesidades vitamínicas son altas. El suplemento vitamínico depende así de dos factores: La cantidad absorbida y las necesidades del cuerpo.

Bajo condiciones favorables de vida al aire libre y en clima soleado, la vitamina D, es formada en la piel por irradiaciones del ergosterol por la luz ultravioleta del sol, pero en el invierno, esta vitamina tiene que ser obtenida del alimento (4).

CAPITULO

III

GENERALIDADES

Actualmente los animales criados para una alta productividad proporcionan considerablemente una mayor cantidad de subproductos por kilogramo de alimento consumido, esto incrementa sus requerimientos vitamínicos y no se debe olvidar que grandes cantidades de ellas son transferidas del animal a los productos que produce.

El incremento en la demanda vitamínica de éstos animales debe ser satisfecha por un suplemento vitamínico de ellas. En la alimentación se ha encontrado a menudo que tales suplementos son insuficientes en la práctica, sin embargo, cuando los requerimientos se incrementan por arriba del nivel normal por circunstancias excepcionales, especialmente por enfermedad, se debe recurrir a una administración de las vitaminas faltantes.

A pesar de su aparente carácter terapéutico, la vía parenteral de administración de vitaminas puede servir para claros propósitos nutricionales (8). Se conocen situaciones en la producción animal donde la vía parenteral es el único camino para administrar vitaminas a los animales, tal es el caso, por ejemplo: con el ganado vacuno y bovino que pastan al aire libre en condiciones semi-áridas donde el contenido de caroteno y alfa tocoferol de la pastura en la temporada de sequía es muy baja y los recursos naturales de suplemento no permiten darle al animal lo que él necesita. La alimentación suplementaria en esas áreas es muy rara y la aplicación parenteral representa una forma fácil y simple de introducir las

vitaminas faltantes. Otra indicación absoluta para la administración parenteral de vitaminas liposolubles es durante las enfermedades que perjudican la habilidad del animal para absorber las vitaminas del intestino (por ejemplo: inflamación del intestino, infección parasitaria).

Una terapia acertada de vitaminas por vía parenteral depende de la disponibilidad de preparaciones efectivas, mientras que la manufactura de preparaciones inyectables de vitaminas hidrosolubles, presentan relativamente poca dificultad, las vitaminas liposolubles han requerido de una mayor investigación.

Existen soluciones puras de vitaminas A, D y E en aceite, que están caracterizadas por una disponibilidad biológica relativamente pobre debido a la mala dispersión del aceite en los fluidos tisulares, dando como resultado bajos niveles de vitamina A en el plasma y en el hígado. Si este tipo de productos están todavía en uso es debido principalmente a la supuesta función como depósito extrahepático. La idea fundamental es que la solución oleosa inyectada dentro del tejido libera lentamente un fluido constante de vitaminas dentro de la sangre, asegurando así, el continuo suplemento de vitaminas por un largo período. Se ha demostrado experimentalmente, sin embargo, que las vitaminas contenidas en el depósito oleoso son rápidamente destruidas por oxidación ahí mismo y no pueden contribuir así al incremento deseado del suplemento vitamínico.

La principal desventaja de la solución oleosa es su dispersión pobre en los fluidos corporales, lo cual fué resuelto agregando al aceite un agente emulsificante, el cual baja la tensión superficial

del agua, permitiendo así una distribución rápida de la solución vitamínica oleosa dentro de la sangre. Como se espera, tales preparaciones muestran una excelente acción biológica (8) y se muestra en la figura # 1.

El producto en estudio corresponde al tipo de preparación con agente emulsificante; es un producto del mercado y esta formado por tres vitaminas: Propionato de vitamina A, 500,000 U/ml.; Colecalciferol 75,000 U/ml. y Acetato de dl-alfa Tocoferol 50 U/ml.; presenta una apariencia de líquido fluido, transparente, de color amarillo, con una densidad de 0.96045 g/ml.; su uso es terapéutico. En caso de deficiencia vitamínica, su aplicación es por vía intramuscular. La elevada concentración de este producto hace posible el suministro rápido de grandes cantidades de vitaminas en un reducido número de inyecciones, disminuyendo así, en poco tiempo la deficiencia y evitando que el animal se encuentre en tensión.

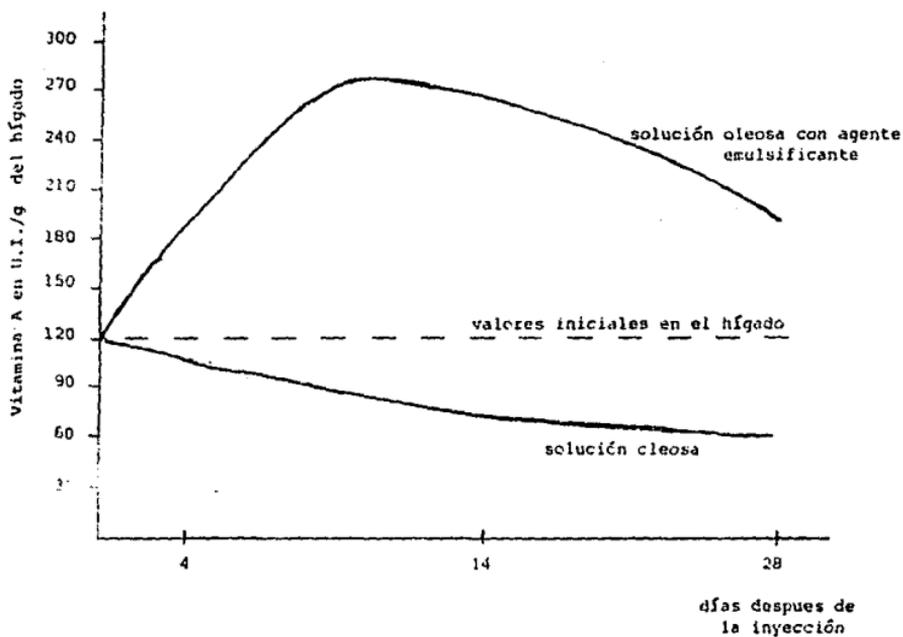


Figura # 1; Acción biológica de la Vitamina A, en diferentes tipos de soluciones vitamínicas. (3).

3.1. TECNICAS DE ANALISIS

Para certificar que los productos contienen las cantidades especificadas de vitaminas, es necesario llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de los principios activos, para lo cual existen diferentes métodos: Biológicos, Físicos y Químicos.

Los primeros análisis de vitaminas fueron efectuados por métodos biológicos (midiendo el crecimiento de una población, un órgano o de un tejido). Los efectos específicos de vitaminas en animales dieron evaluaciones cuantitativas.

Los métodos biológicos son más sensibles y son usados para las muestras de bajo contenido de vitaminas y donde se desea una correlación directa entre el contenido de vitaminas y la respuesta de crecimiento del animal. A pesar de su inequívoca ventaja de su mayor especificidad, los métodos biológicos, han sido cada vez menos usados, ya que ellos consumen más tiempo y son más caros y sus límites de error a menudo son grandes.

Los métodos químicos son más rápidos y reproducibles que los métodos biológicos, normalmente para el análisis de vitaminas se emplean métodos colorimétricos, espectrofotométricos y espectrofluorométricos.

Los métodos oficiales (U.S.P.) para la determinación de la vitamina A, se dividen en:

- Conversión de los ésteres de vitamina A en su alcohol por saponificación alcalina.

- Extracción del alcohol de la solución de saponificación.
- Determinación del contenido de vitamina A, mediante absorción U.V. a 326 nm.

Estos pasos pueden presentar el inconveniente de hidrólisis incompleta, extracción insuficiente y a menudo se presenta una emulsión difícil de romper.

La vitamina D, junto con tricloruro de antimonio da un color amarillo-anaranjado, que no se manifiesta en presencia de anhídrido acético. Esta determinación siempre va precedida de una purificación cromatográfica en columna.

La separación entre las vitaminas A y D, es difícil de lograr debido a la afinidad que ambas presentan hacia los mismos disolventes y aún cuando se usan columnas sucesivas no es posible de aislar una de la otra totalmente y aunado a esto con tricloruro de antimonio en cloroformo, da con el alcohol de vitamina A y sus ésteres una coloración azul característica, que interfiere con la absorción que presenta la vitamina D.

El proceso de análisis de la vitamina E, se subdivide en las siguientes etapas:

- Extracción mediante liposolventes (éter), generalmente con la saponificación del acetato de tocoferol presente. En la mayoría de los casos la saponificación es alcalina, pero debe hacerse en atmósfera inerte.
- Purificación del extracto, mediante cromatografía en columna.

- Determinación del contenido de alfa tocoferol por la reacción de Emmerie Engel, en donde los iones de hierro (III) son reducidos a iones de hierro (II) por el alfa tocoferol libre, éstos dan con el alfa-alfa dipiridilo un complejo color rojo, cuya concentración puede determinarse por espectrofotometría. La reacción no es muy específica, ya que muchas otras sustancias pueden también reducir los iones de hierro (III) dando la misma reacción.

Se aplicó la cromatografía de gases para el análisis cuantitativo de los tocoferoles, pero no es apropiado para el análisis de las vitaminas A y D, debido a la inestabilidad de éstas y a las altas temperaturas de la columna o columnas requeridas para su elución.

Los métodos de cromatografía de líquidos resultan más convenientes para el análisis de vitaminas liposolubles debido a su alta precisión, a que no requieren temperaturas elevadas, sólo se necesita un mínimo tratamiento de la muestra antes de la inyección y aún los componentes más polares pueden fácilmente analizarse.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia permite una determinación simultánea de varias vitaminas, lo cual reduce drásticamente el tiempo de análisis, aumentando la disponibilidad del producto analizado (ya que el análisis rápido dentro de un proceso productivo permite la reducción del tiempo de almacenamiento del producto) y la reducción en el uso de disolventes y reactivos, algunos de ellos tóxicos. (11)

En años recientes, la versatilidad y utilidad de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia ha aumentado por los siguientes motivos:

- La disponibilidad de nuevas y eficientes columnas de partículas pequeñas.
- Desarrollo de detectores más sensibles y específicos.
- La disponibilidad de controles de temperatura arriba de la temperatura ambiente.
- La habilidad para llevar a cabo separaciones a escala preparativa en el mismo instrumento.

3.2 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

Existen dos características principales de la separación cromatográfica: La emigración diferencial de varios compuestos (solutos) en la muestra original y una dispersión a lo largo de la columna de las moléculas de cada soluto. La emigración diferencial en la cromatografía de líquidos se refiere a las distintas velocidades de diferentes compuestos a través de la columna. La emigración diferencial es la base de la separación en cromatografía, sin una diferencia en las velocidades de emigración para dos compuestos, no es posible una separación.

La emigración diferencial o el movimiento de los componentes individuales a través de la columna depende del equilibrio en la distribución de cada componente entre la fase estacionaria y la fase móvil. Así, la emigración diferencial está determinada por las variables experimentales que afectan la distribución; la composición de la fase móvil, de la fase estacionaria y la temperatura de separación.

La dispersión molecular depende de varios factores:

- La dispersión de remolino o de múltiples caminos. Proviene de las diferentes corrientes microscópicas que el disolvente sigue entre diferentes partículas dentro de la columna, como resultado, las moléculas de la muestra toman diferentes caminos a través del empaque, dependiendo del flujo que ellos sigan, así el líquido se mueve más rápidamente en las sendas anchas y más lentamente en las angostas y se vuelve progresivamente mayor a medida que el disolvente fluye a través de la columna.

- Una segunda contribución a la dispersión de la banda es la transferencia en la fase móvil. Esto se refiere a los diferentes tipos de flujos para varias partes de una misma corriente o senda entre las partículas a su alrededor. De esta forma el líquido adyacente a una partícula se mueve más lentamente, mientras que el líquido que pasa por el centro de la corriente se mueve más rápidamente.
- Con empaques de partículas porosas, la fase móvil dentro de los poros de las partículas puede estar estancada o sin movimiento, las moléculas que se difunden una corta distancia dentro del poro retornan a la fase móvil rápidamente y se mueven hacia abajo a una cierta distancia por la columna, por lo que hay un incremento en la difusión molecular.
- Si una molécula penetra muy profundamente dentro de la fase estacionaria, consume un largo tiempo dentro de la partícula y viaja una corta distancia por la columna.
- Finalmente existe la dispersión longitudinal, en donde las moléculas tienden a difundirse en la dirección del flujo, esto causa una dispersión adicional de las moléculas de la muestra a lo largo de la columna, no es un efecto importante pero es significativo a flujos bajos de la fase móvil en columnas con partículas pequeñas.

Eventualmente los diferentes compuestos que llegan al final de la columna son llevados hacia el detector donde sus concentraciones son medidas como una función del tiempo de separación.

Cada cromatograma puede ser identificado por cuatro variables importantes para describir la separación resultante y son:

- 1) Cada compuesto deja la columna en la forma de un pico o banda en forma de campana.
- 2) Cada banda emerge de la columna a un tiempo característico (t_r) el cual puede ser usado para identificar el compuesto. Este tiempo de retención t_r , es medido desde el tiempo de la inyección de la muestra al tiempo en que el máximo de la banda deja la columna.
- 3) La diferencia en tiempos de retención entre bandas adyacentes. Mientras más grande sea esa diferencia más fácilmente se logra la separación de las dos bandas.
- 4) Finalmente cada banda está caracterizada por el ancho del pico (t_w). La separación es mejor para bandas más angostas y para valores más pequeños de t_w . (Figura # 2)

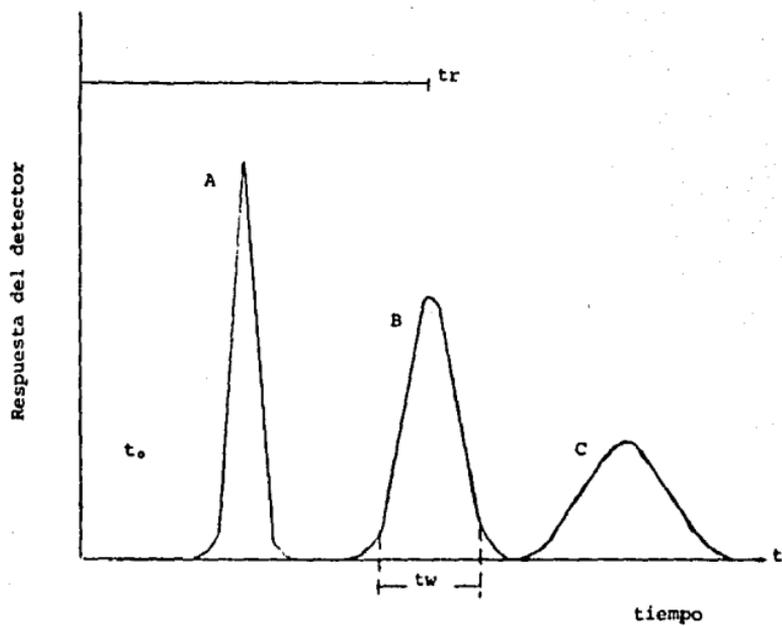


Figura # 2.; Cromatograma Resultante, t_0 marca la elución de cualquier compuesto no retenido.

TIPOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

Existen seis mecanismos de separación de acuerdo al tipo de fase estacionaria usada:

- 1) Líquido-líquido.
- 2) Fases químicamente unidas.
- 3) Líquido-sólido.
- 4) Intercambio iónico.
- 5) Pares de iones.
- 6) Exclusión de acuerdo al tamaño de partícula.

1) CROMATOGRAFIA LIQUIDO-LIQUIDO O DE PARTICION.- Las moléculas del soluto son distribuidas entre dos líquidos inmiscibles. De acuerdo a sus solubilidades relativas, un líquido es la fase móvil y el otro es la fase estacionaria que se encuentra unido por adsorción a un soporte finamente dividido que es usualmente inerte.

Existe una gran area de contacto entre la fase estacionaria y la fase móvil para un rápido equilibrio en la distribución de los componentes de la muestra. La separación se da como resultado de la diferente distribución de los solutos entre las dos fases líquidas.

La cromatografía líquido-líquido, generalmente separa en base al tipo y número de sustituyentes y por diferencias en pesos moleculares.

El inconveniente que presenta esta técnica es la solubilidad de la fase estacionaria y el deterioro de la columna.

- 2) FASES QUÍMICAMENTE UNIDAS.- Esta técnica cromatográfica surgió como consecuencia de los problemas asociados con la cromatografía líquido-líquido. Debido a que su fase estacionaria está químicamente unida a la superficie de un soporte, no puede ser fácilmente removida o producir deterioro alguno en la columna. Separa en base al número y tipo de grupos funcionales.

El mecanismo de separación de ésta técnica no ha sido completamente elucidado; es un mecanismo complejo, cuyas características son similares a las de la cromatografía líquido-sólido.

La cromatografía líquido-líquido y la de fases químicamente unidas, poseen una gran versatilidad debido a la amplia variedad de líquidos que pueden ser seleccionados para la fase estacionaria.

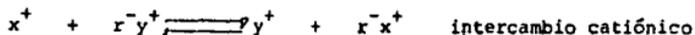
Pueden ser aplicados para diferentes tipos de muestras tanto polares como no polares (Fase inversa y fase directa), no presentan problemas de degradación térmica que frecuentemente ocurre en la cromatografía de gases en la separación de compuestos polifuncionales. Los efectos de isomerización, hidrólisis, etc., que ocurren en la cromatografía líquido-sólido, no se encuentran aquí.

- 3) CROMATOGRAFIA LIQUIDO-SOLIDO O DE ADSORCION.- Es más útil para muestras solubles en compuestos orgánicos. Los compuestos multifuncionales muy polares a menudo requieren un ajuste cuidadoso de las condiciones cromatográficas para evitar bandas no bien definidas.

Las muestras muy polares o iónicas no tienen buena separación. Las muestras muy poco solubles en agua y la mezcla de compuestos en los que solo difiere el número de grupos funcionales, son a menudo mejor separadas por éste tipo de cromatografía. Soporta altas concentraciones de muestra y presenta gran estabilidad en pH extremos, por esto la cromatografía líquido-sólido, es utilizada para separaciones preparativas.

La base de selectividad de ésta cromatografía puede ser entendida en términos del proceso de adsorción. El mecanismo de separación se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido, algunos de los sólidos utilizados con más frecuencia son: alúmina y gel de sílice.

- 4) INTERCAMBIO IÓNICO.- Es llevada a cabo con empaques que poseen grupos funcionales con carga electrónica. El mecanismo de retención es un mecanismo simple de intercambio de los iones de la muestra "x" y los iones de una muestra "y" con los grupos cargados "r" de la fase estacionaria.



Los iones de la muestra que interactúan débilmente con el intercambiador iónico (en presencia de iones de la fase móvil en competencia) serán débilmente retenidos en la columna y registrados muy pronto en el cromatograma. Los iones de la muestra que interactúan fuertemente con el intercambiador iónico serán retenidos más fuertemente y se registran después.

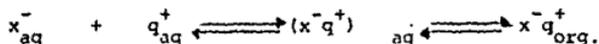
Aunque la cromatografía de intercambio iónico, a veces es aplicada para la separación de compuestos iónicos (sales), es más comúnmente usada para la separación de ácidos orgánicos HA y bases B, que pueden existir como iones bajo condiciones de pH apropiadas.

- 5) PARES DE IONES.- Este tipo de cromatografía puede ser usado tanto en fase directa como fase inversa, siendo ésta última la más popular, aunque el proceso básico es similar para ambas técnicas.

La fase estacionaria en la fase inversa puede ser un empaque de sílica silanizado usualmente usado en la cromatografía de fases químicamente unidas o un empaque similar a los usados en la cromatografía líquido-líquido, inmiscible en agua como 1-pentanol.

La fase móvil consiste de una mezcla de amortiguadores acuosos con un disolvente orgánico miscible en agua y un contraión orgánico de carga opuesta a la de la muestra. El pH de la fase móvil es ajustado para maximizar la ionización del soluto.

La muestra iónica x^{-n} más el contraión q^{+n} se combinan para formar el ión-par ($x^{-n}q^{+n}$) el cual presenta afinidad por la columna que es retenida por ella.



La retención está controlada por:

- La temperatura
- Tipo, tamaño y concentración del contraión
- Tipo y composición del modificador orgánico
- Fuerza iónica y pH de la fase acuosa.

- 6) EXCLUSION DE ACUERDO AL TAMAÑO DE PARTICULA.- Se usa para separar componentes de alto peso molecular (arriba de 2000) particularmente aquellos no iónicos. Separa moléculas de acuerdo a su tamaño efectivo en solución, la razón para la retención relativa de diferentes moléculas de muestra por medio de un empaque de partículas porosas es que, si algunas moléculas de la muestra son demasiado grandes para entrar en los poros, estas son totalmente excluidas de la partícula, éstas grandes moléculas de muestra se mueven directamente a través de la columna y aparecen primero en el cromatograma. Las moléculas que son demasiado pequeñas y que pueden penetrar a través de los poros del empaque, son retenidas y se mueven a través de la columna más lentamente, estos solutos aparecen a lo último en el cromatograma. Los solutos de tamaño intermedio son estéricamente menos capaces de aproximarse a las paredes de los poros y en promedio consumen menos tiempo en éstos. Los solutos se mueven a través de la columna a velocidades dependientes de su tamaño relativo. (12, 13).

CAPITULO IV

METODO EXPERIMENTAL

4.0 METODO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL Y EQUIPO

- 1) Balanza Analítica Mettler
- 2) Equipo Millipore de Filtración
- 3) Material de uso común en el laboratorio
- 4) Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia Hewlett Packard, Mod. 1081B, con control de flujo, Lámpara U.V. de onda fija (254 nm) integrador Mod. 3390A
- 5) Equipo de Ultrasonido Branson 32
- 6) Columnas Lichrosorb RP-18 Hewlett Packard, de acero inoxidable 20 cm x 4.6 mm D.I., tamaño de partícula de 10 milimicras.

4.2 REACTIVOS

- 1) Metanol HPLC
- 2) Dicloro metano HPLC
- 3) Reactivos de uso común en el laboratorio (ejem. alcohol, isooctano, etc.)
- 4) Patrones de referencia de U.S.P., Propionato de vitamina A, Colecalciferol (cris.), Acetato dl-alfa tocoferol.
- 5) Muestra problema (concentrado de vitaminas A, D y E, para consumo animal)

4.3 CONDICIONES DE OPERACION

Cero:	10
Atenuación:	9
Velocidad de carta:	0.2 cm/min.
Ancho del pico:	1.0
Umbral:	2.0
Flujo:	0.8 ml/min.
Presión:	80 BAR
Temperatura:	25°C.
Fase móvil:	Metanol HPLC
Volumen de muestra:	20 Microlitros
Longitud de onda:	254 nm.

4.4 PREPARACION DE PATRONES DE REFERENCIA

4.4.1. PREPARACION DE PROPIONATO DE VITAMINA A

Pesar con exactitud el equivalente en gramos a 680,000 unidades de Propionato de vitamina A, en un matraz volumétrico de bajo actinio de 25 ml. Disolver y aforar con Diclorometano. Esta solución contiene 27,200 u/ml. Almacenar a 5°C., tiempo de caducidad: 2 días.

4.4.2. COLECALCIFEROL

Pesar con exactitud el equivalente en gramos a 103,000 unidades de Colecalciferol, en un matraz volumétrico de bajo actinio de 25 ml., disolver y aforar con Diclorometano. Esta solución contiene 4120 u/ml. Almacenar a 5°C., tiempo de caducidad: 2 días.

4.4.3. ACETATO DE dl-ALFA TOCOFEROL

Pesar con exactitud el equivalente en gramos a 68.0 unidades de Acetato de dl-alfa Tocoferol, en un matraz volumétrico de bajo actinio de 25 ml., disolver y aforar con Diclorometano. Esta solución contiene 2.72 u/ml. Almacenar a 5°C., tiempo de caducidad: 2 días.

4.4.4. MEZCLA DE PATRONES DE REFERENCIA

Pesar con exactitud el equivalente en gramos a 680,000 unidades de Propionato de vitamina A, 103,000 unidades de Colecalciferol y 68.0 unidades de Acetato de dl-alfa Tocoferol, en un matraz volumétrico de bajo actinio de 25 ml., disolver y aforar con Diclorometano. Almacenar a 5°C., tiempo de caducidad: 2 días.

4.4.5. PREPARACION DE LA MUESTRA

Pesar con exactitud 1.3209 g. del concentrado de vitaminas A, D y E, el cual contiene teóricamente 687,646 unidades de Propionato de vitamina A, 103,146.96 unidades de Colecalciferol y 68.76 unidades de Acetato de dl-alfa Tocoferol,

en un matraz volumétrico de bajo actinio de 25 ml., disolver y aforar con Diclorometano. Almacenar a 5°C., cada mililitro de ésta solución contiene 27,505.86 unidades de Propionato de vitamina A, 4,125.88 unidades de Colecalciferol y 2.75 unidades de Acetato de dl-alfa Tocoferol.

4.4.6. MUESTRA EN BLANCO

Pesar con exactitud 1.3209 g. de la muestra en blanco en estudio, en un matraz volumétrico de bajo actinio de 25 ml., disolver y aforar con Diclorometano. Almacenar a 5°C.

4.5 PROCEDIMIENTO

Ya encendido el cromatógrafo, se procede a equilibrar el sistema con 100 ml. de fase móvil desgasificada, posteriormente se inyectan 20 ~~μ~~l. de muestra en el siguiente orden:

- 1) Diclorometano
- 2) Diclorometano
- 3) Acetato dl-alfa tocoferol
- 4) Colecalciferol
- 5) Propionato de vitamina A
- 6) Muestra problema de vitaminas A, D y E
- 7) Mezcla de patrones de referencia
- 8) Muestra en blanco

Se corre cada cromatograma por espacio de 40 min.

REPRODUCIBILIDAD

Para conocer la reproducibilidad del método, se realizaron 10 cromatogramas, tanto de la muestra problema de vitaminas, como de la mezcla de patrones de referencia, se tomó como límite máximo un 5% de variación con respecto al promedio de las áreas. (16)

CUANTIFICACION

La cuantificación se hará en base a la concentración y áreas de la muestra problema y patrón de referencia.

$$\text{VITAMINAS} = \frac{A (C) (E)}{B (D)} = F \text{ u/g}$$

$$F (G) = H \text{ u/ml.}$$

En donde:

A = Area de la vitamina en la muestra

B = Area de la vitamina patrón de referencia

C = Peso del patrón correspondiente

D = Peso de la muestra

E = Potencia de patrón de referencia

G = Densidad de la muestra problema = D .96045

LINEALIDAD

Se verificará inyectando 5 diluciones de la muestra que se observan en la Tabla I. (16)

TABLA I

CONCENTRACIONES DE LA MUESTRA PARA OBTENER LA LINEALIDAD

PESO MUESTRA EN GRAMOS	CONCENTRACIONES EN UNIDADES DE PROPIONATO DE VITAMINA A	CONCENTRACIONES EN UNIDADES DE COLECALCIFEROL	CONCENTRACIONES EN UNIDADES DE ACETATO d1-ALFA TOCOFEROL
1) 0.9209	479,410.690	71,911.603	47.941
2) 1.1209	583,528.550	87,529.280	58.353
3) 1.3209	687,646.400	103,146.960	68.765
4) 1.5209	791,764.250	118,764.630	79.176
5) 1.7209	895,882.100	134,382.310	89.582

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS Y DISCUSION

Howard y Hadden (Tabla 2, Fig. 3), utilizan para la cuantificación de éste tipo de vitaminas las columnas de fase inversa RP 18 y como fase móvil una mezcla de metanol: agua (95:5) (Figs. 3 y 4).

Se hicieron pruebas variando la relación de metanol: agua, encontrándose que la concentración de agua en la fase móvil es directamente proporcional a la resolución y al tiempo de retención (t_r), por lo que se prefirió disminuir la resolución e imprimir a la técnica velocidad y menor costo sin afectar la exactitud y reproducibilidad.

La resolución se disminuyó, tomando en cuenta el pico de la vitamina D, que es el limitante, hasta un valor cercano a 0.8 que es el valor mínimo para obtener una separación satisfactoria. (13)

El objeto de repetir la primera inyección (según se indica en el procedimiento), fué la de conocer las anomalías de la columna - debido a que puede presentar un cromatograma no característico, - después de varias repeticiones encontramos que cuando la columna - ha trabajado por un lapso de tiempo amplio con las mismas condiciones, la primera corrida no presenta alteraciones con respecto a la segunda, ahorrando así el tiempo de su repetición.

Se compararon los cromatogramas obtenidos tanto de los patrones de referencia como de la muestra problema (Figs. 4, 5, 6, 7, 8 y 9), para verificar los picos de cada una de las vitaminas de acuerdo a los tiempos de retención.

Se compararon también con la muestra en blanco para observar si existe alguna interferencia en las regiones donde los principios activos eluyen. Los resultados se reportan en la Tabla 3.

Los tiempos de retención de cada una de las vitaminas quedan así identificados, observándose también que la muestra en blanco no presenta ninguna respuesta cromatográfica en los tiempos de retención de las vitaminas.

De acuerdo con los datos obtenidos para verificar la reproducibilidad (Tablas 4 y 5), encontramos que los tiempos de retención - presentan, tanto para la muestra problema como para la mezcla de - patrones de referencia una variación de 0.6 - 1.0%, teniendo con - esto una ratificación de los tiempos característicos de estas vitaminas y así mismo de su reproducibilidad.

La bibliografía reporta (16), un coeficiente de variación máximo de 2%, siendo los obtenidos alrededor de 1.0% y la variación mayor de 1.642% para la vitamina A de la muestra problema, resultando así, que la reproducibilidad es mayor para las vitaminas E y D, en comparación con la vitamina A, en las concentraciones estudiadas.

La linealidad obtenida es satisfactoria en los niveles de concentración seleccionados para las tres vitaminas, (Tabla 6), debido a que el coeficiente de correlación es muy cercano a 1.0

En cuanto a la cuantificación tomando los datos de la Tabla 4, reportamos los datos obtenidos en la Tabla 7.

De acuerdo con la Tabla 8, observamos que el método tradicional reporta un tiempo de análisis de 24 hrs., y el método por HPLC, de 3 hrs., representando una diferencia de 21 hrs., lo que equivale a 2.6 días de ahorro si se analiza el producto vitamínico por el método de HPLC.

El tiempo requerido para la preparación y cuantificación de una sola muestra es de 3 hrs., por lo que el uso repetido de este método permite analizar aproximadamente 4 muestras y una mezcla de patrones en un día de 8 hrs. de trabajo de un analista, reduciendo así el tiempo de análisis y cumpliendo con uno de los objetivos propuestos. Esto además, tiene como consecuencia la disminución en cuanto al costo del análisis del producto ya que el tiempo y la utilización de reactivos se reduce considerablemente.

En la Tabla 9, se observa que la inversión inicial en el método por HPLC, es mayor (\$12,227,500) con respecto al método tradicional (\$2,323,127) por lo que hay una inversión adicional de \$9,904,373 en el método por HPLC.

En cuanto al costo del análisis (tiempo de trabajo y gasto de disolventes), se encuentra que es menor en el método por HPLC. (\$4,399), en comparación con el método tradicional (\$36,762), habiendo una diferencia de \$32,363.

De acuerdo con las diferencias obtenidas:

La inversión adicional en el método por HPLC, se amortiza analizando 306 muestras, ya que con éste método por cada análisis se ahorra \$32,363

$$9,904,373/32,363 = 306 \text{ muestras}$$

De acuerdo con la Tabla 8, se cuantifica una muestra en 3 hrs. y 4 muestras en 8 hrs. de trabajo, ya que solo es necesario una mezcla de patrones de referencia, por lo que las muestras serian analizadas en $306/4 = 76.5$ días, que equivalen a 3.8 meses aproximadamente, ya que se trabajan como promedio 20 días al mes.

TABLA 2

FASE MOVIL Y COLUMNAS RECOMENDADAS PARA ALGUNAS VITAMINAS (10, 11)

MUESTRA	FASE MOVIL	COLUMNA
VITAMINAS		
- Niacina, niacinamina, piridoxina, tiamina y riboflavina	Metanol-Agua	RP 18
- Complejo B	Propanol-Agua	RP 18
- Vitamina D ₂ - D ₃	Metanol-Agua	RP 18
- Compuestos Insaturados y Heterocíclicos	Metanol-Agua	RP 18

FIGURA 3

TABLA DE SELECCION DE COLUMNAS APROPIADAS

MUESTRA	SOLUBILIDAD	PROP. DE LA MUESTRA	COLUMNA	FASE MOVIL
MUESTRA	SOLUBLE EN SOLVENTES ORGANICOS	SOLUBLE EN HEXANO (NO POLAR)	FASE REVERSA NO ACUOSA	METANOL, HEXANO TETRAHIDROPURANO
		SOLUBLE EN ALCOHOL (MODERADAMENTE POLAR)	ADSORCION	HEXANO, METANOL

TABLA 3

TIEMPOS DE RETENCION CARACTERISTICOS PARA CADA UNA DE LAS VITAMINAS

(VER CROMAT. FIGS. 4, 5, 6, 7, 8 y 9)

VITAMINA	tr. PATRONES DE REFERENCIA	tr. MUESTRA (min)	tr. MUESTRA EN BLANCO
PROPIONATO DE VITAMINA A	6.88	6.86	-
COLECALCIFEROL	10.91	10.91	-
ACETATO DE dl- ALFA TOCOFEROL	15.01	15.00	-

TABLA 4

DATOS DE LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DE LA MUESTRA PROBLEMA
(CROMATOGRAMA No.8)

M U E S T R A						
	CROMATOGRAMA 1		CROMATOGRAMA 2		CROMATOGRAMA 3	
	tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
Prop. vit. "A"	6.89	5.0069	6.86	4.9593	6.95	5.0103
Colecalciferol	10.96	2.9887	10.91	2.9967	10.95	3.0231
Acet. dl-Alfa Tocoferol	15.08	1.8080	15.00	1.7959	15.05	1.7859
	CROMATOGRAMA 4		CROMATOGRAMA 5		CROMATOGRAMA 6	
	tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
Prop. vit. "A"	6.84	5.0538	6.82	4.9512	6.87	5.1523
Colecalciferol	10.99	3.0456	10.88	2.9447	10.89	2.9901
Acet. dl-Alfa Tocoferol	15.13	1.8005	14.96	1.7605	14.98	1.7811
	CROMATOGRAMA 7		CROMATOGRAMA 8		CROMATOGRAMA 9	
	tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
Prop. vit. "A"	6.95	5.1790	6.89	4.9657	6.89	5.1610
Colecalciferol	10.95	3.0591	10.87	3.0025	10.93	3.0079
Acet. dl-Alfa Tocoferol	15.07	1.8195	14.95	1.8046	15.01	1.8190
	CROMATOGRAMA 10					
	tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
Prop. vit. "A"	6.87	5.0918				
Colecalciferol	10.99	3.0020				
Acet. dl-Alfa Tocoferol	15.12	1.7905				

TABLA 4 CONTINUACION

DATOS DE LOS CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DE LA MEZCLA
DE PATRONES DE REFERENCIA (VER CROMATOGRAMA No.9)

E S T A N D A R						
	CROMATOGRAMA 1		CROMATOGRAMA 2		CROMATOGRAMA 3	
	tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
Prop. vit. "A"	6.93	4.6723	6.86	4.6680	6.83	4.6575
Colecalciferol	10.90	2.2909	10.89	2.2504	10.96	2.2586
Acet. dl-Alfa Tocoferol	15.07	1.7125	15.03	1.7183	14.97	1.7001
E S T A N D A R						
	CROMATOGRAMA 4		CROMATOGRAMA 5		CROMATOGRAMA 6	
	tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
Prop. vit. "A"	6.91	4.5992	6.86	4.7169	6.88	4.7024
Colecalciferol	10.88	2.2877	10.86	2.2571	10.92	2.2628
Acet. dl-Alfa Tocoferol	15.11	1.6860	15.00	1.7269	15.09	1.7001
E S T A N D A R						
	CROMATOGRAMA 7		CROMATOGRAMA 8		CROMATOGRAMA 9	
	tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
Prop. vit. "A"	6.88	4.5986	6.85	4.7309	6.89	4.6857
Colecalciferol	10.85	2.2592	10.92	2.2939	10.85	2.2495
Acet. dl-Alfa Tocoferol	15.06	1.6851	14.96	1.7139	15.05	1.7117
E S T A N D A R						
	CROMATOGRAMA 10					
	tr	AREA				
Prop. vit. "A"	6.81	4.6180				
Colecalciferol	10.94	2.2641				
Acet. dl-Alfa Tocoferol	14.97	1.7157				

TABLA 5

COEFICIENTES DE VARIACION Y DESVIACIONES ESTANDAR
DE CADA UNA DE LAS VITAMINAS EN LA MUESTRA PROBLEMA

M U E S T R A					
VITAMINA A		COLECALCIFEROL		ACETATO d1-ALFA TOCOFEROL	
tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
6.89	5.0069	10.96	2.9887	15.08	1.8080
6.86	4.9593	10.91	2.9967	15.00	1.7959
6.95	5.0103	10.95	3.0231	15.05	1.7859
6.84	5.0538	10.99	3.0456	15.13	1.8005
6.82	4.9512	10.88	2.9447	14.96	1.7608
6.87	5.1523	10.89	2.9901	14.98	1.7811
6.95	5.1790	10.95	3.0591	15.07	1.8195
6.89	4.9657	10.87	3.0025	14.95	1.8046
6.89	5.1610	10.93	3.0079	15.01	1.8190
6.87	5.0918	10.99	3.0020	15.12	1.7905
prcm. 6.88	5.0541	10.93	3.0060	15.04	1.7966
Desv. std	0.08299		0.03181		0.017978
Coef. var.	1.6424		1.058		1.0007

TABLA 5 (CONTINUACION)

COEFICIENTES DE VARIACION Y DESVIACIONES ESTANDAR DE CADA
UNA DE LAS VITAMINAS EN LA MEZCLA DE PATRONES DE REFERENCIA

E S T A N D A R					
VITAMINA A		COLECALCIFEROL		ACETATO d1-ALFA TOCOFEROL	
tr	AREA	tr	AREA	tr	AREA
6.93	4.6723	10.54	2.2641	15.07	1.7175
6.86	4.6680	10.90	2.2909	15.03	1.7183
6.83	4.6575	10.89	2.2504	14.97	1.7001
6.91	4.5992	10.96	2.2586	15.11	1.6860
6.86	4.7169	10.88	2.2877	15.00	1.7269
6.88	4.7024	10.86	2.2571	15.09	1.7001
6.88	4.5986	10.92	2.2628	15.06	1.6851
6.85	4.7309	10.85	2.2592	14.96	1.7139
6.89	4.6857	10.92	2.2939	15.05	1.7117
6.81	4.6180	10.85	2.2495	14.97	1.7157
prom. 6.87	4.6620	10.90	2.2614	15.04	1.7075
Desv. std.	0.04716		0.01716		0.0141
Coef. var.	1.0115		0.7578		0.8264

L I N E A L I D A D

CONCENTRACION	AREA DE PROPIONATO DE VITAMINA A	COLECALCIFEROL	ACETATO dl-ALFA TOCOPEROLO
1) 0.9209	4.4595	2.0567	1.2396
2) 1.1209	4.7599	2.4733	1.5001
3) 1.3209	5.0531	3.0060	1.7966
4) 1.5209	5.3512	3.4626	2.0841
5) 1.7209	5.7023	3.9474	2.3714
Recta de regresión	$Y=3.032+1.5384 X$	$Y=0.1614+2.3852 X$	$Y=-0.079+1.4213 X$
Coefficiente de correlación	0.9994	0.9995	0.9996

TABLA 7

CUANTIFICACION DE LAS VITAMINAS DE LA MUESTRA

PROBLEMA DE ACUERDO CON LAS AREAS OBTENIDAS

PROPIONATO DE VITAMINA A

Peso		
Std)	0.2850 g.	Potencia: 2495800 u/g.
M)	1.3209 g.	Densidad = 0.96045 g/ml.
M)	5.0531 (0.2850) (2495800)	
	<u>4.6620 (1.3209)</u>	= 583,673.95 u/g.
		560,589.64 u/ml.
		12.0% exceso

COLECALCIFEROL

Peso		
Std)	0.0027 g.	Potencia: 40×10^6 u/g.
M)	1.3209 g.	Densidad = 0.96045 g/ml.
M)	3.006 (40×10^6) (0.0027)	
	<u>2.2644 (1.3209)</u>	= 108,539.95 u/g.
		104,247.19 u/ml.
		39.0% exceso

ACETATO DE dl-ALFA TOCOFEROL

Peso		
Std)	0.0758	Potencia: 996 u/g.
M)	1.3209 g.	Densidad = 0.96045 g/ml.
M)	1.7966 (0.0758) (996)	
	<u>1.7106 (1.3209)</u>	= 60.029 u/g.
		57.6549 u/ml.
		15.0% exceso

ID 0000

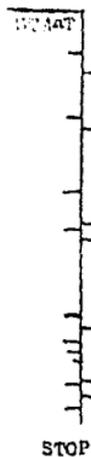


FIGURA 4
DISOLVENTE

RUN # 2 DEC/07/84 16:48:07
ID 000
NO RUN PEAKS STORED

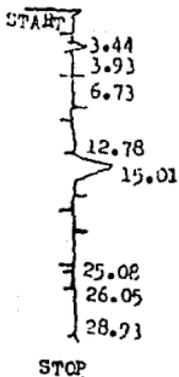


FIGURA 5
ACETATO DE dl
ALFA TOCOFEROL

ID 2 0

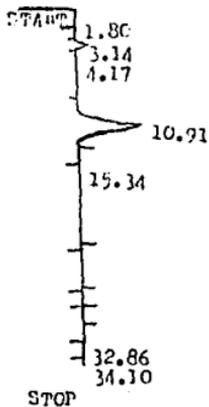


FIGURA 6

COLECALCIFEROL

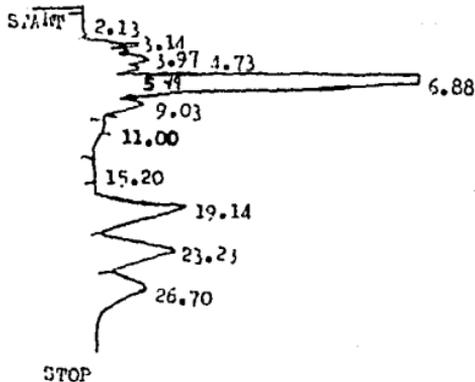
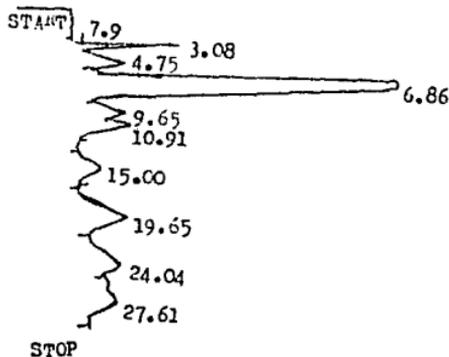


FIGURA 7

PROPIONATO DE VITAMINA A



RUN # 11
ID 123

RT	AREA	TYPE	AH/HT	A:EA%
1.79	225600	PH	0.741	0.028
3.08	4.9608E+07	DSHE	0.662	6.150
4.76	2.0271E+07	TBB	0.836	2.513
6.86	4.9593E+08	ISHH	2.289	61.477
9.65	2.3974E+07	TAV	0.988	2.972
10.91	2.9967E+07	TYF	0.976	3.715
15.00	1.7959E+07	TPV	1.246	2.226
19.65	5.9505E+07	TPV	1.919	7.376
24.04	5.4876E+07	TVV	2.250	6.803
27.61	5.4381E+07	TVP	2.821	6.741

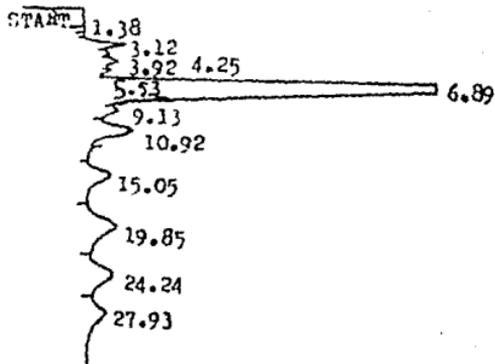
TOTAL AREA = 8.0669E+08

MUL FACTOR = 1.0000E+00

FIGURA 8

CONCENTRADO DE VITAMINAS A, D y E.

(MUESTRA PROBLEMA)



STOP

RUN # 5

ID 123

AREA%

HT	AREA	TYPE	AR/HT	AREA%
1.78	53099	BV	0.327	0.008
2.24	93785	VV	0.470	0.014
3.12	1.1360E+07	VV	0.415	1.725
3.97	1.0220E+07	VV	0.628	1.552
4.75	1.9867E+07	VV	0.909	3.016
5.53	8516400	D VV	0.588	1.293
6.89	4.6857E+08	ISHH	1.649	71.139
9.13	4185500	TBP	0.566	0.636
10.92	2.2939E+07	TPB	0.974	3.483
15.05	1.7117E+07	TBF	1.265	2.599
19.85	3.5593E+07	TPV	1.924	5.405
24.24	3.3890E+07	TVV	2.101	5.145
27.93	2.6255E+07	ITVB	2.499	3.986

TOTAL AREA= 6.5867E+08

NUL FACTOR= 1.0000E+00

FIGURA 9

MEZCLA DE PATRONES DE REFERENCIA

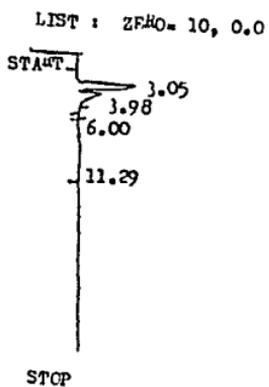


FIGURA 10
MUESTRA EN BLANCO

LINEALIDAD

TABLA No. 7

ESTA TESTS DE BEBE SALOR DE LA INFLUENZA

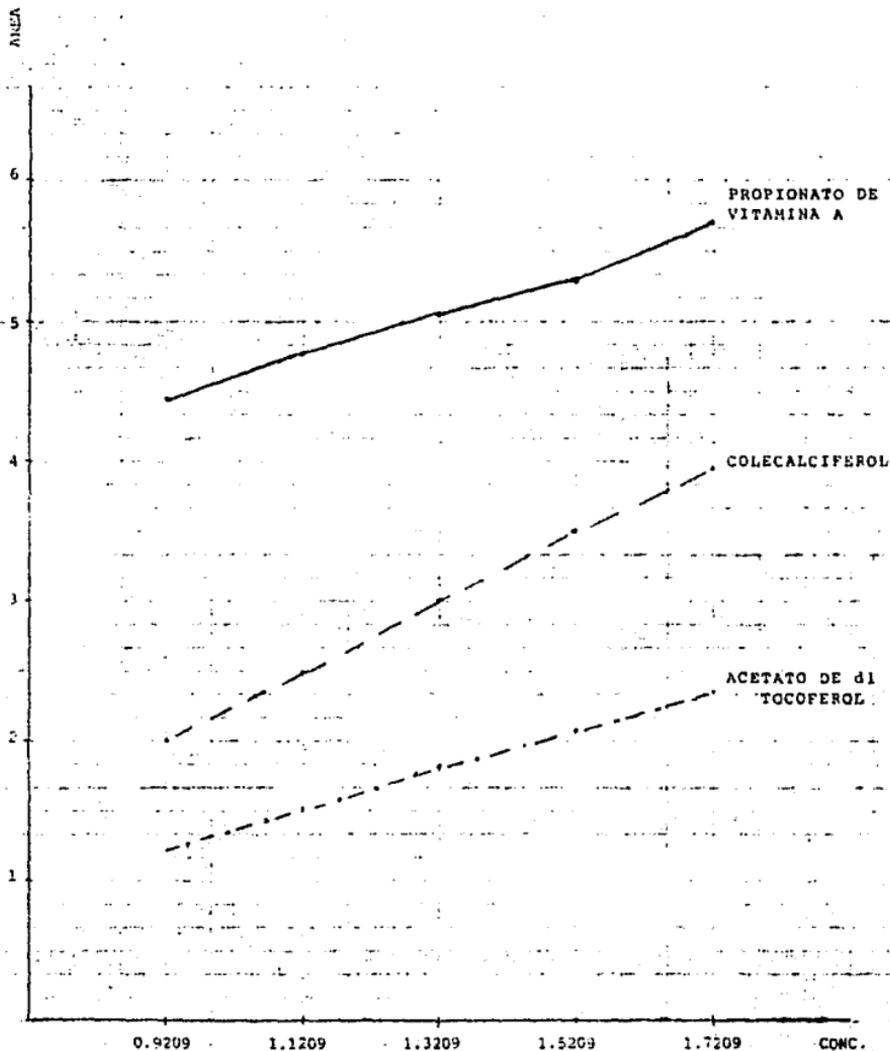


TABLA 8

EVALUACION ESTIMATIVA DEL TIEMPO DE ANALISIS DEL
 METODO ESTUDIADO POR HPLC Y EL METODO TRADICIONAL

VITAMINA	TIEMPO DE ANALISIS	METODO
A	4.0 hrs.	Tradicional
D	12.0 hrs.	Tradicional
E	8.0 hrs.	Tradicional
A, D y E	3.0 hrs.	HPLC

TABLA 9

EVALUACION ESTIMATIVA DEL COSTO DEL ANALISIS DEL
 METODO ESTUDIADO POR HPLC Y DEL METODO TRADICIONAL

HPLC

Instrumental y material de laboratorio (inversión inicial)	\$12,227,500
Reactivos/muestra	\$ 2,224
Tiempo/muestra 3 x 725 (salario por hora \$725)	\$ 2,175
Gasto del análisis por muestra	\$ 4,399.00

METODO TRADICIONAL

Instrumental y material de laboratorio (inversión inicial)	\$2,323,127
Reactivos/muestra	\$ 19,362
Tiempo/muestra 24 x 725 (salario por hora \$725)	\$ 17,400
Gasto del análisis por muestra	\$ 36,762.00

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Encontramos que el método por HPLC, es mejor que los métodos tradicionales para la cuantificación de las vitaminas A, D y E en términos de costo, velocidad y simplicidad. (Tablas 8 y 9)

La técnica presentada es fácil y requiere un mínimo de operaciones, lo cual permite que se obtengan resultados reproducibles en un tiempo razonable de análisis.

El costo del análisis de un lote del producto por HPLC, es de aproximadamente un 88% menor al costo del análisis por medio de las técnicas tradicionales.

La técnica es sumamente sencilla debido a que se han eliminado pasos como la saponificación, purificación por columna, evaporación, etc. (25), en donde es posible obtener pérdidas de muestra, por lo tanto ésta técnica proporciona mayor seguridad y reproducibilidad ya que se pueden conservar las mismas condiciones de trabajo entre las determinaciones (26, 27, 28).

En base a los datos de linealidad, se encontró que pueden determinarse satisfactoriamente las vitaminas en una concentración que va desde 2 u/ml. que es la mínima que corresponde a la vitamina E, hasta 35,000 u/ml. que es la máxima que corresponde a la vitamina A.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Internacional Encyclopedia of Food and Nutrition.
Vol. 17, Part 2, Pag. 1137
Pergamon Press (1969)
- 2.- Hoffman - La Roche. Compendio de Vitaminas (1972)
- 3.- Internacional Encyclopedia of Food ant Nutrition.
Vol.17, Part 1, Pag. 415
Pergamon Press (1970)
- 4.- Modell, W. and Schild, H. Applied Pharmacology.
Pags. 110 - 119 W.B. Saunders. Co. (1976)
- 5.- Roman, Kutsy. Handbook of Vitamins and Hormones.
Pags. 7 - 31 Van Nostrand Reinhold Co. (1973)
- 6.- Dyke, S.F. The Chemistry of Vitamins.
Vol. VI Pag. 208
Intercience Publishers. (1965)
- 7.- Moore, T. Vitamin A,
Pag. 295 Elsevier Publishing Co. (1957)
- 8.- Nadai, J. and Brubacher, G. International Encyclopedia
of Food and Nutrition.
Vol. 9 Pag. 475
Pergamon Press (1970)
- 9.- Bougherty, H. and Pollar, P. Medicinal Chemistry
Vol. 1 Part. 2 Pag. 810
Wiley Intercience (1970)

- 10.- Horvarth, C. High Performance Liquid Chromatography
Vol. 2
Academic Press (1980)
- 11.- Uonach, B. and Schomburg, G.J. Chromatog.
Pags. 149, 417 (1978)
- 12.- Snyder, L.R. and Kirkland, J.J. Introduction to Modern
Liquid Chromatography, second Ed.
Willey Intercience (1979)
- 13.- Kirkland, J.J. Modern Practice of Liquid Chromatography
Willey Intercience (1977)
- 14.- Barnett, S.P. and Leroy. Simultaneous Edlis Determination
of Vitamin A Acetato, Vitamin D₂ and Vitamin E, Acetate in
Multivitamin Tablets By High performance Liquid Chromatography
in Coupled Columns.
Anal. Chem. 51, 6 (1979) 641
- 15.- De Vries, E.J. and Zeeman, J. Analisis of Fat-Soluble
Vitamins XXIII J. Assoc. of Anal. Chem. 60, 6 (1979) 1285
- 16.- Williams, R.C. and Shmidt, J.A. Quantitative Analisis of the
Fat Soluble Vitamins by High-Speed Liquid Chromatography
J. Chromatogr. Sci. 10, (1972) 974.
- 17.- Strong, J.W. Combined Assays for Vitamins A, D₂ and E,
Multivitamin Preparations with Separation by Reversed -
Phase Partition Chromatography J. Pharma. Sci. 65, 7,
(1976) 968

- 18.- Elton Bott, R.R. High Performance Liquid Chromatography
Separation of the Fat Soluble Vitamins in Cod Liver Oil
and Feeds. Anal. Chimica Acta 127 (1981) 213
- 19.- Vanhaelen-Pastre, R. High Performance Liquid Chromatography
Determination of the three hidroxy vitamins D₃ in pharmaceu-
tical formulations. J. Chromatogr. 79 (1979) 143 - 149.
- 20.- Erikson, T. and Sorensen, B. High Performance Liquid Chroma-
tography of Vitamin E. Acta Pharm. Sue. 14, (1977) 475.
- 21.- Vecchy, M. and Vesely, J. Aplications of High Pressure
Liquid Chromatography to Problems in Vitamin A Analysis.
J. Chromatogr. 83 (1973) 447-453
- 22.- Landen, W. O. Resolution of Fat soluble Vitamins in High
Performance Liquid Chromatography with Metanol Containig
Mobile Phase. J. Chromatogr. 221, 1 (1981) 155-159
- 23.- Burns, D.T. and Mackay, C. Comparision of Reversed Phase
and Adsertion Modes of High Performance Liquid Chromatography
for the Assay of the Fat-Soluble Vitamins in Multivitamin
Tablets. J. Chromatogr. 200 (1978) 300 - 304
- 24.- Harold, M. Cromatografía Líquida de alta Presión. Programa
regional de desarrollo científico. Secretaría General de
la Organización de los Estados Americanos. Washington D.C.
1973.
- 25.- U.S.P. XX

- 26.- Wilkie, J.W. Determination of Vitamin D by a Chemical Method Involving Chromatography and Color Inhibition. J. Am. Pharm. Assoc. 47 (1958) 385 - 393
- 27.- Bollinger, H.R. The Assay Methods of Vitamin A in Dry Form and in Water-Dispersible Form. Pharm. Acta Helv. 54 (1979) 7 - 13.
- 28.- Crawford, D.C. Assay of Vitamin E in Multivitamin Products Using Thin-Layer Chromatography. J. Pharm. Sci. 57 (1968) 1716 - 1720