

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS
DE ALTA PRESION PARA EL ANALISIS DE ALGU-
NAS VITAMINAS DEL COMPLEJO B.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A

BERNARDO GRANADOS VEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

TESIS

NO. 1976

PROG. M-1

217



UNIVERSITY OF THE PHILIPPINES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TITULO DEL TEMA

" METODOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION PARA EL
ANALISIS DE ALGUNAS VITAMINAS DEL COMPLEJO B ".

214

NOMBRE DEL SUSTENTANTE

BERNARDO GRANADOS VEGA

CARRERA

Q U I M I C O

A Ñ O

1976

Jurado asignado originalmente
según el tema.

PRESIDENTE, Prof. GUILLEMO HERNANDEZ ANGELES
VOCAL " GUADALUPE VELEZ PRATT
SECRETARIO " FRANCISCO FERNANDEZ MORIEGA
1er.SUPLENTE " ALBERTO SOLANO
2do.SUPLENTE " ARTURO PEREZ ALONSO

Sitio donde se desarrolló el tema: SYNTEX, S.A. División Farmaceutica.

Nombre completo y firma del sustentante: BERNARDO GRANADOS VEGA

B. Granados

Nombre completo y firma del asesor del tema: Prof. GUILLERMO HERNANDEZ ANGELES

Guillermo Hernández Angeles
Guillermo Hernández Angeles

A MIS PADRES

Con todo cariño y gratitud
por su gran esfuerzo para mi
formación como profesionista.

A MIS HERMANOS

A MIS MAESTROS

A MIS MEJORES AMIGOS

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO :

A los Laboratorios Syntex, S.A. División Farmacéutica.

UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL:

A las siguientes personas por su valiosa cooperación
para la realización de este trabajo.

Dr. Jorge Medina C.

Ing. Ramón Valle O.

Q.F.B. Roberto Ramirez S.

Sr. Rubén Altamirano G.

CONTENIDO

I.- INTRODUCCION

II.- MATERIAL Y REACTIVOS

III.- PARTE EXPERIMENTAL

Métodos y resultados.

IV.- DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

V.- BIBLIOGRAFIA

I.- INTRODUCCION

INTRODUCCION..

Los métodos que tradicionalmente se usan para el análisis de las vitaminas hidrosolubles son: Métodos químicos, fisicoquímicos, microbiológicos y ensayos con animales.

Los métodos microbiológicos y ensayos con animales se usan con mucha frecuencia por ser muy sensibles para detectar cantidades muy pequeñas de vitaminas en alimentos y productos naturales. Un inconveniente de estos métodos es la duración en tiempo de análisis pues requieren cerca de 20 horas de análisis o más, lo cual es una desventaja cuando los resultados son urgentes. Sin embargo los métodos microbiológicos y ensayos con animales se usan por ser fáciles y económicos.

Los métodos químicos y fisicoquímicos están expuestos al problema de interferencias de impurezas que pueden afectar la exactitud de los resultados.

En los últimos años la cromatografía en placa fina se ha empleado para el análisis de algunas vitaminas, obteniéndose resultados satisfactorios. La cromatografía en placa fina se usa con mucha frecuencia para analizar vitaminas porque elimina en gran parte algunos problemas que se tienen con los métodos mencionados anteriormente.

El objetivo de este trabajo es desarrollar nuevos métodos para el análisis de vitaminas hidrosolubles mediante una nueva técnica que es la cromatografía de líquidos a alta presión.

Entre una de las ventajas de la cromatografía a alta presión de líquidos con los métodos químicos fisicoquímicos es que solo es necesario una muestra muy pequeña para hacer un análisis.

Cromatografía.

La cromatografía ha sido definido como la técnica que hace posible la separación de una mezcla de solutos, esta separación esta basada en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso (fase estacionaria), arrastrada por un disolvente en movimiento (fase móvil).

En el año de 1906 el biologo TSWETT fue probablemente la primera persona que advirtió la posibilidad de esta técnica. TSWETT utilizó una columna larga de vidrio, rellena de sulfato cálcico finamente dividido, provista de una llave en el extremo inferior.

Este investigador indico que cuando una mezcla de pigmentos verdes de planta se pone en lo alto de la columna y a continuación se agrega éter de petróleo, aparece una serie de bandas horizontales de diferentes colores, que corresponden a cada uno de los pigmentos de la mezcla que nos indican que ha habido una separación a lo largo de la columna. Para describir este fenómeno se introdujó el término cromatografía que literalmente quiere decir " escribir en color " - esta separación no tiene que ver nada con el color de los componentes, sino con la diferente afinidad de adsorción de los pigmentos hacia el yeso así, los que adsorben más débilmente avanzan con más rapidez a lo largo de la columna que los que lo hacen con mayor fuerza.

Este experimento fue, sin duda, la primera aplicación de una columna de adsorción cromatográfica. Aunque TSWETT investigó este fenómeno, posteriormente quedó relegado a una mera curiosidad de laboratorio hasta que MARTIN y SYNGE introducen la cromatografía de partición.

Los medios usados en estas columnas contienen una cierta cantidad de agua y las separaciones que en ellas se llevan a cabo dependen de la distribución continua, o coeficiente de reparto, de los componentes de la mezcla a separar entre el agua de la columna y el disolvente que fluye continuamente hacia la parte inferior. Las separaciones por cromatografía de partición son particularmente interesantes para los compuestos solubles en agua.

Posteriormente en 1944 CONSDEN, GORDON y MARTIN describieron la cromatografía en papel, en la que las separaciones se llevan a cabo (principalmente por partición) sobre tiras en un sistema de columna abierta. El concepto de columna abierta se ha extendido por la introducción de la cromatografía en capa fina, en la que las separaciones se realizan en un material soportado sobre una placa de vidrio. En el año de 1958 STAHL generalizó el procedimiento e indicó sus aplicaciones.

La cromatografía de gases y la Cromatografía de líquidos a alta presión están teniendo un desarrollo considerable en estos últimos años. En síntesis es el desarrollo de la cromatografía en columna.

Los diversos sistemas empleados en cromatografía (por ejemplo: una tira de papel de filtro, una placa de vidrio cubierta con una capa fina de polvo, como alúmina y gel de sílice o una columna de vidrio preparada para la cromatografía en columna). Con cada uno de estos-

métodos es posible conseguir separaciones casi imposibles de obtener de otra manera. En cada caso la separación está basada en un proceso de reparto múltiple o uno continuo de adsorción-desorción.

Se compara la cromatografía con la destilación fraccionada y se aplica el concepto de plato teórico es una unidad de la columna de destilación en la que hay un equilibrio entre el vapor ascendente y el líquido que cae. Análogamente podemos considerar que un sistema cromatográfico está formado por una serie de dichos platos teóricos, siendo cada uno de ellos una unidad dentro del sistema en el que hay un equilibrio entre el disolvente y el material empleado.

Cromatografía de Partición.

La cromatografía de partición, como su nombre indica, está basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante, la partición existente entre la fase móvil (disolvente) y la fase estacionaria. El disolvente puede ser un líquido (cromatografía líquido-líquido) o un gas (cromatografía gas líquido).

Cromatografía de Adsorción.

Las diferencias de comportamiento en la adsorción-desorción de sustancias contenidas en un disolvente móvil (un líquido o un gas), sobre un sólido estacionario se utilizan para conseguir la separación de los componentes de una mezcla. La adsorción es un fenómeno de superficie que se manifiesta por un aumento de concentración en la interfase que rodea al medio estacionario. Las separaciones que se llevan a cabo en un disolvente líquido se denominan cromatografía

grafía Líquido/Sólido, y si el disolvente es un gas se llama cromatografía Gas/Sólido.

La cromatografía Líquido/Sólido, se aplica en la separación de sustancias de media o baja polaridad.

En cualquier fenómeno de adsorción influyen tres variables independientes. Estas son el adsorbente, el disolvente y las sustancias a cromatografiar. Las separaciones sobre adsorbentes dependen del equilibrio entre las moléculas adsorvidas en la fase estacionaria y las que están libres en el disolvente, moviéndose las moléculas individualmente entre las dos fases.

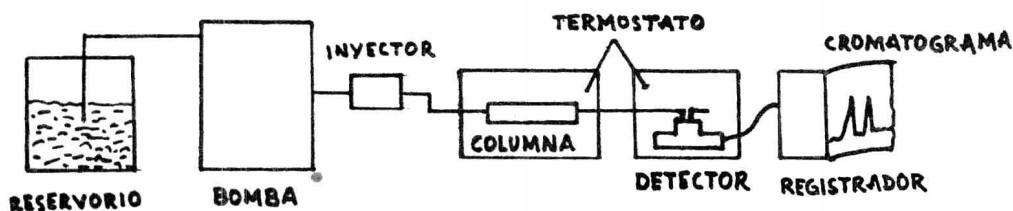
Cromatografía de intercambio iónico.

Las separaciones de intercambio iónico se llevan a cabo con materiales especiales de estructura porosa e insolubles. Estos contienen grupos reactivos que están asociados a iones capaces de intercambiarlos con los del medio que les rodea. Este es el único fenómeno que ocurre en el material durante todo el proceso, que invariablemente tiene lugar en el medio líquido. (generalmente acuoso).

Como su nombre indica la cromatografía de intercambio iónico se emplea en la separación de sustancias iónicas de polielectrólitos tanto orgánicas como inorgánicas tales como proteínas, hormonas, virus, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicamente importantes. Los tres tipos de materiales que generalmente se usan son: resinas, geles y celulosas de intercambio iónico. La diferencia entre ellos se debe a la naturaleza de los grupos cambiadores incorporados a cada uno y principalmente a la microestructura.

El interés inicial por el fenómeno de intercambio iónico se centró principalmente en el ablandamiento de aguas. Se encontró que ciertos minerales, silicatos notablemente complicados, conocidos como zeolitas, tenían la propiedad de eliminar los iones calcio y magnesio de las aguas duras, desplazándolos por iones sodio. De esta forma actúan las zeolitas como intercambiadores iónicos.

Sin embargo su empleo es muy limitado ya que son relativamente inestables con los cambios de pH , siendo posible muy raramente la recuperación del producto absorbido.



Esquema de un cromatografo de líquidos.

Funcionamiento del aparato.- Una pequeña muestra del material a separar (1 a 10 microlitros), se inyecta por medio de una jeringa de 10 microlitros de capacidad al aparato en la corriente de una fase móvil que esta fluyendo a presiones muy elevadas; que corre hasta una columna usada en el análisis que contiene un medio apropiado que es capaz de ir retardando el paso de cada componente que está pasando a través de la columna. Los componentes separados sa -

len a intervalos diferentes característicos de cada componente en las condiciones del ensayo y pasan a través de un detector de luz U.V. (Fotómetro). La señal es aumentada por un amplificador y es captada por un registrador que consta de una tira de papel (para todo tipo de cromatografía), que corre a una velocidad determinada, - una pluma que va dibujando una serie de picos. Cada pico corresponde a un componente, a esta serie de picos se le llama cromatograma. Las sustancias se identifican por el tiempo que tardan en salir de la columna.

La cuantificación de las sustancias se determina por relación del área de los picos de las sustancias problema y tipo.

El método habitual para determinar el área de los picos es la integración por triangulación.

En la actualidad se dispone de aparatos electrónicos conocidos como integradores, que hacen esta función automáticamente durante la separación.

Un cromatógrafo de líquidos está constituido por las siguientes partes:

- a) Reservorio para el líquido móvil.
- b) Bomba.
- c) Entrada de muestra.
- d) Columna.
- e) Detector.
- f) Registrador.
- g) Termostato para columna y detector.

Ventajas y limitaciones de la cromatografía de líquidos a alta presión. La cromatografía de líquidos a alta presión ofrece varias ventajas:

- a) Rápidez.
- b) Resolución.
- c) Sensibilidad.
- d) Columnas reusables.

Rápidez.- Los tiempos de análisis involucran en común varios minutos. La operación es continua requiere menor tiempo.

Resolución.- Por uso de columnas selectivas y líquidos móviles la cromatografía de líquidos a alta presión puede suministrar resolución de muchos compuestos no volátiles que no responden a las técnicas de cromatografía de gases.

Sensibilidad.- La alta sensibilidad de los detectores (Fotómetros ultravioleta), permiten la medida de cantidades de material de nona gramos (10^{-9} g.).

Otra ventaja de la alta sensibilidad es que las muestras que se requieren son pequeñas, unos pocos microgramos de la muestra son suficientes para un análisis completo.

Las cantidades tan pequeñas de la muestra que usan en cromatografía de líquidos a alta presión puede ser una desventaja.

Si las fracciones son colectadas las cantidades de cada componente-

útil es muy pequeña.

Columnas .-Se atribuido en cromatografía de líquidos a alta -
presión que las columnas son reusables.

Las fases móviles que se escogen.no alteran las características de-
la columna.

Vitaminas.

El hecho de que no puede mantenerse la nutrición normal en animales alimentados todos con dieta que consiste sólo en proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales purificados se apreció que por lo menos 30 años antes de demostrar que existían las sustancias hoy conocidas como vitaminas.

En 1912 Funk comprobó que había nitrógeno básico en una sustancia extraída de la cascarilla del arroz y la levadura, y que curaba el beriberi de la paloma. La denominó "vitamina", esto es amina indispensable para la vida. Desde entonces y a pesar de que se ha conservado la terminación "a" que parece denotar que se trata de aminas, se ha dado este nombre a los "factores alimenticios accesorios" que poseen papel importantísimo en la nutrición y en algunos fenómenos metabólicos fundamentales.

Las vitaminas se han definido como compuestos orgánicos que se presentan en alimentos naturales, en forma de vitamina o de sus precursores, y se necesitan en cantidades muy pequeñas para el crecimiento, mantenimiento y la reproducción normales, esto es, para mantener la nutrición y la salud. Difieren de otros alimentos orgánicos por cuanto no participan en la formación de la estructura tisular ni experimentan degradación para liberar energía.

En un principio se clasificaron según la solubilidad en agua o grasas alfabéticamente; por ejemplo: liposolubles A y D, hidrosolubles B y C.

Vitamina B (complejo vitamínico B).

En los principios de la investigación acerca de las vitaminas, se -

denominó vitamina B hidrosoluble a un factor que se presentaba en la cascarrilla del arroz, los extractos de frijol, la levadura y el hígado, cuya deficiencia en la dieta originaba beriberi. Por aquellos entonces, en 1920 se había identificado dos vitaminas más "liposolubles A" e "hidrosolubles C"; poco después se apreció que difería de la vitamina A, otra, la "liposoluble D".

Pronto se hizo patente el carácter múltiple de la vitamina B, y se designaron numericamente, B₁, B₂ y así sucesivamente los diversos componentes del complejo vitamínico B. Al conocer su carácter o su estructura química, se les dieron nombres más descriptivos.

Al copiarse los datos a cerca de la distribución y las funciones de estas sustancias, se advirtió que a diferencia de otras vitaminas conocidas, son factores nutritivos esenciales para todas las formas de vida, desde las levaduras, mohos y bacterias más inferiores hasta el hombre. Está comprobado que varias sustancias de este grupo son componentes esenciales (coenzimas) de sistemas enzimáticos intracelulares de importancia fundamental.

Williams ha destacado esta noción, las considera partes esenciales de la maquinaria metabólica de todas las células. Y opina que su función nutritiva estricta es de importancia secundaria. Entre las vitaminas B incluye a las sustancias orgánicas que se presentan en todas las células vivientes, que actúan como catalizadores y que tienen función nutritiva para algunos animales superiores, por lo menos. Por lo menos algunos de estos factores indispensables pueden ser sintetizados por el hombre y en consecuencia no son elementos nutritivos esenciales.

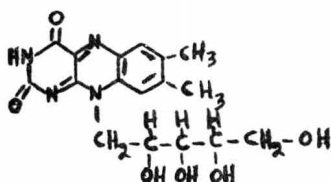
Aunque tenga poca importancia que un compuesto se considere o no

como vitamina B, conviene mantener en este sentido cierta uniformidad, aunque sea solo con propósitos académicos.

Se acepta en general que pertenecen al grupo vitamínico B las siguientes sustancias: 1) tiamina; 2) riboflavina; 3) niacina y niacinamida; 4) ácido pantotémico, 5) piridoxina, piridoxal, piridoxamina; - 6) biotina; 7) grupo del ácido fólico; 8) vitamina B₁₂ (cobalamina; cobamida; factor extrínseco antianemia perniciosa), 9) ácido lipoi-co.

Riboflavina (vitamina B₂).

Fórmula:



P.M. 376.37

En 1931 se apreció que había unas sustancias que presentaban intensa fluorescencia verde amarillenta y se obtenían de la clara de huevo, la leche, el hígado, los vegetales y otras fuentes que estimulan el crecimiento de las ratas.

Se llamaron "ovoflavinas", "lactoflavinas", "hepatoflavinas" y "verdoflavina" respectivamente, hasta descubrirse que fuesen la misma sustancia. Poco después se apreció que este pigmento se encontraba en el pigmento amarillo descubierto en 1932 por Warburg y Christian en la levadura.

Carácteres químicos.

La riboflavina es un pigmento amarillo naranja que posee D-ribitol y una sustancia heterocíclica, isoalaxacina (flavina).

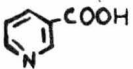
La riboflavina es bastante estable para el calor de las soluciones ácidas y neutras y no en alcalinas. Las soluciones acuosas son descompuestas por la luz visible y u travioleta y la labilidad aumenta por el calor y la alcalinidad.

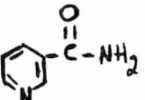
Al exponerse a la luz, se separa el residuo robítílico y se forma en sol ción alcalina, un pigmento amarillo soluble en cloroformo - la lumiflavina; en solución ácida o neutra un, compuesto semejante-llamado "lumicro".

Ensayo y valoración.

La riboflavina puede estimarse cuantitativamente por los siguientes procedimientos: 1) biológicos (efecto curativo en animales), 2) microbiológicos (los más sensibles) y 3) cromatográficos, fluorométricos y colorimétricos.

Niacina (ácido nicotínico) y Nicotinamida (niacinamida).

Acido nicotínico. Fórmula:  P.M. 123.II

Nicotinamida. Fórmula:  P.M. 122.II

La pelagra es una enfermedad grave que ocurrió en forma endémica - y epidémica en diversas regiones, y era muy frecuente en el sur de los Estados Unidos. En 1912 Golberg comprobó que dependía de una insuficiencia alimentaria, cuyo caracter no dilucidó. Se advirtió en 1917 que una enfermedad de los perros tenía mucho en común con la pelagra humana.

El ácido nicotínico se obtuvo de la nicotina en 1867 y ya en 1912 se había aislado de la levadura y el salvado de arroz, sin que se advirtiera la importancia para la nutrición.

Sin embargo en 1935 Warburg y Christian comprobaron que la nicotinamida participaba en sistemas de oxidación celular como agente que transporta hidrógeno.

Caracteres químicos.

El ácido nicotínico (niacina) es el ácido piridin-3-carboxílico su nombre proviene de que puede prepararse por la oxidación de la nicotina, aunque sus efectos farmacológicos difieren mucho de esta última. Se presenta en tejidos principalmente en forma de amida; y así entra en combinación fisiológica activa.

Ensayo y valoración.

El ácido nicotínico puede estimarse cuantitativamente por métodos químicos y microbiológicos.

La nicotinamida puede estimarse cuantitativamente por métodos químicos, microbiológicos y cromatográficos.

Tratamiento estadístico de datos.

Cuando se hacen repetidas mediciones, los resultados se agrupan alrededor de un valor medio, con una distribución Gaussiana, siempre que los errores sean puramente al azar y estén sujetos a las leyes de probabilidad. La desviación normal de este grupo de datos es una medida de la amplitud de estos errores y es, en cierta forma un índice del cuidado y la habilidad con que se hicieron las mediciones. Al presentar los datos de prueba se encuentra una serie de distribuciones de frecuencia que requieren demasiado espacio. Por lo que debe encontrarse un modo más conciso de presentación. Esto siempre requiere al menos dos números. Uno de estos es una medida de tendencia central y el otro es una medida de dispersión de las observaciones.

Precisión, Reproducibilidad y exactitud de los métodos.

La única forma en la cual el valor de cualquier característica de calidad puede ser determinada, es mediante cierta forma de medición. Cualquier método de medición es una característica de calidad industrial puede esperarse que tenga cierto patrón de variabilidad. Bajo condiciones favorables, este patrón podrá ser observado repitiendo varias veces una medición de una característica de calidad que permanezca invariable.

La precisión de un método de medición se refiere a su variabilidad cuando se usa para tomar mediciones repetidas, bajo condiciones cuidadosamente controladas.

Una medición numérica de precisión es la desviación normal.

La reproducibilidad de un método de medición se refiere a la consistencia de su patrón de variación.

La exactitud de un método de medición se refiere a su ausencia de error, a la conformidad de sus resultados con el valor verdadero de la característica de calidad que está siendo medida.

Un método exacto, el valor promedio obtenido, de un grupo de mediciones deberá diferir del valor verdadero en no más de lo que podría esperarse como una variación al azar.

Entre las medidas más comunes que resultan en el control de calidad estadístico esta la media aritmética y la desviación normal. La desviación normal se define como la raíz cuadrada de la media de las desviaciones de los números observados con respecto a su media aritmética elevada al cuadrado y dividida entre el número de observaciones menos uno.

Su expresión algebraica es la siguiente:

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

Donde:

n = Número de observaciones.

x = Valores medidos.

\bar{x} = Valor Promedio (media aritmética).

La media aritmética de un grupo de n número de observaciones es la suma de los números dividida por n . Se expresa en terminos algebraicos en la siguiente forma:

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_n}{n}$$

Donde :

\bar{X} Representa la media aritmética.

$X_1, X_2, X_3,$ etc. Representa los números en cuestión.

Es necesario hacer la estimación de un punto de un parámetro; con cierta información que nos indique que tan cercana puede ser la estimación del verdadero valor desconocido.

Los intervalos de confianza y los límites de confianza pueden usarse para este propósito.

Para estimar el intervalo de confianza se usa una medida de dispersión de la muestra, la desviación normal.

El intervalo de confianza se representa por la siguiente fórmula:

$$I.C. = \pm \frac{tS}{\sqrt{n}}$$

Donde:

S = Es la desviación normal.

n = Número de observaciones.

t = Valor de t para niveles de probabilidad (90%, 95%, 99%, etc.) de acuerdo a los grados de libertad que se tengan.

El número de grados de libertad es el número de elementos disponibles para la evaluación de la dispersión en un conjunto de datos.

Los límites de confianza se obtienen aplicando los intervalos de confianza calculado a la estimación del parámetro en cuestión. Entendiéndose por parámetro a la medida correspondiente de un universo.

Los límites de confianza se expresan de la siguiente manera:

$$L.C. = \bar{X} \pm I.C. \quad \left\{ \begin{array}{l} \bar{X} \pm I.C. \\ \bar{X} \pm I.C. \end{array} \right.$$

Esto nos indica que si el resultado de una determinación está dentro de los límites señalados existe un (90%, 95%, 99%, etc.) de probabilidad de que ese valor sea el verdadero.

II.- MATERIAL Y REACTIVOS

Material y reactivos.

- 1.- Cromatógrafo de líquidos modelo 830 marca Dupont con detector de luz U.V. a 254 nm. equipado con una columna Sorbax de 25 cm. de largo 2.1 mm de diámetro.
- 2.- Jeringa hamilton de 10 microlitros de capacidad.
- 3.- Matraces aforados de 10 mililitros.
- 4.- Matraces erlenmeyer con tapón esmerilado de 125 mililitros.
- 5.- Pipetas volumétricas de 10 y 50 mililitros.
- 6.- Embudos de separación de 125 ml.
- 7.- Tubos de ensayo.
- 8.- Embudos de filtración rápida.
- 9.- Balanza analítica.
- 10.- Papel Whatman No. 43.

Reactivos.

- a) Acido clorhídrico N.
- b) Hidróxido de sodio 0.1 N.
- c) Fosfato de sodio monobásico ($\text{Na H}_2\text{PO}_4$) 0.05 M.
- d) Fosfato de potasio monobásico ($\text{K H}_2\text{PO}_4$) 0.05 M.

Disolventes.

Cloroformo.

Solución fase móvil.- Fosfato de sodio monobásico 0.05 M y fosfato de potasio monobásico 0.05 M en proporción de 75:25 respectivamente acidificada con HCl N hasta un pH de 3.24 ± 2

Medir exactamente 750 ml de fosfato de sodio monobásico 0.05 M y - agregar 250 ml de fosfato de potasio monobásico 0.05 M. Medir el pH

de esta solución, agitar magnéticamente al tiempo se estar agregando el ácido clorhídrico N gota a gota hasta que la solución alcance un pH de 3.24 ± 2

III.- PARTE EXPERIMENTAL

Métodos y resultados.

Determinación cuantitativa de ácido nicotínico por cromatografía -
a alta presión de líquidos.

1.- Fundamento.

Disolución del ácido nicotínico con agua destilada. Estimación -
cuantitativa por relación de la altura o el área de los picos -
del problema y de una muestra tipo de concentración conocida.

2.- Aparatos.

Cromatógrafo de líquidos de alta presión marca Dupont modelo -
830 con detector de luz U.V. a 254 nm. Equipado con una columna
Sorbax SIL de 25 cm de largo \times 2.1 mm de diámetro.

3.- Reactivos.

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 0.05 M.

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.05 M.

Acido clorhídrico N.

4.- Solución tipo de ácido nicotínico.

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de ácido nicotínico tipo -
en un matraz aforado de 10 ml, disolver con agua destilada -
y aforar.

5.- Solución problema.

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de la muestra en un matraz
aforado de 10 ml, disolver con agua destilada y aforar.

6.- Determinación cromatográfica a alta presión de líquidos.

Procedimiento.- Con una jeringa Hamilton de 10 microlitros de capacidad tomar del matraz 5 microlitros de la solución tipo, inyectarlos al cromatógrafo de líquidos de alta presión que deberá estar - bajo las siguientes condiciones:

Temperatura ambiente.

Atenuación del aparato 128×10^2 de absorbancia.

Velocidad de la carta 0.2 pulg/min.

Presión de la columna 1500 PSI.

Fase móvil.- NaH_2PO_4 0.05 M y KH_2PO_4 0.05 M en proporción de - 75:25 respectivamente a un pH de 3.24 ± 2 .

La solución problema también deberá inyectarse al cromatógrafo de - líquidos en estas mismas condiciones.

7.- Cálculos y resultados.

Cálcular la cantidad de ácido nicotínico empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Area P.}}{\text{Area Std.}} \times 100 = \% \text{ de Acido nicotínico.}$$

Conc. P

Conc. Std

$$\frac{\text{Area P}}{\text{Area Std}} \times \frac{\text{Conc. Std.}}{\text{Conc. P}} \times 100 = \% \text{ de Acido nicotínico.}$$

Donde:

Area P = Area del pico de la solución problema.

Area Std. = Area del pico de la solución tipo.

Conc. P = Concentración de la solución problema.

Conc. Std. = Concentración de la solución tipo.

TABLA No. I

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE ACIDO NICOTINICO EN MATERIA PRIMA.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(X- \bar{X})	(X- \bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
I	5.00	5.00	100.00	0.50	0.25
2	"	5.05	101.00	0.50	0.25
3	"	4.95	99.00	1.50	2.25
4	"	5.05	101.00	0.50	0.25
5	"	5.00	100.00	0.50	0.25
6	"	5.05	101.00	0.50	0.25
7	"	5.10	102.00	1.50	2.25
8	"	5.05	101.00	0.50	0.25
9	"	5.05	101.00	0.50	0.25
10	"	4.95	99.00	1.50	2.25

$$\bar{X} = 100.50$$

$$s = 0.97$$

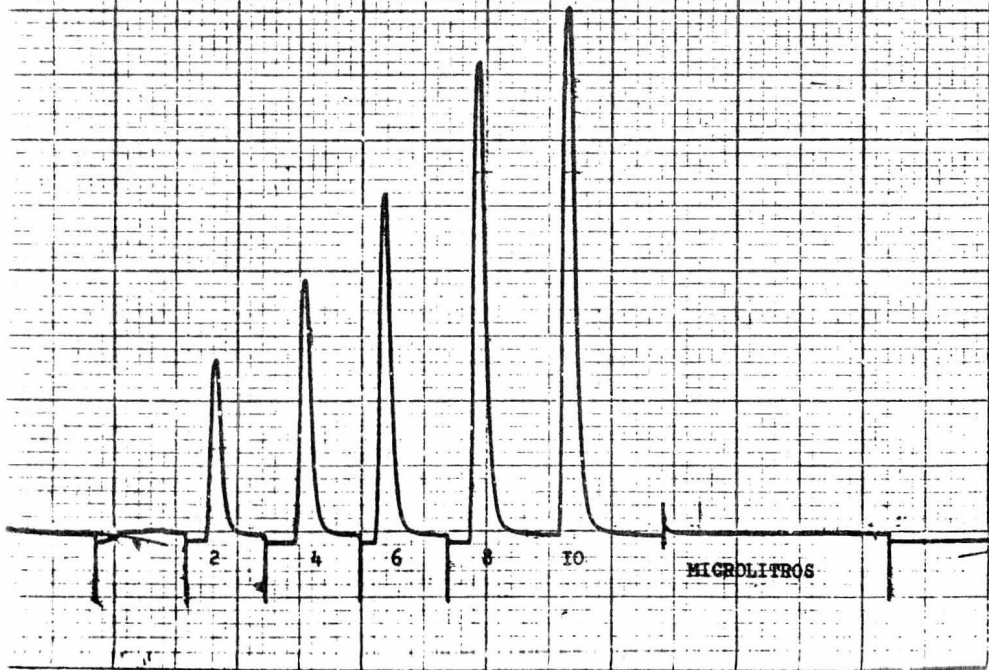
$$t = 2.81$$

$$IC_{95\%} = 0.86$$

$$L.C. = 100.50 \pm 0.86 \quad \left\{ \begin{array}{l} 101.16 \\ 99.64 \end{array} \right.$$

Estos valores representan que si el resultado de una determinación - está dentro de estos límites existe un 95% de probabilidad de que - sea el verdadero y no se deba al azar.

CROMATOGRAMA DEL ACIDO NICOTINICO
QUE MUESTRA LA RESPUESTA DEL DETECTOR CON
DIFERENTE CANTIDAD INYECTADA



GRÁFICA No. 1
RESPUESTA DEL DISEÑO CON DIFERENTES
CANTIDADES DE ACERO REFORZADO.

AREA DE LOS

PIEDRES

mm²
320

280

240

200

160

120

80

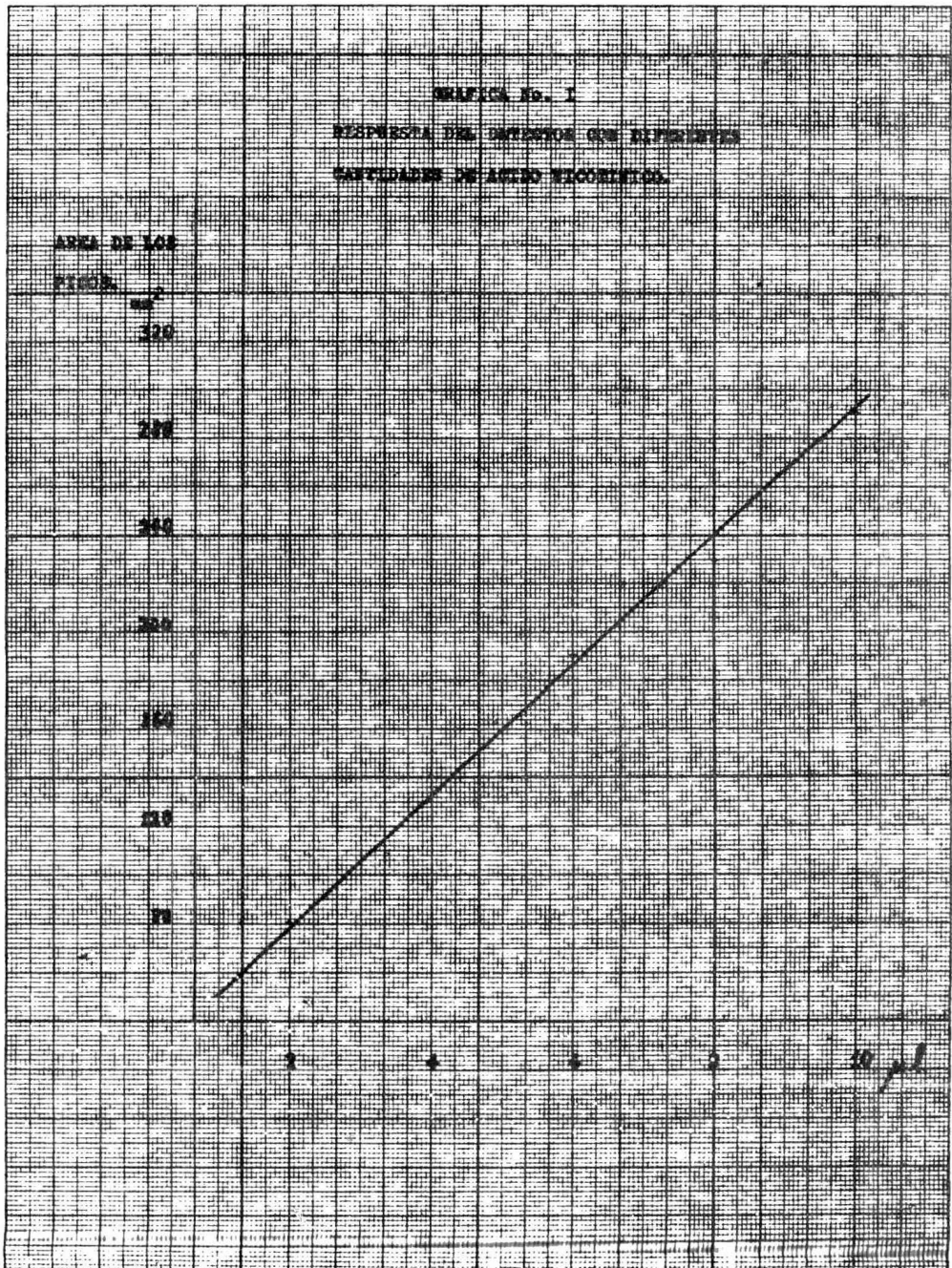
1

2

3

4

10,1



Determinación cuantitativa de nicotinamida por cromatografía a alta presión de líquidos. Para materia prima.

I.- Fundamento.

Disolución de la nicotinamida con agua destilada. Estimación -
cuantitativa por relación de la altura o el área de los picos -
del problema y de una muestra tipo de concentración conocida.

2.- Aparatos.

Cromatógrafo de líquidos de alta presión marca Dupont modelo -
830 con detector de luz U.V. a 254 nm. Equipado con una columna
Sorbax SIL de 25 cm de largo x 2.1 mm de diámetro.

3.- Reactivos.

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 0.05 M.

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.05 M.

Acido clorhídrico N.

4.- Solución tipo de nicotinamida.

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de nicotinamida tipo en -
matraz aforado de 10 ml, disolver con agua destilada y aforar.

5.- Solución problema.

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de la muestra en un matraz
aforado de 10 ml, disolver con agua destilada y aforar.

6.- Determinación cromatográfica a alta presión de líquidos.

Procedimiento.- Con una jeringa Hamilton de 10 microlitros de capacidad tomar del matraz 5 microlitros de la solución tipo e inyectar al cromatógrafo de líquidos de alta presión que deberá estar bajo - las siguientes condiciones:

Temperatura ambiente.

Atenuación del aparato 128×10^2 de absorbancia.

Velocidad de la carta 0.2 pulg/min.

Presión de la columna. 1500 PSI.

Fase móvil.- NaH_2PO_4 0.05 M y KH_2PO_4 0.05 M en proporción de - 75:25 respectivamente a un pH de 3.24 ± 2 .

La solución problema deberá inyectarse al aparato en estas mismas - condiciones.

7.- Cálculos y resultados.

Cálcular la cantidad de nicotinamida empleando la siguiente - fórmula:

$$\frac{\text{Area P.}}{\text{Area Std.}} \times 100 = \% \text{ de Nicotinamida.}$$

$$\frac{\text{Conc. P}}{\text{Conc. Std.}}$$

$$\frac{\text{Area P}}{\text{Area Std.}} \times \frac{\text{Conc. Std.}}{\text{Conc. P}} = \% \text{ de Nicotinamida.}$$

TABLA No. 2

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE NICOTINAMIDA EN MATERIA PRIMA.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
1	5.00	4.85	97.10	2.39	5.71
2	"	5.00	100.00	0.51	0.26
3	"	4.93	98.60	0.89	0.79
4	"	5.00	100.00	0.51	0.26
5	"	5.03	100.60	1.11	1.23
6	"	4.93	98.60	0.89	0.79
7	"	5.00	100.00	0.51	0.26
8	"	4.93	98.60	0.89	0.79
9	"	5.07	101.40	1.91	3.64
10	"	5.01	100.00	0.51	0.26

$$\bar{X} = 99.49$$

$$s = 1.25$$

$$t = 2.81$$

$$IC_{95\%} = 1.11$$

$$L.C. = 99.49 \pm 1.11$$

ESPECTROGRAMA DE LA SICOLOGÍA
QUE MUESTRA LA RESPUESTA DEL DEBERO CON
EXTRINSECA CASERNA UNIFORMADA

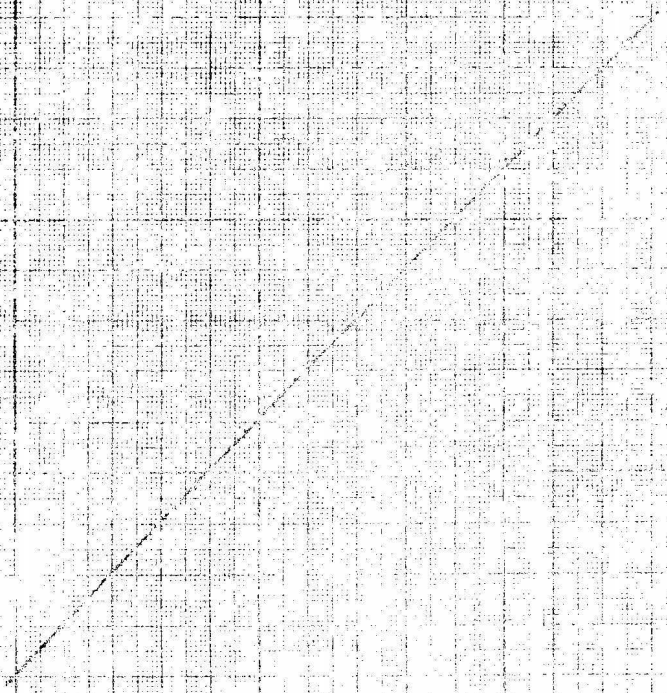


GRAPHICAL SOLUTION

RELATIONSHIP BETWEEN ...

Y AXIS
X AXIS

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0



Determinación cuantitativa de riboflavina por cromatografía a alta-
presión de líquidos. Para materia prima.

I.- Fundamento.

Disolución de la riboflavina en medio básico. Estimación cuantitativa por relación de la altura o el área de los picos del problema y de una muestra tipo de concentración conocida.

2.- Aparatos.

Cromatógrafo de líquidos de alta presión marca Dupont modelo - 830 con detector de luz U.V. a 254 nm. Equipado con una columna Sorbax SIL de 25 cm de largo x 2.1 mm de diámetro.

3.- Reactivos.

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 0.05 M.

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.05 M.

Acido clorhídrico N.

Hidróxido de sodio 0.1 N.

4.- Solución tipo de riboflavina.

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de riboflavina tipo, en un matraz aforado de 10 ml, disolver con 5 ml de NaOH 0.1 N y agregar 1 ml de ácido clorhídrico N y aforar con agua destilada.

5.- Solución problema.

Pesar exactamente alrededor de 10 mg de la muestra en un matraz aforado de 10 ml, disolver con 5 ml de NaOH 0.1 N y agregar-

1 ml de ácido clorhídrico N, y aforar con agua destilada.

Nota.

La solución tipo y la solución problema deben protegerse de la luz debido a que la riboflavina (vitamina B₂) es una sustancia fotosensible y se descompone con la luz.

6.- Determinación cromatográfica a alta presión de líquidos.

Procedimiento.- Con una jeringa Hamilton de 10 microlitros de capacidad tomar del matraz 5 ml de la solución tipo, e inyectar al cromatógrafo de líquidos de alta presión que deberá estar bajo las siguientes condiciones:

Temperatura ambiente.

Atenuación del aparato 128×10^{-2} de absorbancia.

Velocidad de la carta 0.2 pulg/min.

Presión de la columna 1500 PSI.

Fase móvil.- NaH_2PO_4 0.05 M y KH_2PO_4 0.05 M en proporción de 75:25 respectivamente a un pH de 3.24 ± 2 .

La solución problema también deberá inyectarse al aparato en estas mismas condiciones.

7.- Cálculos y resultados.

$$\frac{\text{Area P}}{\text{Area Std.}} \times 100 = \% \text{ de Riboflavina.}$$

$$\frac{\text{Conc. P}}{\text{Conc. Std.}}$$

$$\frac{\text{Area P}}{\text{Area Std.}} \times \frac{\text{Conc. Std.}}{\text{Conc. P}} \times 100 = \% \text{ de Riboflavina.}$$

TABLA No. 3

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE RIBOFLAVINA EN MATERIA PRIMA:

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
I	5.00	4.95	99.00	1.33	1.77
2	"	5.09	101.80	3.24	10.40
3	"	4.95	99.00	1.33	1.77
4	"	5.00	100.00	0.33	0.10
5	"	4.95	99.00	1.33	1.77
6	"	5.04	100.90	0.57	0.32
7	"	5.00	100.00	0.33	0.10
8	"	5.00	100.00	0.33	0.10
9	"	5.09	101.80	3.24	10.49
10	"	5.09	101.80	3.24	10.49

$$\bar{X} = 100.33$$

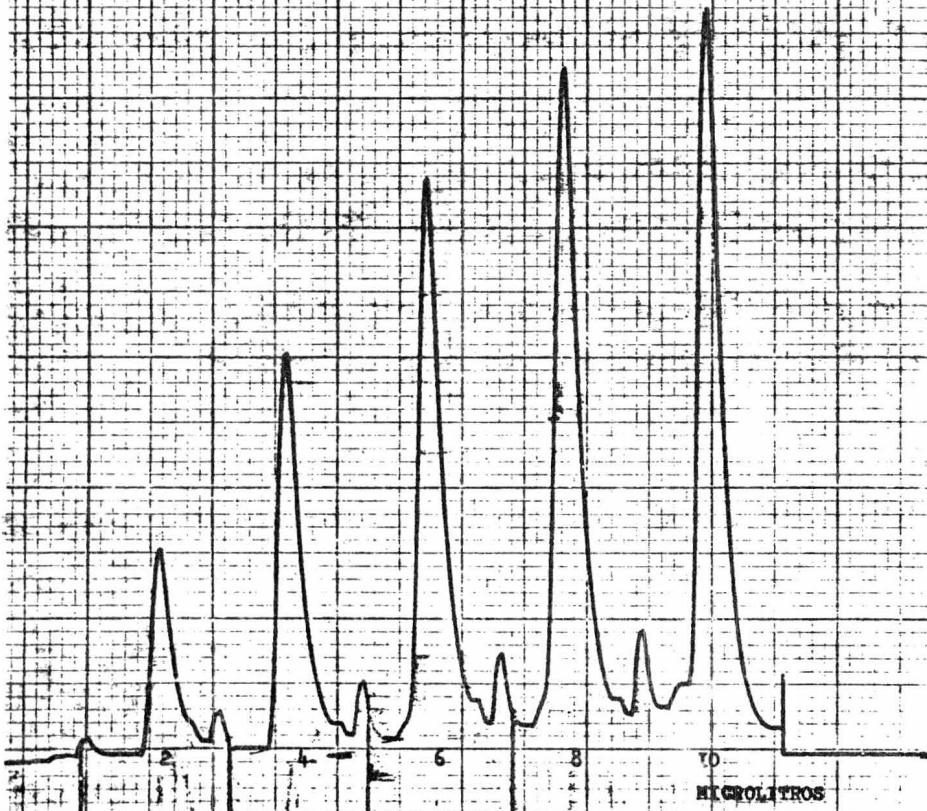
$$S = 2.03$$

$$t = 2.81$$

$$IC_{95\%} = 1.80$$

$$L.C. = 100.33 \pm 1.80$$

CRONATOGRAMA DE LA RISOFLAVINA
QUE MUESTRA LA RESPUESTA DEL DETECTOR CON
DIFERENTES CANTIDADES DETECTADA



GRAFIA No. 3
RESPUESTA DEL DETECTOR CON DIFERENTES
CANTIDADES DE RIBOFLAVINA.

AREA DE LOS

PIEDES.

720

620

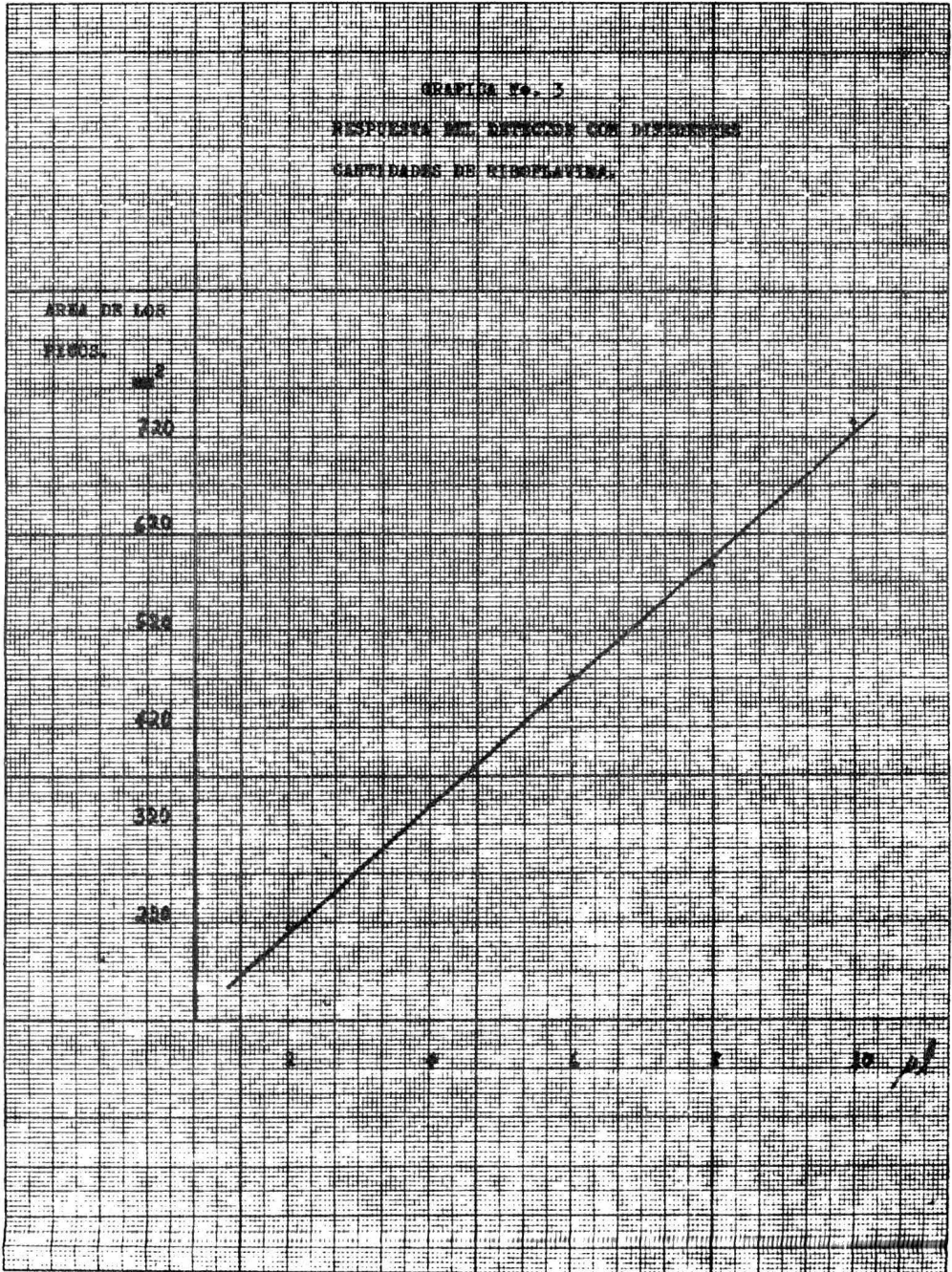
520

420

320

220

2 4 6 8 10 pl



Determinación cuantitativa de Riboflavina y Nicotinamida por cromatografía a alta presión de líquidos. Para Cápsulas.

I.- Fundamento.

Disolución de riboflavina y nicotinamida en medio básico con hidróxido de sodio 0.1 N (por ser muy soluble la riboflavina en medio básico), eliminación de sustancias solubles en cloroformo. Cuantificación por relación de la altura o el área de los picos del problema y de una muestra tipo de concentración conocida.

2.- Aparatos.

Cromatógrafo de líquidos de alta presión marca Dupont modelo 830 con detector de luz U.V. a 254 nm. Equipado con una columna Sorbax SIL de 25 cm de largo x 2.1 mm de diámetro.

3.- Reactivos.

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 0.05 M.

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.05 M.

Acido clorhídrico N.

Hidróxido de sodio 0.1 N.

4.- Solución tipo de Riboflavina y Nicotinamida.

Pesar exactamente alrededor de 60 mg de nicotinamida y 6 mg de riboflavina, transferirlos a un matraz erlenmeyer de 125 ml con tapón esmerilado. Agragar exactamente 60 ml de NaOH 0.1 N y agitar magnéticamente por 10 minutos, con una pipeta tomar 10 -

ml de esta solución y agregar 2 ml de ácido clorhídrico N.

Concentración: 1 mg/ml de Nicotinamida y 0.1 mg/ml de Riboflavina.

Nota.

Estas soluciones solución tipo y solución problema deben protegerse de la luz debido a que la riboflavina es fotosensible y se descompone con la luz.

5.- Solución problema.

Extracción de las vitaminas del granulado vitamínico.- Pesar 10 cápsulas y determinar su peso promedio, moler el granulado en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo. De este polvo pesar exactamente alrededor del peso promedio de dos cápsulas. Transferir el polvo a un matraz erlenmeyer de 125 ml con tapón esmerilado, agregar exactamente 60 ml de NaOH 0.1 N y agitar magnéticamente por 10 minutos, hasta disolución completa de la riboflavina (granulos amarillos), filtrar a través de un embudo de filtración rápida con papel Whatman No. 43 recibiendo el filtrado en un embudo de separación de 125 ml y agregar 12 ml de ácido clorhídrico N; lavar el filtrado acidificado con cuatro porciones de cloroformo de 25 ml cada una. Desechar en cada caso la capa inferior que es la de cloroformo con impurezas (esta es la solución problema).

6.- Determinación cromatográfica a alta presión de líquidos.

Procedimiento.- Con una jeringa Hamilton de 10 microlitros de capacidad inyectar al cromatógrafo de líquidos de alta presión 4 microlitros por separado de cada una de las soluciones tipo -

y problema. El cromatógrafo de líquidos de alta presión deberá estar bajo las siguientes condiciones:

Temperatura ambiente.

Presión de la columna 1500 PSI

Atenuación 32×10^{-2} de absorbancia para la Nicotinamida y una atenuación de 16×10^{-2} para la Riboflavina.

Velocidad de la carta 0.2 pulg/min.

Fase móvil.- NaH_2PO_4 0.05 M y KH_2PO_4 0.05 M en proporción de 75:25 respectivamente a un pH de 3.24 ± 2 .

7.- Cálculos y resultados.

Calcular la cantidad de Nicotinamida o Riboflavina (vitamina B_2) empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{H_{PP}}{H_{St.}} \times C \times D = \text{mg de Nicotinamida o Riboflavina/cápsula.}$$

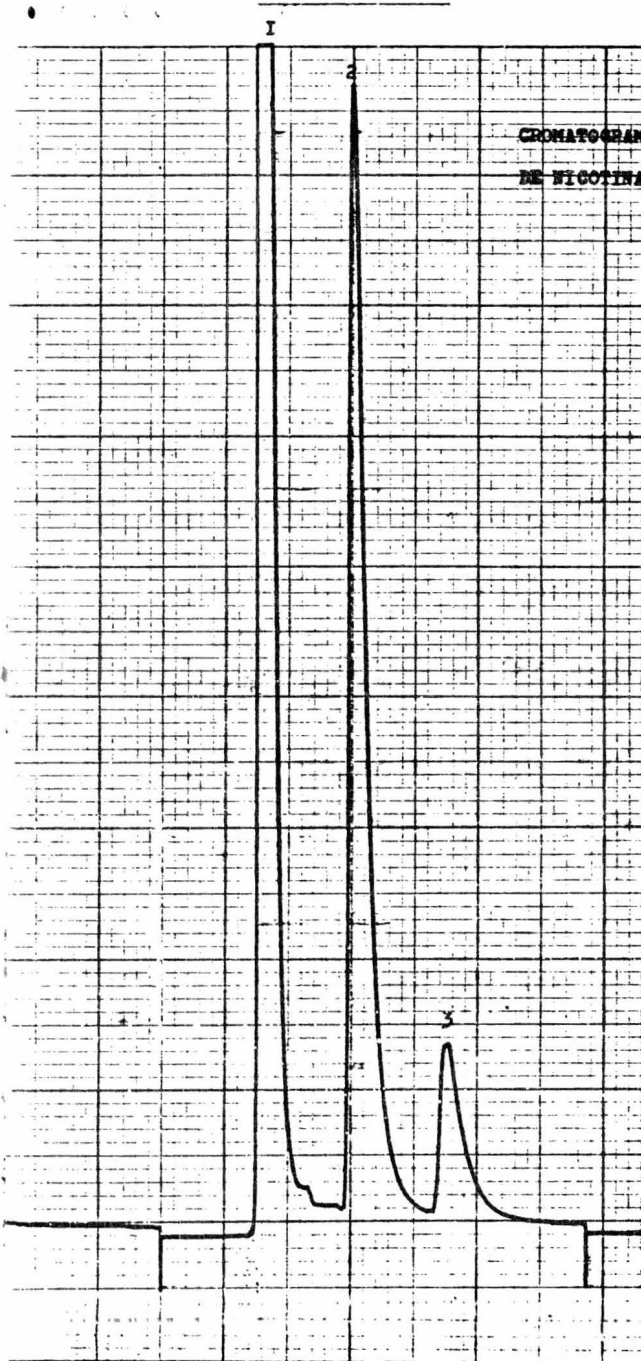
Donde:

H_{PP} = Area o altura del pico de la Nicotinamida o Riboflavina (solución problema).

$H_{St.}$ = Area o altura del pico de la Nicotinamida o Riboflavina (solución tipo).

C = Concentración de la solución tipo.

D = Dilución.



**CRONATOGRAMA TIPOICO DE LA SEPARACION
DE NICOTINAMIDA Y RIBOFLAVINA EN CAPSULAS**

PICO.

- 1.- IMPUREZAS**
- 2.- NICOTINAMIDA**
- 3.- RIBOFLAVINA**

TABLA No. 4

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE NICOTINAMIDA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(X- \bar{X})	(X- \bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
I	3.58	3.54	98.90	2.90	8.41
2	"	3.70	103.40	1.60	2.56
3	"	3.58	100.00	1.80	2.24
4	"	3.70	103.40	1.60	2.56
5	"	3.70	103.40	1.60	2.56

$$\bar{X} = 101.80$$

$$S = 2.19$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 3.11$$

$$L.C. = 101.80 \pm 3.11$$

TABLA No. 5

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE NICOTINAMIDA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(X- \bar{X})	(X- \bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
I	4.20	4.27	101.80	1.80	3.24
2	"	4.27	101.80	1.80	3.24
3	"	4.24	100.90	0.90	0.36
4	"	4.12	98.20	1.80	3.24
5	"	4.09	97.30	2.70	7.29

$$\bar{X} = 100.00$$

$$S = 2.08$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 2.97$$

$$L.C. = 100.00 \pm 2.97$$

TABLA No. 6

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE NICOTINAMIDA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
I	4.42	4.33	98.01	1.59	2.53
2	"	4.42	100.00	0.40	0.16
3	"	4.33	98.01	1.59	2.53
4	"	4.37	99.00	0.60	0.36
5	"	5.54	102.90	3.30	10.89

$$\bar{X} = 99.60$$

$$S = 1.91$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 2.72$$

$$L.C. = 99.60 \pm 2.72$$

TABLA No. 7

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE NICOTINAMIDA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
I	4.64	4.64	100.00	0.40	0.16
2	"	4.57	98.40	2.00	4.00
3	"	4.64	100.00	0.40	0.16
4	"	4.78	102.70	2.30	5.30
5	"	4.68	100.90	0.50	0.25

$$\bar{X} = 100.40$$

$$S = 1.57$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 2.23$$

$$L.C. = 100.40 \pm 2.23$$

TABLA No. 8

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE NICOTINAMIDA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	$(X - \bar{X})$	$(X - \bar{X})^2$
	Adicionados	Encontrados			
1	4.86	4.98	102.40	2.24	5.01
2	"	5.01	103.40	3.04	9.24
3	"	4.66	96.00	4.16	17.30
4	"	4.62	95.20	4.96	24.20
5	"	5.05	104.00	3.84	14.75

$$\bar{X} = 100.16$$

$$S = 4.20$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 5.98$$

$$L.C. = 100.16 \pm 5.98$$

TABLA No. 9

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE RIBOFLAVINA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	$(X - \bar{X})$	$(X - \bar{X})^2$
	Adicionados	Encontrados			
1	0.478	0.460	96.30	3.70	13.70
2	"	0.482	101.00	1.00	1.00
3	"	0.480	100.50	0.50	0.25
4	"	0.483	101.10	1.10	1.21
5	"	0.485	101.10	1.10	1.21

$$\bar{X} = 100.00$$

$$S = 2.08$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 2.97$$

$$L.C. = 100.00 \pm 2.97$$

TABLA No. 10

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE RIBOFLAVINA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	($\bar{X} - \bar{X}$)	($\bar{X} - \bar{X}$) ²
	Adicionados	Encontrados			
1	0.352	0.372	105.60	5.60	31.36
2	"	0.363	103.20	3.20	10.24
3	"	0.346	98.50	1.50	2.25
4	"	0.337	96.00	4.00	16.00
5	"	0.340	96.70	3.30	10.89

$$\bar{X} = 100.00$$

$$s = 4.20$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 5.99$$

$$L.C. = 100.00 \pm 5.99$$

TABLA No. 11

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE RIBOFLAVINA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	($\bar{X} - \bar{X}$)	($\bar{X} - \bar{X}$) ²
	Adicionados	Encontrados			
1	0.412	0.412	100.00	0.10	0.01
2	"	0.392	95.20	4.70	22.09
3	"	0.409	99.30	0.60	0.36
4	"	0.423	102.60	2.70	7.30
5	"	0.423	102.60	2.70	7.30

$$\bar{X} = 99.90$$

$$s = 3.04$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 4.33$$

$$L.C. = 99.90 \pm 4.33$$

TABLA No. 12

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE RIBOFLAVINA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(\bar{X})	(\bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
1	0.434	0.412	95.00	4.10	16.80
2	"	0.437	100.60	1.50	2.25
3	"	0.438	101.00	1.90	3.60
4	"	0.440	101.40	2.30	5.29
5	"	0.424	97.70	1.40	1.96

$$\bar{X} = 99.10$$

$$S = 2.37$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 3.89$$

$$L.C. = 99.10 \pm 3.89$$

TABLA No. 13

DATOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS DE RIBOFLAVINA EN CAPSULAS.

Muestra	Microgramos.		% Recuperación	(\bar{X})	(\bar{X}) ²
	Adicionados	Encontrados			
1	0.456	0.456	100.00	0.48	0.23
2	"	0.456	100.00	0.48	0.23
3	"	0.450	98.80	1.68	2.82
4	"	0.459	100.60	0.12	0.02
5	"	0.470	103.00	2.72	6.40

$$\bar{X} = 100.48$$

$$S = 1.55$$

$$t = 3.18$$

$$IC_{95\%} = 2.16$$

$$L.C. = 100.48 \pm 2.16$$

IV.- DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

Discusiones y conclusiones.

Se desarrollaron métodos para el análisis de las siguientes vitaminas del complejo B: Acido nicotínico, Nicotinamida y Riboflavina en materia prima y en cápsulas, usando las mismas condiciones del ensayo para ambos métodos.

Las determinaciones de estas vitaminas se hicieron en medio ácido - porque la riboflavina es una vitamina que se descompone en medio básico. En los métodos que se desarrollaron para el análisis de estas vitaminas se hicieron recobros, preparando placebos especialmente en cápsulas para la nicotinamida y la riboflavina adicionando diferentes cantidades de estas vitaminas al granulado vitamínico de las cápsulas.

El cromatograma típico de las tres vitaminas nos muestra la separación de las tres en una sola inyección. En el cual el primer pico - corresponde al ácido nicotínico, el segundo a la nicotinamida y el tercero a la riboflavina.

Las graficas obtenidas en cada caso, en las cuales se graficó mm^2 - del área de los picos contra soluciones de diferente concentración - en las cuales se observa que se obtiene una línea recta, lo cual nos indica que el detector del aparato responde en forma lineal para las diferentes muestras con diferente concentración de cada vitamina. Este hecho también se puede apreciar claramente en el cromatograma respectivo, en el cual se observa que el tamaño de los picos - va aumentando a medida que aumenta la cantidad de vitamina.

En las tablas de los resultados obtenidos se observa que los valores que se obtuvieron en las diferentes muestras son semejantes al valor medio (valor más).

Los valores presentan desviaciones muy pequeñas por lo que se puede decir que los resultados que se obtuvieron son satisfactorios.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

a) Estos métodos desarrollados para el análisis de las vitaminas tanto en materia prima como en cápsulas, son aceptables por lo que se refiere a su Precisión y Exactitud.

b) Los resultados obtenidos confirman las ventajas que tiene la cromatografía de líquidos a alta presión sobre otras técnicas para el análisis de vitaminas del complejo B.

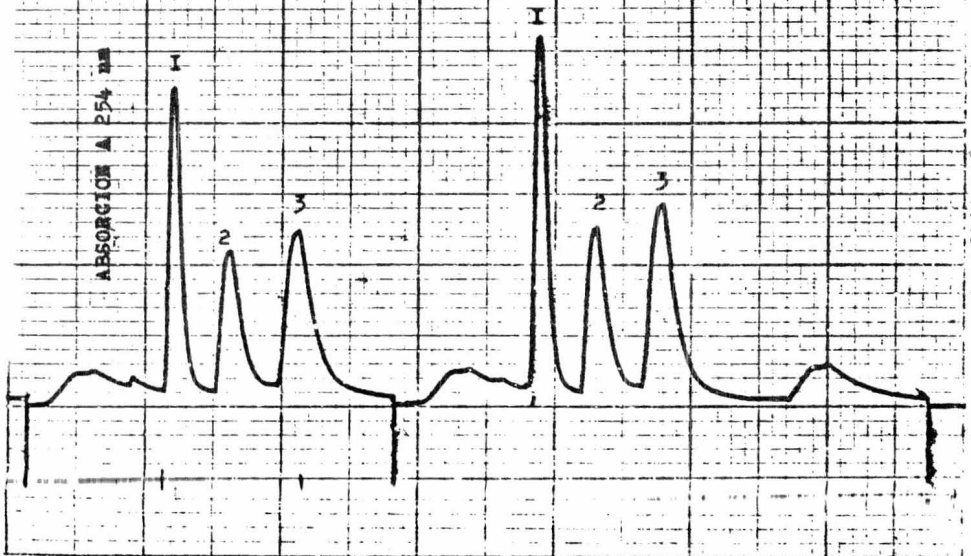
c) El método desarrollado para el análisis de nicotinamida y riboflavina en cápsulas también puede aplicarse para analizar productos que además de contener estas dos vitaminas contengan ácido nicotínico, ya que las tres vitaminas se separan perfectamente lo cual se observa en el cromatograma típico de las tres vitaminas.

d) Por último estos métodos para el análisis de estas vitaminas que se desarrollaron en este trabajo contribuyen así a nuevas técnicas de análisis en el campo de la química analítica.

CRONATOGRAMA TÍPICO DE LA SEPARACION
DE LAS TRES VITAMINAS.

PICO.

- 1.- ACIDO NICOTINICO
- 2.- NICOTINAMIDA
- 3.- RIBOFLAVINA



V.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

- I.- Kirland J.J.
Modern Practices in Liquid Chromatography.
Wiley-Interscience Publisher. (1971).
- 2.- Snyder L.R., and Kirland J.J.
Introduction to Modern Liquid Chromatography.
John Wiley & Sons.
New York. 1974.
- 3.- Hadden N., et al.
Basic Liquid Chromatography.
Variant Aerography.
Walnut Creek, Calif, 1972
- 4.- Williams R.C., Baker D.P., and Schmit J.A.
Analysis of Water-Soluble Vitamins by High-Speed Ion-Exchange
Chromatography.
J. Chromatog. Sci. II. 618-623 (1973).
- 5.- Abbot David, Andrews R.S.
Introducción a la Cromatografía.
Editorial Alambra, S.A.
Madrid, 1973.
- 6.- Heftman Eric, (edited).
Chromatography.
Third. Printin.
Reinhold Publishing Corporation.
New York. 1964.

- 7.- Lederer Edgar and Lederer Michael.
Chromatography.
Third. Impression.
Elsevier Publishing Company.
New York 1955.
- 8.- Liquid Chromatography Review.
Pharmaceutical Applications.
Dupont Instruments.
- 9.- Schmit J.A.
Quantitative Aspects of Liquid Chromatography.
E.I. Dupont, De Nemours & Co. Inc. (1974).
- 10.- Journal of Chromatographic Science. 13. 461-465 October (1975).
- 11.- Journal of Chromatographic Science. 13. 404-410 September (1975).
- 12.- Dupont. Manual del Cromatógrafo de Líquidos Modelo 830.
- 13.- Dr. Abraham Cantarow y Dr. Bernard Shepartz.
Bioquímica.
4^a Edición.
Editorial Interamericana.
México, D.F. 1972.
- 14.- Albert L. Leninger.
Bioquímica.
Ediciones Omega, S.A.
Barcelona España. 1972.
- 15.- Meloan y Crifton E. Meloan y Robert M. Kiser.
Problemas y Experimentos en Análisis Instrumental.
1^a Edición en Español.
Ed. Reverte, S.A.
México, D.F. 1973.

16.- Dixon y Masey.

Introducción al Análisis Estadístico.

2ª Edición.

Ed. McGraw-Hill Book Co. Inc.

Madrid España. 1965.

17.- Eugene L. Grant.

Control de Calidad Estadístico.

1ª Edición.

Editorial Continental.

México, D.F. 1966.