



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"CUANTIFICACION DE VITAMINAS DEL COMPLEJO B EN HARINAS FORTIFICADAS DE CEREALES POR HPLC"

T E S I S

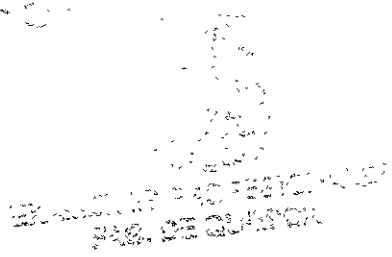
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO DE ALIMENTOS PRESENTA: CARLOS ALBERTO ALMANZA RODRIGUEZ

228482



MEXICO, D. F.

2001





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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Francisca Iturbe Chinas
Vocal	Prof. María de los Angeles Valdivia López
Secretario	Prof. Hermilo Leal Lara
1er. Suplente	Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén
2º. Suplente	Prof. Luz Sandra Sánchez del Angel

Sitio donde se desarrolló el tema:


Laboratorio 323, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor



M en C. María de los Angeles Valdivia López

Sustentante



Almanza Rodríguez Carlos Alberto

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todo el aprendizaje dentro y fuera de las aulas y por dar cabida a todo ese cosmos de ideas que la hacen posible.

A la M. en C. María de los Ángeles Valdivia por su asesoramiento en este trabajo y la confianza depositada en mí para llevarlo a cabo.

A la M. en C. Francisca Iturbe Chinas por incluirme en el Subprograma 121, por sus invaluable consejos y por su ejemplar compromiso con la Universidad.

A la Q.F.B. Julieta Sandoval Guillén por sus atinadas observaciones y apoyo durante el desarrollo de este trabajo y por compartir la experiencia desinteresadamente.

Al Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química por todo el apoyo técnico hacia este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mi padre, por ser el máximo ejemplo de integridad e incondicionalidad. Sin ti me hubiera perdido.

A mi madre, el ser más bondadoso que conozco.

A Luis y Lilia, por su fortaleza y por toda una vida hombro con hombro. Son lo máximo.

A Rodrigo, Alberto y Adán en Do sostenido, a ritmo sincopado y en perfecta armonía.

A Roberto, Fadia, Anita, Bolo, Enka, Iván y Michelle por ser el colage más artístico y divertido que conozco y por todas las madrugadas arreglando al mundo y a nosotros mismos, ¡¡¡ya casi lo conseguimos!!!

A Silvia, Tábata, Luz, Rocío, Luisa y Joel : You are Spartacus!!

A Manolo, Paty, Varinia y Francisco, compadres y comadres, filósofos y locos. . ¡¡¡nos teníamos que conocer!!!

A Andrea, Tere, Javier, Pancho y a todos los demás del pabellón sur. Realmente me divertí horrores.

A Viviana, Pili, Rosy, "Martín", Emmanuel y Vanessa, definitivamente las apariencias engañan. Gracias por dejarme entrar.

A Silvia P., un corazón disfrazado de mujer...

A Laura, por la historia.

V No se olvida.

A ese ser que montó el escenario y nos deja actuar en su obra maestra. . los reflectores son para Él.

"Bailo, como si nadie me estuviera viendo,  
trabajo, como si no necesitara el dinero,  
y amo, como si jamás me hubieran herido"

Bono, vocalista de U2

# ÍNDICE

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	2
<b>ANTECEDENTES</b>	4
<b>1.1 Harina de maíz fortificada</b>	4
1.1.1 Elaboración	5
1.1.2 Composición	5
<b>1.2 Vitaminas hidrosolubles en harina de maíz fortificada</b>	7
1.2.1 Tiamina	7
1.2.2 Riboflavina	8
1.2.3 Niacina	9
1.2.4 Ácido fólico	10
<b>1.3 Determinación de vitaminas hidrosolubles en alimentos</b>	11
1.3.1 Métodos tradicionales	11
1.3.1.1 Tiamina	12
1.3.1.2 Riboflavina	12
1.3.1.3 Niacina	13
1.3.1.4 Ácido fólico	13
1.3.2 Métodos en Normas Oficiales Mexicanas y Códex Alimentarius	13
1.3.3 Métodos simultáneos por HPLC	14
1.3.3.1 Separaciones múltiples	14
1.3.3.2 Factores que afectan la cromatografía de par iónico en vitaminas hidrosolubles	18
1.3.3.5 Separaciones múltiples	18
<b>1.4 Validación estadística</b>	20
1.4.1 Finalidad	20
1.4.2 Exactitud	21
1.4.3 Precisión	23
1.4.4 Linealidad	26
1.4.4.1 Significación de la regresión	29
1.4.4.2 Prueba de falta de ajuste	30

## INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionales para la determinación de vitaminas requieren del análisis individual de cada una por métodos que involucran diversas técnicas instrumentales, como la espectrofotometría, colorimetría, fluorometría y en algunos casos bioensayos. La elección del método generalmente depende de la precisión y sensibilidad requeridas y las interferencias posibles en la muestra estudiada.

Como regla general en los alimentos, debido a sus diversas propiedades químicas y físicas es muy difícil extraer y cuantificar las múltiples vitaminas. El mayor reto en el análisis de vitaminas es generalmente su extracción de la matriz alimenticia original. Las condiciones de la misma necesitan ser seleccionadas atendiendo la naturaleza lábil de estos compuestos para liberarlas evitando su degradación o pérdida (Russell, 1996). En casos especiales los análisis de vitaminas múltiples en alimentos son factibles, como lo es la determinación en alimentos fortificados o adicionados (formas libres de las vitaminas).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus iniciales en inglés) se ha convertido en la técnica más popular para determinar vitaminas hidrosolubles. De manera particular, la cromatografía de líquidos en fase inversa permite la separación y cuantificación de analitos hidrosolubles y no volátiles, como las vitaminas. Además, los métodos por HPLC presentan ventajas respecto a los métodos biológicos, microbiológicos y químicos entre las que se encuentran mayor rapidez de análisis, mayor precisión, exactitud razonable y mayor especificidad incluso en la separación simultánea de vitaminas múltiples (Eitenmiller, 1990).

Uno de los mayores retos en la selección de un método para el análisis de vitaminas es el de identificar los méritos relativos de diversas metodologías afines. Los indicadores de la confiabilidad de un ensayo que el analista debe buscar incluyen la medición de la precisión, exactitud, reproducibilidad, recuperaciones en

muestras aleatorias, linealidad de la calibración, comparación con métodos reconocidos y / o mediciones de la pureza de los picos (Beecher y Vanderslice 1984).

Actualmente son numerosos los alimentos que se comercializan enfatizando el enriquecimiento vitamínico del cual son objeto, situación que les da un alto valor agregado y los hace atractivos ante un consumidor cada vez más exigente. Por otra parte, la legislación y normalización de este tipo de productos comienza a ser necesaria precisamente en lo relativo al enriquecimiento o fortificación, ya que por tratarse de un asunto de salud pública, tiene que estar regulado, tanto por los organismos encargados de la salud, como por la misma industria que los elabora.

Debido a esta situación, surge la necesidad de optimizar los esquemas analíticos existentes o bien el desarrollo de nuevos métodos para la extracción, detección y cuantificación de estos compuestos

Desde el aspecto analítico es deseable la existencia de metodologías que faciliten el análisis de los alimentos, es decir, que simplifiquen los procesos en el laboratorio sin sacrificar aspectos de suma importancia como la confiabilidad de los datos obtenidos.

Ante esta perspectiva el desarrollo y validación de un esquema analítico que permita una extracción eficiente y un método válido de separación y cuantificación de las vitaminas hidrosolubles resulta evidente.



## OBJETIVOS

### Objetivo general:

- Desarrollar un esquema analítico que permita una eficiente extracción, separación y cuantificación simultánea de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), niacina y ácido fólico en harina de maíz fortificada

### Objetivos particulares:

- Desarrollar un método de extracción y purificación de las vitaminas que sea eficaz acorde con las características fisicoquímicas de las harinas.
- Establecer las condiciones cromatográficas necesarias para la separación y cuantificación simultánea de las cuatro vitaminas.
- Validar estadísticamente el método en función de la precisión, exactitud, reproducibilidad y linealidad de los datos obtenidos.
- Establecer claramente las ventajas y desventajas que presenta el método propuesto frente a los métodos tradicionales para la determinación de vitaminas hidrosolubles en alimentos.

## ANTECEDENTES.

### 1.1 Harina de maíz fortificada.

#### 1.1.1 Elaboración

La preparación industrial de harinas de masa precocida (o nixtamalizada) es lograda utilizando diversos procedimientos basados en el cocimiento alcalino y lavado del maíz, seguido de molienda y secado. La masa seca es tamizada y reformulada en harinas con una distribución de tamaño de partícula cuidadosamente controlada para conseguir los requerimientos del producto. En un proceso continuo, la harina entera cruda se cocina con agua (1:3) y cal (0.3% del peso del maíz). La mezcla se cocina y seca en un secador de tambor doble. Se supone que las tortillas producidas con este secado presentan características fisicoquímicas y sensoriales similares a aquellas tortillas preparadas de manera tradicional.

El proceso de nixtamalización (fig. 1.1) produce algunos cambios significativos en el maíz, entre ellos:

- Gelatinización parcial del almidón;
- Disminución del contenido de proteína por solubilización en el agua de cocción.
- Aumento de la disponibilidad de aminoácidos por desnaturalización proteica
- Aumento de la disponibilidad de niacina
- Aumento del contenido de calcio
- Pérdida de vitaminas hidrosolubles
- Reducción en el contenido de grasa.

(Machorro, 1982)

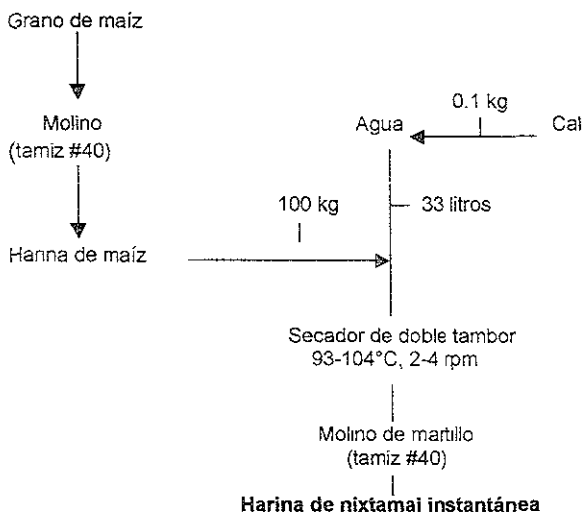


Figura 1.1 Producción de harina de nixtamal instantánea

Debido a la alcalinidad del medio en que se desarrolla este proceso, resulta inevitable la pérdida de las vitaminas hidrosolubles a excepción de la niacina, por lo que se han desarrollado técnicas de adición de las mismas. Estas operaciones consisten en incorporarlas a una premezcla de harina de maíz ya sea durante la molienda o en algún otro punto del proceso, dependiendo del esquema de obtención de la harina.

### 1.1.2 Composición.

En la tabla 1.1 se muestra la composición química promedio para las harinas de nixtamal fortificadas. Se sabe que en general el maíz presenta un contenido en carbohidratos elevado lo que convierte a las harinas en un alimento con gran aporte calórico, pero principalmente destaca el hecho de que en México el consumo de tortillas de harina de maíz nixtamalizado es muy elevado y con la finalidad de hacerlas un alimento con mayor valor nutricional se ha recurrido a la fortificación con vitaminas y minerales

Tabla 1.1 Composición química promedio de harinas de maíz fortificadas.

Fuente: Instituto Nacional de la Nutrición.

Componente	g / 100 g harina	
Humedad	4.7 – 6	
Proteínas	8	
Carbohidratos	75.4	
Grasas	3.9	
Fibra dietética	8	
	% IDR	Equivalencia mg/kg
Tiamina	33	2.64
Riboflavina	17	2
Niacina	17	28.9
Ácido fólico	27	0.54
Hierro	20	3.6
Zinc	17	2.8

% IDR = Porcentaje de la ingesta diaria recomendada.

En cuanto a los niveles de fortificación para cada vitamina y mineral, éstos son determinados con base en los que se presentan en la tabla 1.2 y que son los establecidos por el Instituto Nacional de la Nutrición :

Tabla 1.2 Lineamientos para la adición de micronutrientes a las harinas de maíz.

Micronutriente	Mínimo mg/kg	Nivel Recomendado mg/kg	Máximo mg/ kg	Compuesto recomendado
Tiamina	4.0	5.0	8.0	Mononitrato de tiamina
Riboflavina	2.4	3.0	5.0	Clorhidrato de riboflavina
Niacina	28	35	45	Nicotinamida
Ácido fólico	0.4	0.5	0.8	Ácido fólico
Hierro	24	30	40	Hierro reducido extrafino
Zinc	16	20.0	26.0	Óxido de zinc

Dichos micronutrientes y sus respectivos niveles de adición pueden ser modificados conforme se determine por resultados y pruebas que realicen los organismos encargados.

## 1.2 Vitaminas hidrosolubles en harina de maíz fortificado.

### 1.2.1 Tiamina

Históricamente, la tiamina (fig. 1.2) ha sido conocida como la vitamina cuya deficiencia produce beriberi (Kawasaki, 1992). Aunque sus efectos en las funciones nerviosas y sus propiedades antipolneuríticas han sido reconocidas por años, los medios exactos por los cuales la tiamina ejerce su función neurológica está aún bajo investigación

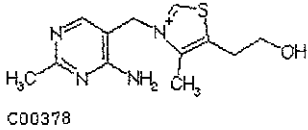


Fig. 1.2 Tiamina (vitamina B<sub>1</sub>)

La fuentes de tiamina en alimentos incluyen carne, pescado, cereales enteros, cereales fortificados y productos de panadería, nueces, legumbres, huevo, frutas y vegetales (De Leenheer y col, 1992). En la naturaleza, la vitamina B<sub>1</sub> existe tanto en su forma no fosforilada (tiamina) y como esteres fosfóricos, que incluyen el monofosfato, pirofosfato y trifosfato de tiamina (TMP, TPP, TTP respectivamente) y se encuentran unidos a proteínas. El éster difosfatado (TPP) es generalmente reconocido como la forma fisiológicamente activa como coenzima. El contenido de tiamina total resulta de la suma de la tiamina y sus esteres fosforilados

Los ésteres son relativamente estables en estado seco si el alimento se almacena a bajas temperaturas y en la oscuridad. En solución, la tiamina es estable a pH 2-4 y la TPP es estable en el intervalo de pH 2-6 a baja temperatura. Todas las formas de la tiamina son inestables a temperaturas elevadas y bajo condiciones alcalinas. La detección de tiamina puede ser problemática debido a que generalmente se presenta en bajas concentraciones.

### 1.2.2 Riboflavina

Aunque la deficiencia de riboflavina no está asociada con un síndrome específico identificado, produce síntomas similares a los de pelagra, incluyendo lesiones de la piel alrededor de la boca, nariz y oídos (DeVries, 1993).

La vitamina B<sub>2</sub> endógena está presente en los alimentos en tres formas principales (fig. 1.3): riboflavina y las coenzimas fisiológicamente activas, flavin mononucleótido (FMN) y flavin-adenin-dinucleótido (FAD) (Nielsen, 1992)

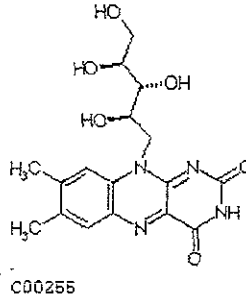


Fig 1.3. Riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>)

Las fuentes alimenticias de vitamina B<sub>2</sub> incluyen levadura, productos lácteos, carne y huevo (Russel, 1996). Las coenzimas son las formas predominantes en alimentos y se encuentran unidas a proteínas. La excepción es la leche, en la que se encuentra predominantemente en forma de riboflavina libre.

Las característica química más importante que afecta los análisis de esta vitamina es su fotosensibilidad. La degradación de vitamina B<sub>2</sub> por luz UV y visible produce

fotoreducción irreversible a lumiflavina o lumicromo y por tanto la pérdida de su actividad. Todas las formas vitamínicas B<sub>2</sub> son inestables a pH alcalino y las coenzimas son degradadas por debajo de pH 5. La extracción y análisis de la coenzimas necesitan por tanto realizarse a pH 5-7, mientras que el análisis de riboflavina total es mejor en pH ácido.

Para propósitos de detección, todas las formas vitamínicas tienen espectros de absorción similares y fluorescen de manera natural. Es factible entonces su detección espectrofotométrica

### 1.2.3 Niacina (Vitamina B<sub>3</sub> o PP).

La niacina (fig.1.4) es conocida como la vitamina preventiva de pelagra (DeVries, 1993). Fisiológicamente actúa como un acarreador de hidrógeno y como cofactor para un número importante de deshidrogenasas. Participa en los sistemas red-ox, desempeñando un rol esencial en los sistemas enzimáticos responsables del metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos.

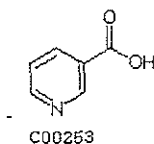


Fig. 1.4. Ácido nicotínico (vitamina B<sub>3</sub> o PP)

Las formas encontradas en alimentos incluyen al ácido nicotínico, esteres del nicotinoil y la formas de coenzimas : nicotinamin-adenin-dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) y la forma fosfatada de ésta (NADP<sup>+</sup>), y sus respectivas formas reducidas, NADH y NADPH. Los alimentos en que se encuentra incluyen cereales y semillas, que contiene principalmente ácido nicotínico, y pescado, cerdo, pollo y res, que contienen nicotinamida

En general la niacina es una de las vitaminas más estables (De Leenheer y col., 1992). Las soluciones acuosas de ácido nicotínico y de nicotinamida soportan condiciones de autoclave por periodos cortos sin descomposición (*v. gr.* a 100°C / 10 min.) La estabilidad del ácido nicotínico es independiente del pH. En contraste, la nicotinamida es estable a pH neutro pero puede convertirse al ácido calentándola en ácido o álcali 1N.

Respecto a su detección, todas las formas vitamínicas de la niacina poseen absorción en el espectro de UV.

#### 1.2.4 Ácido fólico.

La deficiencia de folacina produce anemia megaloblástica muy similar a la producida por la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>. Esto resulta de la interdependencia de la folacina y la vitamina B<sub>12</sub> en al menos dos rutas bioquímicas. La función *in vivo* de la folacina es como acarreador de unidades monocarbónicas y como coenzima en diversas reacciones bioquímicas incluyendo la síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas (Mullin y Dutch, 1992).

La folacina está disponible ampliamente en alimentos vegetales y animales, principalmente vegetales de hojas verdes, hígado, levadura de cerveza, frijol y productos lácteos fermentados (DeVries, 1993). Las diferentes formas vitamínicas constituyen un gran grupo de compuestos relacionados que contienen la misma estructura básica de ácido fólico (ácido pteroilglutámico) (fig. 1.5) con diferencias en el estado de reducción y el número de residuos glutámicos, en teoría existen aproximadamente 150 formas con diferente actividad biológica. El ácido fólico no está presente de manera natural, pero es la forma vitamínica utilizada para fortificación



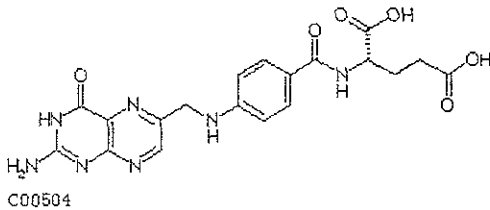


Fig 1 5 Ácido fólico (ácido pteroilglutámico)

Las diferentes formas de la folacina en alimentos son relativamente lábiles, pues son extremadamente sensibles al calor, a la luz, a la oxidación y a valores de pH extremos (De Leehneer y col., 1992). La extracción de estas vitaminas es complicada por las bajas concentraciones en que se presentan y la amplia presencia de enzimas endógenas en alimentos que interconvierten a las formas vitamínicas y / o degradan la cadena poliglutámica. Además, pueden estar unidas a proteínas. Debe tenerse especial cuidado en asegurar una extracción cuantitativa.

En cuanto a su detección, todos los folatos biológicamente activos presentan absorción UV característica.

### 1.3 Determinación de vitaminas hidrosolubles en alimentos.

#### 1.3.1 Métodos tradicionales

Los métodos oficiales de referencia (AOAC, 1995) para la cuantificación de tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico en alimentos utilizan técnicas químicas microbiológicas e instrumentales y son el parámetro contra el cual otros métodos son comparados.

### 1.3.1.1 Tiamina (Viamina B<sub>1</sub>)

Todos los métodos recomendados para la cuantificación de tiamina están basados en la formación de un derivado fluorescente (tiocromo). Las condiciones de extracción involucran además de hidrólisis ácida en autoclave, otra hidrólisis enzimática a 50°C por 3 horas. La derivatización se realiza por oxidación alcalina con bromocianuro. En muestras que puedan contener varios vitámeros la tiamina total se cuantifica por desfosforilación mediante enzimas previa a la derivatización (Russell, 1996). Si es necesario también puede realizarse una purificación por columna. Estos métodos no son aplicables para materiales que puedan afectar la fluorescencia del tiocromo.

### 1.3.1.2 Riboflavina (Vitamina B<sub>2</sub>)

Para el ensayo de riboflavina en alimentos, se recomiendan dos métodos microbiológicos y dos fluorométricos (Sullivan y Carpenter, 1993). Las técnicas fluorométricas, que incluyen un procedimiento manual y uno semiautomático están basadas en la extracción de los vitámeros B<sub>2</sub> y su conversión a riboflavina por calentamiento en presencia de ácidos minerales (*v. gr.* en autoclave con HCl 0.1N a 121°C/30 min). La proteína se precipita y el extracto se oxida levemente con permanganato de potasio para destruir compuestos que pudieran interferir con la fluorescencia. El exceso de permanganato se decolora con peróxido de hidrógeno y se mide la fluorescencia de la riboflavina.

Debido a la falta de un paso de separación en los métodos fluorométricos, frecuentemente ocurre sobreestimación debido a la presencia de componentes que interfieren (Russell y Vanderslice, 1992). Trabajos recientes indican que estos métodos no son factibles para muestras con alto contenido graso o actividad enzimática degradativa (*v. gr.* fosfatasa).

### 1.3.1.3 Niacina (Vitamina B<sub>3</sub> o vitamina PP).

Actualmente, están listados dos métodos automatizados y uno manual para la determinación de niacina total (ácido nicotínico + nicotinamida) en alimentos (Sullivan y Carpenter, 1993). Los vitameros de la niacina son extraídos por hidrólisis ácida o básica, que además facilita la conversión de nicotinamida a ácido nicotínico. La niacina total se determina como ácido nicotínico por anclaje de los grupos piridina con bromocianuro y la formación de un producto colorido por reacción con ácido sulfanílico. El producto final se determina espectrofotométricamente a 470 nm. Estos métodos sufren de varias desventajas incluyendo baja sensibilidad y el uso de reactivos dañinos e inestables (BrCN y ácido sulfanílico) (Shibata y Shimono, 1992).

### 1.3.1.4 Ácido fólico (Folacina).

Los métodos de referencia para folacina libre o total son microbiológicos. Los diferentes microorganismos utilizados, entre ellos *Streptococcus faecalis* y *Lactobacillus casei*, han mostrado tener diferentes respuestas a las variadas formas de la vitamina (Goli y Vanderslice, 1992). Además, la determinación resulta muy laboriosa, consume tiempo y no es del todo reproducible (Jacoby y Henry, 1992) ya que los microorganismos presentan susceptibilidad a ciertos componentes de los alimentos que pueden actuar como estimulantes o depresores del crecimiento. En general, la metodología para ácido fólico continúa siendo problemática.

### 1.3.2 Métodos en Normas Oficiales Mexicanas y Codex Alimentarius.

En la legislación mexicana, (NOM-131-SSA1-1995) los métodos reportados en alimentos para lactantes son similares a los de referencia (AOAC, 1995), con la

excepción de que la cuantificación de tiamina y riboflavina se hace de manera simultánea. En el caso del *Códex Alimentarius* las metodologías son las de referencia.

### 1 3.3 Métodos simultáneos por HPLC.

#### 1 3.3.1 Separaciones múltiples:

En años recientes, el análisis de vitaminas hidrosolubles en alimentos ha encontrado en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) una excelente herramienta, tanto en el aspecto químico como en humano, ya que por la versatilidad que presenta, simplifica y optimiza la cuantificación de estos compuestos. En este sentido, los métodos desarrollados presentan alternativas prácticas al cuantificar de manera simultánea las vitaminas de interés.

Estos análisis múltiples resultan factibles en casos especiales, como la determinación en alimentos fortificados, que contienen a las vitaminas en sus formas libres o en la determinación de las mismas en alimentos relativamente simples como los jugos. La separación simultánea de múltiples vitaminas está lejos de ser superada; el mayor tropiezo continúa siendo la extracción no degradativa de las vitaminas debido a la considerable diversidad en sus propiedades químicas, físicas y las condiciones que influyen en su estabilización o desestabilización (Russell, 1996).

Los niveles de vitaminas presentes en los alimentos son generalmente muy bajas y las vitaminas están acompañadas por un exceso de constituyentes de la matriz que a veces poseen las mismas características (De Leenheer y col , 1994).

Como grupo, las vitaminas son de una diversidad química extrema. Muchas de ellas son susceptibles a la oxidación y degradación por exposición a la luz o al

calor. Una de las mayores bondades de los sistemas de HPLC es que el contacto con el aire, luz y temperaturas extremas está excluido.

Siempre se intenta que la preparación de la muestra mejore la especificidad de un procedimiento analítico eliminando la mayor cantidad posible de otros constituyentes de la matriz para concentrar el analito.

En general, la extracción de las vitaminas involucra tratamientos ácidos, altas temperaturas y a veces hidrólisis enzimática dependiendo principalmente del tipo de muestra, la o las vitaminas que se desean extraer y la forma en que éstas se encuentran en el alimento, la metodología de extracción se debe adecuar al tipo de muestra, ya que no siempre las vitaminas se encuentran asociadas a otros componentes de la muestra o están en sus formas libres (adicionadas).

Las primeras determinaciones simultáneas de vitaminas en alimentos por HPLC se realizaron a mediados de la década de los 80's. Desde entonces, se han optimizado.

En 1992, Chase y col. cuantificaron tiamina, riboflavina y piridoxina en fórmula infantil por fase inversa. El tratamiento de la muestra consistió en una extracción con ácido perclórico para la separación de los componentes asociados a las vitaminas, mientras que la detección combina absorción UV y fluorescencia, lo cual implicó una previa derivatización del extracto, haciéndolo un sistema un tanto complejo, y que además no coincide con las determinaciones por métodos oficiales, aunque si presenta grandes ventajas en tiempo de análisis y límites de cuantificación.

Barna y Dworschák en 1994 desarrollaron un método para cuantificar tiamina y riboflavina en hígado mediante hidrólisis ácida seguida de hidrólisis enzimática. En comparación con los métodos oficiales, este método tuvo menor recuperación de ambas vitaminas y una amplia dispersión por la descomposición de las formas

vitamínicas en la extracción además de la extracción o hidrólisis conjunta de compuestos que dificultaron la detección.

Un método con buenos resultados y ventajas evidentes en el análisis múltiple de vitaminas por HPLC es el desarrollado por Albalá y col en 1997. En éste, la extracción consistió en agitación con ácido tricloroacético y filtración de los extractos; se cuantificaron ocho vitaminas del complejo B, entre ellas nicotinamida, ácido fólico, riboflavina y tiamina en fórmula infantil en menos de 60 minutos y con detección en UV.

Aunque los materiales básicos de empaqueo en todos los sistemas cromatográficos son sólidos, la capa exterior puede ser un líquido o bien un sólido (Pomeranz y Meloan, 1994). En HPLC sólido-líquido, la capa externa del material de empaque, que entra en contacto con la fase móvil y los componentes de la muestra es un sólido (fig. 1 6).

Ya que la mayoría de los empaque de columna sólida son láminas o materiales laminados, sus superficies son aluminatos o silicatos y consisten de grandes cantidades de grupos terminales  $-OH$ , los cuales son altamente polares.

Generalmente un solvente no polar como el hexano es utilizado como la fase móvil. Cuando compuestos de polaridad moderada son disueltos en la fase móvil y pasados a través de la columna, los compuestos más polares son retenidos más fuertemente que los menos polares y por tanto la separación es buena.

Debido a que en un sistema líquido-sólido la superficie sólida de las partículas es polar y no es muy útil para la separación de compuestos no polares, los cuales tienen muy poca afinidad por las partículas polares, se emplean los materiales de empaque de fase inversa. En éstos, la superficie reactiva de la partícula es cambiada por reacción con un compuesto no polar que es químicamente enlazado al grupo  $-OH$  para que no pueda ser desprendido. En esta categoría entran los

sistemas C<sub>18</sub>, en los que se enlaza una molécula de octadecasil en la que la molécula a separar, en este caso las vitaminas, se retiene un determinado tiempo y después es eluida dependiendo de su afinidad con la fase móvil y del equilibrio de partición que se establece entre ambas fases.

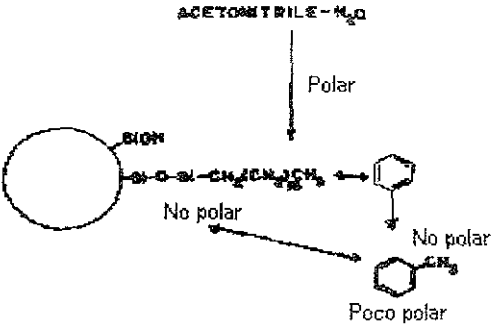


Fig. 1.6. Sistema de empaqueo líquido sólido

La aplicación más popular es una modificación de este sistema: la cromatografía de par iónico. Se base enteramente en los equilibrios de concentración y puede ser usada para separar materiales altamente polares con una superficie no polar (fig. 1.7).

Si se logra el sistema correcto, la cromatografía de par iónico generalmente proporciona mejores eficiencias de separación que la de intercambio iónico. Los agentes que funcionan mejor como pares iónicos son los ácidos sulfónicos orgánicos como el ácido hexansulfónico  $(CH_3-(CH_2)_5 - SO_3^-, H^+$

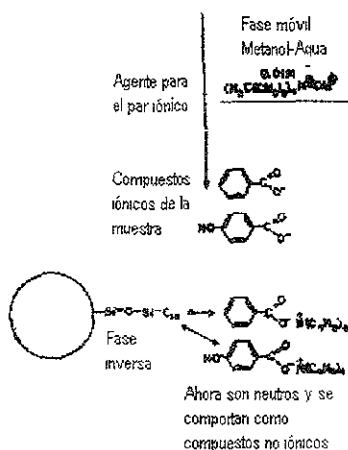


Fig 17. Sistema cromatográfico par-iónico

### 1.3.3.2 Factores que afectan la cromatografía de par iónico en vitaminas hidrosolubles.

En diferentes estudios, se ha observado que la separación de vitaminas hidrosolubles por cromatografía de par iónico se ve afectada por diversos factores, (Dong y col., 1988) como el tipo y proporción de solvente orgánico, la concentración del par iónico, el tipo y longitud de columna y algunos aditivos que se añaden a la fase móvil para mejorar la resolución de los picos. Con estos resultados se puede tener un sumario de condiciones óptimas para la separación y detección de vitaminas



Tabla 1.3 Sumario de condiciones óptimas para la separación de vitaminas hidrosolubles en columnas C<sub>18</sub>

Factores	Intervalos
Par iónico	4 – 7 mM 1-hexanosulfonato
pH	2.8 – 3.2
Modificador orgánico	12.5 – 20% metanol
Aditivos	0.8 – 1.2 % ácido acético 0.1 – 0.13 % trietilamina
Temperatura de la columna	22 – 28 °C

Los criterios para la selección de estos rangos son la resolución, forma del pico y la rapidez del análisis

De estos estudios se desprenden las siguientes conclusiones.

- El hexanosulfonato resulta ser el par iónico que mejores resultados proporciona con respecto a la resolución.
- El intervalo de pH es de suma importancia, ya que las vitaminas son sumamente sensibles a las variaciones de éste, puesto que poseen varios y distintos grupos ionizables.
- En el caso de los aditivos, la trietilamina mejora y controla la elusión de tiamina y refina la resolución de otras vitaminas.
- Los niveles de metanol por debajo del intervalo aumentan la resolución de las vitaminas que eluyen más rápido a expensas del tiempo de análisis.

En la mayoría de los análisis múltiples para cuantificación de vitaminas uno de los grandes obstáculos es la trazabilidad de las mismas, así como la incertidumbre y dispersión que presenta la información obtenida, situación que es de gran importancia en la estandarización de los mismos, por lo que es necesario realizar pruebas de validación estadística que permitan establecer la confiabilidad de los datos.

## 1.4 Validación estadística.

Junto con la calibración y la trazabilidad (límite mínimo de cuantificación determinado con precisión y exactitud aceptables) de las calibraciones, la validación de métodos es probablemente el mayor obstáculo para los laboratorios (Wilson y Geoff, 1995).

Los esquemas de acreditación requieren que los laboratorios usen métodos apropiados para las pruebas que realizan, es decir, que el método efectivamente sirva para el propósito que se diseñó y que logre el nivel de sensibilidad requerido por los clientes o bien por la legislación existente

### 1.4.1 Finalidad.

El propósito de realizar una determinación cualquiera, es el de obtener un valor estimado del valor verdadero, ya que nunca se podrá conocer el valor real. Esto es principalmente debido a que ninguna medición se encuentra libre de error y lo que se determina es un valor que difiere del real con una diferencia llamada error absoluto.

Además, cada medición estará sujeta a cierta incertidumbre en el valor final obtenido, sin considerar su relación con el valor verdadero.

Existen dos tipos de error: los sistemáticos o determinados y los aleatorios o indeterminados. Un error sistemático es aquel cuya fuente puede localizarse o definirse y de esta manera tratar de eliminarlo en la mayor proporción posible. (Montgomery, 1996). Algunas fuentes de este tipo de error pueden ser errores instrumentales, del método, de operación y personales. Un error aleatorio es aquel que no puede atribuirse a una causa conocida ni puede predecirse su magnitud o dirección para una medición de una serie de datos, no son fáciles de identificar y ocurren de manera aislada fortuita y accidentalmente

En vista de que los errores aleatorios no pueden predecirse con exactitud, una manera de estimarlos es mediante técnicas estadísticas, las cuales proporcionan un panorama de su magnitud, frecuencia de ocurrencia y efecto en la expresión final del resultado. A partir de dicho análisis puede obtenerse un indicio de las probabilidades de ocurrencia de errores indeterminados.

Aún cuando los errores sistemáticos pueden ser detectados, también es posible evaluarlos mediante técnicas estadísticas con las que se establece de manera más acertada la concordancia de los valores estimados con el valor real (García del Valle, 1988).

#### 1.4.2 Exactitud.

La exactitud de un método está definida como la cercanía de un resultado obtenido experimentalmente y su valor real. La evaluación de la exactitud se puede llevar a cabo efectuando inferencias estadísticas con base en el valor real mediante:

- a) Pruebas de Hipótesis: Verifican que los datos experimentales pertenezcan a una distribución de probabilidad especial cuyo parámetro es el valor real. Esta distribución en particular es la de "t de Student" (para muestras pequeñas) y que está definida por la expresión:

$$t = (\bar{x} - \mu) / (S / \sqrt{n})$$

donde .  $\bar{x}$  = media de las determinaciones

$\mu$  = media teórica (100% poblacional)

S = desviación estándar de las determinaciones

n = número de determinaciones

La exactitud de un método es generalmente establecida usando la cantidad conocida de un ingrediente activo estándar recuperado de la matriz por el método de ensayo propuesto. Dado que la cantidad de analitos añadidos en un estudio de recuperación son cantidades conocidas, generalmente se asume que están ajustados. De cualquier manera, la cantidad recuperada por el método es un variable aleatoria. Si  $x_i$  es la cantidad de analito añadida a la muestra y  $y_i$  es la cantidad recuperada correspondiente, entonces, el porcentaje de recuperación  $Z_i$ , el error absoluto  $EA$  y el porcentaje de error  $PE$  para la muestra  $i$  están definidos por

$$Z_i = 100 (y_i/x_i) \%$$

$$EA_i = y_i - x_i$$

$$PE_i = 100 (EA_i/x_i) \% \text{ o bien } PE_i = Z_i - 100$$

Si se obtienen los promedios correspondientes de cada porcentaje y la varianza muestral  $s^2$  de cada uno, entonces se puede estimar la exactitud por medio de los intervalos de confianza de  $(1 - \alpha) * 100\%$  (donde  $\alpha$  generalmente es 0.05, es decir el 95% de la distribución normal).

$$LS_z (LI_z) = \bar{Z} \pm s_z t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% recuperación}$$

$$LS_{ea} (LI_{ea}) = \bar{ea} \pm s_{ea} t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para error absoluto}$$

$$LS_{pe} (LI_{pe}) = \bar{pe} \pm s_{pe} t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% error}$$

donde LS y LI definen a los límites superior e inferior del intervalo respectivamente .

Si el intervalo de confianza para el porcentaje de recuperación ( $L_{S_2}$   $L_{I_2}$ ) contiene al 100, el método de ensayo se considera validado en términos de su exactitud. En otras palabras, relativamente no presenta desviación o tendencia, o bien esta determinada por el intervalo. Por otra parte, si el intervalo para el porcentaje de error no incluye al cero, el método de ensayo no se está validado en términos de su exactitud.

Se establece un contraste de hipótesis:

$$H_0 : \bar{x} = \mu \quad \text{Hipótesis nula .}$$

$$H_1 : \bar{x} \neq \mu \quad \text{Hipótesis alternativa.}$$

Con lo que se determina si el método es exacto para una región de aceptación del 95% con una significancia del 0.05 ( $1-\alpha$ ).

#### 1.4.3 Precisión.

La precisión proporciona información acerca de errores sistemáticos o tendencias en el método. Se refiere a la dispersión que existe entre las mediciones alrededor de su valor medio o central, es decir, una medida de la concordancia de los valores experimentales alrededor de un valor central.

La precisión evalúa dos aspectos principales: la repetibilidad y la reproducibilidad del método.

##### a) Repetibilidad

Similar al establecimiento de la exactitud, también se puede emplear el porcentaje de recuperación  $Z_1$  para cuantificar la precisión del método. Se considera  $s_2^2$  como la varianza muestral en el porcentaje de recuperación, entonces

$$s_z^2 = SS(Z)/n-1$$

donde

$$SS(Z) = \sum_{i=1}^n (z_i - \bar{Z})^2$$

Y la desviación estándar y el coeficiente de variación están dados por:

$$s_z = \sqrt{s_z^2}$$

$$CV_z = 100 (s_z / \bar{Z})$$

El intervalo de confianza  $(1-\alpha) \times 100\%$  para la varianza poblacional desconocida  $\sigma_z^2$  está dado por:

$$(LI_{\sigma_z}, LS_{\sigma_z})$$

donde

$$LI = SS(Z) / \chi_U^2$$

$$LS = SS(Z) / \chi_L^2$$

$$\chi_U^2 = \chi^2(1/2 \alpha, n-1)$$

$$\chi_L^2 = \chi^2(1- 1/2 \alpha, n-1)$$

donde  $\chi^2(1/2 \alpha, n-1)$  y  $\chi^2(1- 1/2 \alpha, n-1)$  son los cuantiles de una distribución central chi cuadrada con n-1 grados de libertad

En la práctica es deseable limitar la variabilidad del método dentro de una cantidad específica aceptable. Si la variabilidad del ensayo está dentro de la cantidad aceptable, se considera que el método está validado. En otras palabras, con cierta seguridad, el método ensayado tiene la precisión buscada. Con base en este concepto, se puede evaluar la precisión de un método ensayado estableciendo las siguientes hipótesis:

$$H_0: \sigma_z^2 \geq \sigma_0^2$$

$$H_1: \sigma_z^2 < \sigma_0^2$$

y la hipótesis nula puede ser rechazada si en el nivel  $\alpha$  de significancia:

$$Q = SS(Z) / \sigma_0^2 < \chi^2(1-\alpha, n-1)$$

Cabe mencionar que el estadístico Q es la prueba sin tendencia más potente para hipótesis.

#### b) Reproducibilidad:

Es la concordancia entre valores sucesivos y un valor central pero determinado bajo diferentes condiciones de trabajo (extracciones, días, equipos, analistas, etc.). Una manera de evaluarla es mediante la determinación del cuadrado medio del error de varianza. Para la determinación de este parámetro estadístico se utiliza un diseño experimental denominado análisis de varianza en el que se analizan las interacciones posibles en el método desarrollado. Existe una modalidad del análisis de varianza más simplificado que únicamente involucra las interacciones extracción, día y extracción – día de donde se puede estimar el cuadrado medio del error de varianza como un estimador de la reproducibilidad. El análisis de varianza sigue el siguiente modelo.

$$y_{ijk} = \mu + EX_i + D_j + EXD_{ij} + E_{(ij)k}$$

Donde:

$y_{ijk}$  = porcentaje cuantificado con la i-ésima extracción dado el j-ésimo día de la k-ésima repetición.

$EX_i$  = efecto de la extracción i en el porcentaje cuantificado

$D_j$  = efecto del j-ésimo día en el porcentaje cuantificado

$EXD_{ij}$  = interacción extracción – día

$E_{(ij)k}$  = error experimental

$\mu$  = parámetro que representa el valor real del porcentaje de recuperación donde no hay efecto por extracción o día

El cuadro de análisis de varianza que representa este modelo es:

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	$F_{cal}$
$EX_i$	$j-1$	$\frac{y_{i..}^2}{bc} - \frac{y^2}{abc}$	$SC_{EX} / a-1$	$\frac{CM_{EX}}{CM_{EXD}}$
$D_j$	$j-1$	$\frac{y_{.j}^2}{bc} - \frac{y^2}{abc}$	$SC_D / b-1$	$\frac{CM_D}{CM_{AD}}$
$EXD_{ij}$	$ij - i - j + 1$	$\frac{y_{ij}^2 + y_{i.}^2 + y_{.j}^2 - y^2}{C \quad abc}$	$SC_{EXD} / (a-1)(b-1)$	$\frac{CM_{EXD}}{CM_E}$

#### 1 4.4 Linealidad.

1.4.4 1 La linealidad es la relación existente entre una variable independiente y una dependiente dentro de un intervalo considerado. También representa una medida de la exactitud del método, en el caso de los métodos espectroscópicos de detección la señal obtenida es directamente proporcional a la cantidad de muestra. Esta relación queda establecida por la ecuación de la recta



$$y = mx + b$$

donde.       $y$  = variable independiente (señal o respuesta)  
                $x$  = variable independiente (cantidad detectada)  
                $b$  = ordenada al origen  
                $m$  = pendiente

La ecuación de esta recta puede servir para fines de predicción de la variable dependiente cuando se conocen o suponen los valores de la variable dependiente.

La linealidad se evalúa mediante una regresión lineal utilizando el análisis de mínimos cuadrados, el análisis de residuos y el coeficiente de determinación. La recta obtenida será la que mejor se ajuste a el conjunto de valores obtenidos experimentalmente siendo la ecuación de esta recta.

$$y = \beta_1 x + \beta_0 + E$$

donde:       $y$       = cantidad recuperada  
                $x$       = cantidad adicionada  
                $\beta_0$      = ordenada al origen poblacional = 0  
                $\beta_1$      = pendiente poblacional = 1  
                $E$       = error asociado a la correlación

Desarrollando el modelo queda:

$$\bar{y} = \beta_1 (x - \bar{x}) + \beta'_0 + E$$

donde:       $\bar{x}$       =  $(1/n) \sum_{j=1}^n x_j$   
                $\beta'_0$      =  $\beta_0 + \beta_1 \bar{x}$

Los estimadores para ajustar el modelo son:

$$S_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$$

$$\hat{\beta}'_0 = \bar{y}$$

$$\hat{\beta}_1 = S_{xy} / S_{xx}$$

y se obtiene el modelo ajustado:

$$\hat{y} = \hat{\beta}'_0 + \hat{\beta}_1(\bar{x} - x)$$

Del modelo anterior se deduce el modelo para el análisis de errores (residuos):

$$\hat{y} = \hat{\beta}'_0 + \hat{\beta}_1 x$$

Se obtienen los valores de  $\hat{y}$  y ajustados y el error ( $e_j$ ) y las sumas de cuadrados de la regresión:

$$SS_e = \sum e_j^2$$

$$SS_R = \hat{\beta}_1 S_{xy}$$

$$S_{yy} = SS_R + SS_e$$

Donde:  $SS_E$  = suma de cuadrados de error  
 $SS_R$  = Suma de cuadrados de la regresión

a) Se plantean las pruebas de hipótesis para la regresión:

$$H_0 \quad \beta_1 = \beta_{1,0}$$

$$H_1 \quad \beta_1 \neq \beta_{1,0}$$

Contra el estadístico de prueba

$$t_0 = \frac{\beta_1 - \beta_{1,0}}{\sqrt{MS_E / S_{xx}}}$$

Si  $|t_0| > t_{\alpha/2, n-2}$  entonces se rechaza  $H_0$  y se establece que existe una relación lineal entre  $x$  y  $y$ .

b) Se plantean las pruebas de hipótesis para la ordenada al origen:

$$H_0 : \beta_1 = \beta_{0,0}$$

$$H_1 : \beta_1 \neq \beta_{0,0}$$

Contra el estadístico de prueba

$$t_0 = \frac{\beta_1 - \beta_{1,0}}{\sqrt{MS_E (1/n + x^2 / S_{xy})}}$$

Si  $|t_0| > t_{\alpha/2, n-2}$  entonces se rechaza la hipótesis nula.

#### 1.4.4.2 Significación de la regresión.

Este resulta ser un caso especial de las hipótesis planteadas para la pendiente:

$$H_0 : \beta_1 = 0$$

$$H_1 : \beta_1 \neq 0$$

Esta hipótesis se relaciona con la significación de la regresión. No rechazar  $H_0$  :  $\beta_1 = 0$  equivale a concluir que no existe una relación lineal entre  $x$  y  $y$ . En otras palabras, el mejor estimador de  $y$ , para cualquier valor de  $x$ , es  $\hat{y} = \bar{y}$ .

El procedimiento para probar la hipótesis nula es el análisis de varianza para probar la significación de la regresión:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_0$
Regresión	$SS_R = \beta_1 S_{xy}$	1	$MS_R$	$\frac{MS_R}{MS_E}$
Error o residual	$SS_E = S_{yy} - \beta_1 S_{xy}$	$n-2$	$MS_E$	
Total	$S_{yy}$	$n-1$		

Se rechaza  $H_0$  si  $F_0 > F_{\alpha, 1, n-2}$  y se concluye que la regresión es altamente significativa.

#### 1.4.4.3 Prueba de falta de ajuste.

Esta prueba se realiza con la finalidad de determinar si el modelo supuesto es correcto para el análisis de los datos.

Se plantean las siguiente hipótesis:

$H_0$  . El modelo se ajusta adecuadamente a los datos

$H_1$  . El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos

En esta prueba se consideran el número de repeticiones y los niveles de cada serie y se realiza el análisis de varianza correspondiente:

Fuente de variación	Cuadrados medios	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_0$
Error puro	$SS_{EP} = \sum \sum (y_{iu} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MS_{EP} / MS_{FA}$	$\frac{MS_{FA}}{MS_{EP}}$
Falta de ajuste	$SS_{FA} = SS_E - SS_{EP}$	$m - 2$		

$m$  = número de datos por serie

$n$  = número de repeticiones

Si  $F_0 < F_{\alpha, n-m, m-2}$  se acepta  $H_0$ , es decir, que el modelo se ajusta adecuadamente a los datos.

#### 1.4.5 Coeficiente de determinación:

Es un estimador del porcentaje de variabilidad de los datos que es explicada mediante el modelo y se calcula:

$$R^2 = SS_R / S_{yy}$$

Esta relación puede establecerse siempre y cuando la variable  $x$  sea aleatoria, de manera que  $x$  y  $y$  puedan considerarse variables aleatorias conjuntamente distribuidas, entonces  $R$  constituye la correlación simple entre ellas. Sin embargo, el concepto de correlación no está definido si  $x$  no es una variable aleatoria.

## II METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El desarrollo del experimento se realizó en función de los objetivos planteados, con el propósito de establecer las condiciones óptimas de extracción, purificación y cuantificación de las vitaminas, considerando las características fisicoquímicas de éstas y de la muestra seleccionada.

La metodología experimental se divide en 5 etapas

1. Condiciones cromatográficas
2. Calibración del equipo.
- 3 Extracción y purificación de las vitaminas.
4. Cuantificación de las vitaminas.
5. Comparación de resultados para ácido fólico (Referencia AOAC)

### **1. Condiciones cromatográficas.**

La separación cromatográfica se realizó en un equipo Beckman Gold System, con un módulo programable de solventes Modelo 126 y un módulo detector programable Modelo 126 operando en la región de UV a 254 nm. La separación se logró en una columna C<sub>18</sub> marca Waters (250 x 4.6 mm D.I.) , empacada con Spherisorb ODS con partículas de 5µm de diámetro. La fase móvil o eluyente utilizado fue buffer de fosfatos (0.1N) – metanol (85:15, v/v), con hexanosulfonato de sodio 5mM a un flujo de 1.0 ml/min. El volumen de muestra inyectado fue de 50 µl y todas las determinaciones de muestras se realizaron a temperatura ambiente

Al final de cada serie de determinaciones, la columna se lavó con un gradiente de agua-metanol desde 100:0 hasta 50:50 para remover los residuos solubles y se almacenó en esta misma mezcla.

## 2. Calibración del equipo.

La calibración del equipo se realizó mediante una curva estándar de las cuatro vitaminas, inyectada por triplicado, considerando las concentraciones de cada una de acuerdo a las esperadas en los extractos de las muestras.

La solución stock que contenía la tiamina, la riboflavina y la nicotinamida se preparó pesando los reactivos (mononitrato de tiamina, riboflavina, nicotinamida y ácido fólico grado R.A. Marca Roche) en balanza electrónica (marca Mettler-Toledo Mod. AG245) y disolviéndolos en agua destilada. En el caso del ácido fólico, la solución stock se realizó por separado, considerando los niveles en que se encuentra en la muestra. De esta solución, se tomaron 10 mililitros y se añadieron al estándar de las otras tres vitaminas. Esta solución (conteniendo las cuatro vitaminas) se llevó a 100 mililitros en un matraz aforado para tener concentraciones de acuerdo a la siguiente tabla:

*Tabla 2.1. Concentraciones de las soluciones stock de los estándares.*

Compuesto	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )
Mononitrato de tiamina	7.8
Riboflavina	4.5
Nicotinamida	5.8
Ácido fólico	0.92

De la solución anterior se tomaron diferentes alícuotas para preparar las soluciones de la curva de calibración.

### 2.1 Curva de calibración.

Se tomaron alícuotas de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 ml de solución stock y se llevaron a 5 ml con agua para preparar las soluciones de trabajo y así obtener las siguientes concentraciones de cada vitamina:

Tabla 2.2 Concentraciones de la vitaminas en la curva estándar.

Solución stock (ml)	Agua (ml)	Concentración tiamina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración riboflavina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración niacina ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración ácido fólico ( $\mu\text{g/ml}$ )
0	5	0	0	0	0
1	4	1.54	1.16	1.76	0.18
2	3	3.08	2.32	3.52	0.37
3	2	4.62	3.48	5.28	0.55
4	1	6.16	4.64	7.04	0.72
5	0	7.7	5.8	8.8	0.91

Todas las soluciones se prepararon bajo luz tenue, como lo especifica la AOAC y fueron analizadas el mismo día de su preparación.

### 3. Extracción y purificación .

#### 3.1 Muestra.

Se preparó pesando 10 g de harina de maíz fortificada y dispersando en 40 ml de agua a pH 5 y 45°C.

##### 3.1.1 Muestra con estándares.

El estudio de recuperación se realizó añadiendo 5 ml de solución estándar preparada el mismo día a muestras seleccionadas aleatoriamente, variando las concentraciones de vitaminas para obtener un intervalo de 50-200% según la cantidad esperada en las muestras.

##### 3.1.2 Extracción y purificación de las vitaminas.

Se decidió realizar la extracción de las vitaminas por dispersión de la harina de maíz en agua a 45°C y pH 5 y agitación a 8000 rpm por 10 minutos. La selección de esta técnica se debe principalmente al inconveniente analítico que



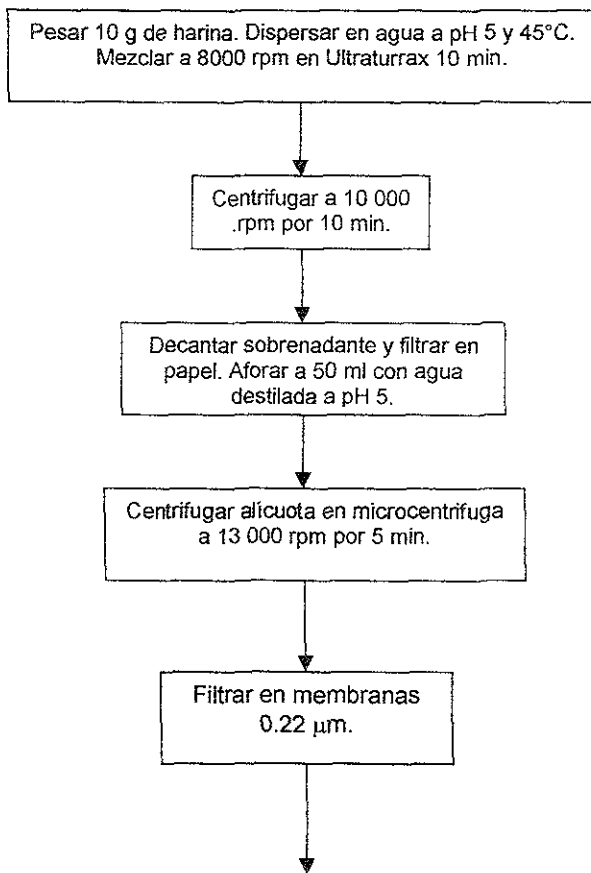
representa el someter a las vitaminas y a la harina a condiciones extremas de temperatura y acidez (degradación de las vitaminas e hidrólisis de los componentes mayoritarios de la harina), además de que permite una mínima manipulación de la muestra simplificando la purificación de los extractos. El equipo empleado en la extracción fue un homogeneizador marca IEC Modelo 8049 a velocidad baja. Se lavó el homogeneizador con agua destilada a pH 5 y el lavado se mezcló con el extracto. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10,000 rpm en centrifuga marca IEC Modelo HT durante 10 minutos seguida de filtración en papel Whatman # 1. Una vez filtradas la muestras se llevaron a 50 ml con agua destilada a pH 5. Fue necesaria una segunda centrifugación en microcentrifuga marca IEC Modelo Centra-M en tubos eppendorf para obtener el extracto lo más claro posible. Las muestras y las muestras con estándares fueron filtradas a través de membranas de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los extractos obtenidos presentaron mínima turbidez, siendo prácticamente incoloros. Este procedimiento se esquematiza en la fig.2.1.

Todos los extractos obtenidos se almacenaron en frascos de vidrio de color ámbar para evitar posibles pérdidas y fueron analizados el mismo día de su preparación.

#### **4. Cuantificación de las vitaminas.**

##### **4.1 Cuantificación.**

Para la cuantificación de vitaminas se seleccionaron 3 lotes distintos de harina de maíz fortificada de la misma marca comercial adquiridos en diferentes tiendas de autoservicio. Cada lote fue homogeneizado a modo de que las muestras analizadas fueran representativas.



**Extracto claro.**  
(almacenar en frascos ámbar en refrigeración)

*Figura 2.1. Diagrama del procedimiento de extracción y clarificación*

Cada extracto de muestra y cada extracto con estándar se inyectó por triplicado en el cromatógrafo. La cuantificación se realizó obteniendo el promedio de las áreas obtenidas para cada vitamina en cada muestra e interpolando estos valores en la curva estándar correspondiente. Una vez obtenida la concentración en el extracto, se hicieron los ajustes necesarios debido a las diluciones para la expresión de las vitaminas en mg / kg harina.

#### 4.2 Recuperación de estándares.

El estudio de recuperación se realizó añadiendo diferentes concentraciones (50-200% del valor reportado en etiqueta) de tiamina, riboflavina, nicotinamida y ácido fólico a algunos extractos de muestra. El porcentaje de recuperación se calculó por diferencia de la cantidad encontrada en las muestras.

### **5. Comparación de resultados para la determinación de ácido fólico por el método oficial microbiológico.**

Con el propósito de efectuar una comparación de los resultados producidos por el método simultáneo por HPLC con los del método oficial microbiológico AOAC 944.14 (Anexo 1 y fig. 2.2) para ácido fólico, se realizó de manera paralela la cuantificación de éste y se efectuó el análisis de varianza de las medias para establecer si existen diferencias significativas entre ambos métodos. Este análisis es útil para validar el método desarrollado por comparación con el método estándar de referencia en términos de la confiabilidad estadística de los datos.

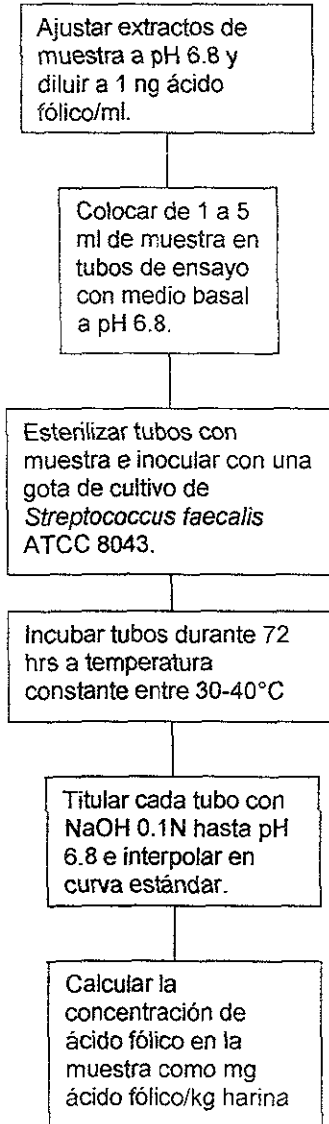


Fig. 2.2. Diagrama de cuantificación de ácido fólico por el método microbiológico AOAC Ref. 944.14.

### III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 1. Condiciones cromatográficas.

Son varios los factores que afectaron la separación de las vitaminas, ya que son compuestos que por sus propiedades fisicoquímicas, se comportan de manera distinta en la columna y en el sistema "par iónico".

##### a) pH .

El pH de la fase móvil resultó ser un factor determinante en la separación de las vitaminas. Todas las vitaminas poseen grupos ionizables, y son estos quienes le proporcionan características ácido-básicas.

En el desarrollo del patrón de elución, se ensayó el intervalo de pH 2.8–4. Cabe mencionar que desde pH 2.8 hasta 3.3, la elución es muy rápida (menos de 6 minutos para las 4 vitaminas), pero se presenta la coelución del ácido fólico y la riboflavina (fig. 3.1). De manera adicional, la niacina eluye junto con el resto del extracto, es decir que se encuentra inmersa entre los compuestos que son menos retenidos y por lo tanto se dificulta la integración del pico por las diferentes señales que inciden en esta región.

La mejor resolución se presentó en pH 3.5, como se observa en la fig 3.2. El efecto más significativo es la separación de el ácido fólico y la riboflavina. incrementándose el tiempo de retención de ésta última. Lo anterior puede atribuirse a un par iónico más efectivo que a valores menores de pH, ya que la ionización del hexanosulfonato también resulta relevante

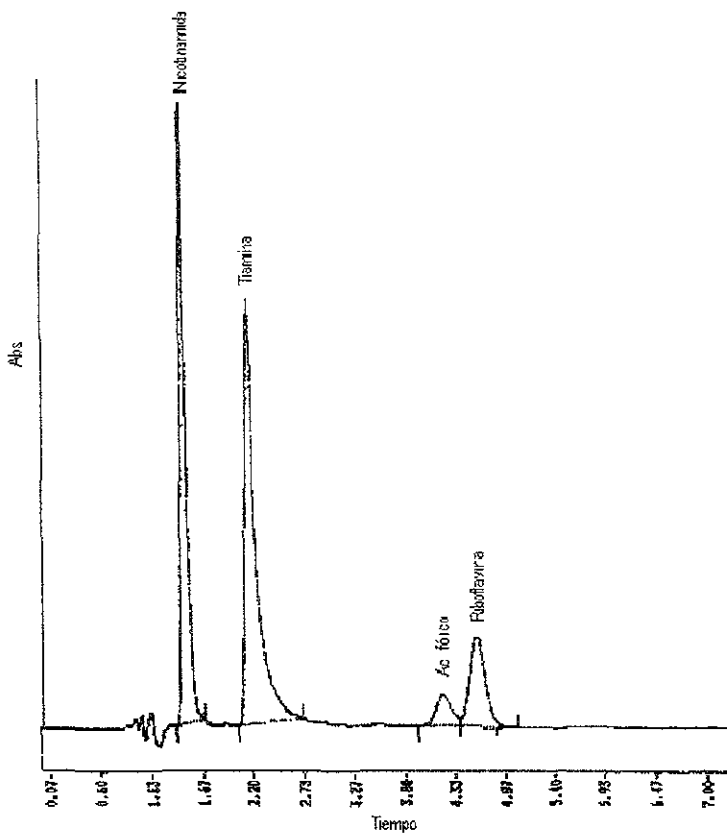


Fig. 3.1 Elución de niacina, tiamina, ácido fólico y riboflavina en columna  $C_{18}$  a pH 3.

b) Modificador orgánico y aditivos

Se realizaron pruebas variando la concentración de metanol desde 10 hasta 20% encontrándose el mejor patrón de elución al 15%. No se observaron variaciones significativas en cuanto a la resolución de los

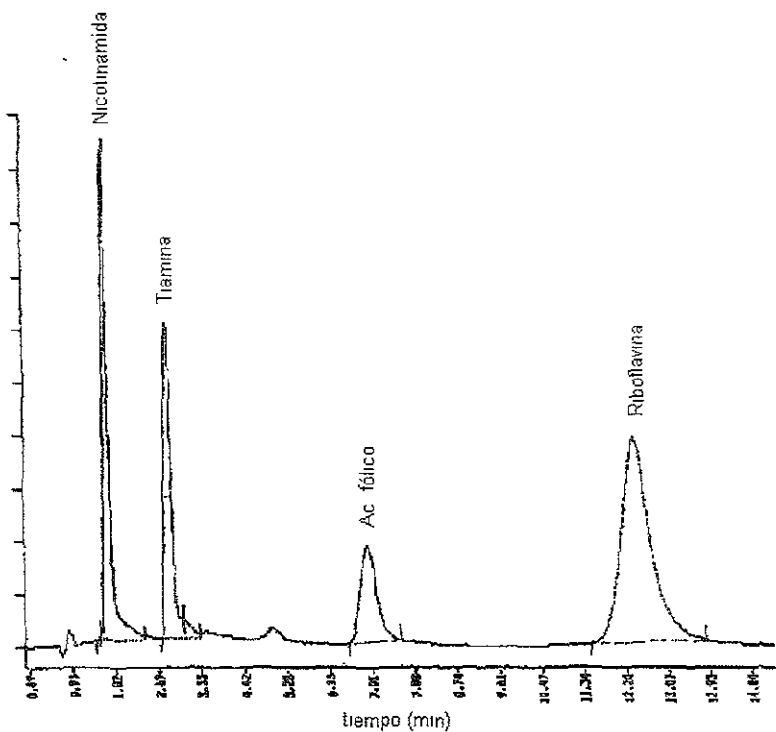


Fig 3.2. Elución de niacina, tiamina, ácido fólico y riboflavina en columna  $C_{18}$  a pH 3.5.

picos aunque sí en los tiempos de retención, resultando menores en la mayor concentración (20%), aunque los picos correspondientes a niacina y timina presentan menor resolución. Con una concentración del 15%, el resultado resultó ser óptimo, sin embargo los picos

correspondientes a las vitaminas más fuertemente retenidas aparecen ligeramente achatados. Esto pudo ser corregido mediante la adición de 1% de ácido acético y 0.1% de hidróxido de amonio, los cuales funcionan como aditivos de la fase móvil, proporcionando picos mejor definidos, además de amortiguar el pH de los estándares y las muestras inyectadas.

Las condiciones para la detección simultánea de las cuatro vitaminas fueron las siguientes

a) Longitud de onda.

La longitud de onda se seleccionó mediante un barrido desde 240 hasta 280 nm. Aunque las cuatro vitaminas ensayadas absorben dentro de este rango y poseen diferentes máximos de absorción, se encontró que a 254 nm la respuesta de las vitaminas resultó buena, con picos bien definidos y relativamente menores interferencias por otros componentes de la matriz. Este resultado coincide con lo reportado por Ôties y Hisil en 1993.

b) Flujo de la fase móvil.

Se realizaron pruebas con diferentes flujos de fase móvil y se observó que al aumentar el flujo las vitaminas eluyen más rápidamente, sin embargo, la resolución es menor y se acorta en gran medida la vida útil de la columna, pues aumenta mucho la presión y las separaciones cada vez resultan menos efectivas. Por el contrario, reduciéndolo, la separación es mejor y no hay tanto daño a la columna, pero se extiende el tiempo de análisis y los picos pueden ensancharse dificultando un poco la integración de los mismos. De las pruebas efectuadas se



estableció que el flujo de 1ml/min proporcionó buenos resultados en cuanto a la forma de los picos y al tiempo de retención de las vitaminas.

## **2. Calibración del equipo.**

Los resultados de la curva estándar se muestran en las gráficas correspondientes de cada vitamina (Fig.3.3 Tiamina, fig.3.4 riboflavina, fig. 3 5 niacina y fig. 3.6 ácido fólico).

Dado que la concentración de cada vitamina en la harina es distinta, éstas concentraciones (reportadas en etiqueta) se consideraron para la elaboración de la curva, a modo de que los resultados del análisis de las muestras estuvieran dentro del rango establecido para cada vitamina.

Cada punto de las curvas fue determinado por triplicado, obteniendo el promedio de cada grupo de datos y relacionándolo como variable de respuesta para la obtención de la ecuación de la curva.

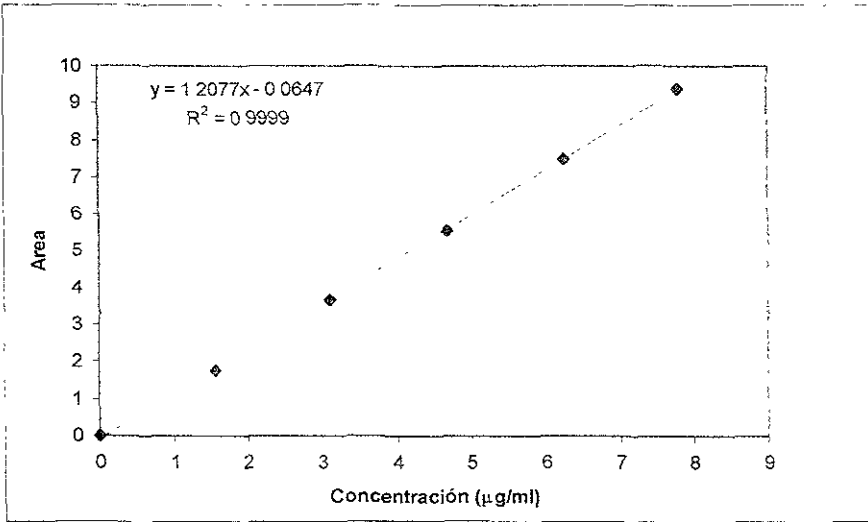


Figura 3.3. Curva de calibración de tiamina en columna Sphensorb ODS por el método simultáneo por HPLC.

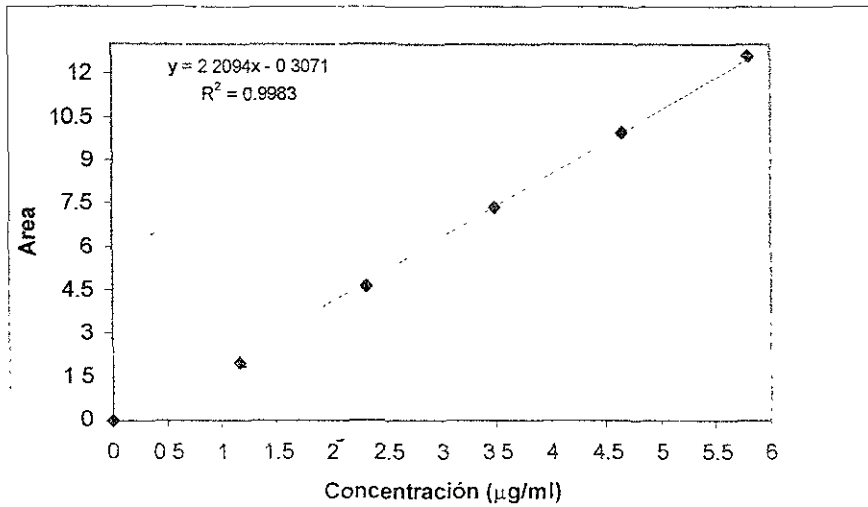


Fig 3.4 Curva de calibración de nboflavina en columna Sphensorb ODS por el método simultáneo por HPLC

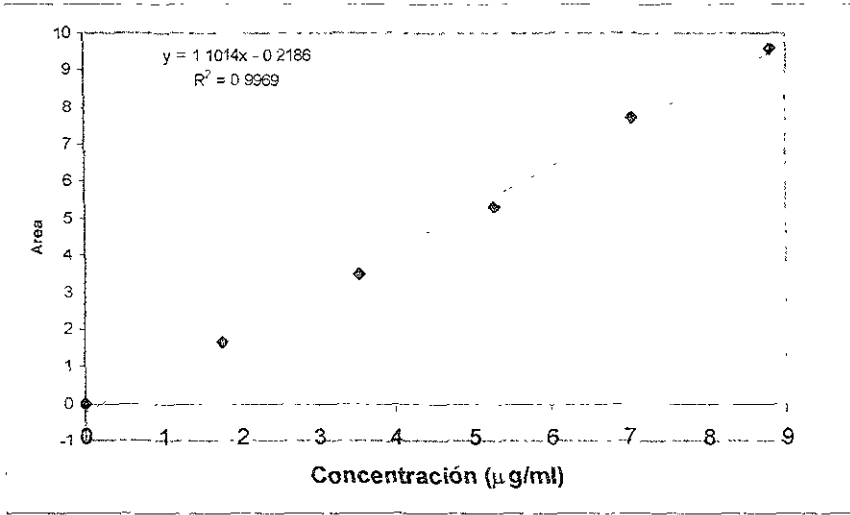


Fig 3.5 Curva de calibración de niacina en columna Spherosorb ODS por el método simultáneo por HPLC.

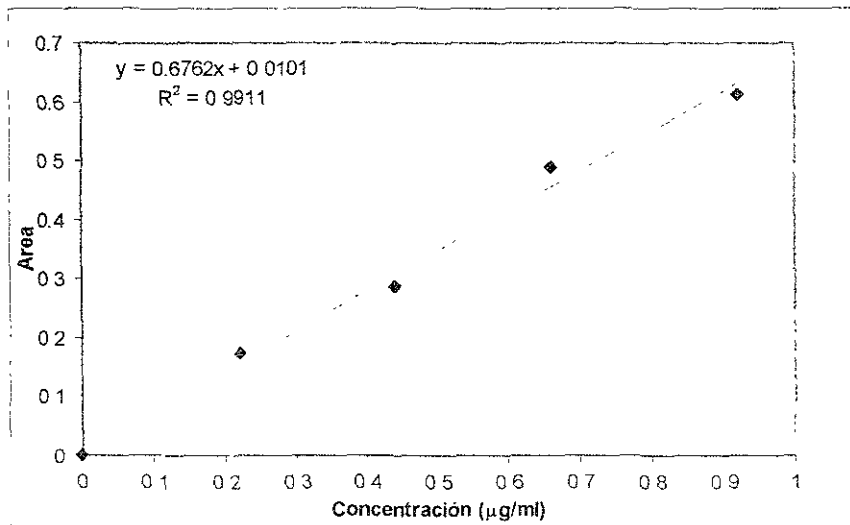


Fig 3.6 Curva de calibración de ácido fólico en columna Spherosorb ODS por el método simultáneo por HPLC

### 3. Extracción y purificación.

Para el análisis de muestras sólidas, el disolvente utilizado debe extraer de manera relativamente selectiva y cuantitativamente los analitos de interés, por lo que éstos deben ser solubles en él y no extraer compuestos que puedan interferir con el análisis.

La tiamina, la riboflavina, la niacina y el ácido fólico en sus formas libres son extraídos por lo general en soluciones acuosas amortiguadas, principalmente por la alta sensibilidad que presentan a condiciones de pH extremas. Puede decirse que todas son estables en el intervalo de 4-6.

Se encontró que en el caso de la tiamina y la niacina, la extracción es relativamente más simple que la de riboflavina y el ácido fólico, principalmente porque son altamente solubles en agua a temperatura ambiente. En cambio las dos últimas vitaminas son poco solubles a temperatura ambiente, por lo que es necesario elevar la temperatura durante la extracción para su solubilización.

Un gran inconveniente en la harina de maíz es que entre 50 y 60°C el almidón que se encuentra presente (70% aproximadamente) comienza a solubilizarse absorbiendo el agua de la suspensión y formando suspensiones viscosas (gelatinización). Esto es un gran obstáculo para la extracción de las vitaminas, ya que por la absorción de agua puede darse el caso de que las vitaminas o al menos una fracción de las mismas queden atrapadas en la red que forman los gránulos de almidón gelatinizado y se dificulte la cuantificación.

Por otra parte, al elevarse la temperatura en la extracción es inevitable que se extraigan además de las vitaminas otra serie de compuestos (proteínas, azúcares simples o polisacáridos diferentes del almidón) que dificulten la purificación y / o la detección de los compuestos de interés, o bien que junto con la acidez del medio ocurra la hidrólisis de el mismo almidón y / o de las

proteínas. Esto podría ocasionar la aparición de una nueva serie de compuestos (mono y disacáridos, péptidos, etc.) que además de alterar las características fisicoquímicas del extracto y por lo tanto complicando la purificación, seguramente dificultarán la detección de las vitaminas, sin mencionar la probable pérdida (degradación) de las mismas.

Por estas características tan particulares tanto de la muestra como de las propias vitaminas, y aprovechando el hecho de que éstas se encuentran en sus formas libres, se estableció un control estricto de la temperatura y del pH de extracción. Con esto se logró que la gelatinización del almidón ocurriera en una proporción mínima y que no se vieran afectadas las concentraciones de los analitos de interés por valores de pH extremos. Por otra parte, como se esperan concentraciones bajas de las vitaminas, el volumen de agua de extracción debería ser suficiente para extraerlos, pero evitando una gran dilución que dificulte la posterior detección y cuantificación. Todas las extracciones se realizaron en 50 ml de agua (volumen final aforado), que fue suficiente para dispersar la muestra y permitir la extracción.

Se encontró que una gran ventaja del método de extracción con homogeneizador es que aunque se realizó a la velocidad más baja, la agitación es tal, que junto con la temperatura se forma un sistema de extracción continua muy efectivo para los compuestos hidrosolubles. Adicionalmente ocurre la subdivisión de las partículas de harina, lo que hace que las vitaminas estén más disponibles para su solubilización y se tengan mejores recuperaciones.

A pesar de que en la literatura se reportan purificaciones en precolumnas o en cartuchos C<sub>18</sub> por el exceso de constituyentes de la matriz (Lavigne, 1987, Yamanaka, 1996), en el método desarrollado, la purificación se realizó únicamente por filtración del extracto. Para esto se consideró como aspecto importante el diámetro aproximado de los gránulos de almidón (25-30  $\mu\text{m}$ ) para que el poro de la membrana empleada fuera menor que éste.

Lo anterior coincide con los métodos propuestos por Albalá-Hurtado en 1997 y Chase y col. en 1992, en los cuales los extractos fueron únicamente centrifugados y filtrados. El resultado fue un extracto prácticamente transparente e incoloro. Además, debido a la concentración de las vitaminas en la muestra y a la proporción en que se encuentran respecto a los demás componentes, el realizar otro paso de purificación o concentración seguramente tendría repercusiones en la cantidad detectada así como en los porcentajes de recuperación, los cuales se muestran en la tabla 1

Estadísticamente, para que la evaluación de una característica dada de una muestra (en este caso la recuperación y la concentración de las vitaminas en la muestra) en un experimento resulte representativa de la población, deben realizarse entre 7 y 30 repeticiones dependiendo de si se conoce o no la dispersión promedio de esa característica en particular. En el caso de la cuantificación de vitaminas hidrosolubles por HPLC no existe una referencia estándar contra la cual se pueda determinar el número de repeticiones, por lo tanto se estableció en 15, que es generalmente el mínimo recomendado para cualquier experimento, ya que proporcionan la información necesaria para el análisis de los datos.

*Tabla 3.1. Porcentajes de recuperación de vitaminas en harina de maíz fortificada.*

<b>Compuesto</b>	<b>Recuperación<sup>a</sup> (%)</b>
Tiamina	96.19 ± 5.54 <sup>b</sup>
Riboflavina	91.26 ± 5.02 <sup>b</sup>
Niacina	95.40 ± 1.71 <sup>b</sup>
Ácido fólico	93.26 ± 2.85 <sup>b</sup>

a= promedio de 15 repeticiones

b= desviación estándar

Como se puede observar, las recuperaciones de las cuatro vitaminas superan el 90 por ciento y los valores más altos corresponden a la tiamina y a la niacina, lo cual puede deberse a su alta solubilidad en soluciones acuosas amortiguadas.

Estos resultados coinciden de manera aceptable con los obtenidos por Albalá-Hurtado y col. (1997). Los porcentajes de recuperación fueron de 98%, 89%, 98% y 79% para niacina, tiamina, riboflavina y ácido fólico respectivamente. Este resultado para el ácido fólico puede explicarse por probables pérdidas por el tratamiento ácido excesivo de la muestra y la sensibilidad que este compuesto presenta ante la acidez, situación que se evitó en este trabajo y que recae directamente en la cuantificación de esta vitamina.

#### **4. Cuantificación de vitaminas.**

La muestra ensayada (harina de maíz fortificada) fue extraída y purificada conforme al método descrito en la metodología. Como se mencionó anteriormente, el extracto obtenido resultó prácticamente incoloro y transparente. Un cromatograma típico del análisis de la muestra se presenta en la fig.3.7.

Se evaluaron tres lotes distintos de una harina comercial de la misma marca, sin embargo los datos reportados pertenecen únicamente al último lote ensayado, ya que las cantidades de cada vitamina variaron de uno a otro de manera considerable, muy probablemente debido a la técnica de homogeneización de la harina con la premezcla de enriquecimiento.

Esta situación de variabilidad entre lotes puede interferir de manera importante en la dispersión que presenten los datos obtenidos, y por lo tanto no ser representativa de la población y proporcionar datos erróneos al realizar el análisis estadístico.

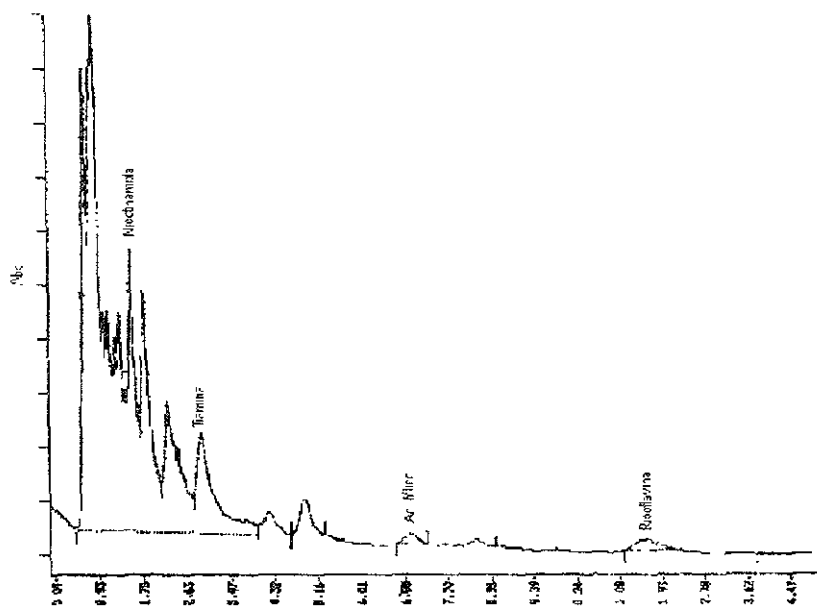


Fig. 3.7 Cromatograma de niacina, tiamina, ácido fólico y riboflavina en extracto de harina de maíz en columna C18.

Las cantidades detectadas de cada vitamina se muestran en la tabla 3.2 con las siguientes de acuerdo a lo reportado en etiqueta.

Tabla 3.2. Comparación de valores ensayados y reportados en etiqueta.

Vitamina	Valor ensayado <sup>a</sup> (mg/kg harina)	Valor en etiqueta (mg/kg harina)
Niacina	26.45 ± 1.4 <sup>b</sup>	28
Tiamina	2.66 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.97
Riboflavina	1.99 ± 0.11 <sup>b</sup>	2
Ácido fólico	1.72 ± 0.076 <sup>b</sup>	0.5
Ácido fólico (AOAC)	1.58 ± 0.153 <sup>b</sup>	0.5

a = promedio de 15 determinaciones

b = desviación estándar



Como se puede observar en la tabla anterior, los resultados obtenidos coinciden únicamente en el caso de la niacina y la riboflavina. La cantidad de niacina muy probablemente corresponda al contenido original liberado durante la nixtamalización, ya que la cantidad promedio de esta vitamina en las diferentes variedades de maíz es precisamente 28 mg/kg (Karmas y Harris, 1975), por lo que podría no ser necesaria su adición en el proceso de fortificación.

Sin embargo, aunque el proceso alcalino de nixtamalización libera a la niacina de su interacción con proteínas, no garantiza su absoluta disponibilidad, puesto que no hay manera de comprobar si aún después del proceso existe un residual asociado a la matriz proteica, o bien si la cantidad total de niacina encontrada corresponde al contenido bruto o sólo una fracción de ésta y el resto es adicionado

En otras palabras, no hay manera de discriminar si la cantidad de niacina cuantificada en la harina pertenece al contenido total de esta vitamina en el maíz o bien este contenido se completa o ajusta mediante la fortificación.

En el caso de la tiamina, la cantidad detectada resultó menor que la reportada en etiqueta y que el límite mínimo permitido para este tipo de productos, lo cual puede deberse a un mezclado deficiente de la harina o bien a una pérdida durante el proceso o durante el almacenamiento.

La estabilidad de las formas iónicas de esta vitamina esta sujeta a factores como la humedad, la temperatura y la cantidad de luz presentes en el medio. Considerando el empaque de la harina (generalmente papel tipo kraft) y la alta higroscopía de la harina, pueden encontrarse probables causas de la pérdida de la tiamina, por ejemplo, la porosidad de este tipo de empaques que aunque no es elevada, ciertamente permite el intercambio de humedad y en cierto grado el paso de luz. La combinación de estos factores puede ocasionar la

eventual desestabilización de la vitamina y por lo tanto la pérdida de su actividad biológica.

En el caso del ácido fólico, la cantidad cuantificada resultó muy superior a la reportada en etiqueta y a la máxima establecida para la harina.

Este exceso al igual que la deficiencia en el caso de la tiamina puede atribuirse a un mal mezclado o bien a una sobredosis adicionada intencionalmente para asegurar la concentración considerando los factores que afectan la estabilidad de la vitamina (sensibilidad a la luz, aire, por ejemplo)

Por otra parte, en 1999, Konings reportó 40  $\mu\text{g}$  de ácido fólico /kg de harina entera. De este dato, se puede deducir otra posibilidad: que el ácido fólico presente en el maíz no se pierda completamente durante la nixtamalización y la cantidad cuantificada sea la suma del remanente y el adicionado en la premezcla.

## **5. Validación estadística.**

5.1 Con la finalidad de evaluar la confiabilidad de la cuantificación de cada vitamina, se evaluó la exactitud, la precisión (como repetibilidad y reproducibilidad), y linealidad para cada una de las vitaminas. Los resultados de cada estimación se presentan en la tabla 3.3.

**Tabla 3.3 Tabla de estimadores estadísticos para la validación del método.**

<b>Estimación</b>	<b>Tiamina</b>	<b>Niacina</b>	<b>Riboflavina</b>	<b>Ácido fólico</b>
%Recuperación	96.19	95.4	91.26	93.26
Desv. Estándar	5.54	1.71	5.02	2.85
Coefficiente de variación	5.76	1.8	5.5	3.05
Error absoluto (95%)	(-1 516,0 684)	(-1 016,0 244)	(-0.321,0 023)	(-0 576, .096)
Linealidad				
$F_{calc}$ ( $F_{tablas}$ )	563.42 (4.67)	3704.3 (4.67)	2812.5 (4.67)	908.61 (4.67)
$R^2$	0.9774	0.9965	0.9956	0.9856
Variancia por día-extracción (95%)	No significativa	No significativa	No significativa	No significativa
Varianza máxima	8.1	6.25	7.4	4.2

**Ver Anexo 2 . Tratamiento estadístico de los datos.**

En la tabla anterior se pueden observar claramente los estimadores estadísticos de los parámetros evaluados en la validación del método (exactitud, linealidad y precisión). De esta tabla se desprende el siguiente análisis:

- a) Aunque la desviación estándar y el coeficiente de variación son buenos estimadores de la dispersión que presentan los datos, es arriesgado establecer el nivel de confiabilidad de los mismos en función de estos dos parámetros, ya que existen muchas variables que los afectan y que no son consideradas, por lo que es necesario establecer ciertos criterios respecto al tratamiento de los datos.
- b) El intervalo establecido de error absoluto es un estimador altamente representativo de la exactitud del método de recuperación, ya que el hecho de que contenga el valor de cero implica que el error en la recuperación puede tomar este valor. Estos resultados más que proporcionar información acerca del grado de dispersión, son útiles para establecer los límites dentro

de los cuales se encuentra el valor real del porcentaje de recuperación de las vitaminas con un 95 % de confiabilidad.

- c) En cuanto a la linealidad de los datos, se encontró que dentro de los intervalos ensayados para cada vitamina la respuesta es lineal (según el estimador F de la distribución normal al 95% de confiabilidad), es decir que existe una correlación altamente significativa de las variables (Cantidad adicionada y cantidad recuperada). De igual manera se estableció con el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que el modelo explica satisfactoriamente la variabilidad de los datos.
- d) Respecto a la precisión del método de recuperación son dos los aspectos que se evalúan: reproducibilidad y repetibilidad.
- **Reproducibilidad:** Se consideraron la extracción y el día en que ésta fue realizada como variables de efectos aleatorios para evaluar la reproducibilidad y se encontró que ninguno de los dos efectos ni la interacción que pudieran tener alteran significativamente la confiabilidad de los datos. Se seleccionaron estas variables para evaluar que tanto pueden afectar las condiciones independientes (medio ambiente, por ejemplo) y las dependientes (manipulación de la muestra y del equipo) dado que pueden ser fuentes de error considerables.
  - **Repetibilidad:** Con este parámetro se establece la máxima variabilidad que permite el método, es decir, al considerar el error absoluto de las determinaciones y la variabilidad máxima en los datos obtenidos bajo esas condiciones, se puede validar el método. En este método se pudo establecer la varianza máxima para cada vitamina, que como se puede observar en la tabla es en todos los casos menor a 10, lo que implica que cualquier serie de datos obtenida por este método no debe rebasar el máximo de varianza

calculado por el estimador  $Q$  de la distribución normal. Por lo tanto queda establecida la precisión del método por debajo de este valor.

## 5.2 Comparación estadística de recuperación por el método simultáneo por HPLC y por el método microbiológico AOAC para ácido fólico.

Con la finalidad de establecer si existe diferencia entre los porcentajes de recuperación y de cuantificación de ácido fólico por el método microbiológico AOAC y el simultáneo por HPLC, se realizaron determinaciones simultáneas de 8 extracciones diferentes por ambos métodos. Los resultados se encuentran en la tabla 3.4

*Tabla 3.4. Porcentajes de recuperación de ácido fólico por el método microbiológico AOAC y el simultáneo por HPLC.*

Extracción	% recuperación	
	Método simultáneo	método AOAC
1	93.33	107.1
2	96.25	105
3	90	91.12
4	94.58	90.8
5	92.5	74.8
6	95.5	75.44
7	94.75	79.21
8	87.75	93.33
Promedio	93.84	89.6
Desviación estándar	2.11	12.47
Varianza ( $s^2$ )	4.46	155.51
n	8	8

Como es evidente en la tabla anterior, los datos obtenidos por el método simultáneo presentan mucho menos dispersión que los obtenidos por el

método microbiológico, aunque esto no es tan notorio en el porcentaje de recuperación.

Para comprobar la diferencia entre los datos, se realizó la estimación de  $t_0$  que es el estadístico de prueba para la comparación de medias y el parámetro para establecer la diferencia entre las mismas.

- Pruebas de hipótesis:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

$$S_p^2 = ((n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2) / n_1 + n_2 - 2$$

$$S_p^2 = ((7)4.46 + (7) 155.51) / 14 = 79.98$$

$$S_p = 8.94$$

$$t_0 = 93.84 - 89.6 / 8.94 \sqrt{1/7 + 1/7}$$

$$t_0 = 251.36$$

El valor  $t_0$  estimado se compara contra  $t_{0.025, 14} = 2.145$

Como  $t_0 > t_{0.025, 14}$  se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe diferencia significativa entre los porcentajes de recuperación y por tanto entre los métodos

Es evidente que el método simultáneo por HPLC presenta claras ventajas respecto al oficial para el caso específico de harinas fortificadas, ya que no solo el porcentaje de recuperación es mejor, sino que además presenta menos dispersión, por tanto aunque los porcentajes de recuperación no difieran

significativamente, si existe evidencia de que el método oficial es menos preciso, exacto y reproducible.

Esta diferencia en relación a los niveles tanto de cuantificación como de recuperación se explica mediante los diversos factores que pueden alterar los resultados.

Por tratarse de una determinación microbiológica, el método oficial está sujeto de alguna manera a las condiciones en las que actuó el microorganismo, como la forma en que se presenta la vitamina y la respuesta que tenga frente a ésta, sustancias estimulantes o depresoras del crecimiento presentes en el alimento y baja especificidad por las formas vitamínicas. Otros factores experimentales importantes son los asociados con el manejo de la muestra, como podría ser el grado de dilución, que para este ensayo debe llegar al orden de ng ácido fólico por mililitro lo que implica una importante fuente de error ya que se debe diluir cerca de 10,000 veces la solución problema.

Por otra parte esta determinación es complicada por el manejo de los microorganismos y consume mucho tiempo (3 días de incubación) respecto al método propuesto en este estudio.

En este sentido, la cuantificación por el método simultáneo por HPLC propuesto presenta ventajas evidentes en el caso de las harinas, como son la rapidez del análisis, la relativa facilidad de preparación de la muestra y la determinación de las demás vitaminas en un mismo análisis. En lo relativo a la precisión, exactitud, sensibilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos presenta grandes ventajas, no sólo para el ácido fólico, sino también para las otras vitaminas presentes en la harina.

## Conclusiones.

- El esquema analítico propuesto ofrece una alternativa analítica que mostró ventajas significativas en relación a los métodos oficiales que pueden resultar poco específicos según la naturaleza de la muestra.
- La extracción en condiciones de baja acidez (pH 5) y temperatura media (45°C) en harina de maíz proporciona porcentajes de recuperación superiores al 90% en el caso de las cuatro vitaminas ensayadas, con una mínima degradación de las mismas en el caso de productos fortificados. Además se minimiza la geleatinización del almidón o la hidrólisis del mismo disminuyendo las interferencias.
- El método es lineal dentro de los límites establecidos para cada vitamina y de manera adicional existe una alta correlación de las variables en el método de recuperación.
- Se estableció que el método es repetible con una precisión o desviación estándar relativa del 6.25%, 8.1%, 4.2% y 7.4% para niacina, tiamina, ácido fólico y riboflavina respectivamente.
- Se encontró que no existen efectos significativos por extracción y día y la interacción posible de ambas variables como estimación de la precisión (reproducibilidad del método) con un 95% de confiabilidad.
- El método propuesto presenta como ventajas la cuantificación simultánea de cuatro vitaminas hidrosolubles, la reducción del tiempo de análisis, especificidad, precisión y exactitud satisfactoria respecto a los métodos tradicionales



- Los resultados obtenidos mediante la metodología propuesta para el ácido fólico presentan mayor precisión, exactitud, sensibilidad y reproducibilidad que los obtenidos mediante el método oficial microbiológico AOAC Ref. 944.14 para las harinas de cereales fortificados.
- Por la baja cantidad en la que están presentes las vitaminas en productos fortificados con premezclas vitamínicas, es de suma importancia la homogeneización de los lotes para la obtención de un producto estandarizado.
- El método desarrollado puede aplicarse a productos fortificados que contengan las vitaminas hidrosolubles ensayadas u otras con características similares.

## Bibliografía.

Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M., Izquierdo-Pulido, M., Mariné-Font, A., (1997). *Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography*, J. Chromatography A., 778: 247-253

American Association of Cereal Chemists (1987) *Corn: Chemistry and technology*. USA

AOAC *Official Methods of Analysis*, (1995), Washington D.C. 16<sup>th</sup> ed , Sección 944.14

Barna, E., Dwoeschák, E., (1994). *Determination of thiamine (vitamina B<sub>1</sub>) and riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) in meat and liver by high performance liquid chromatography*, J. Chromatography A., 668: 359-363

Beecher, G.R., and Vanderslice J.T., (1984) Determination of nutrients in foods: factors that must be considered, en *Modern Methods of Food Analysis*, AVI, Westport, 235-260

CODEX ALIMENTARIUS. *Normas del Códex para cereales, legumbres, leguminosas y productos derivados*, ONU, OMS, 5<sup>a</sup> ed. , 1995

Chase, G. W., Landen, W. O., Eitenmiller, R R., Soliman, A.M., (1992) *Liquid chromatographic determination of thiamine, riboflavine and piridoxine in infant formula*, J. AOAC Int., Vol 75(3): 561-565

De Leenheer, A., Lambert, W. E , Hans, N., (1992) *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, 2<sup>nd</sup>. ed , Marcel Deckker Inc., N.Y

DeVries, J.W., (1993) Water-soluble vitamins, en *Methods of Analysis for Nutritional Labelling* (D.M. Sullivan and D.E. Carpenter, eds.), AOAC International, 131-135

Dong, M. W., Lepore, J., and Tarumoto, T., (1988). *Factors affecting the ion-pair chromatography of water-soluble vitamins*, J. Chromatography, 442:81-95

Eitenmiller, R R., (1990) *Simultaneous determination of water-soluble vitamins in foodstuffs*, J. Food Qual , 13:7

García del Valle, B. G., Tesis (1988) *Desarrollo y validación de un método para la determinación de vitaminas del complejo B en un polifármaco por HPLC*. Facultad de Química, UNAM.

Goli, D M., and Vanderslice, J.T., (1992)

Jacoby, B.T., and Henry, F.T., (1992) *Liquid chromatographic determination of folic acid in infant formula and adult medical nutritionals*, J. AOAC Int., Vol.75(5): 891-898

Kawasaki, T. Vitamin B1: thiamine, en *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, 2<sup>nd</sup>. Edition, (A.P. De Leenheer, Lambert, W.E., and Nelis, H.J.), Marcel Decker, N.Y., 319-354

Karmas, E., and Harris, R.S., (1975) *Nutritional Evaluation of Food Processing*, 2nd ed., The AVI Publishing Company, Inc , Connecticut, USA, 612-621

Konings, E. J.M., (1999) *A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour*, J. AOAC Int., Vol. 82(1): 119-127

Machorro, V.L., Tesis (1982) *Identificación y cuantificación de aflatoxinas en maíz durante el proceso de nixtamalización*. Facultad de Química, UNAM

Montgomery, D.C , (1991) *Diseño y Análisis de Experimentos*, Grupo Editorial Iberoamérica, 45-77, 429-445

Montgomery, D.C , Runger, G., (1996) *Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería*, McGraw-Hill, 211-245

Mullin, R.J , and Duth, D S , (1992) *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, 2<sup>nd</sup> ed, Marcel Dekker, N Y., 261-283

Nielsen, P. , (1992) Flavins, in *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins*, 2<sup>nd</sup> ed, Marcel Dekker, N.Y., 355-398

Norma Oficial Mexicana. NOM-131-SSA1-1995. *Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales*.

Ötles, S. And Hisil, Y., *Italian Journal of Food Science.*, 5:63 1993

Pomeranz, Y., and Meloan, C.(1994) *Food Analysis, Theory and Practice*, 3rd. ed., Chapman-Hall, USA, 324-342

Russell, L.F , (1996), Water-soluble vitamins in *Food Analysis by HPLC*, Marcel Deckker, N.Y., 701-713

Russell, L F , Vanderslice, J T. (1992), *Fluorometric detection of riboflavin in foodstuffs*, Food Chemistry, Vol 43, pp. 151

Sullivan D M , and Carpenter, D E. (1993) *Methods od Analysis for Nutritional Labelling* AOAC, Int , Arlington, VA

Shein-Chung, C. And Jen-Pei, L., (1995) Validation, Process Control and Stability in *Statistical design and analysis in pharmaceutical science*, Marcel Dekker, Inc. N.Y., USA, 71-97

Shivata, K., and Shimono T. (1994) Nicotinic Acid and Nicotinamide en *Food Analysis by HPLC*, Marcel Dekker, Inc. N Y., 285-311

Wilson, S , and Geoff, W. (1995) *Food and Drink Laboratory Accreditation, A practical aproach*, Chapman & Hall, London, 105-108

## ANEXO 1.

Determinación de ácido fólico. Método microbiológico. AOAC 944.14; Ref. 45.2.03

### Reactivos:

- Medio líquido: Caldo Lactobacilli AOAC, Laboratorios Difco.
- Medio sólido: Agar Lactobacilli AOAC, Laboratorios Difco.
- Medio Basal: Cualquier medio basal comercial.
- Solución de NaOH 0.1 N: Disolver 4 g de NaOH en agua, enfriar y aforar a 1 lit
- Solución estándar de ácido fólico: Preparar stock pesando 50 mg de ácido fólico y disolver en 30 ml de NaOH 0.01 N, añadir agua a 300 ml, ajustar a pH 7-8 con HCl y diluir con agua a 100 µg/ml exacto. Almacenar en oscuridad a 10°C
- Sol. trabajo: Diluir un volumen conveniente de solución stock a una concentración aproximada de 1-4 ng de ácido fólico/ml. Prepara cada ensayo.
- Inóculo: Transferir células de *Streptococcus faecalis* ATCC No. 8043 de cultivo stock a un tubo estéril con 10 ml de medio líquido. Incubar de 6-24 horas a cualquier temperatura entre 30-40 °C. Bajo condiciones asépticas, centrifugar y decantar sobrenadante. Lavar las células con 3 porciones de 10 ml de solución NaCl 0.9% estéril. Resuspender en 10 ml de NaCl 0.9%. Esta suspensión es el inóculo.

Solución de ensayo: Colocar una cantidad conocida de muestra en un vaso y añadir agua igual en ml a 10 veces el peso de la muestra seca en gramos.; la solución resultante debe contener <1.0 mg de ácido fólico/ml. Añadir el equivalente a 2 ml de NH<sub>4</sub>OH (2+3) por cada 100 ml de líquido. Si la muestra no es soluble, dispersar en líquido y agitar vigorosamente, lavando las paredes con NH<sub>4</sub>OH 0.01N. Colocar en autoclave 15 min a 121-123°C, enfriar. Diluir a volumen conocido con agua y filtrar. Tomar alícuota, añadir agua, ajustar a pH 6.8 y diluir con agua a un volumen que contenga por ml, ácido fólico equivalente a la solución estándar.

### Procedimiento:

- Preparar tubos que contengan solución estándar por duplicado: 0.0 (blanco sin inóculo), 0.0 (blanco inoculado), 1, 2, 3, 4 y 5 ml de solución estándar.
- Preparar tubos con solución de ensayo por duplicado: 1, 2, 3 y 4 ml.
- En todos los tubos añadir agua a 5 ml. Añadir 5 ml de medio basal y mezclar.
- Agitar los tubos y esterilizar 10 min. Enfriar rápidamente.
- Agregar cada tubo, excepto un par de duplicados con 0.0 ml de solución estándar, con una gota de inóculo. Incubar 72 horas a cualquier temperatura entre 30 y 40 °C.
- Titular el contenido de cada tubo con NaOH 0.1N, usando azul de bromotímol, hasta pH 6.8 con potenciómetro.
- Comparar los resultados si la respuesta del blanco inoculado es <1.5 ml a la del blanco sin inocular. La respuesta al nivel de 5 ml de solución estándar debe ser equivalente a una titulación de 8-12 ml.

- Curva estándar: Graficar ml de NaOH 0.1N gastados en cada nivel de solución estándar contra la cantidad de estándar de referencia contenida en los respectivos tubos.

- Determinar la cantidad de vitamina para cada nivel de solución de ensayo interpolando en la curva. Descartar cualquier resultado de titulación equivalente a  $<0.5$  ml o  $> 4.5$  ml respectivamente de solución estándar

## ANEXO 2.

### Tratamiento estadístico de los datos.

#### A) Tiamina.

##### A1. Exactitud.

Para la evaluación de la exactitud del método, se hicieron recuperaciones entre el 50% y el 200% aproximadamente de la cantidad de tiamina reportada en etiqueta. Los resultados se muestran en la tabla a1.

*Tabla a1. Porcentaje de recuperación de tiamina*

$\mu\text{g}$ adicionados / 10 g hanna	$\mu\text{g}$ recuperados	% recuperación	Error	% Error absoluto
2.4	2.47	102.92	0.07	2.92
2.4	2.5	104.17	0.1	4.17
2.4	2.21	92.08	-0.19	-7.98
5	4.56	91.2	-0.44	-8.8
5	5.32	106.4	0.32	6.4
5	5.02	100.4	0.02	0.4
5.2	4.74	91.15	-0.46	-8.85
9.1	8.58	94.29	-0.52	-5.71
9.1	9.08	99.78	-0.02	-0.22
11	10.55	95.91	-0.45	-4.09
11	10.11	91.91	-0.89	-8.09
11	10.98	99.82	-0.02	-0.18
13.8	12.55	90.94	-1.25	-9.06
13.8	12.54	90.87	-1.26	-9.13
13.8	12.55	90.94	-1.25	-9.06
Promedio		96.19	-0.416	-3.82
Desviación estándar (s)		5.54	0.512	5.54
N = 15 N-1 = 14				
Estadístico de prueba $t_{0.025, 14} = 2.15$				
Nivel de significancia = $\alpha = 0.05$				



### A1.1 Cálculos.

$$LS_x (Ll_x) = \bar{x} \pm s_x t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% recuperación}$$

$$LS_{ea} (Ll_{ea}) = \bar{ea} \pm s_{ea} t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para error absoluto}$$

$$LS_e (Ll_e) = \bar{e} \pm s_e t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% error}$$

$$LS_x (Ll_x) = 96.19 \pm 11.91 \quad \text{o bien} \quad (LS_x, Ll_x) = (84.28\%, 108.1\%)$$

$$LS_{ea} (Ll_{ea}) = -0.416 \pm 1.1 \quad \text{o bien} \quad (LS_{ea}, Ll_{ea}) = (-1.516, 0.684)$$

$$LS_e (Ll_e) = -3.82 \pm 11.91 \quad \text{o bien} \quad (LS_e, Ll_e) = (-15.73\%, 8.09\%)$$

### A1.2 Conclusión

Si se considera que en el intervalo de confianza al 95% están incluidos el 100% y el 0% para el porcentaje de recuperación y para el porcentaje de error respectivamente, se concluye que el método está validado en términos de su exactitud, ya que la desviación o error de los datos respecto al valor real puede ser nula.

### A2. Linealidad.

Para evaluar la relación entre la variable independiente ( $\mu\text{g}$  adicionados) y la variable dependiente ( $\mu\text{g}$  recuperados) se recurrió al análisis de linealidad, utilizando para ello los valores de la tabla a1.

Modelo ajustado:

$$\hat{y} = 7.58 + 0.8093(x - 8)$$

Y el modelo en términos de la intersección original para evaluar errores:

$$\hat{y} = 1.1096 + 0.8093x$$

En esta ecuación se sustituyen los valores de cada x y con cada valor de y ajustado se obtiene los errores o residuos, la suma de sus cuadrados y la suma de cuadrados de la regresión.

$$SS_e = 3.92$$

$$SS_R = 169.815$$

$$S_{yy} = 173.734$$

Se establecen las pruebas de hipótesis para la pendiente y la ordenada al origen.

Pendiente:

$$H_0: \beta_1 = \beta_{1,0}$$

$$H_1: \beta_1 \neq \beta_{1,0}$$

Con estas hipótesis se realiza la prueba de falta de ajuste y de significación de la regresión.

a) Significación de la regresión.

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Cuadro de análisis de varianza .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_0$	$F_{1,13,0.95}$
Regresión	169.815	1	169.815	563.42	4.67
Error	3.92	13	0.3014		
Total	173.73	14			

Como  $F_o > F_{1,13,0.95}$  se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, la regresión es altamente significativa.

b) Prueba de falta de ajuste

$H_0$ : El modelo se ajusta adecuadamente a los datos

$H_1$ : El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos

Tabla de falta de ajuste.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_o$	$F_{0.05,3,9}$
Error puro	6.53	9	0.725	-1.2	3.86
Falta de ajuste	2.612	3	0.87		
Error total	173.73	12			

Como  $F_o < F_{1,13,0.95}$  se acepta  $H_0$ , por lo tanto, el modelo se ajusta adecuadamente a los datos.

c) Coeficiente de determinación.

$$R^2 = SS_R / S_{yy} = 169.815 / 173.734 = 0.9774$$

El 98% de la variabilidad de los datos es explicada por el modelo..

d) Intervalos de confianza del 95% para la pendiente y la ordenada al origen.

- Pendiente:

$$1.1096 \pm 2.16 \sqrt{0.3014 \left( \frac{1}{15} + \frac{64}{259.26} \right)} =$$

$$= 1.1096 \pm 0.0193$$

- Ordenada al origen

$$0.8093 \pm 2.16\sqrt{0.3014/259.26} =$$

$$= \mathbf{0.8093 \pm 0.03}$$

La elaboración de estos intervalos de confianza tiene un propósito predictivo, ya que si se desea inferir acerca de otros porcentajes de recuperación fuera de los ensayados puede recurrirse a ellos, con la incertidumbre establecida en el modelo

### A3. Precisión

#### A3.1 Reproducibilidad

Con la finalidad de determinar el efecto de la extracción ,el día en que fue realizada y la posible interacción entre estas variables como medida de la reproducibilidad en las determinaciones hechas por el método, se realizó el análisis de varianza correspondiente, haciendo para esto recuperaciones de la cantidad etiquetada en dos días diferentes y con dos extracciones diferentes. Los resultados se presentan en la tabla a2.

*Tabla a2 Datos de recuperación de estándar de tiamina por día y extracción.*

	Extracción 1	Extracción 2
	95.25	97.43
Día 1	94.58	100
	94.54	87.1
	89.32	102.46
Día 2	105.82	92.68
	97.54	87.6

Tabla de análisis de varianza (dos factores aleatorios)

Fuente de Variación	Cuadrados medios	Grados de libertad	Cuadrados medios	F <sub>0</sub>	F <sub>0.95</sub>
Día	3.56	1	3.56	0.177	161.45
Extracción	8	1	8	0.398	161.45
Interacción	20.1	1	20.1	0.483	5.32
Error	332.55	8	41.57		

Región crítica unilateral a nivel de significancia  $\alpha=0.05$ .

$F_{\text{calc}} < F_{1-\alpha}$  ; entonces:

$F_{\text{calcD}} < F_{0.95}$  (día)

$F_{\text{calcE}} < F_{0.95}$  (extracción)

$F_{\text{calcDE}} < F_{0.95}$  (interacción día-extracción)

Conclusión: Siendo menores los estimadores F calculados de distribución normal que los respectivos de tablas, se concluye que no existen efectos por extracción, día o la interacción que éstos tengan, por lo que se deduce que el método es preciso (reproducibile).

### A3.2 Repetibilidad.

Con la finalidad de conocer la concordancia de los valores experimentales alrededor del valor verdadero se hizo la evaluación de la repetibilidad utilizando para ello los valores del porcentaje de recuperación x

$$H_0: \sigma_x^2 \geq \sigma_0^2$$

$$H_1: \sigma_x^2 < \sigma_0^2$$

$$s = 5.54$$

$$\chi^2_{0.975,14} = 5.63$$

$$s_x^2 = 30.69$$

$$\chi^2_{0.025,14} = 26.12$$

$$SS_x = 429.6$$

$$\chi^2_{0.95,14} = 6.57$$

intervalo de confianza para  $\sigma^2$  al 95%:

$$LS = 429.6/26.12 = 16.44$$

$$LI = 429.6/6.57 = 65.3$$

Asumiendo que el coeficiente variación es menor a 8.1 :

$$Q = SS_x/\sigma_0^2 = 429.6 / 65.61 = 6.55$$

Como  $Q < \chi^2_{0.95,14}$  se rechaza la hipótesis nula al nivel de 5% de significancia y se concluye que el método está validado en términos de su precisión.

## B) Niacina.

### B.1 Exactitud.

Para la evaluación de la exactitud del método, se hicieron recuperaciones entre el 50% y el 200% aproximadamente de la cantidad de niacina reportada en etiqueta. Los resultados se muestran en la tabla b1.

Tabla b1. Porcentaje de recuperación de niacina.

$\mu\text{g}$ adicionados /10 g harina	$\mu\text{g}$ recuperados	% recuperación	Error	% Error absoluto
5	4.75	95	-0.25	-5
5	4.79	95.8	-0.21	-4.2
5	4.88	97.6	-0.12	-2.4
5.2	5.02	96.54	-0.18	-3.46
5.4	5.2	96.3	-0.2	-3.7
7.1	6.58	92.68	-0.52	-7.32
7.1	6.76	95.21	-0.34	-4.79
8.2	7.86	95.85	-0.34	-4.15
8.2	7.98	97.32	-0.22	-2.68
10.5	9.84	93.71	-0.66	-6.29
10.5	10.24	97.52	-0.24	-2.48
10.5	10.11	96.29	-0.39	-3.71
11	10.4	94.55	-0.6	-5.45
11	10.28	93.45	-0.72	-6.55
11	10.2	92.73	-0.8	-7.27

Promedio

95.4

-0.386

-4.60

Desviación estándar (s)

1.69

0.212

1.69

N = 15, N-1 = 14

Estadístico de prueba  $t_{0.005, 14} = 2.977$

Nivel de significancia =  $\alpha = 0.01$

### B1.1 Cálculos.

$$LS_x (LI_x) = \bar{x} \pm s_x t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% recuperación}$$

$$LS_{ea} (LI_{ea}) = \bar{ea} \pm s_{ea} t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para error absoluto}$$

$$LS_e (LI_e) = \bar{e} \pm s_e t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% error}$$

$$LS_x (LI_x) = 95.4 \pm 5.03 \quad \text{o bien} \quad (LS_x, LI_x) = (90.37\%, 100.43\%)$$

$$LS_{ea} (LI_{ea}) = -0.386 \pm 0.63 \quad \text{o bien} \quad (LS_{ea}, LI_{ea}) = (-1.016, 0.244)$$

$$LS_e (LI_e) = -4.6 \pm 5.03 \quad \text{o bien} \quad (LS_e, LI_e) = (-9.63\% \text{ y } 0.43\%)$$

### B1.2 Conclusión

Si se considera que en el intervalo de confianza al 95% están incluidos el 100% y el 0% para el porcentaje de recuperación y para el porcentaje de error respectivamente, se concluye que el método está validado en términos de su exactitud, ya que la aproximación implica que la desviación o error de los datos respecto al valor real puede tomar el valor de cero o bien ser nula.

### B2. Linealidad.

Para evaluar la relación entre la variable independiente ( $\mu\text{g}$  adicionados) y la variable dependiente ( $\mu\text{g}$  recuperados) se recurrió al análisis de linealidad, utilizando para ello los valores de la tabla b1.

Modelo ajustado

$$\hat{y} = 7.66 + 0.933(x - 8.05)$$

y el modelo en términos de la intersección original para evaluar errores



$$\hat{y} = 0.147 + 0.933x$$

En esta ecuación se sustituyen los valores de cada  $x$  y con cada valor de  $y$  ajustado se obtiene los errores o residuos, la suma de sus cuadrados y la suma de cuadrados de la regresión.

$$SS_e = 0.272$$

$$SS_R = 77.79$$

$$S_{yy} = 78.06$$

Se establecen las pruebas de hipótesis para la pendiente y la ordenada al origen.

Pendiente:

$$H_0: \beta_1 = \beta_{1,0}$$

$$H_1: \beta_1 \neq \beta_{1,0}$$

Con estas hipótesis se realiza la prueba de falta de ajuste y de significación de la regresión.

~ a) Significación de la regresión.

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Cuadro de análisis de varianza .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_0$	$F_{1,13,0.95}$
Regresión	77.79	1	77.79	3704.3	4.67
Error	0.272	13	0.021		
Total	78.06	14			

Como  $F_0 > F_{1,13,0.95}$  se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, la regresión es altamente significativa.

b) Prueba de falta de ajuste

$H_0$ : El modelo se ajusta adecuadamente a los datos

$H_1$ : El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos

Tabla de falta de ajuste.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_0$	$F_{0.05,4,9}$
Error puro	2.89	9	0.321	-2.044	3.63
Falta de ajuste	-2.63	4	-0.656		
Error total	0.26	13			

Como  $F_0 < F_{0.05,4,9}$  se acepta  $H_0$ , por lo tanto, el modelo se ajusta adecuadamente a los datos

c) Coeficiente de determinación.

$$R^2 = SS_R / S_{yy} = 77.79 / 78.06 = 0.9965$$

El 99% de la variabilidad de los datos es explicada por el modelo

d) Intervalos de confianza del 95% para la pendiente y la ordenada al origen.

- Ordenada:

$$0.147 \pm 2.16\sqrt{0.021 \left( \frac{1}{15} + \frac{8.05^2}{89.02} \right)} =$$

$$= 0.147 \pm 0.0006$$

- Ordenada al origen

$$0.933 \pm 2.16\sqrt{0.021 / 89.02} =$$

$$= 0.933 \pm 0.0332$$

La elaboración de estos intervalos de confianza tiene un propósito predictivo, ya que si se desea inferir acerca de otros porcentajes de recuperación fuera de los ensayados puede recurrirse a ellos, con la incertidumbre establecida en el modelo.

### B.3 Precisión

#### B3.1 Reproducibilidad

Con la finalidad de determinar el efecto de la extracción, el día en que fue realizada y la posible interacción entre estas variables como medida de la reproducibilidad en las determinaciones hechas por el método, se realizó el análisis de varianza correspondiente, haciendo para esto recuperaciones de la cantidad etiquetada en dos días diferentes y con dos extracciones diferentes. Los resultados se presentan en la tabla b2.

Tabla b2. Datos de recuperación por día y extracción.

	Extracción 1	Extracción 2
Día 1	95	93.71
	95.8	97.52
	97.6	96.29
Día 2	92.96	94.55
	96.3	93.45
	92.68	92.73

Los resultados del análisis de varianza se presentan en la tabla siguiente:

Tabla de análisis de varianza (dos factores aleatorios)

Fuente de Variación	Cuadrados medios	Grados de libertad	Cuadrados medios	F <sub>0</sub>	F <sub>0.95</sub>
Día	26.16	1	26.16	2.22	161.45
Extracción	3	1	3	0.255	161.45
Interacción	11.77	1	11.77	-2.3	5.32
Error	-5.13	8	-5.13		

Región crítica unilateral a nivel de significancia  $\alpha=0.05$ .

$F_{\text{calc}} < F_{1-\alpha}$  ; entonces:

$$F_{\text{calcD}} < F_{0.95} \quad (\text{día})$$

$$F_{\text{calcE}} < F_{0.95} \quad (\text{extracción})$$

$$F_{\text{calcDE}} < F_{0.95} \quad (\text{interacción día-extracción})$$

Conclusión: Siendo menores los estimadores F calculados de distribución normal que los respectivo de tablas, se concluye que no existen efectos por extracción, día o la interacción que éstos tengan, por lo que se deduce que el método es preciso (reproducible).

### B3.2 Repetibilidad.

Con la finalidad de conocer la concordancia de los valores experimentales alrededor del valor verdadero se hizo la evaluación de la repetibilidad utilizando para ello los valores del porcentaje de recuperación x.

$$H_0: \sigma_x^2 \geq \sigma_0^2$$

$$H_1: \sigma_x^2 < \sigma_0^2$$

$$s = 1.71$$

$$\chi^2_{0.975,14} = 5.63$$

$$s_x^2 = 2.92$$

$$\chi^2_{0.025,14} = 26.12$$

$$SS_x = 38.4$$

$$\chi^2_{0.95,14} = 6.57$$

Intervalo de confianza para  $\sigma^2$  al 95%:

$$LS = 38.4 / 26.12 = 1.47$$

$$LI = 38.4 / 5.63 = 6.82$$

Asumiendo que la varianza es menor a 6.25

$$Q = SS_x / \sigma_0^2 = 38.4 / 6.25 = 6.55$$

Como  $Q < \chi^2_{0.95,14}$  se rechaza la hipótesis nula al nivel de 5% de significancia y se concluye que el método está validado en términos de su precisión

ANÁLISIS DE LA REPLICABILIDAD  
 DEL MÉTODO DE CALIBRACIÓN

## C) Riboflavina

### C1. Exactitud.

Para la evaluación de la exactitud del método, se hicieron recuperaciones entre el 50% y el 200% aproximadamente de la cantidad de riboflavina reportada en etiqueta. Los resultados se muestran en la tabla c1

*Tabla c1. Porcentaje de recuperación de riboflavina.*

$\mu\text{g}$ adicionados /10 g harina	$\mu\text{g}$ recuperados	% recuperación	Error	% Error absoluto
1.1	0.98	89.09	-0.12	-5
1.1	0.93	84.55	-0.17	-4.2
1.1	1.07	97.27	-0.03	-2.4
1.1	0.93	84.55	-0.17	-3.46
1.1	0.93	84.55	-0.17	-3.7
1.1	1.1	100	0	-7.32
1.1	0.98	89.09	-0.12	-4.79
1.9	1.8	94.74	-0.1	-4.15
1.9	1.75	92.11	-0.15	-2.68
1.9	1.74	91.58	-0.16	-6.29
1.9	1.7	89.47	-0.2	-2.48
1.9	1.65	86.84	-0.25	-3.71
4.02	3.7	92.04	-0.32	-5.45
4.02	3.94	98.01	-0.08	-6.55
4.02	3.82	95.02	-0.2	-7.27
Promedio		91.26	-0.149	-8.75
Desviación estándar (s)		5.02	0.08	5.02
N = 15, N-1 = 14				
Estadístico de prueba $t_{0.025, 14} = 2.15$				
Nivel de significancia = $\alpha = 0.05$				

### C1.1 Cálculos.

$$LS_x (LI_x) = \bar{x} \pm s_x t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% recuperación}$$

$$LS_{ea} (LI_{ea}) = \bar{ea} \pm s_{ea} t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para error absoluto}$$

$$LS_e (LI_e) = \bar{e} \pm s_e t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% error}$$

$$LS_x (LI_x) = 91.26 \pm 10.8 \quad \text{o bien} \quad (LS_x, LI_x) = (80.46\%, 102.06\%)$$

$$LS_{ea} (LI_{ea}) = -0.149 \pm 0.172 \quad \text{o bien} \quad (LS_{ea}, LI_{ea}) = (-0.321, 0.023)$$

$$LS_e (LI_e) = -8.75 \pm 10.8 \quad \text{o bien} \quad (LS_e, LI_e) = (-19.54\%, 2.05\%)$$

### C1.2. Conclusión

Si se considera que en el intervalo de confianza al 95% están incluidos el 100% y el 0% para el porcentaje de recuperación y para el porcentaje de error respectivamente, se concluye que el método está validado en términos de su exactitud, ya que la aproximación implica que la desviación o error de los datos respecto al valor real puede tomar el valor de cero o bien ser nula.

En el caso de esta vitamina, se observa que los intervalos establecidos son aparentemente amplios, sin embargo se debe considerar que fue la que presentó el menor porcentaje de recuperación y por tanto la que tiene la mayor dispersión respecto al 100%, es decir, que la amplitud del intervalo en gran medida se debe a que el porcentaje de recuperación es relativamente inferior.

### C.2 Linealidad

Para evaluar la relación entre la variable independiente ( $\mu\text{g}$  adicionados) y la variable dependiente ( $\mu\text{g}$  recuperados) se recurrió al análisis de linealidad, utilizando para ello los valores de la tabla c1

Modelo ajustado.

$$\hat{y} = 1.801 + 0.9704(x - 1.95)$$

y el modelo en términos de la intersección original para evaluar errores.

$$\hat{y} = -0.0913 + 0.9704x$$

En esta ecuación se sustituyen los valores de cada x y con cada valor de y ajustado se obtiene los errores o residuos, la suma de sus cuadrados y la suma de cuadrados de la regresión.

$$SS_e = 0.0752$$

$$SS_R = 16.875$$

$$S_{yy} = 16.95$$

Se establecen las pruebas de hipótesis para la pendiente y la ordenada al origen.

Pendiente:

$$H_0: \beta_1 = \beta_{1,0}$$

$$H_1: \beta_1 \neq \beta_{1,0}$$

Con estas pruebas se realiza la prueba de falta de ajuste y de significación de la regresión

a) Significación de la regresión.

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$



Cuadro de análisis de varianza .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F <sub>0</sub>	F <sub>1,13,0.95</sub>
Regresión	16.875	1	16.875	2812.5	4.67
Error	0.0752	13	0.006		
Total	16.95	14			

Como  $F_0 > F_{1,13,0.95}$  se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, la regresión es altamente significativa.

b) Prueba de falta de ajuste.

$H_0$ : El modelo se ajusta adecuadamente a los datos

$H_1$ : El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos

Tabla de falta de ajuste.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F <sub>0</sub>	F <sub>0.05,4,9</sub>
Error puro	0.414	12	0.0345	-9.85	4.75
Falta de ajuste	-0.34	1			
Error total	0.074	13			

Como  $F_0 < F_{0.05,4,9}$  se acepta  $H_0$ , por lo tanto, el modelo se ajusta adecuadamente a los datos.

c) Coeficiente de determinación

$$R^2 = SS_R / S_{yy} = 16.875 / 16.95 = 0.9956$$

El 99% de la variabilidad de los datos es explicada por el modelo

d) Intervalos de confianza del 95% para la pendiente y la ordenada al origen.

- Ordenada:

$$\begin{aligned} & -0.0913 \pm 2.16 \sqrt{0.006 \left( \frac{1}{15} \right) + (1.95^2 / 17.92)} = \\ & = -0.0913 \pm 0.0006 \end{aligned}$$

- Ordenada al origen

$$\begin{aligned} & 0.9704 \pm 2.16 \sqrt{0.006 / 17.92} = \\ & = 0.9704 \pm 0.024 \end{aligned}$$

La elaboración de estos intervalos de confianza tiene un propósito predictivo, ya que si se desea inferir acerca de otros porcentajes de recuperación fuera de los ensayados puede recurrirse a ellos, con la incertidumbre establecida en el modelo.

### C.3. Precisión

#### C3.1. Reproducibilidad

Con la finalidad de determinar el efecto de la extracción, el día en que fue realizada y la posible interacción entre estas variables como medida de la reproducibilidad en las determinaciones hechas por el método, se realizó el análisis de varianza correspondiente, haciendo para esto recuperaciones de la cantidad etiquetada en dos días diferentes y con dos extracciones diferentes. Los resultados se presentan en la tabla c2

Tabla c2. Datos de recuperación por día y extracción.

	Extracción 1	Extracción 2
Día 1	89.09	94.74
	84.55	92.11
	97.27	91.58
Día 2	84.55	89.47
	100	92.04
	89.09	86.84

Los resultados del análisis de varianza se presentan en la tabla siguiente

Tabla de análisis de varianza (dos factores aleatorios)

Fuente de Variación	Cuadrados medios	Grados de libertad	Cuadrados medios	F <sub>0</sub>	F <sub>0.95</sub>
Día	4.5	1	4.5	0.242	161.45
Extracción	0.422	1	0.422	0.023	161.45
Interacción	18.6	1	18.6	0.66	5.32
Error	223.54	8	27.94		

Región crítica unilateral a nivel de significancia  $\alpha=0.05$ .

$$F_{\text{calc}} < F_{1-\alpha} \quad ; \quad \text{entonces:}$$

$$F_{\text{calcD}} < F_{0.95} \quad (\text{día})$$

$$F_{\text{calcE}} < F_{0.95} \quad (\text{extracción})$$

$$F_{\text{calcDE}} < F_{0.95} \quad (\text{interacción día-extracción})$$

Conclusión: Siendo menores los estimadores F calculados de distribución normal que los respectivo de tablas, se concluye que no existen efectos por extracción, día o la interacción que éstos tengan, por lo que se deduce que el método es preciso (reproducibile).

### C3.2 Repetibilidad.

Con la finalidad de conocer la concordancia de los valores experimentales alrededor del valor verdadero se hizo la evaluación de la repetibilidad utilizando para ello los valores del porcentaje de recuperación x.

$$H_0: \sigma_x^2 \geq \sigma_0^2$$

$$H_1: \sigma_x^2 < \sigma_0^2$$

$s = 5.02$	$\chi^2_{0.975,14} = 5.63$
$s_x^2 = 25.2$	$\chi^2_{0.025,14} = 26.12$
$SS_x = 352.87$	$\chi^2_{0.95,14} = 6.57$

Intervalo de confianza para  $\sigma^2$  al 95%:

$$LS = 352.87 / 26.12 = 13.51$$

$$LI = 352.87 / 5.63 = 62.68$$

Asumiendo que la varianza es menor a 7.4:

$$Q = SS_x / \sigma_0^2 = 352.87 / 54.76 = 6.44$$

Como  $Q < \chi^2_{0.95,14}$  se rechaza la hipótesis nula al nivel de 5% de significancia y se concluye que el método está validado en términos de su precisión

## D) Ácido fólico

### D1. Exactitud.

Para la evaluación de la exactitud del método, se hicieron recuperaciones entre el 50% y el 200% aproximadamente de la cantidad de ácido fólico reportada en etiqueta. Los resultados se muestran en la tabla d1.

Tabla d1. Porcentaje de recuperación de ácido fólico.

µg adicionados	µg recuperados	% recuperación	Error absoluto	% Error
2.4	2.24	93.33	-0.16	-6.66
2.4	2.31	96.25	-0.09	-3.75
2.4	2.16	90	-0.24	-10
2.4	2.21	92.08	-0.19	-7.92
2.4	2.27	94.58	-0.13	-5.42
4	3.7	92.5	-0.3	-7.5
4	3.82	95.5	-0.18	-4.5
4	3.81	95.25	-0.19	-4.75
4	3.79	94.75	-0.21	-5.25
4	3.51	87.75	-0.49	-12.25
4	3.6	90	-0.4	-10
4	3.8	95	-0.2	-5
4	3.67	91.75	-0.33	-8.25
5.4	5.33	98.7	-0.07	-1.3
5.4	4.94	91.48	-0.46	-8.52
Promedio		93.26	-0.24	-6.74
Desviación estándar (s)		2.85	0.128	2.85

N = 15, N-1 = 14

Estadístico de prueba  $t_{0.01, 14} = 2.624$

Nivel de significancia =  $\alpha = 0.02$

## D1 1. Cálculos.

$$LS_x (LI_x) = \bar{x} \pm s_x t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% recuperación}$$

$$LS_{ea} (LI_{ea}) = \bar{ea} \pm s_{ea} t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para error absoluto}$$

$$LS_e (LI_e) = \bar{e} \pm s_e t_{(1/2\alpha, n-1)} \quad \text{Para \% error}$$

$$t_{0.01, 14} = 2.624$$

$$LS_x (LI_x) = 93.26 \pm 7.48 \quad \text{o bien} \quad (LS_x, LI_x) = (85.78\%, 100.74\%)$$

$$LS_{ea} (LI_{ea}) = -0.24 \pm 0.336 \quad \text{o bien} \quad (LS_{ea}, LI_{ea}) = (-0.576, 0.096)$$

$$LS_e (LI_e) = -6.74 \pm 7.48 \quad \text{o bien} \quad (LS_e, LI_e) = (-14.22\%, 0.74\%)$$

## D1.2. Conclusión

Si se considera que en el intervalo de confianza al 95% están incluidos el 100% y el 0% para el porcentaje de recuperación y para el porcentaje de error respectivamente, se concluye que el método está validado en términos de su exactitud, ya que la aproximación implica que la desviación o error de los datos respecto al valor real puede tomar el valor de cero o bien ser nula.

## D2. Linealidad.

Para evaluar la relación entre la variable independiente ( $\mu\text{g}$  adicionados) y la variable dependiente ( $\mu\text{g}$  recuperados) se recurrió al análisis de linealidad, utilizando para ello los valores de la tabla 9.

Modelo ajustado:

$$\hat{y} = 3.41 + 0.952 (x - 3.65)$$

Y el modelo en términos de la intersección original para evaluar errores:

$$\hat{y} = -0.0662 + 0.952 x$$

En esta ecuación se sustituyen los valores de cada x y con cada valor de y ajustado se obtiene los errores o residuos, la suma de sus cuadrados y la suma de cuadrados de la regresión.

$$SS_e = 0.1967$$

$$SS_R = 13.72$$

$$S_{yy} = 13.92$$

Se establecen las pruebas de hipótesis para la pendiente y la ordenada al origen.

Pendiente:

$$H_0: \beta_1 = \beta_{1,0}$$

$$H_1: \beta_1 \neq \beta_{1,0}$$

Con estas pruebas se realiza la prueba de falta de ajuste y de significación de la regresión.

a) Significación de la regresión

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Cuadro de análisis de varianza .

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_0$	$F_{1,13,0.95}$
Regresión	13.72	1	13.72	908.61	4.67
Error	0.1967	13	0.0151		
Total	13.92	14			

Como  $F_0 > F_{1,13,0.95}$  se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, la regresión es altamente significativa.

b) Prueba de falta de ajuste

$H_0$ : El modelo se ajusta adecuadamente a los datos

$H_1$ : El modelo no se ajusta adecuadamente a los datos

Tabla de falta de ajuste.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_0$	$F_{0.05,4,9}$
Error puro	1.11	12	0.0925	-0.101	4.75
Falta de ajuste	-0.915	1	-0.915		
Error total	0.195	13			

Como  $F_0 < F_{0.05,4,9}$  se acepta  $H_0$ , por lo tanto, el modelo se ajusta adecuadamente a los datos.

c) Coeficiente de determinación

$$R^2 = SS_R / S_{yy} = 13.72 / 13.92 = \mathbf{0.9856}$$

El 98% de la variabilidad de los datos es explicada por el modelo



d) Intervalos de confianza del 95% para la pendiente y la ordenada al origen.

- Ordenada:

$$-0.0662 \pm 2.16 \sqrt{0.006 \left( \frac{1}{15} \right) + (3.65^2 / 14.92)} =$$

$$= -0.0662 \pm 0.26$$

- Pendiente.

$$0.952 \pm 2.16 \sqrt{0.0151 / 14.92} =$$

$$= 0.952 \pm 0.0687$$

La elaboración de estos intervalos de confianza tiene un propósito predictivo, ya que si se desea inferir acerca de otros porcentajes de recuperación fuera de los ensayados puede recurrirse a ellos, con la incertidumbre establecida en el modelo

### D.3. Precisión

#### D3.1 Reproducibilidad

Con la finalidad de determinar el efecto de la extracción ,el día en que fue realizada y la posible interacción entre estas variables como medida de la reproducibilidad en las determinaciones hechas por el método, se realizó el análisis de varianza correspondiente, haciendo para esto recuperaciones de la cantidad etiquetada en dos días diferentes y con dos extracciones diferentes. Los resultados se presentan en la tabla d2.

Tabla d2. Datos de recuperación por día y extracción.

	Extracción 1	Extracción 2
Día 1	93.33	92.08
	96.25	94.58
	90	92.5
Día 2	95.5	90
	95.25	95
	94.75	91.75

Los resultados del análisis de varianza se presentan en la tabla siguiente.

Tabla de análisis de varianza (dos factores aleatorios)

Fuente de Variación	Cuadrados medios	Grados de libertad	Cuadrados medios	$F_0$	$F_{0.95}$
Día	1.026	1	1.026	0.0743	161.45
Extracción	7.007	1	7.007	0.51	161.45
Interacción	13.81	1	13.81	3.91	5.32
Error	24.28	8	3.53		

Región crítica unilateral a nivel de significancia  $\alpha=0.05$ .

$$F_{\text{calc}} < F_{1-\alpha} \quad ; \quad \text{entonces:}$$

$$F_{\text{calcD}} < F_{0.95} \quad (\text{día})$$

$$F_{\text{calcE}} < F_{0.95} \quad (\text{extracción})$$

$$F_{\text{calcDE}} < F_{0.95} \quad (\text{interacción día-extracción})$$

Conclusión: Siendo menores los estimadores F calculados de distribución normal que los respectivo de tablas, se concluye que no existen efectos por extracción, día o la interacción que éstos tengan, por lo que se deduce que el método es preciso (reproducibile).

### D3.2. Repetibilidad.

Con la finalidad de conocer la concordancia de los valores experimentales alrededor del valor verdadero se hizo la evaluación de la repetibilidad utilizando para ello los valores del porcentaje de recuperación x.

$$H_0: \sigma_x^2 \geq \sigma_0^2$$

$$H_1: \sigma_x^2 < \sigma_0^2$$

$$s = 2.85 \quad \chi^2_{0.975,14} = 5.63$$

$$s_x^2 = 8.12 \quad \chi^2_{0.025,14} = 26.12$$

$$SS_x = 113.55 \quad \chi^2_{0.95,14} = 6.57$$

Intervalo de confianza para  $\sigma^2$  al 95%:

$$LS = 113.55 / 26.12 = 4.35$$

$$LI = 113.55 / 5.63 = 20.17$$

Asumiendo que la varianza es menor a 4.2:

$$Q = SS_x / \sigma_0^2 = 113.55 / 17.64 = 6.43$$

Como  $Q < \chi^2_{0.95,14}$  se rechaza la hipótesis nula al nivel de 5% de significancia y se concluye que el metodo está validado en términos de su precisión