



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
PRESIÓN (CLAP) PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA A.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ADRIANA RAMÍREZ HERNÁNDEZ



MÉXICO, D. F.



2004

**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Jurado asignado:

Presidente **Profa. Ernestina Cervera Flores**

Vocal **Prof. Adolfo García Osuna**

Secretario **Profa. Lucía Cornejo Barrera**

1^{er}. Suplente **Profa. Rosa María Argote Espinosa**

2^o. Suplente **Profa. Araceli Patricia Peña Álvarez**

Sitio en el que se desarrolló el tema

**Departamento de Química Analítica
Edificio "A" laboratorio 3b y 3f.
Facultad de Química Cd. Universitaria.**

Asesor del tema



Q. Adolfo García Osuna

Supervisor técnico



Q.F.B. Silvia Mendoza Arellano

Sustentante



Adriana Ramírez Hernández

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Adriana Ramírez
Hernández
FECHA: 26- Octubre - 2004
FIRMA: 

A MI FAMILIA:
Antonio Díaz Vaca
Alejandra Díaz Ramírez
por su comprensión,
apoyo, amor y
su paciencia

A MIS PADRES:
Sabina Hernández Poncet
Miguel Ramírez Vera
por su apoyo , comprensión y
por darme la vida.
Ambar gracias por tu
apoyo incondicional
y por creer en mi.

A MIS HERMANOS:
en especial a
Esther Ramírez Hernández
por ser más que una hermana
y estar a mi lado en las buenas y en las malas.

A MIS PROFESORES:
En especial a mi sinodal
Q. Adolfo García Osuna por su
comprensión, su paciencia y
sobretudo por su apoyo,
a mi asesora técnica
Q.F.B. Silvia Mendoza Arellano
por todas las facilidades
para realizar este trabajo
y su paciencia.

A MIS AMIGOS:
En especial a
Susana I. Martínez Samáno

Lo único que le da sentido a la vida
es el amor. Ya sea el amor por otro, por otras personas
o el amor por lo que hacemos. Quizá, en el fondo, el
amor sea solamente una actitud ante la vida, hacia las
cosas que nos rodean.

DANIEL WEINSTOCK

ÍNDICE

PÁGINA

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	5

Capítulo 2 ANTECEDENTES TEÓRICOS

VITAMINA A	7
1) Estructura	7
2) Función	8
3) Deficiencia y toxicidad	8
4) Estabilidad	9
5) Fuentes	9
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)	11
1) Desarrollo histórico	11
2) Principios en los que se basa la cromatografía y su clasificación	11
3) Cromatografía de Fases Químicamente Unidas	13
4) Instrumentación	14
(a) FUENTE DE FASE MÓVIL	15
(b) SISTEMA DE BOMBEO	18
(c) SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA	19
(d) SISTEMA DE SEPARACIÓN	21
(e) SISTEMA DE DETECCIÓN	21
(f) SISTEMA DE REGISTRO	24
VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA	26
1) Desarrollo de la separación cromatográfica	26
2) Linealidad del sistema	28
3) Precisión del sistema	30

4) Precisión del método	31
5) Estabilidad de la muestra	33

Capítulo 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

INSTRUMENTACIÓN	36
MATERIAL VOLUMÉTRICO	36
REACTIVOS	37
CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO	37
VALIDACIÓN	38
1) Desarrollo de la separación cromatográfica	38
2) Linealidad del sistema	39
3) Precisión del sistema	39
4) Precisión del método	40
5) Estabilidad de los estándares	41

Capítulo 4 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO	44
VALIDACIÓN	47
1) Desarrollo de la separación cromatográfica	47
2) Linealidad del sistema	49
3) Precisión del sistema	58
4) Repetibilidad	64
5) Reproducibilidad	72
6) Estabilidad de la muestra	79

CONCLUSIONES	89
---------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA	92
---------------------	-----------

ANEXO 1	94
----------------	-----------

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

INTRODUCCIÓN

La validación de técnicas y métodos analíticos se exige con mayor fuerza cuando la economía mundial aplica lo conocido como globalización y la interacción de los mercados de diferentes países lleva a la firma de acuerdos del orden internacional. Aunque en algunas de las áreas de la química nacional como la farmacéutica ya se tenía una manera organizada de procedimientos para realizar estas validaciones, en una gran parte de la industria química no se llevaba con la severidad que actualmente se piden. Esto conlleva a la demanda del mercado y organismos tanto nacionales como internacionales de tener el aseguramiento de la calidad en los resultados obtenidos por metodologías analíticas y obviamente el área de los alimentos no es la excepción, además de ser una ventaja competitiva en la industria alimenticia realizar esto es una obligación; la industria de alimentos debe cumplir con los requisitos de validación establecidos por la Secretaría de Salud (SS) y aquellas instancias gubernamentales que la legislación indique en el país y en caso de exportaciones en las que indiquen organismos internacionales, como ejemplo la Food and Drugs Administration de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés).

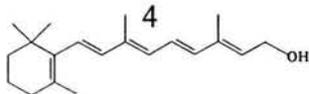
Siempre es posible facilitar y mejorar los procesos y productos a través de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

La validación de una técnica aplica la información estadística que permita comprobar el margen de error con el que se obtienen los resultados de lo que se esté analizando y con ello como mantener constante dicho error o mejorarlo.

El control de calidad está enfocado a vigilar constantemente que los parámetros de una medición, independiente de una medición específica, se mantenga dentro de los límites preestablecidos, asegurando la confiabilidad de la medición, a través de un sistema integral de calidad.

Dentro de los procesos de fabricación los métodos analíticos deben estar controlados lo que dará como resultado un producto de alta calidad y una optimización en los procesos.

En el área de la química de alimentos se busca que los productos cumplan con las normas nacionales e internacionales y que no incurran en engaños al consumidor, por lo cual es importante tener un método analítico confiable para analizar los productos alimenticios, y lo primero que se tiene que asegurar es que la técnica elegida sea confiable.



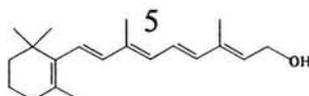
La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE por sus siglas en español, también conocida como CLAP) es una de las técnicas instrumentales actualmente con mayor uso para realizar la separación y el análisis cuantitativo de compuestos en diferentes muestras (tanto simples como complejas), facilitando el trabajo y mejorando los tiempos de análisis de estos, obteniéndose resultados confiables y pudiendo validar el proceso realizado en ésta.

Las vitaminas se deben ingerir en cantidades adecuadas y de preferencia de origen natural, ya que una deficiencia en éstas provoca daños a la salud, como es el caso de la vitamina A cuya deficiencia puede provocar ceguera nocturna, piel reseca y escamosa, xeroftalmia y mucosas resacas, y al ser consumidas en cantidades elevadas pueden producir toxicidad.

Se pretende en este trabajo realizar la validación del sistema instrumental de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) con el que se va a llevar en estudios posteriores para el análisis de la vitamina A en muestras reales y que se encuentra en el laboratorio 3F del Departamento de Química Analítica.

OBJETIVOS

- Realizar la validación del sistema cromatográfico de líquidos de alta eficiencia que se tiene en el laboratorio 3F para el análisis de vitamina A en su forma como retinol, ésta incluye la optimización de la separación en el sistema cromatográfico, la linealidad, precisión del sistema, repetibilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos, y la estabilidad de las soluciones estándar que se utilicen.
- Plantear si el sistema permitirá el análisis de vitamina A en muestras reales.



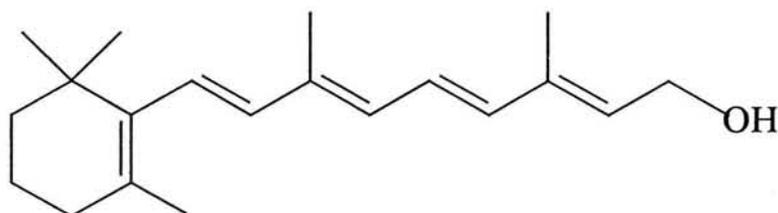
CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES TEÓRICOS

VITAMINA A^{3, 4, 5, 6, 7, 8}

1) Estructura

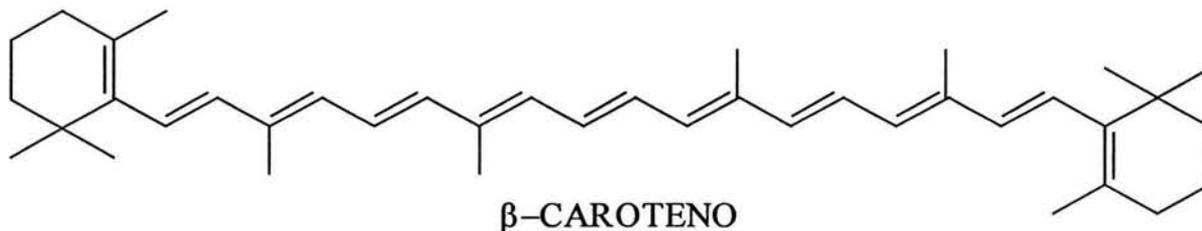
La vitamina A activa se encuentra en una serie de hidrocarburos insaturados de 20 a 40 átomos de carbono, ampliamente difundidos en el reino animal y en el reino vegetal. La vitamina A (*figura 2.1.*) se puede encontrar como alcohol libre (retinol), como éster de ácidos grasos, como aldehídos (retinal o retineno) y como ácido (ácido retinoico). En los animales el órgano que contiene mayor cantidad de vitamina A es el hígado y en el reino vegetal se encuentra el precursor de ésta como β -caroteno.



RETINOL

Figura 2.1. Estructura de la vitamina A o Retinol.

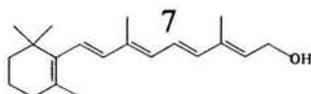
La provitamina más potente es el β -caroteno (*figura 2.2.*), se encuentra en los vegetales y está formada por dos moléculas de vitamina A, sin embargo la conversión en la mucosa intestinal así como en otros tejidos como el hígado solo producen una molécula de vitamina A.



β -CAROTENO

Figura 2.2. Estructura del β -caroteno.

La vitamina A es una sustancia liposoluble y acompaña a otras sustancias de tipo lipídico. También existen complejos proteína-caroteno que pueden estar asociados a la fase acuosa. Los sistemas carotenoides muy insaturados originan una serie de espectros complejos en la regiones



UV-Visible (300-500nm) que explican la fuerte pigmentación naranja-amarillenta de estas sustancias.

La vitamina A presenta su máxima actividad biológica cuando todas sus insaturaciones se encuentran en configuración trans.

2) Función

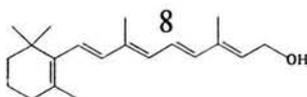
1. Mantenimiento y reparación del tejido corporal.
2. Favorece la resistencia a las infecciones.
3. Necesario para el correcto desarrollo nervioso.
4. Necesaria para la visión nocturna (Rodopsina).
5. Interviene en el crecimiento óseo.
6. Evita la queratinización de las células epiteliales.
7. Sirve para proteger las membranas celulares por su acción antioxidante.
8. Previene la hemólisis y mantiene la fertilidad sexual.

3) Deficiencia y toxicidad

La deficiencia de vitamina A en el hombre inhibe el crecimiento, produce el endurecimiento del epitelio en varias partes del cuerpo, principalmente en los sistemas respiratorio, visual, reproductivo y urinario, y afecta la estructura ósea y dental. Las enfermedades provocadas por el bajo consumo de vitamina A son la ceguera nocturna, xeroftalmia, piel reseca y escamosa así como mucosas reseca.

En ausencia de vitamina A, las células mucosas calciformes desaparecen y quedan reemplazadas por células basales que se han estimulado para que proliferen. Esas células alteran y reemplazan el epitelio original por un epitelio estratificado queratinizado. La supresión de las secreciones normales conduce a irritación e infección.

Los requerimientos de vitamina A en seres humanos se han calculado a partir de estudios en los que se ha intentado corregir estados de deficiencia producidos experimentalmente. Las recomendaciones actuales del "Food and Nutrition Board del National Research Council" se basan en la cantidad de Retinol necesaria para conservar adaptación normal a la oscuridad más un factor de seguridad adicional para cubrir variaciones de la absorción de Retinol y la utilización del mismo. Las raciones diarias recomendadas para varones y mujeres adultos normales son de



1,000 y 800 equivalentes de Retinol al día, respectivamente suponiendo que el 50% de la vitamina A en la dieta se deriva del Retinol, y el 50% del β -caroteno.

El adulto promedio occidental recibe alrededor de 50% de la ingestión diaria de vitamina A como Retinol o ésteres de Retinil, y el resto como carotenoides.

El requerimiento de vitamina A para adultos es de 1.5 a 1.8 mg/día tomando en cuenta que el 75% es ingerido como Retinol y el otro 25% como β -caroteno (6g de β -caroteno equivale 1g de Retinol).

Un consumo excesivo de esta vitamina proveniente de preparaciones farmacéuticas puede ocasionar intoxicación, lo cuál no sucede con la ingestión de alimentos ya que estos contienen una concentración adecuada de la vitamina. Se considera que el consumo diario de 18,000 a 20,000 unidades internacionales durante uno o dos meses es suficiente para ocasionar toxicidad.

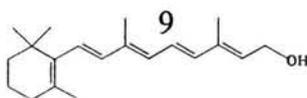
4) Estabilidad

Los carotenoides se descomponen de un 4 a 50% según las condiciones de preparación y conservación de los alimentos. En ausencia de oxígeno, a temperaturas elevadas (cocción, esterilización, etc) se producen especialmente isomerizaciones y fragmentación. Son sensibles a la oxidación ya que sus precursores y la vitamina A son hidrocarburos insaturados, este proceso se acelera en presencia de catalizadores, como enzimas y metales de transición, con las radiaciones electromagnéticas y en sistemas con una actividad acuosa baja.

Las principales fuentes de vitamina A en la dieta son el hígado, la mantequilla, el queso, la leche entera, la yema de huevo y el pescado. El β -caroteno se encuentra en diversas frutas y vegetales amarillos o verdes. Esos alimentos también contienen muchos carotenoides que no pueden convertirse en Retinol. Muchos de ellos funcionan como antioxidantes y es posible que tengan efectos útiles que favorecen la salud.

5) Fuentes

En tejidos animales la vitamina A se encuentra como Retinol. En el hígado es donde se almacena la vitamina, siendo el de res de los más ricos en vitamina A, también se encuentra en la yema de huevo, productos lácteos y pescado. En el reino vegetal la vitamina A se encuentra en forma de carotenos o carotenoides que son precursores de vitamina A. En la *tabla 2.1* se muestra algunos de los diversos alimentos que contienen vitamina A.



ALIMENTO	CONTENIDO DE VITAMINA A EN µG (ER) POR 100g DE PORCIÓN COMESTIBLE.			
	A	B	C	D
GRASAS Y ACEITES				
Mantequilla	902.0	828.3	-	754
Mayonesa	80.0	-	-	84
Aceite de hígado de bacalao	-	1,800	3,600	-
Hígado cerdo	17,595	17,595		3,270
Patés	8,300			990
Hígado de res			300	8,660
Huevo de gallina entero	16.0	227.0		156
FRUTAS	-	-	-	-
Aguacate	41.0	-	59.94	200
Albaricoque	357.0		900	-
Mandarina		106.0	75	108
Naranja	420.0	49.0	150	12
Manzana	480.0	-	22.5	10
Melocotón	500	-	330	
Melón	30.5	-	6.5	3
DERIVADOS LACTEOS				
Yogur natural	10.0	9.8	37.5	30
Queso de cabrales		300.0		-
Queso manchego curado	357.0	-		-
Queso manchego fresco	218.0	-		288
Queso de bola	30.5	-		-
Crema, natillas y flan	420.0	-	240	200
Helados y mousse	480.0	-		80
Nata	500	-		-
PESCADOS Y MARISCOS				
Pez espada	500.0	-		-
Almejas, chirlas, etc.	250.0	-	60	-
Sardina	50.0	62.9	750	9
VERDURAS				
Endivia	1,100	-	2500	556
Acelgas	-	183.0	-	404
Espinacas	-	542.0	2,700	321
Perejil	7,000	-	300	520
Tomate	207.0	94.0	1,000	507
Zanahoria	1,333	-	3,600	666

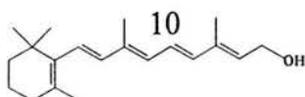
A = Mataix, V. J. Nutrición para educadores. Díaz de Santos, S.A., Madrid España.

B = Tabla de composición de Alimentos Españoles. Ed. Universidad de Granada, 1998.

C = Tabla de composición de alimentos. Osborne. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Acribia.

D= Tabla de INN SZ

Tabla 2.1. Contenido de vitamina A para los diferentes alimentos ya sean animales o vegetales ⁹.



CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)^{1, 15,16}

1) Desarrollo histórico

En 1905, Ramsey utilizó por primera vez técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores. Al año siguiente Tswett empleó la cromatografía de elución para la separación de la clorofila de extractos vegetales. En 1930 Tiselius y sus colaboradores introdujeron dos técnicas diferentes a la técnica de elución^{15,16}.

En 1941 Martin y Synge introducen la cromatografía de reparto, lo que les valió el premio Nobel en 1952.

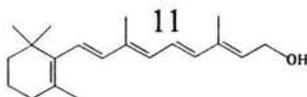
En 1952 Martin y James introducen la cromatografía de gases.

A pesar de que el primer experimento sobre cromatografía fue una forma de cromatografía líquida, no fue sino hasta 1968 que se produjo un avance considerable en esta técnica que por tantos años había permanecido olvidada; este avance fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua.

2) Principios en los que se basa la cromatografía y su clasificación

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos¹. Se caracteriza por tener una fase móvil y una fase estacionaria. La separación es el proceso de migración diferencial en la cual los componentes de la mezcla son transportados por la fase móvil y retenidos selectivamente por una fase estacionaria, lo anterior está relacionado a la constante de equilibrio que presentan los diferentes analitos presentes en la muestra entre estas 2 fases.

Normalmente la cromatografía se puede dividir de una manera general con respecto a su fase móvil y después realizar una subdivisión por el tipo de fase estacionaria, la *figura 2.3.* indica dicha clasificación.



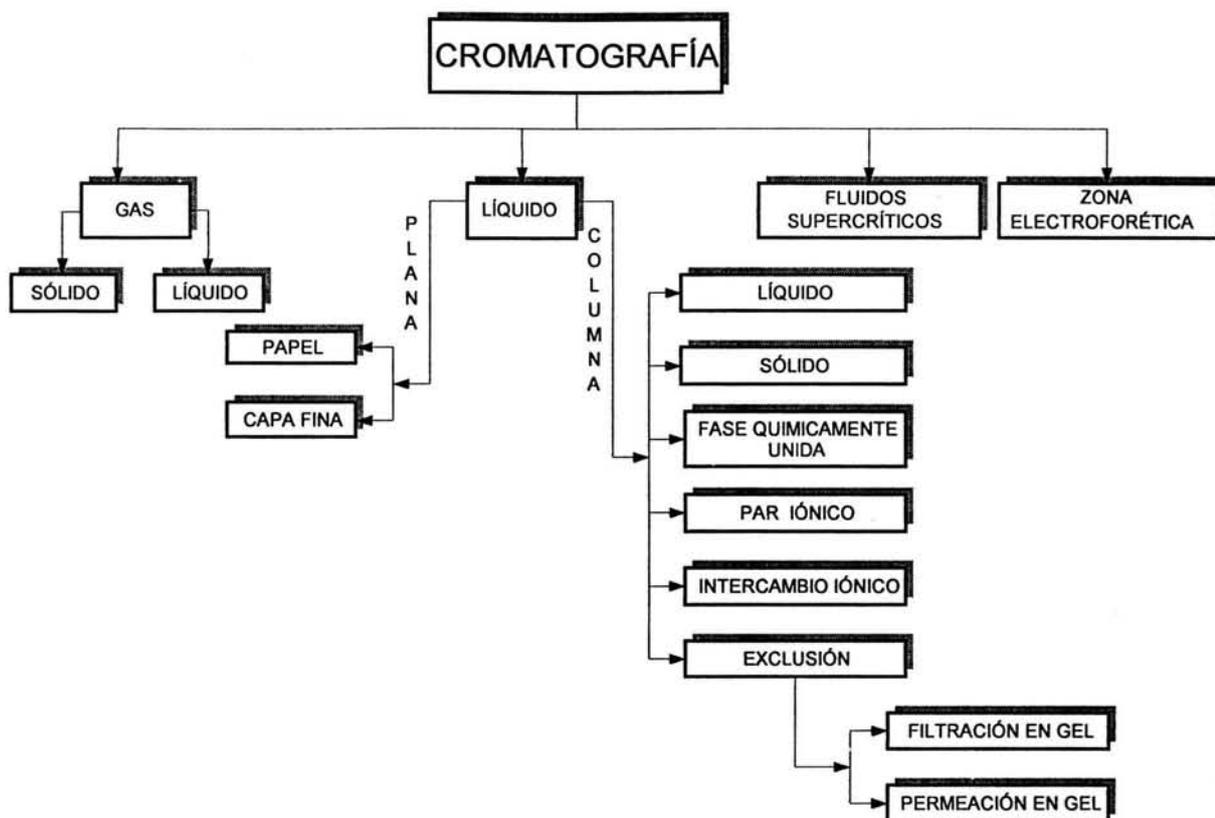
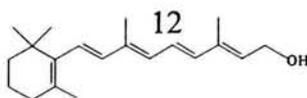
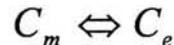
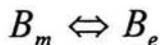
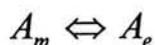


Figura 2.3. Clasificación general de las técnicas cromatográficas.

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de equilibrios debido a las interacciones entre cada uno de estos componentes, como son: interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones bipolares, electrostáticas, etc., y que son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Los componentes más afines a la fase estacionaria se retienen más y tardan más en eluir y los más afines a la fase móvil se retienen menos y eluyen más rápido. En la *figura 2.4.* se muestra un ejemplo de lo anterior, en la que las partículas de la fase estacionaria, las moléculas del disolvente y las moléculas del soluto A, B y C son los constituyentes de la muestra y sus equilibrios¹⁵.

Para cada caso, en la columna se establece un equilibrio que involucra la fracción de cada especie disuelta por cada fase en equilibrio. Los equilibrios para cada especie A, B y C son:



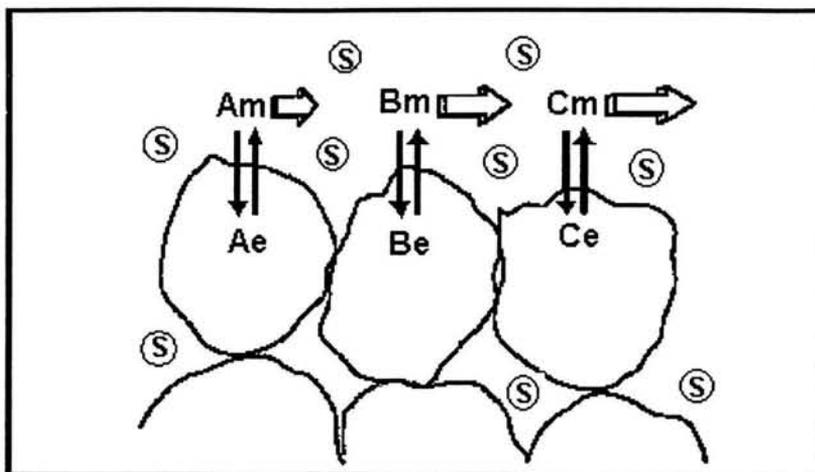


Figura 2.4. Separación hipotética de los solutos A, B, y C, en equilibrio entre la fase móvil (m) y la fase estacionaria (e). (S) representa las moléculas del disolvente de la fase móvil.

A continuación se da una breve explicación de la subdivisión que se trabajó en esta tesis para realizar el análisis de la vitamina A.

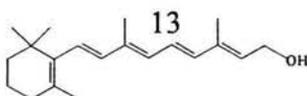
3) **Cromatografía de Fases Químicamente Unidas**

En esta opción la fase estacionaria está químicamente unida a la superficie de un soporte, la fase móvil difícilmente produce deterioro alguno en la fase estacionaria (a excepción de trabajar en medios muy extremos de pH y romper el enlace químico por hidrólisis de éste).

Dependiendo de los grupos funcionales que contiene el compuesto que se une químicamente al soporte se pueden trabajar dos tipos de cromatografía:

<i>Cromatografía en fase normal</i>	<i>Cromatografía en fase inversa o reversa</i>
Fase estacionaria polar.	Fase estacionaria no polar.
Fase móvil no polar.	Fase móvil polar.

Si los compuestos que se unen al soporte de la fase estacionaria contienen a grupos funcionales como el grupo amino (-NH₂), el grupo nitrilo (-CN) o el grupo hidroxilo (-OH) éstas son de tendencia polar y se trabaja por lo tanto la cromatografía en fase normal, o bien si son de tipo no polar como el grupo octil (-C₈H₁₇), octadecil (-C₁₈H₃₇), fenil (-C₆H₅) se trabaja la cromatografía en fase inversa¹.

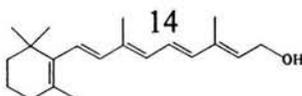


3) Instrumentación

Hay disponibles en el mercado una amplia variedad de equipos de CLAE que varían según el costo, versatilidad y complejidad.

Existen ciertas características generales para evaluar los instrumentos de CLAE que dan idea sobre la utilidad que pueden prestar. Dichas características son:

- a) **VERSATILIDAD.** El instrumento debe ser capaz de trabajar con diferentes tipos de muestra, debe prestarse a las diferentes técnicas cromatográficas y realizar el máximo de operaciones, tales como, programación de fase móvil, recolección de fracciones a la salida de la columna, etc., para ello el instrumento debe estar equipado con los siguientes aditamentos¹:
 - I. Sistema de operación de alta presión.
 - II. Diversos detectores.
 - III. Sistema para recolectar fracciones a la salida de la columna.
 - IV. Programadores de fase móvil o disolvente (también llamado generador de gradiente).
 - V. Controles de temperatura para la columna y el detector.
 - VI. Controles de flujo.
- b) **RAPIDEZ.** Se requiere contar con columnas que contengan rellenos de alta eficiencia y que el instrumento posea sistemas de bombeo de alta presión para la fase móvil. Durante mucho tiempo los análisis por cromatografía de líquidos eran excesivamente lentos, pero hoy en día los análisis son tan rápidos como los que se llevan a cabo por cromatografía de gases¹.
- c) **REPRODUCIBILIDAD Y ESTABILIDAD.** Para tener un funcionamiento efectivo a largo plazo el instrumento debe poseer mecanismos adecuados para controlar los parámetros de operación, tales como el flujo de la fase móvil, la presión, composición de la fase móvil, etc., para lo cuál debe estar provisto de controladores de temperatura, flujo, sistemas de bombeo de alta presión, programadores de fase móvil, detectores, etc..
- d) **SENSIBILIDAD.** La sensibilidad depende del sistema de detección que utiliza el cromatógrafo de líquidos, en la actualidad es posible detectar muestras en el intervalo de ppb a ppm.



Un estudio detallado de las características antes citadas permite elegir un instrumento de acuerdo al trabajo que se requiera realizar.

Las partes importantes que constituyen un Cromatógrafo de Líquidos Instrumental se encuentran indicados en la *figura 2.5*.

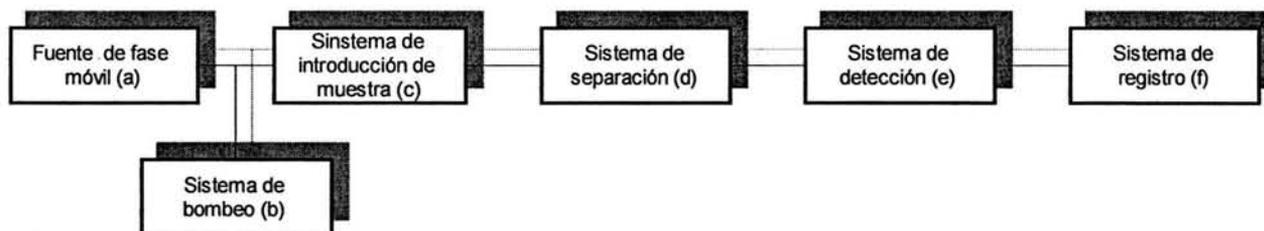
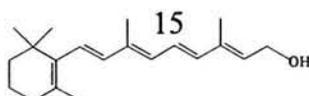


Figura 2.5. Diagrama general de los componentes de un cromatógrafo.

(a) FUENTE DE FASE MÓVIL

Se puede utilizar cualquier recipiente que pueda contener al disolvente (o disolventes) que se utilice(n) como fase móvil (*figura 2.6*). La fase móvil puede ser un disolvente polar, no polar o una mezcla de estos, y estos deben cumplir las siguientes características:

- Disolver la muestra.
- Alta pureza.
- Baja viscosidad.
- Inerte.
- No tóxico ni peligroso.
- Ser compatible con el tipo de detector utilizado.
- Ser barato o accesible.



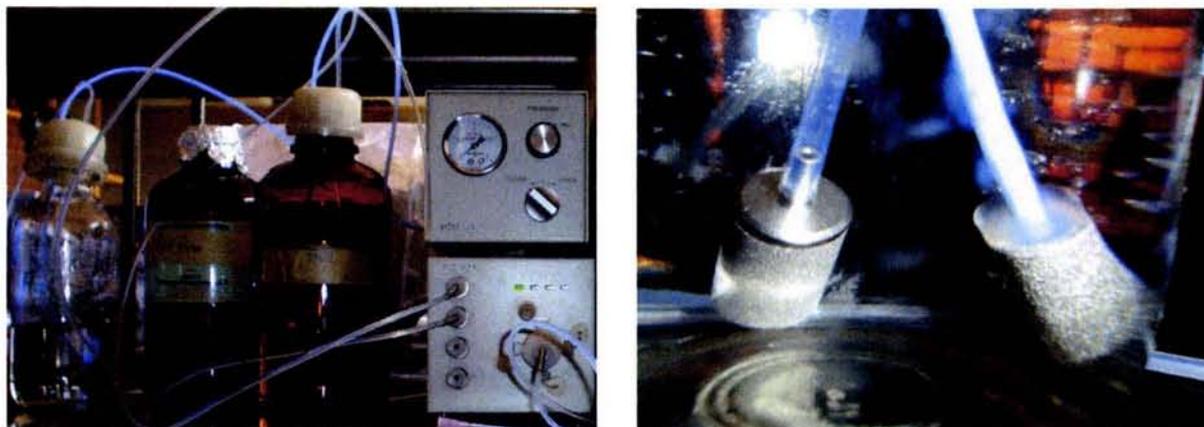


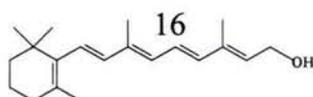
Figura 2.6. Frascos de vidrio (izquierda) que sirven como contenedores de la fase móvil en el equipo de la marca Shimadzu, este equipo tiene un sistema de desgasificación con burbujeo con helio (derecha).

Es necesario que la muestra sea soluble en la fase móvil para poder ser transportada a través del sistema. Si el disolvente y la fase móvil son de diferente polaridad se puede provocar precipitación dentro de la cámara de inyección o en la columna, lo que causaría pérdida de resolución en la separación. Cuando se realiza la cromatografía de tipo líquido-líquido, la fase estacionaria que se encuentra en la columna se puede ir disolviendo por la fase móvil, para evitar esto se satura la fase móvil con la fase estacionaria. Esto se puede realizar mediante una precolumna, que por lo general es una sección corta de tubería que se encuentra previa a la columna y que esta rellena del material que forma la fase estacionaria, al pasar a través de ella la fase móvil ésta se satura de la fase estacionaria antes de llegar a la columna analítica, lo que evita su desgaste.

La viscosidad (η) de los disolventes esta estrechamente relacionada con la presión del sistema, se busca una baja viscosidad de la fase móvil, para mejorar la eficiencia de la separación, esto influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El aumento de la viscosidad reduce la permeabilidad de la fase móvil en la columna, y la presión es mayor que la producida por un disolvente de baja viscosidad, por esta razón se trata de evitar el uso de disolventes de alta viscosidad como son: el dimetilsulfóxido (η :2.00 cps) y el isopropanol (η :1.90 cps).

En el caso de las mezclas de disolventes, normalmente la viscosidad de la mezcla depende de la viscosidad del solvente menos viscoso, pero esto no se cumple para los disolventes de



tendencia polar (de fuerte asociación), donde la viscosidad resulta más elevada en la mezcla que en los componentes puros^{15,16}.

Los disolventes más utilizados en CLAE son:

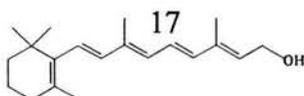
POLARES	NO POLARES
AGUA	TOLUENO
ACETONITRILO	CLOROFORMO
METANOL	CLORURO DE METILENO
	HEXANO

Los disolventes más utilizados en fase inversa son:

- ❖ AGUA: Es el disolvente de mayor aplicación en CLAE. Se pueden adquirir comercialmente agua de calidad cromatográfica, o bien puede ser purificada por el mismo usuario. El agua destilada y desionizada que es muy útil para aplicaciones de laboratorio, puede encontrar serias limitaciones en CLAE, la razón de ello es la presencia de sustancias orgánicas como ftalatos, cloramidas, etc.
- ❖ METANOL: El metanol es el disolvente orgánico más utilizado en fase inversa, en mezcla con agua, ya que tiene mayor poder de disolución de sales y reactivos. Tiene baja toxicidad y es fácil de purificar industrialmente, siendo el disolvente de grado HPLC más barato. Sus principales desventajas con respecto al acetonitrilo son: que tiene mayor afinidad por el oxígeno y que genera presiones mayores en el sistema cromatográfico.
- ❖ ACETONITRILO: Es higroscópico por lo cual se tiene que almacenar en lugares secos y bien cerrados. Es un disolvente caro por las dificultades que presenta su purificación. Se le obtiene como subproducto de síntesis del acrilonitrilo, materia prima para la producción de cauchos sintéticos y plásticos.

Para asegurar que no se introduzca ninguna partícula al sistema y que pueda quedar atrapada en la tubería y cause aumentos de presión no deseables, ésta contiene un filtro ya sea de acero inoxidable o de vidrio sinterizado que atrape de partículas mayores 0.45µm (por lo menos).

A la fase móvil que se utilice hay que eliminarle el aire (O₂ y N₂) que se encuentra disuelto en ella para que no lleguen a formarse burbujas en la tubería y éstas causen problemas en



los diferentes componentes del instrumento. Esta eliminación normalmente se puede realizar de 3 maneras:

- Manual: se filtra el disolvente y en donde se recibe se agita, con la ayuda de un ultrasonido o en un sistema que tiene un agitador magnético conectado al vacío. Ésta es la forma más económica de llevar a cabo la eliminación de aire para CLAE.
- Burbujeo con un gas inerte: el equipo tiene una tubería externa de teflón que en la parte que se introduce a la fase móvil tiene un filtro que puede ser de acero inoxidable o de vidrio sinterizado, burbujeando en la fase móvil al gas inerte (helio) y eliminando por desplazamiento al aire contenido en ésta (*figura 2.6.*).
- Filtración con membrana: los equipos automatizados actualmente antes del sistema de bombeo tienen un compartimiento que contiene un serpentín de tubería de teflón y se encuentra al vacío, los gases O₂ y N₂ son permeables en el teflón y por lo tanto son eliminados de ésta.

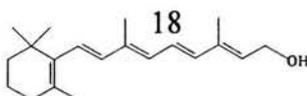
En CLAE se pueden trabajar bajo dos técnicas de elución conocidas como:

- Isocrática: se mantiene el mismo poder de elución, es decir, el disolvente o la mezcla de disolventes que constituye(n) la fase móvil se mantiene(n) igual durante todo el tiempo de análisis en el cromatógrafo.
- Gradiente de elución: se varía el poder de elución, es decir, el disolvente o la mezcla de disolventes que constituye(n) la fase móvil se va(n) variando durante el tiempo que dure el análisis en el cromatógrafo. En ésta técnica la variación del poder de elución va de baja a alta.

(b) SISTEMA DE BOMBEO

Es el dispositivo que suministra y mantiene en movimiento a la fase móvil en el sistema, debe de mantener un flujo constante, continuo, no pulsante y vencer las altas presiones que se generan en el sistema instrumental (*figura 2.7.*).

En la historia instrumental de la CLAE se han clasificado dos tipos de sistemas de bombeo, Mecánicas y Neumáticas. En este trabajo solo se menciona el sistema que tiene el instrumento utilizado y que son las utilizadas en la mayoría de los equipos comerciales.



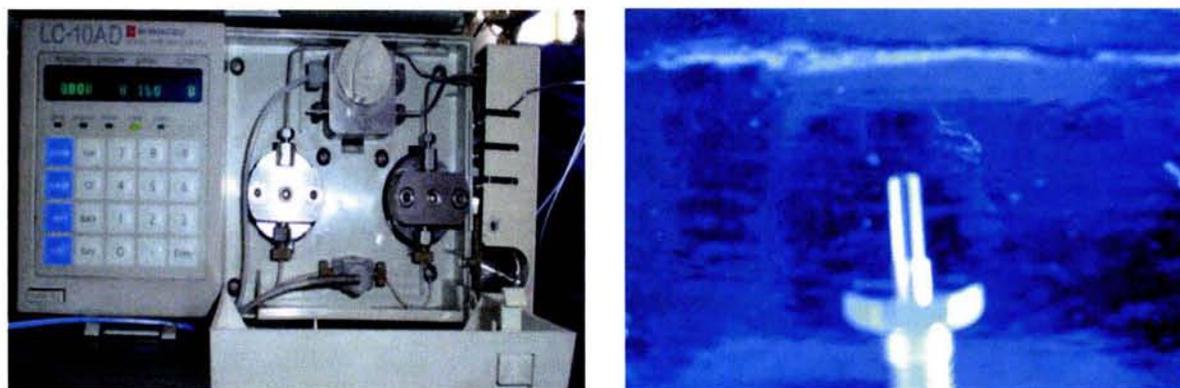


Figura 2.7. Sistema de bombeo del cromatógrafo de líquidos marca Shimadzu (izquierda), pistón de la bomba (derecha).

Mecánica

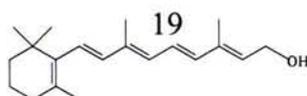
Bombas recíprocas de pistón

Estas bombas funcionan mediante el movimiento de un pistón, que carga a la cabeza de la bomba de fase móvil, mediante unas válvulas que alternadamente se abren y cierran (conocidas como válvulas “check” por su nombre en inglés y que en general son unas pequeñas bolas de cuarzo o zafiro), esto provoca que se llene y se vacíe de modo alternativo la cámara que se ubica en la cabeza de la bomba (*figura 2.7.*).

Estas bombas cumplen con todas las condiciones para trabajar en CLAE a excepción de que se produce un flujo continuo pero pulsante, por lo que para eliminar este problema se trabaja con dos pistones sincronizados en el sentido en que mientras una de ellas está cargando fase móvil la otra está enviándola al sistema cromatográfico restante, por lo que también se conocen como bombas recíprocas, además para disminuir más esta pulsación la fase móvil que sale del sistema de bombeo se manda a un tramo de tubería con diámetro mayor que la tubería capilar que se utiliza en el sistema, lo que disminuye en su totalidad esta pulsación.

(C) SISTEMA DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA

El dispositivo por el cual se introduce normalmente la muestra al sistema se le conoce como válvula de inyección o válvula de seis pasos o vías (*figura 2.8.*), para introducir la muestra a esta válvula de manera manual se utiliza una jeringa y en caso de estar automatizado se utilizan válvulas de inyección automáticas. Están constituidas por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un bucle o tubería de muestra externo (“loop” por su nombre en inglés) en el que se introduce la muestra (*figura 2.9.*).



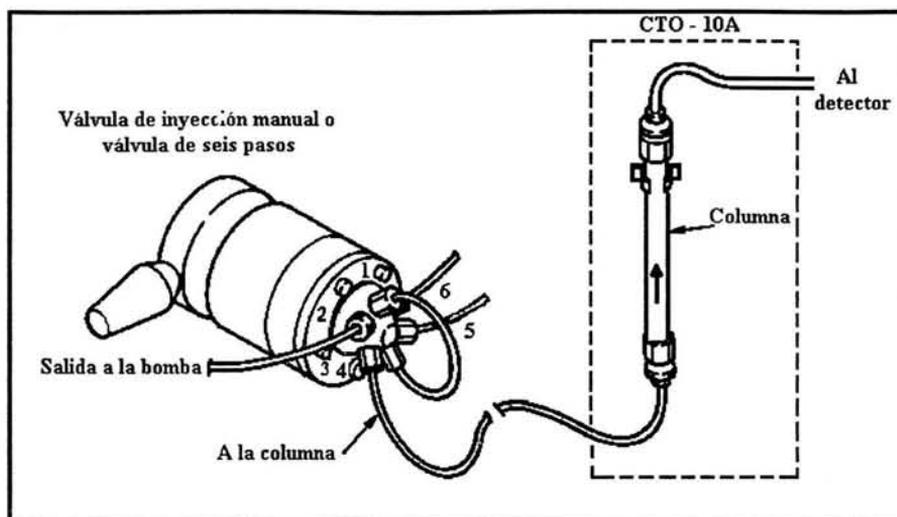


Figura 2.8. Válvula de inyección o válvula de seis pasos manual utilizada en el instrumento en que se realizó este trabajo (diagrama proporcionada por la Cia. Shimadzu).

Los volúmenes de inyección en válvulas manuales que normalmente se manejan van de los 5 a 200 μ l (en válvulas de inyección automática se pueden inyectar volúmenes más pequeños que 5 μ l). La muestra, disuelta en la fase móvil o en alguno de los disolventes que la formen se introduce a la válvula en la posición de carga. En la *figura 2.9.* se muestran las diferentes posiciones de la válvula de 6 pasos o vías.

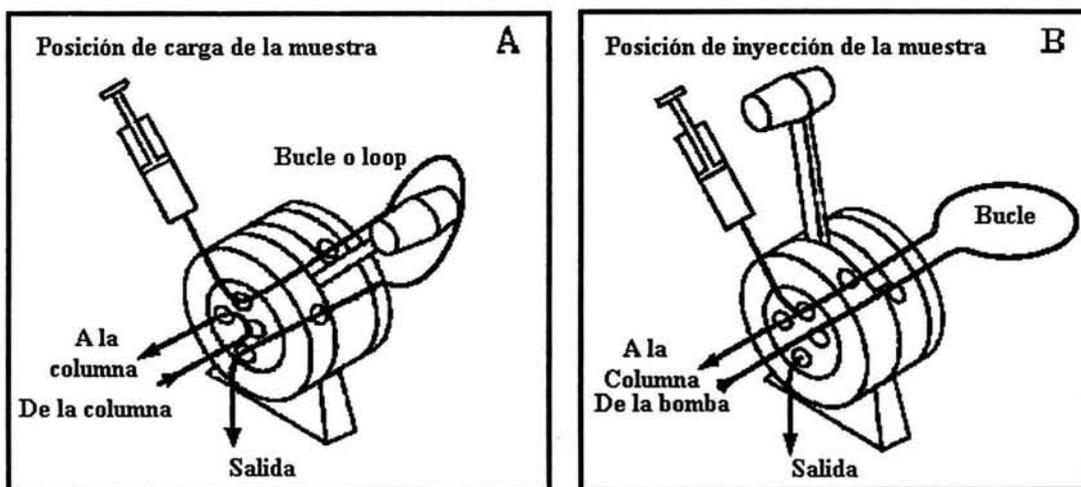
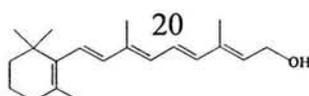


Figura 2.9. La figura A indica la posición de carga de la muestra, la jeringa llena el bucle y la fase móvil pasa de la bomba a la columna. La figura B indica la posición de inyección de la muestra, el bucle queda inserto entre la bomba y la columna, de tal forma que la fase móvil arrastra la muestra hacia la columna.



(d) SISTEMA DE SEPARACIÓN

Se compone de una columna analítica que contiene a la fase estacionaria y en algunos casos algún aditamento (como una chaqueta) de calentamiento. La columna analítica es de tipo empacada, y esta formada por un segmento de tubería que es generalmente de acero inoxidable que le permite soportar altas presiones y cuyas dimensiones normalmente varían en los siguientes intervalos: diámetro interno de 2 a 5mm y con una longitud de 5 a 25cm, esta tubería contiene la fase estacionaria y la naturaleza de ésta dependerá de que tipo de técnica cromatográfica se requiera trabajar para separar a los compuestos que constituyen la muestra, como se indicó en la clasificación general de la cromatografía (intercambio iónico, fases químicamente unidas, etc.) y cuyo tamaño de partícula de este empaque oscila entre 3 a 5 μ m. (figura 2.10)

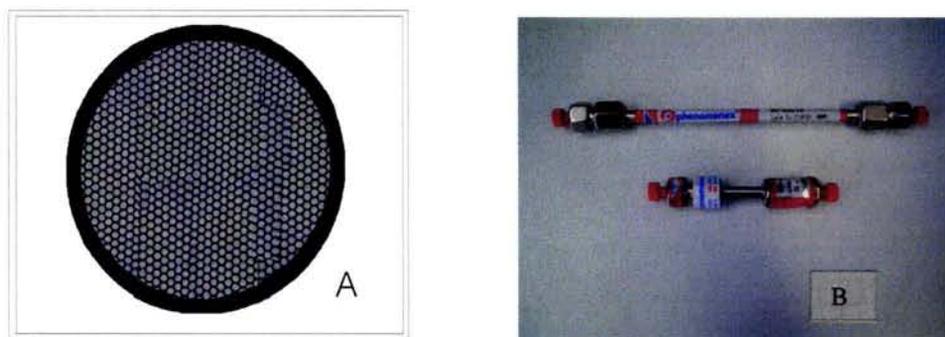


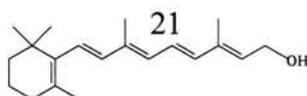
Figura 2.10. La figura A) es la vista frontal de cómo se encontraría el empaque de una columna empacada y la figura B) son dos tipos de columna donde se puede observar que la longitud varía y por tanto su diámetro.

La fase estacionaria que se utilizó en este trabajo fue una fase químicamente unida (Nucleosil C18), que tiene unida químicamente un octadecil $[-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3]$, al tener unido este grupo funcional no polar le confiere a la fase estacionaria característica no polar por lo tanto la técnica utilizada fue la cromatografía de fase inversa.

(e) SISTEMA DE DETECCIÓN

Este dispositivo debe permitir medir en forma continua (a flujo continuo) alguna propiedad física de los componentes de la muestra o de la fase móvil, generando una señal proporcional a la concentración de la muestra medida a la salida de la columna¹.

Las características que deben cumplir los detectores son:



- Respuesta universal o selectiva: dependiendo de la respuesta que presenten los compuestos que formen la muestra al fenómeno físico que genere el detector nos indicará que, en caso de responder todo tipo de compuestos el detector será universal o si solo responden alguna o algunos de ellos al fenómeno, será de tipo selectivo.
- Sensibilidad: es la razón entre la señal generada y la mínima cantidad de un compuesto que produce una señal diferente al ruido presente en la línea base del cromatograma.
- Ruido: variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra sino a cambios como fluctuaciones en el voltaje, variaciones de flujo, temperatura, etc.
- Linealidad: es la relación lineal con la concentración del analito en estudio, que en caso de cumplirse permite utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa.
- Estabilidad: representa la estabilidad que presenta un buen detector, y se espera que sea insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo.

En CLAE los detectores más utilizados se pueden clasificar en dos grandes grupos por el área en que se clasifica el fenómeno físico que se mide:

Espectroscópicos

- Esp. de UV-Vis
- Esp. de Fluorescencia
- Refractometría
- Esp. de Masas

Electroquímicos

- Conductímetro
- Amperímetro
- Voltamperímetro
- Coulombimetría

El detector utilizado en este trabajo fue un Espectrofotómetro de UV-Vis de longitud de onda variable por lo que se explicará de manera más detallada el uso de este detector (*figura 2.11*).

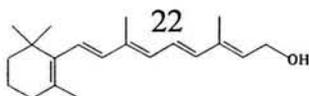




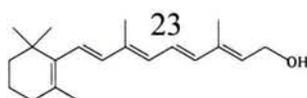
Figura 2.11 Detector de UV-Visible de longitud de onda variable marca Shimadzu.

Espectrofotómetro de UV-Visible

Se basa en la absorción de la radiación electromagnética en la región del ultravioleta cercano y el visible (de los 180-1100nm) por parte de la muestra, se pueden trabajar con este detector compuestos orgánicos que contienen dobles ligaduras conjugadas, sistemas aromáticos, algunos aniones de compuestos inorgánicos y los cationes de los metales de transición. Este detector es de tipo selectivo.

Existen tres tipos de detectores basados en espectrofotómetros UV-Vis que se venden comercialmente:

- Fotómetros de longitud de onda fija que utilizan filtros como sistema dispersivo o monocromático y normalmente pueden trabajar a 254 y 284nm.
- Espectrofotómetros de longitud de onda variable de tipo dispersivo, los cuales tienen un sistema dispersivo o monocromático que permite variar la longitud de onda que se quiera trabajar, lo que permite poder optimizar la sensibilidad de este detector comparado a los obtenidos por los fotómetros de longitud de onda fija (*figura 2.11*).
- Espectrofotómetro de arreglo de diodos que utiliza un espejo holográfico que realiza una primera dispersión de la radiación electromagnética y la dirige al detector conocido como arreglo de diodos, estos diodos responden de manera específica para cada fotón por lo que se tiene una respuesta inmediata, es decir se obtiene el espectro UV-Vis completo conforme se va generando el cromatograma por lo que se puede tener el espectro de cada uno de los picos cromatográficos y también se pueden generar varios cromatogramas a diferentes longitudes de onda al mismo tiempo, lo cual no es posible realizar con los sistemas dispersivos, hay que indicar que este detector requiere tener como sistema de



registro una computadora por el hecho de la cantidad de almacenaje y procesamiento que realiza de los espectros obtenidos.

Dependiendo del detector que se tenga así como del compuesto con que se trabaje, en la mayoría de las muestras pueden detectarse cantidades de compuestos del orden de los nanogramos¹⁶, en condiciones optimas se pueden obtener valores de hasta 0.005 unidades de absorbancia lo que implica que pueden permitir una sensibilidad en el orden de las ppb y ppm lo que la hace altamente sensible.

Presentan en general buena estabilidad lo que implica que no se ven afectados por cambios de flujo o temperatura.

(f) SISTEMA DE REGISTRO^{1, 15,16}

La función que cumple este dispositivo es la de representar en forma gráfica la señal generada por los compuestos en el detector con respecto al tiempo en que estos van saliendo de la columna y llegando al detector, esto se puede lograr mediante un registrador, un integrador electrónico (*figura 2.12*) o una computadora, este gráfico se conoce con el nombre de cromatograma.

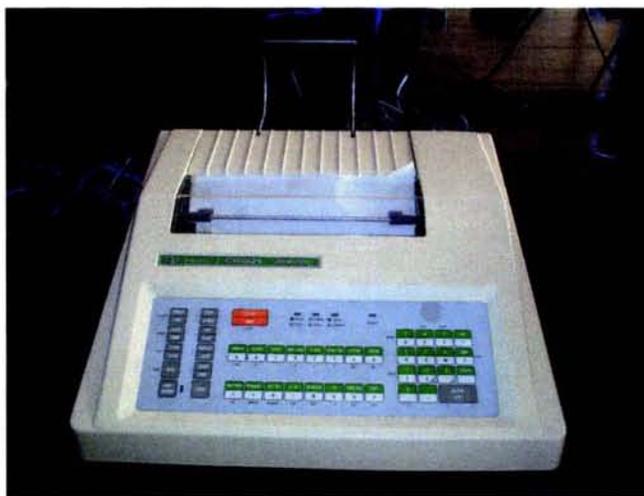
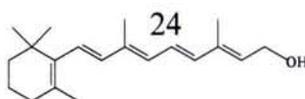


Figura 2.12. Integrador electrónico marca Shimadzu.

Cromatograma

Según la IUPAC se define como “un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo”



El cromatograma comienza en el momento en que es inyectada la muestra. A partir de ese momento se tienen varias señales en el cromatograma, a continuación se describen algunas de ellas.

- 1) Línea base: es la línea recta que aparece en el cromatograma cuando solo sale de la columna el eluyente. (figura 2.13.)
- 2) Tiempo muerto (t_0): es el tiempo que tarda en eluir una muestra que no es retenida en la fase estacionaria. (figura 2.13.)
- 3) Tiempo de retención (t_r): es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico del compuesto. (figura 2.13.)
- 4) Tiempo de retención ajustado o corregido (t'_r): es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria, se calcula como la diferencia entre el t_r y el t_0 . (figura 2.13.)
- 5) Área de pico: este parámetro permite determinar la concentración de cada componente separado en la fase estacionaria. (figura 2.13.)
- 6) Ancho del pico: es la medida que se puede tener del ancho en la base del pico (W_b), o el ancho a la mitad del pico ($W_{1/2}$). (figura 2.13.)

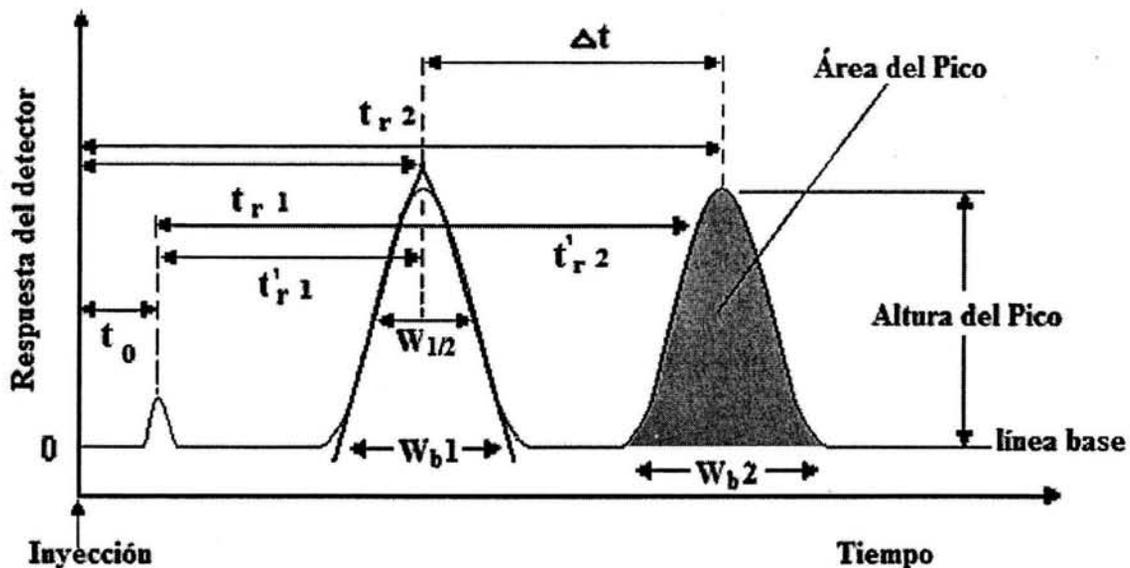
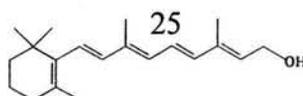


Figura 2.14. Cromatograma típico y algunos parámetros de medición frecuente.



VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA^{2, 10,13.}

La validación se define como el grado de validez de un proceso de medición. La validación de un método analítico se lleva a cabo según los fines para los cuales se aplicará éste. En general los parámetros que se evalúan normalmente en una validación analítica instrumental son: condiciones óptimas de trabajo de la técnica a utilizar, linealidad, precisión, reproducibilidad y repetibilidad del método, exactitud, cantidad mínima detectable, tolerancia del sistema y estabilidad de la muestra. Mencionaremos aquellos que se determinaron en este trabajo.

1) Desarrollo de la separación cromatográfica

De los cromatogramas obtenidos de una mezcla de vitaminas liposolubles (como es el caso de la vitamina A) se calcularon los siguientes parámetros cromatográficos con el fin demostrar que se tienen las condiciones adecuadas en el sistema cromatográfico para cuantificar la vitamina A en presencia de otros derivados de ésta y otras vitaminas liposolubles que podrían ser extraídas en tratamientos de muestras reales. Estos parámetros fueron:

a) Eficiencia

La eficiencia se define como la capacidad que tiene la columna analítica (y que contiene la fase estacionaria) para separar los compuestos de una mezcla, también se puede definir como:

$$\text{EFICIENCIA} = \text{Número de platos teóricos} = \text{Número de equilibrios}$$

De manera práctica la ecuación que se utiliza para calcular la eficiencia es:

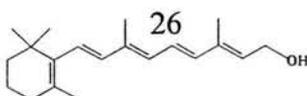
$$N = 5.545 \left(\frac{tr'}{W_{1/2h}} \right)^2$$

donde:

N = eficiencia.

tr' = tiempo de retención corregido = tr - to.

tr = tiempo de retención.



t_0 = tiempo muerto.

$W_{1/2h}$ = ancho a la mitad de la altura del pico.

b) Selectividad

Da una idea de la afinidad que tienen los compuestos que forman la muestra con la fase estacionaria, la ecuación para su cálculo práctico es la siguiente:

$$\alpha = \frac{tr'_2}{tr'_1}$$

donde:

α = selectividad.

tr'_2 = tiempo de retención corregido del compuesto que tarda más en eluir.

tr'_1 = tiempo de retención corregido del compuesto que tarda menos en eluir.

c) Factor de capacidad

Se define como la masa del analito en la fase estacionaria entre la masa del analito en la fase móvil, y está relacionada de manera directa a la constante de equilibrio, para su cálculo práctico la ecuación utilizada es la siguiente:

$$k' = \frac{tr'}{t_0}$$

donde:

k' = factor de capacidad.

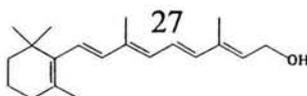
tr' = tiempo de retención corregido.

t_0 = tiempo muerto.

d) Resolución

La resolución nos indica cuantitativamente que tan separada está el área de un pico con respecto a otro, la ecuación práctica para calcularla es:

$$Rs = 1.18 \left(\frac{\Delta tr}{W_{1/2h1} + W_{1/2h2}} \right)$$



donde:

R_s = resolución.

Δt_r = diferencia de los tiempos de retención de los 2 compuestos en los que se mide la resolución.

$W_{1/2h1}$ = ancho a la mitad del pico del compuesto 1.

$W_{1/2h2}$ = ancho a la mitad del pico del compuesto 2.

2) Linealidad del sistema

La linealidad es el grado al cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta, es importante especificar en que intervalo sucede esto. Se puede calcular la linealidad del sistema y la linealidad del método.

Se debe probar que la variable dependiente es directamente proporcional a la variable independiente, por lo cual se hace una regresión lineal, en el caso de la linealidad del sistema la variable dependiente es la respuesta o señal y la variable independiente es la concentración del estándar, además de que se espera que tienda al origen (ordenada a cero).

En el caso de la validación de la linealidad del sistema en la mayoría de los criterios de aceptación internacionales se espera que además de observarse gráficamente una tendencia lineal el valor de correlación de la regresión lineal aplicada a los datos de una curva patrón cumpla por lo menos:

$$r \geq 0.98$$

Si se cumple la linealidad se establece una prueba de hipótesis para la ordenada al origen para comprobar si los resultados experimentales se ajustan a una línea recta con ordenada al origen 0 ó no, basados en la ecuación:

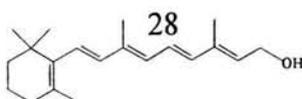
$$Y = \gamma X + \beta$$

La prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen es:

H_0 : $b = \beta$, donde $\beta = 0$ (Hipótesis nula)

H_1 : $b \neq \beta$ (Hipótesis alterna)

El estadístico de prueba utilizada es la "t de Student" para n-2 grados de libertad ya que los coeficientes de regresión β (ordenada al origen) y γ (pendiente) fueron remplazados por las estimaciones de mínimos cuadrados, para esto se realiza el análisis de los datos para obtener una "t calculada" con los datos experimentales que se compara con la "t de tablas":



$$t_{cal.} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + n\bar{X}^2}}$$

donde:

b = Ordenada al origen.

β = Ordenada al origen poblacional ($\beta = 0$).

Se = Error típico de estimación.

Sxx = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones.

\bar{X} = Media experimental.

El error típico de estimación se calcula, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n - 2)nS_{xx}}}$$

donde:

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)$$

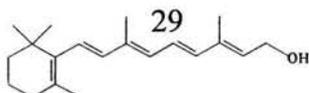
El criterio aplicado para rechazar la hipótesis nula es:

$$t_{exp} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{exp} > t_{\alpha/2}$$

Se trata de un ensayo bilateral ó de dos colas, donde α es el nivel de significancia, que en este trabajo se tomará del 5% ($\alpha = 0.05$), que corresponde a un valor usual de riesgo de cometer un error tipo I y que se toma a nivel internacional en la realización de la mayoría de las metodologías analíticas.

Posteriormente se calcular el intervalo de confianza (IC) para la ordenada al origen con el mismo nivel de significancia se utiliza la ecuación:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$$



Y se calcula el intervalo de confianza (IC) para la pendiente con el mismo nivel de significancia se utiliza la ecuación:

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

3) Precisión del sistema

La precisión se define como el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad, en una validación de la técnica se calcula la precisión del sistema.

Los resultados de este ensayo normalmente no deben diferir en más del 2% de la desviación estándar relativa para órdenes de concentración altas y no más del 5% para concentraciones del orden de las trazas por tratarse de un método cromatográfico.

Para realizar esto se hacen pruebas de hipótesis con los datos obtenidos, con el siguiente criterio.

La hipótesis nula para el caso de precisión del sistema es:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = \text{es el 2\% ó 5\% del área.}$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de variancia σ_0^2 , se utiliza la prueba de χ^2 con n-1 grados de libertad:

$$\chi_{cal.}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2}$$

donde:

n = Número de determinaciones.

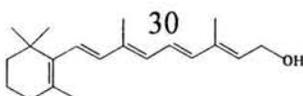
s = Desviación estándar muestral.

σ_0 = Desviación estándar máxima aceptada.

El intervalo de confianza al nivel de $1 - \sigma$, para σ^2 es:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2} < \sigma^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para σ con el mismo nivel $1 - \sigma$.



$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}}$$

Se consideran de dos colas iguales, a pesar de que la distribución χ^2 no es simétrica para evitar cálculos complicados.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$\chi_{calculada}^2 > \chi_{\alpha}^2$$

$$\chi_{calculada}^2 > \chi_{0.05}^2$$

4) Precisión del método

En el caso de lo que se conoce como precisión del método se realizan 2 pruebas estadísticas que se conocen con el nombre de repetibilidad y reproducibilidad.

Hay que indicar que en este trabajo no se desarrolló una metodología sino nada más se optimizó la técnica por lo que formalmente no se debe calcular la repetibilidad y la reproducibilidad, pero si se pueden aplicar estas pruebas para darnos una idea de que el instrumento es estable, ya sea que lo use el mismo analista así como lo use otro analista trabajando aproximadamente a las mismas condiciones de operación del instrumento y de la concentración de los estándares.

Repetibilidad

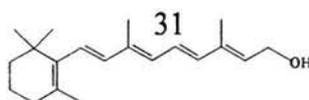
La repetibilidad está definida como el grado de concordancia entre determinaciones independientes de soluciones con una concentración conocida, provenientes de una solución madre, que contiene una muestra homogénea del producto. Los ensayos son realizados por el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo.

La hipótesis nula para el caso de precisión del sistema es:

$$H_0: s^2 = \sigma^2$$

Para calcular σ^2 se toma el siguiente criterio, ya que el porcentaje de recuperación \cong 100% y como ya se mencionó ésta puede estar entre el 2% ó 5%, por lo tanto ésta estará entre 2 y 5.

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$



Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de variancia σ^2_0 , se utiliza la prueba de χ^2 con n-1 grados de libertad:

$$\chi^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma^2_0}$$

donde:

n = Número de determinaciones.

s = Desviación estándar muestral.

σ_0 = Desviación estándar máxima aceptada.

El intervalo de confianza al nivel de $1 - \sigma$, para σ^2 es:

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2} < \sigma^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}$$

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para σ con el mismo nivel $1-\sigma$.

$$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

Se consideran de dos colas iguales, a pesar de que la distribución χ^2 no es simétrica para evitar cálculos complicados.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{0.05}$$

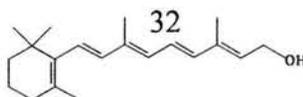
Reproducibilidad

La reproducibilidad está definida como el grado de concordancia entre determinaciones independientes de soluciones con una concentración conocida, proveniente de una solución madre, que contiene una muestra homogénea del producto. Los análisis los puede realizar el mismo analista en diferentes instrumentos o diferentes analistas en el mismo instrumento.

La reproducibilidad del método se determina con la comparación de las variancias y de las medias de los resultados obtenidos por los dos analistas en días diferentes.

La prueba de hipótesis sobre las variancias quedaría:

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$$



$$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

Como se trata de determinar si las dos muestras provienen de poblaciones iguales, se utiliza el estadístico F de Snedecor, que se calcula:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

donde:

s_1^2 = Variancia muestral mayor con n_{M-1} grados de libertad.

s_2^2 = Variancia muestral mayor con n_{m-1} grados de libertad.

NOTA: n_M debe ser el número de datos con el valor de variancia mayor y n_m es el número de datos con el valor de variancia menor.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2} (n_{M-1}, n_{m-1} \text{ grados de libertad})$$

Una vez sabiendo el resultado de la prueba de hipótesis de las variancias, se realiza la prueba de hipótesis sobre las medias, estableciendo como pruebas de hipótesis:

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$, es decir $\mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

Se utilizó la siguiente ecuación para obtener el resultado de esta prueba, para esto se realiza la prueba “t de student”, por lo tanto se realiza el cálculo de la “t calculada” de la siguiente manera:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

Lo que nos indica que no deberá haber diferencia significativa entre los ensayos.

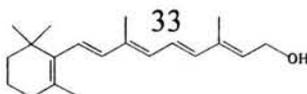
Se rechaza la hipótesis nula si:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

con grados de libertad de $n_1 + n_2 - 2$.

5) Estabilidad de los estándares

Se trata de observar en este ensayo el efecto que tiene el disolvente sobre la vitamina A. Para ello se dejan las muestras ya preparadas a temperatura ambiente, bajo la luz solar o en refrigeración. El objetivo es establecer las condiciones de almacenamiento de las muestras. Se



recomienda un mínimo de 16 horas de almacenamiento. Es posible utilizar las muestras de reproducibilidad del analista 1, del día uno.

Las pruebas de hipótesis es sobre las variancias para este estudio y quedaría como:

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$$

$$H_1: \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$$

Como se trata de determinar si las dos muestras provienen de las mismas poblaciones con variancias iguales, se utiliza el estadístico F de Snededor:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

donde:

s_1^2 = Variancia muestral mayor con n_{M-1} grados de libertad.

s_2^2 = Variancia muestral mayor con n_{m-1} grados de libertad.

NOTA: n_M debe ser el número de datos con el valor de variancia mayor y n_m es el número de datos con el valor de variancia menor.

Se rechaza la prueba de hipótesis nula si:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}$$

con grados de libertad de n_{M-1} , n_{m-1} .

Después de realizar la prueba anterior y si se demuestra que las variancias son iguales (es lo que se espera para esta prueba) y si se trata de muestras pequeñas e independientes se realiza el estadístico de prueba “t de student” sobre las medias.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir } \mu_1 = \mu_2$$

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

Utilizando la siguiente ecuación para el cálculo de la “t calculada”:

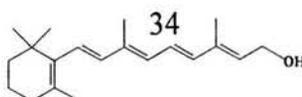
$$t_{cal.} = \frac{\bar{x}_1 + \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

Es decir no deberá haber diferencia significativa entre los ensayos antes y después del almacenamiento de las muestras.

Se rechaza la prueba de hipótesis nula si:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

con grados de libertad de $n_1 + n_2 - 2$.



CAPÍTULO 3

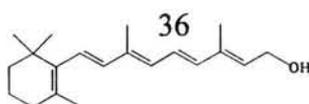
DESARROLLO EXPERIMENTAL

INSTRUMENTACIÓN

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia modular marca Shimadzu que permite trabajar con gradiente de elución, esta formado de las siguientes partes:
 - Desgasificador modelo HD-1.
 - Mezclador de baja presión modelo FCV-10AL.
 - Sistema de bombeo modelo LC-10AD.
- Válvula de inyección marca Rheodyne con tubería para inyectar 10µl de muestra.
- Columna empacada de fase estacionaria químicamente unida de Nucleosil C18, de 150mm de longitud x 4mm de d.i. y tamaño de partícula de 5µm con porosidad de 100Å.
- Detector UV-VIS modelo SPD-10AV de longitud de onda variable.
- Espectrofotómetro UV-Vis marca Perkin-Elmer modelo Lambda 11 de un solo haz.
- Balanza analítica modelo Sartorius BL-120S de peso máximo de 120g y sensibilidad de 0.1mg.

MATERIAL VOLUMÉTRICO

- Micropipeta de émbolo marca Trasferpette Certificado ISO 9001-14001, de intervalo de volumen de 0.5-5ml.
- Matraces aforados de 10ml marca Blaubrand, volumen nominal 10.0ml, valor medio 10.0054ml, tolerancia ± 0.0400 ml Certificado ISO 1042 y número de lote 03.04.



REACTIVOS

Compuesto	Fórmula	Grado	Compañía	No. de lote
Metanol	CH ₃ OH	Nanogrado	Mallinckrodt	5160 V12401
Agua	H ₂ O	ASTM Tipo 1	Obtenida con equipo Millipore	-----
Acetonitrilo	CH ₃ CN	R.A.	Mallinckrodt	H076 M51D56
Retinol sintético	C ₂₀ H ₃₀ O	95%	SIGMA	063K5004
Vitamina K ₃	C ₁₁ H ₈ O ₂	98%	Chem Service	306-77C
Vitamina K ₁	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	98%	Chem Service	306-115B
Vitamina E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	98%	Chem Service	306-76B
Vitamina D ₂	C ₂₈ H ₄₄ O	98%	Chem Service	306-112A
Vitamina D ₃	C ₂₇ H ₄₄ O	99%	Chem Service	310-90D
Palmitato de vitamina A	C ₃₆ H ₆₀ O ₂	98%	Chem Service	301-139A
Acetato de vitamina A	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	98%	Roche	Donativo

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

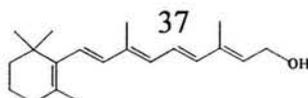
Para conocer las condiciones óptimas de trabajo en el instrumento utilizado en la metodología propuesta se llevaron a cabo los siguientes pasos de trabajo experimental:

1.- Se trabajaron las siguientes soluciones (aprox. 100ppm):

- Acetato de vitamina A en acetonitrilo.
- Acetato de vitamina A en metanol.
- Acetato de vitamina A en agua.
- Palmitato de vitamina A en acetonitrilo.
- Palmitato de vitamina A en metanol.
- Palmitato de vitamina A en agua.
- Retinol en metanol.

Se registraron los espectros UV-Vis a las siguientes condiciones de trabajo:

- Intervalo de longitud de onda: 200-400nm
- Velocidad de barrido: 240nm/min
- Resolución: 1nm



Las muestras fueron disueltas en estos tres diferentes disolventes debido a que son los que se podían utilizar como fase móvil en la técnica de fase inversa por CLAE a utilizar, y con el fin de conocer la(s) longitud(es) de onda de máxima absorción en que se puede llevar a cabo el estudio con el detector UV-Vis del cromatógrafo.

2.- Después se procedió a realizar las pruebas de optimización en el cromatógrafo de líquidos para obtener la mejor resolución (≥ 1.5) y el menor tiempo de análisis utilizando las siguientes soluciones:

- Acetato de vitamina A en acetonitrilo.
- Palmitato de vitamina A en metanol.
- Retinol en metanol.

Para variar el poder de elución de la fase móvil se trabajaron soluciones de 10%agua/90%metanol hasta 1%agua/99%metanol. Se calculó la resolución para estas pruebas y el tiempo de análisis.

3.- Una vez encontrado el mejor poder de elución se varió el flujo para disminuir en lo posible los tiempos de retención de los compuestos y con ello lograr acortar el tiempo de análisis manteniendo la resolución ≥ 1.5 , para ello se trabajó en un intervalo de 1 a 2ml/min.

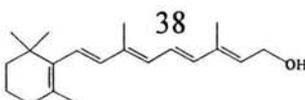
VALIDACIÓN

Una vez encontradas las condiciones de trabajo mencionadas se realizó la validación de la técnica CLAE, realizando las siguientes etapas a esas condiciones óptimas:

1) Desarrollo de la separación cromatográfica

Para calcular los parámetros cromatográficos N , k' , α y R_s de la vitamina A con respecto a las otras vitaminas liposolubles que pueden obtenerse en muestras reales, se preparó una solución de Retinol en metanol de 11ppm, ésta se inyectó en el cromatógrafo a las condiciones óptimas mencionadas en la parte de condiciones óptimas de trabajo, luego se le adicionó a esa misma solución acetato de vitamina A y se registró su cromatograma a esta nueva solución, posteriormente se le fue adicionando una a una las vitaminas D_3 , D_2 , K_3 , K_1 y E, realizando el procedimiento anterior cada vez que se le adicionaba una de las vitaminas.

Se calcularon los parámetros cromatográficos mencionados entre los picos adyacentes al Retinol en el cromatograma que tiene toda la mezcla de las vitaminas liposolubles.



2) Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se obtuvo analizando por duplicado soluciones estándar en un intervalo de concentración de 1 a 100ppm (mg/L) y soluciones estándar en un intervalo de concentración de 4 a 12ppm (mg/L), en días diferentes. Cada solución estándar en esos días fue inyectada por triplicado.

Preparación de las muestras

Para la curva patrón de un intervalo de concentración de 1 a 100ppm, se pesaron 10.9mg de Retinol y se aforaron a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose una solución madre de 1,090ppm, de la solución madre se tomaron ocho alícuotas diferentes para preparar ocho soluciones estándar en el intervalo de 1 a 100ppm, las concentraciones finales de las soluciones patrón se encuentran en la parte de resultados en las *tablas 4.3, 4.3.1, 4.3.2*.

Para la curva patrón de un intervalo de concentración de 4 a 12ppm, se pesaron 1.2mg de Retinol y se aforaron a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose una solución madre de 120ppm, de la solución madre se tomaron cinco alícuotas diferentes para preparar cinco soluciones patrón en el intervalo de concentración de 4 a 12ppm, las concentraciones finales de las soluciones patrón se encuentran en la parte de resultados en la *tabla 4.4*.

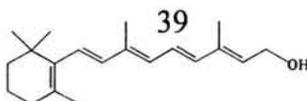
3) Precisión del sistema

Se calculó la precisión del sistema preparando por duplicado siete soluciones estándar de dos diferentes ordenes de concentración 8ppm y 50ppm e inyectando a éstas por triplicado. Esto se realizó para obtener mayor información al aplicar esta prueba.

Los valores de estas disoluciones se eligieron por ser las partes medias (o centroides) de las curvas patrón que se realizaron para la prueba de linealidad.

Las primeras catorce soluciones fueron preparadas de la siguiente manera:

Para las soluciones de 8ppm se pesaron 10.1mg de Retinol y se aforaron a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose una solución madre de 1,010ppm, se tomó una alícuota de 1ml de la solución madre y se aforó a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose una solución secundaria de concentración de 101ppm, de la solución secundaria se tomaron siete alícuotas iguales de 0.8ml (800µl) y se aforaron a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose las siete soluciones estándar de concentración de 8.08ppm (*tablas 4.5*).



Para las soluciones de 50ppm se tomaron siete alícuotas iguales de 0.5ml (500 μ l) de la solución madre y cada una se aforó a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose las siete soluciones estándar de 50.5ppm (*tablas 4.7.*).

Las catorce soluciones restantes fueron preparadas de la siguiente manera:

Para las soluciones de 8ppm se pesaron 10.5mg de Retinol y se aforaron a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose una solución madre de 1,050ppm, se tomó una alícuota de 1ml de la solución madre y se aforó a un volumen de 10ml con metanol obteniéndose una solución secundaria de concentración de 105ppm, de la solución secundaria se tomaron siete alícuotas iguales de 0.77ml (770 μ l) y se aforaron a un volumen de 10ml con metanol obteniendo las siete soluciones estándar de concentración de 8.9ppm (*tablas 4.6.*).

Para las soluciones de 50ppm se tomaros siete alícuotas iguales de 0.5ml (500 μ l) de la solución madre y cada una se aforó a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose las siete soluciones estándar de 52.5ppm (*tablas 4.8.*).

4) Precisión del método

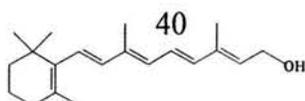
Repetibilidad

Se calculó la repetibilidad preparando por duplicado siete soluciones estándar de dos diferentes órdenes de concentración 8ppm y 50ppm e inyectando a éstas por triplicado.

La manera en que fueron preparadas estas soluciones está indicada en la parte de precisión del sistema, ya que se utilizaron los mismos estándares de concentración 8.08, 8.09 50.5 y 52.5ppm que se prepararon para realizar dicha prueba (*tabla 4.9, 4.10, 4.11 y 4.12.*).

Reproducibilidad

Se calculó la reproducibilidad con dos diferentes analistas que prepararon cada uno catorce soluciones estándar, preparando siete soluciones de dos diferentes órdenes de concentración 8ppm y 50ppm e inyectando a éstas por triplicado.



Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

“Analista 1”

Para las soluciones de 50ppm, se pesaron 10.5mg de Retinol y se aforaron a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose una solución madre de 1,050ppm, se tomaron siete alícuotas iguales de 1ml (1,000 μ l) de la solución madre y cada una se aforó a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose las siete soluciones estándar de 52.5ppm (*tabla 4.13.*).

Para las soluciones de 8ppm se tomó una alícuota de 1ml de la solución madre y se aforó a 10ml con metanol, obteniéndose una solución secundaria con concentración de 105ppm. De la solución secundaria se tomaron siete alícuotas iguales de 0.77ml (770 μ l) y cada una se aforó a un volumen de 10ml, obteniéndose siete soluciones estándar de 8.08ppm (*tabla 4.14.*).

“Analista 2”

Para las soluciones de 50ppm, se pesaron 16.3mg de Retinol y se aforaron a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose una solución madre de 1,630ppm, se tomó una alícuota de 5ml (5,000 μ l) de la solución madre y se aforó a un volumen de 10 ml con metanol, obteniendo una solución secundaria con concentración de 815ppm. De la solución secundaria se tomaron siete alícuotas de 0.62ml cada una y se aforó a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose las siete soluciones estándar de 50.5ppm (*tabla 4.15.*).

Para las soluciones de 8ppm se tomó una alícuota de 0.62ml (620 μ l) de la solución madre y se aforó a 10ml con metanol, obteniéndose una solución secundaria con concentración de 101ppm. De la solución secundaria se tomaron siete alícuotas iguales de 0.8ml (800 μ l) y cada una se aforó a un volumen de 10ml, obteniéndose siete soluciones estándar de 8.08ppm (*tabla 4.16.*).

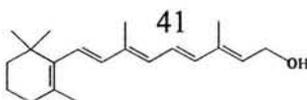
5) Estabilidad de los estándares

Esta prueba se dividió en 2 partes, la primera se realizó para realizar un estudio gráfico de la estabilidad y la segunda para realizar la prueba estadística de la estabilidad.

Para realizar estas pruebas se prepararon dos soluciones estándar, una con una concentración del orden de 8ppm y otra con concentración del orden de 50ppm, el orden de concentración fue basado bajo el mismo criterio que el planteado para el cálculo de precisión del sistema.

1.- Gráfica de estabilidad.

La manera en que fueron preparadas estas soluciones está indicada en la parte de linealidad ya que los estándares de concentración 8.4 y 43.6ppm que se prepararon para realizar la curva patrón se



tomaron para la realización de esta prueba, éstas se inyectaron por triplicado analizándolas durante cinco días diferentes en un espacio de dos semanas y los valores promedio de estos resultados se utilizaron para generar una gráfica de días vs áreas.

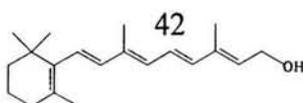
2.- Prueba estadística.

Para llevar a cabo el análisis estadístico se prepararon catorce soluciones de Retinol en metanol, siete en el orden de concentración de 8ppm y siete en el orden de concentración de 50ppm, inyectándose c/u de ellas por duplicado durante tres semanas, este estudio se realizó en dos partes, en la primera parte se compararon los resultados de la primera semana con respecto a la segunda y en la segunda parte se comparó la primera semana con respecto a la tercera semana.

Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

Para las soluciones del orden de concentración de 8ppm, éstas se prepararon pesando 9.9mg de Retinol y aforando a un volumen de 10ml con metanol, obteniéndose una solución madre con concentración de 990ppm, de esta solución se tomó una alícuota de 1ml y se aforó a un volumen de 10ml, obteniéndose una solución secundaria con concentración de 99ppm. De la solución secundaria se tomaron siete alícuotas iguales de 0.8ml (800 μ l) y cada una se aforó a un volumen de 10ml, obteniéndose siete soluciones estándar con concentración de 7.92ppm (*tabla 4.19.*).

Para las soluciones de orden de concentración de 50ppm se tomaron siete alícuotas iguales de 0.5ml (500 μ l) de la solución madre y se aforaron a un volumen de 10ml cada una, obteniéndose siete soluciones estándar con concentración de 49.5ppm (*tabla 4.20.*).



CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Espectroscopia UV-Vis

1.- De las muestras de vitamina A que se corrieron en el espectrofotómetro UV-Vis se obtuvieron los siguientes espectros:

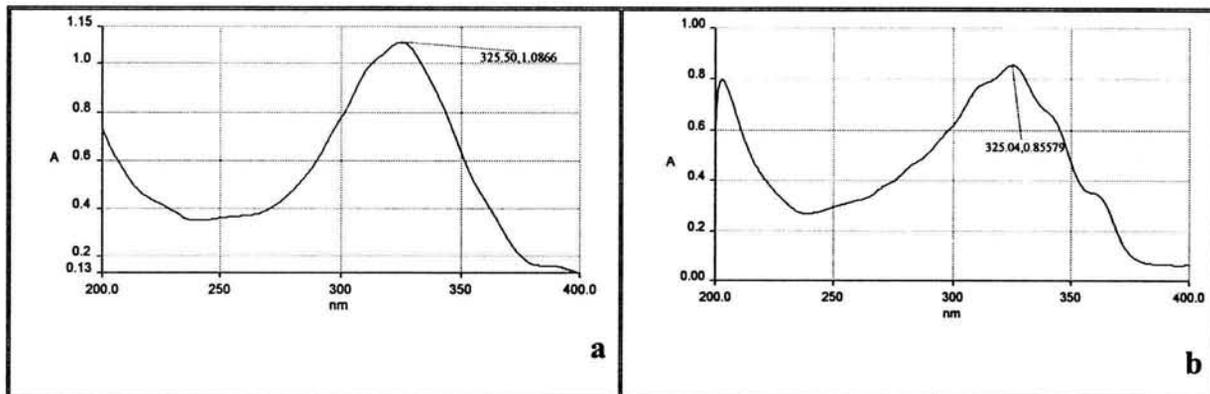


Figura 4.1. a) Espectro de acetato de vitamina A disuelta en acetonitrilo y b) Espectro de acetato de vitamina A disuelta en metanol.

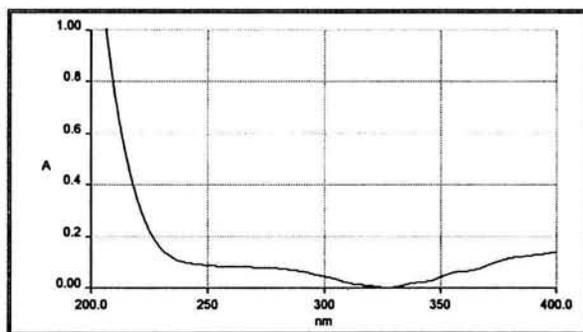


Figura 4.2. Espectro de acetato de vitamina A disuelta en agua.

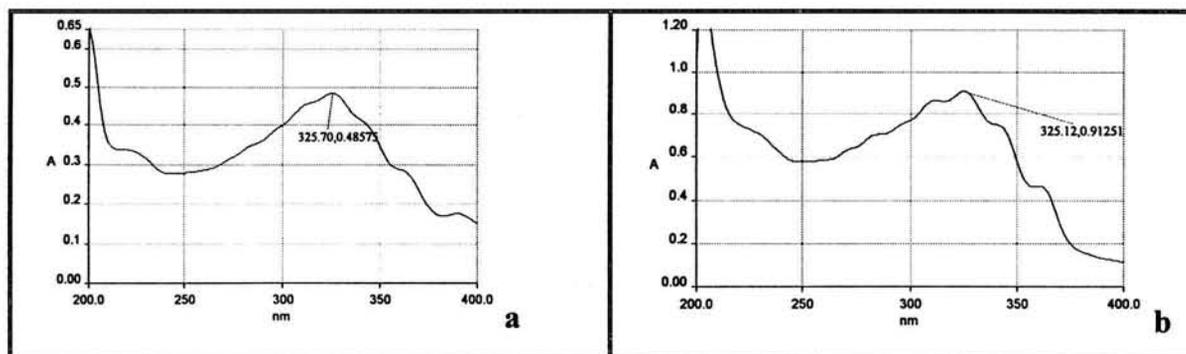
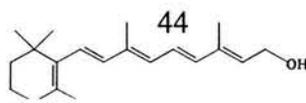


Figura 4.3. a) Espectro de palmitato de vitamina A disuelta en acetonitrilo y b) Espectro de palmitato de vitamina A disuelta en metanol.



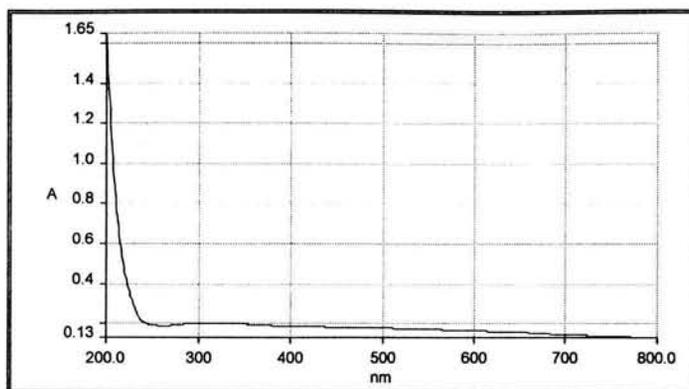


Figura 4.4. Espectro de palmitato de vitamina A disuelta en agua.

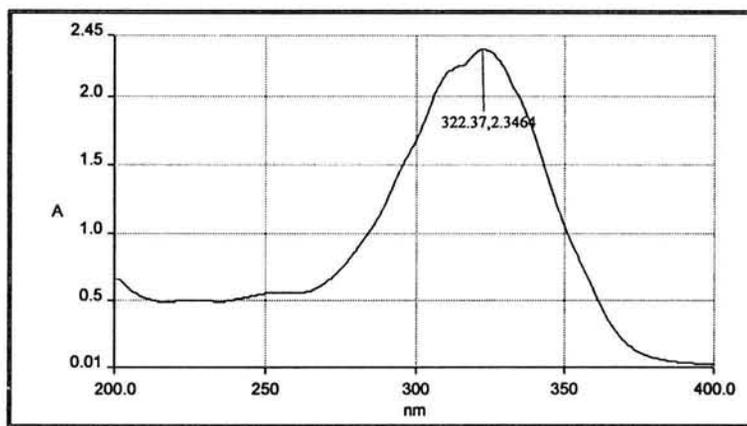
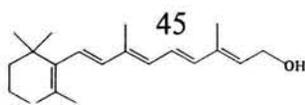


Figura 4.5. Espectro del retinol disuelto en metanol.

Al realizar esta etapa experimental se comprueba que la vitamina A así como sus derivados no son solubles (o es mínima) en agua, esto se comprueba al no obtenerse señales espectrales cuando se corrieron sus espectros al UV-Vis (*Figura 4.2. y 4.4.*), en cambio con el metanol y el acetonitrilo si son solubles los compuestos (*Figura 4.1., 4.3. y 4.5.*), con lo cual se decidió que el disolvente adecuado para llevar a cabo las disoluciones en esta tesis fue el metanol. En los espectros obtenidos en metanol y acetonitrilo la $\lambda_{m\acute{a}x}$ obtenida para los diferentes derivados de vitamina A es de 325nm, lo cual es lógico debido a que el grupo cromóforo que contiene es el mismo y la única variación entre estas vitaminas es que en lugar del grupo hidroxilo que tiene el retinol al final de su cadena los otros tienen un grupo éster en sus derivados que no modifica a dicha $\lambda_{m\acute{a}x}$.

Esto comprueba lo reportado en la bibliografía¹² que reporta que la $\lambda_{m\acute{a}x}$ para el acetato de vitamina A es de 326nm y para el palmitato de vitamina A es de 325-328nm.



VALIDACIÓN

Los resultados obtenidos en la validación de la técnica de CLAE para la cuantificación de vitamina A en esta tesis son los siguientes:

1) Desarrollo de la separación cromatográfica

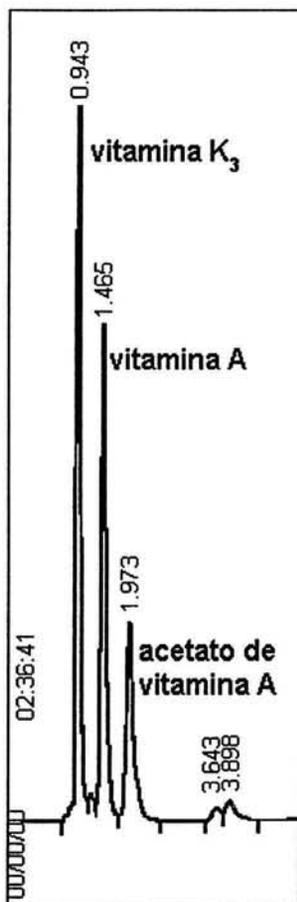
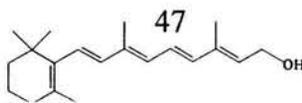


Figura 4.6. Cromatograma de la mezcla de vitaminas liposolubles.

Los cálculos de los parámetros cromatográficos, eficiencia (N), factor de capacidad (k'), selectividad (α) y resolución (R_s), se realizaron en la comparación de los picos obtenidos del cromatograma de la mezcla de vitaminas (*figura 4.6*) entre los picos adyacentes al Retinol. El tiempo muerto (t_0) del sistema cromatográfico a las condiciones indicadas fue de 0.85 minutos.



Pico	Compuesto	tr (min)	tr' (min)	w _{1/2h} (min)
1	Vitamina k ₃	0.94	0.09	0.068
2	Vitamina A	1.47	0.62	0.111
3	Acetato de Vit. A	1.97	1.12	0.153

Tabla 4.1. Datos del cromatograma de la figura 4.6.

Pico	N	k'	α	Rs
1	10	0.11	6.61*	3.42*
2	170	0.72		
3	297	1.32	1.83*	2.26*

Tabla 4.2. Resultados de los cálculos de los parámetros cromatográficos del Retinol con los compuestos adyacentes a él.

*Para la selectividad y para la resolución se calcula comparando primero el pico 1 con el dos (primer dato de la *tabla 4.2.*), y luego comparando el pico dos con respecto al tres (segundo dato de la *tabla 4.2.*).

donde:

tr = tiempo de retención.

α = selectividad.

tr' = tiempo de retención corregido.

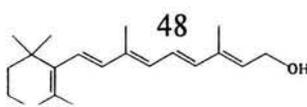
k' = factor de capacidad.

w_{1/2h} = ancho a la mitad del pico.

Rs = resolución.

N = eficiencia.

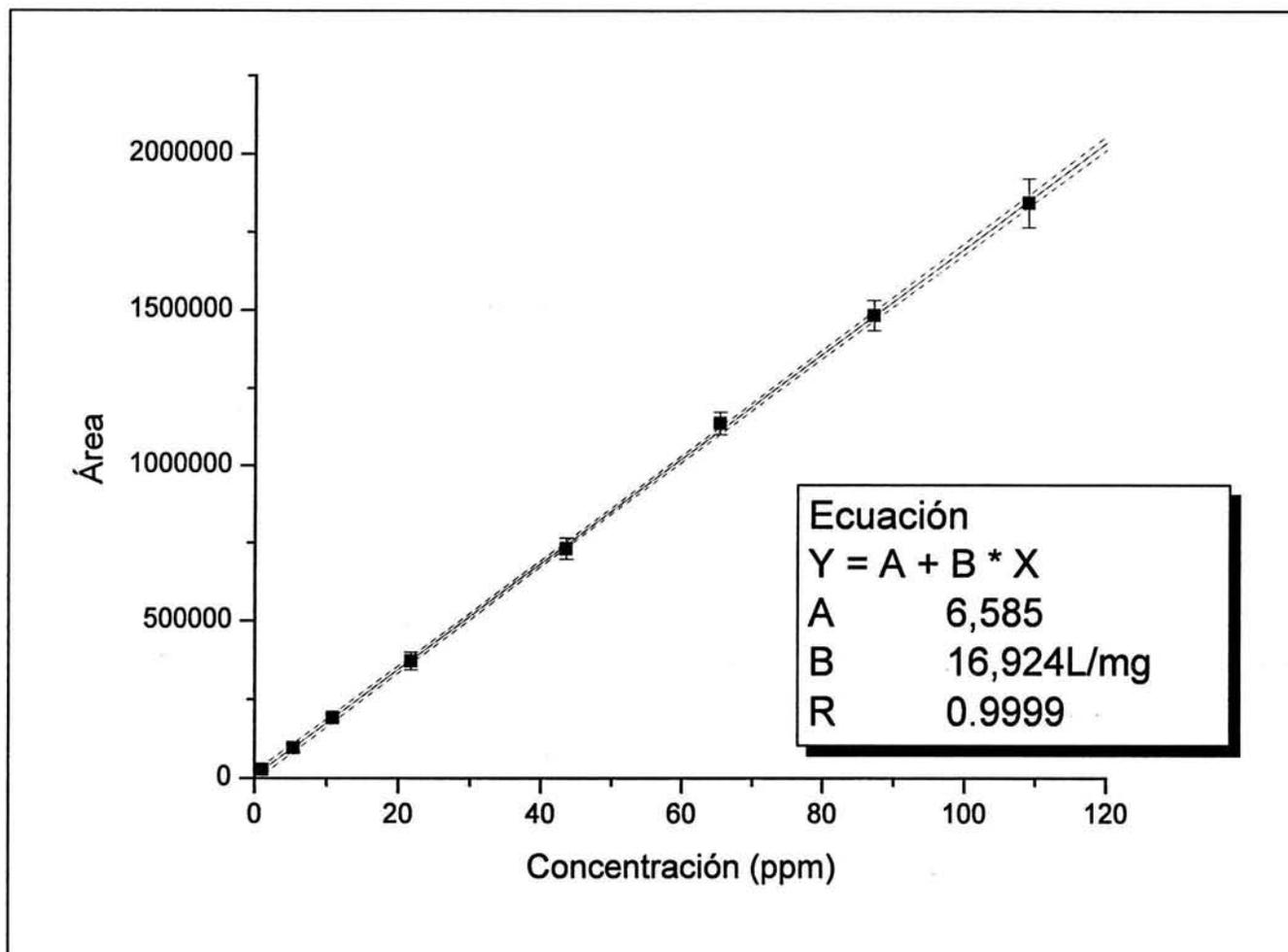
Como se puede ver en las *tablas 4.1. y 4.2.* los resultados obtenidos del cromatograma de la *figura 4.6.* el sistema presenta buena separación de las diferentes vitaminas, las selectividades son mayores a uno lo que indica que la vitamina A, la vitamina k₃ y el acetato de vitamina A presentan afinidad por la fase estacionaria, por lo cual la vitamina A se puede diferenciar dentro de una mezcla compleja de vitaminas liposolubles, la resolución está por arriba de 1.5 lo que indica que la separación de las áreas de los picos se encuentra por arriba del 99.73% y se puede cuantificar adecuadamente.



2) Linealidad del sistema

Con el siguiente experimento se buscó demostrar que la respuesta es directamente proporcional a la concentración del estándar de vitamina A en un intervalo de concentración amplio de 1 a 100ppm aproximadamente y a un intervalo de concentración corto de 4 a 12 ppm aproximadamente.

Resultados de la curva patrón del intervalo amplio.

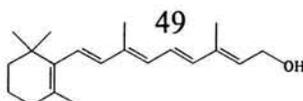


Gráfica 4.1. Regresión lineal del intervalo largo.

Ordenada al origen = 6,585

Pendiente = 16,924L/mg

Coefficiente de regresión = 0.9999



Como se puede observar en la gráfica anterior se tiene tendencia lineal de los datos así como una tendencia al origen, para confirmar la validación de lo observado se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen, siendo ésta:

$$H_0: b = \beta, \text{ donde } \beta = 0$$

$$H_1: b \neq \beta$$

$$t = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + n\bar{X}^2}} = 1.09$$

$$\bar{X} = 43.06$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 13,199,658$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 3.79E + 15$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right) = 2.23E + 11$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n - 2)nS_{xx}}} = 38,632$$

Como se trata de una región bilateral de dos colas y tomando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = $n - 2 = 96 - 2 = 94$

Y como para rechazar la H_0 se tiene que:

$$t_{\text{calculada}} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{\text{calculada}} > t_{\alpha/2}$$

de las tablas se obtiene una $t_{\alpha/2} = 1.99$

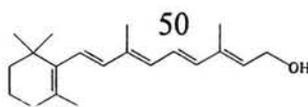
Con lo anterior se concluyó que como $1.09 < 1.99$, es decir la $t_{\text{calculada}} < t_{\alpha/2}$, se acepta la hipótesis nula y por lo tanto la ordenada al origen es igual a cero.

Obtenido lo anterior se procedió a realizar el cálculo del intervalo de confianza (IC), (al 95% de nivel de significancia) para la ordenada al origen:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$$

$$IC = 6,507.4 \pm 11,858$$

$$-5,350.6 < b < 18,365.4$$



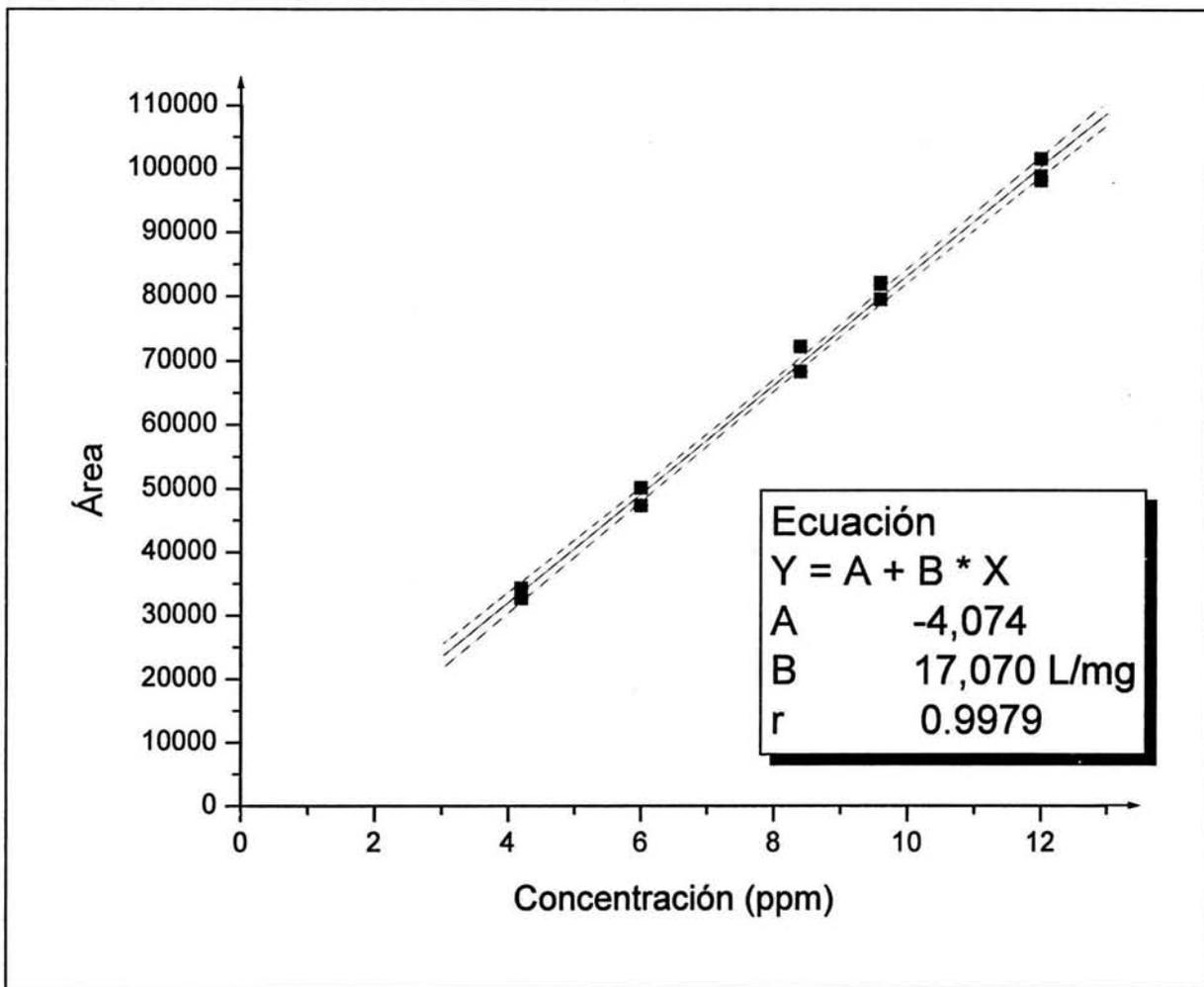
También se realizó el cálculo del intervalo de confianza (IC), (al 95% de nivel de significancia) para la pendiente:

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

$$IC = 16,924 \pm 207$$

$$16,717 < m < 17,1310$$

Resultados de la curva patrón del intervalo corto.

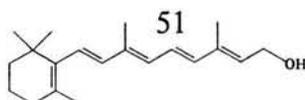


Gráfica 4.2. Regresión lineal del intervalo corto.

Ordenada al origen = -4,074

Pendiente = 17,070L/mg

Coefficiente de regresión = 0.9979



En este caso se puede observar que la gráfica a una concentración menor también tiene tendencia lineal de los datos así como una tendencia al origen, para confirmar la validación de lo observado se realizó también la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen, siendo ésta:

$$H_0: b = \beta, \text{ donde } \beta = 0$$

$$H_1: b \neq \beta$$

$$t = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + n\bar{X}^2}} = -1.56$$

$$\bar{X} = 8.04$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 1672$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 4.9E + 11$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right) = 2.8E + 07$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 3250$$

Como se trata de una región bilateral de dos colas a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = $n - 2 = 15 - 2 = 13$

Y como para rechazar la H_0 se tiene que:

$$t_{\text{calculada}} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{\text{calculada}} > t_{\alpha/2}$$

de las tablas se obtiene una $t_{\alpha/2} = 2.16$

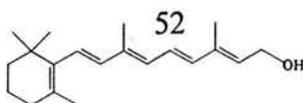
Con lo anterior se concluyó que como $-1.56 > -2.16$, es decir que la $t_{\text{calculada}} > -t_{\alpha/2}$, se acepta la hipótesis nula y por lo tanto la ordenada al origen es igual a cero.

Obtenido lo anterior se procedió a realizar el cálculo del intervalo de confianza (IC), (al 95% de nivel de significancia) para la ordenada al origen:

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$$

$$IC = -4,074 \pm 5,647$$

$$-9,721 < b < 1,573$$

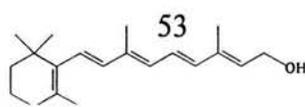


También se realizó el cálculo del intervalo de confianza (IC), (al 95% de nivel de significancia) para la pendiente:

$$IC = m \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

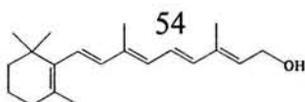
$$IC = 17,070 \pm 665$$

$$16,405 < m < 17,735$$



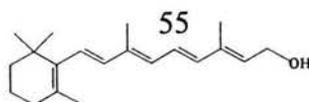
CONC. ppm (Xi)	AREA (Yi)	Xi*Xi	Yi*Yi	Xi*Yi
1.09	28,486	1	811,452,196	31,050
1.09	33,343	1	1,111,755,649	36,344
1.09	22,805	1	520,068,025	24,857
1.09	34,567	1	1,194,877,489	37,678
1.09	36,706	1	1,347,330,436	40,010
1.09	33,729	1	1,137,645,441	36,765
1.09	24,078	1	579,750,084	26,245
1.09	25,237	1	636,906,169	27,508
1.09	24,546	1	602,506,116	26,755
1.09	23,982	1	575,136,324	26,140
1.09	22,389	1	501,267,321	24,404
1.09	23,672	1	560,363,584	25,802
5.45	95,224	30	9,067,610,176	518,971
5.45	102,217	30	10,448,315,089	557,083
5.45	100,401	30	10,080,360,801	547,185
5.45	121,138	30	14,674,415,044	660,202
5.45	118,162	30	13,962,258,244	643,983
5.45	111,340	30	12,396,595,600	606,803
5.45	77,949	30	6,076,046,601	424,822
5.45	78,459	30	6,155,814,681	427,602
5.45	79,589	30	6,334,408,921	433,760
5.45	94,819	30	8,990,642,761	516,764
5.45	97,863	30	9,577,166,769	533,353
5.45	87,977	30	7,739,952,529	479,475
10.90	194,553	119	37,850,869,809	2,120,628
10.90	201,774	119	40,712,747,076	2,199,337
10.90	205,821	119	42,362,284,041	2,243,449
10.90	203,463	119	41,397,192,369	2,217,747
10.90	214,192	119	45,878,212,864	2,334,693
10.90	202,573	119	41,035,820,329	2,208,046
10.90	177,656	119	31,561,654,336	1,936,450
10.90	181,351	119	32,888,185,201	1,976,726
10.90	176,689	119	31,219,002,721	1,925,910
10.90	188,587	119	35,565,056,569	2,055,598
10.90	179,508	119	32,223,122,064	1,956,637
10.90	188,071	119	35,370,701,041	2,049,974
21.80	390,551	475	152,530,083,601	8,514,012
21.80	419,942	475	176,351,283,364	9,154,736
21.80	402,974	475	162,388,044,676	8,784,833
21.80	344,303	475	118,544,555,809	7,505,805
21.80	410,844	475	168,792,792,336	8,956,399
21.80	361,953	475	131,009,974,209	7,890,575
21.80	342,600	475	117,374,760,000	7,468,680
21.80	366,829	475	134,563,515,241	7,996,872
21.80	364,223	475	132,658,393,729	7,940,061
21.80	357,379	475	127,719,749,641	7,790,862
21.80	353,814	475	125,184,346,596	7,713,145
21.80	335,967	475	112,873,825,089	7,324,081
43.60	720,900	1,901	519,696,810,000	31,431,240

Tabla 4.3. Datos de la curva patrón del intervalo largo de concentración y del análisis estadístico.



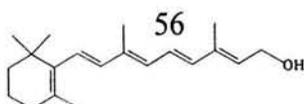
CONC. ppm (Xi)	ÁREA (Yi)	Xi*Xi	Yi*Yi	Xi*Yi
43.60	720,428	1,901	519,016,503,184	31,410,661
43.60	744,858	1,901	554,813,440,164	32,475,809
43.60	789,920	1,901	623,973,606,400	34,440,512
43.60	773,911	1,901	598,938,235,921	33,742,520
43.60	767,088	1,901	588,423,999,744	33,445,037
43.60	689,574	1,901	475,512,301,476	30,065,426
43.60	670,422	1,901	449,465,658,084	29,230,399
43.60	720,128	1,901	518,584,336,384	31,397,581
43.60	727,417	1,901	529,135,491,889	31,715,381
43.60	727,492	1,901	529,244,610,064	31,718,651
43.60	717,212	1,901	514,393,052,944	31,270,443
65.40	1,166,423	4,277	1,360,542,614,929	76,284,064
65.40	1,157,539	4,277	1,339,896,536,521	75,703,051
65.40	1,165,762	4,277	1,359,001,040,644	76,240,835
65.40	1,149,667	4,277	1,321,734,210,889	75,188,222
65.40	1,165,549	4,277	1,358,504,471,401	76,226,905
65.40	1,133,385	4,277	1,284,561,558,225	74,123,379
65.40	1,056,432	4,277	1,116,048,570,624	69,090,653
65.40	1,144,674	4,277	1,310,278,566,276	74,861,680
65.40	1,118,184	4,277	1,250,335,457,856	73,129,234
65.40	1,120,127	4,277	1,254,684,496,129	73,256,306
65.40	1,080,893	4,277	1,168,329,677,449	70,690,402
65.40	1,157,819	4,277	1,340,544,836,761	75,721,363
87.20	1,585,782	7,604	2,514,704,551,524	138,280,190
87.20	1,492,778	7,604	2,228,386,157,284	130,170,242
87.20	1,486,188	7,604	2,208,754,771,344	129,595,594
87.20	1,462,204	7,604	2,138,040,537,616	127,504,189
87.20	1,527,995	7,604	2,334,768,720,025	133,241,164
87.20	1,464,092	7,604	2,143,565,384,464	127,668,822
87.20	1,489,572	7,604	2,218,824,743,184	129,890,678
87.20	1,505,244	7,604	2,265,759,499,536	131,257,277
87.20	1,441,674	7,604	2,078,423,922,276	125,713,973
87.20	1,502,358	7,604	2,257,079,560,164	131,005,618
87.20	1,416,247	7,604	2,005,755,565,009	123,496,738
87.20	1,423,917	7,604	2,027,539,622,889	124,165,562
109.00	1,885,613	11,881	3,555,536,385,769	205,531,817
109.00	1,898,148	11,881	3,602,965,829,904	206,898,132
109.00	1,886,464	11,881	3,558,746,423,296	205,624,576
109.00	1,932,374	11,881	3,734,069,275,876	210,628,766
109.00	1,854,922	11,881	3,440,735,626,084	202,186,498
109.00	1,954,188	11,881	3,818,850,739,344	213,006,492
109.00	1,803,777	11,881	3,253,611,465,729	196,611,693
109.00	1,721,523	11,881	2,963,641,439,529	187,646,007
109.00	1,729,663	11,881	2,991,734,093,569	188,533,267
109.00	1,857,252	11,881	3,449,384,991,504	202,440,468
109.00	1,739,156	11,881	3,024,663,592,336	189,568,004
109.00	1,860,602	11,881	3,461,839,802,404	202,805,618

Tabla 4.3.1 Datos de la curva patrón del intervalo largo de concentración y del análisis estadístico (continuación).



SUMAXi =	4,133
SUMAYi =	70,571,832
SUMAXi*Yi =	5,365,309,954
SUMAXi al cuadrado =	315,455
SUMAYi al cuadrado =	91,396,181,603,378
media Xi =	43
n =	96
g. l. =	94
(n-2)*n =	9,024
n* media =	4,133
(n* media) al cuadrado =	17,084,004
t tablas=	1.99
Sxx	13,199,658
Syy	3,793,649,962,088,060
Sxy	223,376,613,805
Se al cuadrado =	1,492,441,268
Se	38,632
t calculada =	1
ORDENADA	6,507
INTERVALO DE CONFIANZA ORDENADA =	11,858 ±
MÍNIMO =	-5,351
MÁXIMO =	18,365
PENDIENTE =	16,923
INTERVALO DE CONFIANZA PENDIENTE =	207 ±
MÍNIMO =	16,716
MÁXIMO =	17,130
CONCLUSIÓN	
t calculada es menor que la t de tablas	
La Ho se acepta y la ordenada es igual a cero	

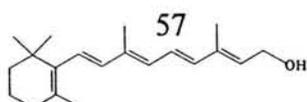
Tabla 4.3.2. Datos de la curva patrón del intervalo largo de concentración y del análisis estadístico (continuación).



CONC. ppm (Xi)	ÁREA (Yi)	Xi*Xi	Yi*Yi	Xi*Yi
4.20	65,387	17.64	4,275,459,769	274,625
4.20	66,623	17.64	4,438,624,129	279,817
4.20	68,505	17.64	4,692,935,025	287,721
6.00	100,257	36.00	10,051,466,049	601,542
6.00	100,165	36.00	10,033,027,225	600,990
6.00	94,774	36.00	8,982,111,076	568,644
8.40	144,376	70.56	20,844,429,376	1,212,758
8.40	136,749	70.56	18,700,289,001	1,148,692
8.40	136,585	70.56	18,655,462,225	1,147,314
9.60	159,052	92.16	25,297,538,704	1,526,899
9.60	164,250	92.16	26,978,062,500	1,576,800
9.60	163,696	92.16	26,796,380,416	1,571,482
12.00	196,304	144.00	38,535,260,416	2,355,648
12.00	203,199	144.00	41,289,833,601	2,438,388
12.00	197,633	144.00	39,058,802,689	2,371,596

SUMAXi =	121
SUMAYi =	1,997,555
SUMAXi*Yi =	17,962,916
SUMAXi al cuadrado =	1,081
SUMAYi al cuadrado =	298,629,682,201
media Xi =	8.04
n =	15
g. l. =	13
(n-2)*n =	195
n* media =	120.6
(n* media) al cuadrado =	14,544
t TABLAS=	2.16
Sxx	1,672
Syy	489,219,254,990
Sxy	28,538,604
Se al cuadrado =	10,565,362
Se	3,250
t calculada =	-1.56
ORDENADA	-4,073.90
INTERVALO DE CONFIANZA	
ORDENADA =	5,646.8 ±
MÍNIMO =	-9,721
MÁXIMO =	1,573
PENDIENTE =	17,070
INTERVALO DE CONFIANZA	
PENDIENTE =	665.1 ±
MÍNIMO =	16,405
MÁXIMO =	17,735
La Ho se acepta y la ordenada es igual a cero.	

Tabla 4.4 Datos de la curva patrón del intervalo corto de concentración y el análisis estadístico.



3) Precisión del sistema

Este estudio permitió conocer el grado de concordancia de los resultados de las diferentes determinaciones en dos diferentes concentraciones que cubren las zonas baja y alta del intervalo lineal planteado, y que ya se demostró en que se tiene respuesta lineal por parte del sistema cromatográfico.

Soluciones de concentración baja (concentración alrededor de 8ppm)

Los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas para este orden de concentración son los siguientes:

Primer ensayo (concentración de 8.08ppm)

La prueba de hipótesis propuesta es:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = 38,026,398$$

$$H_1 = s^2 > \sigma^2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = 18.8$$

Para una región unilateral, y para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = 21 - 1 = 20 se obtiene un valor en tablas de $\chi^2_{0.05} = 31.41$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

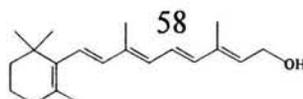
$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{0.05}$$

Como se obtiene que $18.8 < 31.41$, es decir que la $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{\alpha}$, se concluye que la hipótesis nula se acepta y se acepta que el sistema es preciso a un valor máximo del 5% para concentraciones bajas.

Una vez realizado lo anterior se calculó el intervalo de confianza del 95% para la desviación estándar obtenida.

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$



donde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 9.591$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 34.17$$

$$IC = 4,579 < 5,985 < 8,642$$

Segundo ensayo (concentración de 8.09ppm)

La prueba de hipótesis propuesta es:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = 12,028,144$$

$$H_1 = s^2 > \sigma^2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2} = 16.5$$

Para una región unilateral, y para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = 21 - 1 = 20 se obtiene un valor en tablas de $\chi_{0.05}^2 = 31.41$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$\chi^2_{calculada} > \chi_{\alpha}^2$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi_{0.05}^2$$

Como se obtiene que $16.5 < 31.41$, es decir que la $\chi^2_{calculada} < \chi_{\alpha}^2$, se concluye que la hipótesis nula se acepta y se acepta que el sistema es preciso a un valor máximo del 3% para concentraciones bajas.

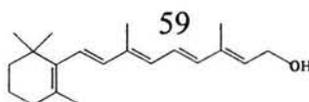
Una vez realizado lo anterior se calculó el intervalo de confianza del 95% para la desviación estándar obtenida.

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}}$$

donde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 9.591$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 34.17$$



$$IC = 2,410 < 3,150 < 4,548$$

Soluciones de concentración alta (concentración alrededor de 50ppm)

Los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas para este orden de concentración son los siguientes:

Primer ensayo (concentración de 50.5ppm)

La prueba de hipótesis propuesta es:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = 1,819,918,057$$

$$H_1 = s^2 > \sigma^2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2} = 4.9$$

Para una región unilateral, y para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = 21 - 1 = 20 se obtiene un valor en tablas de $\chi_{0.05}^2 = 31.41$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{0.05}$$

Como se obtiene que $4.9 < 31.41$, es decir que la $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{\alpha}$, se concluye que la hipótesis nula se acepta y se acepta que el sistema es preciso a un valor máximo del 5% para concentraciones altas.

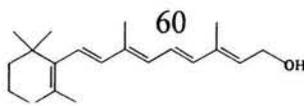
Una vez realizado lo anterior se calculó el intervalo de confianza del 95% para la desviación estándar obtenida.

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_2^2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi_1^2}}$$

donde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 9.591$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 34.17$$



$$IC = 16,118 < 21,068 < 30,424$$

Segundo ensayo (concentración de 52.5ppm)

La prueba de hipótesis propuesta es:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = 467,563,829$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2} = 14.4$$

Para una región unilateral, y para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = 21 - 1 = 20 se obtiene un valor en tablas de $\chi^2_{0.05} = 31.41$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{0.05}$$

Como se obtiene que $14.4 < 31.41$, es decir que la $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{\alpha}$, se concluye que la hipótesis nula se acepta y se acepta que el sistema es preciso a un valor máximo del 3% para concentraciones altas.

Una vez realizado lo anterior se calculó el intervalo de confianza del 95% para la desviación estándar obtenida.

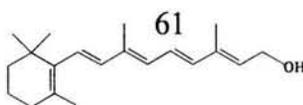
$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

donde:

$$\chi^2_1 = \chi^2_{0.975} = 9.591$$

$$\chi^2_2 = \chi^2_{0.025} = 34.17$$

$$IC = 14,026 < 18,333 < 26,474$$

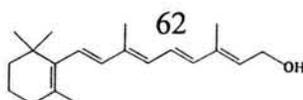


CONC. ppm	ÁREA	n=	21
8.08	117,885	MEDIA EXP =	123,331
8.08	132,862	DESVIACIÓN ESTÁNDAR EXP =	5,985
8.08	129,274	VARIANCIA EXP =	35,818,201
8.08	125,949	%CV=	5
8.08	130,333	DESVIACIÓN ESTÁNDAR PROPUESTA=	6,167
8.08	126,646	VARIANCIA PROPUESTA=	38,026,398
8.08	113,494	α =	0.05
8.08	109,172	JÍ DE TABLAS	
8.08	114,970	JÍ CUADRADA AL $(1-\alpha/2)$ 0.975 =	9.6
8.08	124,192	JÍ CUADRADA AL $(\alpha/2)$ 0.025 =	34.2
8.08	125,436	JÍ CUADRADA AL (α) 0.05 =	31.4
8.08	129,225	JÍ CUADRADA CALCULADA	
8.08	117,741	JÍ CUADRADA =	18.8
8.08	118,552	INTERVALO DE CONFIANZA (IC)	
8.08	124,453	IC MÁXIMO =%	8,642
8.08	125,683	IC MÍNIMO =%	4,579
8.08	127,532	CONCLUSIÓN	
8.08	125,451	Como $18.8 < 31.4$, la H_0 se acepta con un error máximo del 5%.	
8.08	122,491		
8.08	125,008		
8.08	123,604		

Tabla 4.5. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 8 ppm del primer día de experimentación para calcular la precisión del sistema.

CONC. ppm	ÁREA	n=	21
8.09	114,491	MEDIA EXP =	115,605
8.09	110,277	DESVIACIÓN ESTÁNDAR EXP =	3,150
8.09	115,399	VARIANCIA EXP =	9,921,205
8.09	116,857	%CV=	3
8.09	114,524	DESVIACIÓN ESTÁNDAR PROPUESTA=	3,468
8.09	113,916	VARIANCIA PROPUESTA=	12,028,144
8.09	114,244	α =	0.05
8.09	113,597	JÍ CUADRADA DE TABLAS	
8.09	114,932	JÍ CUADRADA AL $(1-\alpha/2)$ 0.975 =	9.6
8.09	112,757	JÍ CUADRADA AL $(\alpha/2)$ 0.025 =	34.2
8.09	112,611	JÍ CUADRADA AL (α) 0.05 =	31.4
8.09	113,919	JÍ CUADRADA CALCULADA	
8.09	114,921	JÍ CUADRADA =	16.5
8.09	113,220	INTERVALO DE CONFIANZA (IC)	
8.09	112,925	IC MÁXIMO =%	4,548
8.09	121,645	IC MÍNIMO =%	2,410
8.09	118,079	CONCLUSIÓN	
8.09	122,308	Como $16.5 < 31.4$, la H_0 se acepta con un error máximo del 3%.	
8.09	118,829		
8.09	118,507		
8.09	119,755		

Tabla 4.6. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 8 ppm del segundo día de experimentación para calcular la precisión del sistema.



4) Repetibilidad

Soluciones de concentración baja (concentración alrededor de 8ppm)

Para el caso de esta prueba estadística con las soluciones de vitamina A en este orden de concentración, los resultados son los siguientes:

Primer ensayo (concentración de 8.08ppm)

La prueba de hipótesis propuesta es (se tomó para el 5% sobre el recobro):

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = 25$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2} = 15.1$$

Para una región unilateral, y para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = 21 - 1 = 20 se obtiene un valor en tablas de $\chi^2_{0.05} = 31.41$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{0.05}$$

Como se obtiene que $15.1 < 31.41$, es decir que la $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{\alpha}$, se concluye que la hipótesis nula se acepta y se acepta que el sistema es repetitivo para las concentraciones de 8ppm a un valor máximo del 5%.

Una vez realizado lo anterior se calculó el intervalo de confianza del 95% para la desviación estándar obtenida.

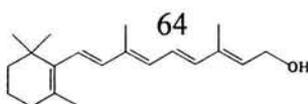
$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

donde:

$$\chi^2_1 = \chi^2_{0.975} = 9.591$$

$$\chi^2_2 = \chi^2_{0.025} = 34.17$$

$$IC = 3.32\% < 4.34\% < 6.27\%$$



Segundo ensayo (concentración de 8.09ppm)

Al realizar el primer ensayo se observó que los datos pueden dar una mejor repetibilidad, por lo que se procedió a realizar la prueba de hipótesis propuesta tomando para el segundo ensayo 3% sobre el recobro:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = 9$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2} = 17.9$$

Para una región unilateral, y para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = 21 - 1 = 20 se obtiene un valor en tablas de $\chi^2_{0.05} = 31.41$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{0.05}$$

Como se obtiene que $17.9 < 31.41$, es decir que la $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{\alpha}$, se concluye que la hipótesis nula se acepta y se acepta que el sistema es repetitivo para las concentraciones de 8ppm a un valor máximo del 3%.

Una vez realizado lo anterior se calculó el intervalo de confianza del 95% para la desviación estándar obtenida.

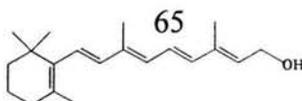
$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

donde:

$$\chi^2_1 = \chi^2_{0.975} = 9.591$$

$$\chi^2_2 = \chi^2_{0.025} = 34.17$$

$$IC = 1.83\% < 2.39\% < 3.45\%$$



Soluciones de concentración alta (concentración alrededor de 50ppm)

Para el caso de esta prueba estadística con las soluciones de vitamina A en este orden de concentración, los resultados son los siguientes:

Primer ensayo (concentración de 50.5ppm)

Como se puede observar en los datos obtenidos para esta prueba los datos de desviación estándar son muy pequeños por lo que para esta zona de trabajo se procedió a realizar la prueba de hipótesis propuesta tomando 2% sobre el recobro:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = 4$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2} = 29.2$$

Para una región unilateral, y para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = 21 - 1 = 20 se obtiene un valor en tablas de $\chi^2_{0.05} = 31.41$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{0.05}$$

Como se obtiene que $29.2 < 31.41$, es decir que la $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{\alpha}$, se concluye que la hipótesis nula se acepta y se acepta que el sistema es repetitivo para las concentraciones de 50ppm a un valor máximo del 2%.

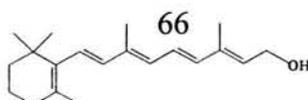
Una vez realizado lo anterior se calculó el intervalo de confianza del 95% para la desviación estándar obtenida.

$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

donde:

$$\chi^2_1 = \chi^2_{0.975} = 9.591$$

$$\chi^2_2 = \chi^2_{0.025} = 34.17$$



$$IC = 1.85\% < 2.42\% < 3.49\%$$

Segundo ensayo (concentración de 52.5ppm)

Como en el caso anterior se procedió a realizar la prueba de hipótesis propuesta tomando 2% sobre el recobro:

$$H_0: s^2 = \sigma^2, \text{ donde } \sigma^2 = 4$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$\chi^2_{cal} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2} = 20.3$$

Para una región unilateral, y para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con g.l. = 21 - 1 = 20 se obtiene un valor en tablas de $\chi^2_{0.05} = 31.41$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{\alpha}$$

$$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{0.05}$$

Como se obtiene que $20.3 < 31.41$, es decir que la $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{\alpha}$, se concluye que la hipótesis nula se acepta y se acepta que el sistema es repetitivo para las concentraciones de 50ppm a un valor máximo del 2%.

Una vez realizado lo anterior se calculó el intervalo de confianza del 95% para la desviación estándar obtenida.

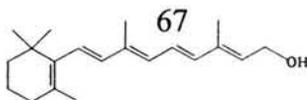
$$IC = \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_2}} < s < \sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_1}}$$

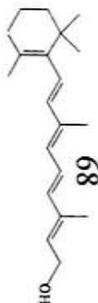
donde:

$$\chi^2_1 = \chi^2_{0.975} = 9.591$$

$$\chi^2_2 = \chi^2_{0.025} = 34.17$$

$$IC = 1.54\% < 2.02\% < 2.91\%$$

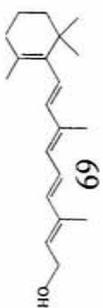




CONC. ppm	Fr	ÁREA	ÁREA/Fr	$((\text{ÁREA} / \text{Fr}) / \text{CONC}) * 100 = \%$
8.08	17,070.18	117,885	6.91	85.47
8.08	17,070.18	132,862	7.78	96.33
8.08	17,070.18	129,274	7.57	93.73
8.08	17,070.18	125,949	7.38	91.32
8.08	17,070.18	130,333	7.64	94.49
8.08	17,070.18	126,646	7.42	91.82
8.08	17,070.18	113,494	6.65	82.29
8.08	17,070.18	109,172	6.40	79.15
8.08	17,070.18	114,970	6.74	83.36
8.08	17,070.18	124,192	7.28	90.04
8.08	17,070.18	125,436	7.35	90.94
8.08	17,070.18	129,225	7.57	93.69
8.08	17,070.18	117,741	6.90	85.36
8.08	17,070.18	118,552	6.94	85.95
8.08	17,070.18	124,453	7.29	90.23
8.08	17,070.18	125,683	7.36	91.12
8.08	17,070.18	127,532	7.47	92.46
8.08	17,070.18	125,451	7.35	90.95
8.08	17,070.18	122,491	7.18	88.81
8.08	17,070.18	125,008	7.32	90.63
8.08	17,070.18	123,604	7.24	89.62

MEDIA= %	89.42
DESVIACIÓN ESTÁNDAR EXP. = %	4.34
COEFICIENTE DE VARIACIÓN =%	4.85
ERROR ESTÁNDAR = S/RAÍZ n =%	0.95
n =	21
g.l. = n-1 =	20
VARIANCIA EXP. = %	18.83
El porcentaje de recuperación es el 100 % y el 5% de 100 es 5 por lo tanto	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR PROPUESTA =	5
VARIANCIA PROPUESTA =	25
JI CUADRADA DE TABLAS	
JI CUADRADA AL $(1-\alpha/2)$ 0.975 =	9.59
JI CUADRADA AL $(\alpha/2)$ 0.025 =	34.17
JI CUADRADA AL (α) 0.05 =	31.41
JI CUADRADA CALCULADA	
JI CUADRADA =	15.1
INTERVALO DE CONFIANZA (IC)	
IC MÁXIMO =%	6.27
IC MÍNIMO =%	3.32
CONCLUSIÓN	
Como $15.1 < 31.41$, la H_0 se acepta para un error máximo del 5%	

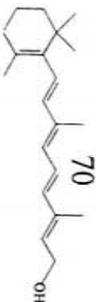
Tabla 4.9. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 8 ppm del primer día de experimentación y resultados del análisis estadístico para el cálculo de repetibilidad



CÁLCULO DEL FACTOR DE RESPUESTA				
	ÁREA	CONC.estándar ppm		
	97,128.00	6		
	97,659.00	6		
	98,885.00	6		
media=	97,890.67			
área/conc= Fr	16,315.11			
CONC. ppm	Fr	ÁREA	ÁREA/Fr	((ÁREA /Fr)/CONC)*100 =%
8.09	16,315.11	114,491	7.02	86.80
8.09	16,315.11	110,277	6.76	83.60
8.09	16,315.11	115,399	7.07	87.48
8.09	16,315.11	116,857	7.16	88.59
8.09	16,315.11	114,524	7.02	86.82
8.09	16,315.11	113,916	6.98	86.36
8.09	16,315.11	114,244	7.00	86.61
8.09	16,315.11	113,597	6.96	86.12
8.09	16,315.11	114,932	7.04	87.13
8.09	16,315.11	112,757	6.91	85.48
8.09	16,315.11	112,611	6.90	85.37
8.09	16,315.11	113,919	6.98	86.36
8.09	16,315.11	114,921	7.04	87.12
8.09	16,315.11	113,220	6.94	85.83
8.09	16,315.11	112,925	6.92	85.61
8.09	16,315.11	121,645	7.46	92.22
8.09	16,315.11	118,079	7.24	89.52
8.09	16,315.11	122,308	7.50	92.72
8.09	16,315.11	118,829	7.28	90.08
8.09	16,315.11	118,507	7.26	89.84
8.09	16,315.11	119,755	7.34	90.79

MEDIA =%	87.64
DESVIACIÓN ESTÁNDAR EXP. = %	2.39
COEFICIENTE DE VARIACIÓN =%	2.72
ERROR ESTÁNDAR = S/RAÍZ n =%	0.52
n =	21
g.l. = n-1 =	20
VARIANCIA EXP. =	5.70
El porcentaje de recuperación es el 100 % y el 3% de 100 es 3 por lo tanto	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR PROPUESTA =	3
VARIANCIA PROPUESTA =	9
Ji CUADRADA DE TABLAS	
Ji CUADRADA AL (1- α /2) 0.975 =	9.59
Ji CUADRADA AL (α /2) 0.025 =	34.17
Ji CUADRADA AL (α) 0.05 =	31.41
Ji CUADRADA CALCULADA	
Ji CUADRADA =	17.9
INTERVALO DE CONFIANZA (IC)	
IC MÁXIMO =%	3.45
IC MÍNIMO =%	1.83
CONCLUSIÓN	
Como 17.86 < 31.41, la Ho se acepta para un error máximo del 3%	

Tabla 4.10. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 8 ppm del segundo día de experimentación y resultados del análisis estadístico para el cálculo de repetibilidad.



CONC. ppm	Fr	ÁREA	ÁREA/Fr	$((\text{ÁREA} / \text{Fr}) / \text{CONC}) * 100 = \%$
50.5	17,265.95	864,176	50.05	99.11
50.5	17,265.95	874,116	50.63	100.25
50.5	17,265.95	879,339	50.93	100.85
50.5	17,265.95	871,608	50.48	99.96
50.5	17,265.95	841,240	48.72	96.48
50.5	17,265.95	879,614	50.95	100.88
50.5	17,265.95	863,705	50.02	99.06
50.5	17,265.95	841,983	48.77	96.57
50.5	17,265.95	852,400	49.37	97.76
50.5	17,265.95	847,879	49.11	97.24
50.5	17,265.95	867,313	50.23	99.47
50.5	17,265.95	864,263	50.06	99.12
50.5	17,265.95	847,095	49.06	97.15
50.5	17,265.95	816,602	47.30	93.65
50.5	17,265.95	826,111	47.85	94.75
50.5	17,265.95	822,965	47.66	94.38
50.5	17,265.95	809,433	46.88	92.83
50.5	17,265.95	840,792	48.70	96.43
50.5	17,265.95	873,249	50.58	100.15
50.5	17,265.95	868,467	50.30	99.60
50.5	17,265.95	865,059	50.10	99.21

MEDIA =%	97.85
DESVIACIÓN ESTÁNDAR EXP. = %	2.42
COEFICIENTE DE VARIACIÓN =%	2.47
ERROR ESTÁNDAR = S/RAÍZ n =%	0.53
n =	21
g.l. = n-1 =	20
VARIANCIA EXP. =	5.84
El porcentaje de recuperación es el 100 % y el 2% de 100 es 2 por lo tanto	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR PROPUESTA =	2
VARIANCIA PROPUESTA =	4
Jl CUADRADA DE TABLAS	
Jl CUADRADA AL $(1-\alpha/2)$ 0.975 =	9.59
Jl CUADRADA AL $(\alpha/2)$ 0.025 =	34.17
Jl CUADRADA AL (α) 0.05 =	31.41
Jl CUADRADA CALCULADA	
Jl CUADRADA =	29.19
INTERVALO DE CONFIANZA (IC)	
IC MÁXIMO =%	3.49
IC MÍNIMO =%	1.85
CONCLUSIÓN	
Como $29.19 < 31.41$, la H_0 se acepta para un error máximo del 2%	

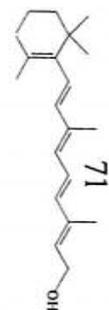
Tabla 4.11. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 50 ppm del primer día de experimentación y resultados del análisis estadístico para el cálculo de repetibilidad.

CÁLCULO DEL FACTOR DE RESPUESTA		
	ÁREA	CONC.estándar ppm
	504,160.00	30
	531,145.00	30
	523,936.00	30
media=	519,747.00	
area/conc= Fr	17,324.90	

CONC. ppm	Fr	ÁREA	ÁREA/Fr	$((\text{ÁREA} / \text{Fr}) / \text{CONC}) * 100 = \%$
52.5	17,324.90	708,738	40.91	77.92
52.5	17,324.90	720,321	41.58	79.19
52.5	17,324.90	715,809	41.32	78.70
52.5	17,324.90	730,076	42.14	80.27
52.5	17,324.90	741,531	42.80	81.53
52.5	17,324.90	720,029	41.56	79.16
52.5	17,324.90	706,637	40.79	77.69
52.5	17,324.90	671,723	38.77	73.85
52.5	17,324.90	720,143	41.57	79.18
52.5	17,324.90	732,745	42.29	80.56
52.5	17,324.90	701,792	40.51	77.16
52.5	17,324.90	719,901	41.55	79.15
52.5	17,324.90	728,568	42.05	80.10
52.5	17,324.90	718,872	41.49	79.04
52.5	17,324.90	732,576	42.28	80.54
52.5	17,324.90	747,500	43.15	82.18
52.5	17,324.90	734,691	42.41	80.77
52.5	17,324.90	743,576	42.92	81.75
52.5	17,324.90	686,104	39.60	75.43
52.5	17,324.90	726,859	41.95	79.91
52.5	17,324.90	728,066	42.02	80.05

MEDIA =%	79.24
DESVIACIÓN ESTÁNDAR EXP. = %	2.02
COEFICIENTE DE VARIACIÓN =%	2.54
ERROR ESTÁNDAR = S/RAÍZ n =%	0.44
n =	21
g.l. = n-1 =	20
VARIANCIA EXP. =	4.06
El porcentaje de recuperación es el 100 % y el 2% de 100 es 2 por lo tanto	
DESVIACIÓN ESTÁNDAR PROPUESTA =	2
VARIANCIA PROPUESTA =	4
JI CUADRADA DE TABLAS	
JI CUADRADA AL $(1-\alpha/2)$ 0.975 =	9.59
JI CUADRADA AL $(\alpha/2)$ 0.025 =	34.17
JI CUADRADA AL (α) 0.05 =	31.41
JI CUADRADA CALCULADA	
JI CUADRADA =	20.31
INTERVALO DE CONFIANZA (IC)	
IC MÁXIMO =%	2.91
IC MÍNIMO =%	1.54
CONCLUSIÓN	
Como $20.31 < 31.41$, la H_0 se acepta para un error máximo del 2%	

Tabla 4.12. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 50 ppm del segundo día de experimentación y resultados del análisis estadístico para el cálculo de repetibilidad.



5) Reproducibilidad

Soluciones de concentración baja (concentración alrededor de 8ppm)

Para el caso de esta prueba estadística con las soluciones de vitamina A en este orden de concentración, los resultados son los siguientes:

La prueba de hipótesis sobre las variancias:

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$$

$$H_1: \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$F_{cal} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = 1.37$$

s_1^2 = Variancia muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad = 21-1 = 20

s_2^2 = Variancia muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad = 21-1 = 20

Para una región bilateral o de dos colas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con $n_M - 1, n_m - 1$ grados de libertad = 20 se obtiene un valor en tablas de $F_{\alpha/2} = 2.46$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}$$

Como se obtiene que $1.37 < 2.46$, es decir que $F_{cal} < F_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , y las variancias de las muestras analizadas en los dos días y con los dos analistas son iguales, por lo que la prueba de hipótesis sobre las medias se establece como la comparación entre dos medias de muestras con variancias comparables, por lo que:

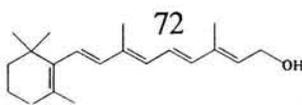
$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir, } \mu_1 = \mu_2$$

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

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$t_{cal.} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} = 14.39$$

los grados de libertad para la distribución t son: $n_1 + n_2 - 2 = 21 + 21 - 2 = 40$ y como se trata de un ensayo bilateral o en dos sentidos con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ se obtiene en tablas una $t_{\alpha/2} = 2.02$.



Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$t_{\text{calculada}} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{\text{calculada}} > t_{\alpha/2}$$

Como se obtuvo que $14.39 > 2.02$, la H_0 se rechaza, lo que quiere decir que las medias para ambos analistas son diferentes y no vienen sus resultados de la misma población por lo que no es reproducible a concentraciones bajas.

Soluciones de concentración alta (concentración alrededor de 50ppm)

Para el caso de esta prueba estadística con las soluciones de vitamina A en este orden de concentración, los resultados son los siguientes:

La prueba de hipótesis sobre las variancias:

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$$

$$H_1: \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$$

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$F_{\text{cal}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = 1.67$$

s_1^2 = Variancia muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad = $21 - 1 = 20$

s_2^2 = Variancia muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad = $21 - 1 = 20$

Para una región bilateral o de dos colas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con $n_M - 1, n_m - 1$ grados de libertad = 20 se obtiene un valor en tablas de $F_{\alpha/2} = 2.46$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

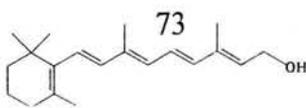
$$F_{\text{cal}} > F_{\alpha/2}$$

Como se obtiene que $1.67 < 2.46$, es decir que $F_{\text{cal}} < F_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , y las variancias de las muestras analizadas en los dos días y con los dos analistas son iguales, por lo que la prueba de hipótesis sobre las medias se establece como la comparación entre dos medias de muestras con variancias comparables, por lo que:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir, } \mu_1 = \mu_2$$

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

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:



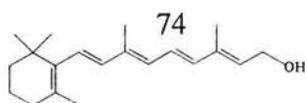
$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} = 0.73$$

los grados de libertad para la distribución t son: $n_1 + n_2 - 2 = 21 + 21 - 2 = 40$ y como se trata de un ensayo bilateral o en dos sentidos con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ se obtiene en tablas una $t_{\alpha/2} = 2.02$.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$t_{calculada} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{calculada} > t_{\alpha/2}$$

Como se obtuvo que $0.73 < 2.02$, es decir que $t_{cal} < t_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , lo que quiere decir que las medias para ambos analistas provienen de la misma población por lo que se tiene reproducibilidad a concentraciones altas con un valor de máximo del 5%.

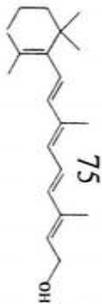


ANALISTA 1

CÁLCULO DEL FACTOR DE RESPUESTA				
	ÁREA	CONC.estándar ppm		
	97,128.00	6		
	97,659.00	6		
	98,885.00	6		
media=	97,890.67			
área/conc= Fr	16,315.11			

CONC. ppm	Fr*	ÁREA	ÁREA/Fr	((ÁREA /Fr)/CONC)*100 =%
8.09	16,315.11	114,491	7.02	86.80
8.09	16,315.11	110,277	6.76	83.60
8.09	16,315.11	115,399	7.07	87.48
8.09	16,315.11	116,857	7.16	88.59
8.09	16,315.11	114,524	7.02	86.82
8.09	16,315.11	113,916	6.98	86.36
8.09	16,315.11	114,244	7.00	86.61
8.09	16,315.11	113,597	6.96	86.12
8.09	16,315.11	114,932	7.04	87.13
8.09	16,315.11	112,757	6.91	85.48
8.09	16,315.11	112,611	6.90	85.37
8.09	16,315.11	113,919	6.98	86.36
8.09	16,315.11	114,921	7.04	87.12
8.09	16,315.11	113,220	6.94	85.83
8.09	16,315.11	112,925	6.92	85.61
8.09	16,315.11	121,645	7.46	92.22
8.09	16,315.11	118,079	7.24	89.52
8.09	16,315.11	122,308	7.50	92.72
8.09	16,315.11	118,829	7.28	90.08
8.09	16,315.11	118,507	7.26	89.84
8.09	16,315.11	119,755	7.34	90.79

Tabla 4.13. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 8 ppm del día de experimentación del analista 1 para el cálculo de reproducibilidad.

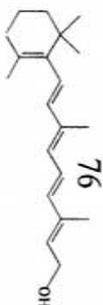


ANALISTA 1

CÁLCULO DEL FACTOR DE RESPUESTA				
	ÁREA	CONC. estándar ppm		
	504,160	30		
	531,145	30		
	523,936	30		
media=	519,747			
área/conc= Fr	17,324.90			

CONC. ppm	Fr*	ÁREA	ÁREA/Fr	((ÁREA /Fr)/CONC)*100 =%
52.50	17,324.90	708,738	40.91	77.92
52.50	17,324.90	720,321	41.58	79.19
52.50	17,324.90	715,809	41.32	78.70
52.50	17,324.90	730,076	42.14	80.27
52.50	17,324.90	741,531	42.80	81.53
52.50	17,324.90	720,029	41.56	79.16
52.50	17,324.90	706,637	40.79	77.69
52.50	17,324.90	671,723	38.77	73.85
52.50	17,324.90	720,143	41.57	79.18
52.50	17,324.90	732,745	42.29	80.56
52.50	17,324.90	701,792	40.51	77.16
52.50	17,324.90	719,901	41.55	79.15
52.50	17,324.90	728,568	42.05	80.10
52.50	17,324.90	718,872	41.49	79.04
52.50	17,324.90	732,576	42.28	80.54
52.50	17,324.90	747,500	43.15	82.18
52.50	17,324.90	734,691	42.41	80.77
52.50	17,324.90	743,576	42.92	81.75
52.50	17,324.90	686,104	39.60	75.43
52.50	17,324.90	726,859	41.95	79.91
52.50	17,324.90	728,066	42.02	80.05

Tabla 4.14. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 50 ppm del día de experimentación del analista 1 para el cálculo de reproducibilidad.



ANALISTA 2

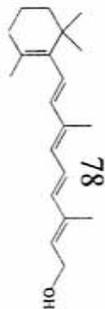
CÁLCULO DEL FACTOR DE RESPUESTA				
	ÁREA	CONC.estándar ppm		
	97753	6		
	96174	6		
	95957	6		
media=	97890.6667			
área/conc= Fr	16315.1111			
CONC. ppm	Fr	ÁREA	ÁREA/Fr	$((\text{ÁREA} / \text{Fr}) / \text{CONC}) * 100 = \%$
8.08	16,315.11	100,874	6.18	76.48
8.08	16,315.11	107,303	6.58	81.35
8.08	16,315.11	101,082	6.20	76.63
8.08	16,315.11	100,214	6.14	75.97
8.08	16,315.11	103,322	6.33	78.33
8.08	16,315.11	107,290	6.58	81.34
8.08	16,315.11	101,427	6.22	76.89
8.08	16,315.11	99,932	6.13	75.76
8.08	16,315.11	102,010	6.25	77.34
8.08	16,315.11	98,851	6.06	74.94
8.08	16,315.11	99,533	6.10	75.46
8.08	16,315.11	100,537	6.16	76.22
8.08	16,315.11	102,957	6.31	78.05
8.08	16,315.11	105,922	6.49	80.30
8.08	16,315.11	103,623	6.35	78.56
8.08	16,315.11	103,655	6.35	78.58
8.08	16,315.11	108,110	6.63	81.96
8.08	16,315.11	103,299	6.33	78.31
8.08	16,315.11	100,374	6.15	76.10
8.08	16,315.11	103,271	6.33	78.29
8.08	16,315.11	100,760	6.18	76.39

ANALISTA 1	
n =	21
MEDIA=	87.64
DESVIACIÓN ESTANDAR =	2.39
CV=	2.72
VARIANCIA =	5.70
ANALISTA 2	
n =	21
MEDIA=	77.77
S=	2.04
CV=	2.63
VARIANCIA =	4.17
La prueba de hipótesis sobre las variancias quedaría:	
nm -1 =	20
nM -1 =	20
F de tablas para:	2.46
Para calcular F es la variancia mayor entre la menor para que F sea mayor a uno	
F calculada =	1.37
CONCLUSIÓN	
Como $1.37 < 2.46$, la H_0 se acepta por lo tanto las variancias de las muestras analizadas en los dos días y con los dos analitas son iguales.	
La prueba de hipótesis sobre las medias quedaría:	
nm =	21
nM =	21
nm + nM - 2 =	40
t de tablas =	2.02
t calculada =	14.39
CONCLUSIÓN	
Como $14.39 > 2.02$, la H_0 se rechaza lo que quiere decir que las medias para ambos analistas son diferentes.	

Tabla 4.15. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 8 ppm del segundo día de experimentación del analista 2, y resultados del análisis estadístico para el cálculo la reproducibilidad.

ANALISTA 2

CÁLCULO DEL FACTOR DE RESPUESTA				
	ÁREA	CONC.estándar ppm		
	483292	30		
	498028	30		
	474562	30		
media=	485294			
área/conc= Fr	16176.4667			
CONC. ppm	Fr	ÁREA	ÁREA/Fr	((ÁREA /Fr)/CONC)*100 =%
50.53	16,176.47	659,216	40.75	80.65
50.53	16,176.47	672,794	41.59	82.31
50.53	16,176.47	685,817	42.40	83.90
50.53	16,176.47	631,844	39.06	77.30
50.53	16,176.47	620,863	38.38	75.96
50.53	16,176.47	626,607	38.74	76.66
50.53	16,176.47	642,150	39.70	78.56
50.53	16,176.47	669,543	41.39	81.91
50.53	16,176.47	667,861	41.29	81.71
50.53	16,176.47	641,816	39.68	78.52
50.53	16,176.47	636,222	39.33	77.84
50.53	16,176.47	652,089	40.31	79.78
50.53	16,176.47	622,662	38.49	76.18
50.53	16,176.47	640,967	39.62	78.42
50.53	16,176.47	633,257	39.15	77.47
50.53	16,176.47	651,283	40.26	79.68
50.53	16,176.47	667,012	41.23	81.60
50.53	16,176.47	628,052	38.83	76.84
50.53	16,176.47	597,982	36.97	73.16
50.53	16,176.47	624,719	38.62	76.43
50.53	16,176.47	639,130	39.51	78.19



ANALISTA 1	
n =	21
MEDIA=	79.24
S=	2.02
CV=	2.54
VARIANCIA =	4.06
ANALISTA 2	
n =	21
MEDIA=	78.72
S=	2.61
CV=	3.31
VARIANCIA =	6.79
La prueba de hipótesis sobre las variancias quedaria:	
nm -1 =	20
nM -1 =	20
F de tablas	2.46
Para calcular F es la variancia mayor entre la menor para que F sea mayor a uno.	
F calculada =	1.67
CONCLUSIÓN	
Como 1.67 < 2.46, la Ho se acepta por lo tanto las variancias de las dos muestras analizadas por los diferentes analistas son iguales.	
La prueba de hipótesis sobre las medias quedaria:	
nm =	21
nM =	21
nm + nM - 2 =	40
t de tablas =	2.02
t calculada =	0.73
CONCLUSIÓN	
Como 0.73 < 2.02, la Ho se acepta por lo tanto las medias para ambos analistas en los dos días son las mismas por lo que se concluye que es reproducible la técnica.	

Tabla 4.16. Datos de las soluciones de concentración aproximada a 50 ppm del día de experimentación del analista 2, y resultados del análisis estadístico para el cálculo de reproducibilidad.

6) Estabilidad de la muestra

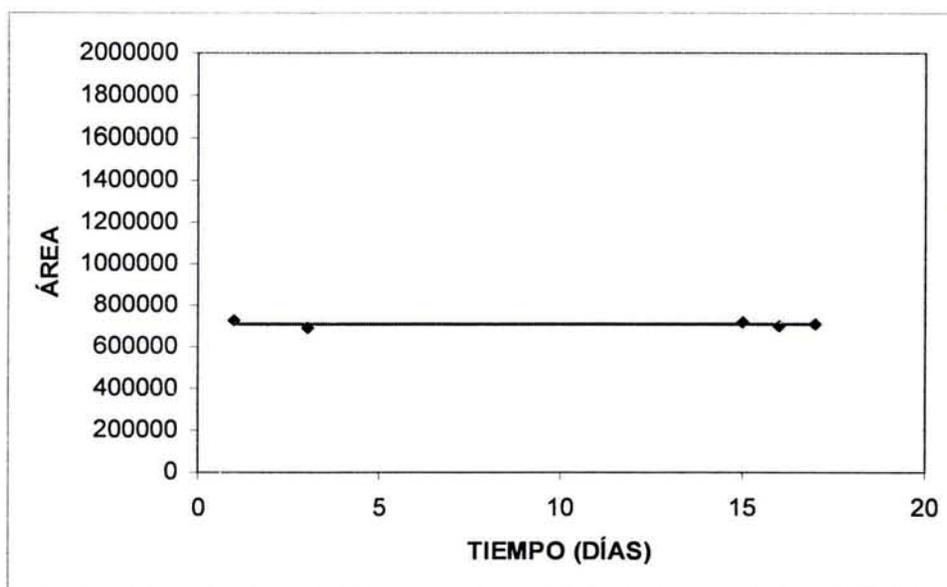
Gráfica de estabilidad.

Soluciones de concentración baja (concentración de 8.4ppm)

Para esta prueba se obtuvieron los siguientes resultados:

DÍAS	ÁREA	ÁREA	ÁREA	ÁREA PROMEDIO
1	720,900	720,428	744,858	728,729
3	689,574	670,422	720,128	693,375
15	740,265	708,201	703,479	717,315
16	700,456	723,447	688,884	704,262
17	707,864	718,511	709,481	711,952

Tabla 4.17. Resultados de la solución de concentración de 8.4ppm, monitoreada por espacio de 17 días.

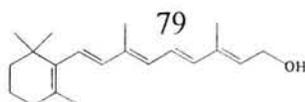


Gráfica 4.3. Resultados obtenidos para la concentración de 8.4ppm.

Soluciones de concentración alta (concentración de 43.6ppm)

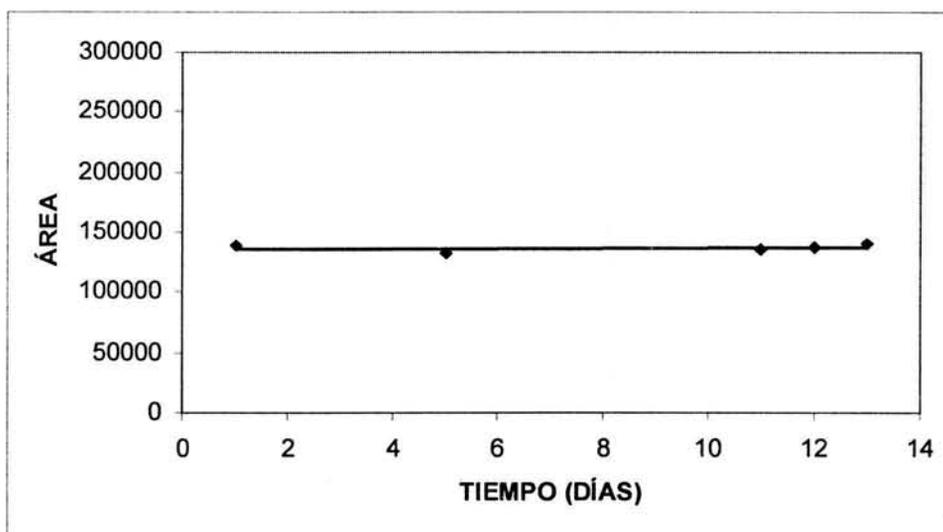
Para esta prueba se obtuvieron los siguientes resultados:

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



DÍAS	ÁREA	ÁREA	ÁREA	ÁREA PROMEDIO
1	144,376	136,749	136,585	139,237
5	126,584	133,805	134,658	131,682
11	129,023	134,684	141,994	135,234
12	135,410	136,600	137,760	136,590
13	136,118	142,634	140,404	139,719

Tabla 4.18. Resultados de la solución de concentración de 43.6ppm, monitoreada por espacio de 13 días.



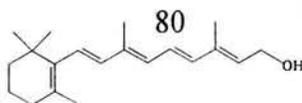
Gráfica 4.4. Resultados obtenidos para la concentración de 43.6ppm.

Posterior al estudio gráfico se llevó a cabo el estudio estadístico, ya que como se observa en el estudio gráfico la vitamina A presenta una buena estabilidad tanto para las concentraciones bajas como para las altas.

Prueba estadística.

Soluciones de concentración baja (concentración de 7.9ppm)

Como se indicó en el capítulo 3 el análisis estadístico se llevó a cabo en dos partes, primero se compararon los resultados obtenidos en la 1^{era} semana con respecto a la 2^{da} semana y en la segunda parte del análisis se compararon la 1^{era} semana con respecto a la 3^{era} semana.



Primera parte

Se realiza la prueba de hipótesis sobre la variancia:

$$H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

El resultado del estadístico de prueba es:

$$F_{cal} = \frac{s_M^2}{s_m^2} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = 2.16$$

s_1^2 = Variancia muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad = 14-1 = 13

s_2^2 = Variancia muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad = 14-1 = 13

Para una región bilateral o de dos colas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con $n_M - 1, n_m - 1$ grados de libertad = 13 se obtiene un valor en tablas de $F_{\alpha/2} = 3.12$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}$$

Como se obtiene que $2.16 < 3.12$, es decir que $F_{cal} < F_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , y las variancias de las muestras analizadas en las dos semanas son iguales, por lo que la prueba de hipótesis sobre las medias se establece como la comparación entre dos medias de muestras con variancias comparables, por lo que:

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$, es decir, $\mu_1 = \mu_2$

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

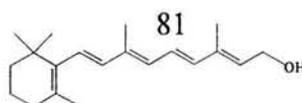
Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} = 1.72$$

Los grados de libertad para la distribución t son: $n_1 + n_2 - 2 = 14 + 14 - 2 = 26$ y como se trata de un ensayo bilateral o en dos sentidos con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ se obtiene en tablas una $t_{\alpha/2} = 2.06$.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$t_{calculada} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{calculada} > t_{\alpha/2}$$



Como se obtuvo que $1.72 < 2.06$, es decir que $t_{calculada} < t_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , lo que quiere decir que las medias obtenidas para ambas semanas provienen de la misma población por lo que la muestra es estable por lo menos durante 14 días para concentraciones bajas a las condiciones mencionadas de almacenamiento.

Segunda parte

Se realiza la prueba de hipótesis sobre la variancia:

$$H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

El resultado del estadístico de prueba es:

$$F_{cal} = \frac{s_M^2}{s_m^2} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = 1.49$$

s_1^2 = Variancia muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad = $14 - 1 = 13$

s_2^2 = Variancia muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad = $14 - 1 = 13$

Para una región bilateral o de dos colas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con $n_M - 1, n_m - 1$ grados de libertad = 13 se obtiene un valor en tablas de $F_{\alpha/2} = 3.12$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}$$

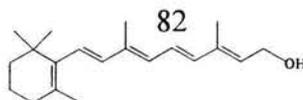
Como se obtiene que $1.49 < 3.12$, es decir que $F_{cal} < F_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , y las variancias de las muestras analizadas en las dos semanas son iguales, por lo que la prueba de hipótesis sobre las medias se establece como la comparación entre dos medias de muestras con variancias comparables, por lo que:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir, } \mu_1 = \mu_2$$

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

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} = 1.14$$



Los grados de libertad para la distribución t son: $n_1 + n_2 - 2 = 14 + 14 - 2 = 26$ y como se trata de un ensayo bilateral o en dos sentidos con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ se obtiene en tablas una $t_{\alpha/2} = 2.06$.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$t_{cal} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{cal} > t_{\alpha/2}$$

Como se obtuvo que $1.14 < 2.06$, es decir que $t_{cal} < t_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , lo que quiere decir que las medias obtenidas para ambas semanas provienen de la misma población por lo que la muestra es estable por lo menos durante 21 días para concentraciones bajas a las condiciones mencionadas de almacenamiento.

Soluciones de concentración alta (concentración de 49.5ppm)

Como se indicó en el capítulo 3 el análisis estadístico se llevó a cabo en dos partes, primero se compararon los resultados obtenidos en la 1^{era} semana con respecto a la 2^{da} semana y en la segunda parte del análisis se compararon la 1^{era} semana con respecto a la 3^{era} semana.

Primera parte

Se realiza la prueba de hipótesis sobre la variancia:

$$H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

$$H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

El resultado del estadístico de prueba es:

$$F_{cal} = \frac{S_M^2}{S_m^2} = \frac{S_1^2}{S_2^2} = 1.34$$

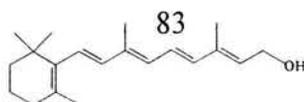
s_1^2 = Variancia muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad = $14 - 1 = 13$

s_2^2 = Variancia muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad = $14 - 1 = 13$

Para una región bilateral o de dos colas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con $n_M - 1, n_m - 1$ grados de libertad = 13 se obtiene un valor en tablas de $F_{\alpha/2} = 3.12$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}$$



Como se obtiene que $1.34 < 3.12$, es decir que $F_{cal} < F_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , y las variancias de las muestras analizadas en las dos semanas son iguales, por lo que la prueba de hipótesis sobre las medias se establece como la comparación entre dos medias de muestras con variancias comparables, por lo que:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir, } \mu_1 = \mu_2$$

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

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} = -0.63$$

Los grados de libertad para la distribución t son: $n_1 + n_2 - 2 = 14 + 14 - 2 = 26$ y como se trata de un ensayo bilateral o en dos sentidos con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ se obtiene en tablas una $t_{\alpha/2} = 2.06$.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$t_{calculada} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{calculada} > t_{\alpha/2}$$

Como se obtuvo que $-0.63 > -2.06$, es decir que $t_{calculada} > -t_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , lo que quiere decir que las medias obtenidas para ambas semanas provienen de la misma población por lo que la muestra es estable por lo menos durante 14 días para concentraciones altas a las condiciones mencionadas de almacenamiento.

Segunda parte

Se realiza la prueba de hipótesis sobre la variancia:

$$H_0 = \sigma_1^2 = \sigma_2^2$$

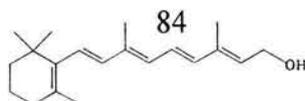
$$H_1 = \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$$

El resultado del estadístico de prueba es:

$$F_{cal} = \frac{s_M^2}{s_m^2} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = 1.15$$

$s_1^2 =$ Variancia muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad = $14 - 1 = 13$

$s_2^2 =$ Variancia muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad = $14 - 1 = 13$



Para una región bilateral o de dos colas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ con $n_M - 1, n_m - 1$ grados de libertad = 13 se obtiene un valor en tablas de $F_{\alpha/2} = 3.12$

Recordando que para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}$$

Como se obtiene que $1.15 < 3.12$, es decir que $F_{cal} < F_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , y las variancias de las muestras analizadas en las dos semanas son iguales, por lo que la prueba de hipótesis sobre las medias se establece como la comparación entre dos medias de muestras con variancias comparables, por lo que:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0, \text{ es decir, } \mu_1 = \mu_2$$

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

Realizando el cálculo del estadístico de prueba se obtiene que:

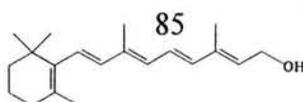
$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}} = -0.12$$

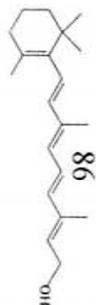
Los grados de libertad para la distribución t son: $n_1 + n_2 - 2 = 14 + 14 - 2 = 26$ y como se trata de un ensayo bilateral o en dos sentidos con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ se obtiene en tablas una $t_{\alpha/2} = 2.06$.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$t_{calculada} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{calculada} > t_{\alpha/2}$$

Como se obtuvo que $-0.12 > -2.06$, es decir que $t_{calculada} > -t_{\alpha/2}$, se concluye que se acepta la H_0 , lo que quiere decir que las medias obtenidas para ambas semanas provienen de la misma población por lo que la muestra es estable por lo menos durante 21 días para concentraciones altas a las condiciones mencionadas de almacenamiento.





DÍA	1	7	14
CONC. ppm	ÁREA	ÁREA	ÁREA
7.92	106,036	113,592	114,542
7.92	112,446	116,986	116,013
7.92	115,833	117,743	114,318
7.92	116,094	117,892	116,556
7.92	114,112	109,476	116,282
7.92	111,586	115,988	112,938
7.92	108,961	117,431	115,757
7.92	115,701	117,533	113,898
7.92	113,240	115,747	113,433
7.92	112,023	115,773	113,953
7.92	113,780	116,580	114,617
7.92	113,111	115,417	103,653
7.92	112,694	103,371	113,506
7.92	111,875	114,765	110,026
n=	14	14	14
Media=	112,678	114,878	113,535
s =	2,700	3,967	3,296
VARIANCIA=	7,291,410	15,733,673	10,860,710
CV=	2.4	3.5	2.9

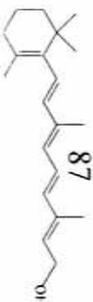
La prueba de hipótesis sobre los días 1 y 7 las variancias quedarían:	
n menor -1 =	13
n Mayor -1 =	13
F de tablas=	3.12
F calculada =	2.16
CONCLUSIÓN	
F calculada es menor que la F de tablas La Ho se acepta por lo tanto pertenecen a una misma población.	

La prueba de hipótesis sobre las medias del día 1 y 7 quedaría:	
nm =	14
nM =	14
nm + nM - 2 =	26
t de tablas =	2.06
t calculada =	1.72
CONCLUSIÓN	
t calculada es menor que la t de tablas La Ho se acepta por lo tanto las medias son iguales.	

La prueba de hipótesis sobre los días 1 y 14 las variancias quedarían:	
n menor -1 =	13
n Mayor -1 =	13
F de tablas =	3.12
F calculada =	1.49
CONCLUSIÓN	
F calculada es menor que la F de tablas La Ho se acepta por lo tanto pertenece a una misma población.	

La prueba de hipótesis sobre las medias del día 1 y 14 quedaría:	
nm =	21
nM =	21
nm + nM - 2 =	40
t de tablas =	2.06
t calculada =	1.14
CONCLUSIÓN	
t calculada es menor que la t de tablas La Ho se acepta por lo tanto las medias son iguales.	

Tabla 4.19. Datos de las tres semanas de experimentación para las soluciones de concentración de 7.92 ppm. y el análisis estadístico.



DÍA	1	7	14
CONC. ppm	ÁREA	ÁREA	ÁREA
49.5	666,462	734,713	734,182
49.5	731,442	738,200	733,112
49.5	674,520	744,838	728,111
49.5	742,613	739,642	736,549
49.5	723,077	677,597	704,950
49.5	721,474	711,627	713,888
49.5	742,664	741,073	728,355
49.5	745,086	708,756	727,991
49.5	694,666	712,850	709,602
49.5	728,776	720,380	710,742
49.5	676,540	685,393	657,732
49.5	679,180	675,647	671,145
49.5	679,556	686,010	663,975
49.5	667,619	674,783	668,498
n=	14	14	14
Media=	705,263	710,822	706,345
s=	30,815	26,640	28,755
VARIANCIA=	949,558,863	709,675,624	826,850,866
CV=	4.37	3.75	4.07

La prueba de hipótesis sobre los días 1 y 7 las variancias quedarían:	
n menor -1 =	13
n Mayor -1 =	13
F de tablas =	3.12
F calculada =	1.34
CONCLUSIÓN	
F calculada es menor que la F de tablas La Ho se acepta por lo tanto pertenecen a una misma población.	

La prueba de hipótesis sobre los días 1 y 14 las variancias quedarían:	
n menor -1 =	13
n Mayor -1 =	13
F de tablas =	3.12
F calculada =	1.15
CONCLUSIÓN	
F calculada es menor que la F de tablas La Ho se acepta por lo tanto pertenece a una misma población.	

La prueba de hipótesis sobre las medias del día 1 y 7 quedaría:	
nm =	21
nM =	21
nm + nM - 2 =	40
t de tablas =	2.06
t calculada =	-0.63
CONCLUSIÓN	
t calculada es menor que la t de tablas La Ho se acepta por lo tanto las medias son iguales	

La prueba de hipótesis sobre las medias del día 1 y 14 quedaría:	
nm =	21
nM =	21
nm + nM - 2 =	40
t de tablas =	2.06
t calculada =	-0.12
CONCLUSIÓN	
t calculada es menor que la t de tablas La Ho se acepta por lo tanto las medias son iguales	

Tabla 4.20. Datos de las tres semanas de experimentación para las soluciones de concentración aproximada de 49.5 ppm. y el análisis estadístico.

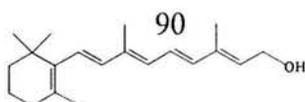
CONCLUSIONES

repetibilidad mejora cuando aumenta el entrenamiento y la experiencia del analista y se logra disminuir el error, esto es lógico ya que se trabaja con concentraciones bajas y cualquier variación es más notoria que cuando se trabaja con concentraciones altas, por lo que el analista tiene que trabajar con una buena habilidad.

- El sistema mostró una reproducibilidad con un error máximo del 5% por lo que nos indica que se encuentra dentro de los valores marcados para un método analítico. Hay que indicar que cuando el analista que apoyó para realizar este estudio no tenía el mismo entrenamiento que tenía el analista realizador de este trabajo, por lo que cuando esta persona recibiera un mayor entrenamiento y experiencia probablemente el error disminuirá.
- La prueba de estabilidad permite indicar que las soluciones estándar de vitamina A son estables por un periodo de tres semanas por lo menos, mientras se almacene en material de color ámbar (o aislado de la luz) y bajo refrigeración de 4°C. Este tiempo mínimo permitirá trabajar perfectamente una buena cantidad de muestras, realizando además los controles de calidad adecuados.

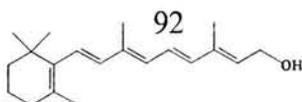
Todos los resultados obtenidos en este trabajo y que se acaban de mencionar permiten indicar y concluir que:

- El Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia que se tiene en el laboratorio 3F permite realizar la separación de la vitamina A como retinol de otras vitaminas liposolubles, y su cuantificación con una buena linealidad, precisión, repetibilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos.
- Por lo tanto se puede realizar el análisis de la vitamina A en matrices reales con confiabilidad en los resultados obtenidos en el sistema instrumental mencionado.



BIBLIOGRAFÍA

1. MCNAIR, H. M., *Cromatografía líquidos de alta presión. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía 10*, Washinton, D. C; 1973.
2. COLEGIO DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS BIÓLOGOS, *Guía de Validación de Métodos Analíticos*; editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.; 2002.
3. LLOYD, L. E. *Fundamentos de nutrición*. Acribia, Zaragoza España, pág. 184-190, 1982.
4. CASANUEVA, E. *Nutriología Médica. Medica Panamericana*, México, pág 359-368, 1995.
5. ROBINSON D. S. *Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos*. Acribia, Zaragoza España, pág 311-315, 1991
6. BADUI, D. S. *Química de los alimentos*, Alhambra Mexicana, 3^a edic., D. F; México, pág. 338-341, 1996.
7. FENNEMA, O R. *Química de los alimentos*. Acribia Zaragoza España, pág. 578-583 1993.
8. BELITZ, G. *Food Chemistry, Springer*, New York; pág. 378-381, 1999.
9. MATAIX, V. J. *Nutrición para educadores*. Díaz de Santos, S.A., Madrid España, pág. 102-105, 407-425, 1995.
10. MILLER, J. N. MILLER, J.C. *Estadística y quimiometría para química analítica*, Pearson educación, S. A., España, 2000.
11. SUPELCO, *Chromatography products of analysis and purification (catalogo)*, pag. 543, 2000.
12. The Index Merck on CD ROM version 12.1.C.
13. LABASTIDA, M. L. *Determinación del Clorhidrato de Lincomicina en columna capilares por Cromatografía de Gases*, Tesis de licenciatura, UNAM; D, F; México, 1989.
14. FREUND J. E. *Probabilidad y estadística para ingenieros*, Reverte, Madrid España, 1973.
15. QUATTROCCHI, O: A: *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*, Artes Gráficas Farro S. A; 1992.



16. YOST, R. W. *Practical Liquid Chromatography An Introduction*, Perkin-Elmer Corporation, U. S.A.; 1^a edic., 1980.

