



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

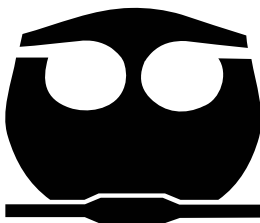
**VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA  
EFICIENCIA PARA EL ANÁLISIS DE  
VITAMINA E.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ELIZABETH CARBAJAL JARQUÍN**



**MÉXICO, D. F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Jurado asignado**

**Presidente**      Profa. Ángela Sotelo López

**Vocal**            Profa. Ernestina Cervera Flores

**Secretario**      Prof. Adolfo García Osuna

**1<sup>er</sup>. Suplente**    Profa. Lucía Cornejo Barrera

**2<sup>o</sup>. Suplente**    Profa. Georgina Artemisa Duarte  
Lisci

### **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**

-----

Elizabeth Carbajal Jarquín

*La dicha de la vida consiste  
en tener siempre algo que hacer,  
alguien a quien amar y  
alguna cosa que esperar.*

*Thomas Chalmers*

*Quien no conoce nada, no ama nada. Quien no puede hacer nada, no  
comprende nada. Quien nada comprende, nada vale. Pero quien  
comprende también ama, observa, ve. . . Cuando mayor es el  
conocimiento inherente a una cosa, más grande es el amor. . . Quien cree  
que todas las frutas maduran al mismo tiempo que las frutillas nada  
sabe acerca de las uvas.*

*PARACELSO*

# AGRADECIMIENTOS

*A Dios por permitirme cerrar este ciclo en mi vida.*

*A mis padres, Fidel y Remedios, por todo el amor, comprensión y apoyo que me dan y por dejarme elegir y tomar mis propias decisiones.  
Los Quiero Mucho.*

*A mis hermanos, Enrique y Carlos, por su cariño.*

*A mi abuela Juana y a mis tíos, Juquila, Marisol y Manuel, por su apoyo, consejos y cariño.*

*A mis amigos y compañeros que han compartido conmigo este sueño, que me permitieron aprender de ellos y que alegraron mi camino por la facultad, en especial a Adriana, Antonio, Claudia, Gilda, Emilio, Susana y Víctor Hugo.*

*A Víctor Hugo por tu comprensión y amor que me demuestras cada día.*

*A mi asesor y a mi supervisora técnica, Adolfo y Silvia, por compartir conmigo sus conocimientos, por su confianza y por su amistad.*

*A mis sinodales, Angela Sotelo, Ernestina Cervera y Adolfo García, por el tiempo que dedicaron en la revisión de esta tesis.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de ella y por proporcionarme los medios para llegar a esta meta.*

## ÍNDICE

	Página
<b>CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
<b>CAPÍTULO 2 PARTE TEÓRICA</b>	
VITAMINA E	6
↗ Propiedades químicas y físicas	6
↗ Digestión, absorción y metabolismo	8
↗ Función	8
↗ Deficiencia	10
↗ Fuentes alimentarias	11
↗ Recomendaciones	11
↗ Análisis de vitamina E	12
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA	14
VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA	26
<b>CAPÍTULO 3 PARTE EXPERIMENTAL</b>	
PARTE EXPERIMENTAL	34
↗ Reactivos	34
↗ Material Medición	34
↗ Instrumentación	35
↗ Condiciones óptimas de trabajo	36
↗ Validación	37
<b>CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	
CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO	42
VALIDACIÓN	50
↗ Linealidad del sistema	50
↗ Precisión del sistema	57
↗ Precisión del método	65
-Repetibilidad	65
-Reproducibilidad	9
↗ Estabilidad de la muestra	74
<b>CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES</b>	
CONCLUSIONES	81
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	83
<b>ANEXO</b>	86



# *CAPÍTULO 1*

## *INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS*



---

---

## INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia que ha adquirido la vitamina E por su actividad antioxidante en el área de aditivos de alimentos, en la nutrición y en la cosmetología, es necesario contar con técnicas y métodos analíticos validados para llevar a cabo su cuantificación. Hoy en día se debe contar con una técnica confiable y precisa de cuantificar la cantidad presente de vitamina E en los alimentos. ya que con las recomendaciones médicas de aumentar el consumo de grasas poliinsaturadas y disminuir el consumo de grasa saturadas para evitar problemas cardiovasculares hace necesario aumentar la ingesta de esta vitamina para evitar que las grasas poliinsaturadas se oxiden, y al mismo tiempo para no tener deficiencia alimentaría de esta vitamina que puede traer como consecuencia problemas principalmente de anemia hemolítica.

Las técnicas analíticas permiten obtener resultados que se acercan con la mayor precisión y exactitud a los considerados como valores verdaderos o tal vez a los valores legislados. La validación de una técnica permite contar con toda la información estadística que permite conocer el margen de error con el que se obtienen los resultados, y con ello cómo mantener constante dicho error o tratar de disminuirlo.

Aunque en este trabajo sólo se va a realizar la validación de la técnica cromatográfica, si es importante mencionar que ésta no servirá de nada si al desarrollar una técnica de preparación de muestra que nos permita extraer a la vitamina E no es adecuada ni se optimiza de manera correcta, pero para poder desarrollar la técnica de extracción se necesita primero tener una técnica cualitativa y cuantitativa validada para poder realizar el desarrollo de las técnicas de extracción, esto es de mayor importancia debido a que las matrices de tipo alimentario son complejas.

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 entre otros condiciones óptimas de trabajo de la técnica a utilizar, linealidad, precisión, reproducibilidad y repetibilidad del método, exactitud, cantidad mínima detectable, tolerancia del sistema, estabilidad de la muestra.

Para el caso de esta investigación se determinaron los siguientes parámetros para validar la cuantificación de esta vitamina por la Técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE).

1) Condiciones del sistema cromatográfico con respecto a otras vitaminas liposolubles

- a) Eficiencia
- b) Selectividad
- c) Factor de capacidad
- d) Resolución

2) Linealidad

La linealidad es el grado al cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta. Es importante especificar en que intervalo la curva de calibración se aproxima a una línea recta. Se calculó la linealidad del sistema.

3) Precisión

La precisión se define como el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad, normalmente en una validación se calcula la precisión del sistema y la precisión del método conocido esto último como la repetibilidad y reproducibilidad del método. En este trabajo se realizó la precisión de sistema y sólo se utilizará el planteamiento estadístico de la precisión del método para conocer la repetibilidad y reproducibilidad de preparación de disoluciones.

4) Estabilidad de la muestra

Se trata de observar en este ensayo el efecto que tiene el disolvente y el almacenamiento de las disoluciones estándar sobre la vitamina E en el tiempo de análisis.

## OBJETIVOS

- Determinar las condiciones óptimas siguiendo la técnica de cromatografía de líquidos (CLAE) para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de la vitamina E con respecto a otras vitaminas liposolubles, utilizando para ello el sistema CLAE del laboratorio 3F.
- Validar la metodología aplicada al sistema de CLAE para realizar el análisis cuantitativo de la vitamina E, y plantear si el sistema cromatográfico permitirá realizar el análisis de vitamina E en muestras reales (en matrices alimentarias preferentemente).

# *CAPÍTULO 2*

## *PARTE TEÓRICA*

## PARTE TEÓRICA

### VITAMINA E

La Vitamina E pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles; siendo descubierta por Herbert Evans y Catherine Bishop, en 1922, quienes identificaron un compuesto liposoluble presente en aceites vegetales, esencial para la reproducción de ratas de laboratorio, que fue denominado tocoferol (del griego *tocos*, parto y *feros*, llevar) y posteriormente fue nombrada en 1924 vitamina E por Sure. El aislamiento de esta vitamina fue llevado a cabo por Evans en 1936 y en 1959 se comprobó que era indispensable para la nutrición humana <sup>1, 2</sup>.

#### Propiedades químicas y físicas<sup>1, 3, 4, 5, 6</sup>

En la naturaleza existen ocho compuestos con actividad de vitamina E, los  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  tocoferoles y los correspondientes tocotrienoles, todos derivados del dihidrobenceno-gamma-pirano, y sólo difieren estructuralmente por el número y posición de subgrupo metilo en el anillo bencénico. Los tocoferoles contienen una unidad isoprenoide saturada de 16 carbonos, con tres centros de simetría en los carbonos 2, 4' y 8', con la configuración R y los tocotrienoles contiene una unidad trieno isoprenoide de 16 carbonos, con las configuraciones 2R, 3' *trans* y 7' *trans*. De estos 8 isómeros el que es más predominante en muchas especies es el  $\alpha$ -tocoferol; siendo a su vez la forma biológicamente activa y por ello, es el que más importancia tiene como nutrimento, además de ser el mejor antioxidante en células de mamíferos y en sangre (*figura 1*).

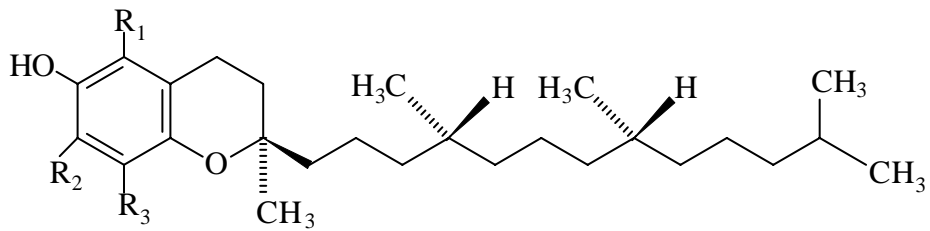
La vitamina E se almacena principalmente en el tejido adiposo, ya que al parecer no existe ningún órgano específico para su almacenamiento, en los mamíferos y en los alimentos, tanto los tocoferoles como los tocotrienoles se encuentran en la fase lipídica o en las monocapas debido a las largas cadenas lineales hidrocarbonadas que poseen.

Existen diversos derivados comerciales de vitamina E que se utilizan como nutrimento y como antioxidante, cada uno con actividad biológica diferente.

La actividad de la vitamina E de los compuestos activos se expresa en términos de mg de  $\alpha$ -tocoferol equivalente.

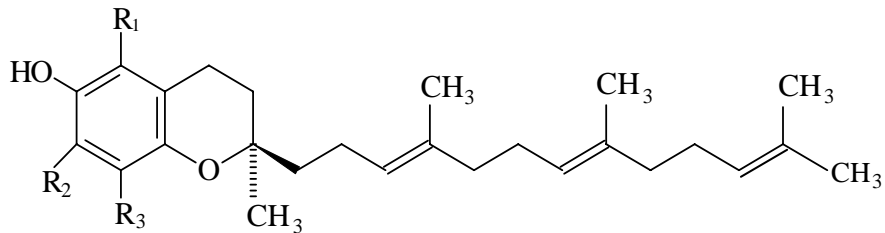
1 mg de  $\alpha$ -tocoferol equivalente = 1.00 mg D  $\alpha$ -tocoferol  
= 1.10 mg de acetato de D  $\alpha$ -tocoferol  
= 1.36 mg D y L- $\alpha$ -tocoferol  
= 1.49 mg (1.49 U.I.) acetato de D y L- $\alpha$ -tocoferol

Tocoferol



Tocoferol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
α	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
δ	H	H	CH <sub>3</sub>

Tocotrienol



Tocotrienoles	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
α	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
δ	H	H	CH <sub>3</sub>

**Figura 1.** Estructura de tocoferoles y tocotrienoles.

En lo que respecta a sus propiedades físicas la vitamina E es insoluble en agua, soluble en grasa y solventes orgánicos; estable frente a la luz visible, inestable frente a la luz ultravioleta, a los álcalis, a la oxidación y al calor, especialmente a estos dos últimos cuando hay presencia de oxígeno.

**Digestión, absorción y metabolismo**<sup>2,7</sup>

La vitamina E se ingiere en estado libre o formando ésteres, las formas esterificadas para poder ser digeridas deben ser previamente hidrolizadas, por acción de estereasas pancreáticas y de la mucosa intestinal.

Debido a que es una vitamina liposoluble, se encuentra disuelta en las grasas alimentarias a nivel intestinal, por lo tanto la absorción de la vitamina E y su digestión dependen de una buena funcionalidad biliar y pancreática; se ha observado que los triglicéridos de cadena media incrementan su absorción, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados la inhiben probablemente como resultado de la interacción química con éstos o con sus productos de peroxidación en el lumen intestinal, solamente se llega a absorber de un 20 a 50% de la vitamina ingerida.

Cuando la vitamina E se encuentra en el interior del eritrocito es incorporada en los quilomicrones, los cuales vía linfática alcanzan la circulación sistémica llegando finalmente al hígado tras alguna degradación en tejidos periféricos transportada en los quilomicrones remanentes. Los quilomicrones también pueden ceder la vitamina a otros tejidos y a las lipoproteínas plasmáticas.

En el hepatocito la vitamina E se une a una proteína hepática, denominada proteína transportadora de tocoferol (TTP), la vitamina puede llevar a cabo las funciones hepáticas, o ser de nuevo transportada fuera del hígado gracias a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) allí sintetizadas. De estas VLDL es posteriormente transferida a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y sobre todo a lipoproteínas de baja densidad (LDL) o bien retornar al hígado a través de la VLDL remanentes, e incluso a través de las LDL y HDL cuando alcanzan este órgano para su metabolización correspondiente. La vitamina E también se puede transferir a los tejidos mediante receptores específicos para las LDL.

El tocoferol absorbido se distribuye ampliamente por todos los tejidos y células sanguíneas incorporándose a las membranas de las células junto con el colesterol y los fosfolípidos.

Hay que recordar que no existe un órgano concreto para su almacenamiento, pero el tejido adiposo es la principal reserva; su principal vía de excreción son las heces.

**Función**<sup>2,5,7</sup>

La principal función fisiológica de esta vitamina es la de actuar como un poderoso antioxidante, siendo el mejor antioxidante liposoluble en la células de mamíferos y en la sangre. También se le atribuyen acciones como estabilizador de membranas celulares, agregación

plaquetaria, efecto protector contra la hemólisis, modulador de la actividad de ciertas enzimas, en la biosíntesis de eicosanoides, etc., probablemente todas estas propiedades sean consecuencia de su actividad antioxidante.

### Capacidad antioxidante

El  $\alpha$ -tocoferol actúa como potente antioxidante lipofílico y supresor del daño oxidativo de membranas biológicas, lipoproteínas y tejidos, mediante la eliminación de radicales libres, tales como oxígeno singulete, radical superóxido, radical hidroxilo y radical peroxilo.

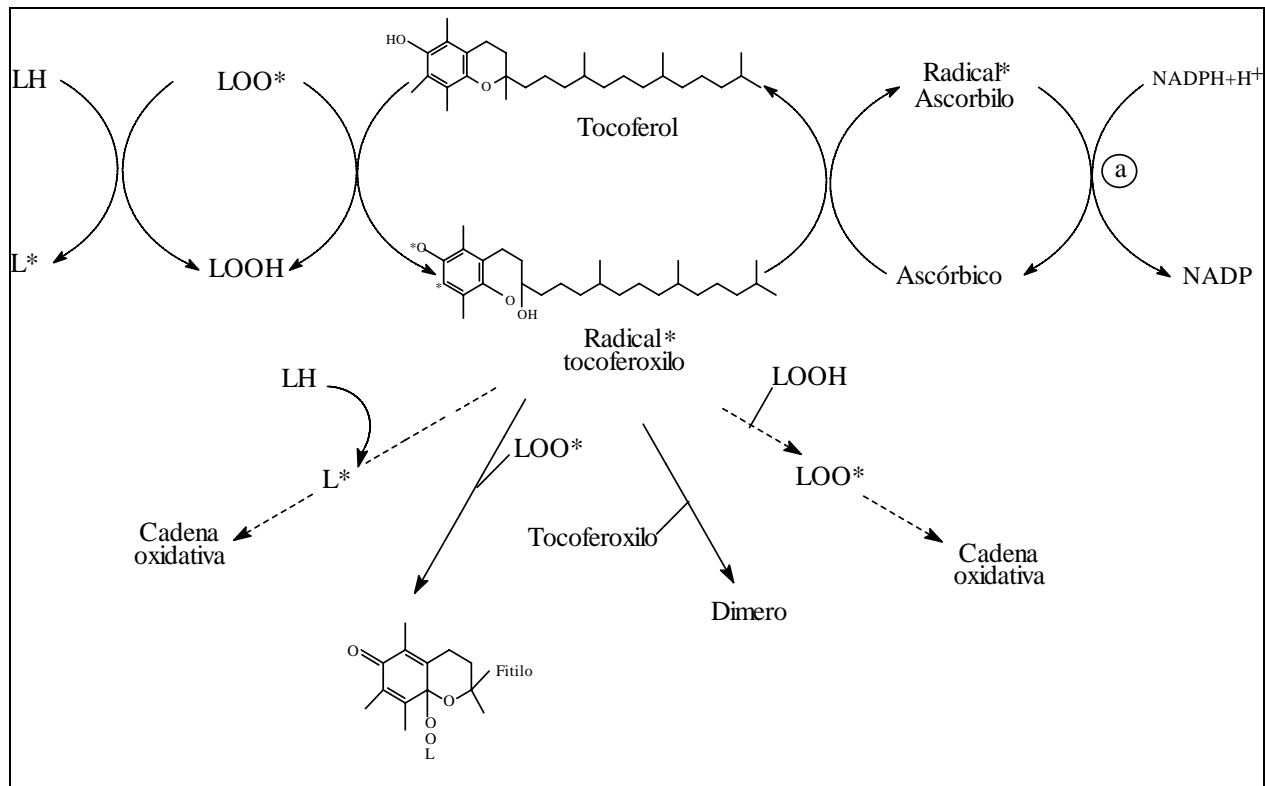
La vitamina E actúa como agente reductor en su mecanismo de inhibición de la oxidación, especialmente de lípidos. En lo que respecta a la cadena de propagación de la peroxidación lipídica es a nivel del radical lipídico peroxilo ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) donde lleva a cabo su acción, eliminando e impidiendo que continúe la cadena y por tanto la formación de nuevos radicales libres (*figura 2*).

Durante esta reacción se forma un radical  $\alpha$ -tocoferoxilo, que es un radical libre, el cuál puede seguir varias vías:

- a) Reaccionar con otro radical peroxilo ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) generando un aducto, que ya no es un radical libre.
- b) Reaccionar con otro radical tocoferoxilo y dar un dímero, que tampoco es un radical libre.
- c) Ser reducido por un reductor como puede ser la vitamina C, ubiquinol (CoQ) o glutatión, regenerándose el  $\alpha$ -tocoferol.

Pero también puede ocurrir que el radical tocoferoxilo pueda sustraer un átomo de hidrógeno de lípidos (LH) o hidroperóxidos, dando lugar a la formación de un radical lipídico ( $\text{L}^{\bullet}$ ) o peroxilo ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) respectivamente, lo que pone de nuevo en funcionamiento la cadena de propagación, mostrando la vitamina E una actividad prooxidante.





**Figura 2.** Vías seguidas por el radical tocoferoxilo. (Las vías señaladas con guiones son las posibles vías prooxidantes).

**Deficiencia** <sup>1, 2, 7</sup>

La deficiencia de esta vitamina en humanos, con origen exclusivamente alimentario, es bastante rara y queda limitada a los cuadros multicarenciales propios de países subdesarrollados o en vías de desarrollo. En recién nacidos prematuros se puede presentar deficiencia pero es debido a que sus reservas corporales son bajas y a una mala absorción de las grasas.

La mayoría de los síntomas de esta deficiencia está relacionada con la ausencia de protección antioxidante, siendo uno de los signos más característicos la tendencia de los eritrocitos a la lisis.

Asimismo pueden aparecer deficiencias asociadas a patologías como síndrome de malabsorción, fibrosis quística, abetalipoproteinemia, enfermedades crónicas del hígado, anemias hemolíticas, etc.

**Fuentes alimentarias**<sup>1, 2, 4, 5, 8</sup>

La vitamina E está ampliamente distribuida en la naturaleza como puede verse en la *tabla 1*. Los alimentos más ricos en tocoferoles son los aceites vegetales, especialmente los de mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados, como girasol, maíz, oliva, etc.. Asimismo se encuentra en granos de cereales, alimentos de origen vegetal y en el tejido adiposo de los animales. En las plantas se localiza principalmente en las hojas y partes verdes.

Durante el almacenamiento y preparación de los alimentos, se producen pérdidas considerables en el contenido de vitamina E, en los procesos de fritura, asado o cocción a fuego lento es cuando se producen las mayores pérdidas de esta vitamina, al haber un mayor contacto con el calor y el oxígeno.

La vitamina E se utiliza mucho como aditivo para proteger del enranciamiento a los alimentos con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados.

**Recomendaciones**<sup>3, 5, 6, 9</sup>

La ingesta diaria recomendada (IDR) de Vitamina E para la población mexicana es de 10 mg de  $\alpha$ -tocoferol equivalente para adultos y mujeres embarazadas, para infantes de 3-4 mg y para niños y puberes de 6-10 mg (INCMNSZ, INNSZ)<sup>9</sup>. Este requerimiento se puede ver alterado cuando: exista un incremento en la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados, como resultado de su actividad antioxidante, recomendándose una ingesta de 0.4 mg de  $\alpha$ -tocoferol por cada gramo de ácido graso poliinsaturado o cuando se tienen altas ingestas de selenio y aminoácidos azufrados en la dieta, ya que éstos permiten un ahorro de  $\alpha$ -tocoferol y una menor ingesta, debido a que participan en el sistema antioxidante del glutatión al mantener activo este sistema.

Alimento	Cantidad (mg/100g)*
Hígado de cerdo	0.17
Carne magra	0.15
Sardina	1.6
Huevo de gallina	1.6
Yogurt natural	0.04
Leche entera pasteurizada	0.09
Almendra seca	20
Arroz	0.1
Tomate	0.89
Pimiento	0.8
Espinaca	1.6
Uva	0.7
Pera	0.89
Aguacate	2.27
Aceite de oliva	48.7
Aceite de girasol	5.1
Aceite de hígado de bacalao	20
Aceite de maíz	17.2
Aceite de germen de trigo	215.4

\*Fuente: Mataix J et al. Tabla de composición de los alimentos Españoles. Ed. Unive.

**Tabla 1.** Contenido de Vitamina E en distintos alimentos.

### **Análisis de vitamina E**<sup>3, 5, 6, 10</sup>

La cuantificación de vitamina E en alimentos se realiza a partir de la extracción de los  $\alpha$ -tocoferoles, ya que ésta es la forma biológicamente activa de todos los tocoferoles y tocotrienoles. Su cuantificación se realiza generalmente con el método colorimétrico<sup>10</sup>, pero poco a poco este método ha sido desplazado por la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE por sus siglas en español) en fase inversa, debido a que esta última permite separar analitos no volátiles de mezclas complejas, lo que nos permite separar los isómeros de los tocoferoles y tocotrienoles y a las otras vitaminas liposolubles presentes en los alimentos,

además de que presenta una menor interferencia y una mayor sensibilidad que el método colorimétrico.

En artículos publicados<sup>10, 11, 12, 13, 15, 15</sup> donde se ha utilizado esta técnica para cuantificar al  $\alpha$ -alfatocoferol y en algunos casos al  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol, y en manuales de productos cromatográficos<sup>16,17</sup>, el sistema de detección que se ha utilizado con mayor frecuencia en CLAE es el espectrofotómetro de UV, ya que este detector presenta una buen sensibilidad y selectividad, aunque también se pueden utilizar otros detectores como fotodiodos, amperométricos, etc..

En la *tabla 2* se presentan algunas de las condiciones que se han utilizado para cuantificar a la vitamina E principalmente como  $\alpha$ -tocoferol.

Referencia	Columna	Fase móvil	Detector
AOAC Oficial Method 992.03 <sup>10</sup>	Hypersil Sílica	Hexano-alcohol isopropílico (99.92:0.08)	UV $\lambda=280$ nm
3J. Atienza et al. (1998) <sup>11</sup>	RP-18	Metanol-agua (92:8)	UV $\lambda= 290$ y $330$ nm
R. Cava et al. (1999) <sup>12</sup>	RP-18	Metanol –agua (93:7)	UV $\lambda=292$ nm
A. Escivá et al. (2002) <sup>13</sup>	ODS-2 (C <sub>18</sub> )	Metanol- agua (94:6)	UV $\lambda=294$ nm
M. M. Delgado Zamarreño et al. (1996) <sup>14</sup>	C <sub>18</sub>	Metanol- agua (99:1)	Amperométrica
B. Rodas Mendoza et al.(2003) <sup>15</sup>	ODS2 (C <sub>18</sub> )	Metanol 100%	UV $\lambda=292$ nm
SUPELCO <sup>16</sup>	SUPELCOSIL LC-18	Metanol-agua (98:2)	UV $\lambda=290$ nm
Alltech <sup>17</sup>	Prevail™ C <sub>18</sub>	Acetonitrilo-Metanol (75:25)	UV $\lambda=220$ nm

**Tabla 2.** Combinaciones de columnas, fase móvil y detección en el análisis de vitamina E.

## CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA <sup>18, 19, 20, 21</sup>

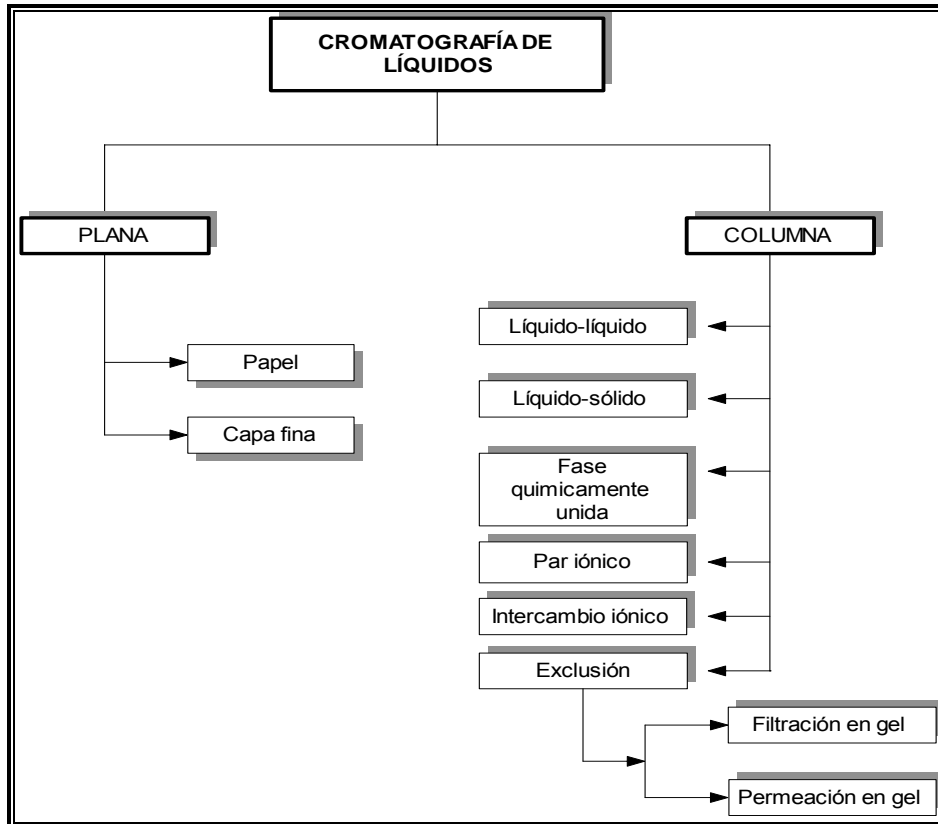
La cromatografía tiene sus inicios en el año de 1905, la cual se utilizó para separar mezclas de gases y vapores, pero el experimento más recordado es el realizado por Tswett, en 1906, que consistió en la separación de la clorofila de extractos vegetales utilizando la cromatografía de elución; los avances de esta técnica empezaron a realizarse a partir de 1968 los cuales se fueron realizando de forma gradual, dentro de estos el más importantes fue la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua.

La cromatografía se define como una técnica fisicoquímica que permite separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos, la cuál consta de una fase estacionaria y una fase móvil; en las cuáles los componentes de la muestra se distribuirán y serán retenidos selectivamente. Se dice que es una técnica fisicoquímica porque existe una constante de equilibrio, que está dada por la cantidad de analito retenido en la fase estacionaria (FE) y la cantidad de analito retenida en la fase móvil (FM).

$$K_{eq} = \frac{[analito]_{FE}}{[analito]_{FM}}$$

Este equilibrio existe por las interacciones que se llevan a cabo cuando los analitos y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria (que se encuentra empacada), las interacciones pueden ser de tipo hidrofóbico, hidrofílico, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, dipolo, dipolo-dipolo inducido y electrostáticas, las cuales son las responsables de la mayor o menor afinidad de la muestra por la fase estacionaria o por la fase móvil. Cuando un analito presenta mayor interacción o afinidad con la fase estacionaria tardará más en eluir del sistema cromatográfico y de igual forma el analito que tenga mayor afinidad por la fase móvil eluirá más rápido de éste.

La técnica de cromatografía se divide de forma general dependiendo del tipo de fase móvil que se utilice, teniendo cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y cromatografía de fluidos supercríticos, y a su vez se puede subdividir en base al tipo de fase estacionaria que se utilice. La cromatografía de líquidos (CL) utiliza como fase móvil un líquido y ésta se subdivide en CL plana y CL en columna tomando en cuenta en dónde se coloca la fase estacionaria, en la *figura 3* podemos observar la clasificación más común de la cromatografía de líquidos.



**Figura 3.** Clasificación de la cromatografía de líquidos.

La técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (*High Performance Liquid Chromatographic* o HPLC por su nombre y siglas en inglés) utilizada en este trabajo cae dentro de la CLAE en columna de fase químicamente unida.

La cromatografía de líquidos de fase químicamente unida consiste en unir químicamente a la fase estacionaria (mediante enlaces covalentes) a una partícula sólida, la cual puede ser sílice (la más utilizada), alúmina o florisil. Dependiendo del grupo funcional que posea el compuesto que se une a la partícula soporte (*tabla 3*) podemos trabajar en dos tipos de cromatografía, fase normal o en fase inversa, donde la primera consiste en tener una fase estacionaria de tendencia polar y una fase móvil de tendencia no polar, y en el segundo caso se trabaja con una fase estacionaria de tendencia no polar y una fase móvil de tendencia polar.

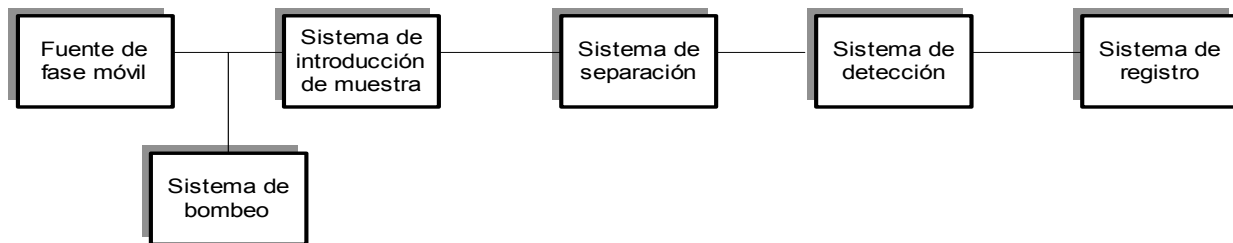
FASE POLAR		FASE NO POLAR	
$-(CH_2)_3NH_2$	Amino	$-(CH_2)_{17}CH_3$	Octadecil
$-(CH_2)_3C\equiv N$	Ciano	$-(CH_2)_7CH_3$	Octil
$-(CH_2)_2OCH_2CH(OH)CH_2OH$	Diol	$-(CH_2)_3C_6H_5$	Fenil

**Tabla 3.** Compuestos más utilizados como fase estacionaria en fase químicamente unida.

## INSTRUMENTACIÓN

La cromatografía de líquidos en columna en sus inicios consistía de un tubo de vidrio relleno con algún material como sílice, alúmina, etc., en dónde la fase móvil y la muestra eluían a través de este relleno sólo por la fuerza de gravedad, lo que hacía que el análisis fuera muy lento, con el tiempo se fueron haciendo adaptaciones y desarrollándose la instrumentación con la adaptación de bombas, detectores, disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria y de la longitud de la columna principalmente.

La instrumentación para CLAE se puede dividir básicamente en los siguientes módulos:



### **Fuente de fase móvil**

La fase móvil se puede almacenar en recipientes de vidrio, de acero inoxidable o de plástico inerte los cuales pueden ser de diferente capacidad (*figura 4*).

Los disolventes utilizados como fase móvil deben cubrir ciertos requisitos como:

- ▲ ser de alta pureza, usualmente grado cromatográfico o bien grado espectroscópico,
- ▲ inerte,
- ▲ tener baja viscosidad, para tener una mejor eficiencia en la separación, ya que la viscosidad influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria,
- ▲ ser compatible con el tipo de detector utilizado,
- ▲ tener una polaridad adecuada para permitir una retención adecuada de la muestra en la columna,
- ▲ disolver a la muestra, para que pueda ser transportada a través de la columna,
- ▲ no tóxico
- ▲ no peligroso,
- ▲ ser “barato” y accesible.

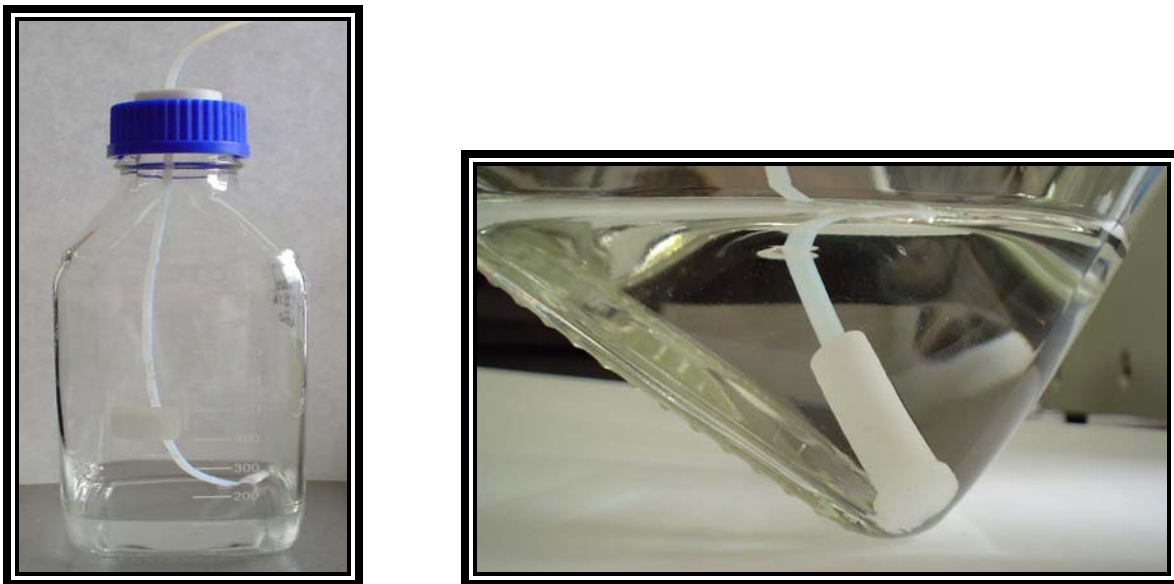
Como fase móvil se utilizan normalmente los siguientes disolventes tolueno, cloroformo, cloruro de metileno y hexano para cuando se trabaja cromatografía en fase normal, y agua, acetonitrilo y metanol para cromatografía en fase inversa.

La fase móvil utilizada debe tener un tratamiento previo de filtración y desgasificación. La filtración de la fase móvil permite eliminar partículas que pueden obstruir los filtros y tuberías del instrumento, acelerar el desgaste de los sellos y rotores del inyector, afectar el normal movimiento de las válvulas de entrada y salida de la bomba, etc.. Los disolventes se filtran por medio de membranas de 0.45 ó 0.22  $\mu\text{m}$  de porosidad en equipos de filtración Millipore y es útil para eliminar tanto las partículas como bacterias, además de que en la succión de la fase móvil se tiene un filtro de acero inoxidable, vidrio o teflón para seguridad de que no entren partículas al sistema, como se puede observar en la *figura 4*.

La fase móvil debe desgasificarse, ya que los gases disueltos en la fase móvil ( $\text{N}_2$  y  $\text{O}_2$ ) pueden producir varios inconvenientes, entre ellos:

- ▲ liberación de burbujas en la cabeza de la bomba,
- ▲ liberación y formación de burbujas en la celda del detector,
- ▲ aumento en la línea base del detector de UV debido al oxígeno disuelto.

Los métodos de desgasificación que se utilizan normalmente son: filtración o ultrasonido con vacío, burbujeo de un gas inerte, y filtración con membrana de teflón.



**Figura 4.** Recipiente de vidrio (izquierda) y filtro de teflón (derecha).

### **Sistema de bombeo**

La bomba tiene como función impulsar a la fase móvil del recipiente que la contiene hacia el sistema cromatográfico. Los materiales con los que se construyen las bombas son muy resistentes al ataque químico así como al desgaste mecánico. Las partes que están en contacto con el solvente son de acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón. El cuerpo de la bomba se fabrica



con acero inoxidable, que está conformado por las tuberías, conectores y cabezales de los pistones. Los pistones se construyen con zafiro y las válvulas de retención por una pequeña esfera de rubí que se apoya en un asiento de zafiro y una malla o retenedor de acero inoxidable que retiene a la esfera en sus movimientos.

Las bombas que se utilizan para los instrumentos de CLAE deben de cumplir con ciertas características las cuales son:

- ▲ presión máxima de operación, usualmente hasta 400 atm,
- ▲ intervalo de volumen obtenible, entre 0.5 y 10 ml/min,
- ▲ reproducibilidad y constancia del flujo, aproximadamente al 1%,
- ▲ flujo continuo.

En base a su diseño y sus características de funcionamiento existen dos tipos de bombas, las mecánicas y las neumáticas, las primeras se dividen en recíprocas y de desplazamiento.

En la actualidad las bombas más utilizadas en CLAE son las recíprocas de doble pistón, las cuales permiten tener un flujo continuo, el funcionamiento de esta bomba consiste en movimientos alternos de los pistones que abren y cierran también de forma alterna las válvulas “check” (por su nombre en inglés) para llenar la cámara de la bomba con la fase móvil e impulsarla hacia la columna; el cromatógrafo con el que se trabajó cuenta con este tipo de bomba (*figura 5*).

Si la fase móvil mantiene el mismo poder de elución durante la corrida o si éste varía a lo largo de ella, se puede trabajar bajo dos formas de elución conocidas como:

- ▲ Isocrática, donde el poder de elución se mantiene constante, él o los disolventes que constituyen la fase móvil se mantienen en la misma proporción durante todo el tiempo de la corrida.
- ▲ Gradiente de elución: el poder de elución varía, él o los disolventes que constituyen la fase móvil van variando durante el tiempo que dure la corrida. Siempre se trabaja desde un poder de elución bajo a uno alto.



**Figura 5.** Sistema de bombeo del cromatógrafo de líquidos marca Knauer y cabezales de los pistones de la bomba (derecha).

### ***Sistema de introducción de muestra***

Esto se realiza mediante una válvula de inyección o válvula de seis pasos, la cuál consiste de un cuerpo fijo, con un rotor de sello que gira y un bucle (o “loop” en inglés) de muestra externo en el que se introducirá a la muestra, cuya capacidad puede ser de 5 a 200 $\mu$ l cuando se utilizan válvulas manuales (*figura 6*) y menores a 5 $\mu$ l cuando se trabaja con válvulas automáticas.

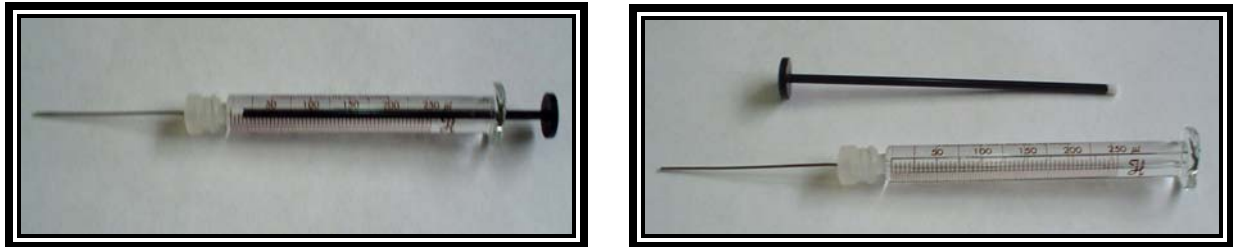
La muestra para poder ser introducida al sistema cromatográfico es necesario que se encuentre disuelta en la fase móvil o en alguno de los disolventes que la componen, la muestra se introduce a la válvula con la ayuda de una jeringa de vidrio cuando se trabaja de manera manual (*figura 7*).

El funcionamiento de la válvula de inyección de manera manual es el siguiente:

- 1) La válvula se debe de encontrar en posición de carga, para poder introducir con la jeringa la muestra y así llenar el “loop”, (en esta posición la fase móvil pasa directamente a la columna), se recomienda inyectar el doble de volumen de la capacidad del “loop”, ya que de esta forma se asegura que se llena completamente y el exceso de muestra pasa a la tubería de desechos.
- 2) Se gira la manija de la válvula a la posición de inyección para permitir el paso de la fase móvil a través del “loop” donde se encuentra la muestra y así ésta es llevada hacia la columna.



**Figura 6.** Válvula de inyección en posición de carga (izquierda) y en posición de inyección (derecha).

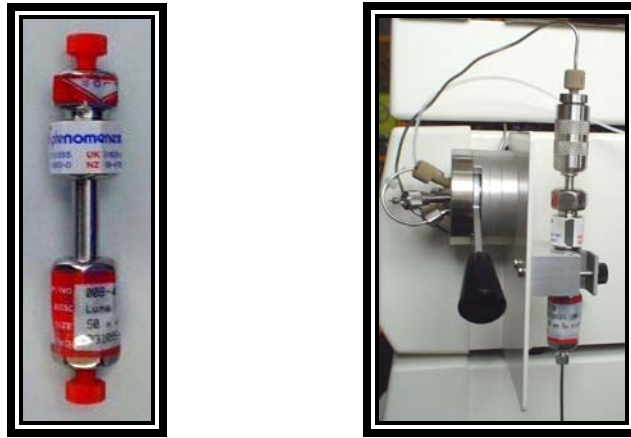


**Figura 7.** Jeringa de vidrio, capacidad 250 µl.

### **Sistema de separación**

El sistema de separación en CLAE consiste de la columna analítica la cual está hecha de algún material inerte y resistente a altas presiones, generalmente es de acero inoxidable, en algunas ocasiones se utilizan algunos aditamentos adicionales como son guarda columnas, para proteger a la columna de partículas que puedan dañarla, y chaquetas de calentamiento para mantener constante la temperatura de trabajo. La longitud de la columna puede variar de 5 a 15 cm con un diámetro interno de 1-5 mm. La columna se encuentra empacada con la fase estacionaria, la cuál puede ser alguna de las mencionadas en la clasificación de la CLAE (*tabla 3*) y cuyo tamaño de partícula se encuentra en intervalos de 3 a 15 µm.

En este trabajo se utilizó una columna con fase químicamente unida de tendencia no polar de C-18 (octadecil), de un tamaño de partícula de 5 µm y de 5 cm de longitud (*figura 8*).



**Figura 8.** Columna analítica de 50 mm Phenomex<sup>®</sup> y columna analítica conectada a la válvula de inyección y al detector.

### **Sistema de detección**

El sistema de detección es la parte del equipo cromatográfico que debe generar algún fenómeno físico y convertir éste en algo manejable para que permita ver y ubicar en tiempo la elución de cada componente de una muestra a la salida de la columna analítica. Los detectores cumplen con ciertas características como son:

Respuesta universal o selectiva. Los detectores universales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene al analito en comparación con la fase móvil pura y los detectores selectivos son sensibles a alguna propiedad del analito.

Linealidad. El detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente proporcionalmente al aumentar la concentración.

Ruido. Variaciones que se producen en la línea base del detector que se originan por pequeñas fallas en el sistema eléctrico, variaciones en el flujo eléctrico o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, etc.. El ruido nunca se atribuye a la muestra.

Sensibilidad. Es la concentración mínima de un analito que puede ser detectada, la cuál debe producir una señal igual al doble del ruido del instrumento.

Estabilidad. Debe soportar cambios de temperatura y variaciones de flujo.

Los detectores más utilizados en CLAE se dividen en 2 tipos:

- **Espectroscópicos:** Espectrofotómetro UV-Visible, espectrofotómetro de fluorescencia, refractómetro, espectrómetro de masas
- **Electroquímicos:** Conductímetro, amperímetro, voltamperímetro y coulombímetro.

El detector que se utilizó para la elaboración de esta tesis fue de UV-Visible.

Su funcionamiento se basa en la absorción de la radiación electromagnética en la región del ultravioleta cercano y el visible (180-1100 nm) por parte de los analitos de la muestra, este detector permite trabajar con compuestos orgánicos que tienen dobles ligaduras conjugadas y/o sistemas aromáticos, algunos iones de compuestos inorgánicos (nitratos, nitritos, carbonatos, tiocarbonatos y azidas) y algunos cationes de los metales de transición.

Por lo mencionado anteriormente este detector es de tipo selectivo, permite detectar analitos en el orden de las ppm, no es destructivo y puede emplearse con gradientes de elución. Existen dos tipos de detectores de UV-Visible los de tipo dispersivo (pueden ser de longitud de onda fija y de longitud de onda variable) y los de arreglo de diodos.

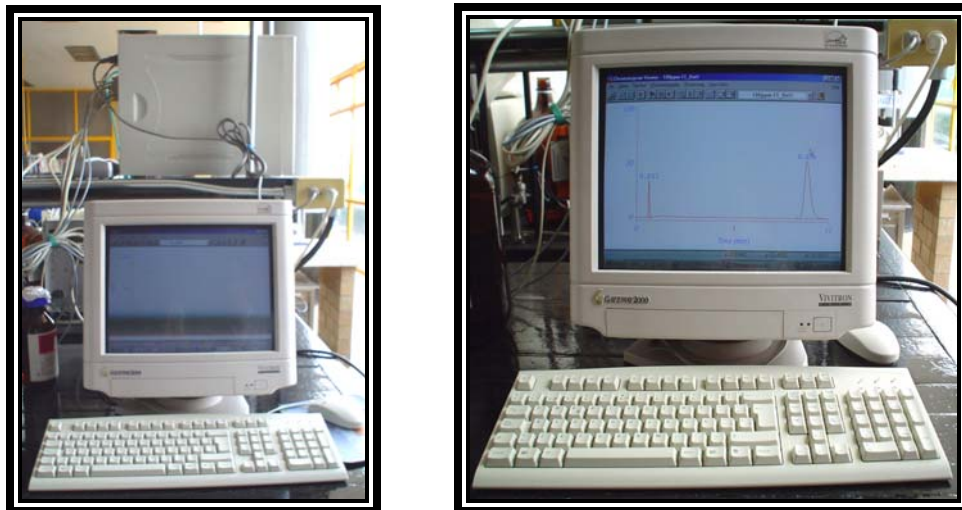
- ▲ Los espectrómetros de longitud de onda fija, utilizan filtros como sistema dispersivo o monocromático y normalmente trabajan a 254, 275 y 284 nm.
- ▲ Los espectrómetros de longitud de onda variable cuentan con un sistema dispersivo o monocromático que permite variar la longitud de onda a la que se quiere trabajar, lo cual nos permite aumentar la sensibilidad ya que se puede trabajar a la longitud de máxima absorción del analito de interés (*figura 9*).
- ▲ Los espectrofotómetros de arreglo de diodos emplean un sistema óptico invertido, 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, por lo que se puede obtener el espectro de UV-Visible completo como se va generando el cromatograma por lo que se puede tener el espectro de cada uno de los picos cromatográficos y también se puede generar varios cromatogramas a diferentes longitudes de onda al mismo tiempo, lo cual no es posible realizar con los sistemas dispersivos; debido a la gran cantidad de información que se obtiene es necesario contar con una computadora como sistema de registro para poder almacenarla y procesarla.



**Figura 9.** Detector de UV-Visible de longitud de onda variable marca Knauer y a la derecha la celda de flujo.

### Sistema de registro

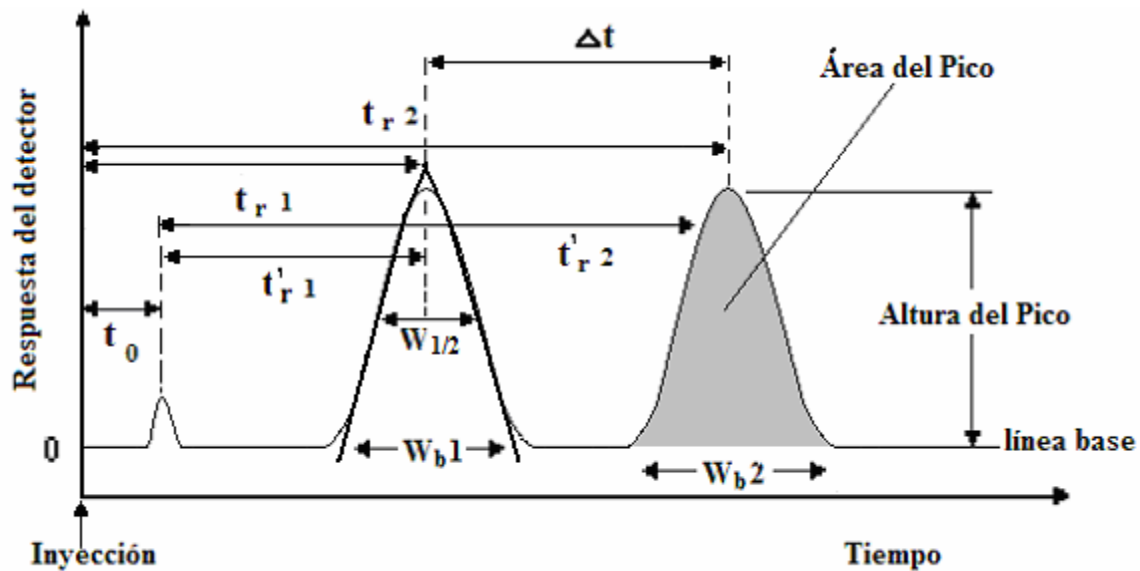
Es un dispositivo que tiene como función representar en forma gráfica la señal que generan los analitos en el detector con respecto al tiempo al que van eluyendo de la columna y llegan al detector, este gráfico se conoce con el nombre de cromatograma y se puede obtener con un registrador (ya en desuso), un integrador electrónico o una computadora (*figura 10*).



**Figura 10.** Computadora.

La IUPAC define a un cromatograma 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 (*figura 11*) se empieza a generar desde el momento en que la muestra es inyectada, las señales que aparecen serán de importancia para realizar análisis cuantitativos y cualitativos de las señales que más interesen, de éste se obtienen varios parámetros de importancia en el trabajo cromatográfico.



**Figura 11.** Cromatograma y parámetros medibles en éste.

- 1) Tiempo muerto ( $t_0$ ): Es el tiempo que tarda en eluir un analito que no es retenido en la fase estacionaria.
- 2) Tiempo de retención ( $t_r$ ): Es el tiempo que los analitos de una muestra presenta desde que se introduce al sistema hasta el momento que se obtiene en el detector en el punto máximo de la señal o pico.
- 3) Tiempo de retención ajustado ( $t'_r$ ): Es el tiempo que la muestra es retenida por la fase estacionaria y se determina por la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto.
- 4) Ancho del pico: Es la medida que se obtiene al ancho de la base del pico ( $W_b$ ) o el ancho a la mitad del pico ( $W_{1/2h}$ ).
- 5) Área del pico: Es el parámetro que permite determinar la concentración de cada analito separado por la fase estacionaria.

Siempre es necesario saber si las condiciones de trabajo son las adecuadas para llevar a cabo la separación de los analitos y con ello poder realizar un adecuado análisis cuantitativo, para ello se calculan los siguientes parámetros cromatográficos:

- a) Eficiencia: es la capacidad que tiene una columna analítica para separar los analitos de una mezcla. Se define como el número de equilibrios (o platos teóricos) que existen de un analito entre la fase móvil y la fase estacionaria. Se calcula con la ecuación:

$$N = 16 \left( \frac{tr}{W_b} \right)^2 = 5.545 \left( \frac{tr}{W_{1/2h}} \right)^2$$

- b) Selectividad: proporciona una idea de la afinidad de los compuestos de una mezcla con la fase estacionaria. Un valor mayor a 1 nos indica una columna más selectiva y mejor separación entre solutos; para calcularla utilizamos la ecuación:

$$\alpha = \frac{tr_2'}{tr_1'}$$

$tr_1'$  = es el tiempo de retención corregido del compuesto que se tarda menos en eluir.

$tr_2'$  = es el tiempo de retención corregido del compuesto que se tarda más en eluir.

- c) Factor de capacidad: se define como la cantidad del analito en la fase estacionaria entre la cantidad del analito en la fase móvil, y está relacionada de manera directa a la constante de equilibrio. Para tener buenas separaciones se necesita un  $k' > 2$ . La ecuación para su cálculo es:

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

- d) Resolución: nos indica cuantitativamente que tan separado está el área de un pico respecto a otro. Cuando se tiene  $R_s \geq 1.5$  se dice que se tiene una separación del 99.73%, y se calcula con la siguiente ecuación base:

$$R_s = 2 \left( \frac{\Delta tr}{W_{b_1} + W_{b_2}} \right)$$

Actualmente los integradores y programas de cómputo trabajan con los anchos a la mitad de la altura, por lo que se utiliza la siguiente ecuación:

$$R_s = 1.2 \left( \frac{\Delta tr}{W_{1/2h_1} + W_{1/2h_2}} \right)$$



## VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA <sup>22, 23, 24, 25, 26, 27, 28</sup>

La validación se define como el grado de validez de un proceso de medición. La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad de un método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, es decir cumple con un propósito establecido.

Las pruebas que se evalúan en una validación son: condiciones óptimas de trabajo, linealidad, precisión, reproducibilidad, repetibilidad, exactitud, cantidad mínima detectable, tolerancia del sistema, estabilidad de la muestra, etc..

A continuación solo se explicarán las pruebas que se determinaron para realizar la validación del sistema cromatográfico empleado en esta tesis.

### A) Condiciones óptimas de trabajo

Antes de iniciar la realización de pruebas estadísticas siempre es necesario encontrar las mejores condiciones de trabajo en la instrumentación para realizar el análisis del analito de interés, en el caso de esta tesis se buscaron las condiciones ideales para la técnica de CLAE.

### B) Linealidad

La linealidad es la medida de la relación que existe entre una variable dependiente y una variable independiente, al ser estas variables directamente proporcionales se espera que tienda a una línea recta. Se puede obtener la linealidad del sistema (cuando se usan estándares) así como la linealidad del método (cuando se adicionan estándares a los excipientes o placebos). Para la linealidad del sistema, la variable dependiente es la señal o respuesta y la variable independiente es la concentración del analito, en cambio en la linealidad del método la variable dependiente es la cantidad recuperada y la variable independiente es la cantidad adicionada de analito.

El criterio internacional normal para aceptar la linealidad del sistema es que los datos experimentales al momento de graficarse deben tener una tendencia lineal y además, tener un valor de coeficiente de correlación igual o mayor a 0.98.

Si se cumple con estos puntos se realizan pruebas de hipótesis sobre la pendiente y la ordenada al origen, utilizando la siguiente ecuación:

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

La prueba de hipótesis que se plantea 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 que se utiliza es la “t de Student” y para obtener la “t” a partir de los datos experimentales se utiliza la siguiente ecuación

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

dónde:

b = ordenada al origen

$\beta$  = ordenada la 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 con n-2 grados de libertad:

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

dónde:

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

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

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

el criterio que se utiliza para rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) es el siguiente:

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

lo anterior debido a que se trata de un ensayo bilateral.

El nivel de significancia con el que se trabaja es del 5% ( $\alpha = 0.05$ ), ya que es una valor que se toma a nivel internacional cuando se desarrolla la mayoría de las metodologías analíticas.

Para calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen y para la pendiente con el mismo nivel de significancia se utilizan las siguientes ecuaciones:

Ordenada al origen

$$IC = b \pm t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{Sxx + (n\bar{x})^2}{nSxx}}$$

Pendiente

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

### C) Precisión

La precisión se define como el grado de concordancia de varias mediciones de una misma propiedad. Se puede determinar la precisión tanto de sistema como del método.

#### Precisión del sistema

La precisión del sistema se define como el grado de concordancia de varias mediciones de una misma concentración. Por tratarse de un método cromatográfico los resultados que se obtengan en este ensayo no deben diferir en más del 2% de la desviación estándar relativa para concentraciones altas y no más del 5% para concentraciones del orden de trazas.

A los datos obtenidos en este ensayo se les realiza una prueba de hipótesis sobre la varianza:

$H_0: s^2 = \sigma_0^2$ , donde  $\sigma_0^2$  = es la varianza contra la que se va a comparar tomada como mínimo del 5% del C.V.)

$H_1: s^2 > \sigma_0^2$

Como se trata de muestras aleatorias que provienen de una población de varianza  $\sigma_0^2$ , se utiliza la prueba de  $\chi^2$  con n-1 grados de libertad:

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

dónde:

n = número de determinaciones

s = desviación estándar muestral (experimental)

$\sigma_o$  = desviación estándar máxima aceptada es decir, contra lo que vamos a comparar (mínimo 5% del C.V.)

Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , sí:

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

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

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

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

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

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

### **Precisión del método**

La precisión del método se maneja normalmente con los términos de repetibilidad y reproducibilidad.

#### ➤ **Repetibilidad**

La repetibilidad es el grado de concordancia entre determinaciones independientes de soluciones con una concentración conocida, proveniente de una misma solución madre, realizadas por el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo.

La hipótesis nula para el caso de repetibilidad es:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 \text{ se calcula con los datos obtenidos.}$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2$$

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza  $\sigma_0^2$  se utiliza la prueba de  $\chi^2$  con n-1 grados de libertad:

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

dónde:

n = número de determinaciones

s = desviación estándar muestral

$\sigma_0$  = desviación estándar máxima aceptada.

Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , sí:

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

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

La fórmula para calcular el intervalo de confianza al nivel de  $1-\sigma$ , para  $s^2$  es:

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

si tomamos la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para “s” 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 considera de dos colas iguales, a pesar de que la distribución  $\chi^2$  no es simétrica.

➤ Reproducibilidad

La reproducibilidad es el grado de concordancia entre determinaciones independientes de soluciones de concentración conocida, proveniente de una misma solución madre. Este análisis se realiza por diferentes analistas en el mismo instrumento, o mismo analista con instrumentos diferentes, etc..

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

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

$$H_0: s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$$

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

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

dónde:

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

$s_2^2$  = varianza muestral menor con  $n_{m-1}$  grados de libertad.

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

Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , sí:

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

Cuando se conoce el resultado de la prueba de hipótesis de las varianzas, se realiza la prueba de hipótesis sobre las medias aplicando la prueba “t de student”, estableciendo como pruebas de hipótesis si es con varianzas iguales o diferentes:

$H_0: \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 0$ , es decir  $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$

$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$

-Si se obtiene que las varianzas son semejantes, el cálculo de la  $t_{cal}$  que se utiliza es:

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

con  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad

-En el caso de que las varianzas no sean semejantes, el cálculo de la  $t_{cal}$  a utilizar es:

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

con  $\phi$  grados de libertad, éstos se calculan con la ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

en cualquiera de los 2 casos la hipótesis nula se rechaza sí:

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

#### D) Estabilidad de la muestra

Esta prueba permite conocer la variación en la concentración del analito ante diferentes variables como perdida del disolvente, interacción con el aire, luz, etc. y que permite conocer cuanto tiempo puede uno almacenar tanto disoluciones estándar, extractos y disoluciones de muestras reales, etc.

En este trabajo se trata de observar el efecto del disolvente sobre las disoluciones estándar del analito para establecer las condiciones de almacenamiento de las muestras.

En este ensayo se realiza un estudio sobre las varianzas y sobre las medias de los datos obtenidos.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

$H_0: s_1^2 = s_2^2$

$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$

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

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

dónde:

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

$s_2^2$  = varianza muestral menor 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  $H_0$ , sí:

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

Cuando se conoce el resultado de la prueba de hipótesis de las varianzas, se realiza la prueba de hipótesis sobre las medias, estableciendo como pruebas de hipótesis:

$$H_0: \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 0, \text{ es decir } \bar{x}_1 = \bar{x}_2$$

$$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

-Si se obtiene que las varianzas son semejantes (que es lo que se espera), el estadístico de prueba que se utiliza es:

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

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

-En el caso de que las varianzas no sean semejantes, el cálculo de la  $t_{cal}$  a utilizar es:

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

con  $\phi$  grados de libertad, éstos se calculan con la ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

en cualquiera de los 2 casos la hipótesis nula se rechaza sí:

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

# *CAPÍTULO 3*

## *PARTE EXPERIMENTAL*



## PARTE EXPERIMENTAL

Para iniciar la validación de la técnica de CLAE para el análisis de la vitamina E es necesario encontrar las condiciones óptimas de trabajo. Lo primero que se realizó fue determinar la longitud de onda de máxima absorción de la vitamina E y confirmar que nuestro estándar presenta el espectro informado por la literatura<sup>11,14</sup>. Una vez determinado el espectro y la comprobación de la longitud de onda de máxima absorción se iniciaron las pruebas en el Cromatógrafo de Líquidos de marca Knauer para establecer que fase móvil se utilizaría tomando en cuenta la información encontrada en la bibliografía<sup>10,11,12,13,14,15,16,17</sup> y tabla 2 realizando el análisis por el modo de fase inversa que es el que se tiene montado en el instrumento mencionado, asegurando la resolución ( $R_s > 1.5$ ) adecuada para el análisis de vitamina E con respecto a las otras vitaminas liposolubles presentes y que el análisis sea en el menor tiempo.

Para poder realizar lo mencionado anteriormente se requiere de contar con los siguientes reactivos, materiales de medición e instrumentación.

### REACTIVOS

Compuesto	Fórmula	Grado	Compañía	No. de lote
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	Nanogrado	Mallinckrodt	5160 T39404
Acetonitrilo	CH <sub>3</sub> CN	HPLC	J.T. Baker	V36C53
Estándar Vitamina E	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	98%	Chem Service	306-76B
Estándar Vitamina K <sub>3</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	98%	Chem Service	306-77C
Estándar Vitamina K <sub>1</sub>	C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	98%	Chem Service	306-115B
Estándar Vitamina D <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	98%	Chem Service	306-112A
Estándar Vitamina D <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	99%	Chem Service	310-90D
Estándar Vitamina A	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O	95%	SIGMA	063K5004

### MATERIAL DE MEDICIÓN

#### Material Volumétrico\*2

- ▲ Matraz aforado tipo "A" de 100 ml Blaubrand, volumen nominal 100.0 ml, valor medio 99.9885 ml, tolerancia ± 0.1000 ml Certificado ISO 1042. Número de lote 03.04.
- ▲ Matraz aforado tipo "A" de 20 ml MBL, tolerancia ± 0.0400 ml.
- ▲ Matraz aforado tipo "A" de 5 ml Blaubrand, volumen nominal 5.0 ml, valor medio 5.0001 ml, tolerancia ± 0.0400 ml. Certificado ISO 1042. Número de lote 03.06.

▲ Micropipetas de desplazamiento de aire:

- ~ Pipeta 0.5-5 ml. Transferpette®. Certificado ISO 9001·14001.  
Al 10% del volumen de la pipeta: exactitud  $\pm 2.50\%$ , precisión + 1.00%.  
Al 100% del volumen de la pipeta exactitud  $\pm 0.25\%$ , precisión + 0.10%.
- ~ Pipeta 100-1000 $\mu$ L Hamilton. SoftGrifp™. Certificado ISO 9001.  
Al 10% del volumen de la pipeta: exactitud  $\pm 1.60\%$ , precisión + 0.50%.  
Al 100% del volumen de la pipeta exactitud  $\pm 0.30\%$ , precisión + 0.12%.
- ~ Pipeta 10-100 $\mu$ L Hamilton. SoftGrifp™. Certificado ISO 9001  
Al 10% del volumen de la pipeta: exactitud  $\pm 1.80\%$ , precisión + 0.70%.  
Al 100% del volumen de la pipeta exactitud  $\pm 0.60\%$ , precisión + 0.15%.

\* Todo el material volumétrico se compro y se cuenta con su certificado de calidad.

### Material general de laboratorio

- ▲ Vasos de precipitados
- ▲ pipetas Pasteur
- ▲ viales de vidrio color ámbar
- ▲ cinta de teflón

### INSTRUMENTACIÓN

- ▲ 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 0.1 mg.
- ▲ Hay que indicar que el Cromatógrafo de Líquidos que se utilizó en el momento de empezar a realizar este trabajo se acababa de comprar y se planteó su uso para empezar a aplicarlo a trabajos de investigación, y ya que en las reglas de validación está se realiza en instrumentos específicos, se tiene que indicar la marca y modelo utilizado y sus características.
  - ❖ Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia modular marca Knauer que permite trabajar de forma isocrática, el cual consta de las siguientes partes:
    - ◆ Sistema de bombeo modelo Smartline Pump 1000 V7603 10/2003.
    - ◆ Detector UV-Vis modelo Smartline UV Detector 2500 V7604 10/2003 de longitud de onda variable.

- ◆ Válvula de inyección WellChrom 6-Port/ 3-Channel con tubería para inyectar 20  $\mu$ l de muestra.
- ◆ Columna empacada de fase estacionaria químicamente unida Luna, C-18 de 50 mm de longitud x 4.6 mm de d.i. y tamaño de partícula de 5  $\mu$ m, con un tamaño de poro de 100 Å.

Con lo mencionado anteriormente se procedió a realizar el trabajo experimental necesario que permitió obtener los datos que fueron procesados en la parte de resultados, la explicación viene en el orden cronológico en que se fue realizando.

## CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

### Longitud de onda de máxima absorción.

Se procedió a comprobar la longitud de onda que se tenía del estándar de vitamina E para comprobar que esta coincidía con la planteada en la bibliografía y establecer con ello la longitud de onda que se colocaría en el detector de UV-Vis del cromatógrafo de líquidos.

Se corrió el espectro UV-Vis de una disolución de vitamina E bajo las siguientes condiciones de trabajo en el espectrofotómetro UV-Vis:

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

Para esto se preparó una solución madre de 940 ppm, para su preparación se pesaron 0.0094 g del estándar de vitamina E y se aforó a 10 ml con metanol, a partir de esta solución se prepararon dos soluciones estándares más, de 94 y 9.4 ppm de concentración. A estas 3 soluciones se les registro su espectro UV, buscando cuál era el espectro adecuado que nos permitiera confirmar el espectro y encontrar la longitud de onda máxima de la vitamina E.

### Fase móvil.

Las condiciones óptimas de trabajo en el cromatógrafo de líquidos que se buscaron fueron las que permitieran analizar a la vitamina E en presencia de otras vitaminas liposolubles; estas condiciones óptimas debían permitir que el poder de elución de la fase móvil tuviera una buena resolución ( $R_s \geq 1.5$ ) entre la vitamina E y las vitaminas adyacentes a ella, para poder realizar el análisis cualitativo de manera adecuada y además realizar este análisis en el menor tiempo.

Tomando en cuenta la información reportada en la literatura<sup>16</sup>, las condiciones iniciales para realizar las pruebas del poder de elución del sistema fueron en el intervalo que va de:

75% acetonitrilo (ACN) / 25% metanol (MetOH) a 100% ACN.

Para realizar lo anterior se prepararon soluciones de forma semicuantitativa de estándares de las vitaminas: A, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, K<sub>1</sub>, K<sub>3</sub>, utilizando como disolvente metanol; de vitamina E se utilizó la solución de 9.4 ppm que se preparó para registrar su espectro de UV. De cada vitamina se registro su cromatograma de forma individual sólo en la fase móvil 75% ACN / 25% MetOH, y después la mezcla de vitaminas. El resto de las pruebas sólo se realiza con la mezcla, y se realizaron los cálculos cromatográficos respectivos.

## VALIDACIÓN

### Linealidad del sistema.

#### ▲ Linealidad intervalo amplio

Esta prueba se repitió en tres días diferentes, ya que se deseaba monitorear que la respuesta siguiera siendo proporcional a la concentración a través del tiempo, esto indica que el instrumento se encuentra estable a las condiciones de trabajo establecidas.

Las soluciones para esta prueba se prepararon a partir de una solución madre de 214 ppm de Vitamina E para los días 1 y 2 , y las soluciones del día 3 se prepararon a partir de una solución madre de 213 ppm.

*\*Curva patrón de los días 1 y 2.*

Para la solución madre de 214 ppm se pesaron 0.0214 g de estándar de vitamina E y se aforaron a 100 ml con metanol. De esta solución madre se tomaron ocho alícuotas para preparar 8 soluciones estándar para la curva patrón cuyo intervalo fue de 1 a 100 ppm, cada solución se preparó por duplicado y se inyectó por triplicado.

A continuación se presenta una tabla indicando el volumen de la alícuota que se tomó para cada solución y la concentración final que se obtuvo. Cada solución se aforó a un volumen de 5 ml con metanol.

<b>Alícuota (ml)</b>	2.34	1.86	1.40	0.93	0.47	0.24	0.12	0.023
<b>Concentración (ppm)</b>	100.15	79.61	59.92	39.80	20.12	10.27	5.14	0.98

**Tabla 4.** Preparación de soluciones estándar del día 1 y 2 a partir de la solución madre de 214 ppm de Vitamina E.

*\*Curva patrón del día 3.*

Para la solución madre de 213 ppm se pesaron 0.0213 g de estándar de vitamina E y se aforaron a 100 ml con metanol. De esta solución madre se tomaron ocho alícuotas para preparar 7 soluciones estándar para la curva patrón cuyo intervalo fue de 1 a 100 ppm, cada solución se inyectó por triplicado.

A continuación se presenta una tabla indicando el volumen de la alícuota que se tomó para cada solución y la concentración final que se obtuvo. Cada solución se aforó a un volumen de 5 ml con metanol.

<b>Alícuota (ml)</b>	2.36	1.88	1.42	0.94	0.47	0.24	0.024
<b>Concentración (ppm)</b>	100.54	80.08	60.49	40.04	20.02	10.22	1.02

**Tabla 5.** Preparación de soluciones estándar del día 3 a partir de la solución madre de 212 ppm de Vitamina E.

▲ Linealidad intervalo corto

Este experimento sólo se realizó una vez y las soluciones para esta prueba se prepararon a partir de una solución madre (S.M.) de 213 ppm de Vitamina E.

A continuación se presenta una tabla indicando el volumen de la alícuota que se tomó para cada solución y la concentración final que se obtuvo.

Para la solución madre de 213 ppm se pesaron 0.0213 g de estándar de vitamina E y se aforaron a 100 ml con metanol. De esta solución madre se tomaron cinco alícuotas para preparar 5 soluciones estándar para la curva patrón cuyo intervalo fue de 6 a 14 ppm, cada solución se preparó por duplicado y se inyectó por triplicado. Cada solución se aforó a un volumen de 5 ml con metanol.

<b>Alícuota (ml)</b>	0.140	0.190	0.240	0.280	0.330
<b>Concentración (ppm)</b>	5.96	8.09	10.22	11.92	14.05

**Tabla 6.** Preparación de soluciones estándar a partir de la solución madre de 213 ppm de Vitamina E.

**Precisión del sistema.**

Para esta prueba se prepararon 7 soluciones de 10 ppm y 7 soluciones de 50 ppm de vitamina E, inyectando cada una por triplicado, realizando este proceso en 2 días diferentes. Las concentraciones de estas soluciones se eligieron por ser los puntos medios de las curvas patrón que se realizaron para la prueba de linealidad del intervalo amplio y del intervalo corto.

Las soluciones se prepararon a partir de la solución madre de 214 ppm (que se preparó para la prueba de linealidad de intervalo largo), para las soluciones de 50 ppm se tomaron alícuotas de 1.18 ml (1,180  $\mu$ l) y se aforaron a un volumen de 5 ml con metanol, obteniendo soluciones de 50.50 ppm y para las soluciones de 10 ppm se tomaron alícuotas de 0.24 ml (240  $\mu$ l) y se aforaron también a un volumen de 5ml con metanol, obteniendo soluciones de 10.27 ppm.

### **Precisión del método instrumental.**

#### **Repetibilidad**

Para esta prueba se prepararon 7 soluciones del orden de concentración de 10 ppm y 7 soluciones de 50 ppm de vitamina E, inyectando cada una por triplicado.

Las concentraciones finales de las soluciones estándar fueron 50.50 ppm y de 10.27 ppm, ya que se utilizó las misma solución madre de la prueba de precisión del sistema.

#### **Reproducibilidad**

Se determinó la reproducibilidad de dos analistas diferentes, quienes prepararon 7 soluciones estándar de vitamina E de 50 ppm y 7 soluciones de 10 ppm, cada solución se inyectó por triplicado.

#### **Analista 1**

Se prepararon 8 disoluciones estándar a partir de la solución madre de 214 ppm (que se preparó para la prueba de linealidad de intervalo amplio del día 1 y 2), para las soluciones de 50 ppm se tomaron alícuotas de 1.18 ml (1,180  $\mu$ l) y se aforaron a un volumen de 5 ml con metanol, obteniendo soluciones estándar de 50.50 ppm y para la solución de 10 ppm se tomaron 0.24 ml (240  $\mu$ l) y se aforó también a un volumen de 5 ml con metanol, obteniendo soluciones estándar de 10.27 ppm.

#### **Analista 2**

Al analista 2 se le pidió que preparara una solución madre de vitamina E de aproximadamente 200 ppm para que a partir de ella preparara 8 soluciones de 50 ppm y 8 soluciones de 10 ppm, y que inyectara por triplicado cada una de ellas.

Se pesaron 0.0037 g de estándar de vitamina E y se aforó a 20 ml con metanol por lo que la solución madre se preparó de 185 ppm de vitamina E, para las soluciones de 50 ppm se tomaron 1.35 ml (1,350  $\mu$ l) y se aforaron a un volumen de 5 ml con metanol, obteniendo

soluciones de 49.95 ppm, para las soluciones de 10 ppm se tomaron 0.27 ml (270  $\mu$ l) y se aforaron a un volumen de 5 ml con metanol, obteniendo soluciones de 9.99 ppm.

### **Estabilidad de la muestra**

En este ensayo se desea determinar el efecto que tiene el disolvente sobre el estándar de vitamina E así como el almacenamiento de las disoluciones.

Para ello se monitorearon por 21 días 5 soluciones de 50 ppm y 5 de 10 ppm de estándar de vitamina E, estas soluciones se analizaron cada 7 días, tomando como día 1 el día en que se prepararon.

Las soluciones se prepararon a partir de la solución madre de 214 ppm (que se preparó para la prueba de linealidad de intervalo largo del día 1 y 2), para las soluciones de 50 ppm se tomaron alícuotas de 1.18 ml (1,180  $\mu$ l) y se aforaron a un volumen de 5 ml con metanol, obteniendo soluciones de 50.50 ppm y para la solución de 10 ppm se tomaron alícuotas de 0.24 ml (240  $\mu$ l) y se aforaron a un volumen de 5 ml con metanol, obteniendo soluciones de 10.27 ppm. Cada solución se inyectó por triplicado.

Las soluciones se almacenaron bajo refrigeración en viales de color ámbar sellados con teflón.

# *CAPÍTULO 4*

## *RESULTADOS y DISCUSIÓN DE RESULTADOS*

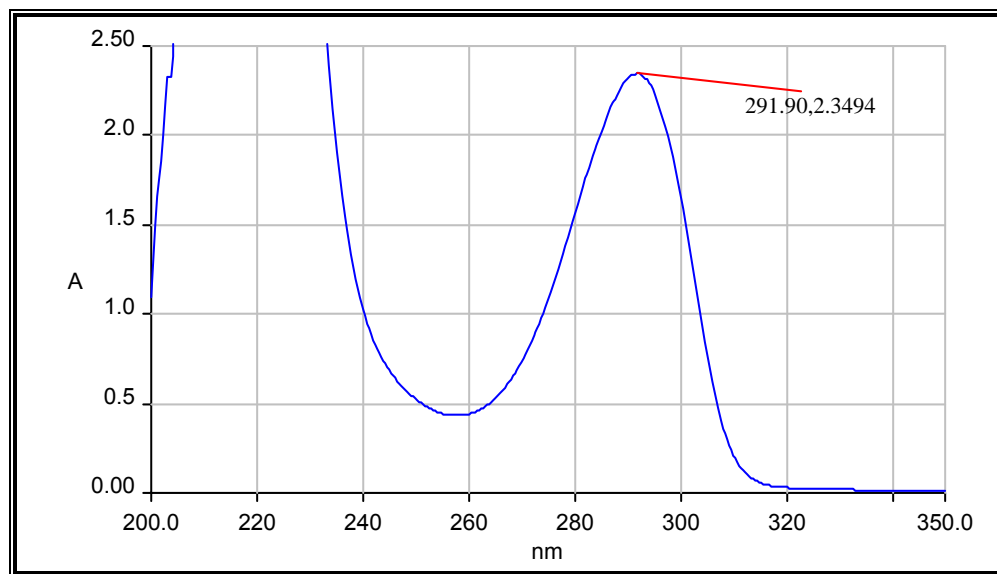


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

#### Longitud de onda máxima

De las soluciones de vitamina E que se registraron en el espectrofotómetro UV-Vis, la solución de 94 ppm permite observar claramente la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{\max}$ ) de esta vitamina, por lo que el espectro de esta concentración es el que se presenta en la *figura 11*.



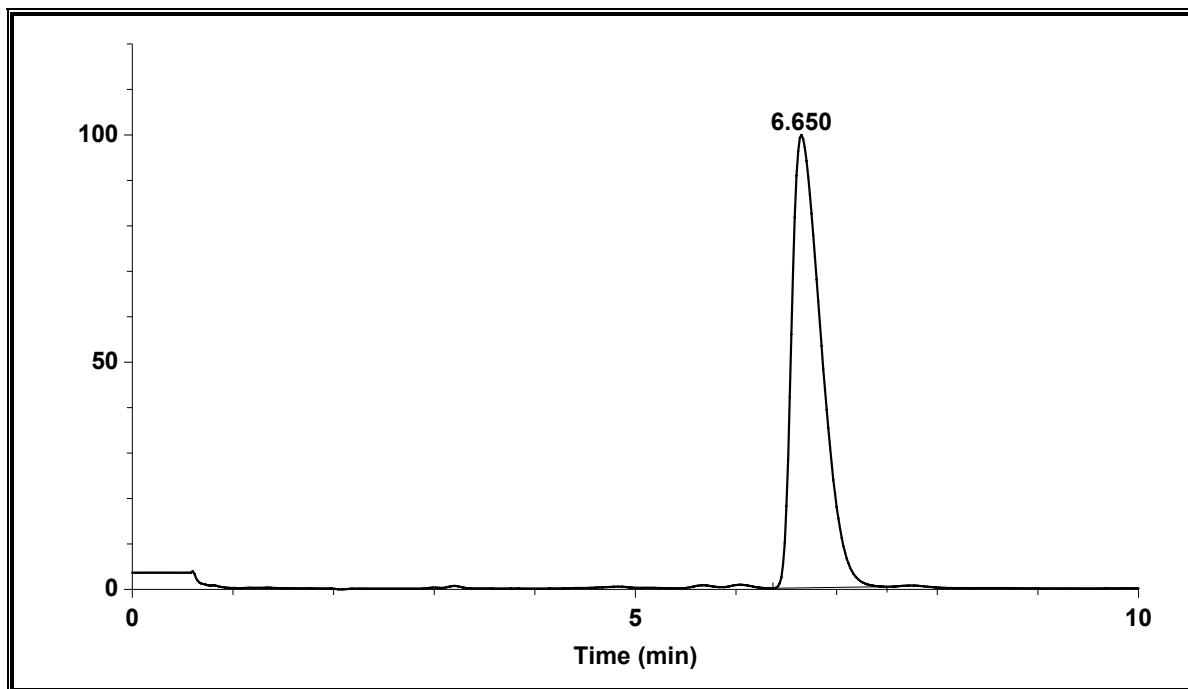
**Figura 11.** Espectro obtenido de la Vitamina E en metanol (94 ppm).

Como se puede observar en el espectro, la longitud de onda de máxima absorción de la vitamina E es de 292 nm, lo cual corresponde con lo reportado en la bibliografía<sup>10,12</sup>, por lo cuál se decidió que ésta sería la  $\lambda_{\max}$  a utilizar en el detector UV-Vis del Cromatógrafo de Líquidos.

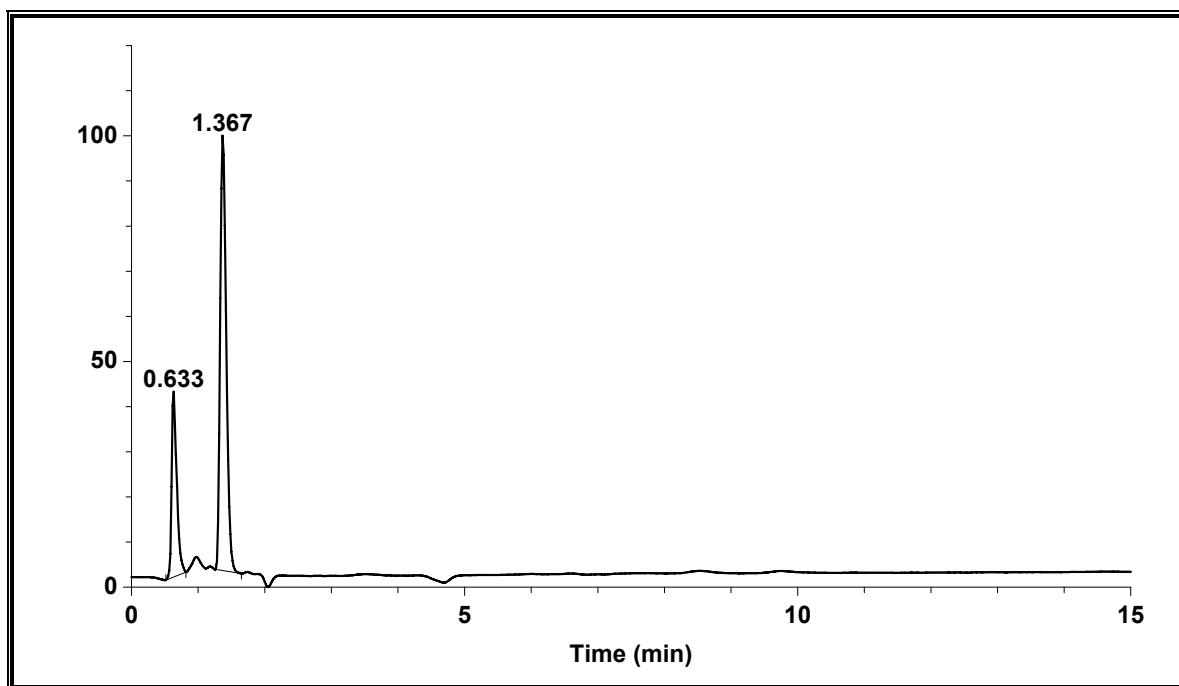
#### Fase móvil

##### 1).- 75 % ACN / 25 % Metanol

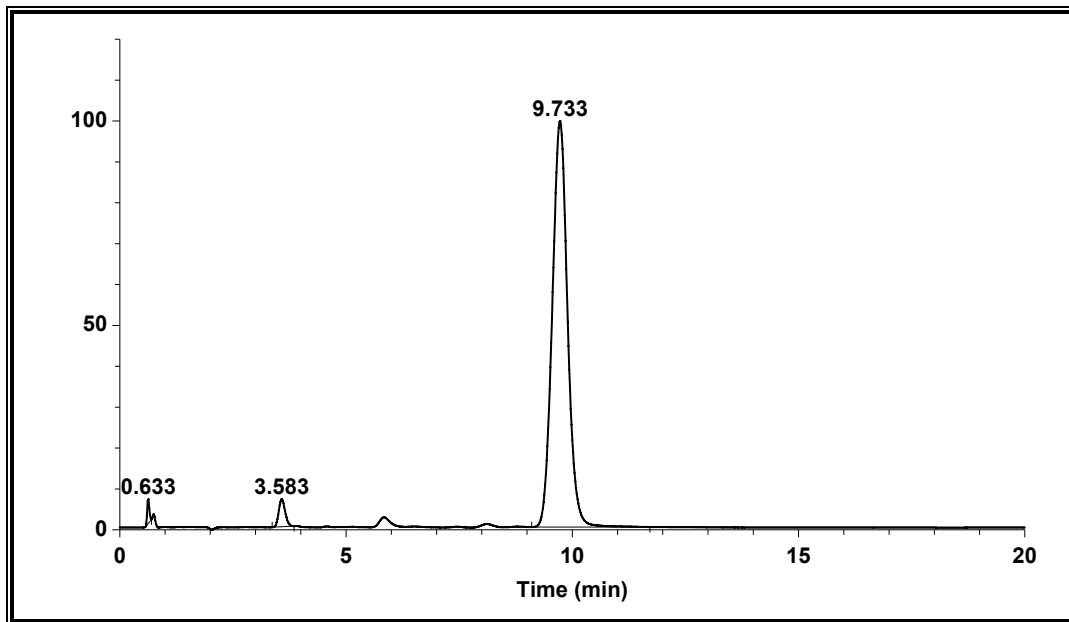
A continuación se presentan los cromatogramas individuales de cada vitamina liposoluble: E, K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, y A, y la mezcla de estas vitaminas obtenidas a estas condiciones de trabajo. Además se presentan los parámetros cromatográficos de la vitamina E con respecto a los picos adyacentes (vitamina D<sub>2y3</sub> y vitamina K<sub>1</sub>). El tiempo muerto es de 6.33 minutos.



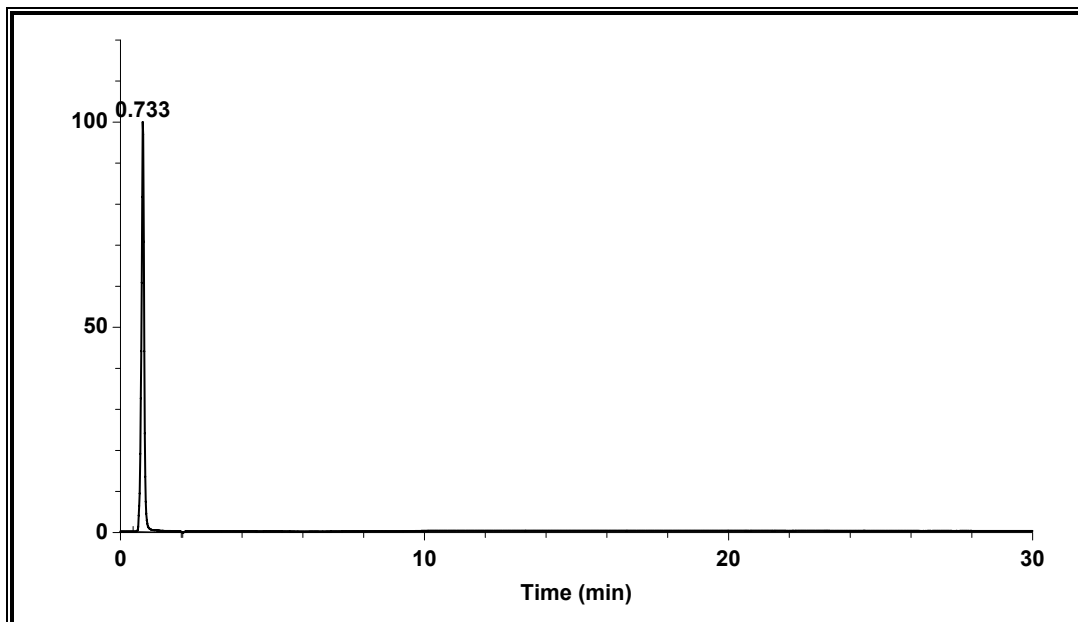
**Figura 12.** Cromatograma de vitamina E.



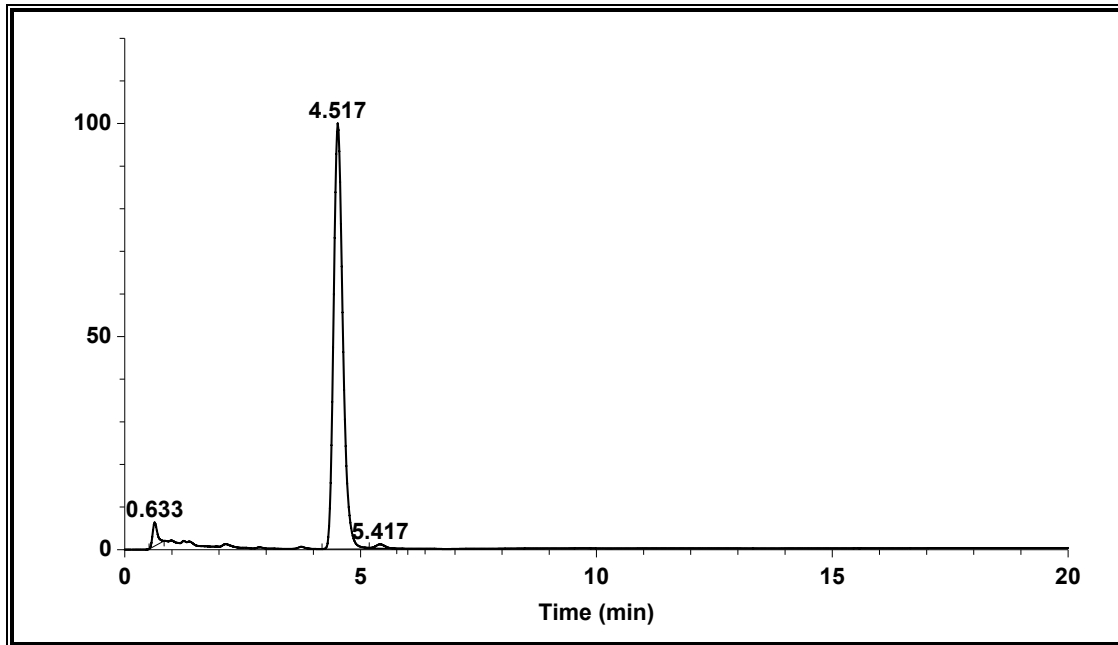
**Figura 13.** Cromatograma de vitamina A.



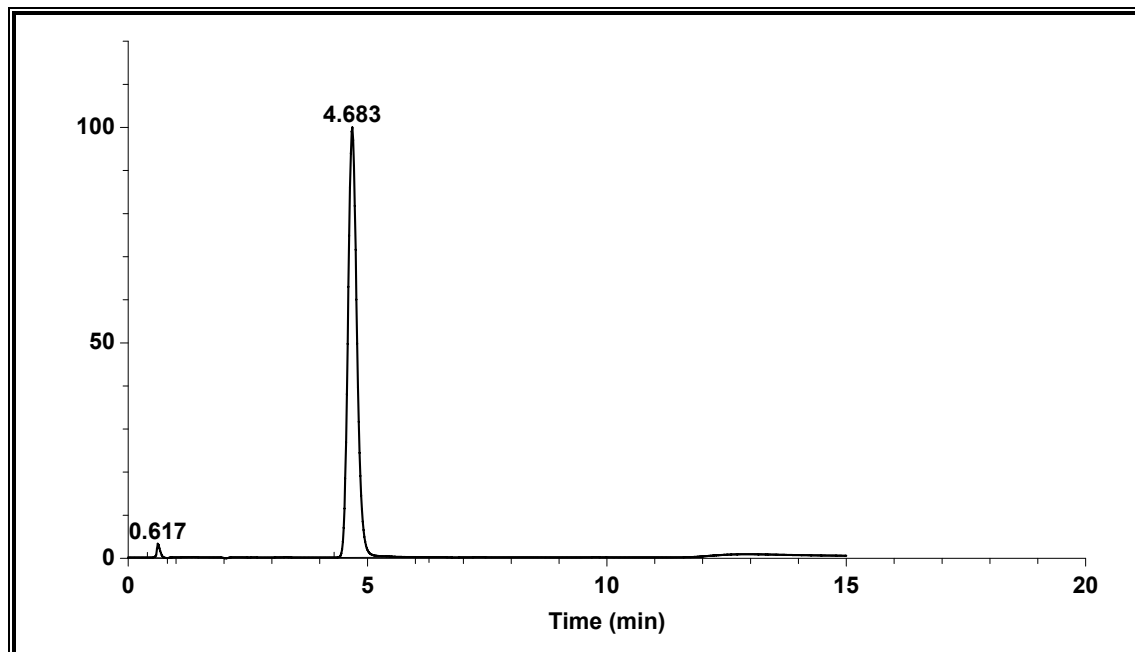
**Figura 14.** Cromatograma de vitamina K<sub>1</sub>.



**Figura 15.** Cromatograma de vitamina K<sub>3</sub>.



**Figura 16.** Cromatograma de vitamina D<sub>2</sub>.



**Figura 17.** Cromatograma de Vitamina D<sub>3</sub>.

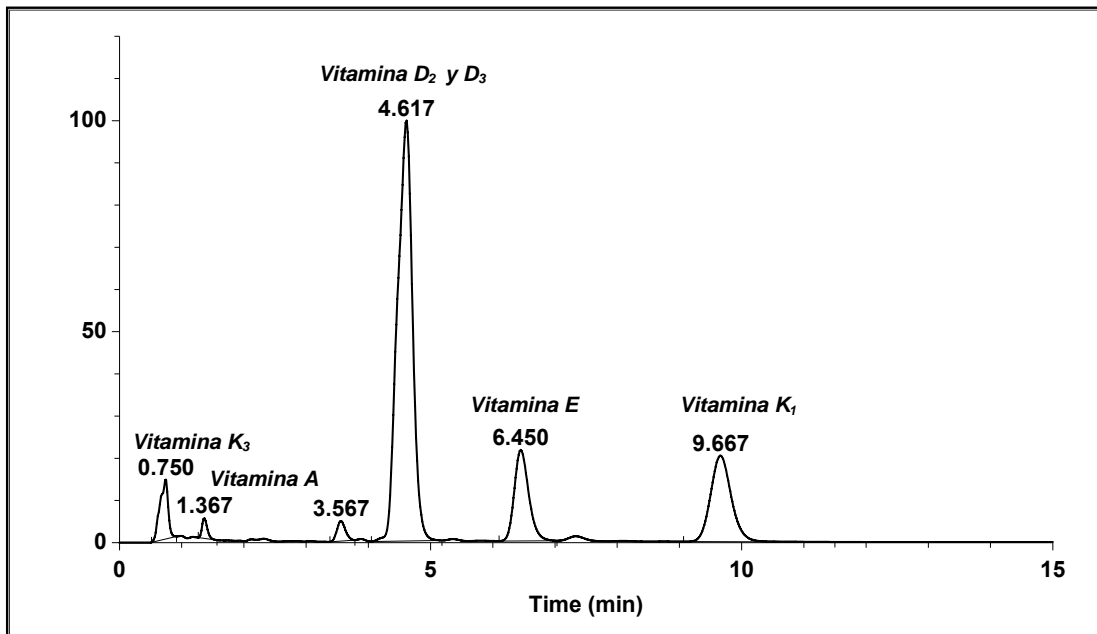


Figura 18. Mezcla de vitaminas liposolubles (75 %.ACN / 25 % Metanol).

$t_0 = 0.633$  min

$t_r$ (min)	$t_r'$ (min)	$W_{1/2h}$ (min)	Rs	$\alpha$	N
4.617	3.984	0.272	---	---	1,189
6.450	5.817	0.246	4.1	1.4	3,100
9.667	9.034	0.352	6.3	1.5	3,652

2).- 80 % ACN / 20 % Metanol

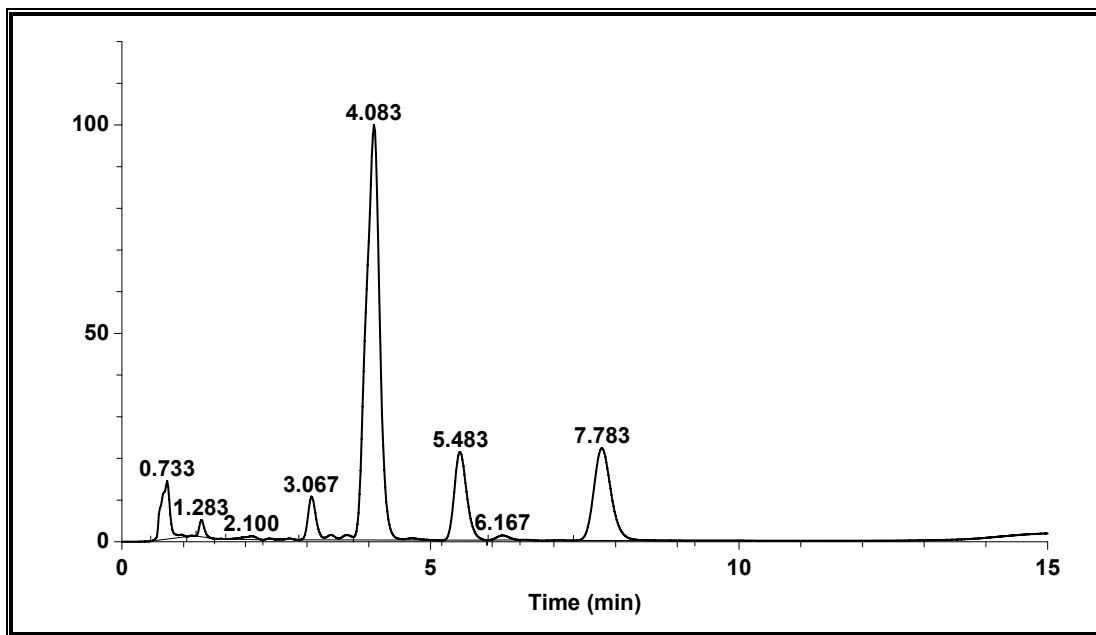
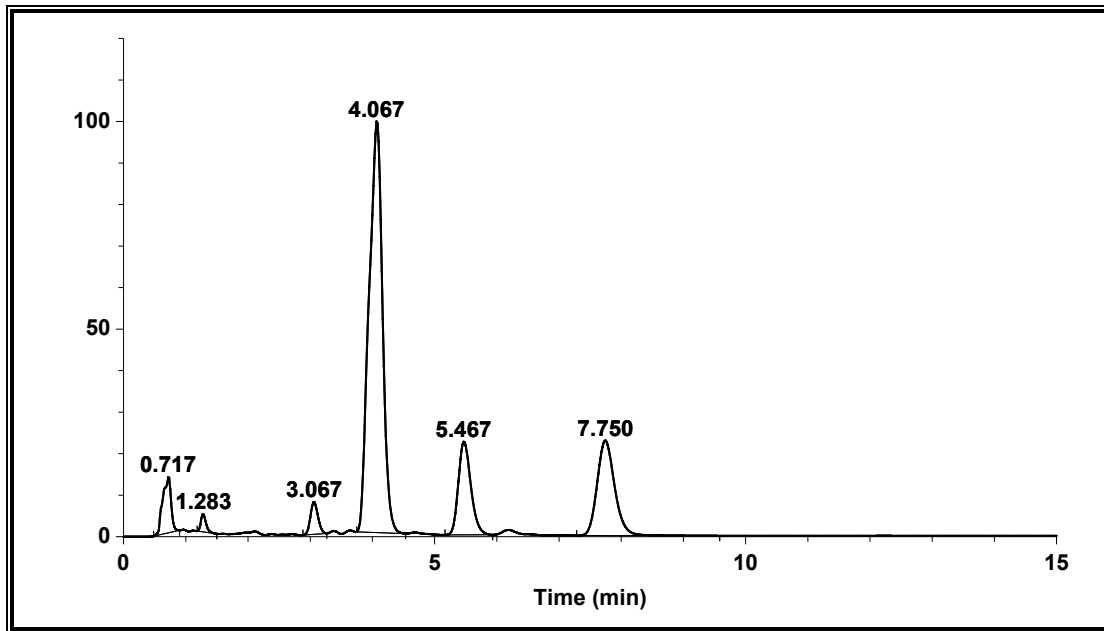


Figura 19. Mezcla de vitaminas liposolubles.

$t_0 = 0.633$  min

$t_r$ (min)	$t_r'$ (min)	$W_{h1/2}$ (min)	$R_s$	$\alpha$	$N$
4.083	3.450	0.243	-----	---	1,118
5.483	4.850	0.215	3.6	1.4	2,822
7.783	7.15	0.296	5.3	1.4	3,235

3).- 85 % ACN / 15 % Metanol



**Figura 20.** Mezcla de vitaminas liposolubles.

$t_0 = 0.633$  min

$t_r$ (min)	$t_r'$ (min)	$W_{h1/2}$ (min)	$R_s$	$\alpha$	$N$
4.067	3.434	0.245	---	---	1,032
5.467	4.834	0.214	3.9	1.4	2,829
7.750	7.117	0.297	5.3	1.5	3,184

4).- 90 % ACN / 10 % Metanol

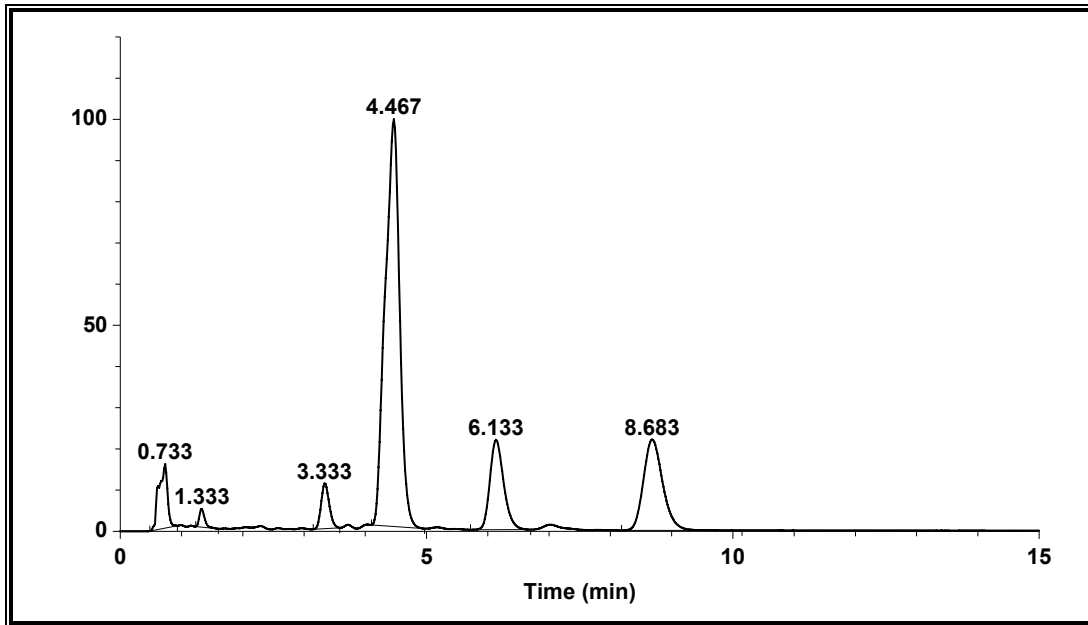


Figura 21. Mezcla de vitaminas liposolubles.

$t_0 = 0.633$  min

$t_r$ (min)	$t_r'$ (min)	$W_{h1/2}$ (min)	$R_s$	$\alpha$	$N$
4.467	3.834	0.268	---	---	1,134
6.133	5.500	0.239	3.8	1.4	2,936
8.683	8.050	0.333	5.3	1.5	3,240

5).- 95 % ACN / 5 % Metanol

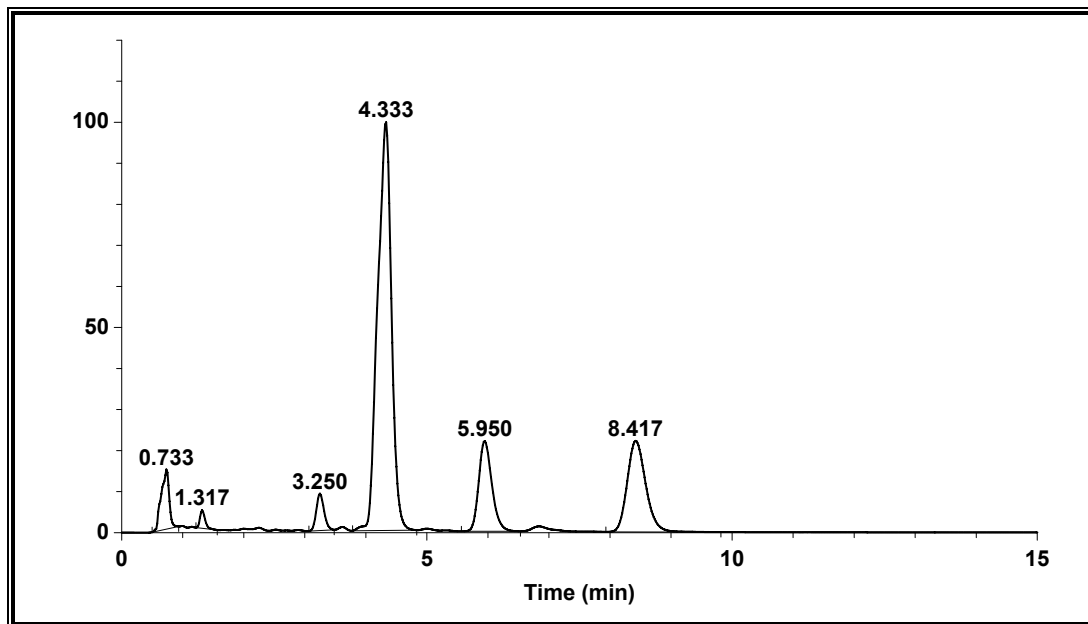
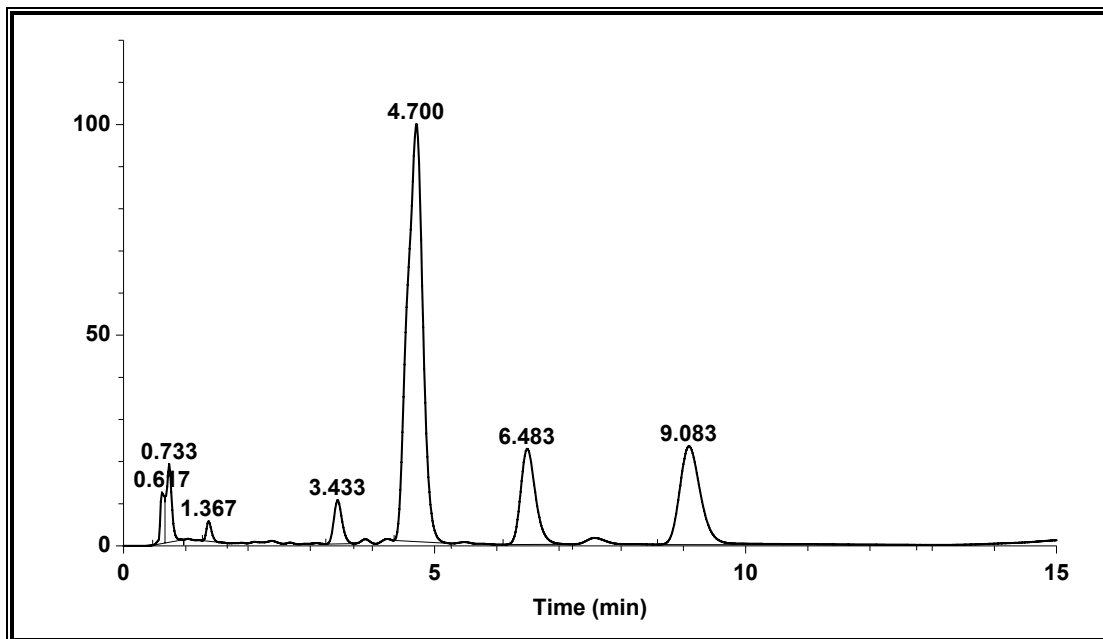


Figura 22. Mezcla de vitaminas liposolubles.

$t_0 = 0.633$  min

$t_r$ (min)	$t_r'$ (min)	$W_{h1/2}$ (min)	$R_s$	$\alpha$	$N$
4.333	3.700	0.254	---	---	1,176
5.950	5.317	0.228	3.9	1.4	3,015
8.417	7.784	0.321	5.3	1.5	3,260

6).- 100 % ACN



**Figura 23.** Mezcla de vitaminas liposolubles.

$t_0 = 0.633$  min

$t_r$ (min)	$t_r'$ (min)	$W_{h1/2}$ (min)	$R_s$	$\alpha$	$N$
4.700	4.067	0.286	---	---	1,121
6.483	5.850	0.319	3.5	1.4	1,864
9.083	8.450	0.354	4.5	1.4	3,159

Después de revisar los tiempos de retención de la Vitamina E y los resultados de los cálculos de resolución con las diferentes fases, se concluyó que la fase móvil a utilizar sería la de 85% ACN / 15% MetOH, ya que en esta fase se obtiene un menor tiempo de retención para la Vitamina E y una resolución mayor a 1.5 entre la vitamina E y los picos adyacentes a ella, además de que la mezcla de vitaminas liposolubles eluyen en un menor tiempo de análisis. Por lo tanto la fase móvil a utilizar para el estudio de la validación será 85% ACN / 15% MetOH.



### VALIDACIÓN

En el Anexo 1 de esta tesis se encuentran las tablas con los datos y cálculos obtenidos en cada una de las pruebas (en formato de páginas excel).

#### Linealidad del sistema.

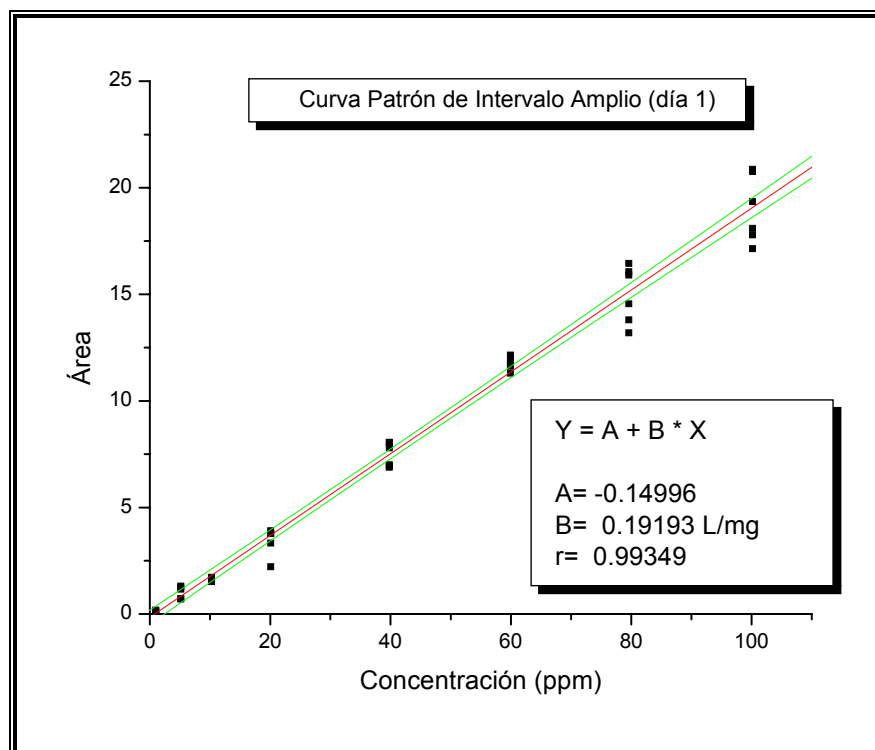
En esta prueba se pretende demostrar que la respuesta (área) es directamente proporcional a la concentración de la vitamina E en un intervalo de concentración amplio y en uno corto.

##### a) *Intervalo Amplio*

Aquí sólo se presentan los cálculos de la prueba estadística del día 3, del día 1 y 2 sólo se presenta la gráfica.

Conc.[ppm]	Área	Área	Área	Área	Área	Área
0.98	0.181433	0.16013	0.13584	0.082638	0.15625	0.09625
5.14	0.725735	0.728373	0.706485	1.2569	1.16756	1.30757
10.27	1.59871	1.66292	1.67436	1.72273	1.66066	1.52215
20.12	3.77194	3.7904	3.78982	3.329636	2.22035	3.90949
39.80	6.89146	6.96319	7.79016	8.05949	8.03798	6.9946
59.92	11.7306	11.805	11.6326	12.1512	11.3011	12.0162
79.61	14.5518	13.8004	13.1915	16.0592	15.905	16.453
100.15	17.7845	17.144	18.0949	20.8588	19.3476	20.7637

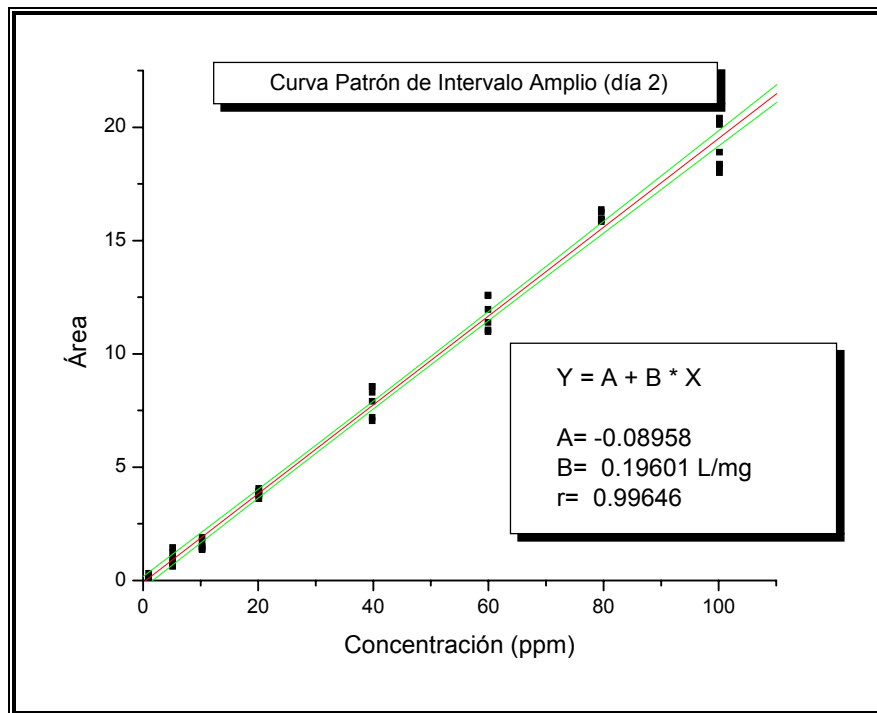
**Tabla 7.** Resultados de la curva patrón de intervalo amplio (día 1).



**Gráfica 1.** Regresión lineal de intervalo amplio, día 1.

Conc.[ppm]	Área	Área	Área	Área	Área	Área
0.98	0.0581145	0.0737925	0.314155	0.119794	0.100233	0.111786
5.14	0.62336967	0.786427	0.66564	1.45206	1.20864	0.970859
10.27	1.35736	1.47904	1.48263	1.40348	1.73030	1.89625
20.12	3.76638	3.84112	3.82308	3.60841	4.05888	3.93555
39.8	8.56595	8.55926	8.30478	7.90623	7.04476	7.19964
59.92	10.9799	11.3861	11.0559	12.5967	12.5672	11.9661
79.61	15.904	15.9273	15.8381	15.9635	16.3676	16.2571
100.15	18.3721	18.003	18.2579	20.1266	18.9021	20.4026

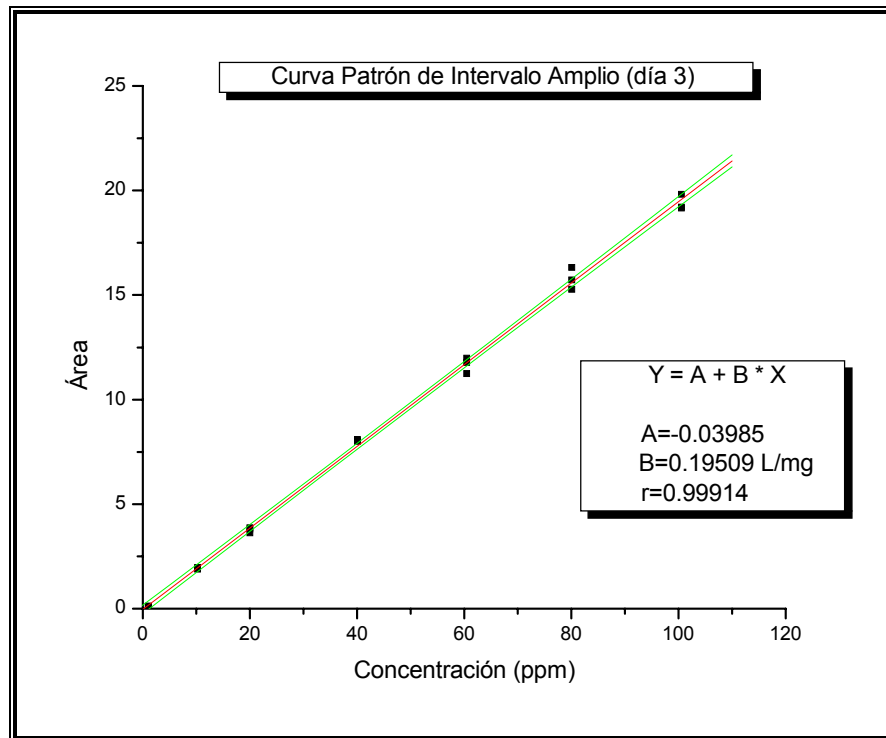
**Tabla 8.** Resultados de la curva patrón de intervalo amplio (día 2).



**Gráfica 2.** Regresión lineal de intervalo amplio, día 2.

Conc.[ppm]	Área	Área	Área
1.02	0.0925	0.1289	0.0988
10.22	1.9712	1.8848	1.8816
20.02	3.8159	3.8714	3.6308
40.04	8.0135	8.0932	8.0286
60.49	11.2313	11.7795	11.9773
80.08	15.7324	15.2748	16.3088
100.54	19.8206	19.1586	19.2144

**Tabla 9.** Resultados de la curva patrón de intervalo amplio (día 3).



**Gráfica 3.** Regresión lineal de intervalo amplio, día 3.

Como se puede observar en las tres gráficas, las tres presentan tendencia lineal y tienden al origen; también se puede observar que la precisión en los puntos obtenidos en las gráficas también mejoró con respecto al tiempo lo cual es lógico ya que el analista adquirió mayor habilidad en la preparación de soluciones y en el uso del instrumento, esto se observa también en que se tiene un mejor coeficiente de correlación en la curva patrón del día tres con respecto a la curva patrón del día uno y del día dos.

El tratamiento estadístico se aplica para las tres gráficas obtenidas en los tres días diferentes, esta información se encuentra en el anexo I. A continuación solamente se presenta la discusión de los cálculos y resultados obtenidos para el día tres.

Primero se realiza la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen:

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

$$H_1: b \neq \beta$$

La prueba estadística utilizada es la "t de student" tomando un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) y 19 grados de libertad ( $n-2$ ).

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

La condición para rechazar la  $H_0$  es que:

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

dónde:

$$t_{\alpha/2} (0.025, 19) = 2.093$$

$$\bar{X} = 44.63$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 525,846.5478$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 20,048.5424$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left( \sum_{i=1}^n X_i \right) \left( \sum_{i=1}^n Y_i \right) = 102,588.2222$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 0.2938$$

$$t_{cal} = -0.3799$$

Con lo anterior se concluye que como  $-0.3799 > -2.093$ , es decir  $-t_{calculada} > -t_{\alpha/2}$  por lo que se acepta la hipótesis nula, así se confirma que la ordenada al origen es igual a cero.

Posteriormente se cálculo el intervalo de confianza (I.C.) al 95% de nivel de significancia para la ordenada al origen y la pendiente, obteniéndose los siguientes resultados:

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

$$IC = b \pm 0.2193$$

$$-0.2591 < -0.0398 < 0.1795$$

Como se puede observar en el intervalo encontrado se encuentra el cero.

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

$$IC = m \pm 0.0039 \text{ L/mg}$$

$$0.1912 < 0.1951 < 0.1990$$

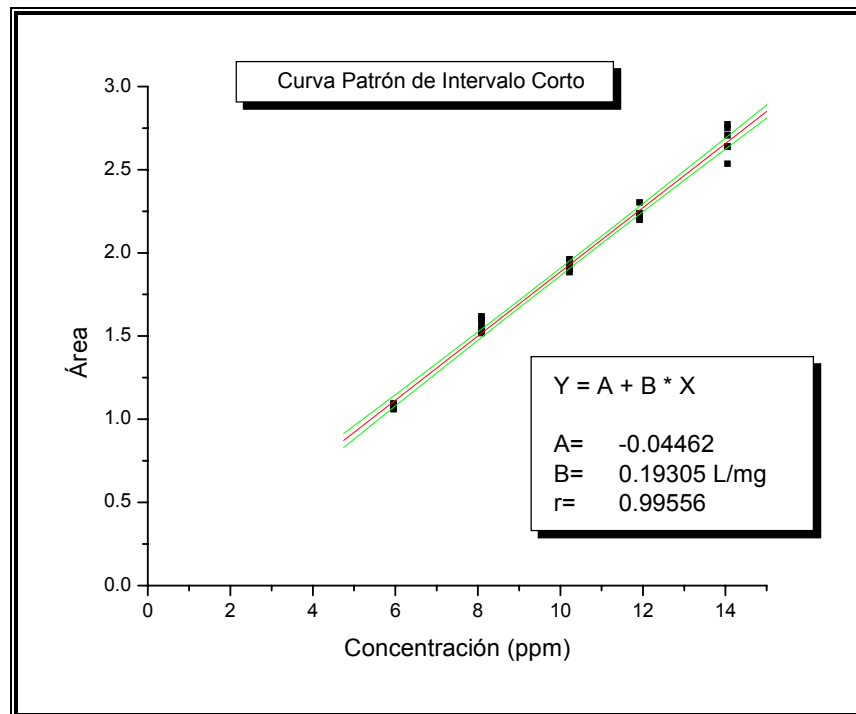
Como se puede ver los valores de las pendientes de las curvas de los días 1 y 2 caen en el intervalo de confianza calculado por lo que se concluye que el sistema se mantiene estable en su respuesta y condiciones de separación.

**b) Intervalo Corto**

Una vez que se determinó que el sistema es lineal en un intervalo amplio se procedió a determinar la linealidad del sistema en un intervalo corto. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Conc. [ppm]	Área	Área	Área	Área	Área	Área
5.96	1.08735	1.08278	1.0811	1.0651	1.0943	1.05958
8.09	1.6059	1.58262	1.58262	1.53456	1.51692	1.54633
10.22	1.96197	1.88423	1.90431	1.91556	1.94368	1.90745
11.92	2.22763	2.21797	2.3029	2.19895	2.23397	2.23795
14.05	2.77218	2.75018	2.7065	2.64052	2.63736	2.53613

**Tabla 10.** Resultados de la curva patrón de intervalo corto.



**Gráfica 4.** Regresión lineal de intervalo corto.

Como puede observarse en la *gráfica 4* la curva patrón tiene tendencia lineal y tiende al origen. Para comprobar lo anterior se realizaron las pruebas de hipótesis y el cálculo de los intervalos de confianza respectivas.

La prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen:

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

$$H_1: b \neq \beta$$

La prueba estadística utilizada fue la "t de student" tomando un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) y 28 grados de libertad ( $n-2$ ).

$$t_{cal.} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{x})^2}}$$

La condición para rechazar la  $H_0$  es que:

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

dónde:

$$t_{\alpha/2} (0.025, 28) = 2.048$$

$$\bar{X} = 10.048$$

$$Sxx = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 7,217.1864$$

$$Syy = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 221.3733$$

$$Sxy = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left( \sum_{i=1}^n X_i \right) \left( \sum_{i=1}^n Y_i \right) = 1,393.2629$$

$$Se = \sqrt{\frac{SxxSyy - (Sxy)^2}{(n-2)nSxx}} = 0.0535$$

$$t_{cal} = -1.238$$

Con lo anterior se concluye que como  $-1.238 > -2.048$ , es decir  $-t_{calculada} > -t_{\alpha/2}$  se acepta la hipótesis nula, y por lo tanto se confirma que la ordenada al origen es igual a cero.

Posteriormente se cálculo el intervalo de confianza (I.C.) al 95% de nivel de significancia para la ordenada al origen y la pendiente, obteniéndose los siguientes resultados:

Para la ordenada

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

$$IC = b \pm 0.07379$$

$$-0.11841 < -0.04462 < 0.02917$$

como se puede observar en el intervalo encontrado se encuentra el cero.

Para la pendiente

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

$$IC = m \pm 0.007$$

$$0.186 < 0.193 < 0.200$$

Como se puede ver el valor obtenido de las pendiente se encuentra también en el intervalo de confianza calculado para el intervalo amplio, lo que indica que el sistema se mantiene lineal, estable en su respuesta y condiciones de separación realizando la curva de calibración a concentraciones altas o bajas.

**Precisión del sistema.**

Con esta prueba se pretende determinar el grado de concordancia de los resultados obtenidos de las diferentes determinaciones por el sistema cromatográfico, se trabajó con las dos distintas concentraciones de vitamina E (10.27 ppm y 50.50 ppm) que cubren la linealidad del intervalo corto y del amplio, respectivamente.

Primer ensayo de soluciones de concentración baja (10.27 ppm)

No. solución	No. inyección	Área
1	1	1.72622
	2	1.74516
	3	1.72930
2	1	1.82953
	2	1.85153
	3	1.83484
3	1	1.66460
	2	1.67458
	3	1.68003
4	1	1.74070
	2	1.65604
	3	1.72780
5	1	1.67048
	2	1.67345
	3	1.67040
6	1	1.73945
	2	1.70638
	3	1.72336
7	1	1.82466
	2	1.78936
	3	1.80257

<b>n</b>	21
<b>MEDIA</b>	1.73621
<b>s</b>	0.06296
<b>VARIANZA</b>	0.00396
<b>C.V.</b>	3.63%

**Tabla 11.** Resultados para la solución de 10.27 ppm, día 1.

La prueba de hipótesis propuesta es:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 0.00754 \text{ (C.V. del 5\% max.)}$$

$$H_1 = s^2 > \sigma_0^2$$



El estadístico de prueba utilizado es la  $\chi^2$  y la ecuación de trabajo es:

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

$$\chi_{calculada}^2 = 10.52$$

por ser una prueba de región unilateral, para un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) con 20 grados de libertad (g.l.=21-1=20) encontramos en tablas que:

$$\chi_{0.05}^2 = 31.41$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

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

Como  $10.52 < 31.41$ , es decir  $\chi_{calculada}^2 < \chi_{\alpha}^2$ , por lo que la hipótesis nula se acepta y el sistema es preciso en concentraciones bajas, con un error del 5% como máximo.

Se procede a calcular el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar.

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

dónde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 9.5908$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 34.1696$$

por lo que se obtiene que el I.C. es igual a:

$$0.04827 < 0.0630 < 0.09091$$

Segundo ensayo de soluciones de concentración baja (10.27 ppm)

No. solución	No. inyección	Área
1	1	1.72414
	2	1.70906
	3	1.71635
2	1	1.81250
	2	1.79738
	3	1.79636
3	1	1.68216
	2	1.71515
	3	1.70318
4	1	1.74817
	2	1.70257
	3	1.72200
5	1	1.72708
	2	1.75695
	3	1.71516
6	1	1.75095
	2	1.73557
	3	1.71916
7	1	1.78659
	2	1.78897
	3	1.79838

<b>n</b>	21
<b>MEDIA</b>	1.74323
<b>s</b>	0.03873
<b>VARIANZA</b>	0.00150
<b>C.V.</b>	2.22%

**Tabla 12.** Resultados para la solución de 10.27 ppm, día 2.

Se realiza la prueba de hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 0.00760 \text{ (C.V. del 5\% max.)}$$

$$H_1 = s^2 > \sigma_0^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

$$\chi^2_{calculada} = 3.95$$

por ser una prueba de región unilateral, para un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) con 20 grados de libertad (g.l.=21-1=20) encontramos en tablas que:

$$\chi_{0.05}^2 = 31.41$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

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

Como  $3.95 < 31.41$ , es decir  $\chi_{calculada}^2 < \chi_{\alpha}^2$ , por lo que la hipótesis nula se acepta y el sistema es preciso en concentraciones bajas, con un error del 5% como máximo.

Se procede a calcular el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar.

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

dónde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 9.5908$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 34.1696$$

por lo que se obtiene que el I.C. es igual a:

$$0.02963 < 0.03873 < 0.05593$$

De este estudio se obtiene que en el caso de concentraciones bajas el sistema cumple el tener una precisión menor del 5%, esto sin importar si el analista lo realiza días diferentes, y disminuyendo ésta conforme aumenta el entrenamiento del analista.

Primer ensayo de soluciones de concentración alta (50.50 ppm)

No. solución	No. inyección	Área
1	1	8.61119
	2	10.1373
	3	10.0689
2	1	8.76307
	2	9.62977
	3	10.0946
3	1	9.04933
	2	10.2859
	3	9.5258
4	1	10.1731
	2	10.1684
	3	10.2086
5	1	10.2006
	2	10.1801
	3	10.1560
6	1	10.0101
	2	10.0887
	3	10.0847
7	1	10.2494
	2	9.95337
	3	10.2127

<b>n</b>	21
<b>MEDIA</b>	9.89770
<b>s</b>	0.49712
<b>VARIANZA</b>	0.24713
<b>C.V.</b>	5.02%

**Tabla 13.** Resultados para la solución de 50.50 ppm, día 1.

Se realiza la prueba de hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 0.24491 \text{ (C.V. del 5\% max.)}$$

$$H_1 = s^2 > \sigma_0^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

$$\chi^2_{calculada} = 20.18$$

por ser una prueba de región unilateral, para un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) con 20 grados de libertad (g.l.=21-1=20) encontramos en tablas que:

$$\chi_{0.05}^2 = 31.41$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

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

Como  $20.18 < 31.41$ , es decir  $\chi_{calculada}^2 < \chi_{\alpha}^2$ , por lo que la hipótesis nula se acepta y el sistema es preciso en concentraciones bajas, con un error del 5% como máximo.

Se procede a calcular el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar.

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

dónde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 9.5908$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 34.1696$$

por lo que se obtiene que el I.C. es igual a:

$$IC = 0.38033 < 0.4971 < 0.71788$$

Segundo ensayo de soluciones de concentración alta (50.50 ppm)

No. solución	No. inyección	Área
1	1	9.88980
	2	9.93422
	3	10.0933
2	1	10.1775
	2	10.0094
	3	10.0169
3	1	10.1377
	2	9.49028
	3	10.2810
4	1	9.93268
	2	10.1102
	3	9.70403
5	1	10.1227
	2	10.1838
	3	10.0612
6	1	10.0416
	2	9.64588
	3	9.94728
7	1	10.2917
	2	10.3226
	3	10.3126

<b>n</b>	21
<b>MEDIA</b>	10.0336
<b>s</b>	0.2196
<b>VARIANZA</b>	0.00482
<b>C.V.</b>	2.19%

**Tabla 14.** Resultados para la solución de 50.50 ppm, día 2

Se realiza la prueba de hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 0.25168 \text{ (C.V. del 5\% max.)}$$

$$H_1 = s^2 > \sigma_0^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

$$\chi^2_{calculada} = 3.83$$

por ser una prueba de región unilateral, para un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) con 20 grados de libertad (g.l.=21-1=20) encontramos en tablas que:

$$\chi_{0.05}^2 = 31.41$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

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

Como  $3.83 < 31.41$ , es decir  $\chi_{calculada}^2 < \chi_{\alpha}^2$ , por lo que la hipótesis nula se acepta y el sistema es preciso en concentraciones bajas, con un error del 5% como máximo.

Se procede a calcular el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar.

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

dónde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 9.5908$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 34.1696$$

por lo que se obtiene que el I.C. es igual a:

$$IC = 0.16802 < 0.2196 < 0.31715$$

De este estudio se obtiene que en el caso de concentraciones altas también el sistema cumple el tener una precisión menor del 5%, esto sin importar si el analista lo realiza días diferentes, y disminuyendo ésta conforme aumenta el entrenamiento del analista.

Del estudio total de la precisión del sistema se obtiene que en el intervalo lineal de trabajo para el análisis cuantitativo, se cumple el que la medición realizada tiene un valor máximo del 5%, aunque con mayor entrenamiento del analista éste puede bajar casi al 2%.

**Precisión del método.**

En esta parte se utilizan las pruebas estadísticas para determinar la estabilidad del instrumento cuando lo utiliza el mismo analista u otro analista, al trabajar bajo las mismas condiciones instrumentales para realizar el análisis de soluciones estándar de un mismo compuesto aproximadamente de la misma concentración.

**Repetibilidad**Soluciones de concentración baja

No. solución	No. inyección	Área
1	1	1.89728
	2	1.87484
	3	1.86040
2	1	1.74482
	2	1.65819
	3	1.68718
3	1	1.75546
	2	1.83659
	3	1.84718
4	1	1.65181
	2	1.69162
	3	1.64576
5	1	1.70952
	2	1.73693
	3	1.68363
6	1	1.68398
	2	1.73846
	3	1.64914
7	1	1.72574
	2	1.71301
	3	1.66768
8	1	1.78222
	2	1.63567
	3	1.77049

<b>n</b>	24
<b>MEDIA</b>	1.7353
<b>s</b>	0.0785
<b>VARIANZA</b>	0.0062
<b>C.V.</b>	4.52%

**Tabla 15.** Resultados para la solución de 10.27 ppm



Se realiza la prueba de hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 0.0075 \text{ (C.V. del 5\% max.)}$$

$$H_1 = s^2 > \sigma_0^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

$$\chi^2_{calculada} = 18.82$$

por ser una prueba de región unilateral, para un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) con 23 grados de libertad ( $g.l.=24-1=23$ ) encontramos en tablas que:

$$\chi^2_{0.05} = 35.17$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

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

Como  $18.82 < 35.17$ , es decir  $\chi^2_{calculada} < \chi^2_{\alpha}$ , por lo que la hipótesis nula se acepta y el sistema es preciso en concentraciones bajas, con un error del 5% como máximo.

Se procede a calcular el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar.

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

dónde:

$$\chi^2_1 = \chi^2_{0.975} = 11.6885$$

$$\chi^2_2 = \chi^2_{0.025} = 38.0756$$

por lo que se obtiene que el I.C. es igual a:

$$IC = 0.0610 < 0.0785 < 0.1101$$

Soluciones de concentración alta

No. solución	No. inyección	Área
1	1	9.68474
	2	10.0015
	3	10.2184
2	1	10.3385
	2	9.27729
	3	10.4550
3	1	10.1507
	2	10.0684
	3	11.4502
4	1	8.6463
	2	10.0996
	3	9.9733
5	1	10.1517
	2	10.3332
	3	10.4082
6	1	10.4734
	2	9.77091
	3	8.70094
7	1	10.0044
	2	10.0729
	3	10.1501
8	1	9.6160
	2	10.3768
	3	10.1514

<b>n</b>	24
<b>MEDIA</b>	10.0239
<b>s</b>	0.5732
<b>VARIANZA</b>	0.3285
<b>C.V.</b>	5.72%

**Tabla 16.** Resultados para la solución de 50.50 ppm

Se realiza la prueba de hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 = 0.2512 \text{ (C.V. del 5\% max.)}$$

$$H_1 = s^2 > \sigma_0^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

$$\chi^2_{calculada} = 30.08$$

por ser una prueba de región unilateral, para un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ) con 23 grados de libertad (g.l.=24-1=23) encontramos en tablas que:

$$\chi_{0.05}^2 = 35.17$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

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

Como  $30.08 < 35.17$ , es decir  $\chi_{calculada}^2 < \chi_{\alpha}^2$ , por lo que la hipótesis nula se acepta y el sistema es preciso en concentraciones bajas, con un error del 5% como máximo.

Se procede a calcular el intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar.

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

dónde:

$$\chi_1^2 = \chi_{0.975}^2 = 11.6885$$

$$\chi_2^2 = \chi_{0.025}^2 = 38.0756$$

por lo que se obtiene que el I.C. es igual a:

$$IC = 0.4455 < 0.5732 < 0.8040$$

Del estudio total de la repetibilidad se obtiene que en el intervalo lineal de trabajo para el análisis cuantitativo, se cumple el que la medición realizada tiene un valor máximo del 5%, ya sea a concentraciones altas o bajas, lo cual debía de ser ya que en la precisión del sistema se obtuvo el mismo resultado.

**Reproducibilidad**

Soluciones de concentración baja

\*Analista 1

No. solución	No. inyección	Área	No. solución	No. inyección	Área
1	1	1.77462	5	1	1.70318
	2	1.89857		2	1.74817
	3	1.86353		3	1.70257
2	1	1.72414	6	1	1.722
	2	1.70906		2	1.72708
	3	1.71635		3	1.75695
3	1	1.8125	7	1	1.71516
	2	1.79738		2	1.75095
	3	1.79636		3	1.73557
4	1	1.68216	8	1	1.71916
	2	1.71515		2	1.78659
	3	1.77462		3	1.78897

<b>n</b>	24
<b>MEDIA</b>	1.75602
<b>s</b>	0.05343
<b>VARIANZA</b>	0.00286
<b>C.V.</b>	3.04%

**Tabla 17.** Resultados de solución de 10.27 ppm del analista 1.

\*Analista 2

No. solución	No. inyección	Área	No. solución	No. inyección	Área
1	1	1.50993	5	1	1.79852
	2	1.53838		2	1.78072
	3	1.66981		3	1.80479
2	1	1.94091	6	1	1.89652
	2	1.82471		2	1.89989
	3	1.93891		3	1.89392
3	1	1.8038	7	1	1.77952
	2	1.67973		2	1.77837
	3	1.78435		3	1.79599
4	1	1.92472	8	1	1.9103
	2	1.9351		2	1.91453
	3	1.93934		3	1.67904

<b>n</b>	24
<b>MEDIA</b>	1.80924
<b>s</b>	0.12239
<b>VARIANZA</b>	0.01498
<b>C.V.</b>	6.76%

**Tabla 18.** Resultados de solución de 9.99 ppm del analista 2.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

$$H_0 = s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1 = s_1^2 \neq s_2^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

dónde:

$s_1^2$  = Varianza muestral mayor con  $n_M - 1$  grados de libertad (24-1= 23).

$s_2^2$  = Varianza muestral menor con  $n_m - 1$  grados de libertad (24-1= 23).

$$F_{cal} = \frac{0.01498}{0.00286}$$

$$F_{cal} = 5.24$$

Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , si:

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

con grados de libertad  $(n_M - 1, n_m - 1)$  y un nivel de significancia al 95% encontramos en tablas:

$$F_{tablas} = 2.31$$

Como se obtuvo que  $5.24 > 2.31$ , es decir  $F_{cal} > F_{\alpha/2}$ , la hipótesis nula se rechaza, lo que nos indica que los analistas no presentaron la misma precisión y por lo tanto la prueba de hipótesis sobre las medias se hizo considerando varianzas diferentes.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

$$H_0: \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 0$$

$$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

realizando para este estudio la prueba "t de student" y realizando el cálculo de ésta como:

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

$$t_{cal} = 1.95$$

dónde los grados de libertad se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

$$\phi = 31$$

que permitió encontrar en tablas, que a un nivel de significancia del 95% se tiene una:

$$t_{0.025, 31} = 2.04$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

$$t_{cal.} < -t_{\alpha/2, \phi} \quad \text{ó} \quad t_{cal.} > t_{\alpha/2, \phi}$$

Como  $1.95 < 2.04$ , es decir  $t_{cal.} < t_{\alpha/2}$  se acepta la hipótesis nula, esto quiere decir que las medias son iguales y por lo tanto pertenecen a la misma población y se tiene una reproducibilidad a bajas concentraciones con un error máximo del 5%.

Soluciones de concentración alta

\*Analista 1

No. solución	No. inyección	Área	No. solución	No. inyección	Área
1	1	9.68474	5	1	10.1517
	2	10.0015		2	10.3332
	3	10.2184		3	10.4082
2	1	10.3385	6	1	10.4734
	2	9.27729		2	9.77091
	3	10.455		3	8.70094
3	1	10.1507	7	1	10.0044
	2	10.0684		2	10.0729
	3	11.4502		3	10.1501
4	1	8.6463	8	1	9.61601
	2	10.0996		2	10.3768
	3	9.9733		3	10.1514

<b>n</b>	24
<b>MEDIA</b>	10.02391
<b>s</b>	0.57316
<b>VARIANZA</b>	0.32852
<b>C.V.</b>	5.72%

**Tabla 19.** Resultados de solución de 50.50 ppm del analista 1.

\*Analista 2

No. solución	No. inyección	Área	No. solución	No. inyección	Área
1	1	10.0808	5	1	10.2831
	2	10.3579		2	12.4941
	3	10.2239		3	12.0032
2	1	7.9261	6	1	10.2526
	2	8.90043		2	10.6795
	3	8.43204		3	10.0909
3	1	14.6413	7	1	10.0607
	2	16.266		2	9.31258
	3	16.3044		3	7.40163
4	1	9.41836	8	1	10.5022
	2	10.5773		2	11.0298
	3	9.84784		3	11.509

<b>n</b>	24
<b>MEDIA</b>	10.77482
<b>s</b>	2.25210
<b>VARIANZA</b>	5.07193
<b>C.V.</b>	20.90%

**Tabla 20.** Resultados de solución de 49.95 ppm del analista 2.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

$$H_0 = s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1 = s_1^2 \neq s_2^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

dónde:

$s_1^2$  = Varianza muestral mayor con  $n_M - 1$  grados de libertad (24-1= 23).

$s_2^2$  = Varianza muestral menor con  $n_m - 1$  grados de libertad (24-1= 23).

$$F_{cal} = \frac{5.07193}{0.3852}$$

$$F_{cal} = 15.44$$

Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , si:

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

con grados de libertad  $(n_M - 1, n_m - 1)$  y un nivel de significancia al 95% encontramos en tablas:

$$F_{tablas} = 2.31$$

Como se obtuvo que  $15.44 > 2.31$ , es decir  $F_{cal} > F_{\alpha/2}$ , la hipótesis nula se rechaza, lo que nos indica que los analistas no presentaron la misma precisión y por lo tanto la prueba de hipótesis sobre las medias se hizo considerando varianzas diferentes.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

$$H_0: \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 0$$

$$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

realizando para este estudio la prueba "t de student" y realizando el cálculo de ésta como:

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

$$t_{cal} = 1.58$$

dónde los grados de libertad se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

$$\Phi = 26$$

que permitió encontrar en tablas, que a un nivel de significancia del 95% se tiene una:

$$t_{0.025, 26} = 2.06$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

$$t_{cal.} < -t_{\alpha/2, \phi} \quad \text{ó} \quad t_{cal.} > t_{\alpha/2, \phi}$$

Como,  $1.58 < 2.06$ , es decir  $t_{cal.} < t_{\alpha/2}$  se acepta la hipótesis nula, esto quiere decir que las medias son iguales y por lo tanto pertenecen a la misma población y se tiene una reproducibilidad a bajas concentraciones con un error máximo del 5%.



**Estabilidad de la muestra.**

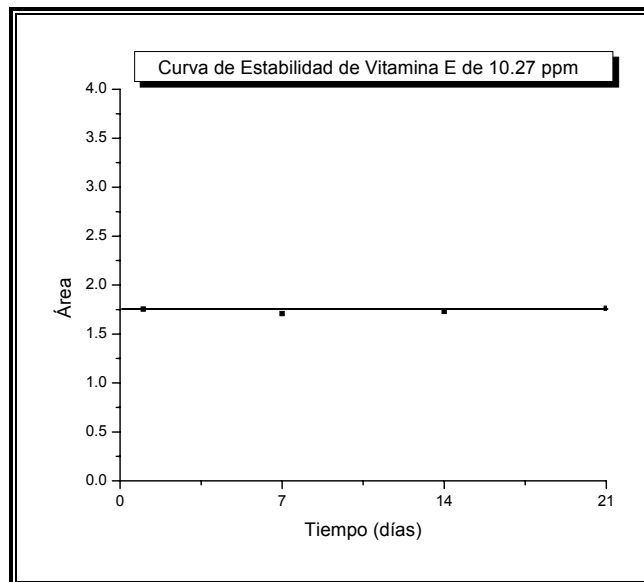
Gráfica de estabilidad

*\*Soluciones de concentración baja*

Para esta prueba se obtuvieron los siguientes resultados:

No. de Solución	Día	1	7	14	21
	No. inyección	Área	Área	Área	Área
1	1	1.72414	1.67662	1.74482	1.72622
	2	1.70906	1.73085	1.65819	1.74516
	3	1.71635	1.66472	1.68718	1.7293
2	1	1.8125	1.75692	1.75546	1.82953
	2	1.79738	1.74754	1.83659	1.85153
	3	1.79636	1.73626	1.84718	1.83484
3	1	1.74817	1.7144	1.70952	1.7407
	2	1.70257	1.72042	1.73693	1.65604
	3	1.722	1.6917	1.68363	1.7278
4	1	1.75095	1.52048	1.72574	1.73945
	2	1.73557	1.72756	1.71301	1.70638
	3	1.71916	1.6663	1.66768	1.72336
5	1	1.78659	1.75235	1.78222	1.82466
	2	1.78897	1.76083	1.63567	1.78936
	3	1.79838	1.75714	1.77049	1.80257

**Tabla 21.** Resultados de la prueba de estabilidad para la solución de 10.27 ppm de vitamina E.



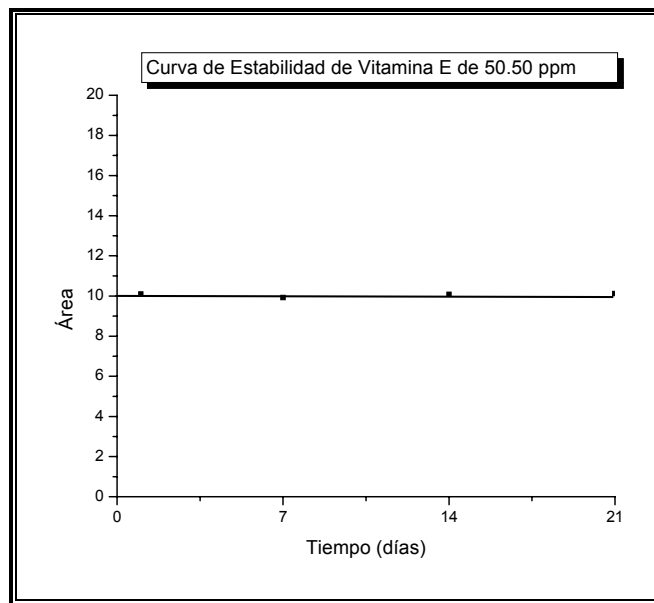
**Gráfica 5.** Resultados del estudio de estabilidad para la solución de 10.27 ppm de vitamina E, monitoreada por espacio de 21 días.

*\*Soluciones de concentración alta*

Para esta prueba se obtuvieron los siguientes resultados.

No. de Solución	Día	1	7	14	21
	No. inyección	Área	Área	Área	Área
1	1	9.68474	8.61119	9.8898	9.93605
	2	10.0015	10.1373	9.93422	10.084
	3	10.2184	10.0689	10.0933	10.2409
2	1	10.1507	8.76307	10.1775	10.2561
	2	10.0684	9.62977	10.0094	10.3345
	3	11.4502	10.0946	10.0169	10.1239
3	1	10.1517	10.1731	9.93268	10.0895
	2	10.3332	10.1684	10.1102	10.3336
	3	10.4082	10.2086	9.70403	10.1003
4	1	10.4734	10.2006	10.1227	10.0072
	2	9.77091	10.1801	10.1838	10.0431
	3	8.70094	10.156	10.0612	10.1754
5	1	9.61601	10.2494	10.2917	9.88081
	2	10.3768	9.95337	10.3226	9.90191
	3	10.1514	10.2127	10.3126	10.2668

**Tabla 22.** Resultados de la prueba de estabilidad para la solución de 50.50 ppm de vitamina E.



**Gráfica 6.** Resultados del estudio de estabilidad para la solución de 50.50 ppm de vitamina E, monitoreada por espacio de 21 días.

Como puede observarse en las gráficas las disoluciones de vitamina E a concentración baja y alta presentan una buena estabilidad durante los 21 días en que fueron almacenadas. Para comprobar lo anterior se realizan las respectivas pruebas estadísticas.

La prueba estadística que se presentará será entre el 1er. día y el 21er. día, aunque en el anexo I se encuentran los cálculos de las pruebas estadísticas realizadas a 7 y 14 días.

*\*Soluciones de concentración baja*

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

$$H_0 = s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1 = s_1^2 \neq s_2^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

dónde:

$s_1^2$  = Varianza muestral mayor con  $n_M - 1$  grados de libertad (15-1= 14).

$s_2^2$  = Varianza muestral menor con  $n_m - 1$  grados de libertad (15-1= 14).

$$F_{cal} = \frac{0.003199}{0.001496}$$

$$F_{cal} = 2.53$$

Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , si:

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

con grados de libertad  $(n_M - 1, n_m - 1)$  y un nivel de significancia al 95% encontramos en tablas:

$$F_{tablas} = 2.98$$

Como se obtuvo que  $2.53 < 2.98$ , es decir  $F_{cal} < F_{\alpha/2}$ , la hipótesis nula se acepta, lo que nos indica que el analista presentó la misma precisión y por lo tanto la prueba de hipótesis sobre las medias se hizo considerando varianzas iguales.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

$$H_0: \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 0$$

$$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

realizando para este estudio la prueba “t de student” y realizando el cálculo de ésta como:

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

$$t_{cal} = 0.08$$

los grados de libertad para la distribución t son:  $n_1 + n_2 - 2 = 15 + 15 - 2 = 28$ , y como se trata de una región bilateral con un nivel de significancia de 95% ( $\alpha = 0.05$ ), se tiene una:

$$t_{0.025, 28} = 2.05$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

$$t_{cal.} < -t_{\alpha/2} \quad \text{ó} \quad t_{cal.} > t_{\alpha/2}$$

Como  $0.08 < 2.05$ , es decir  $t_{cal.} < t_{\alpha/2}$  se acepta la hipótesis nula, esto quiere decir que las medias son iguales y por lo tanto pertenecen a la misma población, por lo que las disoluciones estándar de baja concentración se mantuvieron estables durante 21 días bajo las condiciones de almacenamiento indicadas.

#### \*Soluciones de concentración alta

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

$$H_0 = s_1^2 = s_2^2$$

$$H_1 = s_1^2 \neq s_2^2$$

Realizamos el cálculo de la:

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

dónde:

$s_1^2$  = Varianza muestral mayor con  $n_M - 1$  grados de libertad (15-1= 14).

$s_2^2$  = Varianza muestral menor con  $n_m - 1$  grados de libertad (15-1= 14).

$$F_{cal} = \frac{0.33523}{0.02209}$$

$$F_{cal.} = 15.18$$

Se rechaza la hipótesis nula  $H_0$ , si:

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

con grados de libertad  $(n_M - 1, n_m - 1)$  y un nivel de significancia al 95% encontramos en tablas:

$$F_{tablas} = 2.98$$

Como se obtuvo que  $15.18 > 2.98$ , es decir  $F_{cal} > F_{\alpha/2}$ , la hipótesis nula se rechaza, lo que nos indica que el analista no presentó la misma precisión y por lo tanto la prueba de hipótesis sobre las medias se hizo considerando varianzas diferentes.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

$$H_0: \bar{x}_1 - \bar{x}_2 = 0$$

$$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$$

realizando para este estudio la prueba "t de student" y realizando el cálculo de ésta como:

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

$$t_{cal} = -0.09$$

dónde los grados de libertad se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

$$\phi = 16$$

que permitió encontrar en tablas, que a un nivel de significancia del 95% se tiene una:

$$t_{0.025, 16} = -2.12$$

Para rechazar la  $H_0$  se tiene que cumplir que:

$$t_{cal.} < -t_{\alpha/2, \phi} \quad \text{ó} \quad t_{cal.} > t_{\alpha/2, \phi}$$

Como  $-0.09 > -2.12$ , es decir  $t_{cal.} > -t_{\alpha/2}$  se acepta la hipótesis nula, esto quiere decir que las medias son iguales y por lo tanto pertenecen a la misma población, por lo que las disoluciones estándar de alta concentración se mantuvieron estables durante 21 días bajo las condiciones de almacenamiento indicadas.

---

Después de realizar estas pruebas de estabilidad se puede concluir que las disoluciones estándar de vitamina E almacenadas bajo refrigeración en viales de color ámbar sellados con teflón se mantienen estables por lo menos 21 días.

*CAPÍTULO 5*

*CONCLUSIONES*

---

---

## CONCLUSIONES

Después del tratamiento estadístico de los datos obtenidos y el análisis de la información obtenida de estos cálculos se llegó a las siguientes conclusiones:

- ▲ Basados en la revisión bibliográfica que se realizó en este trabajo (páginas 13, 34), en la que se encontró que la mayoría de las metodologías cromatográficas incluían para el análisis cualitativo y cuantitativo a la técnica de fase inversa con una fase  $C_{18}$  y disolventes polares que podían oscilar entre agua, metanol y acetonitrilo, las condiciones de trabajo que se plantearon de manera inicial (páginas 36, 46) permitieron separar a la vitamina E de las otras vitaminas liposolubles.
- ▲ Al realizar modificaciones del porcentaje de las especies de la fase móvil (acetonitrilo/metanol) para realizar el análisis de la mezcla de manera más rápida, se logró realizar éste de casi 11 minutos a 7.8 minutos, lo que permite realizar una mayor cantidad de muestras.
- ▲ Se encontraron las condiciones óptimas de separación de la vitamina E (como  $\alpha$ -tocoferol), con respecto a otras vitaminas liposolubles en el sistema cromatográfico de líquidos utilizado en este trabajo y que se encuentra en el laboratorio 3-F del Departamento de Química Analítica.
- ▲ Las condiciones óptimas encontradas permiten tener una resolución mayor al 1.5 y por lo tanto una separación entre las vitaminas adyacentes (D's y K) es mayor al 99.7%.
- ▲ Al observar las gráficas se observa que el sistema presenta buena linealidad, tanto en el intervalo de concentraciones altas (1-100ppm) como en el intervalo de concentraciones bajas (6-14ppm), además de que estas curvas presentan tendencia al origen.
- ▲ Las pruebas de hipótesis realizadas a dichas curvas de calibración para la ordenada al origen indicaron también tendencia al origen; el coeficiente de correlación para las curvas patrón para ambas concentraciones es mayor a 0.99, lo que indica que la variable dependiente (señal) es directamente proporcional a la independiente (concentración) y por lo tanto se tiene una buena linealidad.
- ▲ Se determinó el intervalo de confianza a la ordenada y a la pendiente del sistema lineal, lo cual permitirá llevar un correcto control de calidad del sistema en otras etapas posteriores.



- ▲ Del estudio de precisión del sistema se cumple con tener un error máximo del 5%, y que con mayor entrenamiento del analista ésta puede bajar casi al 2%. Por lo cual se cumple con la precisión mínima recomendada a las técnicas instrumentales cromatográficas.
- ▲ Del estudio de repetibilidad se cumple con tener un error máximo del 5% en cuanto a la preparación e inyección de las disoluciones estándar.
- ▲ El sistema presentó una reproducibilidad con un error máximo del 5% en cuanto a la preparación e inyección de las disoluciones estándar.
- ▲ De la prueba de estabilidad se obtuvo que las soluciones estándar de vitamina E almacenadas bajo refrigeración en viales de color ámbar sellados con teflón se mantienen estables por lo menos 21 días.

Como conclusión final de este trabajo se tiene que:

- ▲ El Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia marca Knauer que se encuentra en el laboratorio 3-F permite separar a la Vitamina E como  $\alpha$ -tocoferol de otras vitaminas liposolubles, y realizar su cuantificación con una buena linealidad, precisión, repetibilidad y reproducibilidad. Por lo tanto se puede realizar el análisis de la vitamina E en matrices reales con confiabilidad en los resultados obtenidos en el sistema instrumental mencionado.

# *BIBLIOGRAFÍA*

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Bender A. E. **Nutrición y alimentos dietéticos**. Acribia, Zaragoza España, pág.301-303, 3ªed1997.
2. Tunter R., **Nutrition**, Jones and Bartlett Plublishers, U.S.A, pág. 350-355,2002
3. Robinson D. S. **Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos**. Acribia, Zaragoza España, pág 321-324, 1991.
4. Eastwood M. **Principles of Human Nutritión**, Chapman & Hall, Great Britain, pág. 235-237, 1997.
5. Rodríguez, G. **Función de la vitamina E en la nutrición humana**. Rev Cubana Alimen Nut 11 (1): 46-47, 1997.
6. Fenneman, O. R. **Química de los alimentos**. Acribia Zaragoza España, pág. 584-587, 1993.
7. Badui D., S **Química de los alimentos**. Addison Wesley, México, pág. 342-343, 1993.
8. Mataix, V. J. **Nutrición y alimentación Humana. Vol. 1**, Ergon, Madrid España,pág. 184-190, 2002
9. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. **Tablas de Composición de los Alimentos**. Ingestión diaria recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos para la población mexicana, 2001.
10. AOAC. **Official Methods of Analysis**. Capítulo 45,50. Washington, D.C. 30ªed.,1995
11. J. Atienza et al., " $\beta$ -Carotenos,  $\alpha$ -tocopherol and  $\gamma$ -tocopherol contents in dry legumes. Influence of cooking," **Food Science and Technology International** 4, 437, Diciembre 1998.
12. R. Cava et al., "Effect of  $\alpha$ -tocopherol acetate supplementation and the extensive feeding of pigs on the volatile aldehydes during the maturation of Iberian ham," **Food Science and Technology International** 5,235, Junio 1999.
13. A. Escivá et al., "Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography," **Journal of Cromatography A** 947, 313, 2002.
14. M. M. Delgado et al., Zamarreño et al., "Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection," **Talanta** 43 ,1555, 1996.
15. B. Rodas Mendoza et al., "Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitaminas A and E in infant folumas," **Journal of Cromatography A** 1018, 197, 2003.
16. SUPELCO, Chromatography products of analysis and purification, pag. 543, 2000.

17. Alltech, Manual de cromatografía 550, pág.393,398, 641, 2003/2004.
18. McNair, H. M., **Cromatografía líquidos de alta presión**. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía 10, Washinton, D.C. 1973.
19. Harris Daniel, **Análisis Químico Cuantitativo**. Editorial Reverté S.A. España, pág. 693-720, 2001.
20. Skoog Douglas A y col, **Principios de análisis instrumental**, Mc Graw Hill, pág. 785-862, 1992.
21. Quattrochi, O. A., **Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica**, Artes Gráficas Farro S.A., Argentina, pág. 3-7, 10-36, 40-51, 66-87, 1992.
22. Miller, J. N y col, **Estadística y Quimiometría para Química Analítica**, Prince Hall. España,2002. 4ª Edición.
23. Freund J. E. **Probabilidad y estadística para ingenieros**, Reverte, Madrid (España),1973.
24. Wayne, W. D., **Bioestadística**. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa. México, 1997. 3ª Edición.
25. Kuehl, R. O, **Diseño de experimentos**. Principios estadísticos para el diseño de y análisis de investigaciones. Thomson Learning, México, 2003. 2ª Edición.
26. **Guía de Validación de Métodos Analíticos**; editada por el Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C.; registro ante la DGP-032; edición 2002.
27. Labastida, M.L. **Determinación del clorhidrato de lincomicina en columnas capilares por cromatografía de gases**. Tesis Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 29-37, 1989.
28. Ramírez, H. A. **Validación de la Técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para la cuantificación de Vitamina A**. Tesis Licenciatura, UNAM, 2004.

*ANEXO*

[ppm] xi	Area yi	xi*xi	yi*yi	xi*yi
100.15	17.785	10030.0	316.2884	1781.1177
100.15	17.144	10030.0	293.9167	1716.9716
100.15	18.095	10030.0	327.4254	1812.2042
100.15	20.859	10030.0	435.0895	2089.0088
100.15	19.348	10030.0	374.3296	1937.6621
100.15	20.764	10030.0	431.1312	2079.4846
79.61	14.552	6337.75	211.7549	1158.4688
79.61	13.800	6337.75	190.4510	1098.6498
79.61	13.192	6337.75	174.0157	1050.1753
79.61	16.059	6337.75	257.8979	1278.4729
79.61	15.905	6337.75	252.9690	1266.1971
79.61	16.453	6337.75	270.7012	1309.8233
59.92	11.731	3590.41	137.6070	702.8976
59.92	11.805	3590.41	139.3580	707.3556
59.92	11.633	3590.41	135.3174	697.0254
59.92	12.151	3590.41	147.6517	728.0999
59.92	11.301	3590.41	127.7149	677.1619
59.92	12.016	3590.41	144.3891	720.0107
39.80	6.8915	1584.0	47.4922	274.2801
39.80	6.9632	1584.0	48.4860	277.1350
39.80	7.7902	1584.0	60.6866	310.0484
39.80	8.0595	1584.0	64.9554	320.7677
39.80	8.0380	1584.0	64.6091	319.9116
39.80	6.9946	1584.0	48.9244	278.3851
20.12	3.7719	404.814	14.2275	75.8914
20.12	3.7904	404.814	14.3671	76.2628
20.12	3.7898	404.814	14.3627	76.2512
20.12	3.3296	404.814	11.0865	66.9923
20.12	2.2204	404.814	4.9300	44.6734
20.12	3.9095	404.814	15.2841	78.6589
10.27	1.5987	105.473	2.5559	16.4188
10.27	1.6629	105.473	2.7653	17.0782
10.27	1.6744	105.473	2.8035	17.1957
10.27	1.7227	105.473	2.9678	17.6924
10.27	1.6607	105.473	2.7578	17.0550
10.27	1.5222	105.473	2.3169	15.6325
5.14	0.7257	26.4196	0.5267	3.7303
5.14	0.7284	26.4196	0.5305	3.7438
5.14	0.7065	26.4196	0.4991	3.6313
5.14	1.2569	26.4196	1.5798	6.4605
5.14	1.1676	26.4196	1.3632	6.0013
5.14	1.3076	26.4196	1.7097	6.7209
0.98	0.1814	0.96	0.0329	0.1778
0.98	0.1601	0.96	0.0256	0.1569
0.98	0.1358	0.96	0.0185	0.1331
0.98	0.0826	0.96	0.0068	0.0810
0.98	0.1563	0.96	0.0244	0.1531
0.98	0.0963	0.96	0.0093	0.0943

SUMAXi =	1895.94
SUMAYi =	356.686310
SUMAXi*Yi =	25142.20216
SUMAXi al cuadrado =	132479.3298
SUMAYi al cuadrado =	4799.914168
media Xi =	39.49875
n =	48
g. l. =	46
(n-2)*n =	2208
n* media =	1895.94
(n* media) al cuadrado =	3594588.484
t TABLAS=	2.0129
Sxx	2764419.347
Syy	1.03E+05
Sxy	5.31E+05
Se al cuadrado =	0.60664408
Se	0.778873597
t calculada =	-0.879149
ORDENADA	-1.499E-01
INTERVALO DE CONFIANZA ORDENADA	
MÍNIMO =	-0.493109987
MÁXIMO =	0.193309987
PENDIENTE =	0.1919
INTERVALO DE CONFIANZA PENDIENTE	
MÍNIMO =	1.8537E-01
MÁXIMO =	1.9843E-01
CONCLUSIÓN	
t calculada es mayor que la t de tablas	
La H <sub>0</sub> se acepta y la ordenada es igual a cero.	

**Tabla 1.-**Resultados de la curva patrón de intervalo amplio (día 1) de concentración y análisis estadístico.

[ppm] xi	Area yi	xi*xi	yi*yi	xi*yi
100.15	18.372	10030.0	337.5341	1839.9658
100.15	18.00	10030.0	324.1080	1803.0005
100.15	18.258	10030.0	333.3509	1828.5287
100.15	20.127	10030.0	405.0800	2015.6790
100.15	18.90	10030.0	357.2894	1893.0453
100.15	20.40	10030.0	416.2661	2043.3204
79.61	15.90	6337.8	252.9372	1266.1174
79.61	15.927	6337.8	253.6789	1267.9724
79.61	15.838	6337.8	250.8454	1260.8711
79.61	15.964	6337.8	254.8333	1270.8542
79.61	16.368	6337.8	267.8983	1303.0246
79.61	16.257	6337.8	264.2933	1294.2277
59.92	10.98	3590.4	120.5582	657.9156
59.92	11.386	3590.4	129.6433	682.2551
59.92	11.056	3590.4	122.2329	662.4695
59.92	12.60	3590.4	158.6769	754.7943
59.92	12.567	3590.4	157.9345	753.0266
59.92	11.966	3590.4	143.1875	717.0087
39.80	8.566	1584.0	73.3755	340.9248
39.80	8.5593	1584.0	73.2609	340.6585
39.80	8.3048	1584.0	68.9694	330.5302
39.80	7.9062	1584.0	62.5085	314.6680
39.80	7.0448	1584.0	49.6286	280.3814
39.80	7.200	1584.0	51.8348	286.5457
20.12	3.7664	404.81	14.1856	75.7796
20.12	3.8411	404.81	14.7542	77.2833
20.12	3.8231	404.81	14.6159	76.9204
20.12	3.6084	404.81	13.0206	72.6012
20.12	4.0589	404.81	16.4745	81.6647
20.12	3.9356	404.81	15.4886	79.1833
10.27	1.3574	105.47	1.8424	13.9401
10.27	1.479	105.47	2.1876	15.1897
10.27	1.4826	105.47	2.1982	15.2266
10.27	1.4035	105.47	1.9698	14.4137
10.27	1.730	105.47	2.9939	17.7702
10.27	1.8963	105.47	3.5958	19.4745
5.14	0.6234	26.42	0.3886	3.2041
5.14	0.7864	26.42	0.6185	4.0422
5.14	0.6656	26.42	0.4431	3.4214
5.14	1.4521	26.42	2.1085	7.4636
5.14	1.2086	26.42	1.4608	6.2124
5.14	0.9709	26.42	0.9426	4.9902
0.98	0.0581	0.9604	0.0034	0.0570
0.98	0.0738	0.9604	0.0054	0.0723
0.98	0.3142	0.9604	0.0987	0.3079
0.98	0.120	0.9604	0.0144	0.1174
0.98	0.100	0.9604	0.0100	0.0982
0.98	0.1118	0.9604	0.0125	0.1096

SUMAXi =	1895.94
SUMAYi =	367.321771
SUMAXi*Yi =	25797.32924
SUMAXi al cuadrado =	132479.3298
SUMAYi al cuadrado =	5039.359486
media Xi =	39.49875
n =	48
g. l. =	46
(n-2)*n =	2208
n* media =	1895.94
(n* media) al cuadrado =	3594588.484
t TABLAS=	2.0129
Sxx	2764419.3468
Syy	1.07E+05
Sxy	5.42E+05
Se al cuadrado =	0.342397395
Se	0.585147328
t calculada =	-0.6995
ORDENADA	-8.96E-02
INTERVALO DE CONFIANZA ORDENADA	
MÍNIMO =	-0.347444671
MÁXIMO =	0.168244671
PENDIENTE =	0.196
INTERVALO DE CONFIANZA PENDIENTE	
MÍNIMO =	1.911E-01
MÁXIMO =	2.009E-01
CONCLUSIÓN	
t calculada es mayor que la t de tablas	
La H <sub>0</sub> se acepta y la ordenada es igual a cero.	

**Tabla 2.-** Resultados de la curva patrón de intervalo amplio (día 2) de concentración y análisis estadístico.

[ppm] xi	Área yi	xi*xi	yi*yi	xi*yi
100.54	19.821	10108	392.8562	1992.7631
100.54	19.159	10108	367.0520	1926.2056
100.54	19.214	10108	369.1932	1931.8158
80.08	15.732	6412.8	247.5084	1259.8506
80.08	15.275	6412.8	233.3195	1223.2060
80.08	16.309	6412.8	265.9770	1306.0087
60.49	11.231	3659	126.1421	679.3813
60.49	11.78	3659	138.7566	712.5420
60.49	11.977	3659	143.4557	724.5069
40.04	8.0135	1603.2	64.2162	320.8605
40.04	8.0932	1603.2	65.4999	324.0517
40.04	8.0286	1603.2	64.4584	321.4651
20.02	3.8159	400.8	14.5611	76.3943
20.02	3.8714	400.8	14.9877	77.5054
20.02	3.6308	400.8	13.1827	72.6886
10.22	1.9712	104.45	3.8856	20.1457
10.22	1.8848	104.45	3.5525	19.2627
10.22	1.8816	104.45	3.5404	19.2300
1.02	0.0925	1.0404	0.0086	0.0944
1.02	0.1289	1.0404	0.0166	0.1315
1.02	0.0988	1.0404	0.0098	0.1008

SUMAXi =	937.23
SUMAYi =	182.0089
SUMAXi*Yi =	13008.2106
SUMAXi al cuadrado =	66868.8867
SUMAYi al cuadrado =	2532.1801
media Xi =	44.63
n =	21
g. l. =	19
(n-2)*n =	399
n* media =	937.23
(n* media) al cuadrado =	878400.0729
t TABLAS=	2.0930
Sxx	525846.5478
Syy	20048.5424
Sxy	102588.2222
Se al cuadrado =	0.0863
Se	0.2938
t calculada =	-0.3799
ORDENADA	-3.98E-02
INTERVALO DE CONFIANZA ORDENADA	
MÍNIMO =	-0.2591
MÁXIMO =	0.1795
PENDIENTE =	0.1951
INTERVALO DE CONFIANZA PENDIENTE	
MÍNIMO =	1.91E-01
MÁXIMO =	1.99E-01
CONCLUSIÓN	
t calculada es mayor que la t de tablas	
La H <sub>0</sub> se acepta y la ordenada es igual a cero.	

**Tabla 3.-** Resultados de la curva patrón de intervalo amplio (día 3) de concentración y análisis estadístico.



[ppm] xi	Area yi	xi*xi	yi*yi	xi*yi
5.96	1.0874	35.522	1.1823	6.4806
5.96	1.0828	35.522	1.1724	6.4534
5.96	1.0811	35.522	1.1688	6.4434
5.96	1.0651	35.522	1.1344	6.348
5.96	1.0943	35.522	1.1975	6.522
5.96	1.0596	35.522	1.1227	6.3151
8.09	1.6059	65.448	2.5789	12.992
8.09	1.5826	65.448	2.5047	12.803
8.09	1.6178	65.448	2.6172	13.088
8.09	1.5346	65.448	2.3549	12.415
8.09	1.5169	65.448	2.301	12.272
8.09	1.5463	65.448	2.3911	12.51
10.22	1.962	104.45	3.8493	20.051
10.22	1.8842	104.45	3.5503	19.257
10.22	1.9043	104.45	3.6264	19.462
10.22	1.9156	104.45	3.6694	19.577
10.22	1.9437	104.45	3.7779	19.864
10.22	1.9075	104.45	3.6384	19.494
11.92	2.2276	142.09	4.9623	26.553
11.92	2.218	142.09	4.9194	26.438
11.92	2.3029	142.09	5.3033	27.451
11.92	2.199	142.09	4.8354	26.211
11.92	2.234	142.09	4.9906	26.629
11.92	2.238	142.09	5.0084	26.676
14.05	2.7722	197.4	7.685	38.949
14.05	2.7502	197.4	7.5635	38.64
14.05	2.7065	197.4	7.3251	38.026
14.05	2.6405	197.4	6.9723	37.099
14.05	2.6374	197.4	6.9557	37.055
14.05	2.5361	197.4	6.432	35.633

SUMAXi =	301.4400
SUMAYi =	56.85377
SUMAXi*Yi =	617.70878
SUMAXi al cuadrado =	3269.4420
SUMAYi al cuadrado =	116.7908
media Xi =	10.0480
n =	30
g. l. =	28
(n-2)*n =	840
n* media =	301.44
(n* media) al cuadrado =	90866.0736
t TABLAS=	2.0484
Sxx	7217.1864
Syy	2.71E+02
Sxy	1.39E+03
Se al cuadrado =	0.00286523
Se	0.053527848
t calculada =	-1.2385
ORDENADA	-4.462E-02
INTERVALO DE CONFIANZA ORDENADA	
MÍNIMO =	-0.1184
MÁXIMO =	0.0292
PENDIENTE =	0.1931
INTERVALO DE CONFIANZA PENDIENTE	
MÍNIMO =	1.86E-01
MÁXIMO =	2.00E-01
CONCLUSIÓN	
t calculada es mayor que la t de tablas	
La H <sub>0</sub> se acepta y la ordenada es igual a cero.	

**Tabla 4.-** Resultados de la curva patrón de intervalo corto de concentración y análisis estadístico.

No. de Solución	Día	1	7	14	21
	No. inyección	Área	Área	Área	Área
1	1	1.72414	1.67662	1.74482	1.72622
	2	1.70906	1.73085	1.65819	1.74516
	3	1.71635	1.66472	1.68718	1.7293
2	1	1.8125	1.75692	1.75546	1.82953
	2	1.79738	1.74754	1.83659	1.85153
	3	1.79636	1.73626	1.84718	1.83484
3	1	1.74817	1.7144	1.70952	1.7407
	2	1.70257	1.72042	1.73693	1.65604
	3	1.722	1.6917	1.68363	1.7278
4	1	1.75095	1.52048	1.72574	1.73945
	2	1.73557	1.72756	1.71301	1.70638
	3	1.71916	1.6663	1.66768	1.72336
5	1	1.78659	1.75235	1.78222	1.82466
	2	1.78897	1.76083	1.63567	1.78936
	3	1.79838	1.75714	1.77049	1.80257
n =	15	15	15	15	
media =	1.753877	1.708273	1.730287	1.761793	
Desv. Estándar=	0.038681	0.061559	0.061541	0.056556	
Varianza=	0.001496	0.003789	0.003787	0.003199	
C.V. %=	2.205473	3.603573	3.556693	3.210162	

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:	
n mayor -1 =	14
n menor -1 =	14
varianza1=	0.003789
varianza2=	0.001496
F de tablas=	2.98
F calculada =	2.53
CONCLUSIÓN	
F calculada es menor que la F de tablas.	
H <sub>0</sub> se acepta, el analista presenta la misma precisión.	

La prueba de hipótesis sobre las medias quedaría:	
nM =	15
nm =	15
varianza1=	0.003789
varianza2=	0.001496
nm+nM-2	28
t de tablas =	2.05
t calculada =	-0.44
CONCLUSIÓN	
t calculada es mayor que la t de tablas	
H <sub>0</sub> se acepta, las medias son iguales y por tanto las soluciones son estables por 7 días.	

**Tabla 13.-** Resultados de la prueba de estabilidad de las soluciones de 10.27 ppm de vitamina E.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:	
n Mayor -1 =	14
n menor -1 =	14
varianza1=	0.003787
varianza2=	0.001496
F de tablas=	2.98
F calculada =	2.53
<p>CONCLUSIÓN</p> <p>F calculada es menor que la F de tablas. La <math>H_0</math> se acepta, el analista presenta la misma precisión.</p>	

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:	
n Mayor -1 =	14
n menor -1 =	14
varianza1=	0.003199
varianza2=	0.001496
F de tablas=	2.98
F calculada =	2.14
<p>CONCLUSIÓN</p> <p>F calculada es menor que la F de tablas. La <math>H_0</math> se acepta, el analista presenta la misma precisión.</p>	

La prueba de hipótesis sobre las medias quedaría:	
nM =	15
nm =	15
varianza1=	0.003787
varianza2=	0.001496
nm+nM-2	28
t de tablas =	2.05
t calculada =	-0.23
<p>CONCLUSIÓN</p> <p>t calculada es mayor que la t de tablas La <math>H_0</math> se acepta, las medias son iguales y por tanto las soluciones son estables por 14 días.</p>	

La prueba de hipótesis sobre las medias quedaría:	
nM =	15
nm =	15
varianza1=	0.003199
varianza2=	0.001496
nm+nM-2	28
t de tablas =	2.05
t calculada =	0.08
<p>CONCLUSIÓN</p> <p>t calculada es menor que la t de tablas La <math>H_0</math> se acepta, las medias son iguales y por tanto las soluciones son estables por 21 días.</p>	

**Tabla 13.-** Resultados de la prueba de estabilidad de las soluciones de 10.27 ppm de vitamina E.

No. de Solución	Día	1	7	14	21
	No. inyección	Área	Área	Área	Área
1	1	9.68474	8.61119	9.8898	9.93605
	2	10.0015	10.1373	9.93422	10.084
	3	10.2184	10.0689	10.0933	10.2409
2	1	10.1507	8.76307	10.1775	10.2561
	2	10.0684	9.62977	10.0094	10.3345
	3	11.4502	10.0946	10.0169	10.1239
3	1	10.1517	10.1731	9.93268	10.0895
	2	10.3332	10.1684	10.1102	10.3336
	3	10.4082	10.2086	9.70403	10.1003
4	1	10.4734	10.2006	10.1227	10.0072
	2	9.77091	10.1801	10.1838	10.0431
	3	8.70094	10.156	10.0612	10.1754
5	1	9.61601	10.2494	10.2917	9.88081
	2	10.3768	9.95337	10.3226	9.90191
	3	10.1514	10.2127	10.3126	10.2668
n =	15	15	15	15	
media =	10.103767	9.920473	10.077509	10.118271	
Desv. Estándar=	0.578989	0.523860	0.171272	0.148620	
Varianza=	0.335229	0.274429	0.029334	0.022088	
C.V. %=	5.730432	5.280591	1.699549	1.468825	

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:	
n Mayor -1 =	14
n menor -1 =	14
varianza1=	0.335229
varianza2=	0.274429
F de tablas=	2.98
F calculada =	1.22
CONCLUSIÓN	
F calculada es menor que la F de tablas.	
H <sub>0</sub> se rechaza, el analista no presenta la misma precisión.	

La prueba de hipótesis sobre las medias quedaría:	
nM =	15
nm =	15
varianza1=	0.335229
varianza2=	0.274429
nm+nM-2	28
t de tablas =	2.05
t calculada =	0.91
CONCLUSIÓN	
t calculada es menor que la t de tablas	
H <sub>0</sub> se acepta, las medias son iguales y por tanto las soluciones son estables por 7 días.	

**Tabla 14.-** Resultados de la prueba de estabilidad de las soluciones de 50.50 ppm de vitamina E.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:	
n Mayor -1 =	14
n menor -1 =	14
varianza1=	0.335229
varianza2=	0.029334
F de tablas=	2.98
F calculada =	11.43
<p>CONCLUSIÓN</p> <p>F calculada es mayor que la F de tablas.  <math>H_0</math> se rechaza, el analista no presenta la misma precisión.</p>	

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:	
n Mayor -1 =	14
n menor -1 =	14
varianza1=	0.335229
varianza2=	0.022088
F de tablas=	2.98
F calculada =	15.18
<p>CONCLUSIÓN</p> <p>F calculada es mayor que la F de tablas.  <math>H_0</math> se rechaza, el analista no presenta la misma precisión.</p>	

La prueba de hipótesis sobre las medias quedaría:	
nM =	15
nm =	15
varianza1=	0.335229
varianza2=	0.029334
$\Phi$ CALCULADO=	16.43
$\Phi$ REDONDEADO=	16
t de tablas =	2.12
t calculada =	0.17
<p>CONCLUSIÓN</p> <p>t calculada es menor que la t de tablas  <math>H_0</math> se acepta, las medias son iguales y por tanto las soluciones son estables por 14 días.</p>	

La prueba de hipótesis sobre las medias quedaría:	
nM =	15
nm =	15
varianza1=	0.335229
varianza2=	0.022088
$\Phi$ CALCULADO=	15.84
$\Phi$ REDONDEADO=	16
t de tablas =	2.12
t calculada =	-0.09
<p>CONCLUSIÓN</p> <p>t calculada es mayor que la t de tablas  <math>H_0</math> se acepta, las medias son iguales y por tanto las soluciones son estables por 21 días.</p>	

**Tabla 14.-** Resultados de la prueba de estabilidad de las soluciones de 50.50 ppm de vitamina E.

No.	No.	Area
1	1	9.68474
	2	10.0015
	3	10.2184
2	1	10.3385
	2	9.27729
	3	10.455
3	1	10.1507
	2	10.0684
	3	11.4502
4	1	8.6463
	2	10.0996
	3	9.9733
5	1	10.1517
	2	10.3332
	3	10.4082
6	1	10.4734
	2	9.77091
	3	8.70094
7	1	10.0044
	2	10.0729
	3	10.1501
8	1	9.61601
	2	10.3768
	3	10.1514

Analista 1	
n=	24
MEDIA EXP =	10.02391
S EXP =	0.57316
VARIANZA EXP =	0.32852
CV % =	5.72

**Tabla 12.-** Resultados de reproducibilidad para la solución de 50 ppm de vitamina E.

No.	No.	Area
1	1	10.0808
	2	10.3579
	3	10.2239
2	1	7.9261
	2	8.90043
	3	8.43204
3	1	14.6413
	2	16.266
	3	16.3044
4	1	9.41836
	2	10.5773
	3	9.84784
5	1	10.2831
	2	12.4941
	3	12.0032
6	1	10.2526
	2	10.6795
	3	10.0909
7	1	10.0607
	2	9.31258
	3	7.40163
8	1	10.5022
	2	11.0298
	3	11.509

Analista 2	
n=	24
MEDIA EXP =	10.77482
S EXP =	2.25210
VARIANZA EXP =	5.07193
CV % =	20.90

**Tabla 12.-** Resultados de reproducibilidad para la solución de 50 ppm de vitamina E.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:	
n Mayor -1 =	23
n menor -1 =	23
varianza1=	5.07193
varianza2=	0.32852
F de tablas=	2.31
F calculada =	15.44
<p><b>CONCLUSIÓN</b>  F calculada es mayor que la F de tablas.  H<sub>0</sub> se rechaza, los analistas no presentan la misma precisión</p>	

La prueba de hipótesis sobre las medias quedaría:	
nM =	24
nm =	24
varianza1=	5.07193
varianza2=	0.32852
Φ CALCULADO=	25.97
Φ REDONDEADO=	26
t de tablas =	2.06
t calculada =	1.58
<p><b>CONCLUSIÓN</b>  t calculada es menor que la t de tablas  H<sub>0</sub> se acepta, las medias son iguales y se tiene una reproducibilidad con un error máximo del 5%.</p>	

**Tabla 12.-** Resultados de reproducibilidad para la solución de 50 ppm de vitamina E.



No.	No.	Area
1	1	1.77462
	2	1.89857
	3	1.86353
2	1	1.72414
	2	1.70906
	3	1.71635
3	1	1.8125
	2	1.79738
	3	1.79636
4	1	1.68216
	2	1.71515
	3	1.70318
5	1	1.74817
	2	1.70257
	3	1.722
6	1	1.72708
	2	1.75695
	3	1.71516
7	1	1.75095
	2	1.73557
	3	1.71916
8	1	1.78659
	2	1.78897
	3	1.79838

Analista 1	
n=	24
MEDIA EXP =	1.75602
S EXP =	0.05343
VARIANZA EXP =	0.00286
CV % =	3.04

**Tabla 11.-** Resultados de reproducibilidad para la solución de 10 ppm de vitamina E.

No.	No.	Area
1	1	1.50993
	2	1.53838
	3	1.66981
2	1	1.94091
	2	1.82471
	3	1.93891
3	1	1.8038
	2	1.67973
	3	1.78435
4	1	1.92472
	2	1.9351
	3	1.93934
5	1	1.79852
	2	1.78072
	3	1.80479
6	1	1.89652
	2	1.89989
	3	1.89392
7	1	1.77952
	2	1.77837
	3	1.79599
8	1	1.9103
	2	1.91453
	3	1.67904

Analista 2	
n=	24
MEDIA EXP =	1.80924
S EXP =	0.12239
VARIANZA EXP =	0.01498
CV % =	6.76

**Tabla 11.-** Resultados de reproducibilidad para la solución de 10 ppm de vitamina E.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas que	
n Mayor -1 =	23
n menor -1 =	23
varianza1=	0.014980
varianza2=	0.00286
F de tablas=	2.31
F calculada =	5.24
<p><b>CONCLUSIÓN</b>  F calculada es mayor que la F de tablas.  H<sub>0</sub> se rechaza, los analistas no presentan la misma precisión</p>	

La prueba de hipótesis sobre las medias que	
nM =	24
nm =	24
varianza1=	0.014980
varianza2=	0.00286
Φ CALCULADO=	31.47
Φ REDONDEADO=	31
t de tablas =	2.04
t calculada =	1.95
<p><b>CONCLUSIÓN</b>  t calculada es menor que la t de tablas  H<sub>0</sub> se acepta, las medias son iguales y se tiene una reproducibilidad con un error máximo del 5</p>	

**Tabla 11.-** Resultados de reproducibilidad para la solución de 10 ppm de vitamina E.

No. solución	No. inyección	Área
1	1	1.89728
	2	1.87484
	3	1.86040
2	1	1.74482
	2	1.65819
	3	1.68718
3	1	1.75546
	2	1.83659
	3	1.84718
4	1	1.65181
	2	1.69162
	3	1.64576
5	1	1.70952
	2	1.73693
	3	1.68363
6	1	1.68398
	2	1.73846
	3	1.64914
7	1	1.72574
	2	1.71301
	3	1.66768
8	1	1.78222
	2	1.63567
	3	1.77049

n=	24
MEDIA EXP =	1.7353
S EXP =	0.0785
VARIANZA EXP =	0.0062
%CVexp=	4.5235
%CV=	5
DESVIACION ESTANDAR =	0.0868
VARIANZA =	0.0075
ALFA =	0.0500
JI DE TABLAS	
JI CUADRADA AL 0.975 = 1-alfa/2	11.6885
JI CUADRADA AL 0.025 = alfa/2	38.0756
JI CUADRADA AL 0.05 = alfa	35.1725
JI CALCULADA	
JI CUADRADA =	18.8251
IC	
IC MAXIMO =	0.1101
IC MINIMO =	0.0610
CONCLUSION	
Como $18.8251 < 35.1725$ , $H_0$ se acepta y se tiene una precisión con un error máximo del 5%.	

**Tabla 9.-** Resultados de repetibilidad para la solución de 10.27 ppm.

No. solución	No. inyección	Área
1	1	9.68474
	2	10.0015
	3	10.2184
2	1	10.3385
	2	9.27729
	3	10.4550
3	1	10.1507
	2	10.0684
	3	11.4502
4	1	8.6463
	2	10.0996
	3	9.9733
5	1	10.1517
	2	10.3332
	3	10.4082
6	1	10.4734
	2	9.77091
	3	8.70094
7	1	10.0044
	2	10.0729
	3	10.1501
8	1	9.6160
	2	10.3768
	3	10.1514

n=	24
MEDIA EXP =	10.0239
S EXP =	0.5732
VARIANZA EXP =	0.3285
%CVexp=	5.7180
%CV=	5
DESVIACION ESTANDAR =	0.5012
VARIANZA =	0.2512
ALFA =	0.05
JI DE TABLAS	
JI CUADRADA AL 0.975 = 1-alfa/2	11.6885
JI CUADRADA AL 0.025 = alfa/2	38.0756
JI CUADRADA AL 0.05 = alfa	35.1725
JI CALCULADA	
JI CUADRADA =	30.0796
IC	
IC MAXIMO =	0.8040
IC MINIMO =	0.4455
CONCLUSION	
Como $30.0796 < 35.1725$ , $H_0$ se acepta y se tiene una precisión con un error máximo del 5%.	

**Tabla 10.-** Resultados de repetibilidad para la solución de 50.50 ppm.

No. solución	No. inyección	Área
1	1	1.72622
	2	1.74516
	3	1.72930
2	1	1.82953
	2	1.85153
	3	1.83484
3	1	1.66460
	2	1.67458
	3	1.68003
4	1	1.74070
	2	1.65604
	3	1.72780
5	1	1.67048
	2	1.67345
	3	1.67040
6	1	1.73945
	2	1.70638
	3	1.72336
7	1	1.82466
	2	1.78936
	3	1.80257

n=	21
MEDIA EXP =	1.73621
S EXP =	0.06296
VARIANZA EXP =	0.00396
%CVexp=	3.62610
%CV=	5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR =	0.08681
VARIANZA =	0.00754
ALFA =	0.05
JI DE TABLAS	
JI CUADRADA AL 0.975 = 1-alfa/2	9.5908
JI CUADRADA AL 0.025 = alfa/2	34.1696
JI CUADRADA AL 0.05 = alfa	31.4104
JI CALCULADA	
JI CUADRADA =	10.5189
IC	
IC MÁXIMO =	0.09091
IC MÍNIMO =	0.04817
CONCLUSIÓN	
Como $10.5189 < 31.4104$ , $H_0$ se acepta y se tiene una precisión con un error máximo del 5%.	

**Tabla 5.-** Resultados del precisión de sistema para la solución de 10.27 ppm de vitamina E, día 1.

No. solución	No. inyección	Área
1	1	1.72414
	2	1.70906
	3	1.71635
2	1	1.8125
	2	1.79738
	3	1.79636
3	1	1.68216
	2	1.71515
	3	1.70318
4	1	1.74817
	2	1.70257
	3	1.72200
5	1	1.72708
	2	1.75695
	3	1.71516
6	1	1.75095
	2	1.73557
	3	1.71916
7	1	1.78659
	2	1.78897
	3	1.79838

n=	21
MEDIA EXP =	1.74323
S EXP =	0.03873
VARIANZA EXP =	0.00150
%CVexp=	2.22198
%CV=	5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR =	0.08716
VARIANZA =	0.00760
ALFA =	0.05
JI DE TABLAS	
JI CUADRADA AL 0.975 = 1-alfa/2	9.5908
JI CUADRADA AL 0.025 = alfa/2	34.1696
JI CUADRADA AL 0.05 = alfa	31.4104
JI CALCULADA	
JI CUADRADA =	3.94974
IC	
IC MÁXIMO =	0.05593
IC MÍNIMO =	0.02963
CONCLUSIÓN	
Como $3.94974 < 31.4104$ , $H_0$ se acepta y se tiene una precisión con un error máximo del 5%.	

**Tabla 6.-** Resultados del precisión de sistema para la solución de 10.27 ppm de vitamina E, día 2.

No. solución	No. inyección	Área
1	1	8.61119
	2	10.13730
	3	10.06890
2	1	8.76307
	2	9.62977
	3	10.09460
3	1	9.04933
	2	10.28590
	3	9.52580
4	1	10.17310
	2	10.16840
	3	10.20860
5	1	10.20060
	2	10.18010
	3	10.15600
6	1	10.01010
	2	10.08870
	3	10.08470
7	1	10.24940
	2	9.95337
	3	10.21270

n=	21
MEDIA EXP =	9.89770
S EXP =	0.49712
VARIANZA EXP =	0.24713
%CVexp=	5.0226
%CV=	5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR =	0.49488
VARIANZA =	0.24491
ALFA =	0.05
JI DE TABLAS	
JI CUADRADA AL 0.975 = 1-alfa/2	9.5908
JI CUADRADA AL 0.025 = alfa/2	34.1696
JI CUADRADA AL 0.05 = alfa	31.4104
JI CALCULADA	
JI CUADRADA =	20.1812
IC	
IC MÁXIMO =	0.71788
IC MÍNIMO =	0.38033
CONCLUSIÓN	
Como $20.1812 < 31.4104$ , $H_0$ se acepta y se tiene una precisión con un error máximo del 5%.	

**Tabla 7.-** Resultados de precisión del sistema para la solución de 50.50 ppm de vitamina E, día 1.



No. solución	No. inyección	Área
1	1	9.88980
	2	9.93422
	3	10.09330
2	1	10.17750
	2	10.00940
	3	10.01690
3	1	10.13770
	2	9.49028
	3	10.28100
4	1	9.93268
	2	10.11020
	3	9.70403
5	1	10.12270
	2	10.18380
	3	10.06120
6	1	10.04160
	2	9.64588
	3	9.94728
7	1	10.29170
	2	10.32260
	3	10.31260

n=	21
MEDIA EXP =	10.03364
S EXP =	0.21962
VARIANZA EXP =	0.04823
%CVexp=	2.1889
%CV=	5
DESVIACIÓN ESTÁNDAR =	0.50168
VARIANZA =	0.25168
ALFA =	0.05
JI DE TABLAS	
JI CUADRADA AL 0.975 = 1-alfa/2	9.5908
JI CUADRADA AL 0.025 = alfa/2	34.1696
JI CUADRADA AL 0.05 = alfa	31.4104
JI CALCULADA	
JI CUADRADA =	3.8329
IC	
IC MÁXIMO =	0.31715
IC MÍNIMO =	0.16802
CONCLUSIÓN	
Como $3.8329 < 31.4104$ , $H_0$ se acepta y se tiene una precisión con un error máximo del 5%.	

**Tabla 8.-** Resultados de precisión del sistema para la solución de 50.50 ppm de vitamina E, día.