



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**VALIDACIÓN DEL CROMATÓGRAFO DE  
LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA DEL LAB.  
3F PARA EL ANÁLISIS DE VITAMINA D<sub>3</sub>**

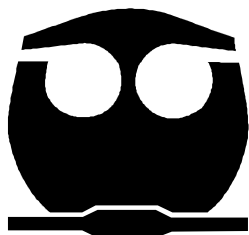
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JESSICA CONSUELO CHAVARRÍA CANO**



**MÉXICO, D. F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Jurado asignado**

<b>Presidente</b>	Q. Ernestina Cervera Flores
<b>Vocal</b>	M. en C. Lucía Cornejo Barrera
<b>Secretario</b>	Q. Adolfo García Osuna
<b>1<sup>er.</sup> Suplente</b>	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
<b>2<sup>o.</sup> Suplente</b>	QFB. María de Lourdes Osnaya Suárez

### **Sitio en el que se desarrolló el tema:**

Departamento de Química Analítica  
Laboratorio 3B y 3F. Edificio A  
Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

### **Asesor del tema**

---

Q. Adolfo García Osuna

### **Supervisor técnico**

---

Q.F.B. Silvia de Jesús Mendoza Arellano

### **Sustentante**

---

Jessica Consuelo Chavarría Cano

## ***Agradecimientos***

*Deseo agradecer a Dios, a quien atribuyo todas aquellas cosas que la lógica y la razón no pueden explicar.*

*A mis amados padres Miriam y René, qué difícil me ha resultado tratar de escribir... gracias por ayudarme a ser la persona que soy, por su fortaleza, fé y lucha constante. Por levantarme cuando he caído y por no dejarme renunciar jamás. Sé que unas cuantas líneas no son suficientes pero solo me queda decir GRACIAS POR TODO.*

*A mis hermanos Miriam, Cinthia y René; por los consejos, regaños, risas, peleas, diversiones y un sin número de experiencias que hemos compartido a lo largo de nuestras vidas. Sé que contaré con ustedes en todo momento.*

*A mis sobrinas Fer y Andy; porque inconscientemente logran hacerme reír cuando más lo necesito. A pesar de que su llegada a la familia volteó de cabeza mi vida, ahora no podría imaginarla sin ustedes.*

*A mi familia (padres, hermanos y sobrinas); por nunca dejarme sola, creer en mí, sus incontables sacrificios y por vivir la química de alimentos a mi lado. Este logro no solo es mío...*

*Al profesor Adolfo; por darme la oportunidad de trabajar a su lado en su grandioso laboratorio, por todas sus enseñanzas y consejos. Gracias por mostrarme que la honestidad, rectitud y el trabajo correcto traen excelentes recompensas.*

*A la profesora Silvia; por sus consejos, apoyo, calidez y confianza.*

*A la profesora Tina; por sus comentarios tan acertados y por tener esa particular chispa que logra levantarle el ánimo a cualquier persona.*

*A los profesores Silvia, Tina y Adolfo; por abrirme las puertas del laboratorio 3B, por su preocupación, enseñanzas y cuidados. Por generar ese ambiente fraternal que me hace sentir en familia y por mostrarme que compartir el conocimiento deja una gran satisfacción.*

*Y ahora si van todos mis amigos, que nombraré por orden de aparición a lo largo de mi vida pero no significa que los últimos son menos importantes (espero no olvidar a ninguno):*

*A mis amigos de la prepa 5: Ivette, Omar, Paco, Nadia, Ariel, Joel, Claudia, Julieta, Dolores y Leticia; por llenar de risas el tiempo que pasé dentro y fuera de la escuela. Especialmente a mis amigos Ivette y Omar que considero de los mejores amigos que tengo, gracias por compartir tantas cosas conmigo, los quiero.*

*A mis amigos de la facultad de Química; por compartir su vida conmigo, sin duda pasé más tiempo con ustedes que con mi familia a lo largo de estos cinco años, gracias por tolerarme,*

*por sus consejos, regaños y risas, créanme que he aprendido algo de cada uno de ustedes.  
Escritos en orden alfabético:*

*Amigos de las donas: Amri, César, Cristóbal, Daniel, Edgar, Frida, Marco, Monse (q.p.d.),  
Óscar y Sergio.*

*Otro agradecimiento especial: a Olga por ser más que mi compañera y amiga en momentos  
difíciles, por ser un gran ejemplo y por alentarme a ser mejor.*

*Amigos QA's: Aarón, Alexis, Ana Gaby, Ana Laura, Ania, Cinthya, Dennis, Diana, Lili y  
Maty.*

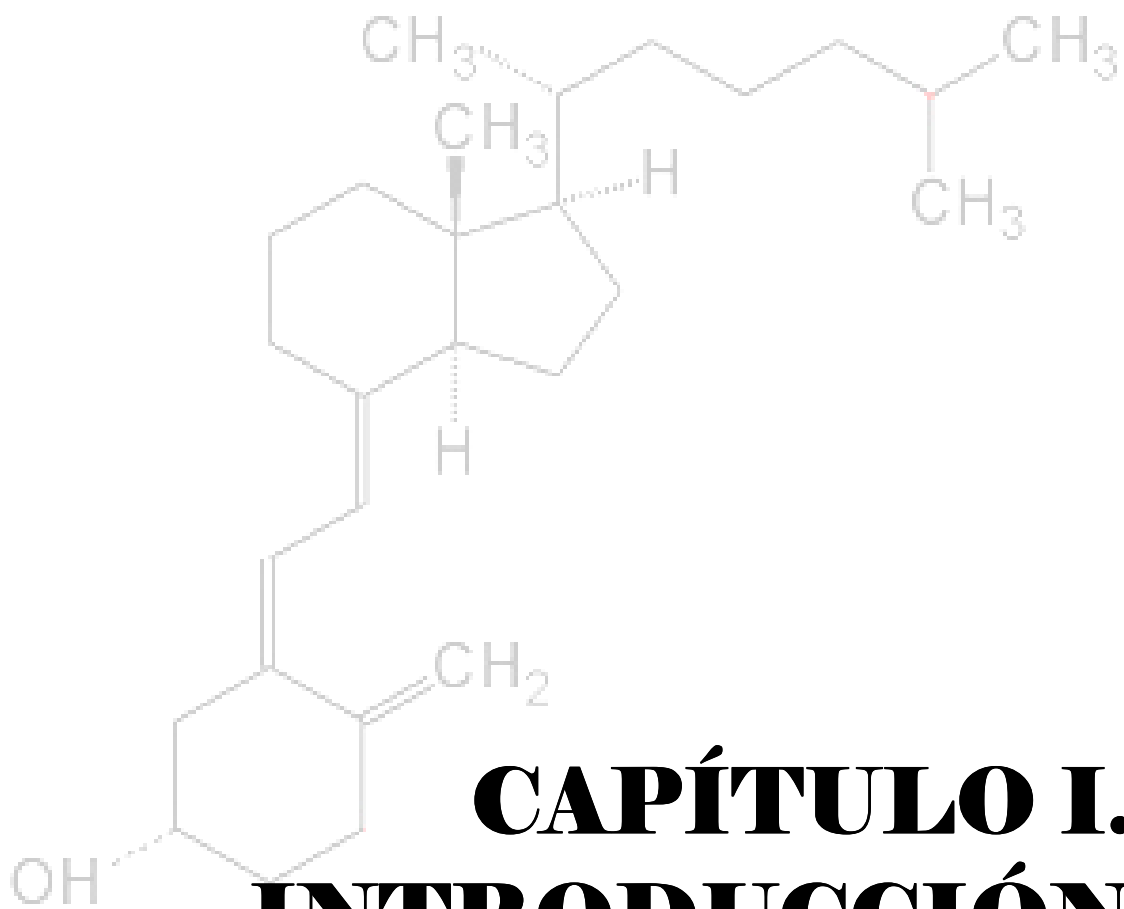
*A mis amigos de laboratorio: Alex, Lilia y Ma. Rosa, he aprendido demasiado de ustedes,  
gracias por escucharme, por darme su apoyo y por levantarme el ánimo cuando lo he  
necesitado.*

*Agradezco a todos los profesores que estuvieron dispuestos a compartir su conocimiento.*

*Y por último pero no menos importante, agradezco a la UNAM por abrirme las puertas al  
conocimiento. Aún recuerdo cuando recibí mi carta de aceptación y nunca imaginé cuánto  
cambiaría mi vida...*

# Índice

	<b>Páginas</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
Vitamina D .....	5
Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) .....	15
Validación .....	28
<b>CAPÍTULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>36</b>
Diagrama de trabajo .....	37
Material.....	37
Instrumental .....	38
Reactivos .....	38
Condiciones óptimas de trabajo.....	39
Linealidad de sistema.....	40
Precisión de sistema .....	41
Estabilidad .....	41
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
Validación de sistema.....	43
Condiciones óptimas del sistema .....	43
Linealidad de sistema.....	45
Precisión de sistema.....	51
Estabilidad.....	54
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO I. FUENTES ALIMENTARIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO II. DATOS Y ESTADÍSTICA.....</b>	<b>67</b>
Linealidad de sistema.....	68
Precisión de sistema .....	74
Estabilidad .....	76



# **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

## Introducción

La Vitamina D es un conjunto de compuestos que poseen actividad antirraquítica. Aunque pertenece al grupo de vitaminas liposolubles, por su estructura secoesteroide y sus funciones, actualmente se clasifica como hormona, ya que forma parte del sistema regulador del metabolismo del calcio y fósforo junto con la calcitonina y la hormona paratiroide (PTH), además, se ha encontrado que participa en diversos procesos metabólicos.

Los dos compuestos más destacados son la vitamina D<sub>2</sub> que es un derivado de las plantas y la D<sub>3</sub> que se obtiene a partir de la incidencia de los rayos solares sobre la piel. Si se tiene una exposición solar insuficiente, los requerimientos básicos deben cubrirse a través de la dieta, sin embargo, las fuentes alimentarias naturales poseen pequeñas cantidades de vitamina D, debido a esto se ha recurrido a la adición y fortificación de algunos alimentos de consumo masivo, principalmente de origen animal en su mayoría lácteos.

Por esto, se debe contar con técnicas analíticas que permitan su cuantificación para mantener niveles adecuados de la misma en dichos productos. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), ha sido una de las mejores técnicas para la separación y cuantificación de la vitamina D y sus metabolitos, ya que es rápida, precisa y proporciona alta resolución.

Los análisis requieren cantidades fiables de muestra, las técnicas analíticas permiten obtener resultados que se acercan con la mayor precisión y exactitud a los considerados como valores verdaderos ó legislados.

Es fundamental disponer de mediciones analíticas utilizando métodos y equipos debidamente validados, es decir, que hayan sido probados para asegurar que son aptos para el propósito requerido y que proporcionan resultados confiables. No tiene sentido analizar alimentos para determinar algún componente si se utilizan métodos no probados o que arrojen resultados no confiables.

Antes de validar un método se debe validar el sistema o la técnica analítica, con lo que es posible obtener la información estadística necesaria que permite conocer el margen de error con el que se obtienen los resultados y en general del análisis, para disminuirlo o por lo menos, mantenerlo constante.

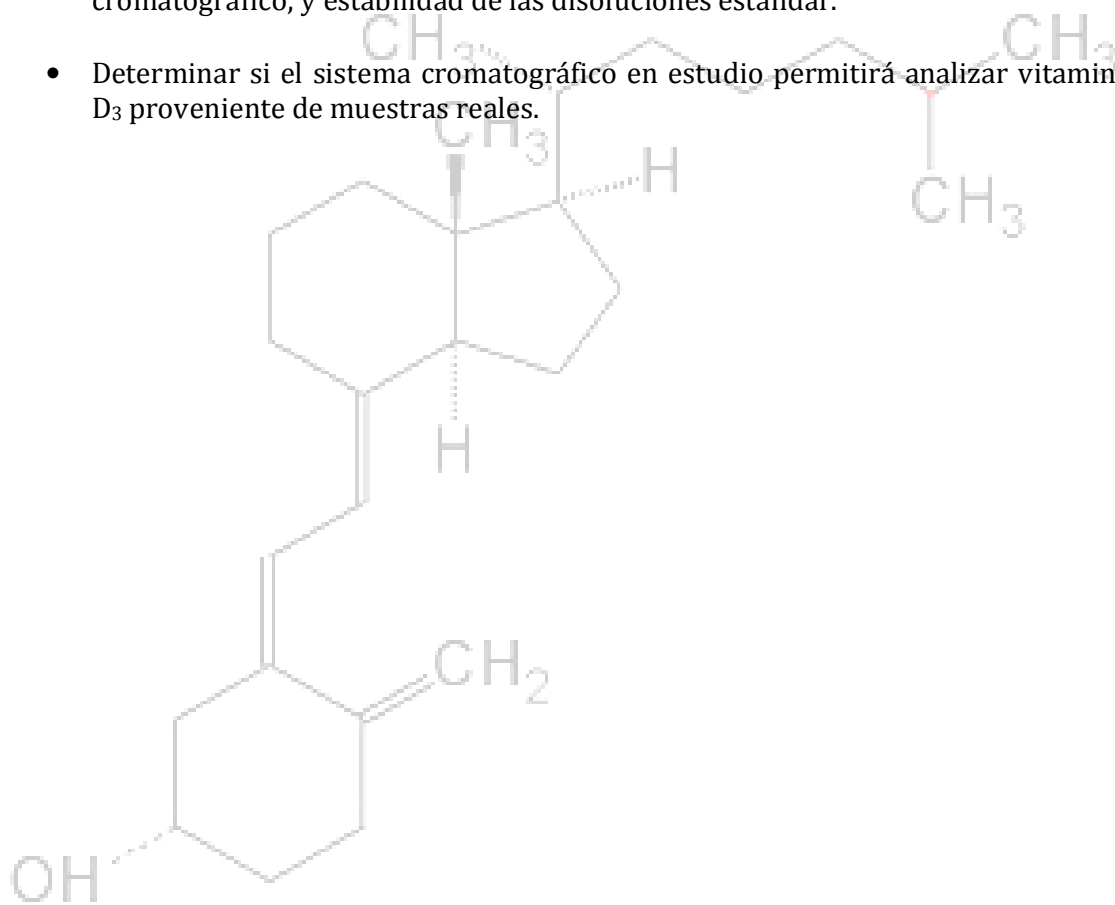
En general los parámetros que se evalúan normalmente en una validación analítica instrumental son: condiciones óptimas de trabajo de la técnica a utilizar, linealidad de sistema y método, precisión de sistema y método (reproducibilidad y repetibilidad), exactitud, cantidad mínima detectable, estabilidad de la muestra, etc.



## Objetivos

Para el desarrollo de esta investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Demostrar que el sistema cromatográfico es capaz de separar y cuantificar la vitamina D<sub>3</sub> de una mezcla de vitaminas liposolubles.
- Validar el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia del laboratorio 3F para el análisis de vitamina D<sub>3</sub>, por medio de la evaluación de los siguientes parámetros: condiciones óptimas de trabajo, linealidad y precisión del sistema cromatográfico, y estabilidad de las disoluciones estándar.
- Determinar si el sistema cromatográfico en estudio permitirá analizar vitamina D<sub>3</sub> proveniente de muestras reales.



# **CAPÍTULO II.**

# **MARCO TEÓRICO**

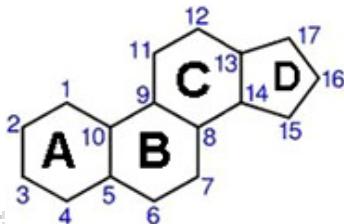
## Vitamina D<sup>1, 2, 3</sup>

Las primeras descripciones de raquitismo se remontan al siglo XVII, y adquiere una mayor relevancia a partir de la revolución industrial del siglo XIX. En la segunda década del siglo XX se observó que la administración de aceite de bacalao o la exposición al sol curaba la enfermedad. En los años treinta se aisló la vitamina D como principio activo, pero su metabolismo y mecanismo de acción se describieron hasta la década de los setenta<sup>4</sup>. Originalmente fue clasificada como vitamina esencial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis del calcio<sup>1</sup>, ya que se ignoraba que el organismo es capaz de sintetizarla fotoquímicamente. En la actualidad se ha demostrado que la vitamina D no es estrictamente una vitamina, puede considerarse como una hormona esteroide por su producción endógena, la regulación de su síntesis, su distribución por vía sanguínea a los tejidos diana lejanos al lugar de producción de la misma, así como su mecanismo de acción ya que una vez administrada se transforma en metabolito activo.

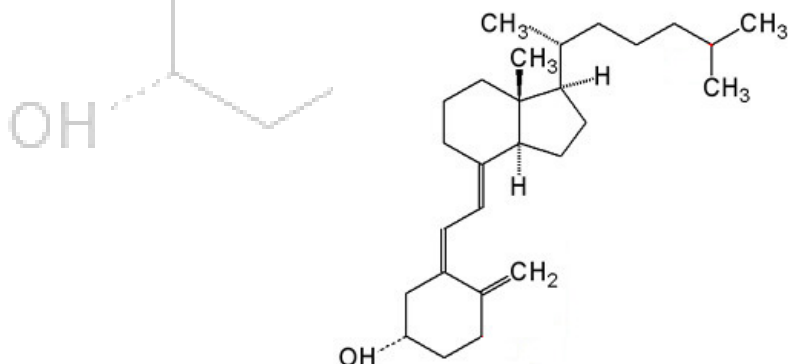
### Química y Propiedades

#### Estructura

La vitamina D se refiere a un grupo de compuestos relacionados estructuralmente, que poseen la misma actividad biológica. Todos ellos son derivados de un sistema de anillo ciclopentanoperhidrofenantreno (*Fig. 2.1*), común en distintos esteroides tales como el colesterol. El anillo B presenta fisión en el enlace sencillo de los carbonos 9 y 10, resultando en un sistema trieno, el cual se presenta en todos los compuestos de la familia D<sup>2</sup>. La estructura de la vitamina D<sub>3</sub> se muestra en la *fig. 2.2*.

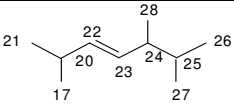
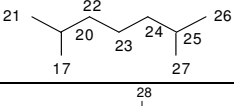
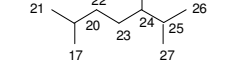


**Fig. 2.1.** Sistema cicloesterano o ciclopentanoperhidrofenantreno.



**Fig. 2.2.** Estructura de vitamina D<sub>3</sub>, calcicol o colecalciferol.

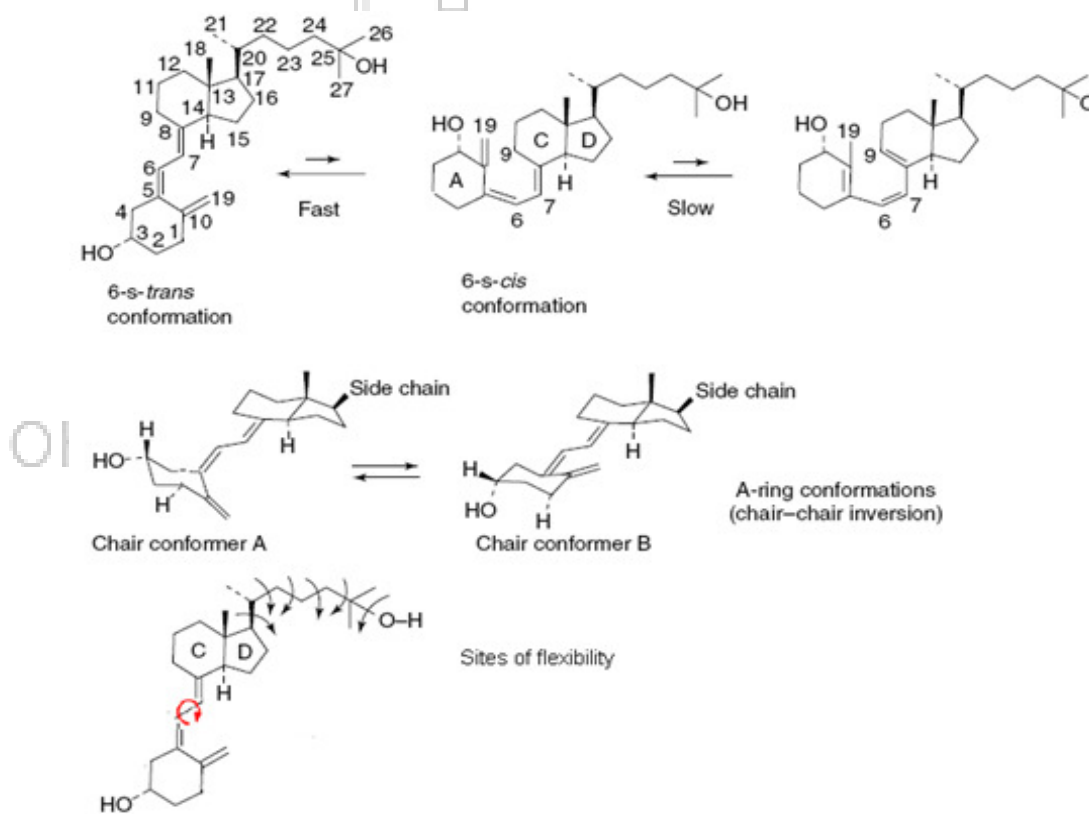
Los miembros de la familia D difieren únicamente en la estructura de la cadena lateral hidrocarbonada unida al anillo de cinco miembros, a continuación se presentan algunos ejemplos (*tabla 2.1*).

Provitamina.	Vitamina D.	Fórmula empírica	Cadena lateral
Ergosterol	D <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O	
7-dehidrocolesterol	D <sub>3</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	
22,23-dihidroergosterol	D <sub>4</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> O	

**Tabla 2.1.** Cadenas laterales de provitamina D incluidas de la vitamina D<sub>2</sub> a la D<sub>4</sub>.

La vitamina D y todos sus metabolitos, son conformacional e inusualmente flexibles en comparación con otras hormonas esteroides. Esto se debe a que la molécula posee tres principales regiones de flexibilidad (*fig. 2.3*):

- La cadena hidrocarbonada lateral tiene una rotación de 360° alrededor de cada enlace simple carbono-carbono.
- El ciclohexano del anillo A sufre una interconversión silla-silla; a consecuencia de esto, los sustituyentes del anillo A son rápida y continuamente alternados entre las posiciones axial y ecuatorial.
- El anillo B roto presenta rotación de 360° alrededor del enlace simple entre los carbonos 6 y 7. Obteniendo como resultado la generación de compuestos con conformación de 6-*s-cis* o 6-*s-trans*.



**Fig. 2.3.** Sitios de flexibilidad de la vitamina D<sub>3</sub>.

### Nomenclatura

La vitamina D es nombrada de acuerdo a la reglamentación de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry ó IUPAC, por su nombre y siglas en inglés), como (1S)-3-[2-[(1R,3 $\alpha$ S,7 $\alpha$ R)-7 $\alpha$ -metil-1-[(2R)-6-metilheptan-2-il]-2,3,3 $\alpha$ ,5,6,7-hexahidro-1H-inden-4-ilideno]etilideno]-4-metilidenociclohexan-1-ol<sup>5</sup>. El término vitamina D debe utilizarse como una expresión general para describir todos los esteroides que presentan cualitativamente la actividad biológica del calciol ó vitamina D<sub>3</sub>. Dado que la vitamina D se deriva de un esteroide, la estructura conserva la nomenclatura del compuesto original esteroide: colesterol. Es designada *seco* debido a que el anillo B del sistema ciclosterano ha sufrido fisión. Los centros asimétricos son nombrados de acuerdo a la notación R, S y a las reglas de prioridad de Cahn. La configuración de los dobles enlaces se denomina E, Z; E para *trans* y Z para *cis*. El nombre sistemático para la vitamina D<sub>3</sub> es (5Z,7E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrien-3-ol y para la vitamina D<sub>2</sub>, (5Z,7E,22E)-(3S)-9,10-seco-5,7,10(19),22-ergostatetraen-3-ol<sup>6</sup>.

### Propiedades de vitamina D<sub>3</sub>

QUÍMICAS
No. CAS: 67-97-0
Tres enlaces dobles; $\lambda_{\max}$ 265nm con coeficiente de extinción molar de 18 300 en alcohol o hexano.
$\alpha_{\lambda_{D_{Na}}}^{20^{\circ}C} = + 84,8^{\circ}$ en acetona.
Peso molecular: 384,65 g/mol.
Composición: C - 84,31%, H - 11,53%, O - 4,16%.
Solubilidad: insoluble en agua; soluble en benceno, cloroformo, etanol y acetona.
Estabilidad y Reactividad: inestable a la luz, puede oxidarse si se expone al aire a 24°C por 72h. Incompatible con agentes oxidantes fuertes, HCl y anhídros. Su descomposición libera vapores tóxicos. Susceptible a la isomerización.
Almacenamiento: bajo nitrógeno, en refrigeración 0°C, perfectamente sellado.
FÍSICAS
Color: blanco
Fase: sólido cristalino
Punto de fusión: 85-87°C
TOXICOLÓGICAS
DL <sub>50</sub> : 42mg/Kg (oral en rata y ratón)

**Fuente:** *The Merck Index*<sup>7</sup>, *Chem Service*<sup>8</sup>, *Handbook of Vitamins*<sup>2</sup>.

### Síntesis

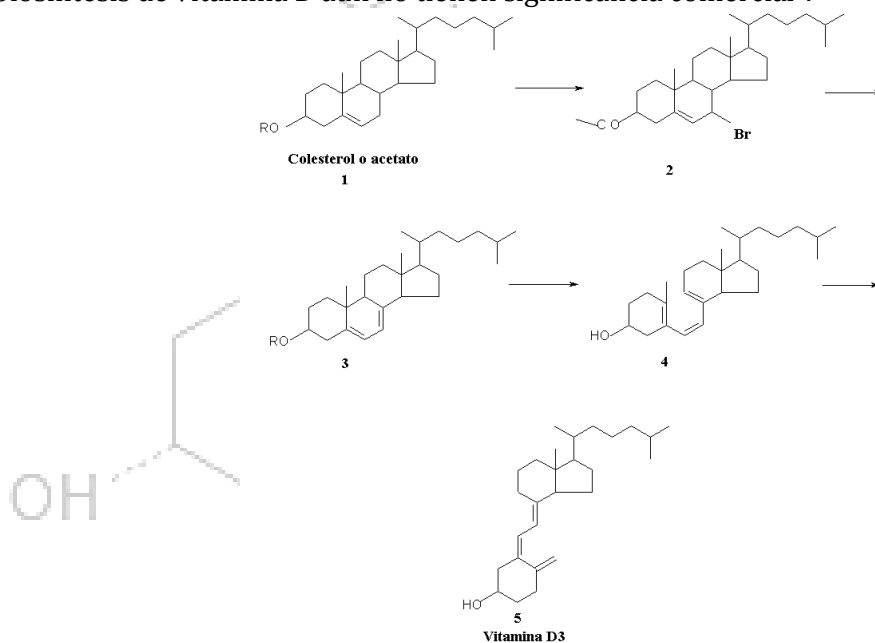
Básicamente, la síntesis de la vitamina D se puede realizar en dos direcciones, la primera involucra la síntesis de la provitamina D la cual puede ser convertida en vitamina D por irradiación con energía UV. La segunda, consiste totalmente en síntesis química.

### Síntesis fotoquímica

La síntesis fotoquímica de la vitamina D se realiza a través de una reacción pericíclica. La estructura primaria que se requiere de la provitamina D es un estero con un sistema dieno del C-5 al C-8 del anillo B, el 7-dehidrocolesterol. El sistema de dobles enlaces conjugados es un cromóforo, el cual al ser irradiado con fotones de la región UV (270-315nm), inicia una serie de transformaciones resultando la estructura secoesteriodes de la vitamina D. La reacción sucede en dos pasos, una apertura electrocíclica del anillo de ciclohexadieno para producir un hexatrieno, seguida por un desplazamiento sigmatrópico del H para producir un hexatrieno isomérico<sup>2</sup>.

### Síntesis industrial

Los dos principales compuestos de la familia de vitamina D que han sido comercializados son el ergocalciferol (D<sub>2</sub>) y colecalciferol (D<sub>3</sub>), este último es el más importante. El punto de inicio para la producción de vitamina D<sub>3</sub> (fig. 2.4) es el colesterol (1) el cual es convertido a acetato, C-7 es bromado (2) típicamente con N-bromosuccinamida, y después es sometido a una eliminación catalizada con una base para introducir una insaturación adicional (3). El producto es saponificado y convertido fotoquímicamente a la provitamina D (4), ésta sufre un rearrreglo a vitamina D<sub>3</sub> (5) por tratamiento térmico. La vitamina D<sub>2</sub> se prepara a través de una ruta análoga pero partiendo del ergosterol. El aislamiento de fuentes naturales y los métodos de biosíntesis de vitamina D aún no tienen significancia comercial<sup>9</sup>.

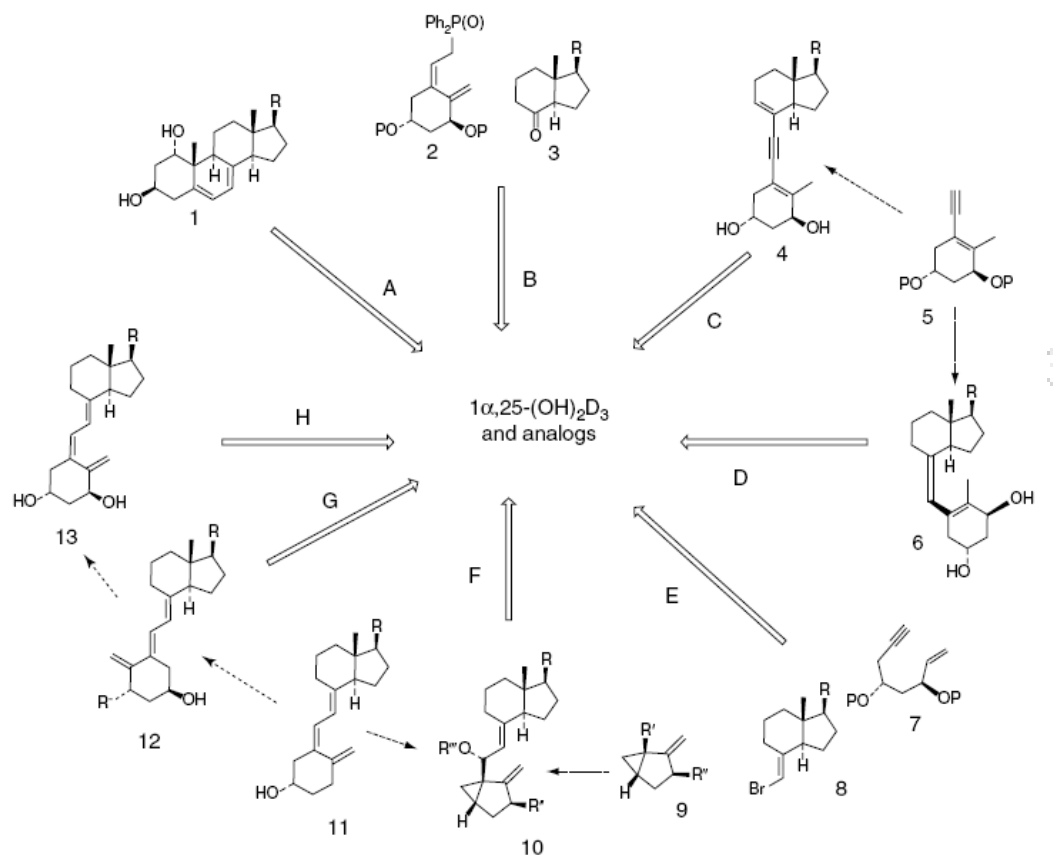


**Fig. 2.4.** Preparación comercial de vitamina D<sub>3</sub> a partir del colesterol.

### Síntesis química

La primera síntesis química pura de la vitamina D, es decir, sin irradiación, fue realizada en 1967. Esta área continua de investigación permitió la producción de diversos metabolitos y análogos de la vitamina D sin la necesidad de pasos fotoquímicos para su

obtención. La *fig. 2.5* resume algunas de las estrategias de síntesis más utilizadas para más de 1000 análogos de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .



**Fig. 2.5.** Resumen de síntesis más comunes de vitamina D y sus análogos.

Método	Reacción	Productos
<b>A</b>	Reacción fotoquímica.	Vitamina D
<b>B</b>	Ruta de Wittig-Horner.	Cadenas laterales y análogos de vitamina D.
<b>C</b>	Rearreglo de dienos semihidrogenados.	Análogos de vitamina D
<b>D</b>	Estrategia vinilalénica.	Análogos de vitamina D
<b>E</b>	Ruta de acoplamiento-ciclación.	Esqueleto de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .
<b>F y G</b>	Isomerización y modificación en sustituyentes	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o análogos de vitamina D.
<b>H</b>	Modificación directa de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o análogos utilizando grupos protegidos.	$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o análogos de vitamina D.

### Estabilidad

La vitamina D es susceptible a altas temperaturas, humedad, oxígeno, luz, pH, agentes reductores y oxidantes y presencia de iones metálicos. La reducción del contenido vitamínico en alimentos es influenciada por estos mismos factores y por la presencia de

otros componentes de la matriz alimentaria. Puede tener lugar durante el almacenamiento, procesamiento y preparación de ingredientes y alimentos, particularmente los sometidos a tratamiento térmico. Para reducir la degradación, se emplean métodos de recubrimiento o protección de las vitaminas. Para esto se utilizan materiales como gelatina, aceites comestibles y sus derivados, almidones y azúcares<sup>3</sup>.

### Fuentes Alimentarias

La vitamina D se encuentra en cantidades pequeñas y variables en alimentos. Generalmente, se encuentra en derivados animales, los pescados como arenque, salmón, sardina, bacalao y aceites de hígado son fuentes ricas en vitamina D, la cual se encuentra contenida en la grasa de los mismos. Por otra parte, los huevos, carnes, leche, mantequilla, yogurt y crema la contienen en menor cantidad. Cereales, verduras, frutas, legumbres y frutos secos se pueden considerar como desprovistos de la misma. Aceites vegetales contienen cantidades casi imperceptibles de la provitamina. A consecuencia de esto, se ha recurrido a la fortificación de algunos productos tales como leche, yogurt, crema, mantequilla, jugos, algunos cereales e incluso confituras tales como el chocolate. (Tabla de contenido de vitamina D en algunos alimentos en anexo I).

### Farmacocinética

La activación de las vitaminas D<sub>3</sub> y D<sub>2</sub> ocurre de la misma manera, sin embargo, se ha demostrado que la vitamina D<sub>2</sub> tiene solo 25%-30% de actividad biológica que la vitamina D<sub>3</sub>.

### Absorción

La vitamina D<sub>3</sub> que es obtenida de la dieta forma micelas con las grasas en el intestino delgado y por medio de las sales biliares se absorben en duodeno y yeyuno. Una vez en el enterocito, la vitamina se incorpora a los quilomicrones, alcanzando la circulación sistémica vía linfática.

### Biosíntesis fotoquímica

La mayor fuente de vitamina D<sub>3</sub> es, sin duda, la biosíntesis en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol, que a su vez procede del colesterol. La biosíntesis de la provitamina ocurre fundamentalmente en las capas en crecimiento de la epidermis, en los estratos basal y espinoso (80-90%), ocurriendo el resto (10-20%) en la dermis, distribuyéndose, un 60% en la epidermis y un 40% en la dermis<sup>3</sup>. Existen cuatro variables importantes que colectivamente establecen la cantidad de vitamina D<sub>3</sub> que será producida fotoquímicamente:

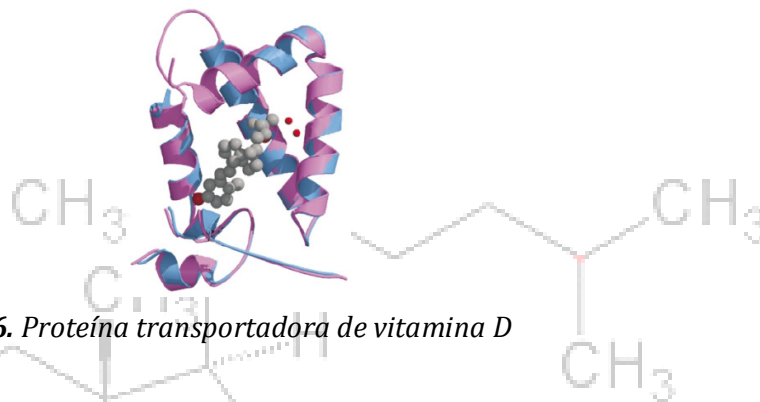
1. Intensidad (cantidad) de radiación UV.
2. Longitud de onda (calidad) apropiada de radiación UV.
3. Concentración de 7-dehidrocolesterol presente en los estratos cutáneos.
4. Concentración de melanina presente en la piel, ya que su función es filtrar la luz UV, por lo que compite por los fotones con el 7-dehidrocolesterol.

Las dos primeras son principalmente determinantes ya que la radiación debe llegar hasta donde se encuentra el 7-dehidrocolesterol, que absorbe más eficientemente longitudes de 270-290nm para producir vitamina D<sub>3</sub>.<sup>2</sup>



### Transporte y Almacenamiento

La vitamina D es preferentemente removida de la piel y de los quilomicrones por el sistema circulatorio, se transporta a través del torrente sanguíneo por una proteína transportadora llamada DBP (por su nombre en inglés, Vitamin D-Binding Protein), que sirve también como reservorio, por lo que se encuentran mayores cantidades de vitamina D y sus metabolitos en sangre.



**Fig. 2.6.** Proteína transportadora de vitamina D

### Anabolismo

Para que la vitamina D tenga actividad biológica debe ser metabolizada a sus formas activas. Primero se transporta al hígado, donde es hidroxilada en el C-25, transformándose a  $25(\text{OH})\text{D}_3$  (calcidiol), catalizada por la enzima  $\text{D}_3$ -25-hidroxilasa. Después, se transporta al riñón por la DBP, donde sufre una segunda hidroxilación a  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (calcitriol); o bien,  $24,25,(\text{OH})_2\text{D}_3$  catalizada por la  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1-hidroxilasa o  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -24-hidroxilasa, dependiendo del sitio de adición del grupo hidroxilo. Estas enzimas se localizan en las mitocondrias de los túbulos proximales y son conocidas como oxidasas de función mixta interviniendo en el complejo enzimático citocromo  $\text{P}_{450}$ .<sup>10</sup> Los puntos más importantes de regulación de la hormona  $\text{D}_3$  son: los niveles de la  $25(\text{OH})\text{D}_3$ -1-hidroxilasa renal dependiente de la hormona paratiroide (PTH) que estimula su síntesis, las concentraciones séricas de calcio y fosfato que la inhiben cuando están elevadas y retroalimentación negativa por producto<sup>3</sup>.

### Catabolismo y Excreción

La conversión del calcitriol a metabolitos menos activos o completamente inactivos es mediada por caminos enzimáticos diferentes, principalmente por hidroxilaciones adicionales siendo los productos finales el ácido calcitroico, que es eliminado por la orina y, la calcitriolactona que puede inhibir ciertas funciones de la hormona natural, su principal vía de excreción son las sales biliares.

### **Farmacodinamia**

Los efectos de la vitamina D se logran por medio de dos vías de transducción:

#### Genómico

La hormona  $\text{D}_3$  se produce en respuesta a un estímulo fisiológico, ésta circula por el torrente sanguíneo a los tejidos diana donde interactúa con receptores intracelulares de

alta afinidad y el receptor X de ácido retinoico. El complejo receptor-hormona localizado en el núcleo genera la transcripción, su modulación deriva en la inducción o represión del ARNm, resultando en la expresión proteínica necesaria (osteocalcina, osteopartina, DBP, etc.) para producir la respuesta biológica requerida<sup>2</sup>, estas respuestas no son inmediatas, pueden tardar horas o incluso días.

### No-Genómico

La vía no-genómica consiste en la unión de compuestos de vitamina D a los receptores de membrana que desencadenan la activación de varias vías de transducción ocasionando respuestas biológicas rápidas en cuestión de segundos o minutos.

Los diversos efectos biológicos de la vitamina D han sido agrupados en dos categorías.

### Efectos clásicos

Cuando la concentración de calcio sérico disminuye (hipocalcemia), se secreta la hormona paratiroide (PTH) que activa la producción de calcitriol ambas movilizan células monolíticas de la médula ósea que maduran a osteoclastos promoviendo la resorción ósea<sup>10</sup>. El calcitriol secretado estimula la absorción entérica, reduce la excreción renal, moviliza calcio desde los huesos e inhibe la producción de PTH haciendo que el nivel de calcio y fósforo en la sangre retorne a su normalidad. Cuando la concentración sérica de calcio aumenta (hipercalcemia), el calcitriol produce una inhibición de sus metabolitos activos en conjunto con la calcitonina (secretada por la glándula tiroides) actúan directamente sobre el esqueleto paralizando la resorción ósea, promoviendo la deposición de calcio en los huesos y aumentando su excreción renal.

### Sistemas no clásicos

Se han descubierto receptores nucleares para 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en una variedad de células y tejidos que no están directamente relacionados con la homeostasis del calcio. Se sabe que la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> está involucrada en la expresión de más de 100 proteínas y varios oncogenes, sin embargo, su mecanismo de acción aún no está muy claro<sup>11</sup>. En la *tabla 2.2* se muestran los diversos efectos de la vitamina D y sus metabolitos sobre otros órganos.

<b>Músculo</b>	Efecto directo en el transporte y homeostasis de calcio.
<b>Piel</b>	Análogos de vitamina D no hipercalcémicos en tratamiento de psoriasis ejercen efectos antiproliferativos y a favor de la diferenciación celular.
<b>Páncreas</b>	Esencial para la secreción normal de insulina. Puede prevenir diabetes tipo I.
<b>Cerebro</b>	Aparentemente, incrementa la actividad de la acetilcolintransferasa en regiones específicas.
<b>Sistema inmune</b>	Induce la diferenciación de monolitos y macrófagos. Promueve la diferenciación de células precursoras de leucemia mieloide. Inhibe la síntesis y proliferación de linfocitos B y T activados.
<b>Otros</b>	El tratamiento con vitamina D tiene una correlación con varios tipos de cáncer, particularmente de estómago, colon, hígado, vesícula biliar, páncreas, pulmón, mama, próstata, vejiga y riñón.

**Tabla 2.2.** Efectos no clásicos de la vitamina D y sus metabolitos<sup>3</sup>.

### Requerimientos nutricionales

#### Ingesta Recomendada

Debido a que la vitamina D<sub>3</sub> es producida por vía endógena, podría no ser necesaria la ingesta de la misma cuando la disponibilidad de rayos solares es suficiente. Las dosis de vitamina D<sub>3</sub> se convierten en un factor nutricional en ausencia de la exposición a los rayos solares. Sumado a los factores ya mencionados, la luz UV puede ser bloqueada por factores como contaminación, prendas de vestir y bloqueadores solares. La ingesta diaria recomendada (IDR) en México y en EUA es:

Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán" <sup>12</sup>	"Food and Drug Administration, FDA" <sup>13</sup>
Niños menores de 3 años, mujeres embarazadas y ancianos: 10µg	Niños, mujeres y hombres menores de 50 años: 5µg
Niños de 4-6 años: 5µg	Mujeres en periodo peri y posmenopáusico: 10µg
Adultos y niños mayores a 6 años: No indicado debido al grado de exposición solar.	Ancianos: 15µg

\*(UI = 0,025µg de vitamina D).

#### Deficiencia

El déficit de vitamina D puede deberse a un reducido aporte en la dieta, a una insuficiente exposición a la luz solar o a una serie de factores que afectan de forma negativa la producción de la 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tales como desordenes intestinales, de hígado, riñón, paratiroides y genéticos, consumo de alcohol y drogas, edad y diferencias en género. La deficiencia de vitamina D resulta en una inadecuada absorción intestinal y renal de calcio y fósforo. Como consecuencia, sus niveles caen y la actividad de la fosfatasa alcalina sérica y los niveles de PTH se incrementan ocasionando la desmineralización ósea que termina en raquitismo en niños y osteomalacia en adultos. Los síntomas clásicos asociados son piernas arqueadas, curvatura de la espina dorsal, deformaciones en pelvis y tórax, como resultado del estrés mecánico del hueso desmineralizado.

#### Toxicidad

La hipervitaminosis D es una intoxicación progresiva que varía según la susceptibilidad de los individuos y que puede aparecer si se sobrepasan las dosis máximas diarias recomendadas. Los síntomas incluyen hipercalcemia, hipercalciuria, anorexia, sordera, náuseas, vómitos, sed, alergia, debilidad muscular, poliuria, etc<sup>14</sup>.

## Análisis

### Espectroscopia UV

La primera técnica disponible para la cuantificación de vitamina D fue la medición de la absorción UV a 265nm, debido al sistema trieno conjugado que muestra características de absorción. Esta técnica es rápida y sencilla, sin embargo, presenta la desventaja que la muestra a analizar debe ser purificada escrupulosamente para eliminar interferencias y sobreestimación causados por contaminantes.

### Métodos por técnicas colorimétricas

Se han utilizado diversos métodos aplicando técnicas colorimétricas, la mayoría se basa en la isomerización de vitamina D a isotaquisterol. Debido a que el método presenta problemas de sensibilidad, se utiliza para determinar principalmente el contenido en preparaciones farmacéuticas.

### Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

La vitamina D es aislada de matrices complejas por métodos de extracción de lípidos totales. Durante numerosos años, una variedad de técnicas cromatográficas han sido utilizadas para separar la vitamina D y sus 37 metabolitos. Algunas de estas técnicas se realizan en papel o en capa fina, usualmente requieren largos tiempos de desarrollo, se obtienen resoluciones insatisfactorias y tienen una limitada capacidad. Las columnas que típicamente se han usado como soporte para separar mejor los compuestos de vitamina D son alúmina, Floridin, celita y sílica. Sin embargo, ninguno de estos métodos es capaz de lograr una buena resolución entre la vitamina D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>. La cromatografía de gases es capaz de separar estos dos compuestos pero en el proceso la vitamina es convertida a pirocalciferol e isopirocalciferol. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), ha sido la mejor técnica para la separación de la vitamina D y sus metabolitos ya que es rápida y proporciona un buen recobro con alta resolución; además, se ha convertido en el mejor procedimiento para separar compuestos moleculares en diferentes áreas, incluyendo la determinación analítica de vitamina D y sus metabolitos. El proceso de separación tiene una alta resolución y sensibilidad dependiendo del detector utilizado. La mayoría de los procedimientos publicados utilizan un detector UV. Sin embargo, si se utiliza un espectrómetro de masas acoplado al cromatógrafo de líquidos, se pueden obtener los patrones de fragmentación de los compuestos, con lo que se tienen métodos de análisis más sofisticados y con mayor selectividad y sensibilidad. Además de lo mencionado, la CLAE reduce el trabajo manual y disminuye los tiempos requeridos para la separación.

## Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia<sup>15, 16</sup>

La técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) ha existido desde hace más de 35 años, actualmente es una de las técnicas de separación más utilizada en determinaciones analíticas tanto en laboratorios de investigación como en la industria, ya que reúne varias características de interés, entre ellas destacan el poder alcanzar niveles de detección en el orden de trazas (hasta ppm), la posibilidad de realizar tanto análisis cualitativo como cuantitativo con alta precisión y, alta resolución en la separación de los compuestos de matrices complejas.

### Definición

Es una técnica de separación física/fisicoquímica que consiste en la introducción de un volumen pequeño de muestra líquida, dentro de una columna empacada con partículas porosas (fase estacionaria), los compuestos de la muestra son trasladados a alta presión a través de la columna por la fase móvil desplazada con ayuda de una bomba. Los compuestos son separados uno de otro por interacciones entre las moléculas y la fase estacionaria, un detector determina cuando han salido de la columna.

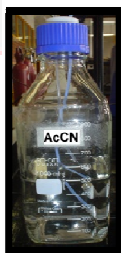
La CLAE es una de las mejores técnicas para analizar compuestos no volátiles o térmicamente inestables o susceptibles al calor, por ejemplo, fármacos, sales, proteínas, polímeros, hidrocarburos pesados, productos naturales, trinitrotolueno, enzimas, etc.

### Instrumentación

Un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia está constituido esencialmente por los siguientes componentes:

#### Fuente de fase móvil

Es el recipiente que contiene la fase móvil. Usualmente se utilizan frascos de vidrio o polímero resistente con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales. En el extremo del tubo de salida del solvente se conecta un filtro de acero, teflón o vidrio con 2 ó 10µm de porosidad para impedir el ingreso de partículas hacia la bomba.



**Fig. 2.7.** Frasco de vidrio, fuente de fase móvil (izquierda) y filtro (derecha).

En CLAE es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con sólo una columna variando la composición de la fase móvil. No todos los solventes son apropiados para ser utilizados en CLAE, deben cumplir con los siguientes requisitos:

- Alto grado de pureza.
- Alto poder solubilizante para los compuestos de interés.
- Baja reactividad (inerte).

- Compatibilidad con el detector utilizado.
- Adecuado punto de ebullición.
- Baja viscosidad.
- Seguro y no tóxico.

La fase móvil debe desgasificarse ya que el aire disuelto (oxígeno y nitrógeno) puede producir ciertos inconvenientes, entre ellos destacan la liberación de burbujas en el cabezal de la bomba y en la celda del detector, oxidación de analitos y variaciones en algunos detectores. Entre los métodos de desgasificación se encuentran los siguientes:

- ↻ Reflujo.
- ↻ Filtración con vacío.
- ↻ Ultrasonido.
- ↻ Burbujeo de un gas inerte.
- ↻ Membranas.



**Fig. 2.8.** Desgasificador de gas inerte. Izquierda, manómetro para controlar presión y caudal del gas inerte. Derecha, tanque contenedor del gas (He).

### Bomba

La bomba es una pieza crítica para el buen funcionamiento del cromatógrafo. Impulsa la fase móvil del reservorio del solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna. Debe presentar las siguientes características:

- Flujo constante y libre de pulsaciones (ruido).
- Amplio intervalo de caudal y exactitud del mismo.
- Bajo volumen muerto.
- Control de la presión máxima de operación (sistema de corte).
- En el caso de realizar gradiente, tener una buena precisión y exactitud en la mezcla de solventes.

Las bombas están construidas de materiales resistentes al ataque químico y al desgaste mecánico. Básicamente existen dos tipos de bombas: neumáticas y mecánicas, estas últimas a su vez se dividen en dos tipos: de pistón (bombas reciprocantes) y de desplazamiento continuo (bomba de tornillo). De las mecánicas las primeras son de uso más difundido, versátiles y fáciles de usar.



**Fig. 2.9.** Bomba mecánica de pistón. Módulo completo (Izquierda). Cabezales de bombas de pistones reciprocantes (Derecha).

Durante el análisis cromatográfico, la bomba debe proveer la fase móvil de composición o poder de elución constante (isocrático) o modificada con el tiempo (gradiente de elución), a través del incremento o disminución en la proporción de los componentes de la mezcla que conforme a la fase móvil, esto último permite mejorar la resolución de los picos cromatográficos y reducir el tiempo de análisis. Se recurre al cambio del poder de elución cuando la modalidad isocrática no es suficiente para resolver todos los picos o

cuando los compuestos de la muestra son muy diferentes en sus propiedades físicas y químicas. Para realizar gradientes los equipos utilizan mezcladores y existen dos tipos:

- ⊗ Mezcladores de baja presión. Generalmente se emplea una bomba y con la ayuda de válvulas solenoides se realiza la mezcla de los solventes en una pequeña cámara antes de la bomba. Se pueden mezclar de 2 a 4 disolventes, presentan bajo ruido de mezclado, y representa un menor costo, sin embargo, requiere una buena desgasificación de los solventes para lograr alta reproducibilidad.
- ⊗ Mezcladores de alta presión. Utilizan una bomba de alta presión por cada solvente que se quiera mezclar para formar la fase móvil, la mezcla se realiza a alta presión en una cámara que se encuentra posterior a las bombas siendo dirigido hacia el sistema. Permite cambios rápidos en la composición (por ejemplo, 100% A - 100% B) con mayor precisión, es costoso, y requiere un mezclador adicional para disminuir el ruido de mezclado.



**Fig. 2.10.** Mezclador cuaternario de baja presión (Izquierda). Fuente de fase móvil, desgasificador y mezclador conectados (Derecha).

### Sistema de introducción de muestra

Los sistemas de inyección permiten la introducción de la muestra sin interrumpir el caudal. Sus principales características son:

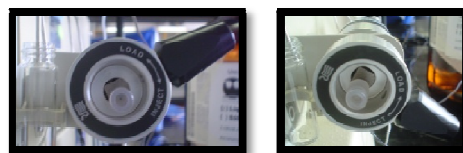
- Buena precisión de los volúmenes de inyección.
- Bajos efectos de memoria y dilución de muestra.
- Capacidad de tomar muestras viscosas y de inyectar volúmenes variables.
- Inerte al ataque químico, capaz de soportar altas presiones y fácil de operar.

Consta de un cuerpo fijo, un rotor que facilita los cambios de posición de la válvula, una válvula usualmente de seis vías que dirige el caudal hacia la columna y una tubería ("loop") que contiene la muestra. La inyección se realiza en dos pasos, en el primero, denominado carga, la fase móvil pasa directamente a la columna y la muestra es aspirada por vacío (en sistemas automatizados) o introducida por una jeringa (en sistemas manuales) dentro del "loop". En el segundo, la válvula es colocada en posición de inyección donde la muestra es removida del "loop" incorporándose al caudal dirigido hacia la columna. Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente (se utiliza cuando se tienen numerosas muestras por analizar o cuando la inyección manual no es práctica). La calidad de la separación en la columna también depende de la calidad de la inyección.

Tipo	Ventajas	Desventajas
Manual	Más utilizados, baratos.	La derivatización en línea es más complicada, limpieza de la jeringa manual.
Automático	Alta reproducibilidad, flujo constante, completamente automatizable, reduce tiempo y trabajo del analista.	Equipo costoso.



**Fig. 2.11.** Microjeringa, complemento del sistema de introducción de muestra.



**Fig. 2.12.** Inyector manual de seis vías. Posición de carga (Izquierda) y, de inyección (Derecha).

### Sistema de separación

El sistema de separación está constituido por una columna elaborada de acero inoxidable, vidrio ó polímeros resistentes de 5, 15 y 25cm de longitud y de 1 a 4,6mm de diámetro interno; en cuyo interior se encuentra la fase estacionaria empacada con partículas porosas pequeñas de 5-25 $\mu$ m, donde se realiza la separación de los compuestos de una muestra utilizando varios parámetros físicos y fisicoquímicos. El proceso de retención de los analitos es determinado por la elección de la fase estacionaria y de la fase móvil. Cuando la muestra y la fase móvil se introducen en el sistema de separación se realizan diferentes tipos de interacciones entre cada uno de los compuestos, las cuales son responsables de la afinidad de cada compuesto por la fase móvil o la fase estacionaria. El compuesto con mayor afinidad a la fase estacionaria se retendrá más y eluirá después que los compuestos con menor afinidad. Para cada compuesto se establecerá un equilibrio entre la especie contenida en la fase móvil y la especie interaccionando con la fase estacionaria. Las principales modalidades de separación son:

#### *Fases químicamente unidas*

La partícula base se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos por grupos funcionales que proporcionan determinadas características de polaridad. Dependiendo de la polaridad de los grupos funcionales unidos, se clasifica en:

**Fase normal.** También llamada cromatografía de adsorción, se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o alúmina microporosas y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil, por ejemplo hexano y acetato de etilo. Útil para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y para isómeros posicionales con sustituyentes polares. El proceso de adsorción está gobernado por interacciones específicas, las más representativas son: interacción dipolo-dipolo, por puente de hidrógeno, mecanismos de transferencia de carga, formación del complejo  $\pi$ .

**Fase inversa o reversa.** En la actualidad, es el modo más utilizado. La fase estacionaria es no polar o menos polar que la fase móvil. La partícula de fase ligada está compuesta por un material base (silicagel, alúmina, agarosa, copolímero de estireno y divinilbenceno, etc.) que se modifica químicamente con un compuesto que contiene un grupo funcional determinado (octadecil, octil, fenilo, nitrilo, amino, diol, etc.) para reemplazar sus grupos funcionales activos de características polares. Para que durante el proceso cromatográfico se produzca una diferenciación entre las moléculas de analito y las de la fase móvil, la superficie del adsorbente debe funcionar como un receptor de



las moléculas de analito. El principal mecanismo de retención está dado por la partición del soluto en la fase móvil y en la fase estacionaria, también pueden tener lugar interacciones de adsorción y un proceso mixto de adsorción y partición.

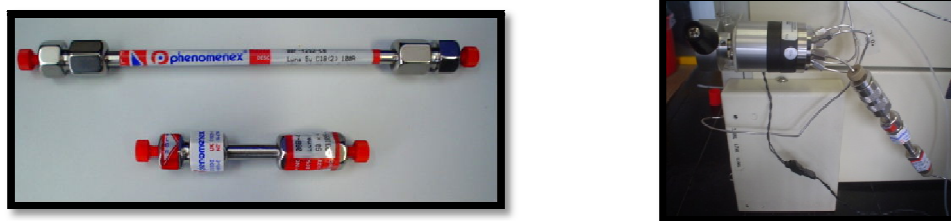
Esta técnica puede ser usada para analizar compuestos no polares, polares, ionizables y moléculas iónicas. Los materiales de fase reversa han tenido una diversa aplicación y largos tiempos de vida media. Además, presentan buena reproducibilidad entre lotes, bajos tiempos de equilibrio, alta estabilidad mecánica y, tiempos y orden de retención predecibles.

### *Intercambio iónico*

La fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos (por ejemplo, sulfatos o tetraalquilamonio) y retiene el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo por un proceso reversible con iones de la fase móvil, que generalmente es una solución acuosa de pH y fuerza iónica controlados. El proceso se denomina de intercambio aniónico si el analito tiene carga negativa y catiónico si tiene carga positiva. Esta técnica es utilizada para la separación de aniones y cationes inorgánicos y orgánicos en disolución y para separar sales de colorantes iónicos, aminoácidos y proteínas. Los materiales utilizados en cromatografía de intercambio iónico, comparados con los de fase reversa, tienen menor tiempo de vida media, son menos estables mecánicamente y toman considerable tiempo para estabilizarse. Estas columnas tienen aplicaciones limitadas en análisis de alimentos.

### *Exclusión molecular*

Teóricamente no existe interacción entre las moléculas de la muestra y la fase estacionaria. La separación está basada en las diferencias de tamaño de las moléculas que constituyen a la muestra, los analitos difunden dentro de los poros de las partículas de un gel, formadas por un polímero (poliestireno, poliacrilamida, agarosa, sílica porosa, etc.) con mayor o menor grado de entrecruzamiento, los compuestos de mayor peso molecular son menos retenidos debido a que migran a través de los canales formados entre las partículas que son mayores que los poros de las mismas, las moléculas de menor peso acceden al interior de los poros por lo que se retienen más. Esta técnica trabaja con dos modalidades: permeación en gel, para el análisis de compuestos no acuosos, y filtración en gel, para compuestos hidrosolubles. La cromatografía de exclusión molecular es usada para el cálculo de pesos moleculares promedio de macromoléculas, limpieza de muestras y, fraccionamiento y aislamiento de compuestos de bajo peso molecular a partir de muestras que contienen mezclas de compuestos de varios pesos moleculares.



**Fig. 2.13.** Izquierda, columnas analíticas de longitud 15cm y 5cm marca Phenomex®. Derecha, columna conectada al instrumento.

## Detector

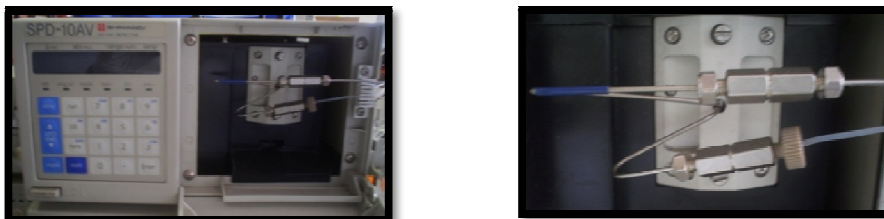
El detector es la parte del instrumento que percibe y ubica en tiempo y espacio la posición de las moléculas que provienen de la columna de manera continua. Este debe generar un fenómeno físico ya sea de los compuestos o de la fase móvil y medirlo de manera continua. Además de lo anterior debe cumplir también las siguientes características:

- Amplio rango dinámico de respuesta.
- Poseer respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumna.
- Tener sensibilidad apropiada.
- Poseer buena relación señal ruido.
- Tener constante de tiempo baja.

Se clasifican en generales, que miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito comparada con la misma fase móvil pura; y, detectores selectivos, que son sensibles a alguna propiedad del soluto. Los detectores utilizados en CLAE son:

- UV/Vis: detecta compuestos orgánicos con insaturaciones, diénicos, carbonílicos  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturados, aromáticos y sustituidos con grupos funcionales que contengan grupos carbonilo. Es el más utilizado, tiene la capacidad de confirmar la presencia de ciertos compuestos, sus metabolitos y derivados. Posee buena sensibilidad e intervalo lineal, no destructivo, puede emplearse en modalidad de gradiente, poco sensible a los cambios de caudal y temperatura.
- Fluorescencia: se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia "natural" o conferida por derivatización. Utiliza una longitud de onda de excitación y otra de emisión. Presenta alta selectividad y sensibilidad.
- Índice de refracción: mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es universal, no destructivo, poco sensible, se afecta con el cambio de la temperatura, no se utiliza en modalidad de gradiente.
- Conductímetro: mide la conductividad específica del efluente proveniente de la columna, los compuestos de la muestra generan un cambio en la conductividad del efluente y de esta manera son detectados. Su respuesta es lineal, dependiente de la temperatura y susceptible a los cambios de flujo de la fase móvil por lo que trabaja mejor en modo isocrático; selectivo, es utilizado principalmente en cromatografía de intercambio iónico.
- Electroquímico: detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, emplea tres electrodos, el de trabajo, de referencia y el auxiliar. Requiere que la fase móvil sea conductiva, es destructivo, muy sensible y altamente selectivo.
- Sistemas acoplados: como el espectrómetro de masas que detecta casi cualquier tipo de sustancia desde átomos hasta moléculas de 150 000Da, posee alta

sensibilidad, es una técnica universal; la fase móvil puede interferir con el proceso de ionización.



**Fig. 2.14.** Detector UV-Vis, módulo completo (Izquierda). Celda flujo continuo (Derecha).

### Sistema de registro

Convierte la señal proveniente del detector en un gráfico conocido como cromatograma de cuya interpretación se obtienen ciertos parámetros que permiten realizar análisis cromatográficos. Para que el sistema de registro proporcione los datos deseados, conviene definir lo que debe de integrar de acuerdo a algoritmos matemáticos específicos. El sistema de registro puede ser un integrador ó una computadora.



**Fig. 2.15.** Integrador.

### **Análisis Cromatográficos**

Como ya se ha mencionado, esta técnica permite realizar determinaciones analíticas cualitativas y cuantitativas. Es necesario tener presente que inicialmente, se debe conocer el objetivo del análisis sobre una muestra así como la procedencia y tratamiento de la misma. Antes de explicar cada tipo de análisis es necesario conocer la información que proporciona un cromatograma.

### Cromatograma y parámetros cromatográficos

Un cromatograma es un gráfico de la respuesta del detector en función del tiempo de avance de la corrida. Comienza en el momento en que la solución de ensayo es inyectada. A continuación se muestra un cromatograma, los datos que se pueden extraer de él y los parámetros que brindan información importante en el análisis.

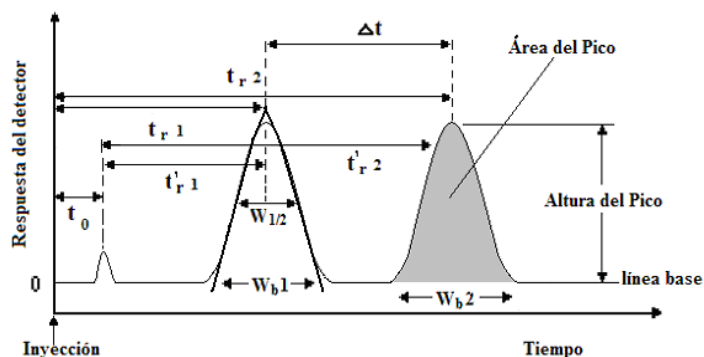


Fig. 2.16. Cromatograma

**Características del pico cromatográfico.** Cada pico representa por lo menos un compuesto constituyente de la muestra. El pico tiene una distribución normal por lo que sigue un comportamiento gaussiano. Se trazan dos líneas tangentes a los puntos de inflexión del pico cromatográfico. Todos los datos que proporciona el registrador se basan en el triángulo trazado.

- ◆ **Línea base.** Es la señal eléctrica que genera la fase móvil cuando sale de la columna en ausencia de algún analito que sea detectado. Sobre el gráfico, es la línea recta dibujada paralela al tiempo.
- ◆ **Tiempo muerto ( $t_0$ ).** Tiempo que tarda en trasladarse una molécula que no interacciona con la fase estacionaria y que es percibida por el detector a través del sistema.
- ◆ **Tiempo de retención ( $t_r$ ).** Tiempo que tarda en eluir una molécula que sí interacciona con la fase estacionaria. Se mide a partir de la inyección hasta el punto de máxima señal del pico cromatográfico.
- ◆ **Ancho de la base ( $W_b$ ).** Es la diferencia entre las intersecciones de las líneas tangentes a los puntos de inflexión del pico y la línea base. Se mide en unidades de tiempo
- ◆ **Ancho de la mitad de la altura del pico ( $W_{1/2}$ ).** A la mitad de la altura del triángulo, es la diferencia entre las intersecciones de las líneas tangentes a los puntos de inflexión del pico y la línea base.
- ◆ **Área (A).** Es la superficie calculada para el triángulo formado, la punta compensa la base. Permite determinar la concentración de cada compuesto por separado.
- ◆ **Altura (h).** Es la distancia entre la línea base y la punta del triángulo.

Con estos datos se pueden calcular ciertos parámetros:

- ◆ **Tiempo de retención corregido ( $t_r'$ ).** Es el tiempo real de interacción entre un compuesto y la fase estacionaria ya que se elimina el tiempo de traslado de las moléculas a lo largo del sistema. Experimentalmente se calcula mediante la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto.

$$t_r' = t_r - t_0$$

- ◆ **Eficiencia (N).** Da una idea general de qué tan bueno es el sistema para separar los componentes por medio del número de platos teóricos, que pueden definirse como los puntos donde se equilibra el sistema. Se calcula para inspeccionar la

columna y para saber cómo se comportan los compuestos de interés con respecto a la fase estacionaria. En la práctica se calcula con la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left( \frac{t_r'}{W_b} \right)^2 = 5,545 \left( \frac{t_r'}{W_{1/2}} \right)^2$$

En ocasiones se prefiere usar la ecuación donde se maneja  $W_{1/2}$  ya que se observa menor variación en los resultados. En el cromatograma la eficiencia se observa a través de la delgadez del pico, una columna tendrá mayor eficiencia cuanto más delgados sean los picos.

- ◆ **Factor de capacidad ( $k'$ ).** Representa la relación entre la cantidad de soluto en la fase estacionaria y la cantidad de soluto en la fase móvil.

$$k' = \frac{\text{Cantidad de soluto en la fase estacionaria}}{\text{Cantidad de soluto en la fase móvil}}$$

Este parámetro se relaciona con la  $K_{eq}$  por medio de un factor  $\beta$ , llamado relación de fases, que representa el cociente del volumen de la fase móvil entre el volumen de la fase estacionaria.

$$\beta = \frac{\text{volumen de la fase móvil}}{\text{volumen de la fase estacionaria}}$$

Si se conoce el valor de la relación de fases, al multiplicarlo con el factor de capacidad se puede obtener  $K_{eq}$ :

$$K_{eq} = \beta k'$$

Experimentalmente,  $k'$  es el cociente entre el tiempo que permanece el soluto en la fase estacionaria y el tiempo que permanece en la fase móvil<sup>17</sup> y se calcula con la ecuación:

$$k' = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

La eficiencia está condicionada a un valor de  $k'$  que debe incluirse en un intervalo de 5-10 para columnas empacadas lo que indica que se tienen 2 000 a 3 000 platos teóricos por metro, si se tiene un valor menor a 5 significa que los compuestos no usaron una cantidad aceptable de platos teóricos, y si se tiene un valor mayor a 10 indica que los picos presentan ensanchamiento generado por fenómenos diferentes a la retención.

- ◆ **Selectividad ( $\alpha$ ).** Da una idea de la afinidad de los compuestos con respecto a la fase estacionaria. En el cromatograma se observa a través de la diferenciación de picos, una fase estacionaria es más selectiva si se logran distinguir más picos en una misma zona. Experimentalmente se calcula como el cociente entre los tiempos de retención corregidos ó los factores de capacidad de un par de picos. Siempre se divide el  $t_r'$  del compuesto que tardó más en eluir entre el que tardó menos, por lo que el valor de  $\alpha$  debe ser mayor o igual a uno.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{r_2}'}{t_{r_1}'}$$

- ◆ **Resolución ( $R_s$ ).** Es una medida cuantitativa de la separación de dos picos. Es el parámetro que se debe calcular en cualquier análisis para asegurar la separación. De acuerdo a una serie de estudios estadísticos basados en las características

gaussianas del pico, el valor de  $\sigma$  se obtiene al aplicarle raíz cuadrada a la varianza, que es determinada por la medición de la anchura del pico a una fracción fija de la altura del pico. Cuando se tiene  $\Delta t = 6\sigma$  se tendrá una resolución de 1,5 que indica una separación de por lo menos un 99,73%. Experimentalmente se calcula por medio de la ecuación:

$$R_s = \frac{2(\Delta t_r')}{(W_{b_2} + W_{b_1})}$$

La resolución se relaciona con los parámetros mencionados a través de una ecuación establecida teóricamente considerando estos factores:

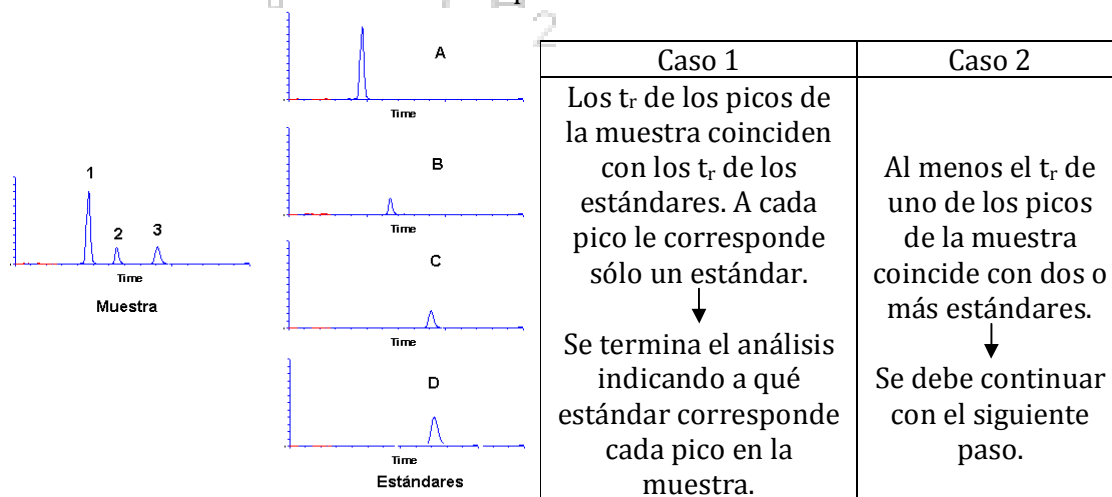
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k'}{1 + k'}$$

Esta ecuación a grandes rasgos indica que al elegir una buena columna (eficiencia), una buena fase estacionaria donde los solutos sean afines a ella (selectividad) y, si las condiciones cromatográficas de fase estacionaria y fase móvil elegidas por el analista son adecuadas (factor de capacidad), se tendrá una buena resolución

### Análisis Cualitativo.

Este tipo de análisis permite conocer la identidad de algún compuesto presente en la muestra en estudio. En cromatografía se realiza utilizando los tiempos de retención de cada compuesto y siguiendo una serie de pasos:

**Paso 1. Comparación de los tiempos de retención.** Una vez obtenido el perfil cromatográfico de la muestra en estudio, se comparan los tiempos de retención de sus analitos con estándares, como ya se mencionó, previamente se debe tener una idea de los compuestos que se encuentran presentes en la muestra para determinar los estándares a utilizar. La muestra y los estándares se deben inyectar a las mismas condiciones. En base a los resultados se pueden tener dos casos:



**Fig. 2.17.** Ejemplo de comparación de tiempos de retención.

En la fig. 2.17 se observa que al pico 1 de la muestra le corresponde el estándar A, al pico 2 el estándar B, pero el pico 3 coincide con los estándares C y D, por lo que se debe continuar con el paso 2 para discernir entre los estándares cual de ellos corresponde al compuesto presente en la muestra.

**Paso 2. Adición a la muestra.** Se añaden a la muestra en pequeñas cantidades los estándares que podrían corresponder al pico en cuestión, y se observa si se tiene una deformación en el pico o no con crecimiento del mismo, en el ejemplo de la fig. 2.21 se añadirían a la muestra los estándares C y D por separado. Nuevamente se tendrán dos casos:

Caso 1	Caso 2
El pico crece simétrico y sin deformarse con C y se deforma con D.	El pico se deforma con ambos estándares.
↓	↓
Se puede concluir que el compuesto de la muestra y del estándar C son el mismo.	Esto indica que co-eluyen pero no son el mismo compuesto, esto es, son compuestos que tienen afinidad similar a la fase estacionaria.
↓	↓
Se termina el análisis indicando a qué estándar corresponde cada pico en la muestra.	Se debe continuar con el siguiente paso.

**Paso 3. Comparación con dos o más fases estacionarias.** Se cambia de fase estacionaria, con esto se busca modificar los equilibrios y en consecuencia la elución de los compuestos. Al cambiar la columna, se debe iniciar el análisis desde el paso 1. Si se tuviera el caso 2 del paso 2, nuevamente se tendría que cambiar la columna y repetir el procedimiento. Si no se lograra identificar el pico en cuestión, se proseguiría con el siguiente paso.

**Paso 4. Cromatografía preparativa.** Se trata de un sistema cromatográfico de mayores dimensiones, consta del mismo instrumental pero el sistema de introducción de muestra y la columna tienen mayor capacidad para introducir cantidades mayores de muestra, se utiliza para aislar a los compuestos que no pueden analizarse con los puntos anteriores. Una vez aislados se envían a otros sistemas de análisis cualitativo como infrarrojo, resonancia magnética nuclear, etc.

Actualmente además se cuenta en la técnica de cromatografía con sistemas acoplados con técnicas cualitativas como Espectrometría de Masas, Espectroscopia Infrarroja y Espectroscopia RMN, siendo la más vendida en el caso de CLAE el acoplamiento a Espectrometría de Masas. Cuando se tienen estos sistemas, no es necesario realizar los pasos anteriores, a excepción del paso 1, ya que además de contar con los tr para comparar se contará también con el Espectro de Masas, pudiendo comparar éste también con el de los estándares.

La desventaja del análisis cualitativo es que se debe de contar con los estándares requeridos, o bien, poseer un cromatógrafo con un sistema acoplado de detección y con el experto para deducir la estructura que da dicha información; lo que representa un incremento en los costos del análisis.

### Análisis cuantitativo.

Permite determinar la cantidad de los compuestos analizados, los datos que se usan para hacer análisis cuantitativo son la altura ó el área del pico cromatográfico, esta última es la más utilizada ya que se obtiene mejor precisión en los resultados. Los métodos de cuantificación más utilizados son:

- 1. Normalización.** Es el cálculo de la composición porcentual de cada compuesto en la muestra. Se suman todas las áreas de los compuestos que salen en el cromatograma, obteniendo lo que se considerará como área total ( $A_T$ ), posteriormente se divide cada área entre esa área total y con base en esto se calculan los porcentajes de cada compuesto. Pero este método debe cumplir que los compuestos generen una respuesta semejante en el sistema cromatográfico.
- 2. Normalización con factor de corrección.** Se basa en el mismo principio que la normalización, pero se utiliza un factor de corrección establecido para corregir la variación de la respuesta generada de cada compuesto en el detector. El área de cada compuesto se multiplica o divide con respecto al factor de corrección, y se realiza el mismo procedimiento matemático que en el método de normalización. Este método debe de seguir cumpliendo la parte de que todos los compuestos que forman a la muestra sean introducidos al sistema, sean separados y sean detectados por el sistema cromatográfico.
- 3. Estándar externo ó calibración absoluta.** En el caso de cromatografía este método está basado en la aplicación del término Factor de respuesta ( $Fr$ ), que por definición es:

$$Fr = \text{Área} / \text{Concentración}$$

Se reordena esta ecuación para construir una curva de calibración con estándares del analito de interés a concentraciones conocidas cuyo incremento debe ser constante a lo largo del intervalo, una vez construida la curva (área en función de concentración), se espera obtener una tendencia lineal y así conocer la ecuación de la recta de donde se extrae el valor de la pendiente que en el caso de cromatografía es el valor del factor de respuesta ( $Fr$ ) y se calcula la concentración del analito, despejando la incógnita de la ecuación reordenada:

$$A = FrC$$

Se debe buscar que la concentración del analito en la muestra caiga en la zona centroide del intervalo.

- 4. Estándar interno ó calibración relativa ó indirecta.** En el caso de cromatografía este método está basado en la aplicación del término Factor de respuesta relativo ( $Fr_r$ ), que por definición es:

$$Fr_r = Fr \text{ del compuesto} / Fr \text{ del estándar interno}$$

Al desdoblarse la definición del  $Fr$  para cada caso y reordenando la ecuación para construir una curva de calibración con estándares como en el método de estándar externo (cuyo incremento debe ser constante a lo largo del intervalo), pero en las disoluciones de cada estándar se adiciona una misma cantidad conocida de estándar interno. Para construir la curva de calibración se grafica el



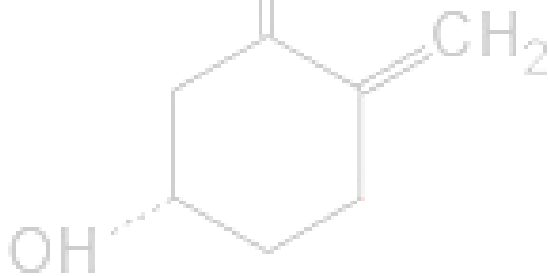
área relativa (Área del compuesto/Área del estándar interno) en función de la concentración relativa (Conc. del compuesto/Conc. del est. interno) y se espera que ésta tenga una tendencia lineal, y así conocer la ecuación de la recta de donde se extrae el valor de la pendiente que en el caso de la cromatografía es el valor del factor de respuesta relativo ( $Fr_r$ ) y se calcula la concentración del analito, despejando la incógnita de la ecuación reordenada:

$$\frac{A_{\text{compuesto}}}{A_{\text{estándar interno}}} = Fr_r \frac{C_{\text{compuesto}}}{C_{\text{estándar interno}}}$$

El compuesto utilizado como estándar interno debe cumplir con ciertas características, entre ellas las dos más importantes y que deben cumplirse de manera obligatoria son que el compuesto utilizado no se encuentre presente en la muestra a analizar y que se coloque a la misma concentración tanto en las disoluciones estándar como en la disolución de la muestra que se inyecta al cromatógrafo.

Este método se utiliza para mejorar la precisión del sistema de introducción de muestra en cromatografía.

- 5. Adición patrón.** En este método se construye una curva de calibración a la que se añade una cantidad constante de la muestra a las disoluciones de los estándares y a un blanco. Este método se realiza para evaluar si existen fenómenos de matriz o cuando se trabaja en el límite de cuantificación del instrumento.



## Validación<sup>18, 19</sup>

El aseguramiento de la calidad describe el conjunto de actividades planteadas y sistemáticas que lleva a cabo una empresa, con el objeto de brindar confianza de que un producto o servicio cumple con los requisitos de calidad específicos<sup>20</sup>. Dentro de estas actividades se incluye la validación de técnicas, métodos y documentación entre varios procedimientos más. El objetivo principal de un procedimiento analítico es la generación de información cualitativa, cuantitativa o estructural sobre cualquier tipo de materia o sistema<sup>21</sup>. Debido a que la calidad de los datos producidos es fundamental, la validación es una herramienta importante en el análisis químico.

### Definición

Validación es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos<sup>22</sup>. Normas nacionales e internacionales establecen que la validación es uno de los requisitos técnicos que los laboratorios deben cumplir para demostrar que operan un sistema de calidad, son competentes y son capaces de generar resultados técnicamente válidos.

La validación de un instrumento o sistema es imprescindible antes de validar la metodología analítica en la que va a ocuparse dicho instrumento. En un proceso de análisis hay fuentes de error inherentes, por lo tanto, es importante que éstos y los elementos que intervienen en el análisis se eliminen o controlen antes de iniciar el proceso de validación.

El sistema y el método deben ser validados cuando es necesario verificar que sus parámetros son adecuados para el uso en un problema analítico particular<sup>21</sup>. Su objetivo principal es garantizar que el sistema, método y lugar donde se implementan son capaces de lograr resultados rutinarios dentro de las especificaciones del método y que sus resultados son confiables. La validación se considera distinta a las actividades realizadas en forma habitual, es decir, no es necesario llevarla a cabo cada vez que se vaya a utilizar la técnica o el método pero sí se realiza a intervalos periódicos planteados en el sistema de calidad del laboratorio e informa qué desempeño se puede esperar que proporcione a futuro dicho método o sistema. La validación de cada ensayo o de cada método de prueba debe realizarse caso por caso, para asegurar que los parámetros son apropiados para el uso que se pretende. Debe plantearse primero la aplicación y el objetivo que persigue el método y con base a estos criterios, seleccionar qué parámetros deben ser validados. Se hace uso de una serie de pruebas que al mismo tiempo que comprueban cualquier suposición en la que el método analítico se basa, también establecen y documentan los parámetros del desempeño del método o sistema. Los parámetros de desempeño típicos considerados en un ensayo de validación son:

- ◆ **Condiciones óptimas de trabajo.**
- ◆ **Confirmación de identidad.**
- ◆ Selectividad/Especificidad.
- ◆ **Linealidad de sistema.**
- ◆ Linealidad de método.
- ◆ **Precisión de sistema.**
- ◆ Precisión de método (repetibilidad, reproducibilidad).
- ◆ Exactitud.
- ◆ Recobro.

- ◆ Sensibilidad.
- ◆ Límites de detección y cuantificación.
- ◆ **Estabilidad de estándares y muestra.**
- ◆ Robustez/Desigualdad.
- ◆ Etc.

Se puede prescindir de la evaluación de algunos parámetros dependiendo del método utilizado. En este trabajo se determinaron los parámetros remarcados con **negrillas** para validar el sistema cromatográfico en estudio.

La parte medular de la validación es la aplicación de toda una serie de fórmulas y criterios para el manejo de los datos que se obtienen en el laboratorio al hacer un análisis o experimento de manera repetida. El agrupamiento, manejo y evaluación de los mismos arroja resultados que se han uniformizado para poder establecer con base en ellos, si un método o técnica son válidos o no. En el proceso de asignar un valor determinado a un criterio se requieren operaciones tales como repetir las mediciones de los parámetros, comparar unos resultados con otros y confirmar o rechazar hipótesis, siendo la estadística una herramienta fundamental para la extracción de información química. Las técnicas de estadística paramétrica son válidas y las más utilizadas.

Finalmente, la documentación es la manera de presentar, mantener y conservar los resultados de la validación. A continuación se describirán los parámetros evaluados en este trabajo, mencionando el tratamiento estadístico requerido en cada uno de ellos.

### **Condiciones óptimas de trabajo**

Para todos los métodos analíticos se recomienda la evaluación de la aptitud del sistema ya que permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales. Los fabricantes de instrumentos o sistemas de medición generalmente suministran especificaciones y procedimientos escritos, además, existen normas y publicaciones para técnicas específicas de análisis que guían al analista a seleccionar las condiciones óptimas de operación para el mejor desempeño del sistema de medición.

### **Confirmación de identidad**

Es necesario establecer que la señal producida en la etapa de medición u otra propiedad medida, sea sólo debida al analito y no a la presencia de algo química o físicamente similar o que se haya presentado como coincidencia. Generalmente, se realizan ensayos cualitativos, en cromatografía es común utilizar el tiempo de retención de los analitos para este tipo de análisis, así como la revisión de un blanco del sistema y del disolvente.

### **Linealidad de sistema**

La linealidad se refiere a la proporcionalidad entre los resultados del análisis, en este caso, la señal obtenida por la técnica instrumental y la concentración del analito en estándares dentro de un intervalo dado. La linealidad puede evaluarse mediante la inspección visual de una gráfica o curva de calibración de las señales como función de la concentración o contenido del analito. Lo habitual y más deseable es que la gráfica se aproxime a una línea recta, si hay una relación lineal, los resultados de la prueba pueden evaluarse mediante el cálculo de una línea de regresión con el método de mínimos

cuadrados, el cual define que la relación funcional entre dos variables con comportamiento lineal, está descrita por la ecuación:

$$y = mx + b$$

Donde  $y$  es la variable dependiente,  $x$  la variable independiente,  $b$  el intercepto en el eje de las ordenadas y  $m$ , la pendiente de la línea. Lo que interesa es determinar si los dos valores están relacionados de manera proporcional, el coeficiente de correlación  $r$  es una medida cuantitativa de esta relación. En el caso de que en la técnica empleada la curva de calibración pase a través del origen (como se espera en la cromatografía), el valor de la ordenada debe ser cero. Para decidir si se utiliza la ecuación designada para la técnica en cuestión o la ecuación de una línea recta se realiza un tratamiento estadístico mediante una prueba de hipótesis sobre la ordenada utilizando como estadístico de prueba la "t de Student". Para realizar la inferencia estadística se deben establecer las hipótesis a evaluar, para este procedimiento, se utilizan hipótesis relativas a una media ya que se desea demostrar que el resultado experimental es igual o diferente a un valor de referencia, en este caso, interesa conocer si la ordenada es igual o no al cero. Para ello se establece la siguiente prueba de hipótesis:

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

$$H_1: b \neq \beta \text{ (Hipótesis alterna)}$$

Se calcula el valor experimental de la variable "t de Student":

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

donde:

$b$  = Ordenada al origen.

$\beta$  = Ordenada al origen poblacional.

$Se$  = Error típico de estimación.

$S_{xx}$  = Suma de cuadrados de la variable independiente.

$n$  = número de determinaciones.

$\bar{X}$  = Media experimental.

y del error típico de la estimación:

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

donde:

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

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

$$S_{xy} = n \sum_{l=1}^n X_l Y_l - \left( \sum_{l=1}^n X_l \right) \left( \sum_{l=1}^n Y_l \right)$$

En toda prueba de hipótesis se debe comparar el valor calculado contra algún valor de referencia obtenido de tablas con un nivel de significancia  $\alpha$ , es decir, el riesgo máximo

que se está dispuesto a correr, generalmente del 5% cuando se comienza un estudio, cuando no se pueden correr riesgos este se baja al 2 ó 1%, y en estimadores muy burdos se puede subir hasta 10%. Para esta prueba,  $t_{\alpha}$  es el valor de tablas de la “t de Student” con  $n-2$  grados de libertad, ya que los valores de  $m$  y  $b$  fueron remplazados por las estimaciones de mínimos cuadrados, como se trata de una prueba bilateral el valor de comparación es  $t_{\alpha/2}$ , y el criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

Al comparar los valores de  $t$  calculados y de tablas, se toma una decisión correspondiente al rechazo o aceptación de las hipótesis planteadas, y en consecuencia se llega a una conclusión del objetivo planteado al inicio de la prueba. Una vez que se establece en la validación que la función de calibración es lineal y se sabe qué ecuación aplicar para realizar el análisis cuantitativo, se puede utilizar una estrategia de calibración más sencilla como rutina.

### Intervalo de confianza sobre los valores de calibración (IC)

Se conoce comúnmente como cinturón de confianza y se usa cuando se desea saber si un punto de calibración está fuera de la recta y puede rechazarse como valor aberrante. Si un punto de la curva de calibración queda fuera del cinturón de confianza, se puede rechazar con un riesgo  $\alpha$ . El IC calculado sobre la pendiente se utiliza cuando se hacen análisis rutinarios, principalmente en áreas de control de calidad. El IC calculado sobre la ordenada se utiliza para confirmar que la ordenada pasa o no por el origen. A continuación se muestran las ecuaciones utilizadas para calcularlos.

- Intervalo de confianza para la ordenada ( $IC_b$ ).

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

- Intervalo de confianza para la pendiente ( $IC_m$ ).

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

### **Precisión de sistema**

Es el grado de concordancia entre resultados de pruebas independientes cuyos valores son obtenidos por mediciones repetidas de una magnitud bajo condiciones específicas. Es el componente aleatorio de la incertidumbre, depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios, no tiene relación con el valor verdadero, generalmente depende de la concentración del analito. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar ( $s$ ), la varianza ( $s^2$ ) o más comúnmente como el coeficiente de variación (CV) bajo condiciones específicas de medición. La precisión de un sistema o técnica (como es el caso de esta tesis) se evalúa preparando por lo menos siete disoluciones estándar a la misma concentración, cada una de ellas se analiza por quintuplicado, con los datos obtenidos se calculan los parámetros estadísticos requeridos. Es de suma importancia realizar el procedimiento siempre de la misma manera y bajo las mismas condiciones para no incrementar la dispersión. Una vez

obtenido el valor de dispersión experimental se prosigue con la prueba de hipótesis sobre este valor a través de una prueba “ji cuadrada”. Para realizar la inferencia estadística se utilizan hipótesis relativas a una varianza para saber si la dispersión de los resultados experimentales cumple determinada condición, en este caso, se desea saber si la varianza de los resultados es inferior a la varianza máxima aceptada, que está relacionada con el coeficiente de variación cuyo valor en análisis químicos, cuando no se tiene experiencia en el manejo de la técnica, típicamente debe ser inferior al 5%, en el caso de la técnica de cromatografía instrumental se exige que sea menor al 2% en validaciones alimentarias y farmacéuticas. Para desarrollar esta prueba se establecen las hipótesis a evaluar:

$$H_0: s^2 = \sigma^2 \quad (\text{hipótesis nula})$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2 \quad (\text{hipótesis alterna})$$

donde:

$s^2$  = Varianza obtenida experimentalmente.

$\sigma^2$  = Valor teórico de referencia obtenido del CV, por lo menos del 5%.

Se calcula el estadístico de prueba “ji-cuadrada” experimental con la ecuación:

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

donde:

n = Número de determinaciones.

$s^2$  = Varianza experimental.

$\sigma_o^2$  = Varianza máxima aceptada.

Posteriormente, se debe comparar el valor calculado contra algún valor de referencia obtenido de tablas con un nivel de significancia  $\alpha$  al 5%. Para esta prueba,  $\chi_{\alpha}^2$  es el valor de tablas con n-1 grados de libertad, como se trata de una prueba unilateral el criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

$$\chi_{cal}^2 > \chi_{\alpha, n-1}^2$$

Al comparar los valores de  $\chi^2$  calculados y de tablas, se toma una decisión correspondiente al rechazo o aceptación de las hipótesis planteadas y, en consecuencia se llega a una conclusión del objetivo planteado, donde se decide si el sistema es preciso con referencia al coeficiente de variación establecido al inicio de la prueba.

#### Intervalo de confianza sobre el valor de dispersión.

Se calcula para establecer si valores obtenidos de experimentos posteriores aún se encuentran dentro de los valores establecidos de precisión del sistema. En este caso se calcula el intervalo de confianza para la varianza al nivel de  $1 - \sigma$ , para  $\sigma^2$ :

$$\frac{(n-1)s^2}{\chi_{1-\frac{\alpha}{2}}^2} < s^2 < \frac{(n-1)s^2}{\chi_{\frac{\alpha}{2}}^2}$$

donde:

$\chi_{1-\frac{\alpha}{2}}^2$ ;  $\chi_{\frac{\alpha}{2}}^2$  = Valores de ji-cuadrada obtenidos de tablas.

## Estabilidad

Aunque la estabilidad de la solución o muestra analítica no es estrictamente un requisito de validación, es importante verificarla, ya que puede ser una fuente de error y variación en el método, principalmente en aquellos en que las muestras y/o estándares deben permanecer largos periodos de tiempo antes de ser analizados, como es el caso de las técnicas cromatográficas automatizadas, donde las muestras permanecen en el inyector durante varias horas. El tratamiento estadístico se realiza en dos etapas.

### Etapa I. Prueba de hipótesis relativa a dos varianzas.

Debido a que en mediciones químicas se obtienen estimadores de la media y varianza de muestras pequeñas, se realiza previamente una comparación entre las incertidumbres para conocer si son comparables a pesar del tiempo que ha pasado entre los análisis, a través de una prueba de hipótesis relativa a dos varianzas, que se utiliza cuando se comparan dos métodos, técnicas o experimentos. La comparación se realiza con una prueba "F de Fisher" como se describe a continuación, se establecen las pruebas de hipótesis a evaluar:

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

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

donde:

$s_1^2$  = Varianza de mayor valor obtenida experimentalmente.

$s_2^2$  = Varianza de menor valor obtenida experimentalmente.

Se calcula el valor experimental "F de Fisher":

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

Se debe comparar el valor calculado contra algún valor de referencia obtenido de tablas con un nivel de significancia  $\alpha$  al 5%. Para esta prueba, la  $F$  de tablas es el valor que se obtiene con  $n_1 - 1$  grados de libertad para el denominador y  $n_2 - 1$  grados de libertad para el numerador, como se trata de una prueba unilateral el criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2, n_1-1, n_2-1}$$

Al comparar los valores de  $F$  calculada y de referencia, se toma una decisión correspondiente al rechazo o aceptación de las hipótesis planteadas y, en consecuencia, se llega a una conclusión del objetivo planteado, donde se determina si las incertidumbres son comparables o no, en este trabajo, se utilizó para determinar si el analista mantuvo la misma precisión durante la prueba. Con base a esta conclusión, se toma la decisión de cómo se realiza la siguiente prueba sobre las medias.

### Etapa II. Prueba de hipótesis relativa a dos medias

Para realizar la inferencia estadística se debe establecer la prueba de hipótesis a evaluar, en este procedimiento se trata de hipótesis relativas a dos medias, utilizada para determinar si los resultados de dos experimentos pertenecen a la misma población, o bien, si dos métodos de análisis arrojan resultados semejantes. En este trabajo, se hace

uso de ella para determinar si las disoluciones estándar permanecen iguales bajo ciertas condiciones de almacenamiento con el paso del tiempo. La comparación se realiza con una prueba “t de Student”. Independientemente del resultado obtenido en la prueba de la etapa I, se establecen las hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 \text{ ó } \mu_1 - \mu_2 = 0$$

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

donde:

$\mu_1$  = Media experimental obtenida en el ensayo correspondiente a  $s_1^2$  de la etapa I.

$\mu_2$  = Media experimental obtenida en el ensayo correspondiente a  $s_2^2$  de la etapa I.

Dependiendo del resultado obtenido de la prueba en la etapa I, es decir, si las varianzas son comparables o no, se usan dos procedimientos matemáticos diferentes:

*Comparación entre dos medias de muestras con varianzas comparables.*

Se calcula con la siguiente fórmula la “t de Student”.

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

Para este caso,  $t_{\alpha/2}$  es el valor obtenido en tablas con  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad.

*Comparación entre dos medias de muestras con varianzas diferentes.*

Se calcula con la siguiente fórmula la “t de Student”.

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

Para este caso,  $t_{\alpha/2}$  es el valor de tablas con  $\phi$  grados de libertad, calculados con la ecuación:

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

para ambas pruebas:

$\bar{x}_1$  = Media experimental correspondiente al valor  $s_1^2$

$\bar{x}_2$  = Media experimental correspondiente al valor  $s_2^2$

$n_1$  = Número de determinaciones correspondiente al valor  $s_1^2$

$n_2$  = Número de determinaciones correspondiente al valor  $s_2^2$

$s_1^2$  = Varianza de mayor valor.

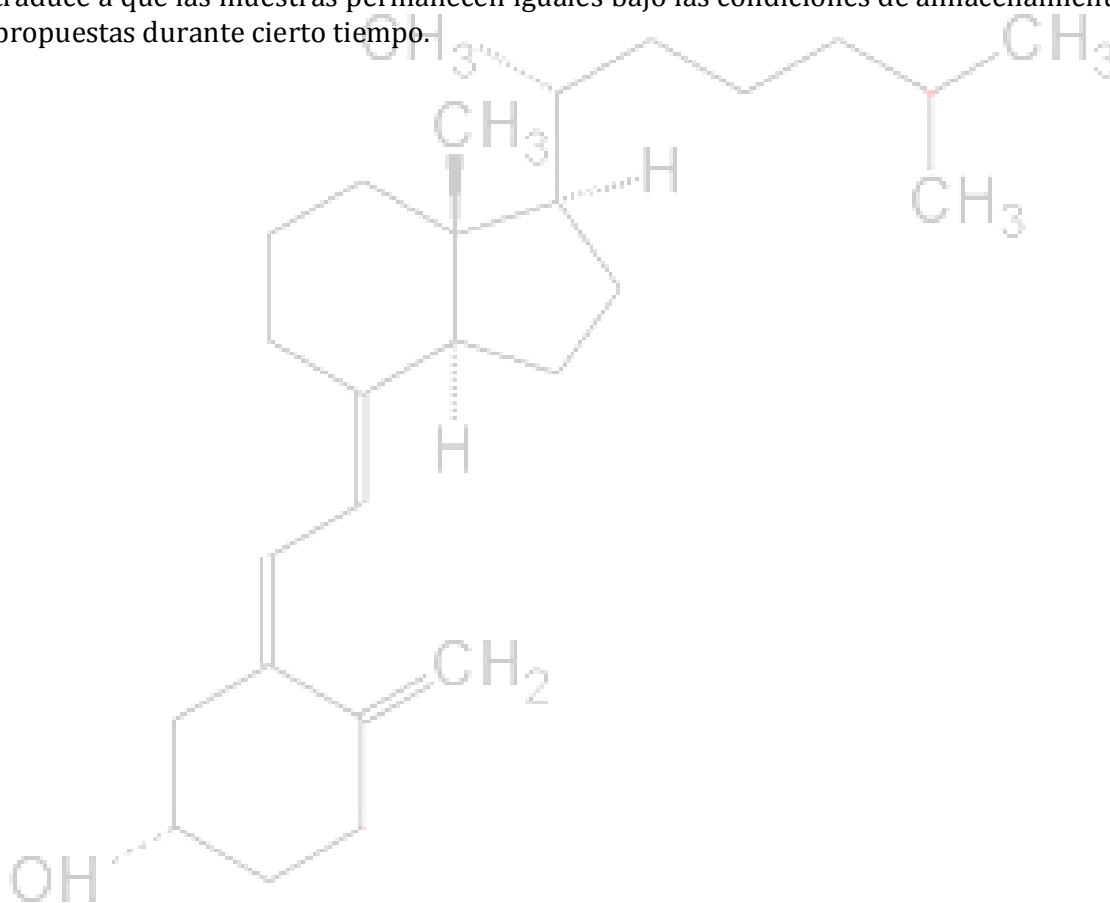
$s_2^2$  = Varianza de menor valor.

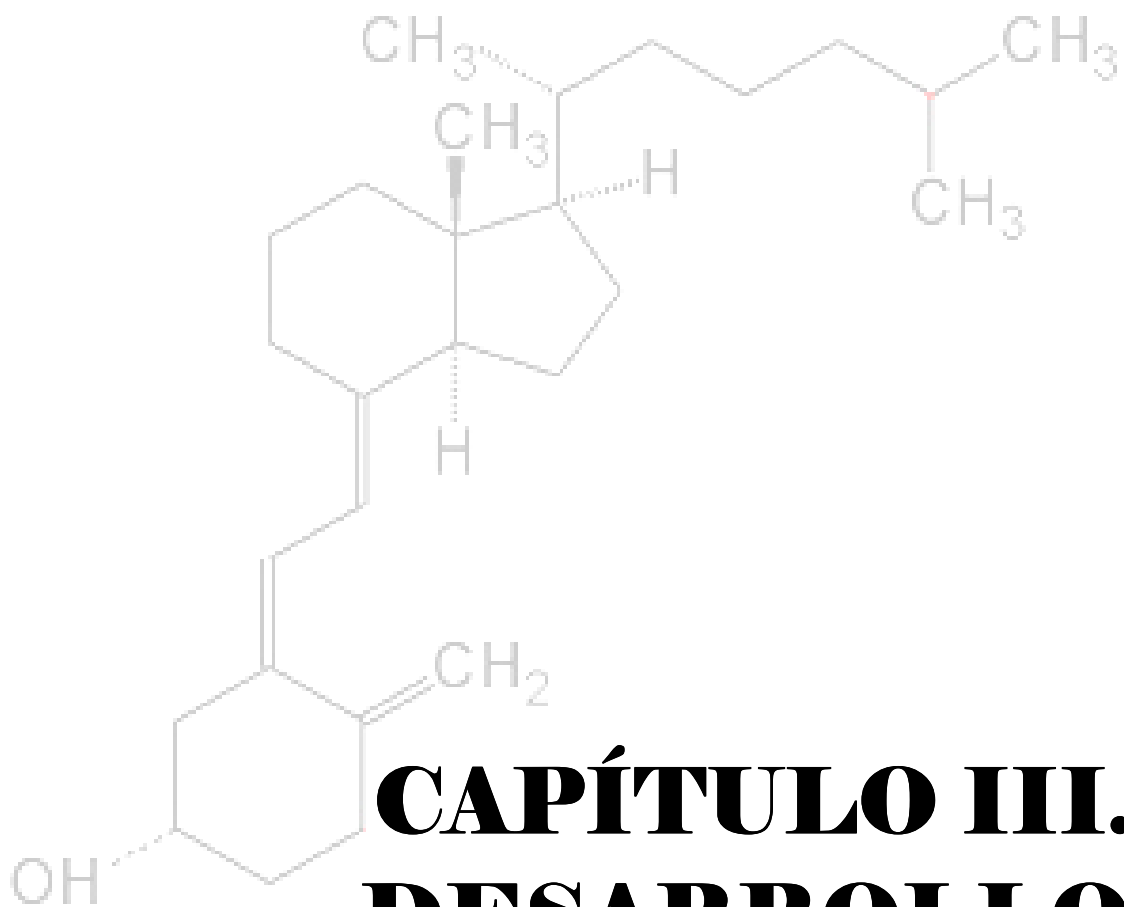


En cualquiera de los dos casos, el valor de  $t_{cal}$  se compara contra el obtenido de tablas con un nivel de significancia  $\alpha$  al 5%, tomando en cuenta los grados de libertad correspondientes. Al tratarse de una prueba bilateral el valor de comparación es  $t_{\alpha/2}$ , y el criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

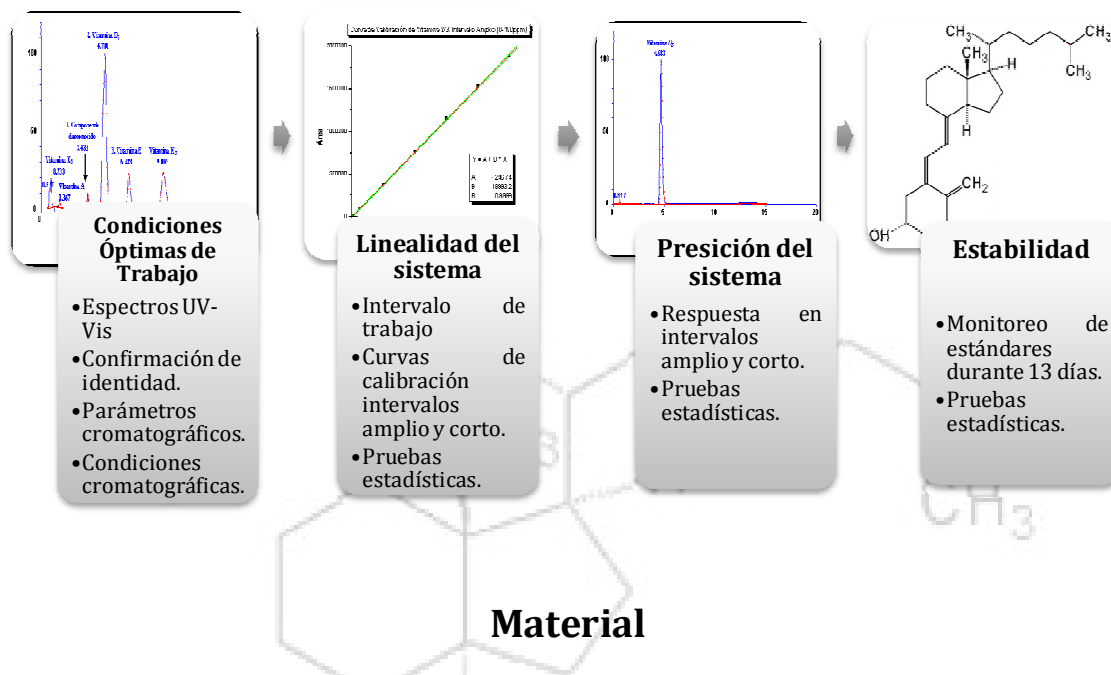
Al comparar los valores de  $t$  calculados y de tablas, se toma una decisión correspondiente al rechazo o aceptación de las hipótesis planteadas, y en consecuencia se llega a una conclusión del objetivo planteado al inicio de la prueba, para esta tesis se determina si las muestras pertenecen a la misma población y en consecuencia, esto se traduce a que las muestras permanecen iguales bajo las condiciones de almacenamiento propuestas durante cierto tiempo.





# **CAPÍTULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

## Diagrama de trabajo



- Celdas de cuarzo para espectrofotómetro de UV-Vis de 1cm de longitud de paso óptico, marca Beckman.
- Espátula.
- Frascos de vidrio de 1L con tapa.
- Pesamuestras.
- Pipetas Pasteur.
- Vasos de precipitados de 10, 80 y 150mL.
- Viales con capacidad de 2mL, marca Agilent, lote 5182-0715.
- Vidrio de reloj.
- Matraces aforados tipo A de 1, 5, 10 y 50mL con un intervalo de tolerancia de  $\pm 0.04$ mL, marca Blaubrand, lotes: 03,03 y 03,06, certificado ISO 1042.
- Pipetas de émbolo de precisión:
  - Pipeta de émbolo de precisión, marca SoftGrip, Hamilton, no. de serie: 028328, certificado ISO 9001, capacidad: 10-100 $\mu$ L.
  - Pipeta de émbolo de precisión, marca SoftGrip, Hamilton, no. de serie: 042534, certificado ISO 9001, capacidad: 100-1 000 $\mu$ L.
  - Pipeta de émbolo de precisión, marca Trasferpette, Brand, lote: 03A6467, certificado ISO 9001-14001, capacidad: 0,5 - 5mL.
- Jeringa para cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, marca Hamilton con capacidad de introducción de muestra de 250 $\mu$ L, modelo Microliter, # 725.
- Balanza analítica, marca E. Mettler Zürich, capacidad máxima de 110g, sensibilidad 0,1mg.

## Instrumental

- Espectrofotómetro UV-Vis de longitud de onda variable, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25, no. de serie 101N6081901, equipado con computadora e impresora Dell.
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (CLAE), marca Shimadzu Scientific Instruments, INC. Equipado con:
  - Válvula de inyección manual de seis pasos, marca Rheodyne, modelo 7725i, tubería con capacidad de inyección 10µL.
  - Desgasificador, marca Shimadzu, modelo HDU-1, con manómetro con capacidad < 2 Kg/cm<sup>2</sup>.
  - Mezclador de gradiente cuaternario, marca Shimadzu, modelo FCV-10AL.
  - Bomba neumática de válvulas recíprocantes, marca Shimadzu, modelo LC-10AD.
  - Columna empacada, marca Phenomenex, no. de serie 260436-2, de 50mm de longitud x 4,6mm de diámetro interno, fase químicamente unida modelo Luna C<sub>18</sub> con tamaño de partícula de 5µm y porosidad de 100Å. Equipada con precolumna de limpieza de la misma fase estacionaria.
  - Detector UV-Vis de longitud de onda variable, marca Shimadzu, modelo SPD-10AV.
  - Integrador marca Shimadzu, modelo Chromatopac CR601.

## Reactivos

Reactivos	Marca	Lote	Pureza	Presentación
Vitamina D <sub>3</sub>	Chem Services	310-90B CAS 67-97-0	99%	Sólido cristalino, blanco
Vitamina E	Chem Services	306-76B CAS 10191-41-0	98%	Fase oleosa, amarillo
Vitamina K <sub>1</sub>	Chem Services	306-115B CAS 84-80-0	98%	Fase oleosa, amarillo
Palmitato de Vitamina A	Sigma	R7632-250MG063K5007 CAS 68-26-8	95%	Adsorbido en gelatina, amarillo
Acetonitrilo	Mallinckrodt Chrom AR	H076 M51D56. CAS 75-005-8	99,99%	Líquido transparente
Helio	Praxair	SD215-20050813418 CAS 7440-59-7	99,99%	Gas comprimido

## Condiciones Óptimas de Trabajo

En cualquier proceso de extracción no selectivo para vitamina D, la fase oleosa contendrá al conjunto de vitaminas liposolubles (A, D, E y K), por lo que se realizaron ensayos para identificar la vitamina D<sub>3</sub> del resto.

Disoluciones estándar de vitaminas liposolubles. Se prepararon soluciones estándar de vitaminas liposolubles a partir de los estándares secundarios de vitaminas:

- Disolución madre del estándar de vitamina D<sub>3</sub>. Se pesaron 5mg del estándar de vitamina D<sub>3</sub>, se trasvasaron a un matraz aforado de 50mL y se llevó al aforo con acetonitrilo, se agitó manualmente hasta disolverse. Obteniendo una concentración de 100ppm.
- Disolución estándar de vitamina E. Se pesaron 3,5mg del estándar de vitamina E por contrapesada, se trasvasaron a un matraz aforado de 10mL y se llevó al aforo con acetonitrilo, se agitó manualmente hasta disolverse. Obteniendo una concentración de 350ppm.
- Disolución estándar de vitamina K<sub>1</sub>. Se pesaron 4,2mg del estándar de vitamina K<sub>1</sub> por contrapesada, se trasvasaron a un matraz aforado de 10mL y se llevó al aforo con acetonitrilo, se agitó manualmente hasta disolverse. Obteniendo una concentración de 420ppm.
- Disolución estándar de palmitato de vitamina A. Se pesó 1mg del estándar de palmitato de vitamina A, se trasvasaron a un matraz aforado de 10mL y se llevó al aforo con acetonitrilo, se agitó manualmente hasta disolverse. Obteniendo una concentración de 100ppm.

Espectrofotometría UV-Vis. Para determinar las longitudes de onda de máxima absorción de las disoluciones estándar de vitaminas, se colocaron en celdas de cuarzo por separado y se introdujeron en el espectrofotómetro. Por medio del barrido de la longitud de onda se obtuvieron los espectros UV (A vs  $\lambda$ ) de cada vitamina. Para obtener dichos gráficos se utilizó el programa "UV WinLab", con los siguientes parámetros:

- Intervalo de barrido: 200 - 400nm
- "Smooth": 2
- Velocidad de barrido: 240nm/min
- Resolución: 1nm
- Número de ciclos: 1
- "Slit": 1nm

*Nota:* Se realizaron las diluciones necesarias para observar las diferentes longitudes de absorción que presentan algunas vitaminas.

Condiciones cromatográficas. Para establecer las condiciones cromatográficas se revisaron y compararon las reportadas por catálogos<sup>23, 24, 25</sup> y trabajos de tesis previos a éste<sup>26, 27</sup>. Se modificaron hasta encontrar las óptimas en este sistema:

- Fase estacionaria: C<sub>18</sub>
- Fase móvil: Acetonitrilo 100%
- Detector UV-Vis con lectura a una longitud de onda ( $\lambda$ ): 265nm\*
- Flujo: 1mL
- Temperatura: Ambiente
- Presión: 42-44Kg/cm<sup>2</sup>

\*Valor obtenido en la sección de Espectrofotometría UV-Vis.

Parámetros cromatográficos. Para el desarrollo de la separación cromatográfica e identificación de la vitamina D<sub>3</sub> se inyectaron la disolución madre del estándar de vitamina D<sub>3</sub> 100ppm y una mezcla de las vitaminas liposolubles. Por comparación de los cromatogramas obtenidos se identificó la vitamina D<sub>3</sub> y se calcularon los parámetros cromatográficos ( $t_r'$ , N,  $k'$ ,  $\alpha$  y  $R_s$ ) con respecto a las señales adyacentes.

## Linealidad de sistema

Después de analizar la información encontrada en la literatura sobre el orden en que se encuentra la vitamina D<sub>3</sub> en alimentos (anexo I) y considerando la capacidad de detección que presenta el detector UV-Vis de los cromatógrafos de líquidos, se planteó que para demostrar la linealidad del sistema (proporcionalidad entre concentración y respuesta del instrumento), se realizarían dos curvas de calibración, una de intervalo amplio y otra de intervalo corto.

Por lo indicado anteriormente se inyectaron disoluciones de concentraciones de 1, 10 y 100ppm para fijar los intervalos de concentración de dichas curvas de calibración.

### Curva de calibración de intervalo amplio.

Se prepararon ocho disoluciones estándar de vitamina D<sub>3</sub> en un intervalo de concentración de 1 a 100ppm, partiendo de una disolución madre del estándar de vitamina D<sub>3</sub> de 100ppm elaborada de la siguiente manera, se pesaron 5mg de cristales de vitamina D<sub>3</sub>, se trasvasaron a un matraz aforado de 50mL y se llevó al aforo con acetonitrilo. Las disoluciones estándar se prepararon por duplicado, se tomaron alícuotas de 50 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 500 $\mu$ L, 1mL, 2mL, 3mL, y 4mL; se trasvasaron a matraces aforados de 5mL y se llevaron al aforo con acetonitrilo quedando del orden de 1, 5, 10, 20, 40, 60 y 80ppm. Para la disolución de 100ppm se utilizó la disolución madre. Cada disolución estándar se inyectó por triplicado en orden ascendente de concentración.

### Curva de calibración de intervalo corto.

Se prepararon cinco disoluciones estándar de vitamina D<sub>3</sub> en un intervalo de concentración de 1 a 20ppm, partiendo de una disolución madre del estándar de vitamina D<sub>3</sub> de 120ppm elaborada de la siguiente manera, se pesaron 6mg de cristales de vitamina D<sub>3</sub>, se trasvasaron a un matraz aforado de 50mL y se llevó al aforo con acetonitrilo. Las disoluciones estándar se prepararon por duplicado, se tomaron alícuotas de 42 $\mu$ L, 210 $\mu$ L, 420 $\mu$ L, 626 $\mu$ L y 830 $\mu$ L; se trasvasaron a matraces aforados de 5mL y se llevaron al aforo con acetonitrilo quedando del orden de 1,008, 5,04, 10,08, 15,024 y 19,92ppm. Cada disolución estándar se inyectó por triplicado en orden ascendente de concentración.

Una vez obtenidos los datos, se calcularon los parámetros estadísticos (media, desviación estándar y coeficiente de variación), los datos de regresión lineal, (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación) y las pruebas de hipótesis e intervalos de confianza correspondientes.

## Precisión de sistema

Para demostrar la precisión del sistema se realizaron dos ensayos, uno a concentración alta y otro a baja. Las cuales fueron fijadas basándose en los intervalos de las curvas de calibración obtenidas en la prueba de linealidad del sistema.

### Precisión a intervalo amplio.

Se prepararon nueve disoluciones estándar de vitamina D<sub>3</sub> de concentración de 20ppm, partiendo de la disolución madre del estándar de vitamina D<sub>3</sub> de 100ppm elaborada para realizar la curva de calibración de intervalo amplio en la prueba de linealidad del sistema, se tomaron alícuotas de 1 050μL; se trasvasaron a matraces aforados de 5mL y se llevaron al aforo con acetonitrilo quedando del orden de 21ppm. Cada disolución estándar se inyectó por quintuplicado en el orden de preparación.

### Precisión a intervalo corto.

Se prepararon nueve disoluciones estándar de vitamina D<sub>3</sub> de concentración de 10ppm, partiendo de la disolución madre del estándar de vitamina D<sub>3</sub> de 120ppm elaborada para realizar la curva de calibración de intervalo corto en la prueba de linealidad del sistema, se tomaron alícuotas de 420μL; se trasvasaron a matraces aforados de 5mL y se llevaron al aforo con acetonitrilo quedando del orden de 10,08ppm. Cada disolución estándar se inyectó por quintuplicado en el orden de preparación.

Una vez obtenidos los datos, se calcularon los parámetros estadísticos (media, desviación estándar y coeficiente de variación), y las pruebas de hipótesis e intervalos de confianza correspondientes.

## Estabilidad del estándar

Para demostrar la estabilidad del estándar se utilizaron los estándares preparados para el ensayo de precisión a intervalo amplio, tomando como tiempo cero los datos obtenidos en dicha prueba. Se monitorearon las disoluciones al sexto y treceavo días de almacenamiento. Las disoluciones se mantuvieron en frascos viales selladas con cinta teflón y parafilm, protegidas de la luz, y bajo refrigeración (aproximadamente 4°C) hasta su uso.

Al sexto y, posteriormente, al treceavo día de almacenamiento, las disoluciones estándar se inyectaron por quintuplicado. Al sexto día, se realizaron las pruebas estadísticas pertinentes para determinar si los estándares permanecieron estables, una vez comprobado esto se continuó con el experimento. Para el treceavo día, al rechazar la H<sub>0</sub> en la prueba de hipótesis, se detuvo el experimento.



# **CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

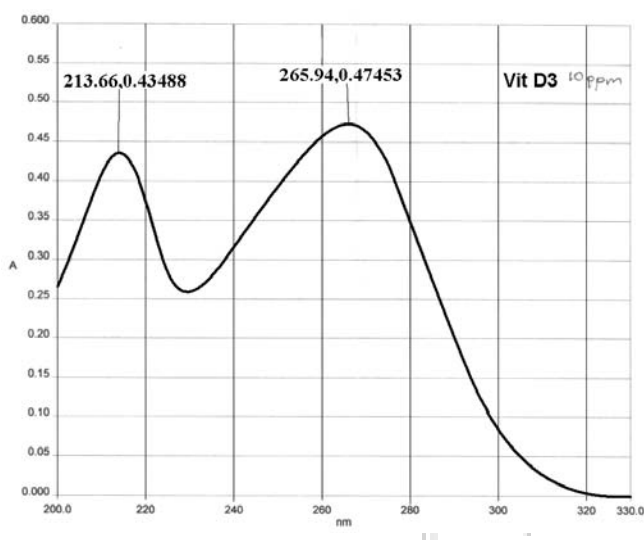


## Validación del sistema

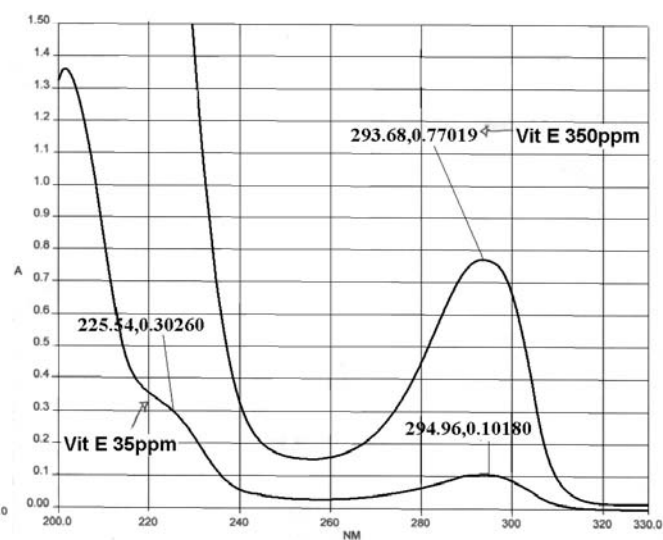
### Condiciones óptimas del sistema

#### Espectros UV-Vis de vitaminas liposolubles

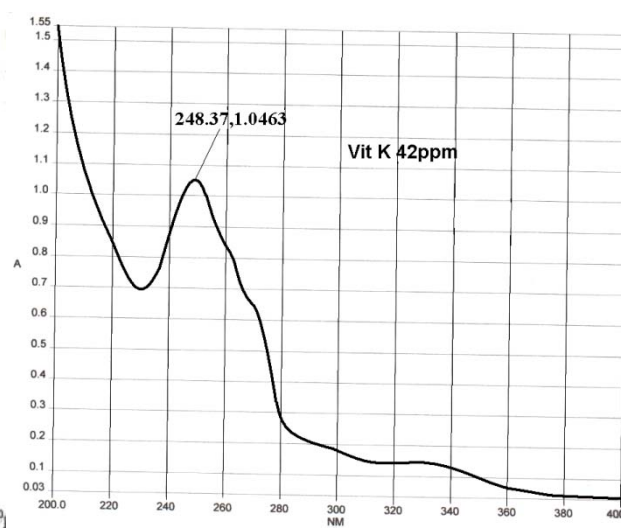
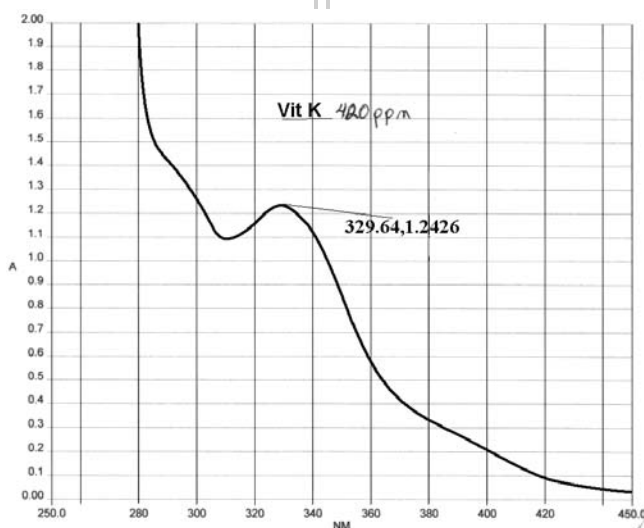
A continuación se presentan los espectros UV-Vis obtenidos de las vitaminas liposolubles indicadas en este trabajo.



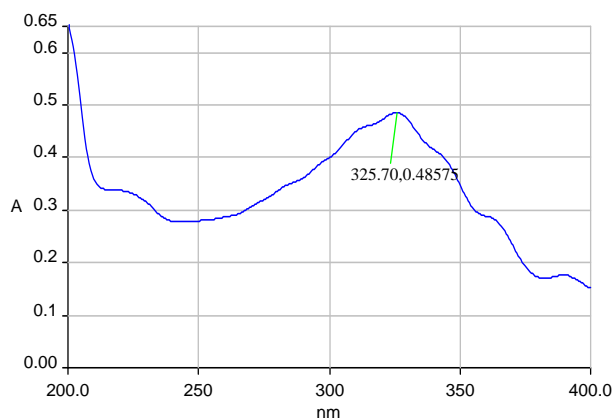
**Fig. 4.1** Espectro UV-Vis de disolución estándar de vitamina D<sub>3</sub>. Longitudes de onda de máxima absorción a 213nm y 265nm.



**Fig.4.2.** Espectro UV-Vis de disolución estándar de vitamina E. Longitudes de onda de máxima absorción a 225nm v 294nm.



**Fig. 4.3.** Espectros UV-Vis de disolución estándar de vitamina K<sub>1</sub> a diferentes concentraciones para observar mejor las longitudes de onda máximas. Longitudes de onda de máxima absorción a 329nm (izquierda) y 248nm (derecha).



**Fig.4. 4.** Espectro UV-Vis de disolución estándar de palmitato de vitamina A. Longitud de onda de máxima absorción a 325nm.

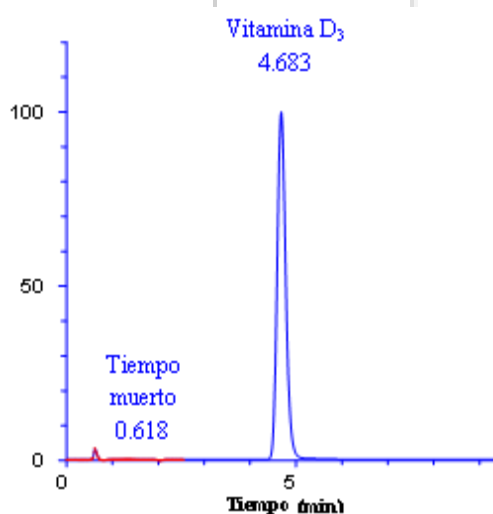
Simultáneamente, se compararon los datos encontrados experimentalmente con los reportados en la bibliografía, siendo de específico interés el valor de longitud de onda de absorción de la vitamina D<sub>3</sub> ya que es el objeto de estudio de este trabajo. Con esto, se confirmaron dos parámetros necesarios para establecer las condiciones óptimas de trabajo:

- 1) La solubilidad del analito en la fase móvil y la longitud de onda de máxima absorción de la vitamina D<sub>3</sub>
- 2) De las longitudes de máxima absorción obtenidas, se eligió la de 265nm ya que presenta mayor valor de absorbancia lo que permitirá que la vitamina D<sub>3</sub> pueda ser detectada con la mayor sensibilidad posible en un cromatógrafo de líquidos a este valor.

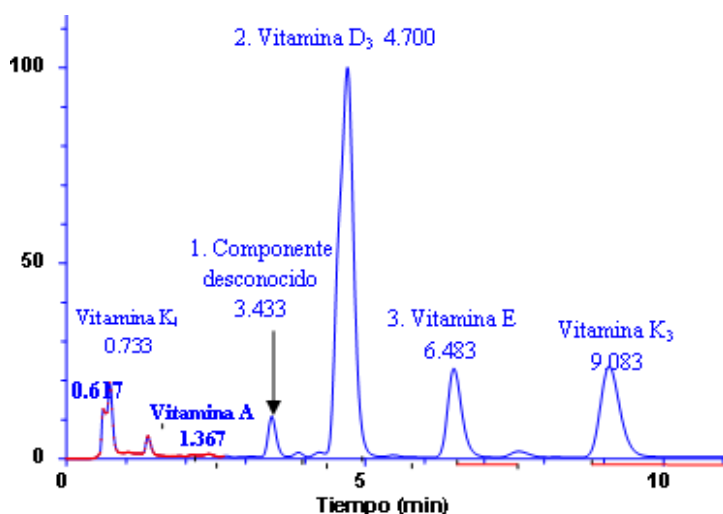
#### Desarrollo de la separación cromatográfica e identificación de la vitamina D<sub>3</sub>

Para la identificación de la vitamina D<sub>3</sub> en una mezcla de vitaminas liposolubles, se realizó el análisis cualitativo de la siguiente manera:

En la *figura 4.5* se muestra el cromatograma de la vitamina D<sub>3</sub> en donde se observan únicamente dos picos cromatográficos correspondientes al tiempo muerto y a la vitamina D<sub>3</sub>. En la *figura 4.6* se muestra el cromatograma obtenido al analizar la mezcla de las vitaminas liposolubles.



**Fig. 4.5.** Solución de vitamina D<sub>3</sub>.



**Fig. 4.6.** Mezcla de vitaminas liposolubles.

Por comparación de los tiempos de retención y de los perfiles cromatográficos de los cromatogramas mencionados se puede identificar el pico correspondiente de la vitamina D<sub>3</sub> en la mezcla.

#### Parámetros cromatográficos

Con la revisión visual de los cromatogramas, se puede decir que se desarrolló adecuadamente la separación de la mezcla de vitaminas liposolubles en el sistema cromatográfico a las condiciones planteadas en la parte experimental de este trabajo, para comprobarlo, se calcularon los parámetros cromatográficos (N, k',  $\alpha$  y Rs) de la vitamina D<sub>3</sub> con respecto a las señales adyacentes a la misma, tomando los datos del cromatograma obtenido de la mezcla de vitaminas liposolubles *figura 4.6*:

Pico	Compuesto	Tr (min)	Tr' (min)	W <sub>1/2</sub> (min)	N	K'	$\alpha$	Rs
1	Componente desconocido	3,433	2,816	0,0847	9 109	4,56	Pico 1 y 2 1,45	Pico 1 y 2 5,89
2	Vitamina D <sub>3</sub>	4,700	4,083	0,1684	4 319	6,62	Pico 2 y 3 1,44	Pico 2 y 3 6,63
3	Vitamina E	6,483	5,866	0,1484	10 582	9,51		

**Tabla 4.1.** Parámetros cromatográficos calculados a partir de la mezcla de vitaminas liposolubles.

Como se muestra en la *tabla 4.1*, los valores de N indican que la columna aún se encuentra en buenas condiciones para ser usada y que los componentes de la mezcla interaccionan de manera adecuada con la fase estacionaria, los valores de  $\alpha$  muestran que la fase estacionaria fue elegida correctamente ya que permite distinguir varios picos pertenecientes a cada una de las vitaminas liposolubles, así mismo, los valores de k' indican que el poder de elución elegido es correcto, y por último, la resolución expresa que la separación de los componentes de la mezcla se realiza al 100%. Con lo anterior, se asegura que bajo estas condiciones en este sistema cromatográfico es posible cuantificar a la vitamina D<sub>3</sub> en caso de que otras vitaminas liposolubles se encontraran presentes en las muestras y la técnica de extracción que se aplique no las eliminara. Al lograr lo anterior se continuó con la realización de la validación del sistema cromatográfico.

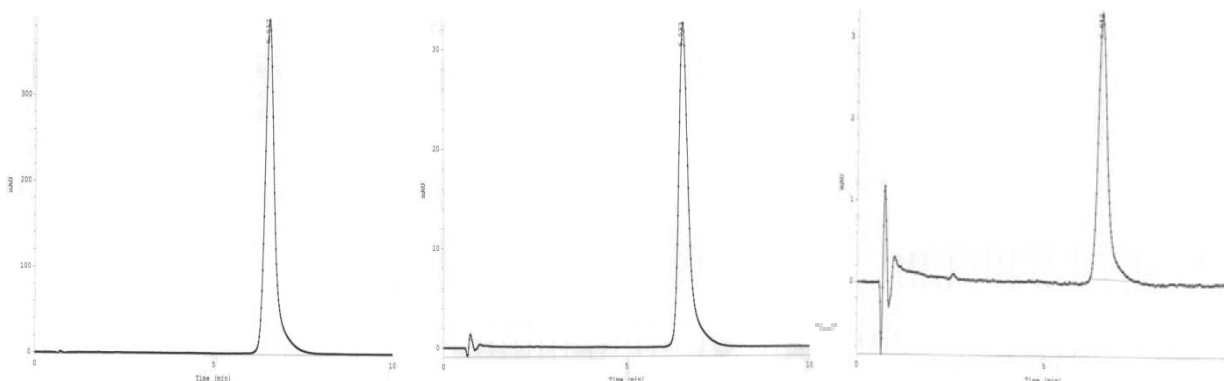
Antes de analizar los resultados de la validación del sistema hay que indicar que los datos de las áreas obtenidas así como de los resultados estadísticos obtenidos de manera completa del estudio de la validación del sistema (linealidad, precisión y estabilidad) se encuentran en el anexo II.

### Linealidad del sistema

#### Intervalo de concentraciones

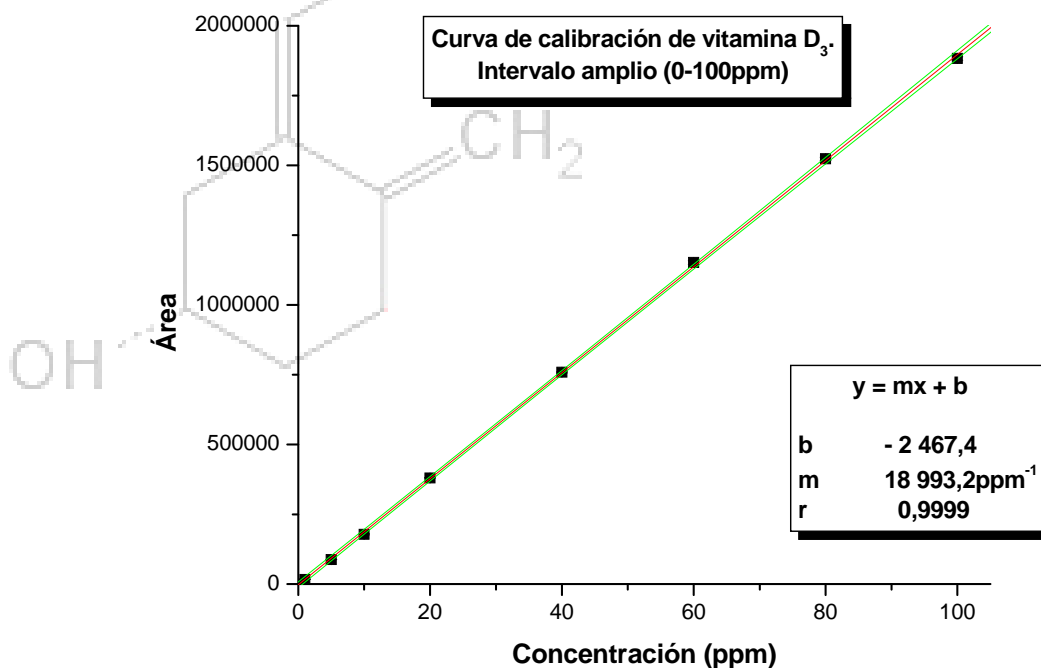
En la *figura 4.7* se muestran los cromatogramas de las disoluciones estándar de vitamina D<sub>3</sub> de concentraciones 1, 10 y 100ppm que se obtuvieron para fijar los intervalos de concentración de las curvas de calibración a realizar. Como se observa, el detector es capaz de percibir concentraciones bajas por lo que los intervalos teóricos establecidos para las curvas de calibración de intervalos amplio y corto son 1-100ppm y 1-20ppm,

respectivamente. La decisión para llegar a considerar estos intervalos se realizó tomando en cuenta los resultados anteriores además de los valores reportados en la literatura para la presencia de esta vitamina en diferentes alimentos (anexo I). Cabe mencionar que el análisis cuantitativo realizado en este trabajo es el método de estándar externo o calibración absoluta.

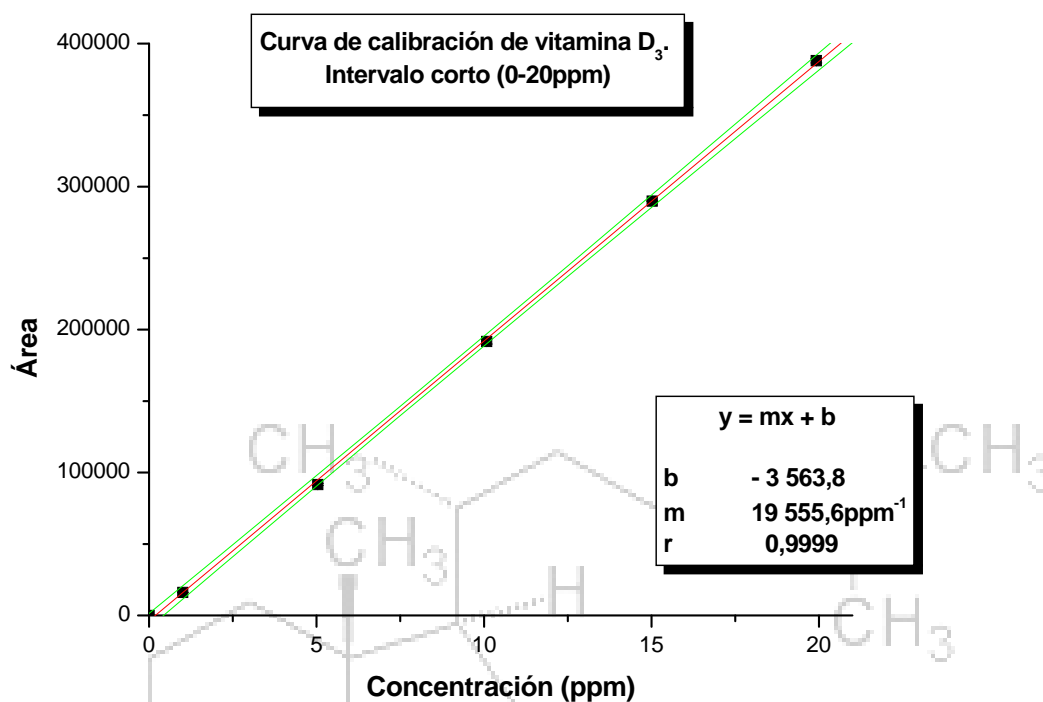


**Fig. 4.7.** Cromatogramas de disoluciones estándar de vitamina D<sub>3</sub> 100ppm (izquierda), 10ppm (centro) y 1ppm (derecha).

Para evaluar la linealidad del sistema, se construyó un gráfico del área en función de concentración de vitamina D<sub>3</sub> para cada intervalo de concentración y se inspeccionaron visualmente y así tomar de éstas las decisiones para realizar las pruebas de hipótesis respectivas. Como se puede observar en las dos gráficas la relación entre la concentración y la señal tiende a una línea recta y también parece tender al origen. Tomando en cuenta lo anterior se calcularon las regresiones lineales respectivas.



**Fig. 4.8.** Curva de calibración de vitamina D<sub>3</sub>. Intervalo amplio (0-100ppm). Se muestran la regresión lineal y el cinturón de confianza.



**Fig. 4.9.** Curva de calibración de vitamina D<sub>3</sub>. Intervalo corto (0-20ppm). Se muestran la regresión lineal y el cinturón de confianza.

Se puede ver que en los dos casos se obtienen valores de coeficiente de correlación de 0,9999 con lo que además se asegura matemáticamente dicha tendencia.

Con lo mostrado anteriormente se afirma que el sistema es lineal en ambos intervalos, por lo que se prosiguió con la elección de la ecuación a utilizar para realizar el análisis cuantitativo y decidir si se utiliza la ecuación designada para cromatografía por el método de estándar externo ( $A=Fr \times C$ ) o la ecuación matemática de una línea recta ( $y=mx + b$ ). Para ello se realizó una prueba de hipótesis bilateral sobre la ordenada, el estadístico de prueba utilizado es "t de Student". Considerando las siguientes hipótesis a evaluar:

$$H_0: b = \beta, \text{ donde } \beta = 0 \quad (\text{Hipótesis nula})$$

$$H_1: b \neq \beta \quad (\text{Hipótesis alterna})$$

Para realizar este estudio, cuando se busca al estadístico de prueba en tablas se trabaja a las condiciones de grados de libertad  $n-2$  y a un nivel de significancia del 5%.

Teniendo además como criterio de rechazo de la hipótesis nula:

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

A continuación se muestran los resultados de las pruebas de hipótesis de cada intervalo y los límites de confianza para la ordenada y la pendiente, calculados. Se muestran tanto los cálculos de manera resumida como las decisiones y conclusiones a las que se llegaron en cada una de las pruebas.

Curva de calibración de intervalo amplio.

Se realizan los siguientes cálculos:

- o Error típico de la estimación

$$Se = \sqrt{\frac{(2\,910\,228 * 1,05 \times 10^{15}) - (55\,297\,942\,298)^2}{(49 - 2)(49)(2\,910\,228)}} = 9\,295,21$$

donde:

$$S_{xx} = 2\,910\,228$$

$$S_{yy} = 1,05 \times 10^{15}$$

$$S_{xy} = 55\,297\,942\,298$$

- o Cálculo de la "t de student"

$$t_{cal} = \left( \frac{(-2\,467,39) - 0}{9\,295,21} \right) \sqrt{\frac{49(2\,910\,228)}{2\,910\,228 + (49 * 38,69)^2}} = -1,2428$$

donde:

$$b = -2\,467,39$$

$$\beta = 0$$

$$Se = 9\,295,21$$

$$S_{xx} = 2\,910\,228$$

$$n = 49$$

$$\bar{X} = 38,69$$

En este caso el valor de  $t_{cal}$  es negativo por lo que se comparó con la  $-t_{\alpha/2, n-2}$  para tomar una decisión con respecto a las hipótesis planteadas. En tablas obtenemos que:

$$-t_{0,025, 47} = -2,0129$$

Por lo que:

$$-1,2428 > -2,0129$$

Como  $t_{cal} > -t_{\alpha/2, n-2}$ , no se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que la ordenada tiende al origen y con esto se llegó a que la ecuación que se utiliza en este análisis cuantitativo por el método de estándar externo es la ecuación designada para cromatografía:

$$A = FrC$$

Posteriormente, se calcularon los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente:

- Intervalo de confianza para la ordenada (IC<sub>b</sub>).

$$IC_b = -2\,467,39 \pm (2,0129 * 9\,295,21) \sqrt{\frac{2\,910\,228 + (49 * 38,69)^2}{(49)(2\,910\,228)}}$$

$$IC_b = -2\,467,39 \pm 3\,996,18$$

$$-6\,463,57 < -2\,467,39 < 1\,528,79$$

- Intervalo de confianza para la pendiente (IC<sub>m</sub>).

$$IC_m = 18\,993,2 \pm (2,0129 * 9\,295,21) \sqrt{\frac{49}{2\,910\,228}}$$

$$IC_m = 18\,993,2 \pm 76,77$$

$$18\,916,43 < 18\,993,2 < 19\,069,98$$

Curva de calibración de intervalo corto.

Se realizan los siguientes cálculos:

- Error típico de la estimación

$$Se = \sqrt{\frac{(45\,701,93 * 1,77 * 10^{13}) - (899\,189\,846,3)^2}{(31 - 2)(31)(45\,701,93)}} = 2\,102,7$$

donde:

$$S_{xx} = 45\,701,93$$

$$S_{yy} = 1,77 * 10^{13}$$

$$S_{xy} = 899\,189\,846,3$$

- Cálculo de la "t de student"

$$t_{cal} = \left( \frac{(-3\,563,83) - 0}{2\,102,7} \right) \sqrt{\frac{31(45\,701,92)}{45\,701,92 + (31 * 9,88)^2}} = -5,3994$$

donde:

$$b = -3\,563,83$$

$$\beta = 0$$

$$Se = 2\,102,7$$

$$S_{xx} = 45\,701,92$$

$$n = 31$$

$$\bar{X} = 9,88$$

En este caso el valor de  $t_{cal}$  es negativo por lo que se comparó con la  $-t_{\alpha/2, n-2}$  para tomar una decisión con respecto a las hipótesis planteadas. En tablas obtenemos que:

$$-t_{0,025, 29} = -2,3638$$

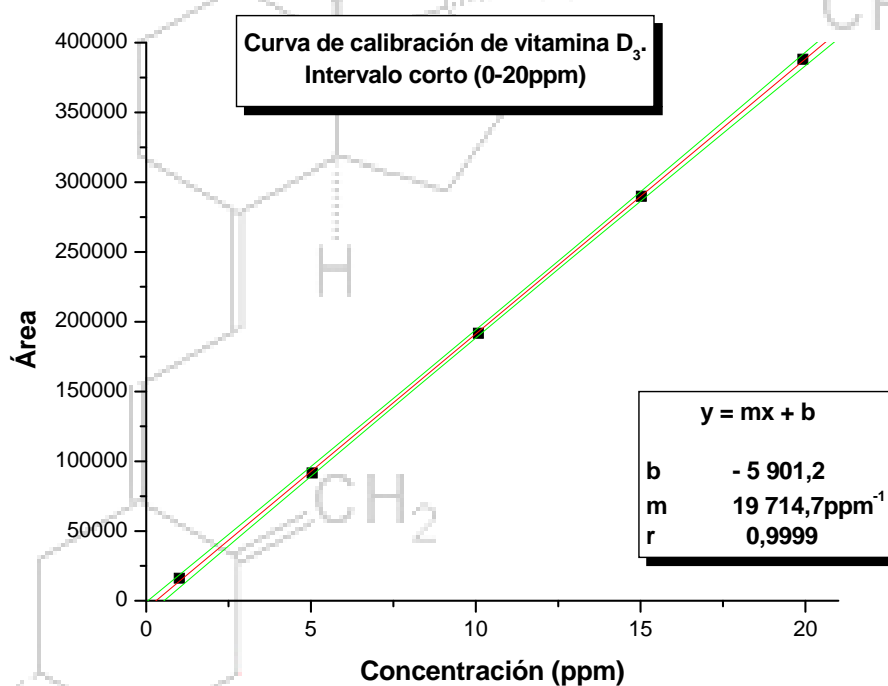
Por lo que:

$$-5,3994 < -2,3638$$

Como  $t_{cal} < -t_{\alpha/2, n-2}$ , se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que la ordenada no tiende al origen y la ecuación que se utiliza en este análisis cuantitativo es la ecuación designada para una línea recta:

$$y = mx + b$$

Al rechazarse la  $H_0$ , se construyó un nuevo gráfico de área en función de concentración de vitamina  $D_3$  sin considerar el origen como ordenada. Una vez obtenido el gráfico, se calcularon regresión lineal y límites de confianza, obteniendo nuevamente valores de coeficiente de correlación de 0,9999.



**Fig. 4.10.** Curva de calibración de disolución estándar de vitamina  $D_3$ . Intervalo corto (0-20ppm). Se muestra regresión lineal y cinturón de confianza.

Posteriormente, se realizaron los cálculos necesarios para obtener los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente considerando que:

$$n = 30$$

$$\bar{X} = 10,21$$

$$t_{0,025, 28} = 2,0484$$



- Error típico de la estimación

$$Se = \sqrt{\frac{(41198,62 * 1,6 \times 10^{13}) - (812\ 216\ 969,3)^2}{(30 - 2)(30)(41198,62)}} = 1859,59$$

donde:

$$S_{xx} = 41\ 198,62$$

$$S_{yy} = 1,6 \times 10^{13}$$

$$S_{xy} = 812\ 216\ 969,3$$

- Intervalo de confianza para la ordenada (IC<sub>b</sub>).

$$IC_b = -5\ 901,15 \pm (2,0484 * 1\ 859,59) \sqrt{\frac{41\ 198,62 + (30 * 10,21)^2}{(30)(41\ 198,62)}}$$

$$IC_b = -5\ 901,15 \pm 1\ 252,91$$

$$-7\ 160,54 < -5\ 901,15 < -4\ 641,77$$

- Intervalo de confianza para la pendiente (IC<sub>m</sub>).

$$IC_m = 19\ 714,67 \pm (2,0484 * 1\ 859,59) \sqrt{\frac{30}{41\ 198,62}}$$

$$IC_m = 19\ 714,67 \pm 102,79$$

$$19\ 611,88 < 19\ 714,67 < 19\ 817,46$$

Con las pruebas estadísticas realizadas anteriormente se demostró que el presenta linealidad en los intervalos de concentración de vitamina D<sub>3</sub> de 0-100ppm y 0-20ppm. Que en el caso de la curva de intervalo amplio la ecuación a utilizar en un análisis cuantitativo posterior sería la designada para cromatografía utilizando el método de estándar externo y, para la curva de intervalo corto la ecuación sería la de la línea recta calculada por el método de mínimos cuadrados. Una vez confirmada la linealidad del sistema se prosigue con la evaluación de la precisión del mismo.

### Precisión del sistema

En cada ensayo, se aplicó una prueba de hipótesis unilateral sobre las varianzas utilizando como estadístico de prueba la  $\chi^2$ . Considerando las siguientes hipótesis:

$$H_0: s^2 = \sigma^2 \quad (\text{Hipótesis nula})$$

$$H_1: s^2 > \sigma^2 \quad (\text{Hipótesis alterna})$$

donde:

$\sigma^2$  = Valor teórico de referencia, por lo menos el 5% (sobre el área) del CV.

$s^2$  = Varianza obtenida experimentalmente.

Para realizar este estudio, cuando se busca al estadístico de prueba en tablas se trabaja a las condiciones de grados de libertad  $n-1$  y a un nivel de significancia del 5%.

Teniendo además como criterio de rechazo de la hipótesis nula:

$$\chi_{cal}^2 > \chi_{\alpha, n-1}^2$$

A continuación se muestran los resultados de las pruebas de hipótesis de cada intervalo y los límites de confianza de la varianza y desviación estándar calculadas. Se muestran tanto los cálculos de manera resumida como las decisiones y conclusiones a las que se llegaron en cada una de las pruebas.

*Precisión a intervalo amplio.*

A continuación se muestran los resultados experimentales obtenidos para una concentración de 21ppm.

$n = 45$ $\bar{x} = 406\,218,27$ $s = 6\,084,19$ $s^2 = 37\,017\,322$ $CV = 1,5\%$
--

Se calculó el valor de  $\sigma^2$ , partiendo del valor del coeficiente de variación teórico que normalmente se exige en el planteamiento inicial de un análisis, 5%. Tomando en cuenta lo anterior obtenemos que:

$$\sigma^2 = ((5 * 406\,218,27) / 100)^2 = 412\,533\,200$$

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(45-1)37\,017\,322}{412\,533\,200} = 3,95$$

En tablas obtenemos que:

$$\chi_{0,05,44}^2 = 60,4809$$

por lo que:

$$3,95 < 60,4809$$

Como  $\chi_{cal}^2 < \chi_{\alpha, n-1}^2$ , no se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que el sistema presenta una precisión de por lo menos 95%.

Como es muy común en caso de validaciones, ya con cierta exigencia, utilizar los valores planteados por la industria farmacéutica y alimentaria que para técnicas cromatográficas exige un CV por lo menos del 2%, también se realizó otra prueba de hipótesis partiendo del valor del coeficiente de variación teórico mencionado. Tomando en cuenta lo anterior obtenemos que:

$$\sigma^2 = ((2 * 406\,218,27) / 100)^2 = 66\,005\,312,1$$

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(45-1)37\,017\,322}{66\,005\,312,1} = 24,68$$

El valor de tablas es:

$$\chi^2_{0,05, 44} = 60,4809$$

por lo que:

$$24,68 < 60,4809$$

Como  $\chi^2_{cal} < \chi^2_{\alpha, n-1}$ , no se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que el sistema una precisión de por lo menos 98%. Por lo que también se cumpliría la exigencia de la industria alimentaria y farmacéutica en caso de aplicarse.

Se calculó el intervalo de confianza para  $\sigma^2$  para el caso de CV del 5%.

$$\sqrt{\frac{(45-1)37\,017\,322}{27,58}} < 6\,084,17 < \sqrt{\frac{(45-1)37\,017\,322}{64,2}}$$

$$5\,036,82 < 6\,084,17 < 7\,685,55$$

*Precisión a intervalo corto.*

A continuación se muestran los resultados experimentales obtenidos para una concentración de 10ppm.

$n = 45$ $\bar{x} = 181\,447,07$ $s = 1\,757,67$ $s^2 = 3\,089\,415,06$ $CV = 0,97\%$
---

Se calculó el valor de  $\sigma^2$ , partiendo del valor del coeficiente de variación teórico que normalmente se exige en el planteamiento inicial de un análisis, 5%. Tomando en cuenta lo anterior obtenemos que:

$$\sigma^2 = ((5 * 181\,447,07) / 100)^2 = 82\,307\,595$$

$$\chi^2_{cal} = \frac{(45-1)3\,089\,415,06}{82\,307\,595} = 1,65$$

El valor de tablas es:

$$\chi^2_{0,05, 44} = 60,4809$$

por lo que:

$$1,65 < 60,4809$$

Como  $\chi^2_{cal} < \chi^2_{\alpha, n-1}$ , no se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que el sistema presenta una precisión de por lo menos 95%. Como en el caso del intervalo amplio, se realizó otra prueba de hipótesis partiendo del valor del coeficiente de variación teórico del 2%. Para este caso se obtiene que:

$$\sigma^2 = ((2 * 181\,447,07) / 100)^2 = 13\,169\,215,2$$

$$\chi^2_{cal} = \frac{(45 - 1)3\,089\,415,06}{13\,169\,215,2} = 10,32$$

El valor de tablas es:

$$\chi^2_{0,05,44} = 60,4809$$

por lo que:

$$10,32 < 60,4809$$

Como  $\chi^2_{cal} < \chi^2_{\alpha, n-1}$ , no se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que el sistema presenta una precisión de por lo menos 98%. Por lo que también cumpliríamos la exigencia de la industria farmacéutica en caso de aplicarse.

Se calculó el intervalo de confianza para  $\sigma^2$  para el caso de CV del 5%.

$$\sqrt{\frac{(45 - 1)3\,089\,415,06}{27,58}} < 1\,757,67 < \sqrt{\frac{(45 - 1)3\,089\,415,06}{64,2}}$$

$$1\,455,1 < 1\,757,67 < 2\,220,29$$

#### Estabilidad del estándar

Para la prueba de estabilidad del estándar, se evaluaron las varianzas de los días a comparar, para asegurar que el analista mantiene su precisión a las condiciones establecidas ( $CV \leq 5\%$ ) durante los análisis, con base en esto, se procedió a realizar la prueba de hipótesis sobre las medias para comprobar si la muestra proviene de la misma población.

Por lo tanto, se aplicaron las siguientes pruebas de hipótesis bilaterales sobre las varianzas y las medias utilizando como estadísticos de prueba "F de Fisher" y "t de Student" respectivamente:

"F de Fisher"	"t de Student"
$H_0: s_1^2 = s_2^2$	$H_0: \mu_1 = \mu_2$ donde $\mu_1 - \mu_2 = 0$
$H_1: s_1^2 \neq s_2^2$	$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

donde:

$s_1^2$  = Varianza de mayor valor obtenida experimentalmente.

$s_2^2$  = Varianza de menor valor obtenida experimentalmente.

$\mu_1$  = Media experimental obtenida en el ensayo correspondiente a  $s_1^2$ .

$\mu_2$  = Media experimental obtenida en el ensayo correspondiente a  $s_2^2$ .

Se aplica  $n_1 - 1$  y  $n_2 - 1$  grados de libertad para la prueba "F de Fisher". Para la prueba "t de Student" se aplicará la respectiva fórmula dependiendo del resultado obtenido de la prueba de hipótesis sobre las varianzas:

	Si no se rechaza $H_0$ usar:	Si se rechaza $H_0$ usar:
Grados de libertad	$n_1 + n_2 - 2$	$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$

Ambas se trabajaron con un nivel de significancia del 5%. Teniendo como criterio de rechazo de la hipótesis nula:

"F de Fisher"	"t de Student"
$F_{cal} > F_{\alpha/2}$	$t_{cal} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{cal} > t_{\alpha/2}$

Los resultados experimentales obtenidos en los diferentes días de análisis.

Día cero	Día Seis	Día Trece
$n = 45$	$n = 45$	$n = 44$
$\bar{x} = 406\ 218,27$	$\bar{x} = 408\ 474$	$\bar{x} = 410\ 481$
$s = 6\ 084,19$	$s = 6\ 249,2$	$s = 4\ 758,93$
$s^2 = 37\ 017\ 322$	$s^2 = 39\ 052\ 509,3$	$s^2 = 22\ 647\ 376,1$
$CV = 1,5\%$	$CV = 1,53\%$	$CV = 1,16\%$

Estudio al sexto día de almacenamiento

- Prueba de hipótesis para las varianzas.

Se realiza el siguiente cálculo:

$$F_{cal} = \frac{39\ 052\ 509,3}{37\ 017\ 322} = 1,06$$

En tablas obtenemos que:

$$F_{0,025, 44, 44} = 1,82$$

por lo que:

$$1,06 < 1,82$$

Como  $F_{cal} < F_{\alpha/2, n_1 - 1, n_2 - 1}$ , no se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que el analista mantuvo la misma precisión y por consiguiente la prueba estadística referente a las medias se realiza utilizando la ecuación cuando las varianzas son iguales.

- Prueba de hipótesis para las medias.

Se realiza el siguiente cálculo:

$$t_{cal} = \frac{408\,474 - 406\,218,3}{\sqrt{[(45-1)39\,052\,509,27] + [(45-1)37\,017\,322,02]}} \sqrt{\frac{(45 * 45)(45 + 45 - 2)}{45 + 45}} = 1,74$$

En tablas obtenemos que:

$$t_{0,025, 88} = 1,99$$

por lo que:

$$1,74 < 1,99$$

Como  $t_{cal} < t_{\alpha/2, n1 + n2 - 2}$ , no se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que las medias son iguales y por lo tanto los valores pertenecen a la misma población por lo que las disoluciones estándar se mantuvieron estables durante seis días bajo las condiciones de almacenamiento mencionadas.

#### Estudio al treceavo día de almacenamiento

Al corroborar la estabilidad de los estándares de por lo menos seis días de almacenamiento se continuó con la prueba, se mantuvieron bajo las mismas condiciones de almacenamiento durante siete días más.

- Prueba de hipótesis para las varianzas.

Se realiza el siguiente cálculo:

$$F_{cal} = \frac{37\,017\,322}{22\,647\,376,1} = 1,64$$

En tablas obtenemos que:

$$F_{0,025, 44, 43} = 1,83$$

por lo que:

$$1,64 < 1,83$$

Como  $F_{cal} < F_{\alpha/2, n1 - 1, n2 - 1}$ , no se rechaza la  $H_0$ , por lo que se concluye que el analista mantuvo la misma precisión y por consiguiente la prueba estadística referente a las medias se realiza utilizando la ecuación cuando las varianzas son iguales.

- Prueba de hipótesis para las medias.

Se realizan los siguientes cálculos:

$$t_{cal} = \frac{406\,218,3 - 410\,481}{\sqrt{[(45-1)37\,017\,322,02] + [(44-1)22\,647\,376,1]}} \sqrt{\frac{(45 * 44)(45 + 44 - 2)}{45 + 44}} = -3,68$$

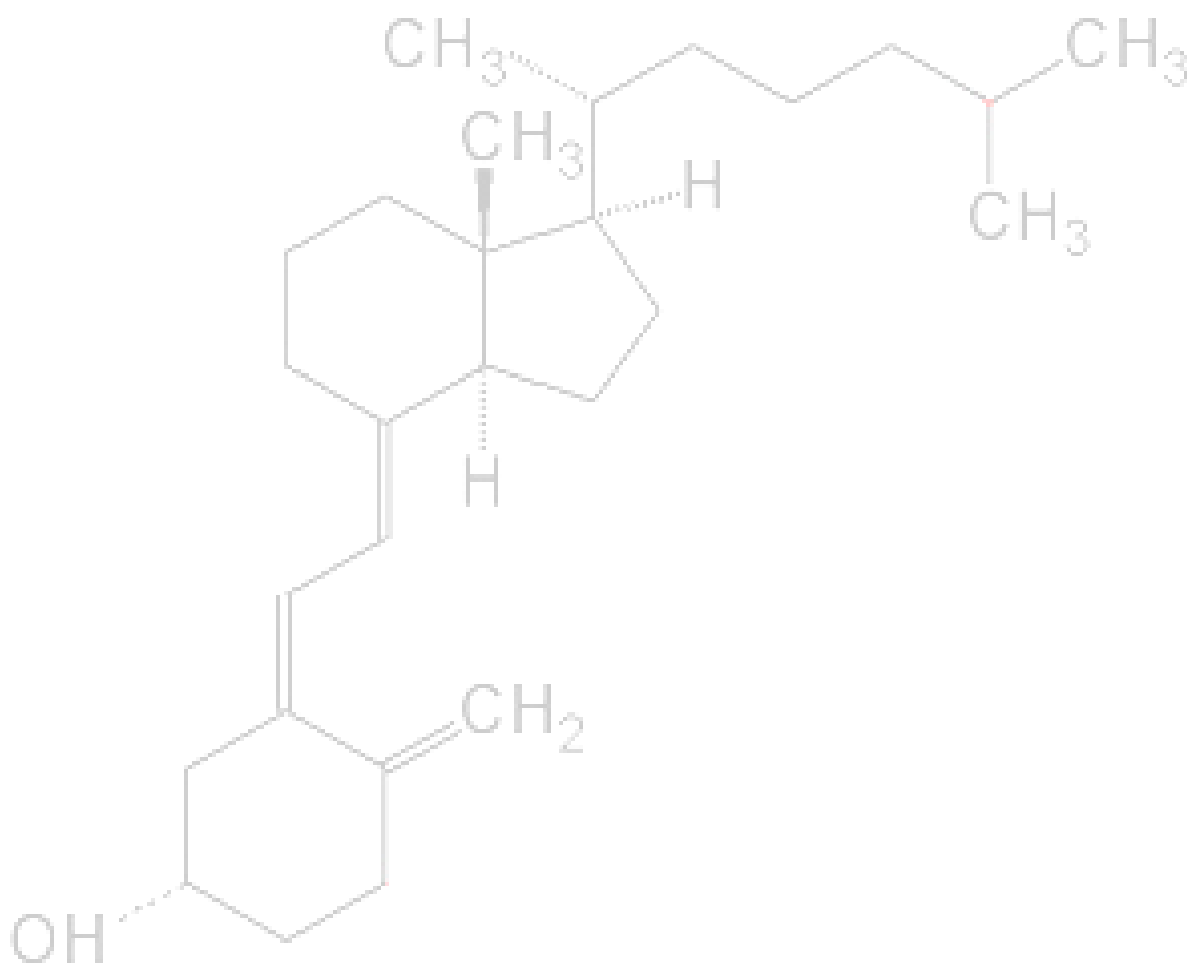
En tablas obtenemos que:

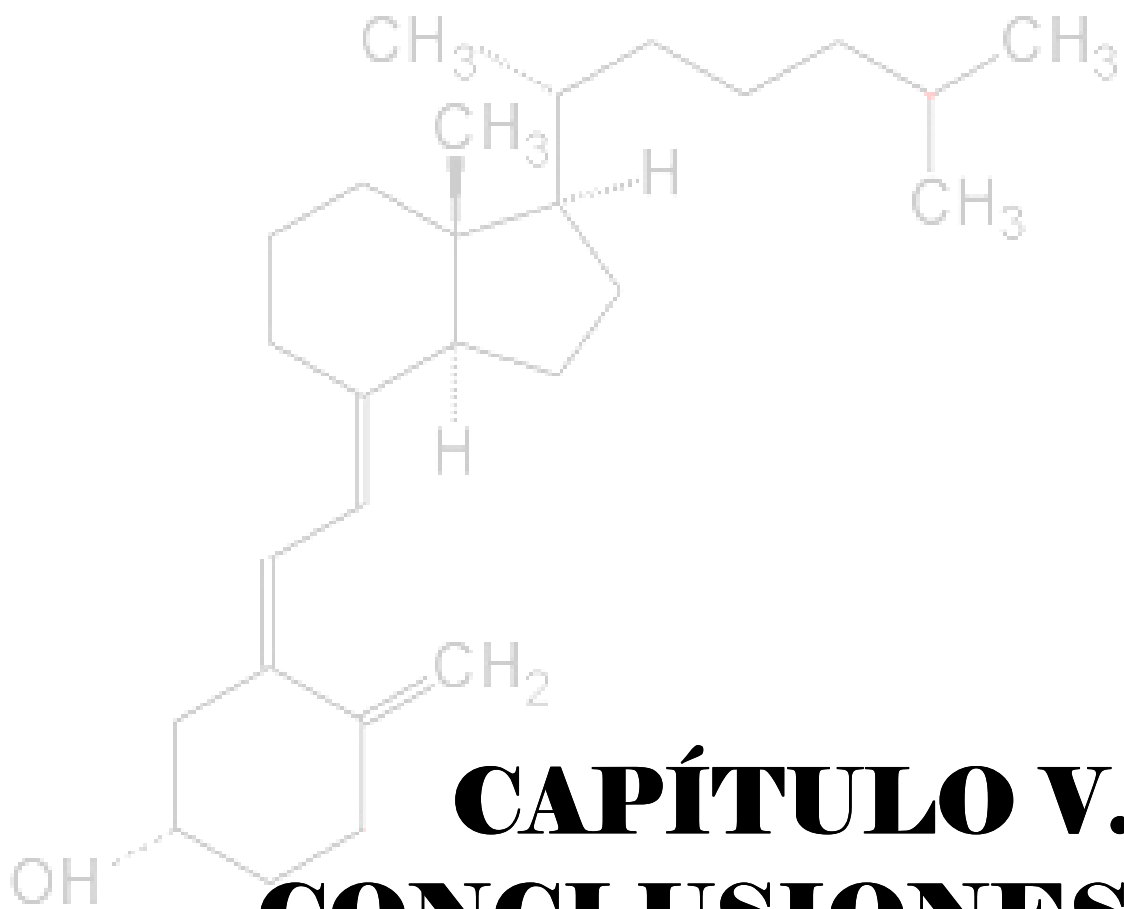
$$-t_{0,025,87} = -1,99$$

por lo que:

$$-3,68 < -1,99$$

Como  $t_{cal} < -t_{\alpha/2, n1 + n2 - 2}$ , se rechaza la  $H_0$  y por consiguiente se acepta  $H_1$ , con lo que se concluye que las medias no son iguales y por lo tanto no provienen de la misma población, por lo que los estándares no se mantuvieron estables a los trece días de almacenamiento bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.





# **CAPÍTULO V.**

# **CONCLUSIONES**



Después de realizar el análisis de los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones particulares:

- 1) La vitamina D<sub>3</sub> es soluble en la fase móvil utilizada (acetonitrilo) y presenta su longitud de onda máxima de absorción a 265nm en el mismo solvente, por lo que se detectó con la mayor sensibilidad posible.
- 2) Las condiciones óptimas de trabajo en las que el sistema cromatográfico mostró un buen desempeño son:
  - Fase estacionaria: C<sub>18</sub>
  - Flujo: 1mL
  - Fase móvil: Acetonitrilo 100%
  - Temperatura: Ambiente
  - Detector UV-Vis con lectura a una longitud de onda (λ): 265nm
  - Presión: 42-44Kg/cm<sup>2</sup>
- 3) El análisis cualitativo permitió identificar la vitamina D<sub>3</sub> del resto de vitaminas liposolubles, por lo que, si se tuvieran muestras con una mezcla de ellas es posible analizar la vitamina D con una buena resolución (100% de separación).
- 4) Los intervalos de concentración utilizados para la evaluación de los parámetros de la validación (linealidad, precisión y estabilidad) son:
  - i. Intervalo amplio 0-100ppm de Vitamina D<sub>3</sub>
  - ii. Intervalo corto 0-20ppm de Vitamina D<sub>3</sub>
- 5) El cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia del laboratorio 3F presenta linealidad en los intervalos de concentración mencionados anteriormente.
- 6) En caso de que se utilicen las curvas de calibración para realizar un análisis cuantitativo por método de estándar externo se deberán emplear las siguientes ecuaciones correspondientes en cada caso:

Intervalo amplio	Intervalo corto
$A = FrC$	$y = mx + b$

- 7) Los intervalos de confianza calculados sobre los valores de calibración son:

0-100ppm	0-20ppm
$IC_b = -2\ 467,39 \pm 3\ 996,18$	$IC_b = -5\ 901,15 \pm 1\ 252,91$
$IC_m = 18\ 993,2 \pm 76,77$	$IC_m = 19\ 714,67 \pm 102,79$

- 8) Se demostró que el sistema presenta una precisión por lo menos del 95% cumpliendo además con lo exigido en industrias como la alimentaria y farmacéutica para la cromatografía con un error máximo del 2% cuando se emplean concentraciones de vitamina D<sub>3</sub> tanto en el intervalo amplio como en el corto.

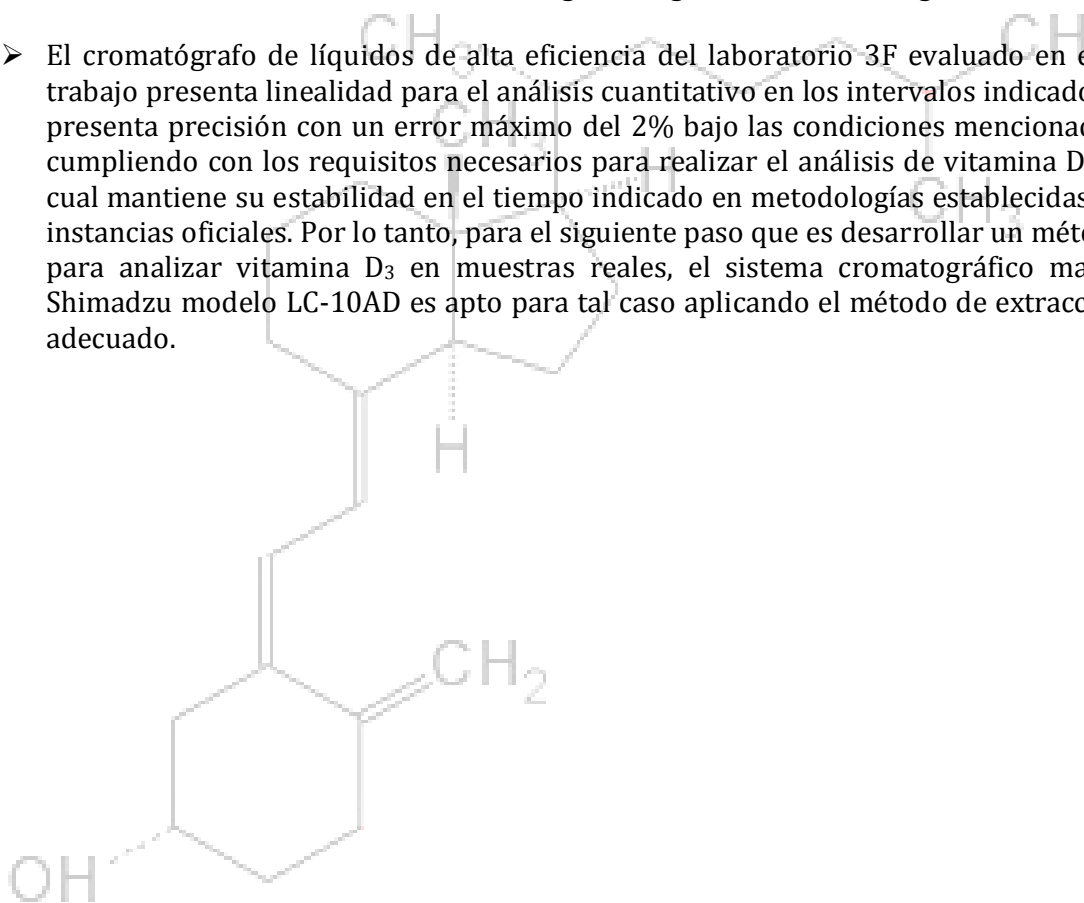
- 9) El intervalo de confianza calculado sobre la varianza es:

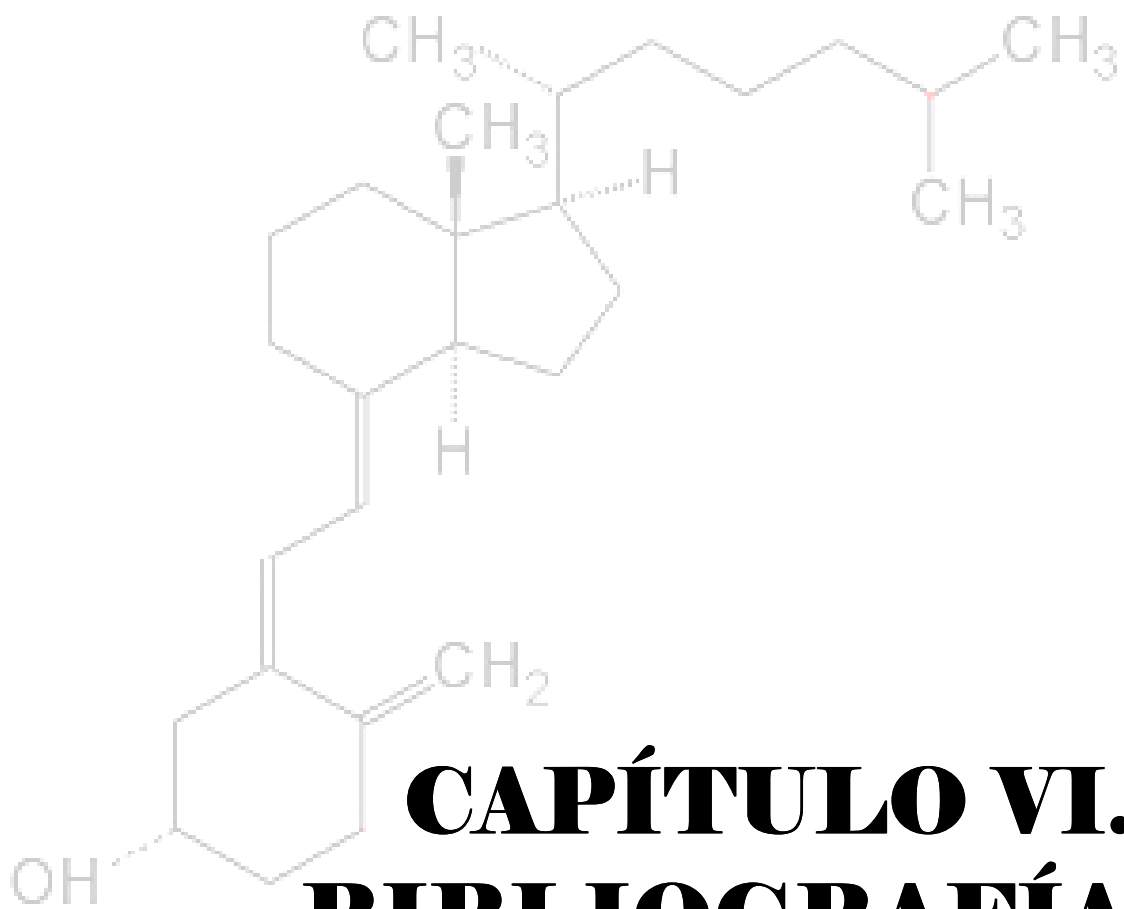
Intervalo amplio	Intervalo corto
$IC_s = 5\ 036,82 < 6\ 084,17 < 7\ 685,55$	$IC_s = 1\ 455,1 < 1\ 757,67 < 2\ 220,29$

- 10) El sistema y el analista mantuvieron una precisión con un error máximo del 5% a lo largo de toda la prueba de estabilidad con lo que se aseguró que la causa del rechazo de hipótesis sobre las medias de la prueba de estabilidad es sólo causada por la inestabilidad del analito.
- 11) Las disoluciones estándar de vitamina D<sub>3</sub> no mostraron degradación química al menos hasta 6 días posteriores a su elaboración almacenadas bajo refrigeración, en frascos viales bien sellados y protegidos de la luz. Con esto se estableció un margen de estabilidad de la vitamina D<sub>3</sub> de por lo menos 6 días.

En base a todo lo citado anteriormente se llegó a la siguiente conclusión general:

- El cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia del laboratorio 3F evaluado en este trabajo presenta linealidad para el análisis cuantitativo en los intervalos indicados y presenta precisión con un error máximo del 2% bajo las condiciones mencionadas, cumpliendo con los requisitos necesarios para realizar el análisis de vitamina D<sub>3</sub> la cual mantiene su estabilidad en el tiempo indicado en metodologías establecidas de instancias oficiales. Por lo tanto, para el siguiente paso que es desarrollar un método para analizar vitamina D<sub>3</sub> en muestras reales, el sistema cromatográfico marca Shimadzu modelo LC-10AD es apto para tal caso aplicando el método de extracción adecuado.





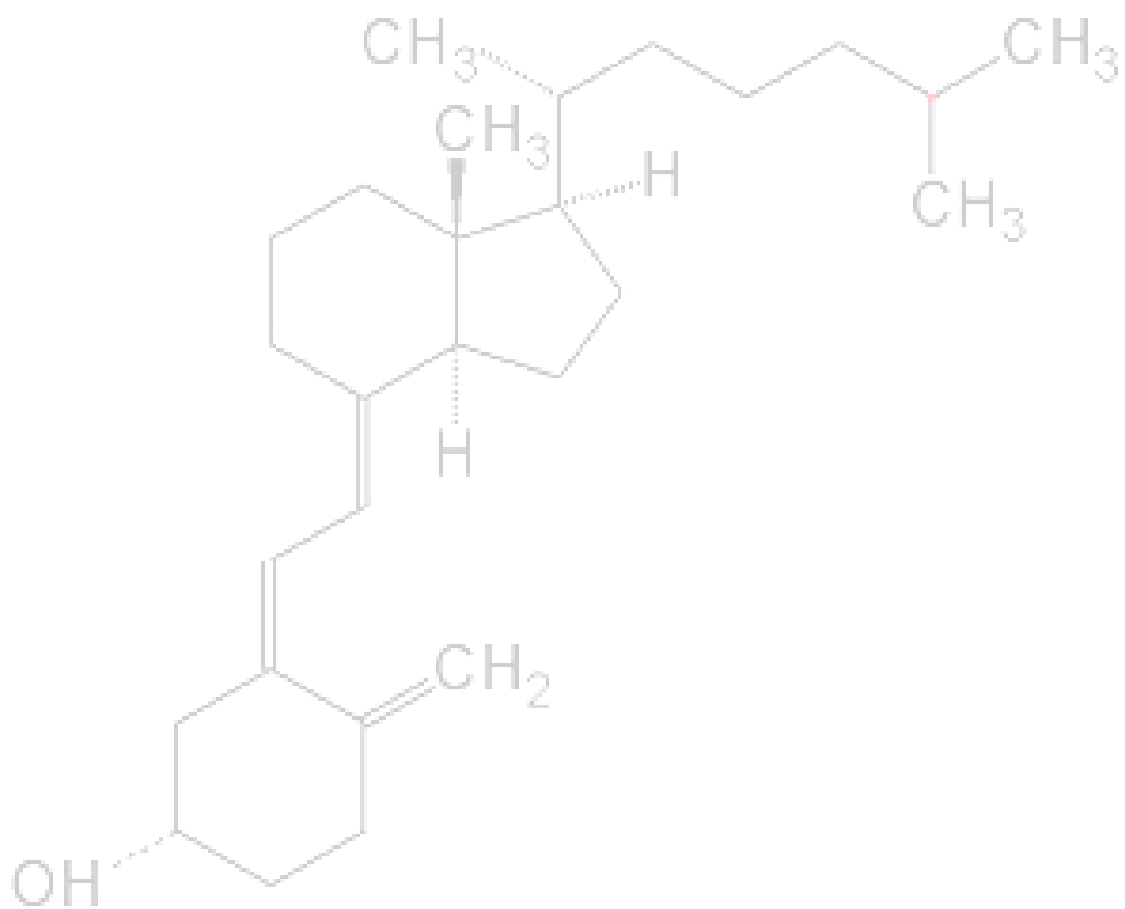
# **CAPÍTULO VI.**

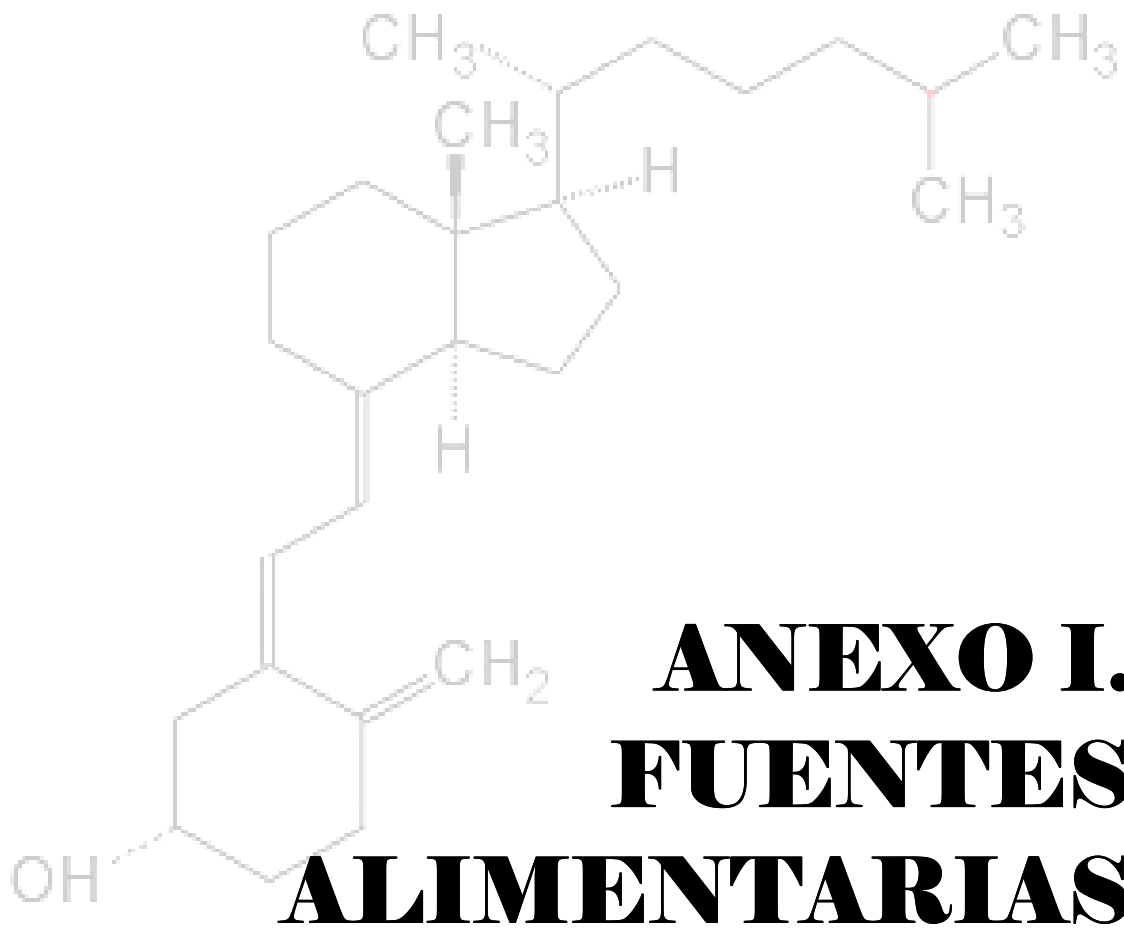
# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Dixon, K. M., Mason, R. S., *Vitamin D*, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41 (2009) 982-985.
2. Zempleni, J., & cols., *Handbook of Vitamins*, CRC Press by Tylor & Francis Group, 4th edition, USA, 2007. pp 41-109.
3. Mataix, V. J., *Nutrición humana*, Ed. Ergon, Vol. I, España, 2002. pp 203-208.
4. Hernández, R. M., Sastre G. A., *Tratado de Nutrición*, Ediciones Díaz de Santos, 1999. pp. 203-213.  
<http://books.google.com/books?id=SQLNJOsZClwC&printsec=frontcover&dq=tratado+de+nutricion+ana+sastre+gallego&hl=es#v=onepage&q=tratado%20de%20nutricion%20ana%20sastre%20gallego&f=false>. Fecha de consulta: 22/04/09.
5. Drug Card of Vitamin D<sub>3</sub>. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00169>. Fecha de consulta: 07/12/09.
6. Karlson, P., & cols., *Nomenclature of Vitamin D*, Pure and applied chemistry, Vol. 54, No. 8 (1982) 1511-1516.
7. *The Merck Index*. Merck Research Laboratories. División of Merck & Col. Inc. 12<sup>th</sup> edition, USA. 1996. pp. 10158.
8. Chem service, *Certificate of Analysis. Vitamin D<sub>3</sub>*. USA, 2000.
9. Ottaway, P. B., *The technology of vitamins in food*, Blackie Academic & Professional. Imprint by Chapman & Hall, 1<sup>st</sup> edition, UK, 1993.
10. Cezar, R. L., *Diseño, síntesis y actividad biológica de un nuevo ligando superagonista (AMCR277A) del receptor nuclear de la vitamina D*. Memoria doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, España, 2007. pp. 17-80.  
<http://www.lcezar.co.cc/Thesis%20-%20FINAL%20-%2015-10-2007%20-%20Part%20I.pdf>. Fecha de consulta: 28/04/09.
11. Lal, H. & cols., *Vitamin D: non-skeletal actions and effects on growth*, Nutrition Research, Vol. 19, No. 11 (1999) 1683-1718.
12. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. *Ingestión diaria recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos para la población mexicana*, 2001.  
[http://quetzal1.innsz.mx/index.php?option=com\\_content&task=view&id=35&Itemid=81](http://quetzal1.innsz.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=35&Itemid=81). Fecha de consulta: 14/12/09.
13. Food and Drug Administration, Recommended intakes for individuals.  
[http://books.nap.edu/openbook.php?record\\_id=6432&page=28](http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=6432&page=28) Fecha de consulta: 17/12/09.
14. Álvarez, V. L., *Enriquecimiento masivo de minerales y vitaminas en los alimentos*, Escuela de prevención y seguridad integral, España, 2003. pp 33.

15. Quattrocchi, Oscar A., Abelaira de Andrizzi, Sara I., Laba, Raúl F. *Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica*. Artes gráficas Farro, SA. Buenos Aires, Argentina, 1992.
16. Gratzfeld-Hüsgen, A., Schuser, R. *HPLC for food analysis. A primer*, Agilent technologies company, Germany, 2001.
17. Sandra, P, *Fundamentals. Resolution. Definition and nomenclature*, Journal of High Resolution Chromatography, Vol. 12 (1989) 82-86.
18. *Validación de métodos analíticos*. Resumen del curso impartido por la AFM, 2001.
19. Hernández, Hernández A., *Validación de Metodologías Instrumentales*, Tesis de Licenciatura, FQ, UNAM, México, 2005.
20. Valcárcel, M., Ríos, A., *La calidad en los laboratorios analíticos*, Editorial Reverté, edición en español, España, 2002. pp. 1-10
21. Holmgren, M., & cols. *The fitness purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*, EURACHEM Guide, 1<sup>st</sup> edition, 1998. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org) Fecha de consulta: 22/06/2009.
22. NOM-059-SSA1-1993. *Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos*. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/059ssa13.html> Fecha de consulta: 19/01/2010.
23. Catálogo de productos Supelco. Compañía Sigma-Aldrich. *Productos de Cromatografía para análisis y purificación*. 2005-2006. pp. 169
24. Catálogo de productos. Compañía Agilent. *El Catálogo fundamental de cromatografía de Agilent, la guía de referencia completa para consumibles de cromatografía y espectroscopía*. 2005-2006. pp. 681.
25. Catálogo de productos. Compañía Alltech. *Cromatografía*. No. 550. pp. 393, 398.
26. Ramírez, Hernández A., *Validación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP) para la cuantificación de vitamina A*, Tesis de licenciatura, FQ, UNAM, México, 2004.
27. Carvajal, Jarquin E. *Validación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el análisis de vitamina E*, Tesis de licenciatura, FQ, UNAM, México, 2006.
28. Fachmann & cols., *Food composition and nutrition tables 1989/90*, Ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 4<sup>th</sup> edition, Germany, 1989.

29. Astasarán, A. I., Martínez, H.A., *Alimentos. Composición y propiedades*, McGraw-Hill, Interamericana, 2da. ed., Universidad de Navarra, España, 1999.

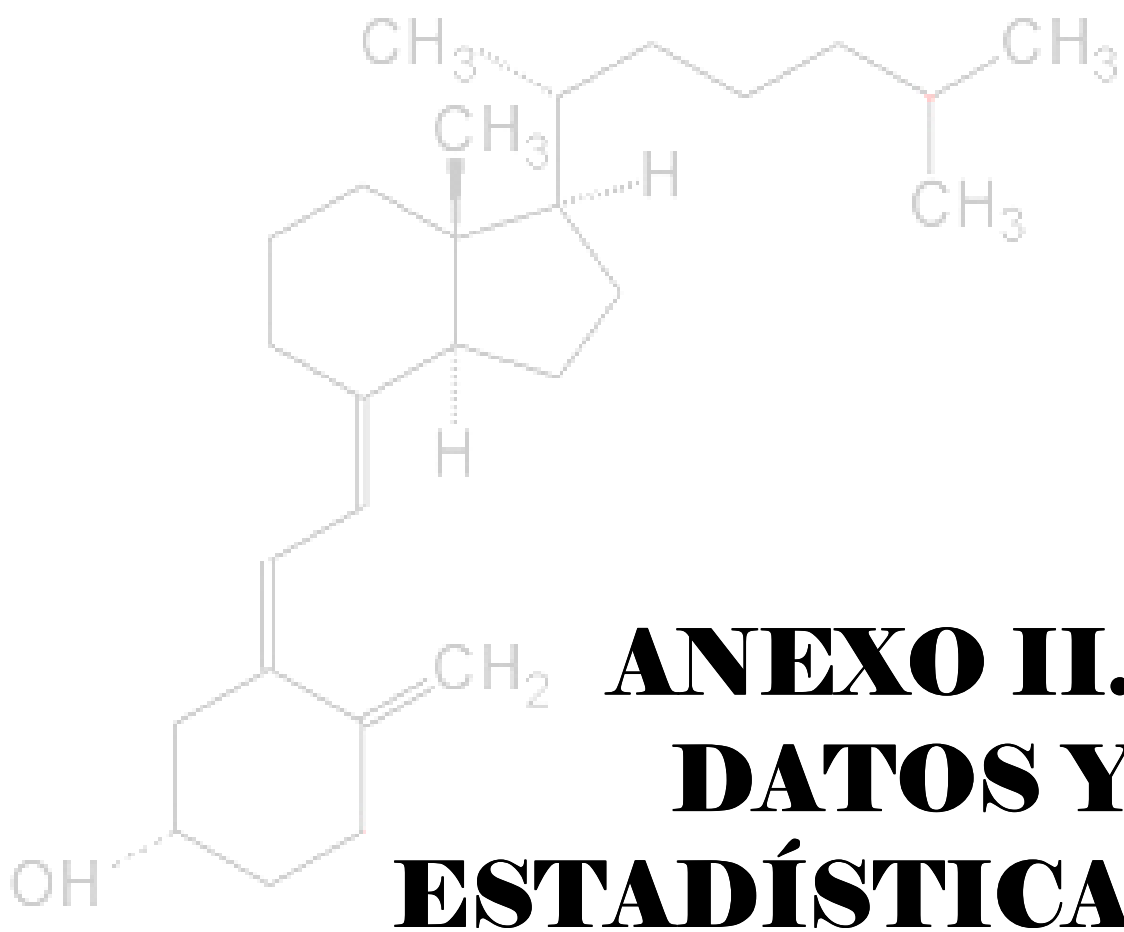




Alimento	Cantidad ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )			
	A	B	C	D
<b>Carnes</b>				
Hígado	2,20	NR	NR	NR
Carne magra	0,01	NR	NR	NR
<b>Pescado</b>				
Salmón	8,00	5-20	4,7-19	0,25 - 0,50
Sardina	7,90	6	7,5	NR
Atún	25,00	NR	2,5-8,25	NR
Lija	9,10	NR	NR	NR
Arenque	NR	7,5-42,5	25-38	NR
<b>Mariscos</b>				
Gambas y camarones	0,01	NR	NR	NR
Langostinos	18,00	NR	NR	NR
<b>Huevos</b>				
Huevo de gallina	1,75	1,5 (0,5-2,1)	2,5-12	1,8
<b>Lácteos</b>				
Yogur natural	0,06	NR	62 (2-88) ng	0,8
Queso manchego semicurado	0,28	NR	NR	0,28
Leche entera pasteurizada	0,03	0,03	60 (19-85) ng	0,03-0,37
Crema	NR	0,27	0,82 (0,38-1,25)	NR
<b>Aceites</b>				
Aceite de hígado de bacalao	210	210	NR	200-300
Mantequilla	0,76	0,80	1,3 (0,30-2,25)	NR

**Tabla 1.** Contenido de vitamina D en distintos alimentos. NR, dato no reportado  
Fuentes bibliográficas: A<sup>3</sup>, B<sup>9</sup>, C<sup>28</sup>, D<sup>29</sup>.





X	Y	X*X	Y*Y	X*Y	
0	0	0	0	0	0
1	16 545	1	273 737 025	16 545	$\bar{y}$
1	16 685	1	278 389 225	16 685	16 694,67
1	16 634	1	276 689 956	16 634	S
1	16 756	1	280 763 536	16 756	108,04
1	16 863	1	284 360 769	16 863	CV
1	16 685	1	278 389 225	16 685	0,65%
5	86 272	25	7 442 857 984	431 360	$\bar{y}$
5	87 651	25	7 682 697 801	438 255	87 416
5	87 907	25	7 727 640 649	439 535	S
5	87 658	25	7 683 924 964	438 290	587,94
5	87 661	25	7 684 450 921	438 305	CV
5	87 347	25	7 629 498 409	436 735	0,67%
10	178 489	100	3,19 E+10	1 784 890	$\bar{y}$
10	180 958	100	3,28 E+10	1 809 580	178 324,83
10	180 796	100	3,27 E+10	1 807 960	S
10	176 719	100	3,12 E+10	1 767 190	2 114,72
10	176 552	100	3,12 E+10	1 765 520	CV
10	176 435	100	3,11 E+10	1 764 350	1,19%
20	381 366	400	1,45 E+11	7 627 320	$\bar{y}$
20	379 647	400	1,44 E+11	7 592 940	380 244
20	380 408	400	1,45 E+11	7 608 160	S
20	378 809	400	1,44 E+11	7 576 180	982,31
20	379 967	400	1,44 E+11	7 599 340	CV
20	381 267	400	1,45 E+11	7 625 340	0,26%
40	756 148	1 600	5,72 E+11	30 245 920	$\bar{y}$
40	757 371	1 600	5,74 E+11	30 294 840	758 785,5
40	757 827	1 600	5,74 E+11	30 313 080	S
40	759 895	1 600	5,77 E+11	30 395 800	1 982,23
40	760 054	1 600	5,78 E+11	30 402 160	CV
40	761 418	1 600	5,80 E+11	30 456 720	0,26%
60	1 140 912	3 600	1,30 E+12	68 454 720	$\bar{y}$
60	1 154 321	3 600	1,33 E+12	69 259 260	1 151 917,67
60	1 150 212	3 600	1,32 E+12	69 012 720	S
60	1 158 884	3 600	1,34 E+12	69 533 040	6 158,44
60	1 155 278	3 600	1,34 E+12	69 316 680	CV
60	1 151 899	3 600	1,33 E+12	69 113 940	0,54%
80	1 513 273	6 400	2,29 E+12	121 061 840	$\bar{y}$
80	1 525 453	6 400	2,33 E+12	122 036 240	1 523 538,33
80	1 528 069	6 400	2,34 E+12	122 245 520	S
80	1 528 959	6 400	2,34 E+12	122 316 720	5 661,51
80	1 522 618	6 400	2,32 E+12	121 809 440	CV
80	1 522 858	6 400	2,32 E+12	121 828 640	0,37%
100	1 874 511	10 000	3,51 E+12	187 451 100	$\bar{y}$
100	1 880 697	10 000	3,54 E+12	188 069 700	1 882 724,67
100	1 877 796	10 000	3,53 E+12	187 779 600	S
100	1 886 713	10 000	3,56 E+12	188 671 300	5 936,60
100	1 889 297	10 000	3,57 E+12	188 929 700	CV
100	1 887 334	10 000	3,56 E+12	188 733 400	0,32%

Tabla 1. Áreas de los picos cromatográficos obtenidos en la prueba de intervalo amplio (0-100ppm). Además, se muestran datos calculados, útiles en el tratamiento estadístico posterior.

Sxx, Syy y Sxy	
$\sum_{i=1}^n x_i^2$	132 756
$n \sum_{i=1}^n x_i^2$	6 505 044
$\sum_{i=1}^n x_i$	1 896
$(\sum_{i=1}^n x_i)^2$	3 594 816
Sxx	2 910 228
$\sum_{i=1}^n y_i^2$	4,77 E+13
$n \sum_{i=1}^n y_i^2$	2,34 E+15
$\sum_{i=1}^n y_i$	35 877 874
$(\sum_{i=1}^n y_i)^2$	1,29 E+15
Syy	1,05 E+15
$\sum_{i=1}^n x_i y_i$	2 516 783 498
$n \sum_{i=1}^n x_i y_i$	1,23 E+11
$(\sum_{i=1}^n x_i)(\sum_{i=1}^n y_i)$	68 024 449 104
Sxy	55 297 942 298
Se	
SxxSyy	3,06 E+21
$Sxy^2$	3,06 E+21
$SxxSyy - Sxy^2$	5,79 E+17
$(n - 2)$	47
nSxx	142 601 172
$(n - 2)nSxx$	6 702 255 084
$\frac{SxxSyy - (Sxy)^2}{(n - 2)nSxx}$	86 400 989,51
Se	9 295,21

t <sub>cal</sub>	
$b - \beta$	-2 467,39
$\frac{b - \beta}{Se}$	-0,27
nSxx	142 601 172
$\bar{X}$	38,69
$n\bar{X}$	1 896
$(n\bar{X})^2$	3 594 816
$Sxx + (n\bar{X})^2$	6 505 044
$\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{X})^2}$	21,92
$\sqrt{\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{X})^2}}$	4,68
t <sub>cal</sub>	-1,2428
t <sub>0,025,47</sub>	-2,0129
Decisión	
Como t <sub>cal</sub> > t <sub>α/2, n-2</sub> , se acepta H <sub>0</sub>	
Conclusión	
La ordenada tiende al origen	

**Tabla 2.** Análisis estadístico para la prueba de linealidad de intervalo amplio (0-100ppm). Se muestra prueba de hipótesis para la ordenada y los errores estadísticos requeridos para dicha prueba.

Intervalo de Confianza para la ordenada	
$b$	-2467,39
$n\bar{X}$	1 896
$(n\bar{X})^2$	3 594 816
$S_{xx} + (n\bar{X})^2$	6 505 044
$nS_{xx}$	142 601 172
$\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}$	0,05
$\sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$	0,21
$t_{\alpha/2} * Se$	18 710,33
$t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$	3 996,18
$b + t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$	<b>1 528,79</b>
$b - t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$	<b>-6 463,57</b>

Intervalo de Confianza para la pendiente	
$m$	18 993,20
$\frac{n}{S_{xx}}$	1,68 E-05
$\sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	0,0041
$Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	38,14
$t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	76,77
$m + t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	<b>19 069,98</b>
$m - t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	<b>18 916,43</b>

**Tabla 3.** Análisis estadístico para la prueba de linealidad de intervalo amplio (0-100ppm). Se muestran intervalos de confianza al 95% para la ordenada y la pendiente.

X	Y	X*X	Y*Y	X*Y	
0	0	0	0	0	0
1,008	15 932	1,02	253 828 624	16 059,46	$\bar{Y}$
1,008	16 096	1,02	259 081 216	16 224,77	16 105,67
1,008	16 266	1,02	264 582 756	16 396,13	S
1,008	16 131	1,02	260 209 161	16 260,05	129,42
1,008	16 221	1,02	263 120 841	16 350,77	CV
1,008	15 988	1,02	255 616 144	16 115,90	0,80%
5,04	91 124	25,40	8 303 583 376	459 264,96	$\bar{Y}$
5,04	92 539	25,40	8 563 466 521	466 396,56	91 633,83
5,04	92 497	25,40	8 555 695 009	466 184,88	S
5,04	91 145	25,40	8 307 411 025	459 370,80	687,56
5,04	91 295	25,40	8 334 777 025	460 126,80	CV
5,04	91 203	25,40	8 317 987 209	459 663,12	0,75%
10,08	193 045	101,61	3,73 E+10	1 945 893,60	$\bar{Y}$
10,08	193 726	101,61	3,75 E+10	1 952 758,08	191 702,33
10,08	193 161	101,61	3,73 E+10	1 947 062,88	S
10,08	190 572	101,61	3,63 E+10	1 920 965,76	1 802,27
10,08	190 092	101,61	3,61 E+10	1 916 127,36	CV
10,08	189 618	101,61	3,60 E+10	1 911 349,44	0,94%
15,024	289 541	225,72	8,38 E+10	4 350 063,98	$\bar{Y}$
15,024	289 642	225,72	8,39 E+10	4 351 581,41	289 851,33
15,024	290 177	225,72	8,42 E+10	4 359 619,25	S
15,024	290 025	225,72	8,41 E+10	4 357 335,60	246,27
15,024	289 746	225,72	8,40 E+10	4 353 143,90	CV
15,024	289 977	225,72	8,41 E+10	4 356 614,45	0,09%
19,92	385 358	396,81	1,49 E+11	7 676 331,36	$\bar{Y}$
19,92	389 163	396,81	1,52 E+11	7 752 126,96	388 068,50
19,92	389 975	396,81	1,52 E+11	7 768 302,00	S
19,92	388 164	396,81	1,51 E+11	7 732 226,88	1 571,63
19,92	387 667	396,81	1,50 E+11	7 722 326,64	CV
19,92	388 084	396,81	1,51 E+11	7 730 633,28	0,41%

**Tabla 4.** Áreas de los picos cromatográficos obtenidos en la prueba de intervalo corto (0-20ppm). Además, se muestran datos calculados, útiles en el tratamiento estadístico posterior.

Sxx, Syy y Sxy	
$\sum_{i=1}^n x_i^2$	4 503,31
$n \sum_{i=1}^n x_i^2$	139 602,49
$\sum_{i=1}^n x_i$	306,43
$(\sum_{i=1}^n x_i)^2$	93 900,57
Sxx	45 701,92
$\sum_{i=1}^n y_i^2$	1,68 E+12
$n \sum_{i=1}^n y_i^2$	5,21 E+13
$\sum_{i=1}^n y_i$	5 864 170
$(\sum_{i=1}^n y_i)^2$	3,44 E+13
Syy	1,77 E+13
$\sum_{i=1}^n x_i y_i$	86 972 877,02
$n \sum_{i=1}^n x_i y_i$	2 696 159 188
$(\sum_{i=1}^n x_i)(\sum_{i=1}^n y_i)$	1 796 969 341
Sxy	899 189 846,3
Se	
SxxSyy	8,09 E+17
$Sxy^2$	8,09 E+17
$SxxSyy - Sxy^2$	1,82 E+14
$(n - 2)$	29
nSxx	1 416 759,61
$(n - 2)nSxx$	41 086 028,61
$\frac{SxxSyy - (Sxy)^2}{(n - 2)nSxx}$	4 421 332,42
Se	2 102,70

t <sub>cal</sub>	
$b - \beta$	-3 563,84
$\frac{b - \beta}{Se}$	-1,70
nSxx	1 416 759,61
$\bar{X}$	9,88
$n\bar{X}$	306,43
$(n\bar{X})^2$	93 900,57
$Sxx + (n\bar{X})^2$	139 602,49
$\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{X})^2}$	10,15
$\sqrt{\frac{nSxx}{Sxx + (n\bar{X})^2}}$	3,19
t <sub>cal</sub>	-5,3993
t <sub>0,025,47</sub>	-2,0395
Decisión	
Como t <sub>cal</sub> < t <sub>α/2, n-2</sub> , H <sub>0</sub> se rechaza y se acepta H <sub>1</sub>	
Conclusión	
La ordenada no tiende al origen	

Tabla 5. Análisis estadístico para la prueba de linealidad de intervalo corto (0-20ppm). Se muestra prueba de hipótesis para la ordenada y los errores estadísticos requeridos para dicha prueba.

Intervalo de Confianza para la ordenada	
$b$	-5 901,15
$n\bar{X}$	306,43
$(n\bar{X})^2$	93 900,57
$S_{xx} + (n\bar{X})^2$	135 099,19
$nS_{xx}$	1 235 958,50
$\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}$	0,11
$\sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$	0,33
$t_{\alpha/2} * Se$	3 809,21
$t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$	1 259,39
$b + t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$	-4 641,77
$b - t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{X})^2}{nS_{xx}}}$	-7 160,54

Intervalo de Confianza para la pendiente	
$m$	19 714,67
$\frac{n}{S_{xx}}$	0,0007
$\sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	0,03
$Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	50,18
$t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	102,79
$m + t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	19 817,46
$m - t_{\alpha/2} Se \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$	19 611,88

**Tabla 6.** Análisis estadístico para la prueba de linealidad de intervalo corto (0-20ppm). Se muestran intervalos de confianza al 95% para la ordenada y la pendiente.

Estándar	Áreas					$\bar{x}$	s	CV
1	377 835	391 127	396 527	397 542	399 402	392 486,6	8 749,61	2,23%
2	406 826	410 746	410 223	410 721	409 002	409 503,6	1 655,62	0,40%
3	408 855	408 206	409 821	412 179	410 152	409 842,6	1 517,30	0,37%
4	403 743	403 632	405 410	406 356	406 203	405 068,8	1 311,66	0,32%
5	407 817	407 525	410 243	406 238	408 942	408 153,0	1 513,70	0,37%
6	404 479	407 005	407 661	407 576	408 754	407 095,0	1 593,39	0,39%
7	408 000	407 582	406 573	408 228	408 883	407 853,2	856,59	0,21%
8	409 087	411 666	411 778	412 209	412 827	411 513,4	1 430,92	0,35%
9	404 059	403 334	403 891	405 040	405 917	404 448,2	1 026,04	0,25%

Tabla 7. Áreas de los picos cromatográficos obtenidos en la prueba de precisión a intervalo amplio para una concentración de 21ppm.

$\chi^2_{calc}$	
$\bar{x}$	406 218,27
s	6 084,19
CV <sub>exp</sub>	1,5%
s <sup>2</sup>	37 017 322
n	45
n - 1	44
CV <sub>teórico</sub>	5%
$\left(\frac{CV_{teórico}}{100}\right)\bar{x}$	20 310,91
$\sigma^2$	412 533 200
$(n-1)\sigma^2$	1 628 762 169
$\chi^2_{calc}$	3,9482
$\chi^2_{0,05,44}$	60,4809
<b>Decisión</b>	
Como $\chi^2_{calc} < \chi^2_{\alpha, n-1}$ , se acepta H <sub>0</sub>	
<b>Conclusión</b>	
El sistema es preciso por lo menos al 95%	
CV <sub>teórico</sub>	2%
$\left(\frac{CV_{teórico}}{100}\right)\bar{x}$	8 124,37
$\sigma^2$	66 005 312,1
$(n-1)\sigma^2$	1 628 762 169
$\chi^2_{calc}$	24,6762
$\chi^2_{0,05,44}$	60,4809
<b>Decisión</b>	
Como $\chi^2_{calc} < \chi^2_{\alpha, n-1}$ , se acepta H <sub>0</sub>	
<b>Conclusión</b>	
El sistema es preciso por lo menos al 98%	

Intervalo de confianza para s	
n - 1	44
$(n-1)s^2$	1 628 762 169
$\chi^2_{0,975,44}$	27,58
$\chi^2_{0,025,44}$	64,20
$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{0,025,44}}$	25 369 549,7
$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{0,025,44}}}$	<b>5 036,82</b>
$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{0,975,44}}$	59 067 554
$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{0,975,44}}}$	<b>7 685,54</b>

Tabla 8. Análisis estadístico para la prueba de precisión a intervalo amplio. Se muestran pruebas de hipótesis para un CV<sub>teórico</sub> del 5% y 2% e intervalo de confianza para s.



Estándar	Áreas					$\bar{x}$	s	CV
1	176 463	181 615	181 872	181 806	182 301	180 811,4	2 443,74	1,35%
2	180 705	181 023	181 251	181 523	181 711	181 242,6	398,54	0,22%
3	184 127	184 492	184 282	184 027	185 132	184 412,0	439,08	0,24%
4	182 975	181 921	181 684	181 995	182 204	182 155,8	494,22	0,27%
5	182 482	182 579	182 109	182 539	183 114	182 564,6	359,55	0,20%
6	181 987	181 363	181 659	181 657	181 467	181 626,6	238,13	0,13%
7	181 912	181 833	182 267	181 619	181 681	181 862,4	254,55	0,14%
8	179 352	178 741	179 613	179 451	179 024	179 236,2	350,64	0,20%
9	179 085	178 642	178 926	179 371	179 536	179 112,0	354,64	0,20%

**Tabla 9.** Áreas de los picos cromatográficos obtenidos en la prueba de precisión a intervalo corto para una concentración de 10ppm.

$\chi^2_{calc}$	
$\bar{x}$	181 447,07
s	1 757,67
$CV_{exp}$	0,97%
$s^2$	3 089 415,06
n	45
n - 1	44
$CV_{teórico}$	5%
$\left(\frac{CV_{teórico}}{100}\right)\bar{x}$	9 072,35
$\sigma^2$	82 307 595
$(n-1)s^2$	135 934 263
$\chi^2_{calc}$	1,6515
$\chi^2_{0,05,44}$	60,4809
Decisión	
Como $\chi^2_{calc} < \chi^2_{\alpha, n-1}$ , se acepta $H_0$	
Conclusión	
El sistema es preciso por lo menos al 95%	
$CV_{teórico}$	2%
$\left(\frac{CV_{teórico}}{100}\right)\bar{x}$	3 628,94
$\sigma^2$	13 169 215,2
$(n-1)s^2$	135 934 263
$\chi^2_{calc}$	10,3221
$\chi^2_{0,05,44}$	60,4809
Decisión	
Como $\chi^2_{calc} < \chi^2_{\alpha, n-1}$ , se acepta $H_0$	
Conclusión	
El sistema es preciso por lo menos al 98%	

Intervalo de confianza para s	
n - 1	44
$(n-1)s^2$	135 934 262,8
$\chi^2_{0,975,44}$	27,58
$\chi^2_{0,025,44}$	64,20
$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{0,025,44}}$	2 117 307,92
$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{0,025,44}}}$	1 455,1
$\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{0,975,44}}$	4 929 697,23
$\sqrt{\frac{(n-1)s^2}{\chi^2_{0,975,44}}}$	2 220,29

**Tabla 10.** Análisis estadístico para la prueba de precisión a intervalo corto. Se muestran pruebas de hipótesis para un  $CV_{teórico}$  del 5% y 2% e intervalo de confianza para s.

Estándar	Áreas					$\bar{x}$	s	CV
1	377 835	391 127	396 527	397 542	399 402	392 486,6	8 749,61	2,23%
2	406 826	410 746	410 223	410 721	409 002	409 503,6	1 655,62	0,40%
3	408 855	408 206	409 821	412 179	410 152	409 842,6	1 517,30	0,37%
4	403 743	403 632	405 410	406 356	406 203	405 068,8	1 311,66	0,32%
5	407 817	407 525	410 243	406 238	408 942	408 153,0	1 513,70	0,37%
6	404 479	407 005	407 661	407 576	408 754	407 095,0	1 593,39	0,39%
7	408 000	407 582	406 573	408 228	408 883	407 853,2	856,59	0,21%
8	409 087	411 666	411 778	412 209	412 827	411 513,4	1 430,92	0,35%
9	404 059	403 334	403 891	405 040	405 917	404 448,2	1 026,04	0,25%

Tabla 11. Áreas de los picos cromatográficos obtenidos el día cero. Prueba de estabilidad.

Estándar	Áreas					$\bar{x}$	s	CV
1	380 533	393 168	398 153	399 907	401 351	394 622,4	8 460,09	2,14%
2	412 004	414 195	413 351	414 826	414 322	413 739,6	1 105,69	0,27%
3	412 608	412 320	413 310	414 697	414 473	413 481,6	1 072,62	0,26%
4	408 493	409 336	408 056	409 212	409 195	408 858,4	557,63	0,14%
5	411 318	411 813	407 174	412 331	411 393	410 805,8	2 069,89	0,50%
6	405 591	408 914	407 013	406 111	407 238	406 973,4	1 274,00	0,31%
7	411 209	409 211	408 867	407 629	408 923	409 167,8	1 292,93	0,32%
8	411 492	411 854	411 209	413 880	414 426	412 572,2	1 473,76	0,36%
9	404 752	406 076	406 917	407 057	405 420	406 044,4	980,81	0,24%

Tabla 12. Áreas de los picos cromatográficos obtenidos el día seis de almacenamiento. Prueba de estabilidad.

Estándar	Áreas					$\bar{x}$	s	CV
1	398 078	408 781	408 135	410 815	411 977	407 557,2	5 518,94	1,35%
2	416 451	417 457	417 537	420 746	416 423	417 722,8	1 771,43	0,42%
3	416 809	406 879	417 586	416 273	414 128	414 335,0	4 361,20	1,05%
4	405 432	404 917	402 717	404 804	407 676	405 109,2	1 770,97	0,44%
5	410 668	412 921	410 416	414 330	412 213	412 109,6	1 623,71	0,39%
6	406 813	410 823	409 097	413 674	-----	410 101,8	2 892,90	0,71%
7	410 532	411 113	411 286	411 828	409 954	410 942,6	720,56	0,18%
8	411 253	412 021	410 284	412 091	412 277	411 585,2	825,81	0,20%
9	404 104	404 672	405 027	403 806	406 340	404 789,8	988,87	0,24%

Tabla 13. Áreas de los picos cromatográficos obtenidos el día trece de almacenamiento. Prueba de estabilidad.

Día cero	Día Seis	Día Trece
$\bar{x} = 406 218,27$	$\bar{x} = 408 473,96$	$\bar{x} = 410 481$
$s = 6 084,19$	$s = 6 249,2$	$s = 4 758,93$
$s^2 = 37 017 322$	$s^2 = 39 052 509,3$	$s^2 = 22 647 376,1$
$CV = 1,5\%$	$CV = 1,53\%$	$CV = 1,16\%$
$n = 45$	$n = 45$	$n = 44$
$n - 1 = 44$	$n - 1 = 44$	$n - 1 = 43$

Tabla 14. Datos experimentales de los días de almacenamiento.

<b>Prueba de hipótesis para las varianzas. Comparación entre los días cero y seis</b>	
$F_{cal}$	1,055
$F_{0.025,44,44}$	1,8197
<b>Decisión</b>	
Como $F_{cal} < F_{\alpha/2, n_1-1, n_2-1}$ , se acepta $H_0$	
<b>Conclusión</b>	
El analista mantuvo la misma precisión. Usar la ecuación de t de Student cuando $s_1^2 = s_2^2$ .	
<b>Prueba de hipótesis sobre las medias cuando <math>s_1^2 = s_2^2</math></b>	
$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	2 255,69
$(n_1 - 1)s_1^2$	1 628 762 169
$(n_2 - 1)s_2^2$	1 718 310 408
$(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2$	3 347 072 577
$\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}$	57 853,89
$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}}$	0,039
$n_1 n_2$	2 025
$n_1 + n_2 - 2$	88
$n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)$	178 200
$n_1 + n_2$	90
$\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}$	1 980
$\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$	44,5
$t_{cal}$	1,7349
$t_{0.025,88}$	1,9873
<b>Decisión</b>	
Como $t_{cal} < t_{\alpha/2, n_1 + n_2 - 2}$ , se acepta $H_0$	
<b>Conclusión</b>	
Las medias provienen de la misma población, por lo tanto es estable.	

**Tabla 15.** Análisis estadístico entre el día cero y seis de almacenamiento

<b>Prueba de hipótesis para las varianzas. Comparación entre los días cero y trece</b>	
$F_{cal}$	1,6345
$F_{0.025,44,44}$	1,8281
<b>Decisión</b>	
Como $F_{cal} < F_{\alpha/2, n_1-1, n_2-1}$ , se acepta $H_0$	
<b>Conclusión</b>	
El analista mantuvo la misma precisión. Usar la ecuación de t de Student cuando $s_1^2 = s_2^2$ .	
<b>Prueba de hipótesis sobre las medias cuando <math>s_1^2 = s_2^2</math></b>	
$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	- 4 262,73
$(n_1 - 1)s_1^2$	1 628 762 169
$(n_2 - 1)s_2^2$	973 837 172
$(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2$	2 602 599 341
$\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}$	51 015,68
$\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}}$	- 0,084
$n_1 n_2$	1 980
$n_1 + n_2 - 2$	87
$n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)$	172 260
$n_1 + n_2$	89
$\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}$	1 935,51
$\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$	43,99
$t_{cal}$	- 3,6761
$- t_{0.025,87}$	- 1,9876
<b>Decisión</b>	
Como $t_{cal} < - t_{\alpha/2, n_1 + n_2 - 2}$ , se rechaza $H_0$ y por consiguiente se acepta $H_1$	
<b>Conclusión</b>	
Las medias no provienen de la misma población, por lo que no es estable.	

**Tabla 16.** Análisis estadístico entre el día cero y trece de almacenamiento.