



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Validación de un Cromatógrafo de Líquidos de
Alta Eficiencia para el análisis de vitamina K₃

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
LUIS RODRIGO GONZÁLEZ COVARRUBIAS



MÉXICO DF

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente ERNESTINA CERVERA FLORES

Vocal FRANCISCO ROJO CALLEJAS

Secretario ADOLFO GARCIA OSUNA

1er sup. GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI

2do sup JOSE GUADALUPE DE LA ROSA CANALES

Sitio donde 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. Silvia de Jesús Mendoza Arellano

Sustentante

Luis Rodrigo González Covarrubias

Dedicatorias

Deseo agradecer a mis padres, Juan Jaime González García y Lilia Covarrubias Navarro, a mis hermanos Vanessa, Jaime, Tania y Aletia porque yo no sería lo que soy sin ellos. Gracias por todo el apoyo, las pláticas, los consejos, las llamadas de atención, las peleas, los malos momentos y sobre todo los buenos, todo eso forja la vida en una persona.

Agradezco al profesor Adolfo, a la maestra Silvia y a la maestra Ernestina que me abrieron las puertas para trabajar en su laboratorio hace ya dos años. Gracias por los consejos, las ayudas, los regaños y llamadas de atención, por enseñarme que el trabajo bien hecho es la manera en que todo profesionista debe darse a conocer y que nada mejor, trae excelentes recompensas.

Agradezco de antemano a la Universidad Nacional Autónoma de México, que hace ya más de 8 años me abrió sus puertas y me brindó una educación media superior y posteriormente una licenciatura. Estaré en deuda eterna por ello. Siempre será un orgullo tener el corazón azul y la piel dorada, iiiGOYA!!!

Índice

	Páginas
<u>Capítulo I Introducción y Objetivos.....</u>	<u>1</u>
<u>Capítulo II Marco Teórico</u>	
Vitamina K.....	3
Cromatografía de Líquidos de Alta eficiencia (CLAE).....	20
Validación	33
<u>Capítulo III Desarrollo Experimental</u>	
Material	42
Instrumentación	42
Reactivos.....	43
Condiciones Óptimas de trabajo	43
Linealidad de sistema	44
Precisión de sistema	45
Estabilidad de vitamina K3.....	45
<u>Capítulo IV Resultados y Análisis de Resultados</u>	
Validación de sistema	47
Linealidad de Sistema	47
Precisión de sistema	53
Estabilidad de Estándares	58
<u>Capítulo V Conclusiones.....</u>	<u>63</u>
<u>Capítulo IV Bibliografía</u>	<u>65</u>
<u>ANEXOS.....</u>	<u>67</u>

INTRODUCCIÓN

La Vitamina K es una vitamina que posee actividad antihemorrágica, su presencia es esencial para la manifestación de la cascada de coagulación y pertenece al conjunto de vitaminas liposolubles. La vitamina K₃ se puede obtener mediante síntesis orgánica, algunos de sus análogos son sintetizados por plantas y bacterias incluyendo aquellas que se encuentran simbioses en el intestino de humanos y animales, también es consumida de algunas plantas de donde se obtiene las cantidades de vitamina K necesarias para un correcto funcionamiento de la homeostasia sanguínea de la coagulación.

Como es muy importante su presencia, la vitamina K₃ (por ser la más estable) se adiciona a los alimentos utilizados en ganadería (cereales), para la alimentación de animales domésticos (croquetas) y en alimentos consumidos por humanos, además la vitamina K₃, está disponible como disoluciones inyectables (como bisulfito sódico de menadiona) para el tratamiento de hemorragias tras intervenciones quirúrgicas mayores.

La Comisión Federal para la Protección Contra riesgos Sanitarios (Cofepris), la Farmacopea de de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP por sus siglas en inglés), en colaboración con la Food and Drugs Administration de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés), establecen a la industria Químico Farmacéutica, que el contenido del principio activo en las formulaciones especificado en el marbete de cualquier medicamento debe ser el mismo para todos los lotes fabricados, es decir, el contenido del activo debe encontrarse dentro de especificaciones. Con estos márgenes tan estrictos en calidad, compete a esta industria la elaboración de medicamentos seguros, efectivos y eficaces, para poder ser presentados como producto terminado en una forma farmacéutica (disoluciones orales, tabletas, cápsulas, suspensiones entre otros,) y presentarlos al consumidor, de una manera más cómoda según lo requiera.

Por esto, se deben contar con técnicas analíticas que permitan su cuantificación y asegurar mantener los niveles adecuados que establece en dichos productos así como su calidad de acuerdo a la NOM-059-SSA1-2006, que establece buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, que obliga validar los procesos de fabricación.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE por sus siglas), ha sido una de las mejores técnicas para la separación y cuantificación de la vitamina K y sus metabolitos, ya que es rápida, precisa y proporciona alta resolución.

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

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

OBJETIVOS

Los siguientes objetivos fueron planteados para el desarrollo de esta tesis de investigación:

- Validar el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia del laboratorio 3F para el análisis de vitamina K₃, 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.

VITAMINA K^{1, 2, 3}Antecedentes generales de la vitamina K

El descubrimiento de la vitamina K deriva de una serie de experimentos realizados por varios investigadores, que en conjunto, no sólo pudieron aislar esta vitamina, sino que también determinaron su función biológica en seres vivos.

Henrik Dam estudiaba la posible función del colesterol en la dieta de los pollos, cuando notó que la dieta de estos animales, (la cual había sido sometida a una extracción con solventes orgánicos no polares lo cual removía los esteroides), provocaba en ellos el desarrollo de hemorragias musculares y coagulación lenta, el mismo efecto fue observado por . McFarlane, Holst y Halbrook llegando a la conclusión que estas enfermedades y con ello la muerte de estos animales, no podía ser curada con ninguna de las vitaminas conocidas.

Henrik Dam continuó con su investigación, y fue en 1935 cuando propuso que la vitamina antihemorrágica de los pollos, era una nueva vitamina liposoluble la cual llamó vitamina K, por la palabra alemana de "Koagulation". El reporte de Henrik Dam describió el éxito que tuvo curando las muertes por hemorragia y utilizando el extracto oleoso de la alfalfa (fuente de vitamina K), señaló claramente el desarrollo de la actividad antihemorrágica. Henrik Dam y Karrer en la universidad de Zúrich aislaron la vitamina K de la alfalfa como un aceite amarillo.

Otros estudios reportaron que el grupo funcional activo de la vitamina K era la quinona, posteriormente cristalizaron la vitamina K.

La vitamina K₁ fue caracterizada como 2-metil-3-fenil-1,4 naftoquinona, la cual fue sintetizada por MacCorquodale. Esta forma aislada de vitamina K, provenía de la carne putrefacta de pescado, que en contraste con el aceite aislado de la alfalfa, era un producto cristalino, y estudios posteriores demostraron que este producto se trataba de la vitamina K₂, dicha vitamina contenía una cadena insaturada en la posición 3 del anillo de la naftoquinona. Otros estudios demostraron que la carne putrefacta de pescado contenía un gran número de diferentes vitaminas K₂, las cuales diferían en la cadena de grupos en la posición 3.

El nombre la vitamina K, este fue asignado por la IUPAC con un descriptor general como es 2-metil-1,4-naftoquinona al igual que todos los derivados de sus compuestos que exhiben una actividad antihemorrágica.

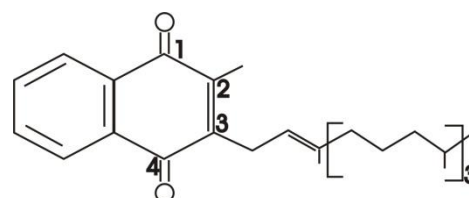
La vitamina K es producido por plantas verdes y generalmente es llamado vitamina K₁ pero es preferible llamarlo filoquinona.

El primer compuesto aislado de la carne de pescado putrefacto fue la vitamina K₂, que es una de las series de los compuestos de la vitamina K con la diferencia de tener cadenas insaturadas llamadas multifenilmenaquinonas las cuales son sintetizadas por un gran número de bacterias facultativas y aeróbicas estrictas. El compuesto principal de la serie de vitamina K es la 2-metil-1,4-naftoquinona la cual fue llamada vitamina K₃ pero más correcto y común designarla como menadiona. MK-4 es un producto bacterial minoritario el cual también puede ser sintetizado por animales por medio de la alquilación de la menadiona a través de la degradación de la filoquinona de un proceso aún no dilucidado.

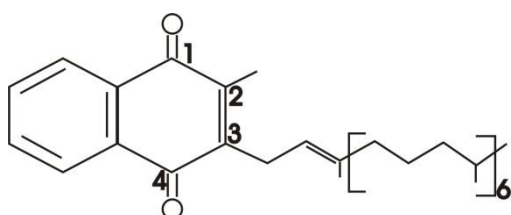
En resumen la denominación de la vitamina K incluye el análisis de un conjunto de sustancias de carácter vitamínico derivadas de la 2-metil-1,4-naftoquinona.

Las formas naturales antes mencionadas se enlistan a continuación en orden:

Filoquinona: o llamada preferentemente fitomenadiona 2-metil-3-fitol-1,4-naftoquinona (vitamina K₁), de origen vegetal, con una cadena isoprenoide lateral que proviene del fitilo con 4 grupos isoprenoide. Es sintetizada también por bacterias facultativas y anaerobios



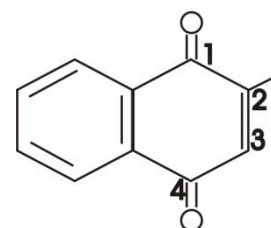
obligados.



Menaquinonas: Vitamina K₂, de origen microbiano, posee una cadena lateral de tipo isoprenoide de longitud variable (entre 20 y 60 átomos de carbono), siendo las más

comunes las que tiene de 6 a 10 grupos de carbono isoprenoides. Es también llamada Menaquinona-7 (MK-7)

La menadiona (vitamina K₃ o 2-metil-1,4-naftoquinona) es de origen sintético y carece de cadena lateral. Algunas sales de la menadiona (con difosfato de sodio o bisulfito de sodio) son hidrosolubles.



Los vegetales, hortalizas y legumbres contienen vitamina K₁ (filoquinona) y los productos animales una mezcla de vitamina K₁ y K₂. Por otra parte las bacterias colónicas sintetizan menaquinonas.

Las vitaminas K son liposolubles a excepción de las sales que se citaron anteriormente y estas permiten la administración parenteral.

Aislamiento de vitamina K¹

La vitamina K puede ser aislada de material biológico por métodos estándar utilizados para obtener lípidos fisiológicamente activos. El proceso suele ser complicado debido a la baja concentración de este producto en las extracciones iniciales, estas extracciones usualmente se hacen con el uso de algún tipo de condiciones desecantes utilizando cloroformo-metanol, o moliendo el tejido completo y utilizando sulfato de sodio anhidro y luego extrayendo con acetona seguido con hexano o éter.

No hay que olvidar que la extracción con solventes orgánicos también disuelve un gran número de compuestos no deseados entre los que destacan mayoritariamente los lípidos, por lo que el empleo de ácido silícico facilita el fraccionamiento de los lípidos en crudo. Un gran número de formas de vitamina pueden ser separadas unas de otras y de otros lípidos por cromatografía de partición en fase reversa, con la cual se obtienen buenas concentraciones de la vitamina K de los tejidos.

Se han desarrollado métodos más eficientes para extraer la vitamina K de diversas fuentes de alimentos, con lo que ahora está disponible una base de datos del contenido de esta vitamina en algunos alimentos.

Propiedades Físicas y Químicas de la vitamina K¹

La fórmula molecular general es $C_{11}H_8O_2$, que corresponde al anillo del benceno fusionado con el anillo de naftoquinona y un grupo metilo.

La vitamina K₃ o menadiona es presentada como cristales amarillos, con un débil olor acre, es estable al contacto con el aire, es insoluble al agua, un gramo se disuelve en 60mL de alcohol, 10mL de Benceno, o en 50mL de aceites vegetales, es moderadamente soluble en cloroformo y tetracloruro de carbono. Agentes reductores y disoluciones alcalinas la descomponen.

La vitamina K₁ o filoquinonas son aceites a temperatura ambiente; varias de las menaquinonas se cristalizan mediante la utilización de disolventes orgánicos y éstas tienen puntos de ebullición de 35°C a 60°C dependiendo de la extensión de la cadena isoprenoide.

Análogos y su función biológica^{1,3}

Después del descubrimiento de la vitamina K un gran número de compuestos análogos con propiedades antihemorrágicas fueron sintetizados en diversos laboratorios y su actividad biológica fue comparada entre sí.

Las características estructurales encontradas para ser esencial su actividad biológica incluyen el anillo de la naftoquinona, un grupo metil en la posición 2 al anillo,

una unidad insaturada de isoprenoide adyacente al anillo, y la configuración trans del poliisoprenoide del lado de la cadena.

La actividad de varias estructuras análogas a la vitamina K en ensayos completos con sistemas animales es la suma de la absorción intestinal relativa, del transporte y del metabolismo y efectividad del compuesto en el sitio activo.

Muchos de los datos de la actividad biológica que se tienen de varios compuestos, se obtuvieron por el uso oral de una dosis rehabilitatoria durante 18hrs, utilizando vitamina K en pollos que tenían dicha deficiencia y que fue administrada oralmente, se encontró que durante dicha administración el isopropenide análogo con grupos 3-5 isoprenoide tenían la máxima actividad. La baja eficacia de los análogos de isoprenoide en este tipo de ensayo puede ser por la absorción relativamente pobre de estos compuestos. Matschiner y Taggart han mostrado que cuando se realiza una inyección en corazón con vitamina K a ratas deficientes de ésta, los análogos isprenoides de más alto peso molecular de la serie de la menaquinona son los más activos.

Formas comerciales de la vitamina K para animales y humanos¹

Pocas formas de vitamina K son comercialmente importantes, el mayor uso de vitamina K en la industria animal, es en la dieta de las aves de corral y en la de cerdos.

La menadiona por si misma tiene la máxima actividad biológica en aves que tienen dicha deficiencia, pero su efectividad depende de la presencia de lípidos en su dieta, los cuales promueven su absorción.

Existen problemas en la estabilidad de la vitamina en ciertos productos alimenticios y es por ello que se utilizan los análogos que son solubles en agua. Para obtener las formas solubles de la menadiona, se le adiciona bisulfito de sodio, esta es la que se utiliza comercialmente, pero también es un tanto inestable en ciertas mezclas de alimentos. La presencia en exceso de bisulfito de sodio, cristaliza como complejo a la vitamina K, este complejo, es conocido como bisulfito de menadiona . Esta forma comercial también se utiliza en la industria farmacéutica, la cual se preparan disoluciones inyectables de bisulfito de menadiona, las cuales se utilizan para problemas con deficiencias en la cascada de coagulación por carencia de vitamina K, o de forma rehabilitadora para mujeres después del parto, la forma comercial es conocida como K 50 y su concentración de de 50mg en 5mL

Una tercera forma que es soluble en agua, es la sal formada por la adicción de dimetilpirinidol y es llamado bisulfito de pirinidol de menadiona, el cual se vende como Kappadiona o Synkayvite, la cual fue utilizada para prevenir la muerte por hemorragias de los embriones de pollo, pero el peligro de hiperbilirrubinemia se asoció

a la utilización de menadiona y esto ha permitido el uso de filoquinona como la vitamina deseada para su uso.

Antagonistas de la acción de vitamina K¹

El dicumarol ha sido utilizado satisfactoriamente como agente clínico en la terapia contra la coagulación. El más exitoso de estos compuestos, ambos utilizados clínicamente, además de ser utilizado como raticida ha sido la warfarina. Aunque la warfarina es la droga que tiene un gran uso alrededor del mundo en la terapia oral de anticoagulantes, existen otros derivados de la cumarina que tienen efectos similares.

Análisis instrumental de vitamina K^{1, 4, 5}

La actividad de los compuestos con vitamina K tienen la estructura 1,4-naftoquinona, y por lo tanto poseen las mismas propiedades químicas esperadas para todas los análogos de la vitamina K. La oxidación de la vitamina K exhibe un espectro ultravioleta, que es característico de los núcleos de las naftoquinonas, con cuatro diferentes picos, entre 240 y 280nm y la última absorción con un pico más débil alrededor de 320-330nm. El coeficiente de absorción molar para ambas poliquinonas y varias menadionas es alrededor de 19,000. El espectro de absorción cambia drásticamente en la reducción a hidroquinona, con un mejoramiento de la respuesta de absorción a los 245nm y la desaparición del pico a 270nm.

El número de interferencias presentes en los extractos crudos, es significativa, por lo cual se requiere la separación de estos compuestos antes de leer en el espectro de absorción de UV-Visible para su uso posterior. El método espectrofotométrico al UV/ V se usa para la determinación de cantidades considerables de vitamina K presentes en fuentes naturales. Sin embargo el uso de la técnica de Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) nos permite la cuantificación de esta vitamina en el orden de partes por millón, es decir, cantidades traza de esta vitamina presente en fuentes naturales de alimentos.

La separación de un gran número de mezclas de menaquinonas en fuentes de bacterias y animales se logró primeramente en cromatografía en capa fina. Todas las separaciones que envuelven extractos concentrados de vitamina K (solo aquellas provenientes de plantas y animales), se extraen utilizando una luz tenue o ausencia de la misma, para minimizar la descomposición al UV de la vitamina. Los compuestos de la vitamina K son sensibles a la alcalinidad, pero relativamente estables a una atmósfera oxidante y al calor por lo que pueden ser destiladas a presión reducida con una pequeña descomposición. Para la cuantificación de vitamina K en suero y tejidos de

animales eventualmente se utiliza el equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta

Carnes y Lácteos.	µg de filoquinona/por cada 100 g de porción.
Carne molida	<0.5
Pollo	<0.1
Puerco	<0.1
Pavo	<0.1
Atún	<0.1
Mantequilla	7
Queso Cheddar	3
Leche	0.3
Yogurt	0.3
Leche descremada	<0.1
Mayonesa	81
Yema de huevo	2
Clara de huevo	<0.1

Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) como una herramienta analítica para investigar el metabolismo de ésta.

En la década de los 90 se publicaron tablas informáticas del contenido de vitamina K en alimentos consumidos diariamente. Antes de estas fechas, se creía que sólo los vegetales verdes eran la mayor fuente de vitamina K en la dieta, ahora se sabe que los aceites para cocinar, particularmente el aceite de las semillas de soya son también las mayores fuentes de contribución de vitamina K. La leche humana contiene cerca de 1 ng/mL de filoquinonas las cuales son solamente el

20 al 30% del monto encontrado en la leche de vaca. La leche de fórmula para los bebés están suplementadas con vitamina K, lo cual provee una cantidad mucho más alta que la leche materna.

En las siguientes tablas que se presentan, y que fueron tomadas de la literatura², se reportan valores de filoquinonas a partir de análisis obtenidos por la técnica de HPLC, y que fueron evaluados en varios tipos de alimentos y de análisis clínicos hechos por la FDA de un estudio total de dietas.

Granos.	µg de filoquinona/por cada 100 g de porción.
Pan	3
Harina de avena	1
Harina de trigo	0.6
Arroz blanco	1
Hojuelas de maíz	<0.1

Frutas y verduras.	µg de filoquinona/por cada 100 g de porción.
Aguacate	40
Uvas	3
Melón	1
Bananas	0.5
Manzana	0.1
Naranjas	0.1

Cantidades significativas de MK-4 se encuentra en la carne y la yema de los huevos de aves de corral, debido a que su alimentación es comúnmente

adicionada con cantidades apreciables de menaquinonas de cadena larga. El consumo de filoquinonas en Irlanda para los adultos (hombres y mujeres) ha sido reportado ser

entre 84 y 74 $\mu\text{g}/\text{día}$, para Escocia el consumo es de 72 y 64 $\mu\text{g}/\text{día}$, en Inglaterra es de 70 a 61 $\mu\text{g}/\text{día}$ y en los países bajos el consumo es de 257 y 244 $\mu\text{g}/\text{día}$. El consumo de alimentos lácteos en los países bajos provee cerca de 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ de menaquinonas de cadena larga, estos valores se ven afectados por el consumo mayoritario de lácteos de una población a otra. Algunos de estos valores se reportan a continuación:

Vegetales.	μg de filoquinona/por cada 100 g de porción.
Col	817
Perejil	240
Espinaca	400
Escarola	231
Cebollas verdes	207
Brócoli	205
Coles de Bruselas	177
Repollo	147
Lechuga	122
Habichuelas	47
Chicharos	36
Pepino	19
Tomates	6
Zanahoria	5
Coliflor	5
Betabel	3
Cebolla	2
Papas	0.2
Maíz dulce	0.5
Hongos	<0.1

Nueces, semillas y aceites.	μg de filoquinona/por cada 100 g de porción.
Aceite de soya	193
Aceite de oliva	49
Aceite de nogal	15
Aceite de cártamo	11
Aceite de girasol	9
Aceite de maíz	3
Semillas de soya	47
Habichuelas rojas	19
Semillas de sésamo	8
Frijoles	2
Cacahuates	<0.2

Metabolismo^{1, 2, 3, 4, 5}

Absorción y transporte de la vitamina K^{1, 4}

La absorción de los lípidos no polares, tales como la vitamina K, dentro del sistema linfático requiere de su incorporación dentro de micelas. Estudios recientes demostraron que las filoquinonas contienen estructuras micelares que requieren la presencia del jugo pancreático y la bilirrubina. La absorción de la vitamina es dependiente de energía y es saturable, de una dosis de 1 mg en humanos, el 20% llega a ser excretado, este valor puede cambiar en pacientes con desordenes en la absorción de grasas, insuficiencia pancreática, entre otros.

Algunos estudios muestran la absorción relativa de las filoquinonas provenientes de algunos alimentos: Del brócoli, las espinacas, la lechuga romana, que son consumidos con una dieta aproximadamente con un 30% de grasas, sólo el 15-20% de las filoquinonas están biodisponibles.

Concentraciones substanciales de vitamina K están presentes en el intestino humano en la forma de cadena larga (menaquinonas). Relativamente unos cuantos tipos de bacterias que componen la flora intestinal son los productores mayoritarios de menaquinonas.

La concentración de los diferentes tipos de vitamina K en el intestino puede ser muy grande, las cantidades encontradas en el tracto intestinal por colonoscopia de pacientes están en el intervalo de 0.3 a 5.1 mg, con MK-9, MK-7, MK-10 y MK-11.

Una de las preguntas a investigar es cómo es que estas vitaminas lipofílicas, son absorbidas por el colon, se han reportado estudios de la absorción de estas vitaminas en colon de rata, pero en la ausencia de bilis no se absorbe MK-9 al sistema linfático o a la sangre sino dentro de las 6 horas posteriores a la ingesta de alimentos, pero en presencia de bilis, la MK-9 es absorbida vía sistema linfático en el yeyuno de la rata.

La administración oral de 1 mg de una mezcla de menaquinonas de cadena larga a personas con problemas de coagulación, desciende efectivamente al paso por el intestino delgado, lo que demuestra que hay una absorción importante en esta parte del intestino y que la absorción de los diferentes tipos de vitamina K no es exclusivo del intestino grueso, específicamente del colon, además también se observó, una absorción por parte del intestino grueso, no específicamente el colon, sino en regiones ácidas, la absorción también puede ocurrir por la presencia de bilis.

La menadiona, comúnmente utilizada en la ganadería y en las dietas para los animales de laboratorio como fuente de vitamina K, puede ser absorbida por ambas partes del intestino (delgado y el grueso), por un proceso de difusión pasiva. La

menadiona, por sí misma no tiene una función biológica, pero después de la absorción puede ser alquilada a MK-4 una forma activa de vitamina K.

La absorción de filoquinonas del intestino al sistema linfático disminuye con aquellas personas con insuficiencia biliar y otros síndromes relacionados con la deficiencia en absorción (pancreatitis, problemas en vesícula biliar, intestino perezoso etc.). La filoquinona en el plasma es predominantemente transportada por lipoproteínas ricas en triglicéridos, la fracción de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en inglés) y los quilomicrones, aunque también cargas significantes de esta son transportadas por las lipoproteínas de baja densidad (LDL por sus siglas en inglés). En un estudio comparativo, el transporte de las diferentes formas de la vitamina K, porciones significantes de MK-4 fueron encontradas en lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus sigla en inglés), y la vida media de la MK-9 fue encontrada ser substancialmente mayor que otras filoquinonas como MK-4. Como es lo esperado del transporte de las lipoproteínas, la concentración de filoquinonas en el plasma, está fuertemente relacionado con los niveles de lípidos en sangre. La ruta fundamental de entrada de filoquinona a los tejidos, parece ser la vía de los remanentes de quilomicrones por apoproteína E (receptores de apoE).

Esta respuesta se correlaciona con el aclaramiento hepático de los remanentes de quilomicrones de la circulación, con apoE2 que tiene la tasa más baja de remoción. La remoción de las filoquinonas por los osteoblastos se ha observada que es modulada por el genotipo de apoE.

Técnicas de laboratorio clínico para determinación de Vitamina K^{1, 4, 5}

En mediciones del plasma endógeno el análisis para determinar la concentración de filoquinonas ha estado disponible desde la década de los 80`s debido al desarrollo de las técnicas de HPLC para cuantificar la concentración de filoquinonas en plasma. Pero estas técnicas requieren de un paso adicional, utilizando una columna semipreparativa para eliminar lípidos y otras sustancias que interfieran para la cuantificación de la vitamina K.

Las principales mejoras en la metodología se han logrado al aplicar la CLAE con diferentes tipos de detectores que se han ido desarrollando a través de los años: UV o de fluorescencia de la vitamina, siguiendo de la detección electroquímica o reducción electroquímica. La metodología más utilizada con CLAE hoy en día utiliza la detección por fluorescencia siguiendo de la reducción por zinc post-columna.

Distribución en tejidos y almacenamiento de la vitamina K^{1, 4}

La distribución de la vitamina K en varios órganos del cuerpo de las ratas fue estudiado por primera vez con formas radioactivas de la vitamina, utilizando grandes cantidades de filoquinonas fisiológicas. El hígado retiene la mayor cantidad de vitaminas en distintos tiempos, pero la vida media de esta concentración en el hígado (aprox. 10-15hr) se pierde rápidamente. Estudios utilizando filoquinonas radioactivas, indican que más del 50% de las filoquinonas radioactivas y administradas se recuperan del hígado en la fracción de los microsomas¹. Cantidades importantes se encontraron en la fracción de los restos celulares de mitocondrias.

La actividad específica (picomoles de vitamina por miligramos de proteína pc/mg), de las filoquinonas radioactivas que fueron inyectadas se determinaron, y sólo las fracciones mitocondriales, aparato de Golgi, membranas microsomales y los microsomas tienen una actividad específica, que fue enriquecida sobre el homogenizado entero, con la actividad más alta en la fracción microsomal. Los factores que tienen influencia sobre la distribución intracelular de la vitamina K, aún no han sido dilucidados del todo, y sólo evidencias preliminares de proteínas intracelulares enlazantes de vitamina K que puede que faciliten la internalización de estas a los organelos, se han presentado.

Debido a las cantidades tan pequeñas de vitamina K en los tejidos de animales, es difícil determinar cuáles de los isómeros de vitamina K que están presentes en los tejidos de especies diferentes. Esto fue obtenido por cromatografía en capa fina, que indica que las filoquinonas encontradas, en el hígado de ciertas especies, provenían de la ingesta de plantas y representan el 10% del total de los diferentes tipos de menaquinonas presentes. Hay que señalar que las menaquinonas de cadena larga también tienen actividad hepática y datos recientes sugieren que la MK-4 puede jugar un rol en satisfacer los requerimientos únicos de algunos tejidos, mientras que otros estudios y análisis en hígado de varias especies no se detectaron cantidades significantes de MK-4.

La tabla siguiente muestra los contenidos de vitamina K en hígado humano.

Vitamina	Estudio A	Estudio B	Estudio C
Filoquinona	22±5	18±4	28±4
MK-5	12±18	NR	NR

¹ Los microsomas hepáticos son células parenquimatosas de este órgano, que catalizan transformaciones metabólicas en su mayor parte, por enzimas del retículo endoplasmático.

MK-6	12±13	NR	NR
MK-7	57±59	122±61	34±12
MK-8	95±157	11±2	9±2
MK-9	2±4	4±2	2±1
MK-10	67±71	96±16	75±10
MK-11	90±15	94±36	99±15
MK-12	15±13	21±6	14±2
MK-13	5±6	8±3	5±1

Biotransformación y excreción¹

La conversión de filoquinona o menaquinona de cadena larga a MK-4 es la vía metabólica de la vitamina K más utilizada por algunos tejidos. Evidencia del metabolismo del anillo de la naftoquinona no se tiene aún, y las vías de fosfato, sulfato y glucoronidación del menadiol administrado han sido identificadas en orina y bilis. Otros estudios del metabolismo de las filoquinonas en ratas, demostraron que la mayor ruta de excreción es en las heces y una pequeña cantidad de filoquinonas sin metabolizar está presente. Estudio del metabolismo de filoquinonas radioactivas en humanos, indican que una dosis entre 1 y 45 mg de vitamina K es excretada en orina después de tres días y que el 40-50% fue excretado en esas fecales vía bilis.

Homeostasia⁴

La sangre circula normalmente dentro de un sistema cerrado de vasos. Una lesión traumática, como una incisión que viole la epidermis causando una hemorragia debe ser rápidamente reparada para minimizar la pérdida de la sangre, esto involucra primeramente la movilización plaquetaria y después las proteínas disueltas en el plasma que conlleva a la formación de una masa llamada coágulo sanguíneo o trombo, proporciona una barrera insoluble o barrera estructural que ocluye los vasos lesionados. La barrera es limitada al sitio de lesión de manera tal que la circulación se mantiene en los vasos sanguíneos de otras partes del cuerpo.

El proceso de formación de la barrera contra la pérdida de sangre y para la limitación del sitio lesionado se llama homeostasia (griego “haima” sangre, “stasis” detener). Existen tres etapas de la homeostasia sanguínea: primaria, secundaria y la fibrinólisis.

Homeostasia primaria: Las plaquetas actúan con ellas mismas y con los vasos lesionados, debido a esta interacción las plaquetas se agrupan formando un tapón

denominado tapón homeostásico primario, que detiene temporalmente la hemorragia, pero es frágil y fácilmente se desprende de la pared vascular.

Homeostasia secundaria: Para evitar el desprendimiento del tapón primario, tiras de fibrina son depositadas sobre el tapón de plaquetas primario para hacerlo fuerte, estable y permitir la reparación de la herida sin pérdida adicional de sangre. La fibrina se forma mediante la bioquímica de proteínas del plasma denominados factores de coagulación (se explicara este proceso más adelante).

Fibrinólisis: Después de la reparación de la herida, componentes adicionales del sistema homeostásico, desdoblan y retiran el coágulo en la etapa de fibrinólisis.

Factores de coagulación sanguínea⁴

Después del descubrimiento por parte de Dam`s de las condiciones hemorrágicas en pollos que pueden ser curadas por ciertos extractos de plantas, se demostró que el plasma de estos animales contienen una concentración menor de protrombina, también llamada factor II de coagulación, que fue el primer factor de coagulación descubierto, es una de las proteínas más abundantes y fue la primera que se demostró que contenía residuos de ácido gama carboxilglutamato. Los factores de coagulación como el factor VIII, el factor IX, y el factor X, fueron inicialmente identificados por que su actividad disminuye en pacientes con enfermedades hereditarias sanguíneas y subsecuentemente se mostró que estos factores dependen de la vitamina K para su síntesis.

El proceso de coagulación sanguínea es esencial para la homeostasis y, para la activación plaquetaria, que envuelve una compleja serie de eventos que permiten la generación de trombina y activación proteolítica de proteasas y zimógenos^{II}. La vitamina K dependiente de factores de coagulación está envuelta en esta activación y propagación de eventos a través de complejos asociados a membranas cada uno y con otras proteínas accesorias. Estas proteínas están caracterizadas por un domino terminal amino que contiene un número de residuos de ácido glutámico que han sido convertidos a residuos de gama carboxilglutamil. Otros descubrimientos de residuos Gla en vitamina K dependiente de proteínas presentes en el plasma con una homología similar fueron, la proteína C y la proteína S que están presentes en la activación de iniciación de la inactivación de la trombina del factor V, el cual es un factor de coagulación no dependiente de vitamina K y por lo tanto juega como anticoagulante que como procoagulante en el rol de la homeostasis normal.

^{II} Un zimógeno o proenzima es un precursor enzimático inactivo, es decir, no cataliza ninguna reacción como hacen las enzimas. Para activarse, necesita de un cambio bioquímico en su estructura que le lleve a conformar un centro activo donde poder realizar la catálisis. En ese momento, el zimógeno pasa a ser una enzima activa.

El metabolito más abundante de la filoquinona es el 2,3-epóxido formado como producto de la acción de la vitamina K dependiente de la carboxilación por gama glutamato, este metabolito es más polar que la filoquinona tal cual, y fue caracterizada

Factor	Nombre descriptivo
I	Fibrinógeno
II	Protrombina
III	Factor Tisular
IV	iones calcio
V	Proacelerina
VII	Proconvertina
VIII	Factor antihemofílico (FAH)
IX	Componente tromboplastínico del plasma
X	Factor de Stuart
XII	Antecedente Tromboplastínico de plasma
XIII	Factor estabilizador de fibrina (FeF)
-	Precalicleina
-	Cinínogeno APM

como 2,3 epóxido de filoquinona, y estudios posteriores revelaron que el 10% de la vitamina K presente en el hígado está presente como epóxido y cuando una persona es tratada con anticoagulantes este epóxido se puede convertir en la forma predominante de la vitamina, además de incrementar su excreción urinaria y disminuir la excreción fecal de filoquinonas.

Factores de coagulación⁴

Los factores de la coagulación se han designado con números romanos del I al XIII, de acuerdo con el orden de su descubrimiento y no de la secuencia en la cascada de reacción. Los factores de coagulación se sintetizan en el hígado, incluyendo al plasminógeno del sistema fibrinolítico y los inhibidores de proteasas. Cuando existe enfermedad hepática grave, dichas proteínas pueden ser notablemente disminuidas y originar diátesis hemorrágica. El factor VIII es un complejo grande macromolecular constituido por dos proteínas distintas: una pequeña porción con actividad procoagulante (VIII:C) y una porción multimérica mayor que actúa para enlazar las plaquetas al a colágeno (el factor de von Willebrand).

Propiedades de los factores de coagulación⁴

El proceso de coagulación se divide tradicionalmente en tres vías con base al modo y secuencia de la activación de las proteínas de coagulación in vitro: vía intrínseca, extrínseca, y la vía común. Cada uno de los trece factores de la coagulación está asignado a una de estas vías.

La vía intrínseca se activa por el contacto de las proteínas de coagulación con superficies cargadas negativamente, mientras que la vía extrínseca lo es por el contacto

del factor VII con el factor tisular. Las vías intrínseca y extrínseca convergen en la vía común.

Además de dividirse en tres vías con base en las funciones secuenciales desempeñadas en la homeostasia, los factores de coagulación se pueden dividir en tres grupos según sus propiedades físicas: grupo de la protrombina, grupo del fibrinógeno y grupo contacto.

Grupo de la protrombina⁴

Este grupo incluye a los factores II, VII, IX y X. Son necesarios iones calcio para el enlace de los factores de la protrombina a una superficie fosfolípida ácida en la cual se produce la activación de esta enzima.

La vitamina K desempeña una función importante para la síntesis de los factores funcionales de este grupo, y por ello los factores de este grupo son conocidos como factores dependientes de la vitamina K. Estudios revelan que la vitamina K es necesaria para la adhesión de un grupo -COOH (carboxilo) extra al carbono gamma de los residuos de ácido glutámico (carboxilación gamma) en el extremo N-terminal de la cadena polipeptídica. Esta modificación posribosómica proporciona el receptor de calcio crítico, el cual es esencial para el enlace del factor a la superficie fosfolípida. Por tanto, en ausencia de vitamina K los factores se sintetizan en el hígado y pueden encontrarse en plasma, pero son totalmente no funcionales debido a que carecen de los grupos -COOH necesarios para el enlace de superficie de fosfolípidos, y se conocen como (PIVKA por sus siglas en inglés) que significan proteína inducida por vitamina K ausente de antagonista. El reconocimiento de estos problemas se hace mediante antígenos y por su composición de aminoácidos.

Grupo del Fibrinógeno⁴

Este grupo incluye a los factores VIII y XIII y se conoce como consumible ya que se consumen durante la formación de fibrina y por tanto están ausentes en el suero.

Grupo de contacto⁴

El grupo de contacto incluye los factores XI y XII, así como a las proteínas del plasma, precalicreína, y a los cininógenos de alto peso molecular (CAMP). Estos factores están implicados en la activación inicial de la vía intrínseca de la coagulación y requieren del contacto con una superficie cargada negativamente para su actividad. Con excepción del factor XI, los factores de contacto no parecen desempeñar una

función esencial en la homeostasia in vivo. Este grupo de factores está vinculado con otros sistemas biológicos.

Bioquímica de la coagulación⁴

Las plaquetas, producidas a partir del megacariocito que se encuentra en médula ósea y liberadas al torrente sanguíneo después de su maduración, tienen varias funciones, entre las que destacan una función pasiva en la que recubren el endotelio de los vasos sanguíneos respecto a posibles brechas y fracturas. Mantienen continuidad e integridad de los vasos sanguíneos al llenar las brechas pequeñas causadas por la separación de células endoteliales, se adhieren a las fibras endoteliales de colágeno subyacentes del endotelio expuesto y evitan el escape de la sangre. La disminución en el número de plaquetas en la sangre periférica resulta de escapes de sangre a través de estas brechas hacia el interior de los tejidos (hemorragias).

Después de la lesión tisular, las plaquetas en forma de disco e inertes (no activas), dentro del torrente sanguíneo se activan debido al cambio de ambiente y estas plaquetas inactivas se transforman a plaquetas activas, dejan de tener forma circular, y se convierten en espinosas liberando proteínas y otros elementos químicos que atrapan más plaquetas y proteínas de la coagulación, en un tapón cada vez mayor agregándose y formado el tapón plaquetario primario, los fosfolípidos de membrana de las plaquetas agregadas proporcionan una superficie de reacción para la formación de la fibrina, estabilizando el tapón de plaquetas (homeostasia secundaria). Las plaquetas también proporcionan un factor de crecimiento, que es un mitógeno, almacenado en los gránulos alfa, que estimulan a las células lisas y posiblemente también a los fibroblastos a multiplicarse y a sustituir a las células dañadas por la lesión.

Durante la lesión se produce una hemorragia en el endotelio y las plaquetas escapan de los vasos sanguíneos y fluyen al interior de los tejidos subendoteliales. Inmediatamente se pegan a componentes del subendotelio, de los cuales el elemento más importante son las fibras de colágeno.

Las superficies subendoteliales son áreas a las cuales las plaquetas no se exponen normalmente. La adhesión de plaquetas al colágeno sólo se produce con la ayuda del factor de von Willebrand (vWf por sus siglas) y de su glucoproteína Ib de la membrana de plaquetas. Este factor es sintetizado por las células endoteliales, se almacena dentro de ellas, y se secreta a las áreas subendoteliales y al interior del plasma, también se encuentra en los gránulos alfa de las plaquetas. Cuando se produce la adhesión de las plaquetas, el vWf se enlaza tanto al colágeno como a la glucoproteína Ib, cuando esto sucede en la superficie de las plaquetas, las enzimas de la membrana se activan y

fragmentan en fosfolípidos específicos de membrana. Los productos resultantes son “segundos mensajeros” que penetran en el citoplasma de la plaqueta y transfieren la señal a las partes interiores de la célula. Esto desencadena la conversión de un “puente” que conecta a la plaqueta y a la fibra de colágeno, posteriormente la plaqueta se une mediante la adhesión de sus receptores, a varias proteínas adhesivas de la matriz del tejido conjuntivo y finalmente se “expanden” sobre la superficie de colágeno.

Hay dos enfermedades en las cuales las plaquetas no se adhieren correctamente, la enfermedad de Bernard-Soulier que se caracteriza por la falta de glucoproteína Ib en las membranas de las plaquetas, y la enfermedad de von Willebrand que carecen del factor von Willebrand (vWf).

Tres enzimas de membrana actúan como segundos mensajeros: la fosfolipasa C, la fosfolipasa A₂, y la adenil ciclasa. Los productos de las tres causan un movimiento rápido de los iones de calcio intracelular a partir de los sitios de almacenamiento en el sistema tubular denso^{III}, así como el transporte del exterior a través de la membrana y en el interior del citoplasma. Las plaquetas en reposo tienen concentraciones muy escasas de calcio iónico en el citoplasma. Muchos sistemas celulares que están inactivos en las plaquetas en reposo se activan por la presencia de los iones calcio. Existe una correlación directa entre la cantidad de calcio citoplasmático y el grado de estimulación plaquetaria.

Las pruebas de laboratorio incluyen el conteo de plaquetas y la evaluación de la función plaquetaria. El conteo puede llevarse a cabo por métodos manuales y automatizados. Los métodos manuales se practican al diluir la muestra de sangre entera y contar las plaquetas en una alícuota para calcular el número por litro, el método de Rees Ecker emplea un colorante denominado azul de cresilo brillante, el cual ayuda a

III Sistema tubular denso

Es un sistema de membranas que aparece en la vecindad de los microtúbulos y rodea los organelos, con apariencia, y funciones similares a las del retículo endoplásmico liso de otras células. Regula la activación plaquetaria mediante el secuestro o liberación de calcio, de forma similar a los túbulos del músculo esquelético y por un mecanismo más rápido que el de las mitocondrias. También posee ATPasas, enzimas del metabolismo del ácido araquidónico y adenilato ciclasa.

Las plaquetas poseen organelos inespecíficos, como mitocondrias, lisosomas y peroxisomas, que tienen características y funciones similares a los de otras células pero, además, portan organelos específicos, que son los gránulos alfa y los gránulos densos.

Gránulos alfa

Son organelos esféricos de 140 a 400 nm en diámetro, ricos en macromoléculas con una porción de alta densidad en electrones. Tienen una importante participación en el funcionamiento celular, al propiciar la interacción entre plaquetas, de ahí que la cantidad de gránulos alfa (como promedio 35-40) determina el valor funcional de la célula. También participan en la interacción con otras células a través de la liberación de su contenido.

Gránulos densos

Se caracterizan por su alta densidad electrónica que le confieren el elevado contenido en calcio (50% del total, en una concentración 2 mol/L) y fósforo inorgánico.

hacer más evidentes a las plaquetas. El conteo se realiza con un microscopio de luz. Se dispone de equipos automatizados y semiautomatizados, de los cuales algunos utilizan sangre entera o sangre centrifugada de la cual el plasma es rico en plaquetas^{IV}.

Homeostasia secundaria y fibrinólisis⁴

Se produce homeostasia secundaria cuando las proteínas plasmáticas solubles, llamadas factores de coagulación, interactúan una serie de reacciones enzimáticas complejas para convertir a la proteína soluble fibrinógeno en fibrina insoluble. Las reacciones son realizadas a manera de cascada o catarata, mediante los cuales los factores de coagulación inactivos y circulantes (zimógenos) se transforman en enzimas activas mediante un proceso de activación secuencial. Cada zimógeno actúa primero como un sustrato y luego como una enzima, el sustrato final en la cascada es el fibrinógeno y cuando recibe la acción de la enzima final, trombina se convierte en fibrina. La activación de la cascada se inicia cuando los zimógenos se exponen a las capas subendoteliales de los vasos. Todas las reacciones enzimáticas excepto la última, (la formación de fibrina a partir de fibrinógeno) requieren de un fosfolípido de superficie proporcionado por las membranas de las plaquetas activadas y por los vasos lesionados. El requerimiento de una superficie es importante ya que limita el lugar de las reacciones y formación de la fibrina al sitio de lesión.

Todas las enzimas de la cascada a excepción del factor XIII (una transaminasa) son proteasas de serina que actúan como enzimas de escisión con actividad de proteasa en el sitio de residuo de serina.

El proceso de formación de fibrina están controlados por retroalimentación negativa; cantidades abundantes de trombina, la última enzima formada en la cascada, destruyen los cofactores de las cascada de coagulación en las etapas limitantes de la velocidad de su propia producción.

^{IV} Valores de referencia de plaquetas en adultos y niños (150 a 450) x 10⁹ / L.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

(CLAE)^{6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14}

La cromatografía de líquidos es una de las versiones de cromatografía más ampliamente utilizadas entre las técnicas analíticas y podemos describirla como sigue:

Esencialmente es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados se distribuyen en dos fases, una de ellas llamada fase estacionaria que puede ser sólida, líquida o gel, mientras que la otra fase conocida como fase móvil es un líquido se mueve percolándose a través de la primera, la separación se logra debido a que cada componente que debe estar disuelto en la fase móvil, se distribuye de modo distinto entre ambas fases dependiendo de la afinidad que tenga con cada una, estableciéndose interacciones físicas y químicas, además de que las diferencias entre los coeficientes de partición de los componentes individuales de la muestra dan como resultado la separación de cada uno.

$$K_{eq} = \frac{[\text{Soluto en la Fase Estacionaria}]}{[\text{Soluto en la Fase Móvil}]}$$

Este proceso ocurre como resultado de repeticiones de equilibrios de los compuestos que forman la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria durante el movimiento de estos compuestos en el sistema.

La fase estacionaria puede ser empacada dentro de una tubería conociéndose comúnmente con el nombre de columna y también se puede colocar sobre un objeto como una capa fina, y dependiendo de las características fisicoquímicas de la fase estacionaria, ésta será selectiva para los diferentes compuestos.

Existen varias maneras de clasificar a la cromatografía de líquidos en columna y, esta división está basada en la naturaleza de la fase estacionaria y en el proceso de separación, algunos ejemplos de esta clasificación son:

Cromatografía de adsorción: la fase estacionaria es un adsorbente sólido, y la separación está basada en repeticiones consecutivas de adsorción y desorción.

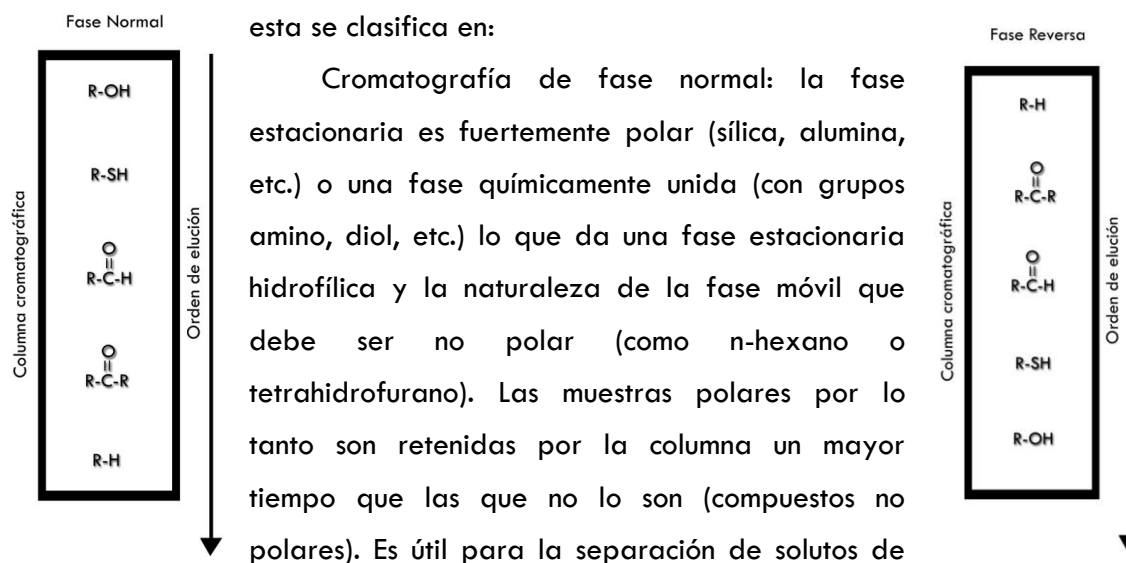
Cromatografía de partición o distribución: la separación no se basa en adsorción, sino en la partición de los analitos entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Cromatografía de intercambio iónico: la fase estacionaria, tiene una superficie con carga iónica (resinas intercambiadoras) opuesta a la de la muestra. Esta técnica se usa casi exclusivamente con muestras iónicas o ionizables. Mientras más fuerte sea la carga en la muestra, más fuertemente será atraída a la superficie iónica y por lo tanto, tomará más tiempo en eluir. La fase móvil es un buffer acuoso, en el que el pH y la polaridad son utilizados como control del tiempo de elución de la columna.

Cromatografía de exclusión: las columnas se rellenan con materiales en los que se tiene precisión en el control del tamaño de poro, y la muestra simplemente es tamizada o filtrada de acuerdo al tamaño molecular, las diferencias en tamaño de las moléculas son arrastrados a través de la columna.

Cromatografía de fases químicamente unida:

La partícula sólida base se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, por grupos funcionales que proporcionen determinadas características de polaridad. Dependiendo de la polaridad de los grupos funcionales



Cromatografía de fase normal: la fase estacionaria es fuertemente polar (sílica, alumina, etc.) o una fase químicamente unida (con grupos amino, diol, etc.) lo que da una fase estacionaria hidrofílica y la naturaleza de la fase móvil que debe ser no polar (como n-hexano o tetrahidrofurano). Las muestras polares por lo tanto son retenidas por la columna un mayor tiempo que las que no lo son (compuestos no polares). Es útil para la separación de solutos de polaridad mediana a alta. El proceso de adsorción está gobernado por las interacciones dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, transferencia de carga entre otras.

En la cromatografía de fase reversa, es exactamente lo contrario a la anterior. Comúnmente se utilizan fases químicamente unidas que contiene un grupo funcional de tendencia no polar (octadecil, octil, fenilo, nitrilo, metilo, etc.). La fase estacionaria por lo tanto es de tendencia no polar (hidrofóbica), mientras que la fase móvil es un de tendencia polar, tales como el agua, alcoholes, acetonitrilo, etc.. Aquí los compuestos menos polares, serán retenidos más tiempo que los polares. Actualmente es el modo de cromatografía más utilizado.

Instrumentación^{9, 10}

La instrumentación básica en la cromatografía de líquidos instrumental es la siguiente:

Fuente de fase móvil

Es un recipiente que contiene a la fase móvil. Se utilizan generalmente frascos de vidrio o polímeros resistentes con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de

partículas ambientales. El extremo del tubo donde la fase móvil es absorbida tiene un filtro que puede ser de vidrio, teflón o acero inoxidable con un tamaño de poro de 0.45 μm que impide el ingreso de partículas mayores a éste a la bomba.

La fase móvil puede estar constituida por un solo disolvente o por la mezcla de 2 o más disolventes, según sea la necesidad del poder de elución que se requiera tener de la fase móvil.

Un disolvente apropiado para ser utilizado como fase móvil en HPLC debe cumplir con algunos requisitos como son:

- ❑ Alto grado de pureza (>99.5%).
- ❑ Alto poder de solubilizar las muestras.
- ❑ Baja reactividad.
- ❑ Compatibilidad con el detector utilizado.
- ❑ Adecuado punto de ebullición.
- ❑ Baja viscosidad.
- ❑ Seguridad (no tóxico).

La fase móvil debe desgasificarse ya que el aire disuelto (oxígeno y nitrógeno) puede producir burbujas las cuales afectan a la columna provocando caídas de presión e interfieren en los pistones de las bombas, los cuales, al ser de vidrio o rubí sintético llegan a calentarse por la fricción y provocan su rompimiento, llevando a la necesidad de cambiar la pieza entera. También pueden causar 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:

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

Sistema de bombeo^{6,7}

La función de este aparato es el impulsar la fase móvil por todo el sistema cromatográfico, desde el recipiente o los recipientes que contienen los disolventes hacia el inyector, columna y detector. Es una pieza crítica para el funcionamiento del cromatógrafo, y debe presentar las siguientes características:

- ❑ Generar flujos constantes y de preferencia libre de pulsaciones.
- ❑ Presentar un amplio intervalo de caudal y exactitud del mismo.
- ❑ Generar y/o vencer altas presiones.

Las bombas están construidas de materiales resistentes al ataque químico y al desgaste mecánico. El sistema de bombeo ha evolucionado a través de dos tipos de bombas:

- Bombas mecánicas, que las hay de dos tipos: reciprocantes (pistón o diafragma) y de desplazamiento continuo.
- Bombas neumáticas.

Las bombas reciprocantes son las utilizadas en este trabajo por lo que sólo se explicarán éstas.

Las bombas recíprocas desplazan flujos de volúmenes constantes en forma no continua, sino más bien pulsante. La máxima presión que se puede obtener varía según el diseño, pero llegan aproximadamente a 600 atm. La desventaja que presentan de que el flujo de los volúmenes son de manera pulsante y no de forma continua o uniforme y que puede provocar pérdida continua en la eficiencia de la columna e inestabilidad del detector, se resuelve con el empleo de un doble pistón recíprocante, en el cual cuando uno succiona la fase móvil el otro ya la está impulsando, además de la presencia en la tubería de un volumen mayor que el impulsado por las bombas, eliminándose las pulsaciones. Actualmente éstas son las bombas presentes en todos los cromatógrafos de líquidos y que dominan el mercado ya que cumplen con los parámetros antes establecidos y son de precio accesible comparada a las otras bombas que se pueden utilizar.

Mezcladores^{8,10}

En HPLC se puede trabajar de dos formas, la primera de ellas es conocida como modo isocrático denominado así cuando el poder de elución es constante (la composición de la fase móvil es constante) y no cambia durante todo el tiempo de análisis. Esta forma de trabajo se aplica cuando las propiedades físicas y químicas de los compuestos que forman la muestra son muy parecidas.

La segunda forma de trabajo es la conocida como gradiente de elución, en el cual, el poder de elución de la fase móvil (la composición de la fase móvil) cambia durante la realización del análisis, donde se incrementa o disminuye en proporción los disolventes utilizados, modificando el poder de elución de la fase móvil. Esta forma de trabajo se aplica cuando las propiedades físicas y químicas de los compuestos que forman la muestra son muy diferentes.

Para poder trabajar de forma con gradiente de elución se requiere el uso de un aparato conocido como mezcladores, y existen dos tipos:

Mezcladores de baja presión

Estos mezcladores permiten con la ayuda de unas válvulas denominadas solenoides mezclar los disolventes en una cámara antes de la bomba (por lo que se denominan de baja presión). Este sistema puede mezclar hasta 4 disolventes.

Mezcladores de alta presión

En este tipo de mezcladores se requiere utilizar una bomba por cada uno de los disolventes que se vayan a emplear para formar la fase móvil, la salida de cada una de las bombas se conecta a una cámara mezcladora (por estar después de las bombas se les conoce como de alta presión). La mezcla es lograda por la presión generada de las bombas en la cámara mezcladora.

El problema de requerir una bomba por disolvente hace que este tipo de mezcladores sea muy caro, por lo que son más utilizados los mezcladores de baja presión para trabajar con gradiente de elución.

Sistema de introducción de muestra^{6,7}

Las válvulas de inyección exigen cuidadoso diseño, debido a que deben resistir altas presiones, tener un volumen pequeño.

La muestra es introducida al sistema generalmente mediante una válvula de inyección o válvula de seis pasos. La introducción de la muestra a esta válvula se puede realizar de forma manual el cual se realiza mediante el empleo de una jeringa con una capacidad determinada, mientras que la manera automatizada, se realiza mediante válvulas de inyección automática.

En el caso de esta validación, la introducción de muestra se llevó de manera manual, por lo que se utilizó una jeringa.

La válvula de inyección está constituida por un rotor que gira en dos posiciones, una de carga y la otra de inyección, además de una tubería de muestra externa conocido como bucle o "loop" (nombre en inglés) en el que se introduce la muestra. El modo en que operan las válvulas son las siguientes:

Cuando la válvula se encuentra en posición de carga, la muestra disuelta en la fase móvil se introduce mediante una jeringa, que llena un tubo capilar conocido por su expresión en inglés como "loop" el cual puede tener capacidades diferentes (5 μL a 200 μL). En esta posición, la fase móvil pasa de la bomba a la columna, es decir, no tiene contacto con el compartimento de la válvula donde la muestra está siendo introducida.

Al girar el rotor en la posición de inyección, la fase móvil ahora si pasa a través del “loop”, es decir, baña la cavidad de la válvula arrastrando la muestra hacia la columna, momento el cual la separación comenzará a realizarse.

Las muestras que se pueden trabajar pueden ser sólidas o líquidas, y éstas deben ser solubles por lo menos en uno de los disolventes que forme a la fase móvil.

Sistema de separación^{9, 11}

Se hablará únicamente de las fases químicamente unidas debido a que es el tipo de fase estacionaria que más se utiliza actualmente en HPLC. Las fases químicamente unidas son ya el principal componente de los sistemas de separación de las columnas de cromatografía debido a que permiten mejores separaciones de las moléculas orgánicas conocidas hoy en día.

Estas fases llamadas fases químicamente unidas, las cuales tienen una larga duración y no requieren ninguna condición de presurización de la fase móvil. Este tipo de fases son preparadas mediante la reacción química entre la superficie de los grupos hidroxilo de la sílica con moléculas orgánicas u organosilanos.

Algunas de las fases polares en cromatografía en fase normal tienen grupos amino o nitrilo (ciano) unidos a la cadena de carbonos, pero la cromatografía más utilizada es la de fase reversa, con cadenas alcalinas de octadecilos, unidos al átomo de silicio del alquilsilano, y este último tipo de fases ayudan a la separación de un gran número de sustancias.

Estas fases estacionarias son empacadas en las columnas que consisten en una tubería, generalmente de acero inoxidable que le permite soportar altas presiones, tiene dimensiones que pueden variar en los intervalos siguientes: diámetro interno 2 a 5mm y este intervalo de diámetros se considera el mejor de acuerdo a la capacidad de muestra, consumo de fase móvil, velocidad y resolución. Se cuenta con columnas de una longitud en un intervalo que va de los 5 a los 25 cm, el tamaño de partícula oscila entre 5 a 25 μm . En este trabajo se empleó una columna empacada con fase reversa químicamente unida de Nucleosil C₁₈.

Sistema de detección^{12, 13, 14}

El sistema de detección permite medir en forma continua alguna propiedad física de los componentes de la muestra o de la fase móvil, generando una señal proporcional a la concentración de la muestra medida a la salida de la columna.

Los detectores en CLAE deben cumplir con 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 universales, que miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil cuando contiene a los analitos estudiados con respecto a la misma fase móvil cuando no los contiene, y detectores selectivos, que son sensibles a alguna propiedad del analito. Los detectores utilizados en CLAE los podemos clasificar en dos grandes grupos:

Detectores Espectroscópicos

Estos aprovechan las propiedades espectroscópicas que pueden presentar la fase móvil y/o los analitos. Estos son:

Detector UV/Vis: detecta compuestos orgánicos con insaturaciones, diénicos, carbonílicos α,β insaturados, aromáticos y sustituidos con grupos funcionales que contengan grupos carbonilo de manera “natural” o conferida por derivatización. 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. Puede emplearse en modalidad de gradiente.

Índice de refracción: mide la diferencia del índice de refracción entre la fase móvil sola y cuando contiene a la muestra. Es universal, no destructivo, poco sensible, se afecta con el cambio de la temperatura, no se utiliza en modalidad de gradiente.

Espectrómetro de masas: permite obtener el espectro de masas de los compuestos que forman a la muestra que pesen hasta 150 000Da, posee alta sensibilidad, puede comportarse tanto como detector universal como selectivo.

Detectores Electroquímicos

Estos aprovechan las propiedades eléctricas que pueden presentar la fase móvil y/o los analitos. Estos son:

Conductímetro: mide la conductancia o conductividad equivalente del efluente proveniente de la columna, los compuestos iónicos de la muestra generan un cambio en

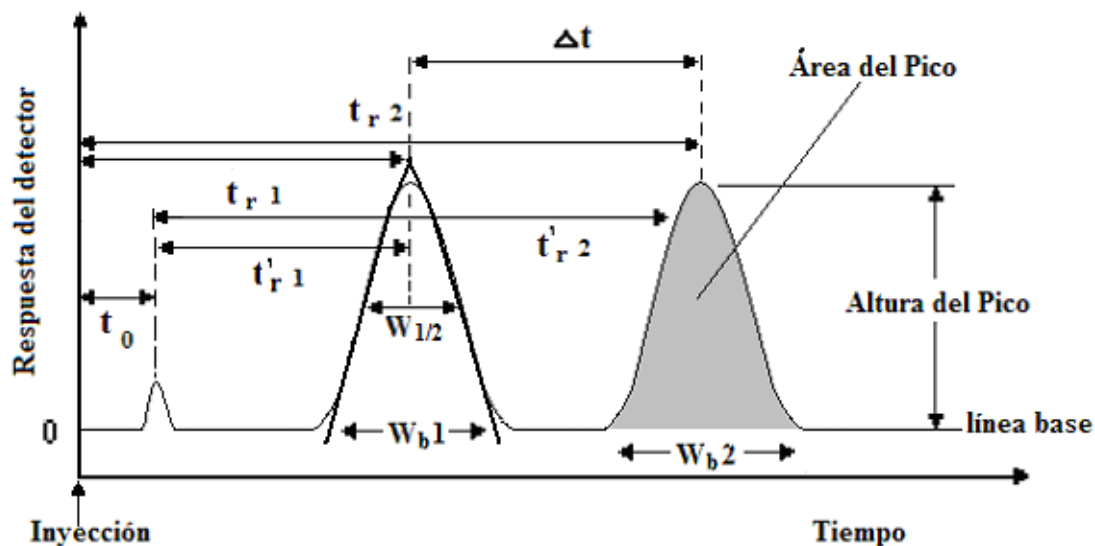
la conductancia del efluente y de esta manera son detectados. Su respuesta es lineal, dependiente de la temperatura y susceptible a los cambios de flujo de la fase móvil por lo que trabaja mejor en modo isocrático; selectivo, es utilizado principalmente en cromatografía de intercambio iónico.

Amperímetro o Electroquímico: detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos al ser aplicado un potencial de valor fijo, 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.

Sistema de registro^{12, 13}

Es el aparato que proporciona una representación gráfica de la señal generada por el detector respecto al tiempo en que dura la corrida (en minutos), este gráfico es conocido como “cromatograma”, y cada señal que aparece en este gráfico es conocido como “pico cromatográfico” y cada uno de estos picos representa un compuesto de la muestra (en caso de que la separación se desarrolle correctamente). Los registros son generados hoy en día por computadoras de las cuales es más práctico modificar parámetros y visualizar mejor los datos obtenidos durante el análisis, aunque también podemos encontrar integradores electrónicos.

Del cromatograma se obtiene cierta información que permite realizar análisis tanto de tipo cualitativo como cuantitativo, además de poder calcular otros datos conocidos



como parámetros cromatográficos.

Parámetros cromatográficos ^{5, 7, 8, 9, 10}

❖ Tiempo muerto (t_0): es el tiempo que tarda en eluir un compuesto que no es retenido por la fase estacionaria.

❖ Tiempo de retención (t_r): es el tiempo que un compuesto permanece desde la inyección de la muestra hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico del compuesto.

❖ Tiempo de retención corregido (t_r'): es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria, se calcula como la diferencia entre el t_r y el t_0 .

$$t_r' = t_r - t_0$$

❖ Área de pico: este parámetro permite determinar la concentración de cada componente separado en la fase estacionaria.

❖ Ancho de la base del pico (W_b): Es la proporción de la línea base interceptada por tangentes trazadas a ambos lados de la señal.

❖ Ancho de la mitad de la altura del pico ($W_{1/2h}$). 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.

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

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

❖ Selectividad (α): proporciona una idea de la afinidad de los compuestos de la muestra con la fase estacionaria. Conforme el valor es mayor a 1 se entiende que la fase estacionaria más selectiva para los analitos y por lo tanto se permitirá una mejor separación entre los compuestos; la ecuación de cálculo es la siguiente:

$$\alpha = \frac{t_{r'2}}{t_{r'1}}$$

En donde $t_{r'1}$ es el tiempo de retención corregido del compuesto que tarda menos en eluir, mientras que $t_{r'2}$ es el tiempo de retención corregido del compuesto que tarda más en eluir.

❖ Factor de capacidad (k'): se define como la relación entre la cantidad del analito en la fase estacionaria entre la cantidad de analito en la fase móvil, y está

relacionada de manera directa a la constante de equilibrio. Para tener buenas separaciones se necesita un intervalo de $10 > k' > 2$. La ecuación para su cálculo es:

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

❖ Resolución (Rs): indica cuantitativamente que tan separada está el área de un pico respecto a otro. Cuando se tiene una $R_s \geq 1.5$ se tiene una separación \geq del 99.7% y se calcula con la siguiente ecuación:

$$R_s = 2 \left(\frac{\Delta t_r}{Wb_{1+} Wb_2} \right)$$

Análisis cualitativo^{9, 10, 11}

El propósito de la mayoría de las investigaciones utilizando cromatografía incluye el determinar que compuestos están presentes en la muestra, un problema es que la cromatografía es esencialmente una técnica de separación y una de las mejores disponible hoy en día, sin embargo, por los detectores mencionados anteriormente y que en su mayoría son selectivos (a excepción del Espectrómetro de Masas) esta es una técnica “ciega”, pues sus detectores indican la presencia de sustancias que le es capaz de “ver” pero no pueden dar información estructural de los compuestos que “ve” que permitan decir que compuesto son, a menos de que se cuente con información previa que plantee cuales podrían ser y se tengan los estándares de dichos compuestos para comparar a éstos con los de la muestra por alguna de las siguientes formas de trabajo:

Comparación del tiempo de retención: Bajo ciertas características establecidas, el tiempo de retención que da una sustancia en una columna dada puede ser certero y es característico de una sustancia en particular, el tiempo de retención puede utilizarse para propósitos de identificación y con ello deben tomarse en cuenta ciertas consideraciones.

Primero que nada debe ser entendido que la reproducibilidad de los datos de tiempo de retención absoluto depende de las condiciones instrumentales (columna utilizada, fase móvil, temperatura, etc.). El tiempo de retención y el tiempo de retención ajustado son utilizadas para propósitos de identificación. La mejor manera de expresar los datos de retención es haciéndolo mediante los tiempos de retención relativos, expresados a partir de la retención de un estándar: $r_{i,st} = \frac{t_{R'}(i)}{t_{R'}(st)}$ donde (i) y (st) se refieren a los valores respectivos de los picos individuales de la muestra y el estándar respectivamente.

Cantidades pequeñas de muestra deben ser utilizadas para el análisis, ya que si se satura la columna puede influir en el tiempo de retención de la muestra.

Adición de estándar a la muestra: El método más sencillo para el análisis por comparación en el tiempo de retención es mezclando una porción de la mezcla sucesivamente con un estándar de la o las sustancias las cuales se supone que componen a la muestra, y posteriormente comparar los cromatogramas obtenidos en el análisis de la muestra original y la mezcla.

Los parámetros a identificar, es que si la sustancia que se adicionó ya estaba presente en la muestra original entonces uno de los picos estará relativamente más largo que en el cromatograma original antes de agregar el estándar, el pico crecerá simétricamente y no se observarán deformaciones, entonces puede decirse que el compuesto agregado si corresponde al que estaba presente originalmente en la muestra. Si el pico entonces se deforma con la adición del estándar, o muestra la aparición de otro pico muy cercano al original, entonces podemos decir que ambas muestras co-eluyen pero no son el mismo compuesto, solo tiene la misma afinidad a la fase estacionaria.

El problema con este método es que sólo muestra que el estándar agregado y el compuesto presente en la muestra corresponden a un pico en particular que tiene un tiempo de retención idéntico o muy cercano; como sea esto no da una prueba absoluta para la identidad de ambas sustancias, por lo tanto la repetición del método en otra columna con diferente polaridad y diferente fase móvil es siempre recomendado, el montar las dos columnas representan mayor prueba que si sólo se hacen en una columna.

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 otras técnicas de análisis cualitativo como infrarrojo, resonancia magnética nuclear, etc..

Técnicas cualitativas acopladas: Buscando la optimización del análisis cualitativo en las técnicas cromatográficas se desarrollaron y actualmente se cuenta con sistemas acoplados de técnicas cualitativas como Espectrometría de Masas 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 contara también con el Espectro de Masas, pudiendo comparar este también con el de los estándares.

Análisis Cuantitativo^{9, 10, 11}

Después de realizar la identificación de los componentes de la muestra el siguiente paso es determinar la cantidad de algunos o de todos los compuestos presentes en ella, y esto corresponde al análisis cuantitativo.

Los datos que se usan para hacer análisis cuantitativo son la altura o el área del pico cromatografico, esta última es la más utilizada ya que todavía se obtiene mejor precisión en los resultados. Los métodos de cuantificación más utilizados son:

Normalización: Este método puede aplicarse con o sin factores de corrección, dependiendo de la precisión requerida y de la muestra. En esencia, relaciona las áreas obtenidas con el porcentaje de composición de la mezcla. Para que este método funcione se requiere que todos los componentes de la muestra sean: introducidos al sistema, separados con buena resolución, detectados y que den la respuesta en el detector igual para todos ellos, si esta última condición no se cumple da lugar a que la normalización de área se lleve implícito el uso de factores de corrección o también llamados de respuesta. Se calcula la concentración para cada componente asumiendo que:

- ❑ Cada componente de la muestra produce un pico.
- ❑ El detector dará la misma área para cada componente si está presente en la muestra.

Si el detector responde igual para las mismas cantidades (concentraciones) en los componentes de la muestra, entonces es lo mismo llamarlo pico relativo de áreas. La normalización se realiza dividiendo el área de cada pico entre el área total y multiplicar el resultado por 100.

Estándar externo o calibración absoluta. Consiste en comparar el área correspondiente a cantidades conocidas de la sustancia problema con el área obtenida para la misma sustancia en la muestra y cuya concentración se desee determinar. En el caso de cromatografía este método está basado en la aplicación del término Factor de respuesta (Fr), que por definición es:

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

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:

$$A = Fr \times C$$

Estándar interno o calibración relativa o indirecta. Este método es menos susceptible a errores técnicos y compensa, en algunos casos, errores producidos durante la preparación de las muestras. En el caso de cromatografía este método está basado en la aplicación del término Factor de respuesta relativo (Frr), que por definición es:

$$Frr = \frac{Fr \text{ del compuesto}}{Fr \text{ del estándar interno}}$$

Al desdoblar 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 esta 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 (Frr) y se calcula la concentración del analito, despejando la incógnita de la ecuación reordenada:

$$\frac{\text{Área del compuesto}}{\text{Área del estándar interno}} = Frr \frac{C \text{ compuesto}}{C \text{ estándar interno}}$$

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.

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^{6,7,8,9,10,11,15,16,17}

Es en los años setenta cuando la FDA establece el paradigma “proceso no validado es un proceso de alto riesgo, ya que en cualquier momento generará medicamentos fuera de especificaciones” y por consecuencia no cumplirán su función y pondrán en riesgo al paciente. De acuerdo a la FDA validar es:

Contar con evidencia documental, que provee de un alto grado de seguridad de que un proceso específico, produce consistentemente un producto de acuerdo a especificaciones predeterminadas y atributos de calidad. Es un término empleado para definir o demostrar la capacidad de un método o técnica analítica para satisfacer los requisitos para la aplicación de la técnica analítica deseada. En la industria farmacéutica es necesario hacer uso de la validación para asegurar la calidad del fármaco o del medicamento. En México se cuenta con la NOM-059-SSA1-2006, referente a las buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos, que establece la obligación de validar los procesos de fabricación de medicamentos.

Lo anterior lleva a las siguientes preguntas.

¿Por qué validar?, validar permite:

- ❖ Asegurar la calidad de los medicamentos.
- ❖ Reducir la posibilidad de rechazos y/o reprocesos.
- ❖ Optimizar los procesos.
- ❖ Incrementar la competitividad.
- ❖ Cumplir con un requerimiento oficial.

¿Cuáles son los beneficios de una validación?

- ❖ Incrementa la eficiencia de la producción.
- ❖ Reduce rechazos y reprocesos.
- ❖ Reduce los costos en servicios.
- ❖ Minimiza las discrepancias relacionadas a fallas del proceso.
- ❖ Reduce las determinaciones de proceso y de producto.
- ❖ Las investigaciones son más rápidas y precisas cuando se presentan desviaciones del proceso, o producto fuera de especificaciones.

Los parámetros que se evalúan normalmente en una validación analítica instrumental son:

- ❖ Condiciones óptimas de trabajo.
- ❖ Linealidad del sistema.

- ❖ Precisión del sistema.
- ❖ Exactitud del sistema.
- ❖ Precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad).
- ❖ Cantidad mínima detectable y cuantificable.
- ❖ Estabilidad de muestra.
- ❖ Etc.

En este trabajo solamente se trabajaron las siguientes pruebas de validación que se explicaran con más detalle.

Condiciones óptimas de trabajo^{6, 9, 10}

Cuando se realiza la validación de un método es necesario establecer las condiciones óptimas de trabajo tanto de las técnicas de medición como de preparación de la muestra para trabajar. Que son aptitudes del sistema que permiten verificar la funcionalidad del sistema independiente de las condiciones ambientales. Los equipos vienen ya por parte del fabricante con ciertas especificaciones que indican al usuario la manera de seleccionar las condiciones óptimas de trabajo para el equipo.

Pero en cualquier técnica como en las cromatográficas es importante encontrar las condiciones óptimas (fase móvil, fase estacionaria, detector, etc.) que permitirán lograr la mejor resolución de los compuestos. También es importante en los análisis por cromatografía, la velocidad del mismo, por lo que siempre se busca que la elución del compuesto se realice lo más rápido posible, es decir que salga de la columna rápidamente sin importar los otros parámetros, debido a que en las presentaciones farmacéuticas es el único principio activo presente y así tener los tiempos de análisis más rápidos que se tengan.

Linealidad del Sistema^{7, 9}

La linealidad del sistema se refiere al grado de concordancia que mantiene la variable dependiente y la variable independiente. Si estas variables son directamente proporcionales, se espera que tiendan a dar una línea recta, lo que permite la superposición de datos dentro de un gráfico que permite cuantificar y predecir una respuesta. La linealidad puede inspeccionarse visualmente 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. Al realizar esta prueba se

deben realizar un mínimo de 5 puntos en la gráfica (concentraciones) para establecer una linealidad.

La ecuación utilizada que describe una línea recta es la siguiente:

$$y = mx + b$$

en donde:

- y es la variable dependiente (señal).
- x es la variable independiente (concentración)
- m se refiere a la pendiente.
- b se refiere a la ordenada al origen.

El coeficiente de correlación (R o R^2) es una medida cuantitativa de la relación o correlación entre dos variables. Los coeficientes $+1$ o -1 indican una correlación estrictamente lineal, mientras que cuando se aproximan a cero no existe ninguna correlación lineal entre las variables.

En el caso de validación en cromatografía de líquidos, el criterio internacional normal para aceptar la linealidad del sistema es que los datos experimentales al momento de graficarse deben tener una tendencia lineal y además, tener un valor de coeficiente de correlación lineal $R^2 \geq 0.98$, este parámetro puede ser más estricto dependiendo también de la industria farmacéutica.

En la mayoría de los sistemas, se espera que la ordenada de la ecuación pase por el origen, es decir, que si el equipo de cromatografía no “ve” a ningún analito, entonces no debe dar respuesta alguna, es decir si no se encuentra nuestro analito de interés dentro de una muestra entonces la respuesta del equipo debe ser cero, no debe aparecer señal alguna, esto en el caso de que no existan componentes adicionales en la muestra y lo que se está analizando sea específicamente el que se espera encontrar. Como los datos reales obtenidos experimentalmente no siempre se cumplirá que la ordenada valga cero, por lo tanto se debe de realizar una prueba de hipótesis, la cual consiste en plantear una hipótesis nula (H_0) y una hipótesis alterna (H_1). Confirmando si nuestro modelo del sistema tiende o no al origen, ya que de ello dependerá si se utiliza la ecuación formal de linealidad $y = mx + b$ o la ecuación base de la técnica de cromatografía $A = FrC$ (en el caso de aplicar el método de estándar externo).

Las hipótesis planteadas son las siguientes:

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

$H_1: b \neq 0$ (Hipótesis alterna)

El tratamiento estadístico aplicado a estas pruebas de hipótesis es el conocido como “t de student”, para ello se tiene que realizar el procedimiento matemático correspondiente para obtener una t calculada (t_{cal}), la cual será comparada con una t de tablas ($t_{\alpha/2}$) con n-2 grados de libertad (n = al número de datos experimentales) y un intervalo de confianza que será del 95%.

La t_{cal} se obtiene mediante la siguiente fórmula:

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

Donde cada término de la ecuación significa:

b = Ordenada al origen.

β = Ordenada al origen poblacional.

Se = Error típico en la estimación.

Sxx = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de observaciones experimentales independientes.

\bar{x} = Media experimental de la variable independiente.

Para obtener la t calculada se requiere calcular la Se y Sxx además de Syy y Sxy, estos se obtienen con las siguientes ecuaciones:

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

$$Sxx = n \sum_{i=1}^{i=n} x^2 - \left(\sum_{i=1}^{i=n} x \right)^2$$

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

$$Sxy = n \sum_{i=1}^{i=n} xy - \left(\sum_{i=1}^{i=n} x \right) \left(\sum_{i=1}^{i=n} y \right)$$

Posteriormente en las tablas estadísticas “t-student” se busca la $t_{\alpha/2}$ siendo un valor de referencia para la comparación de nuestro valor de t_{cal} , con un nivel de significancia

α , es decir, el riesgo máximo que se está dispuesto a correr, y esto es generalmente del 5% cuando un estudio se comienza, en dado caso de que se puedan correr ciertos riesgos entonces este puede estar entre el 1% al 2%. Una vez obtenidos los valores de tablas y el valor calculado se comparan tomando en cuenta el criterio para rechazar la hipótesis nula que es:

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

Posteriormente se establecen los intervalos de confianza tanto para la ordenada al origen como para la pendiente los cuales se calculan con las ecuaciones siguientes:

Intervalo de confianza para la ordenada (IC_b):

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

El intervalo de confianza para la pendiente (IC_m):

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

Precisión del sistema^{9, 10}

Explica el grado de concordancia entre resultados de pruebas individuales, las cuales se realizaron independientes y pertenecen a una misma población y fueron obtenidos en el sistema estudiado.

El procedimiento es aplicado de manera repetida a muestreos múltiples de una muestra homogénea, e indica que tanto están oscilando los valores que se obtienen de manera experimental. 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. Matemáticamente es expresado como la desviación estándar (s), la varianza (s^2) o más comúnmente como el coeficiente de variación (CV) bajo condiciones específicas de medición. El valor obtenido experimentalmente es comparado con alguno establecido anteriormente, por ejemplo la industria farmacéutica que pide para la técnica de HPLC un (CV) del 2%. Normalmente al diseñar una técnica nueva se establece un CV del 5%.

La precisión del sistema (técnica en este caso) se evalúa preparando mínimo siete disoluciones estándar de la misma concentración, la concentración se toma del centroide de la curva de linealidad. Cada estándar es analizado por quintuplicado y con los datos obtenidos se calculan los parámetros estadísticos que se requieren. Además se puede aplicar la prueba de hipótesis para saber si los valores establecidos y obtenidos

cumplen o no la condición indicada. La prueba de hipótesis establecida es la comparación de:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2 \text{ (Hipótesis nula)}$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2 \text{ (Hipótesis alterna)}$$

La prueba estadística que se aplica para esta prueba es el estadístico de “Ji cuadrada” (χ^2).

Donde σ_0^2 se obtiene de despejar del CV la desviación estándar al considerar el valor establecido (5% ó 2%).

Con la siguiente ecuación se calcula la “Ji cuadrada” experimental o calculada:

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

donde:

n = número de determinaciones.

s = desviación estándar muestral (experimental).

σ^2 = desviación estándar máxima aceptada.

La χ_{calc}^2 es comparada con la χ^2 de tablas estadísticas con un nivel de significancia $\alpha=5\%$. Para esta prueba, χ^2 es el valor de tablas con n-1 grados de libertad, debido a que se trata de una prueba unilateral el criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

Una vez comparados los valores de χ^2 calculados con los de tablas se llega a una decisión con la cual se puede aceptar o rechazar las hipótesis planteadas y se llega entonces a una conclusión diciendo si el sistema es preciso con referencia al coeficiente de variación establecido al inicio de la prueba.

Después se realiza el intervalo de confianza al nivel $1 - \sigma$ para σ^2 , esto se realiza para establecer si los valores obtenidos de experimentos posteriores aún se encuentran dentro de los valores establecidos de precisión del sistema. La ecuación utilizada para esto es:

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

en donde:

$\chi_{\alpha/2}^2$ y $\chi_{(1-\alpha/2)}^2$ son valores provenientes de tablas.

Estabilidad¹⁰

Al realizar un trabajo experimental utilizando estándares, se debe determinar el tiempo en el cual la sustancia se mantiene íntegra. A pesar de que no es un requisito estricto de las validaciones, es importante su verificación, porque pueden ser determinadas fuentes de error o de variación, debido a que las muestras a veces deben permanecer un tiempo prolongado de almacenamiento antes de ser analizadas y a variaciones de temperatura determinadas. Si se utiliza un equipo automatizado o semiautomatizado de HPLC, el tiempo de análisis para las muestras puede ser prolongado, debido a que a veces se analizan más de 20 muestras y el análisis de cada una puede ir de unos minutos, a aquellas que sobrepasan los 15 minutos, si tomamos en cuenta que existen equipos automatizados de HPLC con capacidad de análisis para 100 muestras entonces podemos observar que pasa mucho tiempo entre la primera muestra analizada y la última.

Después de tomar en cuenta los factores que afectan la estabilidad de la muestra, estas son sometidas a un análisis el día de su preparación y posteriormente a diferentes intervalos de tiempo establecidos durante el estudio.

La prueba estadística se realiza como una prueba de hipótesis relativa a las varianzas, que se utilizan cuando se comparan dos métodos, técnicas o experimentos.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas es:

$$H_0: S_1^2 = S_2^2$$

$$H_1: S_1^2 \neq S_2^2$$

El estadístico de prueba aplicada es la prueba “F de Fisher” debido a que se determina si las muestras provienen de poblaciones iguales, por lo que se realiza primero la obtención de:

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

donde:

s_1^2 es la varianza muestral mayor con n_1-1 grados de libertad

s_2^2 es la varianza muestral menor con n_2-1 grados de libertad

La hipótesis nula H_0 es rechazada si:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2} \text{ con grados de libertad } n_1-1, n_2-1$$

La F calculada y la F de tablas son comparadas y de acuerdo a los resultados obtenidos para esta prueba de hipótesis se toma una decisión de realizar la siguiente prueba de hipótesis sobre las medias, considerando si se realizará tomando dicha prueba para varianzas iguales o diferentes.

El realizar la prueba de hipótesis relacionando a las medias se utiliza para evaluar si los resultados de dos experimentos pertenecen a la misma población o bien si los métodos de análisis arrojan los mismos resultados de la población. Aquí se aplica la prueba de hipótesis para determinar si nuestras disoluciones estándar permanecen iguales bajo condiciones de almacenamiento determinadas, con el paso del tiempo. Esta comparación la realizamos aplicando la prueba estadística "t-student". Se plantea la siguiente prueba de hipótesis:

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

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

donde:

μ_1 = Media experimental obtenida en el ensayo correspondiente a s_1^2 de la etapa I.

μ_2 = Media experimental obtenida en el ensayo correspondiente a s_2^2 de la etapa I.

Si en la prueba de hipótesis sobre las varianzas, se obtiene que las varianzas son iguales, la t experimental se calcula con la siguiente ecuación:

$$t_{cal.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

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

En caso de que las varianzas no fueron iguales, debido a que el analista no presentó la misma precisión, el estadístico de prueba utilizado es:

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_1}}}$$

con ∞ grados de libertad, calculando éstos con la siguiente ecuación:

$$\infty = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_1}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_1}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

para ambas pruebas:

X_1 = Media experimental correspondiente al valor S_1^2

X_2 = Media experimental correspondiente al valor S_2^2

n_1 = Numero 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

La hipótesis nula es rechazada si:

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

Una vez obtenida la t_{calc} y la $t_{\alpha/2}$ se procede a comparar ambos valores para tomar la decisión correspondiente a rechazar o aceptar las hipótesis planteadas y con ello llegar a la conclusión del objetivo que hemos planteado al inicio de la prueba, llevando a la conclusión de si las muestras fueron estables en el tiempo estudiado a las condiciones de almacenaje establecidos.

Materia^{12, 13, 14}

Espátula.
Pipetas Pasteur.
Vasos de precipitados de 5, 10, 80 y 150mL.
Viales con capacidad de 2mL, marca Agilent, lote 5182-0715.
12 Matraces aforados tipo A de 5mL con un intervalo de tolerancia de ± 0.04 mL, marca Pyrex lote: 5640, Matraz aforado de 50mL marca Blaubrand, intervalo de tolerancia ± 0.06 mL, lote 03.04 certificado ISO 1042.
Pipetas de émbolo de precisión:
Pipeta de émbolo de precisión, marca Hamilton SoftGrip, no. de serie: 028450, certificado ISO 9001, capacidad: 1-10 μ L.
Pipeta de émbolo de precisión, marca Hamilton SoftGrip, no. de serie: 028328, certificado ISO 9001, capacidad: 10-100 μ L.
Pipeta de émbolo de precisión, marca SoftGrip, Hamilton, no. de serie: 042534, certificado ISO 9001, capacidad: 100-1 000 μ 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 μ L, modelo Microliter, # 725.
Balanza analítica, marca E. Mettler Zürich, capacidad máxima de 110g, sensibilidad 0,1mg.

Instrumentación

<p>Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (CLAE), marca Knauer modelo Smartline con las siguientes características: Bomba de doble pistón, marca Knauer modelo Smartline 1000 Válvula de inyección de 20μL. Detector UV marca Knauer, modelo Smartline 2500. Computadora cargada con el programa Eurochrom.</p>
<p>Columna marca Phenomenex, no. de serie 260436-2, de longitud de columna de 50mm x 4.6mm de diámetro interno, empacada con fase estacionaria inversa Luna C-18 (fase químicamente unida de Octadecil) con tamaño de partícula de 5μm y porosidad de 100Å.</p>

Reactivos

Reactivo	Marca	Lote	Pureza	Presentación
Vitamina K ₃	CHEM SERVICE	306-77C	98%	Polvo Amarillo
Acetonitrilo	J.T. Baker	9017-02	99,99%	Líquido transparente

Condiciones Óptimas de Trabajo

Determinación de la fase móvil adecuada para el análisis de la vitamina K₃

Para poder realizar el análisis adecuado en cromatografía de líquidos fue necesario conocer el disolvente adecuado el cual, permitiera un tiempo de interacción favorable de la vitamina con la fase estacionaria que facilitara su análisis y separación y a su vez requiriera el menor tiempo de análisis posible. Para ello se prepararon 5mL de una disolución a una concentración aproximada de 60 ppm en acetonitrilo.

Una vez lista la disolución, ésta se inyectó al cromatógrafo, trabajándose en modo isocrático con una fase móvil de 100% de acetonitrilo (AcN), la vitamina salió a los 0.817 minutos, este valor estaba cercano al del tiempo muerto (0.715 minuto), por lo tanto y debido a que no es adecuado analizar un compuesto que esté muy cercano al tiempo muerto, se procedió a modificar el poder de elución de la fase móvil para que el tiempo de retención de la vitamina aumentara.

Para ello se modificó la fase móvil a 90% AcN y 10% H₂O para disminuir el poder de elución de ésta, el estándar antes preparado de vitamina K₃ fue nuevamente inyectado, se observó el cromatograma obtenido y no se obtuvo una modificación del tiempo de retención apreciable ($t_r=0.850$ minuto) al del tiempo muerto, por ello se decidió modificar nuevamente la fase móvil a 85% AcN y 15% H₂O lo que dio un $t_r=0.917$ minuto lo que permite la interacción de la vitamina K₃ con la fase estacionaria más tiempo y alejado del tiempo muerto, además de que permite un tiempo de análisis adecuado, por lo que esta fase móvil fue seleccionada para realizar el análisis y validación de la técnica.

Preparación de la disolución madre de vitamina K₃

Se utilizó un vaso de precipitados de 50 mL para pesar 50 mg del estándar de vitamina K₃, lo cual permitió disolverla en el mismo recipiente para evitar pérdidas, posteriormente se disolvió la vitamina con unos 3 mL de nuestro disolvente acetonitrilo, y se trasvasó al matraz aforado de 50 mL. Lavar de tres a cuatro veces el vaso de precipitados, con 3 mL de acetonitrilo y trasvasarlo todo al matraz aforado de 50 mL, con ello se busca minimizar la pérdida de vitamina K₃ durante la preparación.

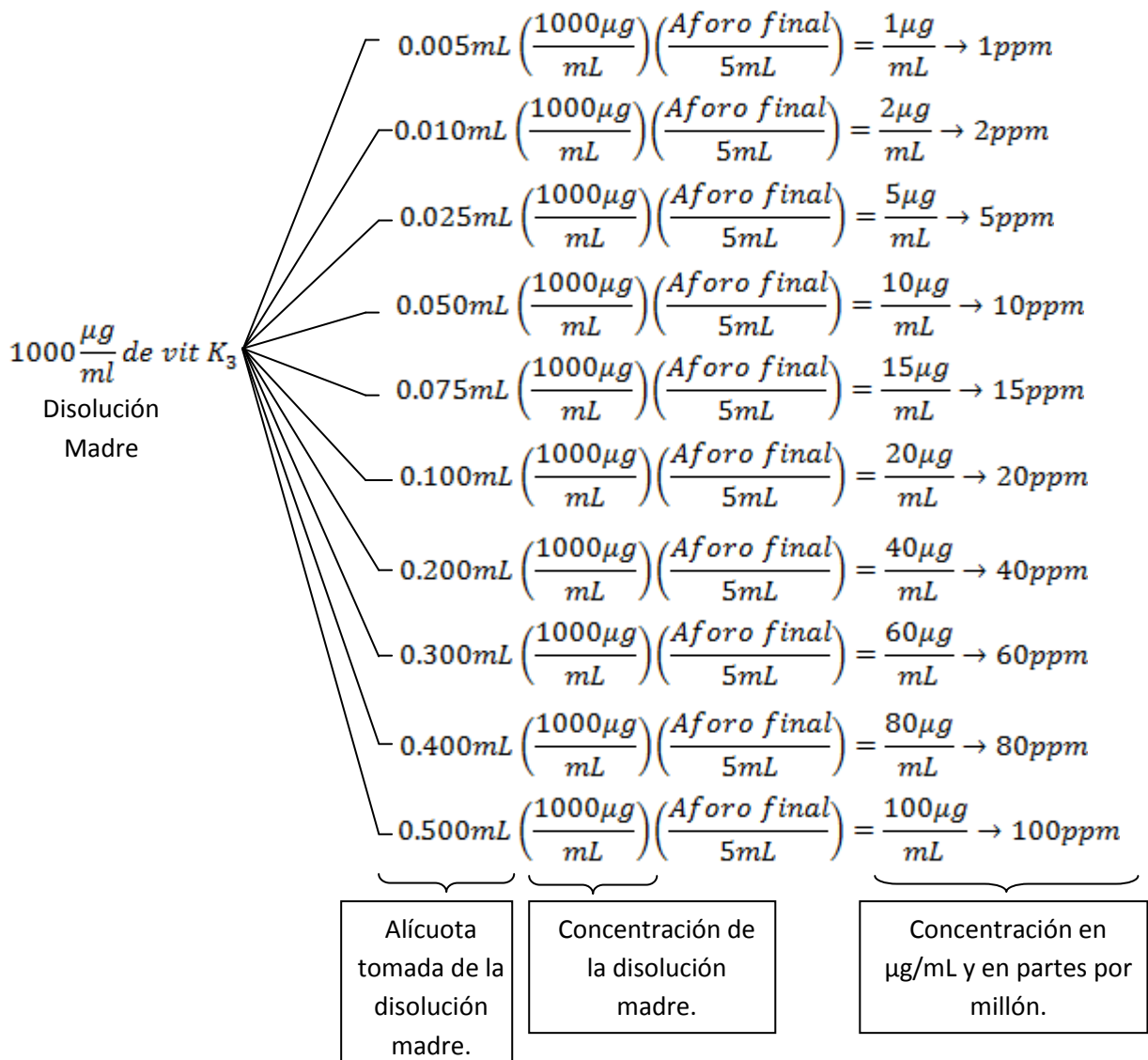
Llevar al aforo el matraz de 50 mL con acetonitrilo con lo que tendremos la disolución madre con la siguiente concentración de vitamina K₃.

$$50\text{mg vit } K_3 = \left(\frac{1000\mu\text{g}}{1\text{mg}}\right) \left(\frac{\text{Aforo}}{50\text{mL}}\right) = 1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ de vit } K_3 \rightarrow 1000 \text{ ppm de vit } K_3$$

Linealidad del sistema

En la literatura^{1,2} se reporta que la vitamina K₃ se encuentra en muestras alimentarias, farmacéuticas y clínicas en intervalos de concentración que van de 1 ppm a 1000 ppm, debido a lo amplio del intervalo se decidió realizar dos curvas de calibración con dos amplitudes en la concentración, que se llamarán intervalo corto e intervalo largo, los cuales comprenden 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm y 20 ppm para el intervalo corto y 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm y 100 ppm para el intervalo largo.

A partir de la disolución madre, se prepararon los siguientes estándares de vitamina K₃.



Cada una de las curvas (intervalo corto y largo) fue preparada por duplicado y cada disolución estándar fue inyectada por triplicado. Para cada concentración se obtuvo un total de 6 datos de área que fueron analizados estadísticamente obteniendo de estos datos los parámetros estadísticos (media, desviación estándar y coeficiente de variación), los datos de regresión lineal, (ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación) y realizándoles las pruebas de hipótesis e intervalos de confianza correspondientes.

Precisión del sistema

La disolución madre utilizada para preparar las disoluciones para esta prueba fue la misma que la utilizada en la prueba de linealidad (1000 ppm). Para la preparación de estos estándares se tomó la concentración del centroide de cada curva de calibración.

Para el intervalo corto se tomó la concentración de 10 ppm y se prepararon 7 disoluciones de esta concentración.

Para el intervalo largo se tomó la concentración de 60 ppm y se prepararon 7 disoluciones de esta concentración.

Cada disolución estándar preparado fue inyectado por quintuplicado. Posteriormente para cada concentración se calcularon los parámetros estadísticos (media, desviación estándar y coeficiente de variación), y se realizaron las pruebas de hipótesis e intervalos de confianza correspondientes.

Estabilidad de la vitamina K₃

Para el estudio de la estabilidad de esta vitamina los mismos datos de la prueba de precisión corresponderían para la prueba de estabilidad al día cero, los mismos estándares preparados para la prueba de precisión fueron inyectados por quintuplicado siete días después de haber realizado la prueba de precisión y al aceptarse que siguieron estables después de aplicar las pruebas de validación respectivas, se inyectaron nuevamente otros siete días después lo que correspondería al día catorce y ya no se haría otro tiempo más. Solamente se utilizaron estas tres fechas para la determinación de esta prueba, debido a que los estándares en farmacia para el análisis de fármacos no permanecen más de unas horas sin ser analizados y mucho menos una semana. Lo que se quiso hacer con esta prueba es determinar que el

estándar es muy estable a las condiciones de almacenamiento que fueron sometidos y hacer hincapié en que su estructura química es bastante estable.

Las condiciones de almacenamiento del estándar de vitamina K₃ fueron las siguientes:

- Frascos viales color ámbar sellados con cinta teflón.
- Aislados de la luz almacenados en un refrigerador comercial con una temperatura de aproximadamente 4°C hasta su uso.

Validación del sistema

Condiciones óptimas de trabajo

Después de las pruebas realizadas en la parte experimental para encontrar las mejores condiciones de la fase móvil para obtener una buena separación en el menor tiempo de análisis, las condiciones óptimas de trabajo para realizar la validación del Instrumento fueron:

- Inyección de muestra de 20 µL.
- Detector UV-Vis: con una longitud de onda de trabajo de 250 nm.
- Columna de acero inoxidable con una longitud de 50 mm x 4.6 mm de diámetro interno, empacada con fase estacionaria inversa Luna C-18 (fase químicamente unida de Octadecil) con tamaño de partícula de 5 µm y porosidad de 100 Å.
- Fase móvil con la composición de 15% H₂O y 85% AcN.

Después de hallar las condiciones óptimas de trabajo se procedió a realizar las pruebas de validación de linealidad del sistema, precisión del sistema y estabilidad de las disoluciones estándar. Hay que indicar en esta parte que todos los datos, cálculos realizados y resultados obtenidos de éstos se encuentran en el anexo I de esta tesis para su comprobación, y que son la impresión de las ventanas creadas en el programa Excel, y que fue desarrollada para facilitar los cálculos.

Linealidad del sistema

A continuación se presentan las curvas patrón obtenidas de los 2 intervalos a estudiar, corto y largo:

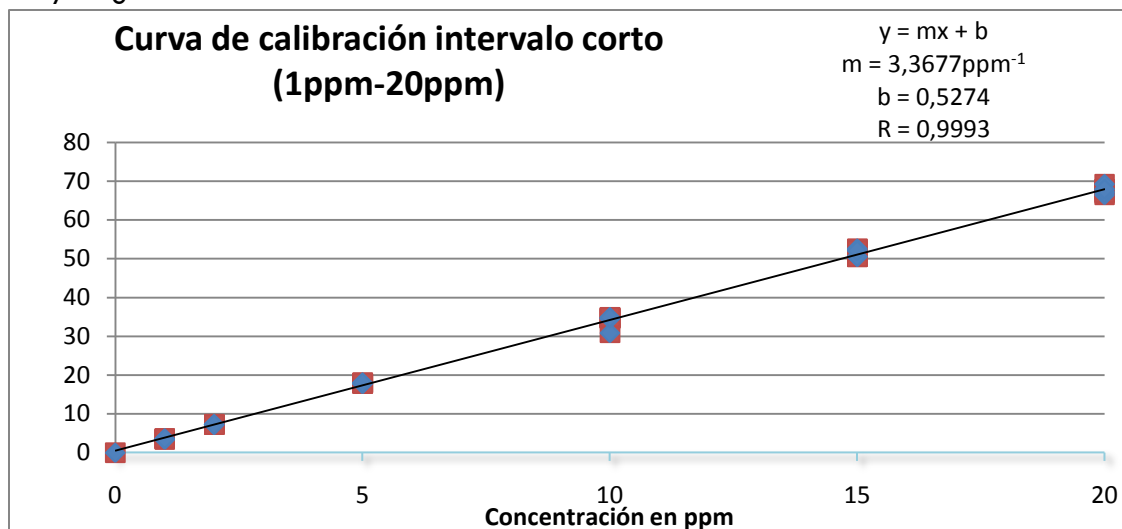


Gráfico 1. Curva de Calibración vitamina K₃ intervalo corto considerando el valor (0,0).

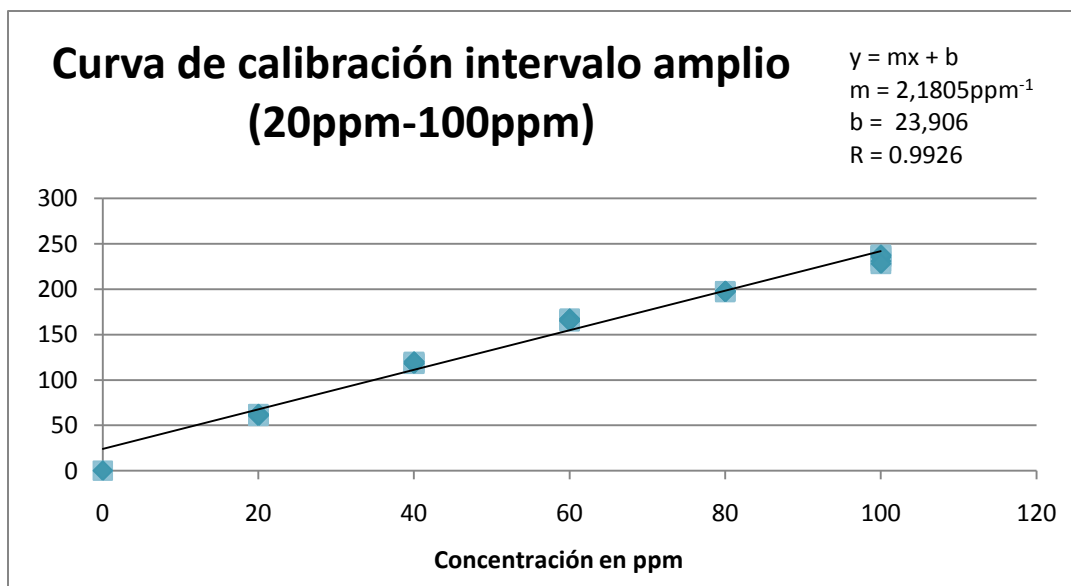


Gráfico 2. Curva de Calibración vitamina K₃ intervalo largo considerando el valor (0,0).

Como se puede observar en la gráfica del intervalo corto se tiene una tendencia lineal entre los datos, además de que parece tender al origen (punto 0,0); además de presentar un coeficiente de correlación > 0.98 (0.9993), lo cual cumple matemáticamente también una tendencia lineal bajo consideraciones de la industria farmacéutica.

En el caso de la gráfica del intervalo largo se observa una tendencia lineal entre los datos de los estándares pero no se observa que tienda al origen (punto 0,0), además aunque presenta un coeficiente de correlación > 0.98 (0.9926) y parecería cumplir matemáticamente una tendencia lineal es observable que sería mejor esta linealidad si no tomamos en cuenta el punto del origen.

A pesar de lo indicado anteriormente, la duda que se puede tener es sobre la aceptación de si el valor de la ordenada al origen será cero o no, y así poder estar seguros de que ecuación será la que se va aplicar para realizar el análisis cuantitativo, es decir, si se utiliza la ecuación designada teóricamente para la cromatografía por el método de estándar externo $A = Fr \times C$ o la ecuación formal de una línea recta $y = mx + b$, se procedió a realizar la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen y así establecer con mayor seguridad la ecuación a utilizar.

Curva de calibración intervalo corto

Se realizó entonces la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen, el estadístico de prueba es la “t-student” y se consideraron las siguientes hipótesis:

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

$$H_1: b\neq 0 \text{ (Hipótesis alterna)}$$

Se realizó el procedimiento matemático para obtener la t calculada, con los datos obtenidos para realizar esa curva patrón:

$$Se = \sqrt{\frac{(66486)(756248.551) - (224083.4069)^2}{(37 - 2)(37)66486}} = 0.8792906$$

donde:

$$S_{xx} = 66486$$

$$S_{yy} = 756248.551$$

$$S_{xy} = 224083.406$$

Con lo que se obtiene que:

$$t_{calc} = \frac{0.5274 - 0}{0.8792906} \sqrt{\frac{(37)(66486)}{66486 + ((37)(8.594594595))^2}} = 3,5756973$$

donde:

$$b = 0.5274$$

$$\beta = 0$$

$$Se = 0.8792906$$

$$n = 37$$

$$\bar{x} = 8.594594595$$

Recordando que para este estudio se trabajo con un nivel de significancia del 5% y que el criterio de rechazo de la hipótesis nula es el siguiente:

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

El valor de t en tablas para 35 grados de libertad (37-2) y un nivel de significancia del 95% es de:

$$t_{0.025,35} = 2.03$$

Por lo tanto se obtuvo que $3.58 > 2.03$ por lo que se tiene que la $t_{\text{calc}} > t_{(\alpha/2, n-2)}$ por lo que la H_0 es rechazada, se concluye que la curva patrón no tiende al origen (la ordenada no vale 0) y para realizar el análisis cuantitativo se utiliza la ecuación de la línea recta $y = mx + b$

Por lo anterior la gráfica y la regresión lineal se realizarán sin tomar el valor (0,0), calculando además los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente.

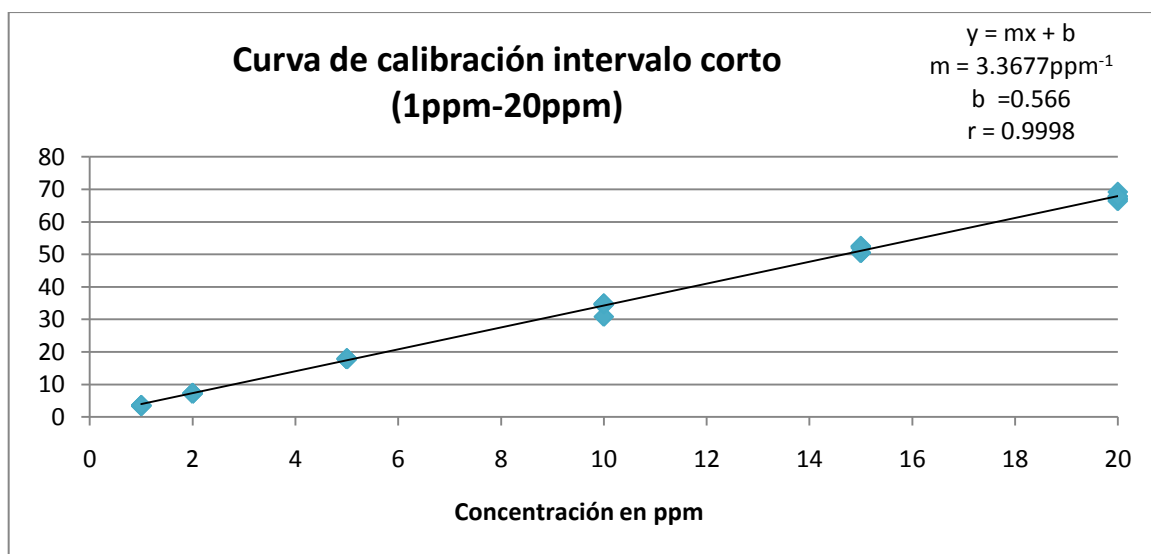


Gráfico 3. Curva de Calibración vitamina K_3 intervalo corto a trabajar.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC_b = 0.56599056 \pm (2.0322445)(0.88719319) \sqrt{\frac{61956 + ((36)(8.833333333))^2}{(36)61956}} = 0.48753025$$

$$IC_b = 0.56599056 \pm 0.48753025$$

$$0.0784603 < 0.56599056 < 1.05352081$$

El intervalo de confianza para la pendiente queda como sigue:

$$IC_m = 3.36767774 \pm (2.0322445)(0.88719319) \sqrt{\frac{36}{61956}} = 0.0434614$$

$$IC_m = 3.36767774 \pm 0.0434614$$

$$3.32421633 < 3.36767774 < 3.41113914$$

Curva de calibración intervalo largo

Para el caso de este intervalo se aplica la misma prueba de hipótesis y se realizó el procedimiento matemático para obtener la t calculada, con los datos obtenidos para realizar esa curva patrón:

$$Se = \sqrt{\frac{(852000)(4124759.278) - (1857827.884)^2}{(31 - 2)(31)852000}} = 9.05269745$$

donde:

$$S_{xx} = 852000$$

$$S_{yy} = 4124759.278$$

$$S_{xy} = 1857827.884$$

Con lo que se obtiene que:

$$t_{calc} = \frac{23.906 - 0}{9.05269745} \sqrt{\frac{(31)(852000)}{852000 + ((31)(58.06451613))^2}} = 6.709061005$$

donde:

$$b = 23.906$$

$$\beta = 0$$

$$Se = 9.05269745$$

$$n = 31$$

$$\bar{x} = 58.06451613$$

Recordando que para este estudio se trabajo con un nivel de significancia del 5% y que el criterio de rechazo de la hipótesis nula es el siguiente:

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

El valor de t en tablas para 29 grados de libertad (31-2) y un nivel de significancia del 95% es de:

$$t_{0.025,29} = 2.04$$

Por lo tanto se obtuvo que $6.71 > 2.04$ por lo que se tiene que la $t_{calc} > t_{(\alpha/2, n-2)}$ por lo que la H_0 es rechazada, se concluye que la curva patrón no tiende al origen (la ordenada no vale 0) y para realizar el análisis cuantitativo se utiliza la ecuación de la línea recta $y = mx + b$

Por lo anterior la gráfica y la regresión lineal se realizarán sin tomar el valor (0,0), calculando además los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente.

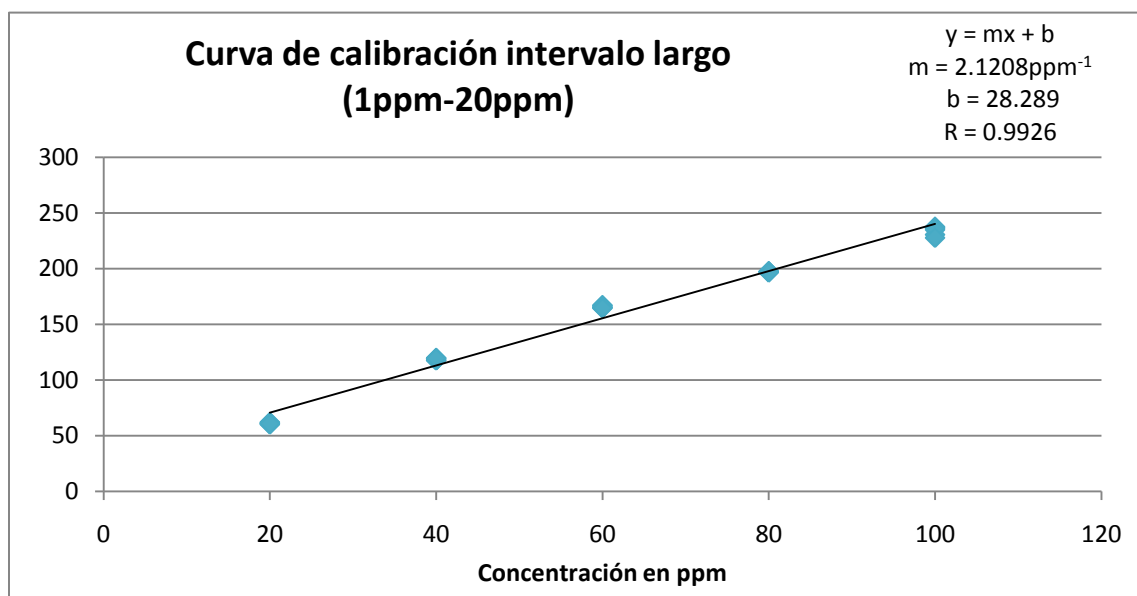


Gráfico 4. Curva de Calibración vitamina K_3 intervalo largo a trabajar.

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$IC_b = 28.2885267 \pm (2.04840711)(7.79269077) \sqrt{\frac{720000 + ((30)(60))^2}{(30)720000}} = 3.336630845$$

$$IC_b = 28.2885267 \pm 3.336630845$$

$$21.4537483 < 28.2885267 < 35.12330503$$

El intervalo de confianza para la pendiente queda como sigue:

$$IC_m = 2.12078467 \pm (2.04840711)(7.79269077) \sqrt{\frac{30}{720000}} = 0.0503016$$

$$IC_m = 2.32284557 \pm 0.0503016$$

$$2.01774651 < 2.12078467 < 2.22382283$$

Por lo tanto una vez realizadas las pruebas de hipótesis se demostró que ambos intervalos de concentración tienden a la linealidad, pero la ordenada de ambos no tiende al origen es decir, no pasa por cero y es por ello que en ambos casos se utilizará la ecuación de una línea recta que es $y = mx + b$.

Precisión del sistema

Esta prueba fue aplicada a las varianzas obtenidas tanto para el intervalo corto como para el largo.

Precisión Intervalo corto

Se realizó entonces la prueba de hipótesis sobre las variancias utilizando el estadístico de prueba χ^2 . Las hipótesis consideradas son las siguientes:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2 \text{ (Hipótesis nula)}$$

$$H_1: s^2 > \sigma_0^2 \text{ (Hipótesis alterna)}$$

Donde σ_0^2 se obtiene de despejar el CV la desviación estándar al considerar el valor establecido (5% ó 2%) de los datos obtenidos experimentalmente.

Resultados del intervalo corto

$$n = 35$$

$$\bar{x} = 33.1300714$$

$$s = 0.60449177$$

$$s^2 = 0.3654103$$

$$CV = 1.82460147\%$$

Recordando que para el estudio de precisión para el intervalo corto, los datos se obtuvieron de manera experimental con la concentración de 10 ppm. Tomando en consideración un valor teórico de CV del 5% entonces se tiene que:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

Y considerando que el CV a estudiar es del 5% se despeja s:

$$5 = \frac{s}{\bar{x}} * 100$$

El despeje queda como sigue:

$$s = \frac{5 * \bar{x}}{100}$$

Se sustituyen los valores indicados en el recuadro de arriba.

$$s = \frac{5 * 33.1300714}{100} = 1.65650357 \rightarrow \sigma_0^2 = 2.74400408$$

Obtenido el valor teórico de referencia σ_0^2 con el cual comparar, entonces se procede a determinar el valor de χ^2 calculada:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(35 - 1)0.3654103}{2.74400408} = 4.52767191$$

De acuerdo a las tablas de χ^2 para un nivel de significancia del 95% (α de 0.05) y 34 (35-1) grados de libertad se tiene un valor de:

$$\chi^2_{0.05, 34} = 48.6023674$$

Recordando que el criterio de rechazo de la hipótesis nula es el siguiente:

$$\chi_{calc}^2 > \chi_{\alpha}^2_{n-1}$$

Por lo tanto se obtuvo que $4.53 < 48.60$ por lo que se tiene que $\chi_{calc}^2 < \chi_{\alpha}^2_{n-1}$ por lo que la H_0 no se rechaza, se concluye que el sistema es preciso para las concentraciones en el intervalo corto con un error máximo del 5%.

Hecho lo anterior se procedió a calcular el intervalo de confianza para la s:

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

el valor de tablas de $\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025, 34}^2 = 51.9659952$

el valor de tablas de $\chi_{1-\alpha/2}^2 = \chi_{0.975, 34}^2 = 19.8062531$

con lo sustituido se tiene que:

$$\sqrt{\frac{(35-1)0.3654103}{51.9659952}} < 0.60449177 < \sqrt{\frac{(35-1)0.3654103}{19.8062531}}$$

Por lo que el intervalo de confianza queda como sigue:

$$0.49 < 0.60 < 0.79$$

En determinados estudios, el parámetro utilizado como referencia es más estricto y este corresponde al 2% como error máximo de precisión (como se plantea en la industria farmacéutica para las técnicas cromatográficas), por lo que la prueba de hipótesis también fue realizada para este valor.

Se realizó el cálculo de σ_0^2 :

$$s = \frac{2 * 33.1300714}{100} = 0.66260143 \rightarrow \sigma_0^2 = 0.43904065$$

Este es el valor de referencia σ_0^2 con el cual comparar. Ahora se procede a determinar el valor de χ^2 calculada con lo cual se tiene:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(35 - 1)0.3654103}{0.43904065} = 28.2979495$$

y como ya se tenía el valor de tablas de χ^2 tenemos:

$$\chi^2_{0.05, 34} = 48.6023674$$

Por lo tanto se obtuvo que $28.30 < 48.60$ por lo que se tiene que $\chi_{calc}^2 < \chi_{\alpha, n-1}^2$ por lo que la H_0 no se rechaza, se concluye que el sistema también es preciso para las concentraciones en el intervalo corto con un error máximo del 2%.

Hecho lo anterior se procedió a calcular el intervalo de confianza para la s:

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

el valor de tablas de $\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025, 34}^2 = 51.9659952$

el valor de tablas de $\chi_{1-\alpha/2}^2 = \chi_{0.975, 34}^2 = 19.8062531$

con lo sustituido se tiene que:

$$\sqrt{\frac{(35-1)0.3654103}{51.9659952}} < 0.60449177 < \sqrt{\frac{(35-1)0.3654103}{19.8062531}}$$

Por lo que el intervalo de confianza queda como sigue:

$$0.49 < 0.60 < 0.79$$

Precisión para el intervalo largo

Recordando que para el estudio de precisión para el intervalo largo, los datos se obtuvieron de manera experimental con la concentración de 60 ppm y tomando en consideración un valor teórico de CV del 5% entonces tenemos que la:

Resultados del intervalo largo
n = 35
$\bar{x} = 155.714571$
s = 2.93549654
s ² = 8.61713996
CV = 1.88517781%

$$s = \frac{5 * 155,714571}{100} = 7.78572857 \rightarrow \sigma_0^2 = 60.6175694$$

Con lo anterior el valor de χ^2 calculada obtenida es:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(35 - 1)8,61713996}{60,6175694} = 4.8332977$$

El valor de tablas de χ^2 es:

$$\chi^2_{0.05, 34} = 48.6023674$$

Por lo tanto se obtuvo que $4.83 < 48.60$ por lo que se tiene que $\chi_{calc}^2 < \chi_{\alpha, n-1}^2$ por lo que la H_0 no se rechaza, se concluye que el sistema es preciso para las concentraciones en el intervalo largo con un error máximo del 5%.

Hecho lo anterior se procedió a calcular el intervalo de confianza para la s:

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

El valor de tablas de $\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025, 34}^2 = 51.9659952$

El valor de tablas de $\chi_{-\alpha/2}^2 = \chi_{0.975, 34}^2 = 19.8062531$

Con lo que sustituido tenemos:

$$\sqrt{\frac{(35 - 1)8.61713996}{51.9659952}} < 2.93549654 < \sqrt{\frac{(35 - 1)8.61713996}{19.8062531}}$$

El intervalo de confianza queda como sigue:

$$2.37444114 < 2.93549654 < 3.84609378$$

También se realizó el estudio para el intervalo largo considerando una precisión con error del 2%.

Se realizó el cálculo de σ_0^2 :

$$S = \frac{2 * 155.714571}{100} = 3.11429143 \rightarrow \sigma_0^2 = 9.6988111$$

Este es el valor de referencia σ_0^2 con el cual comparar. Ahora se procede a determinar el valor de χ^2 calculada con lo cual se tiene:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(35 - 1)8.61713996}{9.6988111} = 30.2081106$$

y como ya se tenía el valor de tablas de χ^2 tenemos:

$$\chi^2_{0.05, 34} = 48.6023674$$

Por lo tanto se obtuvo que $30.21 < 48.60$ por lo que se tiene que $\chi_{calc}^2 < \chi_{\alpha, n-1}^2$ por lo que la H_0 no se rechaza, se concluye que el sistema también es preciso para las concentraciones en el intervalo corto con un error máximo del 2%.

Hecho lo anterior se procedió a calcular el intervalo de confianza para la s:

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

El valor de tablas de $\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025, 34}^2 = 51.9659952$

El valor de tablas de $\chi_{-\alpha/2}^2 = \chi_{0.975, 34}^2 = 19.8062531$

Con lo que sustituido tenemos:

$$\sqrt{\frac{(35-1)8.61713996}{51.9659952}} < 2.93549654 < \sqrt{\frac{(35-1)8.61713996}{19.8062531}}$$

El intervalo de confianza queda como sigue:

$$2.37444114 < 2.93549654 < 3.84609378$$

Estabilidad de estándares

Intervalo corto

Se trabajo con los estándares de 10 ppm utilizados en la prueba de precisión.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas es:

$$H_0: s_1^2 = s_2^2 \text{ (Hipótesis nula)}$$

$$H_1: s_1^2 \neq s_2^2 \text{ (Hipótesis alterna)}$$

Resultados del día cero al siete



Se aplica la prueba estadística F de Fisher, y se obtiene la F calculada.

$$F_{calc} = \frac{0.37030712}{0.3654103} = 1.013400886$$

Se obtiene la F de Fisher en tablas para un nivel de significancia del 95% y 34 (n_1-1 y n_2-1) grados de libertad para las 2 muestras:

$$F_{0.025,34,34} = 1.981119274$$

Recordando que la hipótesis nula H_0 es rechazada si:

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

Por lo tanto se obtuvo que $1.01 < 1.98$ por lo que se tiene que $F_{cal} < F_{\alpha/2}$ por lo que la H_0 no se rechaza, por lo que las varianzas son iguales lo que concluye que el analista mantuvo la misma precisión en los 2 días de estudio, y se procederá a realizar la prueba de hipótesis a las medias considerando varianzas iguales.

La prueba de hipótesis sobre las medias es :

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0 \text{ es decir } \mu_1 = \mu_2 \text{ (Hipótesis nula)}$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \text{ (Hipótesis alterna)}$$

La prueba estadística es la t de student, por lo que se obtiene la t calculada.

$$t_{cal.} = \frac{33.1300714 - 32.9595486}{\sqrt{(35 - 1)0.3654103 + (35 - 1)0.37030712}} \sqrt{\frac{(35)(35)(35 + 35 - 2)}{35 + 35}} = 1.17614564$$

El valor de la t de student en tablas a un nivel de significancia del 95% y 34 (35-1) grados de libertad es el siguiente:

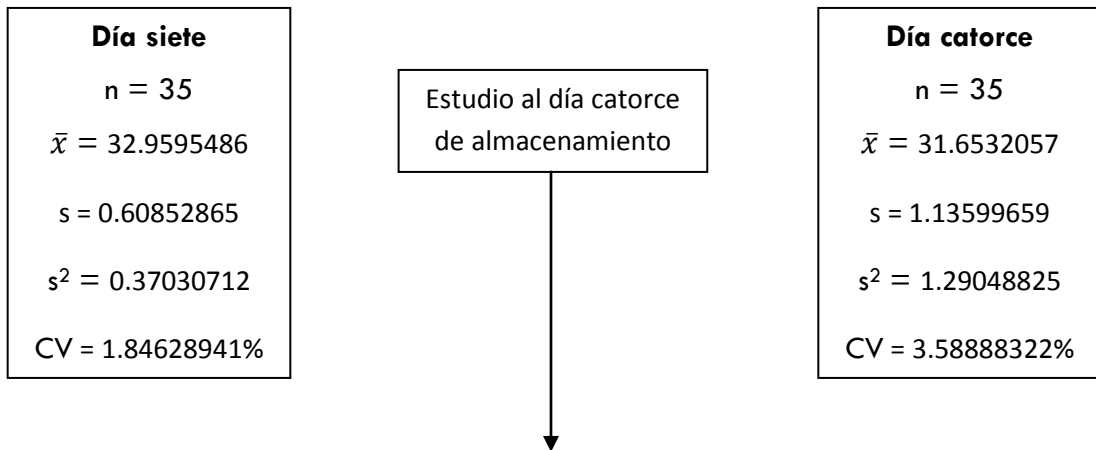
$$t_{0.025,34} = 2.29211796$$

Recordando que para este estudio se trabajo con un nivel de significancia del 5% y que el criterio de rechazo de la hipótesis nula es el siguiente:

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

Por lo tanto se obtuvo que $1.18 < 2.29$ por lo que se tiene que $t_{calc} < t_{\alpha/2}$ por lo que la H_0 no se rechaza, se concluye que los datos pertenecen a la misma población y por lo tanto los estándares son estables durante 7 días a las condiciones de almacenamiento indicadas.

Resultados del día siete al catorce



Se obtiene la F calculada.

$$F_{calc} = \frac{1.29048825}{0.37030712} = 3.484913402$$

La F de Fisher en tablas sigue siendo:

$$F_{0.025,34,34} = 1.981119274$$

Por lo tanto se obtuvo que $3.48 > 1.98$ por lo que se tiene que $F_{cal} > F_{\alpha/2}$ por lo que la H_0 se rechaza, por lo que las varianzas no son iguales lo que concluye que el analista varió su precisión en los 2 días de estudio, y se procederá a realizar la prueba de hipótesis a las medias considerando varianzas diferentes.

Se realiza la prueba sobre las medias, y se obtiene la t calculada.

$$t_{cal} = \frac{32.9595486 - 31.6532057}{\sqrt{\frac{0.37030712}{35} + \frac{1.29048825}{35}}} = 5.99698737$$

El valor de la t de student en tablas a un nivel de significancia del 95%, pero ahora se calculan los grados de libertad con la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{1,29048825}{35} + \frac{0,37030712}{35}\right)^2}{\frac{\left(\frac{1,29048825}{35}\right)^2}{35 - 1} + \frac{\left(\frac{0,37030712}{35}\right)^2}{35 - 1}} = 52.02821 \sim 52$$

Lo que nos da una t de tablas con el siguiente valor:

$$t_{0.025,52} = 2.3081648$$

Por lo tanto se obtuvo que $5.99 > 2.31$ por lo que se tiene que $t_{calc} > t_{\alpha/2}$ por lo que la H_0 se rechaza, se concluye que los datos no pertenecen a la misma población y por lo tanto los estándares no fueron estables durante 14 días a las condiciones de almacenamiento indicadas.

Intervalo largo

Se trabajo con los estándares de 60 ppm utilizados en la prueba de precisión.

Resultados del día cero al siete



Se obtiene la F calculada.

$$F_{calc} = \frac{8.61713996}{8.45553352} = 1.019112507$$

La F de Fisher en tablas sigue siendo:

$$F_{0.025,34,34} = 1.981119274$$

Por lo tanto se obtuvo que $1.02 < 1.98$ por lo que se tiene que $F_{cal} < F_{\alpha/2}$ por lo que la H_0 no se rechaza, por lo que las varianzas son iguales lo que concluye que el analista mantuvo la misma precisión en los 2 días de estudio, y se procederá a realizar la prueba de hipótesis a las medias considerando varianzas iguales.

Se realiza la prueba sobre las medias, y se obtiene la t calculada.

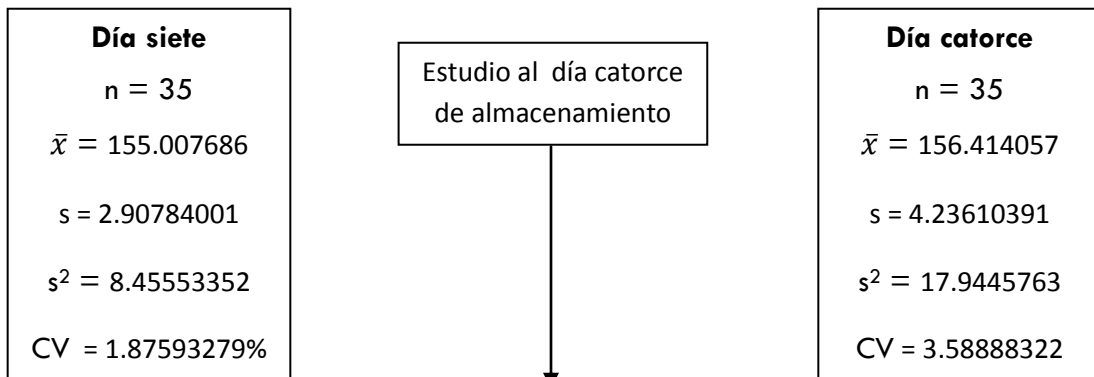
$$t_{cal} = \frac{155.714571 - 155.007686}{\sqrt{(35 - 1)8.61713996 + (35 - 1)8.45553352}} \sqrt{\frac{(35)(35)(35 + 35 - 2)}{35 + 35}} = 1.01212106$$

El valor de la t de student en tablas a un nivel de significancia del 95% y 34 (35-1) grados de libertad sigue siendo:

$$t_{0.025,34} = 2.29211796$$

Por lo tanto se obtuvo que $1.01 < 2.29$ por lo que se tiene que $t_{calc} < t_{\alpha/2}$ por lo que la H_0 no se rechaza, se concluye que los datos pertenecen a la misma población y por lo tanto los estándares son estables durante 7 días a las condiciones de almacenamiento indicadas.

Resultados del día siete al catorce



Se obtiene la F calculada.

$$F_{calc} = \frac{17.9445763}{8.45553352} = 2.122228753$$

La F de Fisher en tablas sigue siendo:

$$F_{0.025,34,34} = 1.981119274$$

Por lo tanto se obtuvo que $2.12 > 1.98$ por lo que se tiene que $F_{cal} > F_{\alpha/2}$ por lo que la H_0 se rechaza, las varianzas no son iguales lo que concluye que el analista varió su precisión en los 2 días de estudio, y se procederá a realizar la prueba de hipótesis a las medias considerando varianzas diferentes.

Se realiza la prueba sobre las medias, y se obtiene la t calculada.

$$t_{cal} = \frac{155.007686 - 156.414057}{\sqrt{\frac{8.45553352}{35} + \frac{17.9445763}{35}}} = -1.61931444$$

El valor de la t de student en tablas a un nivel de significancia del 95%, pero ahora se calculan los grados de libertad con la siguiente ecuación:

$$\emptyset = \frac{\left(\frac{8.45553352}{35} + \frac{17.9445763}{35}\right)^2}{\frac{\left(\frac{8.45553352}{35}\right)^2}{35 - 1} + \frac{\left(\frac{17.9445763}{35}\right)^2}{35 - 1}} = 60.2200873 \sim 60$$

Lo que nos da una t de tablas con el siguiente valor:

$$t_{0.025,60} = 2.29904555$$

Recordando que para este estudio se trabajo con un nivel de significancia del 5% y que el criterio de rechazo de la hipótesis nula es el siguiente:

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

Por lo tanto se obtuvo que $-1.62 > -2.30$ por lo que se tiene que $-t_{calc} > -t_{\alpha/2}$ por lo que la H_0 no se rechaza, se concluye que los datos pertenecen a la misma población y por lo tanto los estándares son estables durante 14 días a las condiciones de almacenamiento indicadas.

Conclusiones

Las conclusiones a las que se llegaron de acuerdo al trabajo experimental realizado y sustentado con el trabajo experimental fueron las siguientes:

1) La vitamina K₃ tiene una absorción máxima a una longitud de onda de 250 nm en la región ultravioleta.

2) Las condiciones óptimas de trabajo en el Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia utilizado fueron las siguientes:

- Fase estacionaria: Fase químicamente unida de C-18.
- Temperatura: Ambiente.
- Fase móvil: 85% Acetonitrilo/15% H₂O
- Flujo de la fase móvil: 1 mL
- Presión obtenida: 5Mpa.
- Detector: UV-Vis con lectura a una longitud de onda de 250 nm.

3) Fueron realizadas dos curvas patrón, divididas en intervalo corto (1 a 20 ppm) e intervalo largo (20 ppm a 100 ppm). En ellas se pueden realizar la cuantificación de la vitamina K₃.

4) Las dos curvas graficadas tanto para el intervalo corto como para el largo, presentan una buena linealidad tanto visual como matemática, factores de correlación de 0.9998 y 0.9926 respectivamente, pero ninguna de las 2 tienden al origen. La linealidad en términos matemáticos es aceptable de acuerdo a normas NMX, la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, la USP, y por el laboratorio en el que se esté trabajando.

5) Al comprobar si se tendía al origen por medio de la prueba de hipótesis respectiva se concluye que éstas gráficas no tienden a éste, por lo tanto la ecuación que las rige es la de la línea recta $y = mx + b$.

6) La precisión en el sistema de acuerdo a los cálculos estadísticos quedó demostrado que para ambos intervalos cumple con un error máximo del 5% establecido para la industria de alimentos, además de que también ambos intervalos cumplen con el error máximo del 2% establecido para la industria farmacéutica.

7) Las disoluciones estándar de vitamina K₃ se mantuvieron estables a la degradación química por lo menos 7 días posteriores a la preparación de los mismos y almacenados bajo refrigeración en frascos viales ámbar, sellados y protegidos de la luz a una temperatura de 2 grados Celsius. Lo cual es suficiente debido a que tanto las disoluciones de los estándares como de las muestras utilizadas para realizar este análisis ya sea en la industria farmacéutica, clínica o alimentaria no permanecen más de unas horas sin ser analizadas y difícilmente se guardarían una semana.

8) Con los resultados anteriores se concluye que el sistema cromatográfico utilizado es adecuado para analizar cuantitativamente a la vitamina K₃.

1. L Zempleni Janos, Robert B. Rucker et al. *Handbook of Vitamins*, CRC Press Taylor & Francis Group, Fourth Edition, USA 2007. pp 124-165
2. William Gottlieb, Mark Bricklin et. al., *Understanding vitamins and minerals* , Rodale Press , USA 1984 pp.21-37
3. L.G.Wade, Jr. *Química Orgánica*, 5a edición, Pearson Prentice Hall, Madrid 2004 pp 69, 197, 710-713, 762
4. Shirlyn B. McKenzie, *Hematología Clínica*, 2da edición, (tr. Jorge A. Mérito Jane, Eduardo Cervera Ceballos) Manual Moderno, Baltimore Maryland (USA) 1996. pp. 603-641.6
5. R. W. Yost, L. S. Ettre, et al. *Practical Liquid Chromatography*, Perkin Elmer, USA 1980, pp. 31-93, 207-251
6. 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.
7. Susana Ivett Martrín Sámano., *Validación de un método de análisis de vitamina A en Hígado de Res por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia CLAE*, Tesis de Licenciatura UNAM, México,2005.
8. Odemaris Martínez González., *Estudio comparativo de la validación de 2 técnicas instrumentales. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia y Espectrometría UV-VIS, para el análisis cuantitativo de Cefalexina*. Tesis de Licenciatura UNAM, México, 2007
9. Jessica Consuelo Chavarría Cano., *Validación del Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia del lab 3F para el análisis de Vitamina D*, Tesis de Licenciatura UNAM, México,2010
10. Verónica Ramos Corzo., *Validación de las técnicas de espectroscopia ultravioleta y cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia para la cuantificación de cefadroxilo en cápsulas*, Tesis de Licenciatura UNAM, México, 2009.
11. R. W. Yost, L. S. Ettre, et al. *Practical Liquid Chromatography*, Perkin Elmer, USA 1980, pp. 31-93, 207-251
12. Catálogo de productos Supelco. Compañía Sigma-Aldrich. Productos de Cromatografía para análisis y purificación. 2005-2006. pp. 169
13. Catálogo de productos. Compañía Agilent. El Catálogo fundamental de cromatografía de Agilent, la guía de referencia completa para consumibles de cromatografía y espectroscopia. 2005-2006. pp. 681.
14. Catálogo de productos. Compañía Alltech. Cromatografía. No. 550. pp. 393, 398. 2004

15. NOM-059-SSA1-1993. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/059ssa13.html> Fecha de consulta: 01/08/2010.
16. Miller J.C., Miller J.N, *Estadística para Química Analítica*, 2da edición, Addison Wesley Iberoamericana USA 1993 pp 20-63
17. Miller N. James, Miller C. Jane, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4ta edición, Prentice Hall, España 2000. pp 77-152

Cálculos de linealidad tomando en consideración el cero:

Para el intervalo corto tenemos:

Concentración ppm	Área	χ^2	γ^2	XY	
0	0	0	0	0	Número total de datos 37
1	3.43413	1	11.7932489	3.43413	Σx
1	3.41728	1	11.6778026	3.41728	318
1	3.46206	1	11.9858594	3.46206	Σx^2
1	3.57414	1	12.7744767	3.57414	4530
1	3.63075	1	13.1823456	3.63075	Σy
1	3.65406	1	13.3521545	3.65406	1091.29718
2	7.27327	4	52.9004565	14.54654	Σy^2
2	7.33166	4	53.7532384	14.66332	52626.4348
2	7.38816	4	54.5849082	14.77632	Σxy
2	7.25279	4	52.6029628	14.50558	15435.56514
2	7.25221	4	52.5945499	14.50442	$\Sigma x/n = \bar{x}$
2	7.24177	4	52.4432327	14.48354	8.594594595
5	17.8025	25	316.929006	89.0125	$(\Sigma x)^2$
5	17.7743	25	315.92574	88.8715	101124
5	17.868	25	319.265424	89.34	$(\Sigma y)^2$
5	17.9344	25	321.642703	89.672	1190929.535
5	18.1037	25	327.743954	90.5185	Σxy
5	17.9658	25	322.76997	89.829	15435.56514
10	34.7991	100	1210.97736	347.991	
10	34.6976	100	1203.92345	346.976	
10	34.5166	100	1191.39568	345.166	
10	30.8683	100	952.851945	308.683	
10	34.7299	100	1206.16595	347.299	
10	34.9356	100	1220.49615	349.356	
15	50.5652	225	2556.83945	758.478	
15	50.481	225	2548.33136	757.215	
15	50.5445	225	2554.74648	758.1675	
15	52.4564	225	2751.6739	786.846	
15	52.601	225	2766.8652	789.015	
15	52.0686	225	2711.13911	781.029	
20	67.2338	400	4520.38386	1344.676	
20	66.4371	400	4413.88826	1328.742	
20	66.9647	400	4484.27105	1339.294	
20	69.24	400	4794.1776	1384.8	
20	67.8828	400	4608.07454	1357.656	
20	67.914	400	4612.3114	1358.28	

Áreas de los picos cromatográficos obtenidos en la prueba del intervalo corto (0-20ppm)

$(\Sigma x)(\Sigma y)$	347032.5032
$S_{xx} = n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2$	66486
$S_{yy} = n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2$	756248.551
$S_{xy} = n\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)$	224083.4069
$(S_{xy})^2$	50213373266

Regresión	
m	3.3704
b	0.5274
r	0.99988912

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

$$Se = \sqrt{\frac{(66486)(756248.551) - (224083.4069)^2}{(37-2)(37)66486}} = 0.8792906$$

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

$$t_{calc} = \frac{0.5274 - 0}{0.8792906} \sqrt{\frac{(37)(66486)}{66486 + ((37)(8.594594595))^2}} = 3,5756973$$

$$t_{0.025,35} = 2.03$$

$$t_{calculada} = 3,5756973$$

Decisión la $t_{calc} > t_{(\alpha/2, n-2)}$ por lo tanto la ordenada no tiende al origen, se rechaza H_0

Cálculos de linealidad tomando en consideración el cero:

Para el intervalo largo se tiene:

Concentración ppm	Área	x^2	y^2	xy	
0	0	0	0	0	Número total de datos 31
20	61.2419	400	3750.57032	1224.838	Σx 1800
20	62.3677	400	3889.73	1247.354	Σx^2 132000
20	62.0022	400	3844.2728	1240.044	Σy 4666.0682
20	60.2919	400	3635.11321	1205.838	Σy^2 835385.54
20	60.9039	400	3709.28504	1218.078	Σxy 330862.924
20	61.0796	400	3730.71754	1221.592	$\Sigma x/n = \bar{x}$ 58.06451613
40	117.921	1600	13905.3622	4716.84	$(\Sigma x)^2$ 3240000
40	118.328	1600	14001.5156	4733.12	$(\Sigma y)^2$ 21772192.45
40	117.887	1600	13897.3448	4715.48	Σxy 8398922.76
40	119.926	1600	14382.2455	4797.04	
40	119.905	1600	14377.209	4796.2	
40	119.556	1600	14293.6371	4782.24	
60	167.109	3600	27925.4179	10026.54	
60	165.95	3600	27539.4025	9957	
60	167.311	3600	27992.9707	10038.66	
60	165.163	3600	27278.8166	9909.78	
60	165.204	3600	27292.3616	9912.24	
60	164.638	3600	27105.671	9878.28	
80	197.411	6400	38971.1029	15792.88	
80	197.459	6400	38990.0567	15796.72	
80	197.899	6400	39164.0142	15831.92	
80	197.377	6400	38957.6801	15790.16	
80	197.497	6400	39005.065	15799.76	
80	196.684	6400	38684.5959	15734.72	
100	235.113	10000	55278.1228	23511.3	
100	230.751	10000	53246.024	23075.1	
100	236.816	10000	56081.8179	23681.6	
100	237.799	10000	56548.3644	23779.9	
100	236.575	10000	55967.7306	23657.5	
100	227.902	10000	51939.3216	22790.2	

Áreas de los picos cromatográficos obtenidos en la prueba del intervalo largo (2-1000ppm)

$(\Sigma x)(\Sigma y)$	8398922.76
$S_{xx} = n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2$	852000
$S_{yy} = n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2$	4124759.278
$S_{xy} = n\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)$	1857827.884
$(S_{xy})^2$	3.45152E+12

Regresión	
m	2.1805
b	23.906
r	0.99151666

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

$$Se = \sqrt{\frac{(852000)(4124759.278) - (1857827.884)^2}{(31-2)(31)852000}} = 9.05269745$$

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

$$t_{calc} = \frac{23.906 - 0}{9.05269745} \sqrt{\frac{(31)(852000)}{852000 + ((31)(58.06451613))^2}} = 6.709061005$$

$$t_{0.025,35} = 2.04522961$$

$$t_{calculada} = 6.709061005$$

Decisión la $t_{calc} > t_{(\alpha/2, n-2)}$ por lo tanto la ordenada no tiende al origen, se rechaza H_0

Cálculos de linealidad sin tomar en consideración el cero

Para el intervalo corto se tiene

Concentración ppm	Área	x^2	y^2	XY
1	3.43413	1	11.7932489	3.43413
1	3.41728	1	11.6778026	3.41728
1	3.46206	1	11.9858594	3.46206
1	3.57414	1	12.7744767	3.57414
1	3.63075	1	13.1823456	3.63075
1	3.65406	1	13.3521545	3.65406
2	7.27327	4	52.9004565	14.54654
2	7.33166	4	53.7532384	14.66332
2	7.38816	4	54.5849082	14.77632
2	7.25279	4	52.6029628	14.50558
2	7.25221	4	52.5945499	14.50442
2	7.24177	4	52.4432327	14.48354
5	17.8025	25	316.929006	89.0125
5	17.7743	25	315.92574	88.8715
5	17.868	25	319.265424	89.34
5	17.9344	25	321.642703	89.672
5	18.1037	25	327.743954	90.5185
5	17.9658	25	322.76997	89.829
10	34.7991	100	1210.97736	347.991
10	34.6976	100	1203.92345	346.976
10	34.5166	100	1191.39568	345.166
10	30.8683	100	952.851945	308.683
10	34.7299	100	1206.16595	347.299
10	34.9356	100	1220.49615	349.356
15	50.5652	225	2556.83945	758.478
15	50.481	225	2548.33136	757.215
15	50.5445	225	2554.74648	758.1675
15	52.4564	225	2751.6739	786.846
15	52.601	225	2766.8652	789.015
15	52.0686	225	2711.13911	781.029
20	67.2338	400	4520.38386	1344.676
20	66.4371	400	4413.88826	1328.742
20	66.9647	400	4484.27105	1339.294
20	69.24	400	4794.1776	1384.8
20	67.8828	400	4608.07454	1357.656
20	67.914	400	4612.3114	1358.28

Número total de datos

36

Σx

318

Σx^2

4530

Σy

1091.29718

Σy^2

52626.4348

Σxy

15435.56514

$\Sigma x/n = \bar{x}$

8,833333333

$(\Sigma x)^2$

101124

$(\Sigma y)^2$

1190929.535

Σxy

15435.56514

$\Sigma x/n = \bar{x}$	8.833333333
$(\Sigma x)(\Sigma y)$	347032.5032
$Sxx = n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2$	61956
$Syy = n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2$	703622.1162
$Sxy = n\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)$	208647.8418
$(Sxy)^2$	43533921888

Rergresión	
m	3.36767774
b	0.56599056
r	0.9998965

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

$$Se = \sqrt{\frac{(61956)(703622.1162) - (208647.8418)^2}{(36-2)(36)61956}} = 0.88719319$$

Intervalos de confianza

Para la ordenada al origen se tiene: $t_{0.025,35} = 2.0322445$

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

$$IC_b = 0.56599056 \pm (2.0322445)(0.88719319) \sqrt{\frac{61956 + ((36)(8.833333333))^2}{(36)61956}} = 0.48753025$$

$$IC_b = 0.56599056 \pm 0.48753025$$

$$0.0784603 < 0.56599056 < 1.05352081$$

Para la pendiente se tiene: $t_{0.025,35} = 2.0322445$

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

$$IC_m = 3.36767774 \pm (2.0322445)(0.88719319) \sqrt{\frac{36}{61956}} = 0.0434614$$

$$IC_m = 3.36767774 \pm 0.0434614$$

$$3.32421633 < 3.36767774 < 3.41113914$$

Cálculos de linealidad sin considerar el cero.

Para el intervalo largo se tiene:

Concentración ppm	Área	X^2	Y^2	XY	
20	61.2419	400	3750.57032	1224.838	Número total de datos 30
20	62.3677	400	3889.73	1247.354	ΣX 1800
20	62.0022	400	3844.2728	1240.044	ΣX^2 132000
20	60.2919	400	3635.11321	1205.838	ΣY 4666.0682
20	60.9039	400	3709.28504	1218.078	ΣY^2 835385.54
20	61.0796	400	3730.71754	1221.592	ΣXY 330862.924
40	117.921	1600	13905.3622	4716.84	$\Sigma X/n = \bar{X}$ 60
40	118.328	1600	14001.5156	4733.12	$(\Sigma X)^2$ 3240000
40	117.887	1600	13897.3448	4715.48	$(\Sigma Y)^2$ 21772192.45
40	119.926	1600	14382.2455	4797.04	Σxy 8398922.76
40	119.905	1600	14377.209	4796.2	
40	119.556	1600	14293.6371	4782.24	
60	167.109	3600	27925.4179	10026.54	
60	165.95	3600	27539.4025	9957	
60	167.311	3600	27992.9707	10038.66	
60	165.163	3600	27278.8166	9909.78	
60	165.204	3600	27292.3616	9912.24	
60	164.638	3600	27105.671	9878.28	
80	197.411	6400	38971.1029	15792.88	
80	197.459	6400	38990.0567	15796.72	
80	197.899	6400	39164.0142	15831.92	
80	197.377	6400	38957.6801	15790.16	
80	197.497	6400	39005.065	15799.76	
80	196.684	6400	38684.5959	15734.72	
100	235.113	10000	55278.1228	23511.3	
100	230.751	10000	53246.024	23075.1	
100	236.816	10000	56081.8179	23681.6	
100	237.799	10000	56548.3644	23779.9	
100	236.575	10000	55967.7306	23657.5	
100	227.902	10000	51939.3216	22790.2	

$(\Sigma x)(\Sigma y)$	8398922.76
$S_{xx} = n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2$	720000
$S_{yy} = n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2$	3289373.738
$S_{xy} = n\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)$	1526964.96
$(S_{xy})^2$	2.33162E+12

Rergresión	
m	2.12078467
b	28.2885267
r	0.99263399

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

$$Se = \sqrt{\frac{(720000)(3289373.738) - (1526964.96)^2}{(30-2)(30)720000}} = 7.79269077$$

Intervalos de confianza

Para la ordenada al origen tenemos: $t_{0.025,29} = 2.04840711$

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

$$IC_b = 28.2885267 \pm (2.04840711)(7.79269077) \sqrt{\frac{720000 + ((30)(60))^2}{(30)720000}} = 3.336630845$$

$$IC_b = 28.2885267 \pm 3.336630845$$

$$21.4537483 < 28.2885267 < 35.12330503$$

Para la pendiente tenemos $t_{0.025,35} = 2.0322445$

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

$$IC_m = 2.12078467 \pm (2.04840711)(7.79269077) \sqrt{\frac{30}{720000}} = 0.0503016$$

$$IC_m = 2.32284557 \pm 0.0503016$$

$$2.01774651 < 2.12078467 < 2.22382283$$

Presición de sistema:

Para 10ppm se tiene:

	Concentración						
	10ppm1	10ppm2	10ppm3	10ppm4	10ppm5	10ppm6	10ppm7
Inyección							
1	32.0023	32.6596	33.3583	32.9394	33.8791	33.3243	33.4239
2	31.9766	32.6773	32.9624	32.5152	33.8849	33.6484	33.6608
3	32.5323	32.2412	33.1899	32.9318	33.5106	34.0265	33.3789
4	32.4484	32.6786	33.1202	33.123	34.0241	33.4839	33.8854
5	32.2772	32.434	33.2436	32.8801	33.6184	33.424	34.1879

χ^2							
inyección	10ppm1	10ppm2	10ppm3	10ppm4	10ppm5	10ppm6	10ppm7
1	1024.14721	1066.64947	1112.77618	1085.00407	1147.79342	1110.50897	1117.15709
2	1022.50295	1067.80594	1086.51981	1057.23823	1148.18645	1132.21482	1133.04946
3	1058.35054	1039.49498	1101.56946	1084.50345	1122.96031	1157.8027	1114.15097
4	1052.89866	1067.8909	1096.94765	1097.13313	1157.63938	1121.17156	1148.22033
5	1041.81764	1051.96436	1105.13694	1081.10098	1130.19682	1117.16378	1168.81251

Σx	1159.5525
$\Sigma x/n = \bar{x}$	33.1300714
Σx^2	38428.4811
s^2	0.3654103
s	0.60449177
%CV	1.82460147
N	35

Despejando el coeficiente de variación para el 5% de error:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \rightarrow 5 = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \rightarrow s = \frac{5 * \bar{x}}{100}$$

Sustituyendo los valores de la tabla de la izquierda en la ecuación despejada se tiene:

$$s = \frac{5 * 33.1300714}{100} = 1.65650357 \rightarrow \sigma_0^2 = 2.74400408$$

Determinando la Ji calculada y comparando con la Ji de tablas se tiene:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} \rightarrow \chi_{calc}^2 = \frac{(35-1)0.3654103}{2.74400408} = 4.52767191$$

$\chi^2_{0.05, 34} = 48.6023674$
 Ji de tablas \rightarrow por lo tanto se tiene: $4.52 < 48.60$ El criterio de rechazo es:

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

Por lo tanto se acepta H_0

Determinando la ji para un error máximo del 2% se tiene:

Despejando el coeficiente de variación para el 2% de error se tiene:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad 2 = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad \rightarrow \quad s = \frac{2 * \bar{x}}{100}$$

Sustituyendo los valores en la ecuación despejada se tiene:

$$s = \frac{2 * 33.1300714}{100} = 0.66260143 \rightarrow \sigma_0^2 = 0.43904065$$

Determinando la Ji calculada y comparando con la Ji de tablas se tiene:

$$X_{calc}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} \quad \rightarrow \quad \chi_{calc}^2 = \frac{(35-1)0.3654103}{0.43904065} = 28.2979495$$

$\chi^2_{0.05, 34} = 48.6023674$
 Ji de tablas \rightarrow por lo tanto se tiene: $28.30 < 48.60$ El criterio de rechazo es:

$$\chi_{calc}^2 > \chi_{\alpha}^2_{n-1}$$

Por lo tanto se rechaza H_0

Calculando los intervalos de confianza para la s se tiene:

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

el valor de tablas de $\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025,34}^2 = 51.9659952$

el valor de tablas de $\chi_{1-\alpha/2}^2 = \chi_{0.975,34}^2 = 19.8062531$

con lo sustituido se tiene que:

$$\sqrt{\frac{(35-1)0.3654103}{51.9659952}} < 0.60449177 < \sqrt{\frac{(35-1)0.3654103}{19.8062531}}$$

$$0.49 < 0.60 < 0.79$$

Presición del sistema

Para 60ppm se tiene:

	Presición						
	60ppm1	60ppm2	60ppm3	60ppm4	60ppm5	60ppm6	60ppm7
Inyección							
1	155.277	156.952	156.399	155.284	154.576	158.666	152.453
2	157.025	156.678	152.715	159.048	153.163	158.523	152.026
3	155.175	153.114	152.521	159.288	149.68	158.531	159.019
4	150.806	156.835	153.294	158.387	153.926	158.961	151.537
5	156.709	157.246	158.675	159.251	151.014	159.218	158.038

χ^2							
inyección	60ppm1	60ppm2	60ppm3	60ppm4	60ppm5	60ppm6	60ppm7
1	24110.9467	24633.9303	24460.6472	24113.1207	23893.7398	25174.8996	23241.9172
2	24656.8506	24547.9957	23321.8712	25296.2663	23458.9046	25129.5415	23111.9047
3	24079.2806	23443.897	23262.6554	25372.6669	22404.1024	25132.078	25287.0424
4	22742.4496	24597.2172	23499.0504	25086.4418	23693.2135	25268.5995	22963.4624
5	24557.7107	24726.3045	25177.7556	25360.881	22805.2282	25350.3715	24976.0094

Σx	5450.01
$\Sigma x/n = \bar{x}$	155.714571
Σx^2	848938.954
s^2	8.61713996
s	2.93549654
%CV	1.88517781
N	35

Despejando el coeficiente de variación para el 5% de error:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \rightarrow 5 = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \rightarrow s = \frac{5 * \bar{x}}{100}$$

Sustituyendo los valores de la tabla de la izquierda en la ecuación despejada se tiene:

$$s = \frac{5 * 155,714571}{100} = 7.78572857 \rightarrow \sigma_0^2 = 60.6175694$$

Determinando la Ji calculada y comparando con la Ji de tablas se tiene:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} \rightarrow \chi_{calc}^2 = \frac{(35-1)8,61713996}{60,6175694} = 4.8332977$$

$\chi^2_{0.05, 34} = 48.6023674$ Ji de tablas \rightarrow por lo tanto se tiene: $4.83 < 48.60$ El criterio de rechazo es:

$$\chi_{calc}^2 < \chi_{\alpha, n-1}^2$$

Por lo tanto se acepta H_0

Determinando la ji para un error máximo del 2% se tiene:

Despejando el coeficiente de variación para el 2% de error se tiene:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \rightarrow 2 = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \rightarrow s = \frac{2 * \bar{x}}{100}$$

Sustituyendo los valores en la ecuación despejada se tiene:

$$S = \frac{2 * 155.714571}{100} = 3.11429143 \rightarrow \sigma_0^2 = 9.6988111$$

Determinando la Ji calculada y comparando con la Ji de tablas se tiene:

$$\chi_{calc}^2 = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} \rightarrow \chi_{calc}^2 = \frac{(35-1)8.61713996}{9.6988111} = 30.2081106$$

$\chi^2_{0.05, 34} = 48.6023674$
 Ji de tablas \rightarrow por lo tanto se tiene: $30.21 < 48.60$ El criterio de rechazo es:

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

Por lo tanto se rechaza H_0

Calculando los intervalos de confianza para la s se tiene:

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

el valor de tablas de $\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025, 34}^2 = 51.9659952$
 el valor de tablas de $\chi_{1-\alpha/2}^2 = \chi_{0.975, 34}^2 = 19.8062531$
 con lo sustituido se tiene que:

$$\sqrt{\frac{(35-1)8.61713996}{51.9659952}} < 2.93549654 < \sqrt{\frac{(35-1)8.61713996}{19.8062531}}$$

$$0.49 < 0.60 < 0.79$$

Estabilidad:

Para el día cero, siete y catorce de 10ppm se tiene:

Estabilidad día cero							
	10ppm1	10ppm2	10ppm3	10ppm4	10ppm5	10ppm6	10ppm7
Inyección							
1	32.0023	32.6596	33.3583	32.9394	33.8791	33.3243	33.4239
2	31.9766	32.6773	32.9624	32.5152	33.8849	33.6484	33.6608
3	32.5323	32.2412	33.1899	32.9318	33.5106	34.0265	33.3789
4	32.4484	32.6786	33.1202	33.123	34.0241	33.4839	33.8854
5	32.2772	32.434	33.2436	32.8801	33.6184	33.424	34.1879

Σx^2							
inyeccion	10ppm1	10ppm2	10ppm3	10ppm4	10ppm5	10ppm6	10ppm7
1	1024.14721	1066.64947	1112.77618	1085.00407	1147.79342	1110.50897	1117.15709
2	1022.50295	1067.80594	1086.51981	1057.23823	1148.18645	1132.21482	1133.04946
3	1058.35054	1039.49498	1101.56946	1084.50345	1122.96031	1157.8027	1114.15097
4	1052.89866	1067.8909	1096.94765	1097.13313	1157.63938	1121.17156	1148.22033
5	1041.81764	1051.96436	1105.13694	1081.10098	1130.19682	1117.16378	1168.81251

Estabilidad día siete							
	10ppm1	10ppm2	10ppm3	10ppm4	10ppm5	10ppm6	10ppm7
Inyección							
1	33.5389	32.2237	33.2412	33.2038	33.5695	32.7227	32.6933
2	33.1515	31.0603	32.89	33.4542	32.9066	33.2766	32.4931
3	33.2659	31.9849	33.1868	33.1628	32.8009	33.3737	32.3464
4	33.1226	32.1404	33.372	33.1248	33.0469	33.3458	32.555
5	33.3511	32.2424	33.5176	33.7168	32.7505	34.3741	32.3774

Σx^2							
	10ppm1	10ppm2	10ppm3	10ppm4	10ppm5	10ppm6	10ppm7
inyección							
1	1124.85781	1038.36684	1104.97738	1102.49233	1126.91133	1070.7751	1068.85186
2	1099.02195	964.742236	1081.7521	1119.1835	1082.84432	1107.33211	1055.80155
3	1106.6201	1023.03383	1101.36369	1099.7713	1075.89904	1113.80385	1046.28959
4	1097.10663	1033.00531	1113.69038	1097.25238	1092.0976	1111.94238	1059.82803
5	1112.29587	1039.57236	1123.42951	1136.8226	1072.59525	1181.57875	1048.29603

Estabilidad día catorce							
	10ppm1	10ppm2	10ppm3	10ppm4	10ppm5	10ppm6	10ppm7
Inyección							
1	30.5628	33.1202	35.2149	31.2902	31.7717	31.0053	30.5421
2	31.1127	31.3691	34.2303	31.1851	31.6714	30.9784	31.1497
3	31.718	31.1081	33.6535	31.165	31.723	29.9299	31.3515
4	31.3429	31.1384	33.6854	31.1015	31.7301	30.8176	30.5195
5	31.4338	30.9322	33.2562	31.019	31.8876	31.3403	31.8048

Σx^2							
	10ppm1	10ppm2	10ppm3	10ppm4	10ppm5	10ppm6	10ppm7
Inyección							
1	934.084744	1096.94765	1240.08918	979.076616	1009.44092	961.328628	932.819872
2	968.000101	984.020435	1171.71344	972.510462	1003.07758	959.661267	970.30381
3	1006.03152	967.713886	1132.55806	971.257225	1006.34873	895.798914	982.916552
4	982.37738	969.599955	1134.70617	967.303302	1006.79925	949.72447	931.43988
5	988.083782	956.800997	1105.97484	962.178361	1016.81903	982.214404	1011.5453

Estabilidad Día cero	
Σx	1159,5525
Σx^2	38428,4811
$\Sigma x/n = \bar{x}$	33,1300714
S^2	0,3654103
S	0,60449177
n_1	35
$\%CV$	1,82460147

$$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{Calculando la F para los días cero y siete, se tiene:}$$

$$F_{calc} = \frac{0.37030712}{0.3654103} = 1.013400886$$

Para la F de tablas se tiene:

$$F_{0.025,34,34} = 1.981119274$$

El criterio de rechazo es: $F_{cal} > F_{\alpha/2}$

$1.01 < 1.98$ Por lo tanto se acepta H_0 , El analista mantuvo la misma precisión, usar la ecuación t de student cuando: $s_1^2 = s_2^2$

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

$$t_{cal.} = \frac{33.1300714 - 32.9595486}{\sqrt{(35 - 1)0.3654103 + (35 - 1)0.37030712}} \sqrt{\frac{(35)(35)(35 + 35 - 2)}{35 + 35}} = 1.17614564$$

Comparando el valor con la t de tablas al 95% dos colas y (n-1).

$$t_{0.025,34} = 2.29211796 \quad 1.17 < 2.29$$

Se acepta H_0 las medias provienen de la misma población, por lo tanto es estable a 7 días de almacenamiento

Estabilidad Día siete	
Σx	1153.5842
Σx^2	38034.2049
$\Sigma x/n = \bar{x}$	32.9595486
S^2	0.37030712
S	0.60852865
n_2	35
$\%CV$	1.84628941

$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$ Calculando la F para los días siete y catorce se tiene:

$$F_{calc} = \frac{1.29048825}{0.37030712} = 3.484913402$$

Para la F de tablas se tiene:

$$F_{0.025,34,34} = 1.981119274$$

El criterio de rechazo es: $F_{cal} > F_{\alpha/2}$

$3.48 > 1.98$ Por lo tanto se rechaza H_0

el analista no mantuvo la misma precisión, por ello usar la ecuación t de student cuando $s_1^2 \neq s_2^2$.

Estabilidad Día catorce	
Σx	1107.8622
Σx^2	35111.2667
$\Sigma x/n = \bar{x}$	31.6532057
S^2	1.29048825
S	1.13599659
n_2	35
$\%CV$	3.58888322

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

$$t_{cal} = \frac{32.9595486 - 31.6532057}{\sqrt{\frac{0.37030712}{35} + \frac{1.29048825}{35}}} = 5.99698737$$

Para determinar los grados de libertad se utiliza la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_1}\right)^2}{\left(\frac{s_1^2/n_1}{n_1 - 1}\right)^2 + \left(\frac{s_2^2/n_1}{n_2 - 1}\right)^2} = \frac{\left(\frac{1.29048825}{35} + \frac{0.37030712}{35}\right)^2}{\left(\frac{1.29048825/35}{35 - 1}\right)^2 + \left(\frac{0.37030712/35}{35 - 1}\right)^2} = 52.02821 \sim 52$$

Con los grados de libertad obtenidos (52) obtenemos el valor de tablas siguiente: $t_{0.025,52} = 2.3081648$

El criterio de rechazo es: $t_{calc} > t_{\alpha/2}$ $5.99 > 2.31$ por lo tanto se rechaza H_0 las medias no provienen de la misma población, por lo tanto la muestra no es estable a los catorce días de almacenamiento.

Estabilidad para el día cero, siete y catorce de 60 ppm

Estabilidad día cero							
	60ppm1	60ppm2	60ppm3	60ppm4	60ppm5	60ppm6	60ppm7
Inyección							
1	155.277	156.952	156.399	155.284	154.576	158.666	152.453
2	157.025	156.678	152.715	159.048	153.163	158.523	152.026
3	155.175	153.114	152.521	159.288	149.68	158.531	159.019
4	150.806	156.835	153.294	158.387	153.926	158.961	151.537
5	156.709	157.246	158.675	159.251	151.014	159.218	158.038

Σx^2							
	60ppm1	60ppm2	60ppm3	60ppm4	60ppm5	60ppm6	60ppm7
Inyección							
1	24110.9467	24633.9303	24460.6472	24113.1207	23893.7398	25174.8996	23241.9172
2	24656.8506	24547.9957	23321.8712	25296.2663	23458.9046	25129.5415	23111.9047
3	24079.2806	23443.897	23262.6554	25372.6669	22404.1024	25132.078	25287.0424
4	22742.4496	24597.2172	23499.0504	25086.4418	23693.2135	25268.5995	22963.4624
5	24557.7107	24726.3045	25177.7556	25360.881	22805.2282	25350.3715	24976.0094

Estabilidad día siete							
	60ppm1	60ppm2	60ppm3	60ppm4	60ppm5	60ppm6	60ppm7
Inyección							
1	152.323	153.626	155.245	154.551	156.43	152.851	155.763
2	154.408	153.709	155.043	155.423	154.886	159.855	156.968
3	150.901	157.364	154.489	156.187	154.641	149.992	154.453
4	147.097	158.749	155.516	160.969	154.63	155.688	151.018
5	153.326	153.664	155.75	162.333	155.17	156.946	155.305

Σx^2							
inyección	60ppm1	60ppm2	60ppm3	60ppm4	60ppm5	60ppm6	60ppm7
1	23202.2963	23600.9479	24101.01	23886.0116	24470.3449	23363.4282	24262.1122
2	23841.8305	23626.4567	24038.3318	24156.3089	23989.673	25553.621	24638.953
3	22771.1118	24763.4285	23866.8511	24394.379	23913.8389	22497.6001	23855.7292
4	21637.5274	25201.245	24185.2263	25911.019	23910.4369	24238.7533	22806.4363
5	23508.8623	23612.6249	24258.0625	26352.0029	24077.7289	24632.0469	24119.643

Estabilidad día 14							
	60ppm1	60ppm2	60ppm3	60ppm4	60ppm5	60ppm6	60ppm7
Inyección							
1	152.324	171.435	151.409	160.303	157.194	158.685	157.902
2	157.605	155.717	150.6	161.537	157.851	157.867	151.81
3	157.344	152.418	151.914	159.948	158.869	157.963	157.825
4	157.271	151.533	152.32	159.192	152.191	150.044	157.539
5	157.623	153.138	150.951	158.852	159.841	158.151	157.326

Σx^2							
	60ppm1	60ppm2	60ppm3	60ppm4	60ppm5	60ppm6	60ppm7
Inyección							
1	23202,601	29389,9592	22924,6853	25697,0518	24709,9536	25180,9292	24933,0416
2	24839,336	24247,7841	22680,36	26094,2024	24916,9382	24921,9897	23046,2761
3	24757,1343	23231,2467	23077,8634	25583,3627	25239,3592	24952,3094	24908,7306
4	24734,1674	22962,2501	23201,3824	25342,0929	23162,1005	22513,2019	24818,5365
5	24845,0101	23451,247	22786,2044	25233,9579	25549,1453	25011,7388	24751,4703

Estabilidad día cero	
Σx	5450,01
Σx^2	848938,954
$\Sigma x/n = \bar{x}$	155,714571
S^2	8,61713996
S	2,93549654
n_1	35
$\%CV$	1,88517781

$$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{Calculando la F para los días cero y siete, se tiene:}$$

$$F_{calc} = \frac{8.61713996}{8.45553352} = 1.019112507$$

Para la F de tablas se tiene:

$$F_{0.025,34,34} = 1.981119274$$

El criterio de rechazo es: $F_{cal} > F_{\alpha/2}$

$1.019 < 1.98$ Por lo tanto se acepta H_0 , El analista mantuvo la misma precisión, usar la ecuación t de student cuando: $s_1^2 = s_2^2$

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

$$t_{cal} = \frac{155.714571 - 155.007686}{\sqrt{(35 - 1)8.61713996 + (35 - 1)8.45553352}} \sqrt{\frac{(35)(35)(35 + 35 - 2)}{35 + 35}} = 1.01212106$$

Comparando el valor con la t de tablas al 95% dos colas y (n-1).

$$t_{0.025,34} = 2.29211796 \quad 1.01 < 2.29$$

Se acepta H_0 las medias provienen de la misma población, por lo tanto es estable a 7 días de almacenamiento

Estabilidad día 7	
Σx	5425,269
Σx^2	841245,88
$\Sigma x/n = \bar{x}$	155,007686
S^2	8,45553352
S	2,90784001
n_2	35
$\%CV$	1,87593279

$$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{Calculando la F para los días cero y siete, se tiene:}$$

$$F_{calc} = \frac{17.9445763}{8.45553352} = 2.122228753$$

Para la F de tablas se tiene:

$$F_{0.025,34,34} = 1.981119274$$

El criterio de rechazo es: $F_{cal} > F_{\alpha/2}$

$2.12 > 1.98$ Por lo tanto se rechaza

H_0 el analista no mantuvo la misma precisión, por ello usar la ecuación t de student cuando $s_1^2 \neq s_2^2$.

Estabilidad día catorce	
Σx	5474,492
Σx^2	856897,62
$\Sigma x/n = \bar{x}$	156,414057
S^2	17,9445763
S	4,23610391
n_2	35
$\%CV$	2,70826292

$$t_{cal} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_1}}} \quad t_{cal} = \frac{155.007686 - 156.414057}{\sqrt{\frac{8.45553352}{35} + \frac{17.9445763}{35}}} = -1.61931444$$

Para determinar los grados de libertad se utiliza la siguiente ecuación:

$$\phi = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_1}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_1}\right)^2}{n_2 - 1}} \quad \phi = \frac{\left(\frac{8.45553352}{35} + \frac{17.9445763}{35}\right)^2}{\frac{\left(\frac{8.45553352}{35}\right)^2}{35 - 1} + \frac{\left(\frac{17.9445763}{35}\right)^2}{35 - 1}} = 60.2200873 \sim 60$$

Con los grados de libertad obtenidos (60) obtenemos el valor de tablas siguiente: $t_{0.025,60} = 2.29904555$

El criterio de rechazo es: $t_{calc} > t_{\alpha/2}$ $-1.62 > -2.30$ por lo tanto se rechaza H_0 las medias no provienen de la misma población, por lo tanto la muestra no es estable a los catorce días de almacenamiento.