



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UNA PRÁCTICA PARA
ENSEÑAR “LA COMPARACIÓN ENTRE 2
CROMATÓGRAFOS DE LÍQUIDOS PARA
ENSEÑAR EL PROCESO DE VALIDACIÓN DE
LA TÉCNICA PARA EL ANÁLISIS DE
VITAMINA D₃”**

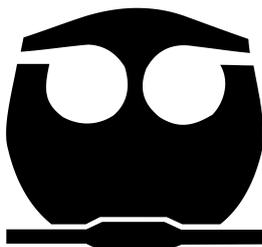
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

FELIPE LOZANO GARCÍA



MÉXICO, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	M. en C. Francisco Rojo Callejas
Vocal	Q. Adolfo García Osuna
Secretario	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
1^{er.} Suplente	Q. Gloria García Ramírez
2^{o.} Suplente	M en C. Silvia Citlalli Gama Gonzáles

Sitio en el que se desarrolló el tema:

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

Asesor del tema

Q. Adolfo García Osuna

Supervisor técnico

Q.F.B. Silvia de Jesús Mendoza Arellano

Sustentante

Felipe Lozano García

Índice

Paginas

Capítulo I. Introducción y Objetivos	1
Capítulo II. Antecedentes	4
Vitamina D.....	5
Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.....	11
Validación.....	21
Capítulo III. Desarrollo Experimental	27
Material.....	28
Instrumentación.....	29
Condiciones Óptimas de Trabajo.....	30
Linealidad del sistema.....	30
Precisión del Sistema.....	30
Reproducibilidad.....	31
Capítulo IV. Resultados y Análisis de Resultados	33
Condiciones Óptimas de trabajo.....	34
Linealidad del Sistema.....	36
Precisión del Sistema.....	41
Reproducibilidad.....	44
Capítulo V. Conclusiones	49
Capitulo VI. Bibliografía	52
Anexo I. Datos y estadística	55
Linealidad.....	56
Precisión.....	59

CAPÍTULO I

Introducción y Objetivos

INTRODUCCIÓN

La vitamina D por su estructura secoesteroide pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles, actualmente se clasifica como hormona ya que forma parte del sistema regulador del calcio y del fosfato, además de participar en diversos procesos metabólicos. Uno de los compuestos más destacados es la vitamina D₃ que se obtiene a partir de la síntesis fotoquímica en el organismo, por lo tanto, si se tiene una exposición solar insuficiente los requerimientos de esta vitamina deben cubrirse mediante la dieta, sin embargo, los alimentos naturales poseen pequeñas cantidades de vitamina D₃, debido a esto es más frecuente la fortificación de algunos alimentos principalmente lácteos y otros de origen animal. La deficiencia de vitamina D₃ provoca una inadecuada absorción intestinal del calcio y fósforo, ocasionando desmineralización ósea.

Las técnicas analíticas instrumentales permiten un adecuado estudio de gran cantidad de analitos a diferentes concentraciones y en diversas matrices, con resultados de gran precisión y exactitud. Una de las técnicas instrumentales más utilizadas en el campo de la química instrumental es la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE por sus siglas). Esta técnica es la más utilizada en los laboratorios para la detección y cuantificación de la vitamina D₃.

Por esto es importante que los equipos se encuentren en óptimas condiciones para un análisis con un alto grado de confiabilidad y confianza que permita el análisis de datos experimentales, por lo que para lograr esto se realiza la validación de la técnica con ayuda de herramientas estadísticas. Una vez validado el sistema o técnica se requiere posteriormente validar el método. Algunos de los parámetros que se calculan en una validación instrumental son: linealidad, precisión, exactitud, dispersión, variación, linealidad, reproducibilidad, etc.

En este trabajo se desarrolla la validación de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia para el análisis de vitamina D₃, y así desarrollar una práctica explicando esta validación y su comparación con la validación de otro cromatógrafo. Con esto se buscará que los alumnos puedan comprender la estadística aplicada para lograr esas validaciones de los cromatógrafos y su comparación entre ellos.

En este trabajo sólo se abarcan las condiciones óptimas de trabajo, linealidad del sistema y precisión del sistema para fines prácticos y de entendimiento para los alumnos.

OBJETIVOS

- Validar el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia Marca Knauer del laboratorio 3F para el análisis de vitamina D₃. y comparar el estudio de validación del sistema anterior con el de otro Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia Marca Shimadzu del mismo laboratorio.
- Procesar los datos obtenidos al realizar esta validación, para que los profesores hagan uso de dicha información para enseñarla y entregarla a los alumnos.
- Plantear el proceso a realizar por parte del profesor con sus alumnos, para que entiendan cada una de las partes de la validación del sistema indicada así como el proceso matemático estadístico para realizar la validación.

CAPÍTULO II

Antecedentes

VITAMINA D₃^{1,2,3,4,5,6,7,8}

Las vitaminas son compuestos orgánicos de gran importancia en el cuerpo humano, éstas funcionan como coenzimas de diversas reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en el organismo. Debido a la complejidad de estas moléculas no pertenecen a un grupo específico, en general las vitaminas se clasifican de acuerdo a su solubilidad en agua en vitaminas hidrosolubles y las liposolubles.

Las vitaminas liposolubles son un grupo de compuestos diversos, difieren en su estructura teniendo poco en común, el retinol, tocoferol, 2-metil-3fitil-1,4-naftoquinona y el colecalfiferol son pertenecientes a este grupo. El retinol (vitamina A) se sintetiza a partir de precursores alfa y beta carotenos, su función es la formación de rodopsina, pigmento visual esencial en el proceso de la visión. El tocoferol (vitamina E) existe en 4 formas: alfa, beta, gama y delta, todas tienen función como antioxidantes siendo la alfa más importante por su actividad biológica. La vitamina K (2-metil-3fitil-1,4-naftoquinona) se conoce también con el nombre de factor antihemorrágico, ya que en ausencia de esta vitamina el hígado no es capaz de sintetizar protrombina, principal precursor de la trombina que es un agente coagulante.

La vitamina D está formada por un grupo de compuestos muy similares entre sí, con una estructura de esteroide, los de mayor importancia son el ergocalciferol (vitamina D₂) y el colecalfiferol (vitamina D₃). El 7-dehidrocolesterol es el precursor del colecalfiferol. La conversión de provitamina a vitamina D₃ por irradiación solar (290-320nm), implica la ruptura del anillo beta del sistema esteroide perdiendo la estructura cíclica, durante este proceso se forman una serie de productos intermediarios como el lumisterol y el taquisterol. La vitamina D₃ en el organismo tiene como función principal la absorción y el transporte de calcio y fósforo a través de la pared intestinal.

Durante la revolución industrial el raquitismo se convirtió en un problema de salud en el norte de Europa, Inglaterra y Estados Unidos, ya que la radiación solar disminuía en las zonas urbanas debido a la contaminación del aire. En 1886 y 1890 Hirsch y Palm realizaron un estudio cuantitativo geográfico de la distribución mundial del raquitismo y encontraron una relación paralela del raquitismo con la falta de luz solar. En 1919 Huldschinsky demostró que la radiación solar (UV) era eficaz en el tratamiento contra el raquitismo, mientras que Sir Edward Mellanby demostró experimentalmente que el raquitismo podía ser impedido por el consumo en la alimentación de aceite de hígado de bacalao, y se postuló que la vitamina A era el factor nutricional que prevenía esta enfermedad. No fue hasta 1922 cuando McCollum mostró que si se sometía el hígado de bacalao a condiciones de temperatura 100°C durante 14h la actividad de la vitamina A era destruida, mientras que la actividad antirraquítica prevalecía, a esta nueva sustancia la nombró vitamina D.¹

Aunque se sabía que tanto la luz como la vitamina D eran eficaces en el tratamiento de la prevención del raquitismo, no se supo la estrecha interdependencia que estos dos guardaban, hasta que en 1925 Hess y Weinstok postularon una provitamina D (7-dehidrocolesterol) que podía ser convertida a vitamina D por la absorción de la radiación UV. Posteriormente en 1936 se identificó la estructura de la vitamina D₃ o colecalfiferol, pero no fue

hasta los años 70 cuando se dilucidó el metabolito biológicamente activo de esta vitamina $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ya en los años 90 se estudio la acción bioquímica de este activo.¹

Estructura

La vitamina D refiere a una familia de compuestos estructurales que tienen actividad antirraquítica, los miembros de esta familia derivan de un sistema de anillo ciclopentanoperhidrofenantreno, de donde provienen otros esteroides como el colesterol.

Los miembros de la vitamina D difieren solo en la estructura de la cadena lateral. La estructura secoesteroide de la vitamina D, el anillo A no está estrictamente fusionado con el anillo B, esto es debido a que el anillo A se encuentra en una de dos posibles conformaciones de silla, cada una designada como conformación silla A y B. Esto tiene como consecuencia el rompimiento del enlace 9-10 del anillo B dejando libre el anillo A, dando como resultado movilidad a la estructura, los sustituyentes en el anillo A se encuentran alternando entre las posiciones axial y ecuatorial. Otra característica importante es la presencia del enlace simple 6,7 que permite una rotación conformacional de 360° generando las conformaciones 6-s-cis o 6-s-trans.¹

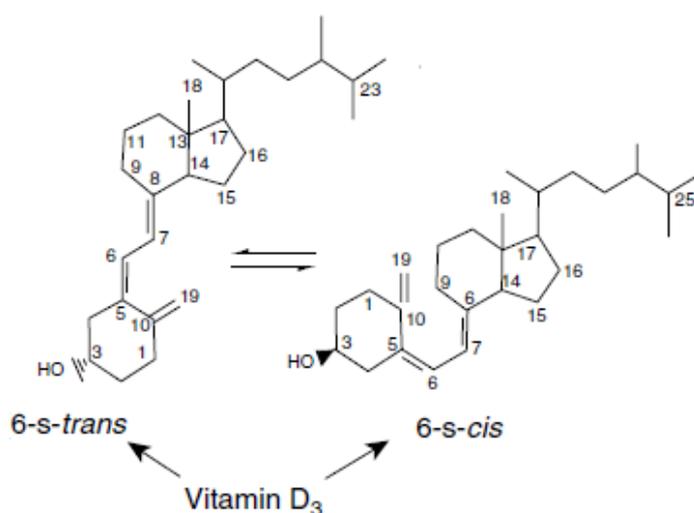


Fig. 2.1.- Conformaciones de la vitamina D₃.

Nomenclatura

La vitamina D₃ es nombrada de acuerdo a las reglas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), con el nombre de [5Z,7E]-[3S]-9,10-seco-5,7,10[19]-colesstatrien-3-ol.²

Propiedades de la vitamina D₃^{1,3}

Peso molecular: 384.6g/mol.

Punto de fusión: 82-88°C.

Absorción al UV: long. de máx. absorción en aprox. 264-265nm (en etanol).

Coefficiente de absortividad molar en alcohol o hexano: 18,300L/mol⁻¹cm⁻¹.

Solubilidad: Soluble en Benceno, cloroformo, etanol y acetona.

Inestable a la luz.

Susceptible a oxidación a los 24°C por 72h.

Almacenaje a 4°C.

Síntesis de vitamina D₃

Hay dos vías principales para la síntesis de vitamina D₃. La primera consiste en la síntesis de la provitamina D₃ que se irradia con luz UV para la transformación a vitamina D₃, la segunda es la síntesis química completa de la vitamina.¹

Síntesis fotoquímica

En los años 20 del siglo pasado se reconoció que la provitamina es convertida a vitamina D mediante la exposición a la luz UV. El requisito estructural principal de la provitamina D es un esteroide con un sistema C-5 a C-7 en el anillo B, este sistema cromóforo en presencia de la radiación UV inicia una serie de transformaciones que resultan en la producción de la estructura secoesteroide de la vitamina D₃.¹

Síntesis química

La síntesis de vitamina D₃ comienza por la síntesis del colesterol, en una conversión de 20 pasos la 4-metoxi-2-5-toluoquinina es transformada a través de diversos mecanismos a testosterona, cortisona y colesterol. Otro método utiliza como compuesto inicial el 1,6-deihidroinaftaleno, que se utiliza como base para la formación de los anillos B y C del esteroide, para posteriormente formar los anillos A y D, el producto final de esta síntesis es la epiandrosterona y por último a colesterol. El colesterol es convertido a acetato, posteriormente es sometido a una bromación y una eliminación, para después ser convertido fotoquímicamente a provitamina D, que por medio de un tratamiento térmico sufre un rearrreglo a vitamina D₃.

Actividad fisiológica de la vitamina D₃

La vitamina D₃ debe estar hidroxilada en la posición C-25 y C-1 para generar la hormona esteroide 1 α ,25(OH)₂D₃, para activar su efecto biológico. La vitamina D se puede obtener de la dieta, es absorbida por el intestino delgado con ayuda de sales biliares, sólo el 50% de la vitamina D es absorbida, ya que puede ser producida en cantidades suficientes por exposición a la luz solar, ya que el organismo no ha desarrollado un mecanismo más eficiente para la absorción mediante la dieta de la vitamina D.

La principal fuente de vitamina D es la producción fotoquímica en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol, que se encuentra en concentraciones altas en los estratos inferiores de la epidermis. Los principales factores que determinan la cantidad de la vitamina D₃ sintetizada fotoquímicamente son cuatro, la cantidad y la calidad de radiación UV (270-290nm), la concentración de 7-dehidrocolesterol en la epidermis y la concentración de melanina presente en la piel (absorbe UV en un intervalo de 290-320nm).

La vitamina D₃ es transportada en sangre por la D-proteína de unión (DBP por sus siglas en inglés), está relacionada también con el depósito de metabolitos de la vitamina D y transporte de ácidos grasos entre otras funciones, aunque la vitamina es rápidamente tomada por el hígado que sirve como lugar de almacenamiento, se han encontrado concentraciones más altas en sangre, sin embargo estudios han encontrado que el músculo y el tejido adiposo almacenan también vitamina D₃.

Para que la vitamina D pueda exhibir actividad biológica, debe ser metabolizada a una de sus formas activas, la 1 α ,25(OH)₂D₃ es el metabolito

más activo, el hígado somete a la vitamina D en su transformación inicial adicionando un grupo hidroxilo en el carbono 25 para formar $25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que es la principal forma circulante de esta vitamina, esta reacción es catalizada por la enzima citocromo P450, vitamina D_3 5-hidroxilasa.

Catabolismo y excreción¹

En los animales existen varias vías para metabolizar la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, una de las vías más importantes es la oxidación de la cadena lateral mediante la hidroxilación del carbono 24 para producir 24-oxo- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, catalizada por la 24R-hidroxilasa, otra vía es la formación de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -26, 23 lactona y la formación de $1\alpha,26,26(\text{OH})_3\text{D}_3$. Se sabe que la excreción de la vitamina D y sus metabolitos se produce principalmente en las heces con ayuda de las sales biliares, y pocas cantidades se excretan por la orina.

Acción bioquímica¹

Uno de los efectos fisiológicos más conocidos de la vitamina D es el incremento de la absorción del calcio en la pared intestinal, aumentando la mineralización de los huesos.

La vitamina D a través del metabolito $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ funciona de manera homóloga a las hormonas esteroideas, en general la hormona es producida en una glándula que responde a un estímulo fisiológico, ya en sangre se encuentra unida a una proteína acarreadora (DBP en caso de la vitamina D), este complejo interactúa con receptores intracelulares específicos de alta afinidad que se localiza en el núcleo donde mediante una fosforilación es activada para unirse a un elemento de respuesta hormonal modulando la expresión de genes, esto resulta en la inducción o represión específica de RNAm modificando la expresión de la proteína.

Acciones no genómicas¹

La $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tiene otras funciones rápidas o de tipo no genéticas, se llevan a cabo mediante la interacción de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ con un receptor de membrana externa que se encuentra asociado a la proteína transportadora (VDR), tienen la función de acoplar componentes proteicos, que proporciona la señal de muchos sistemas de traducción como la modulación de canales iónicos en osteoblastos, canales iónicos en músculo esquelético entre otros.

Estudios cuidadosos usando análogos estructurales de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ han demostrado que la conformación flexible de esta estructura tienen diferentes requerimientos para ligar la estructura proteica, esto debido a la rotación del enlace carbono-carbono 6,7.¹

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y el metabolismo mineral¹

La $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ está directamente relacionada con la regulación de la homeostasis mineral. En hombres los niveles de calcio y fósforo sérico se encuentran entre los 9.5 a 10.5mg/100mL y 2.5 a 4.3mg/100mL respectivamente. En el intestino uno de los efectos de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es la estimulación intestinal del flujo de calcio y fosfato del lumen hacia el plasma.

Requerimientos nutrimentales^{1,4,5}

Los requerimientos de vitamina D₃ de un adulto saludable no han sido del todo precisados, esto es debido a que la vitamina D₃ es producida en la piel por exposición al sol, además ésta puede ser retenida o almacenada en la piel y si la exposición a la luz solar es suficiente, los requerimientos de vitamina D₃ son cubiertos. Sin embargo hay factores que pueden llegar a afectar la disponibilidad de la radiación UV tales como, la zona geográfica, la contaminación, la forma de vida entre otros. Los requerimientos de vitamina D₃ dependen de diversos factores como la concentración de calcio y fósforo provenientes de la dieta, edad, sexo, tiempo de exposición al sol y de la pigmentación de la piel.

La organización mundial de la salud ha definido la unidad internacional para la vitamina D₃ donde 1 U.I. es equivalente a 0.025microgramos o 65.0pmol. Con el descubrimiento del metabolismo de la vitamina D₃ a metabolitos activos, se encontró que en específico de 1 α ,25(OH)₂D₃ es equivalente a la vitamina D₃ en actividad.

La recomendación propuesta por la Food and Nutrition Board of Medicine es de 200U.I./día (5microgramos/día) para niños y adultos hasta los 51 años, 400U.I./día para mujeres entre 51 y 70 años, y 600U.I./día para mujeres mayores de 70 años.¹

Fuentes alimenticias de vitamina D₃^{1,4,6}

La mayor parte de la vitamina D₃ presente en alimentos no fortificados se encuentra en cantidades pequeñas y variables, las fuentes naturales de esta vitamina generalmente derivan de productos de origen animal. Los peces de agua salada como el salmón y la sardina contienen mayores cantidades de vitamina D₃, otros productos como el huevo, carne, leche y la mantequilla tienen cantidades muy pequeñas, mientras que en alimentos de tipo vegetal las cantidades de vitamina son extremadamente pequeñas, las nueces y las frutas no contienen vitamina D.

Deficiencia de vitamina D₃¹

La deficiencia de vitamina D resulta en una absorción intestinal inadecuada de calcio y fósforo, además de una reabsorción renal de éstos, como consecuencia de los niveles en suero de calcio y fósforo disminuyen, incrementando la actividad de la fosfatasa alcalina. En respuesta a los bajos niveles de calcio en suero, ocurre el hiperparatiroidismo, incrementando la hormona paratiroidea para mantener los niveles de calcio en la sangre, resultando en una desmineralización del hueso; dando como resultado raquitismo en niños y osteomalacia en adultos. Los clásicos síntomas asociados con el raquitismo son: las piernas arqueadas, ensanchamiento de rodillas tobillos y muñecas, deformidad en articulaciones, columna, pelvis y tórax. También de lugar a una inadecuada mineralización del esmalte dental.

Bajos niveles de de calcio en suero 5-7mg/mL, altos niveles de fosfatasa alcalina y reducción en la circulación de 25(OH)₂D₃ se pueden utilizar como referencia para el diagnóstico de raquitismo y osteomalacia.

Hipervitaminosis

Las cantidades excesivas de vitamina D no están disponibles a partir de fuentes naturales. Sin embargo se puede presentar en pacientes tratados con

vitamina D o algunos de sus análogos, para el tratamiento del hipoparatiroidismo, raquitismo, osteodistrofia, psoriasis y algunos tipos de cáncer. La hipervitaminosis es un serio problema ya que puede resultar en la calcificación irreversible de corazón, pulmón, riñón y otros tejidos blandos, por ende se deben detectar signos tempranos de intoxicación de vitamina D en pacientes que reciben dosis farmacológicas. Los síntomas incluyen hipercalcemia, hipercalciuria y desmineralización ósea. Los pacientes que sufren de hipervitaminosis D exhiben un aumento de $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en plasma hasta 15 veces con respecto a los niveles normales. Los primeros efectos de la intoxicación de vitamina D suelen ser reversibles, el tratamiento consiste en retirar la vitamina D y la reducción de la ingesta de calcio hasta la normalización de los niveles de calcio en suero.

Análisis de vitamina D₃^{1,7,8}

Las vitaminas B₁₂ y D son las más activas, es decir que se requiere de pocas cantidades para provocar una respuesta biológica, por consecuencia las muestras biológicas contienen por lo general concentraciones muy bajas de estos analitos. Debido a esto los ensayos biológicos deben ser específicos y muy sensibles a la vitamina D o a sus metabolitos activos. Hay muchos ensayos de tipo biológico para la determinación de vitamina D in vitro, estas técnicas, son poco específicas además de costosas y tardías.

Una de las técnicas para la cuantificación de la vitamina D₃ se basa en la absorción de la radiación UV a 264nm. El sistema trieno conjugado de la estructura de la vitamina D produce un espectro de absorción característico donde el máximo de absorción se produce a 264nm, y a esta longitud de onda el coeficiente de absorción molar es de 18,300L/molcm para la vitamina D₂ y D₃. Esta técnica es rápida y sencilla pero tiene la desventaja de que la muestra debe estar libre de compuestos que absorban radiación a la misma longitud. Los métodos colorimétricos se basan en la isomerización de la vitamina D, detectando la vitamina en un intervalo de 1-1000mg, haciendo este método muy poco sensible.

Una de las técnicas analíticas modernas más poderosas para la determinación de muestras que contienen mezclas de esteroides es la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)^{2,10,11}

La cromatografía se define como una técnica física de separación que consta de una fase estacionaria y una fase móvil, donde los componentes de la muestra a separar se distribuyen entre estas dos fases, lo que permite la separación de los componentes de la muestra por la retención selectiva de éstos por la fase estacionaria.

La cromatografía se puede dividir en varias categorías dependiendo de la naturaleza de la fase móvil y de la fase estacionaria que se utilizan, entre ellas se encuentra la cromatografía de líquidos y entre ellas la de tipo instrumental conocido como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) de la cual se discute en este trabajo.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), es una técnica analítica instrumental de separación física que consta de una fase estacionaria sólida, líquida o geles de tamaño muy pequeño empacada en una columna a la que se le hace pasar la fase móvil, aplicando para ello presiones elevadas.

INSTRUMENTACIÓN

El sistema instrumental de un CLAE consta de las siguientes partes básicas:

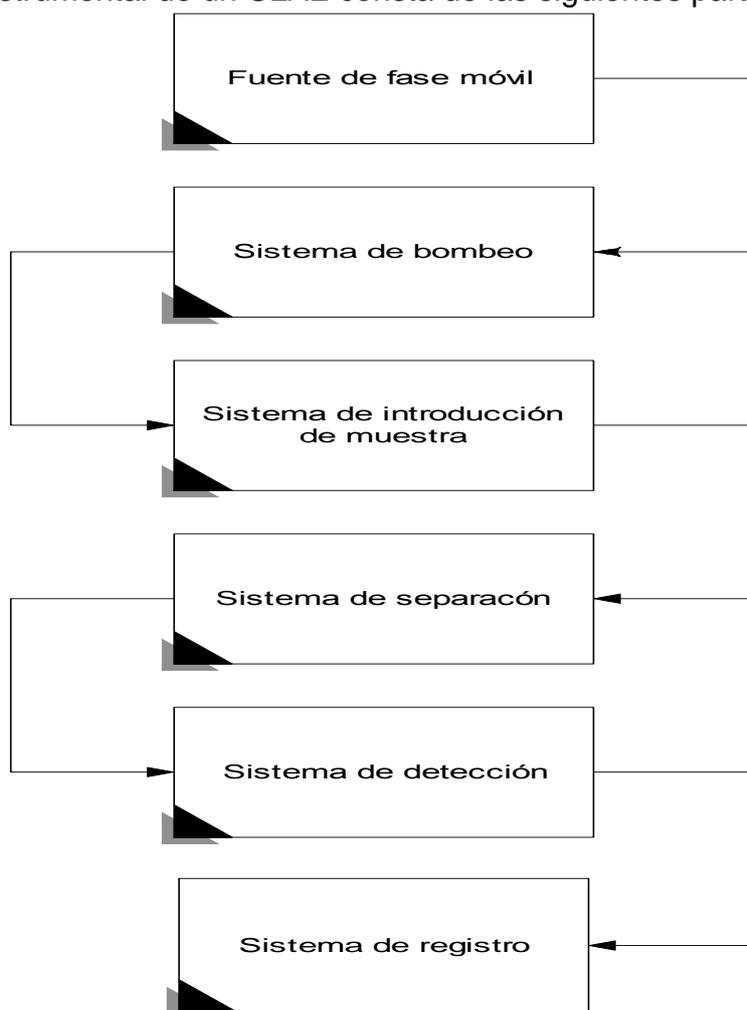


Fig. 2.2.- Partes que conforman a un sistema cromatográfico.

Fuente de fase móvil

La fuente de fase móvil es un contenedor comúnmente de vidrio, que contiene a la fase móvil, generalmente de 1-3 litros. La toma de la fase móvil se realiza generalmente a través de un filtro (filtro sinterizado), que tiene por objetivo no permitir el paso de pequeñas partículas que pueden obstruir la tubería, dañar el sistema de bombeo o tapan la columna. Las fases móviles tienden a contener aire disuelto, y el N_2 y O_2 de éste llega a generar burbujas afectando diferentes partes del instrumento por lo que deben ser eliminados.



Fig. 2.3.- Fuente de fase móvil del Cromatógrafo de líquidos Knauer.

La fase móvil debe cumplir con ciertas características para que se pueda utilizar en cromatografía de alta eficiencia:

- Baja viscosidad.
- Disolver a la muestra.
- No disolver a la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad.
- Ser compatible con el detector.
- Alta pureza.
- Inerte.
- Accesible.

La viscosidad está íntimamente relacionada con la eficiencia en la separación ya que influye en la transferencia de masa en la fase móvil de los analitos. La pureza es de gran importancia ya que las impurezas pueden interferir con la sensibilidad del detector. Los disolventes comúnmente utilizados en cromatografía de alta resolución se muestran en la tabla 2.1.

Sistema de bombeo

Las columnas utilizadas en cromatografía de líquidos de alta eficiencia son partículas muy pequeñas empacadas a altas presiones, lo que implica una resistencia la flujo de la fase móvil muy elevada, por esta razón se requiere de un sistema de bombeo que permita que la fase móvil fluya a través de la columna. El sistema de bombeo tiene como función el generar flujos constantes, reproducibles, no pulsantes y vencer presiones elevadas.

Las partes de las bombas que interactúan con la fase móvil deben estar hechas de materiales resistentes o inertes a ataques químicos, así como al desgaste mecánico. El tipo de bombas que actualmente se utilizan en los equipos de cromatografía de líquidos son las conocidas como bombas mecánicas de pistón recíprocantes. Estas bombas recíprocantes desplazan flujos de volúmenes en forma constante pero pulsante, pero éstas logran disminuir los

pulsos de manera importante debido al funcionamiento de la bomba; ya que mientras un pistón está succionando fase móvil, el otro pistón lo está introduciendo al sistema. Los pistones están unidos a un mecanismo que los hace trabajar juntos y de manera simultanea. El sistema de bombeo tiene un amortiguador de pulsos, que consiste en un contenedor de volumen mayor al de la tubería del sistema, este contenedor recibe el flujo de fase móvil con una mínima pulsación proveniente de las bombas eliminándose éstas totalmente al salir del contenedor.

Disolvente	Corte en el ultravioleta(nm)
Pentano	190
Hexano	195
Heptano	200
Triclorotrifluoroetano	231
Tolueno	284
Cloroformo	245
Diclorometano	233
Éter dietílico	215
Acetato de etilo	257
Dioxano	215
Acetona	330
Tetrahidrofurano	212
2-propanol	205
Metanol	205
Acetonitrilo	190
Agua	----

Tabla 2.1.- Disolventes más utilizados y su absorción en la región del espectro electromagnético en nanómetros.

En la técnica de CLAE se puede trabajar de 2 formas variando el poder de elución (composición de la fase móvil), éstas son conocidas como isocrática y gradiente de elución. En la primera la composición de la fase móvil es constante durante el tiempo que dure el análisis de la muestra manteniéndose el poder de elución constante, mientras que en la segunda la fase móvil va cambiando su composición durante el tiempo que dure el análisis y por lo tanto se va variando el poder de elución (de bajo a alto). Para el caso del análisis por gradiente de elución se logra incrementando o disminuyendo las proporciones de los disolventes que formen la fase móvil, para esto es necesario utilizar mezcladores que lleven a cabo estas mezclas, hay dos tipos de mezcladores:

Mezcladores de alta presión

Estos mezcladores se encuentran después del sistema de bombeo. Este tipo de mezcladores requieren una bomba para cada disolvente a utilizar, la bombas se conectan a un mezclador que recibe los disolventes a altas presiones, realizando las mezclas a partir de las condiciones que se pone en cada bomba.

Mezcladores de baja presión

Estos mezcladores se encuentran antes del sistema de bombeo. Este tipo de mezcladores requieren sólo de una bomba para succionar los diferentes disolventes hacia la cámara de mezclado, y mediante válvulas solenoides el

mezclador permite la entrada de diferentes volúmenes de los disolventes para poner los % indicados en el sistema de bombeo.



Fig. 2.4.- Sistema de bombeo de pistón recíprocante del cromatógrafo de líquidos Knauer.

Sistema de introducción de muestra

El sistema de introducción de muestra está constituido por 2 partes normalmente una jeringa y una válvula de inyección que se encuentra en el instrumento, esta válvula debe resistir altas presiones, está hecho de materiales inertes y permite la introducción de un volumen controlado, minimizando el error de precisión.

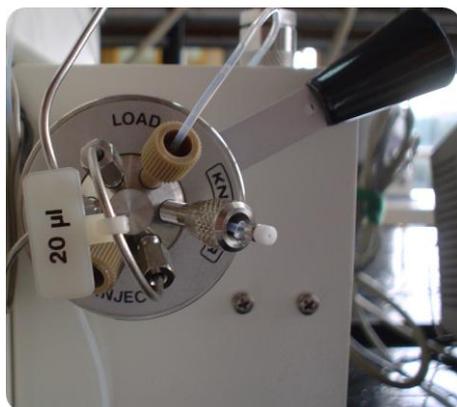


Fig. 2.5.- Válvula de inyección de seis pasos del cromatógrafo de líquidos Knauer.

Este sistema también se conoce mejor como válvula de inyección de seis pasos, recibe el nombre debido a que la válvula se compone de seis segmentos, que se encuentran conectados con tubería capilar de acero inoxidable llamados rizados o "loops" en inglés, usualmente se inyectan volúmenes del orden de 10 a 50 microlitros, de tal manera que cuando la válvula se encuentra en posición de carga el segmento que corresponde a la inyección de la muestra se encuentra conectado al rizo de muestra, que a su vez está conectado al desagüe. Al cambiar a la posición de inyección, el rizo de muestra es conectado simultáneamente al flujo que proviene de las bombas y va hacia la columna, introduciendo así la muestra al sistema.

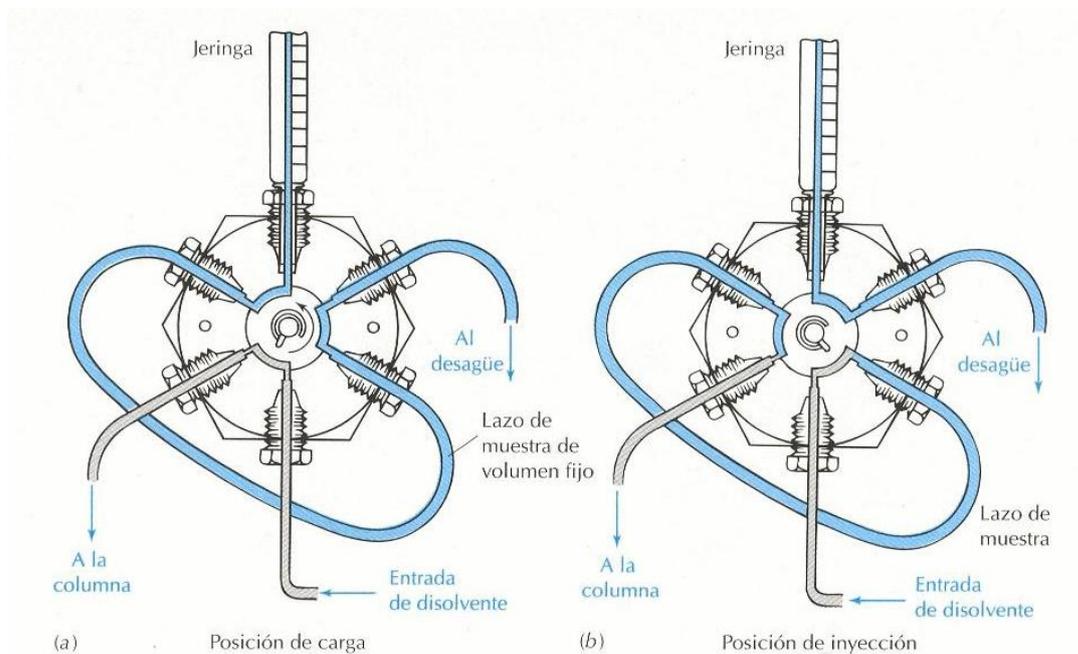


Fig. 2.6.- Diagrama de la válvula de seis pasos en sus dos posiciones carga (a) e inyección (b).

Se pueden trabajar tanto muestras sólidas como líquidas, pero éstas se ponen en disolución por lo que debe ser soluble en la fase móvil para que pueda ser transportada a través de la columna,

Sistema de separación

El sistema de separación consiste en columnas empacadas con la fase estacionaria, generalmente la tubería es de acero inoxidable con longitudes entre 5-30cm y con diámetros internos entre de 1-5mm. Dentro de la columna se encuentra la fase estacionaria empacada y será del material dependiendo de la fase estacionaria que se trabaje según la clasificación que tiene la CLAE.



Fig. 2.7.- Columna analítica de 5cm de longitud marca Phenomenex conectada al cromatógrafo de líquidos Knauer.

En CLAE se puede trabajar de 2 modos dependiendo de la polaridad que presenten la fase estacionaria y la fase móvil:

- Cromatografía en modo de fase normal: la fase estacionaria es de tendencia polar y la fase móvil es de tendencia no polar.
- Cromatografía en modo de fase reversa o inversa: la fase estacionaria es de tendencia no polar y la fase móvil es de tendencia polar.

Sistema de detección

El sistema de detección tiene como función generar un fenómeno físico en el analito o la fase móvil y transformar ese fenómeno físico a una propiedad de tipo eléctrico. Esta medición debe realizarlo de manera continua y sobre el flujo de la fase móvil. Los detectores usados en cromatografía deben en general cumplir las siguientes características:

- Tener un amplio intervalo dinámico.
- Poseer una buena respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento extra-columna del pico cromatográfico.
- Tener una sensibilidad apropiada.
- Presentar una buena relación señal–ruido.
- Tener una constante de tiempo de medición baja.

Los detectores en CLAE se pueden clasificar en dos grandes grupos por la propiedad física que miden:

- Los detectores de **tipo espectroscópico** que tienen su fundamento en medir las propiedades espectroscópicas que presentan los compuestos o fase móvil.

Los detectores utilizados de este tipo son:

Detector UV-Visible.- Se basa en medir la interacción de los compuestos o de la fase móvil con la radiación electromagnética de esta región del espectro electromagnético, midiendo la cantidad de radiación que absorben. Éste es un detector de tipo selectivo, ya que sólo detecta de manera directa compuestos orgánicos que presentes en su estructura instauraciones conjugadas (dienos, carbonilos insaturados y aromáticos), posee una buena sensibilidad e intervalo lineal, es no destructivo y es poco sensible a cambios de temperatura del caudal.

Detector de Fluorescencia.- Se basa en la capacidad que tienen algunos compuestos de absorber y emitir radiación electromagnética en la región UV-Vis. Se utiliza para analizar a sustancias que presentan de manera directa esta cualidad, o que la adquieren mediante derivatización. Es un detector de tipo selectivo, no destructivo, posee una gran sensibilidad y es poco sensible a cambios de temperatura del caudal.

Detector de índice de refracción (Refractómetro).- Se basa en medir las propiedades que tienen los compuestos para dispersar la luz (refractar), mide la refracción que se presenta cuando hay presencia de un analito en la fase móvil comparada cuando sólo pasa fase móvil. Es un detector de tipo universal, no destructivo, pero tiene la desventaja de ser poco sensible, de ser susceptible a cambios de temperatura, y debido a la propiedad que mide no es fácil utilizarlo con gradiente de elución por lo que se busca trabajar en forma isocrática con él.

Detector de espectrometría de masas.- Se basa en producir la ionización de las moléculas y separar los iones generados en por su relación masa/carga. Por sus características puede ser de tipo universal o selectivo, presenta una gran sensibilidad y puede comportarse como detector selectivo o universal y es poco sensible a cambios de temperatura del caudal, su desventaja es que es destructivo.

- Los detectores de **tipo electroquímico** que tienen su fundamento en medir las propiedades eléctricas que presentan los compuestos o la fase móvil.

Los detectores utilizados de este tipo son:

Detector conductimétrico.- Se basa en la propiedad de medir la conductancia que tiene la fase móvil cuando está presente el analito (ionizado) o no. Es un detector de tipo selectivo, no destructivo y muy sensible, aunque tiene la desventaja de ser susceptible a cambios de temperatura y flujo. Es utilizado principalmente cuando se trabaja la cromatografía de intercambio iónico.

Detector amperométrico.- Se fundamenta en medir las propiedades óxido-reductoras que pueden presentar los compuestos de la muestra. Es un detector selectivo, muy sensible pero destructivo.



Fig. 2.8.- Detector UV-Visible del cromatógrafo de líquidos Knauer.

Sistema de registro

Este sistema se encarga de convertir la propiedad eléctrica proveniente del detector en algo entendible para el ser humano, esto es una gráfica de la señal generada (eje de las y) con respecto al tiempo de elución en minutos (eje de las x), este gráfico es conocido como cromatograma. Los aparatos que se utilizan para obtener los cromatogramas son los integrados y las computadoras.

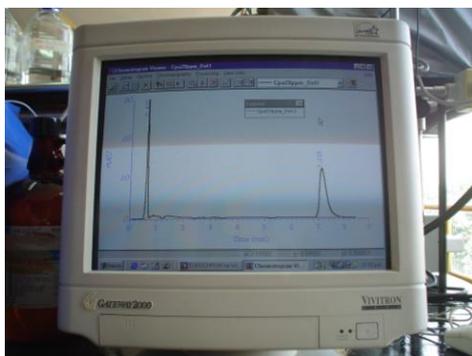


Fig. 2.9.- Computadora conectada al cromatógrafo de líquidos Knauer.

En el cromatograma se obtienen unas señales conocidas como picos que presentan una forma gausiana y que cada uno de ellos representa a un compuesto presente en la muestra. Del cromatograma se obtienen diferentes parámetros que permiten realizar tanto el análisis cualitativo como cuantitativo de los compuestos presentes, así como de otros parámetros cromatográficos.

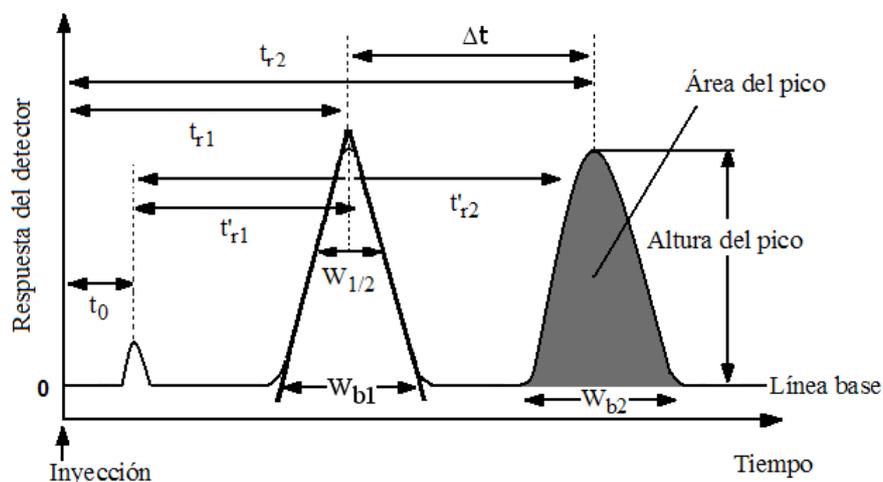


Fig. 2.10.- Cromatograma.

- Tiempo muerto (t_0): es el tiempo que tarda en eluir una muestra que no es retenida en la fase estacionaria.
- Tiempo de retención (t_r): es el tiempo que un compuesto permanece en la columna 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 ajustado o corregido (t_r'): es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria, se calcula como la diferencia entre el t_r y el t_0 .
- Área de pico: este parámetro permite determinar la concentración de cada componente separado en la fase estacionaria.
- Ancho del pico: es la medida que se puede tener del ancho en la base del pico (W_b), o el ancho a la mitad del pico ($W_{1/2h}$).

Con los cromatogramas obtenidos se pueden calcular los siguientes parámetros cromatográficos con la finalidad de demostrar que se tienen las condiciones adecuadas de separación en el sistema y así realizar tanto el análisis cualitativo como la cuantificación de los analitos, estos parámetros son:

1. Eficiencia: es la capacidad que tiene una columna analítica para separar los componentes de una mezcla. Se define como el número de equilibrios que existen de los analitos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Se calcula con la ecuación:

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

2. Selectividad: proporciona una idea de la afinidad de los compuestos de una mezcla con la fase estacionaria. Un valor mayor a 1 de α nos indica

una columna más selectiva y mejor separación entre solutos; la ecuación para su cálculo es:

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

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

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

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

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

4. Resolución: nos indica cuantitativamente que tan separado está el área de un pico respecto a otro. Cuando se tiene $R_s \geq 1.5$ se dice que se tiene una separación del 99.73% ¹⁸, y se calcula con la siguiente ecuación base:

$$R_s = 2 \left(\frac{\Delta tr}{Wb_1 + Wb_2} \right)$$

Análisis cualitativo

El análisis cualitativo se realiza tomando en cuenta los tiempos de retención de los picos de los compuestos presentes en el cromatograma. Este análisis se realiza comparando los tiempos de retención que dan los picos de los compuestos obtenidos del cromatograma de la muestra y que se comparan contra los tiempos de retención que dan los picos de los cromatogramas obtenidos por estándares de compuestos que se espera estén presentes en la muestra. Lo anterior se puede hacer si se analizaron a la muestra y a los estándares a las mismas condiciones cromatográficas.

Pero como en el caso de muestras muy complejas y en las que puede haber presentes una gran cantidad de compuestos que podrían dar el mismo tiempo de retención y que actualmente se hace más exigente el aseguramiento de los resultados y entre ellos optimizar el análisis cualitativo, la cromatografía ha acoplado sistemas de fuerza cualitativa como la espectrometría de masas, con esto se logra que además de tener el tiempo de retención de los compuestos se tiene además el espectro de masas de los compuestos, lo que hace inequívoco el resultado cualitativo de los analitos.

Análisis cuantitativo

Para el análisis cuantitativo se utiliza del cromatograma el área o la altura de los picos cromatográficos. La técnica de cromatografía puede trabajar con todos los métodos cuantitativos conocidos:

- Método de normalización.
- Método de normalización con factores de corrección.
- Método de estándar externo.

- Método de estándar interno.
- Método de adición patrón.

En este trabajo se utilizó el método de estándar externo, por lo que se dará una explicación de éste.

El método de estándar externo se basa en aplicar el parámetro que relaciona a la concentración del analito con la respuesta dada en el detector por éste, esto es conocido como factor de respuesta, que está definido como:

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

Al reorganizar esta ecuación relacionando a la variable dependiente (área o altura) con respecto a la variable independiente (concentración) queda que:

$$A = FrC$$

Esta ecuación indica que si se gráfica el área vs concentración se debe obtener una línea recta con tendencia al origen (0,0) y cuya pendiente será el factor de respuesta. Con lo anterior se preparan disoluciones de concentraciones con crecimiento proporcional del analito para obtener la curva patrón, comprobar que se cumple la linealidad y conocer el Fr. Después se inyecta la muestra para conocer el área del analito en el cromatograma obtenido de ésta, y aplicando la ecuación mencionada y el valor de Fr calculado con la curva patrón, se despeja la concentración del analito y así conocer su valor.

VALIDACIÓN^{2, 11, 12, 13}

La química analítica es una ciencia que siempre implica en muchos de los casos la realización del análisis cuantitativo, es por esto que los resultados cuantitativos son predominantes en los laboratorios de química analítica. Estos métodos cuantitativos llevan un error asociado con cada análisis y por lo tanto los resultados cuantitativos válidos deben estar acompañados de alguna estimación de los errores inherentes a ellos.

Experimentalmente se visualizan tres tipos de errores: crasos, sistemáticos y aleatorios. El error craso es donde el error es muy grande o de tal magnitud que se tiene que repetir el análisis. Los errores de tipo aleatorio provocan que los resultados oscilen alrededor del valor medio, afectando a la precisión, repetibilidad y reproducibilidad de un experimento, estos errores no se pueden eliminar, aunque se pueden minimizar realizando mediciones repetidas, de esta manera se puede medir y evaluar su importancia. Los errores sistemáticos, provocan que los resultados se inclinen hacia algún sentido con respecto al valor medio, afectando a la exactitud. Estos errores se pueden eliminar mediante el control adecuado de los estándares de referencia, técnicas y equipos. En general, estos errores no se detectan fácilmente mediante la observación de los resultados, sino que también tienen un origen muy diverso y dependen de la técnica analítica.

Una propiedad de gran importancia de un método analítico es que se encuentre libre de errores sistemáticos sin embargo los errores aleatorios no permiten que la cantidad medida sea exactamente igual a la cantidad conocida. Para evaluar la importancia de estos errores y/o justificarlos se pueden aplicar herramientas estadísticas.

La validación es por definición la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos (NOM 059). Un método analítico es un proceso mediante el cual se puede generar información por medio de diversos análisis, esta información debe contar con ciertas características o atributos de calidad; esto se refiere a resultados confiables con un alto grado de precisión y exactitud. El proceso analítico consta de varios pasos para su validación:

- **Condiciones optimas de trabajo.**
- **Confirmación e identidad.**
- Selectividad y especificidad.
- **Linealidad del sistema.**
- **Precisión de sistema.**
- Exactitud de sistema.
- Linealidad de método.
- Precisión de método (repetibilidad y reproducibilidad).
- Exactitud de método.
- Recobro.
- Sensibilidad.
- Límites de detección y cuantificación.
- Estabilidad.
- Robustez.
- Etc.

En este trabajo se determinaron los parámetros remarcados en negrillas para validar el sistema cromatográfico. De ellos se dará una breve explicación a continuación.

Condiciones optimas de trabajo

En un sistema es necesario conocer las variantes dentro de las condiciones de trabajo, técnicas de medición, preparación de muestra, equipo, analito, etc. Al conocer las variables que influyen en el trabajo experimental, es posible manejar las variantes de tal manera que se encuentren las condiciones con las cuales la realización de los experimentos se puedan efectuar con eficiencia, de esta manera se podrá trabajar lo más eficientemente posible, en un tiempo razonable y con resultados reproducibles.

En cromatografía de líquidos de alta eficiencia, es de gran importancia encontrar condiciones óptimas para la fase móvil, fase estacionaria, flujo y tipo de detector. Esto permite lograr una separación óptima de los compuestos, un tiempo reducido de análisis y un adecuado funcionamiento del equipo.

Confirmación e identidad

Se tiene que establecer que la señal producida en el detector del instrumento utilizado durante la experimentación, sea solo debida al analito y no a la presencia de otro compuesto que sea física o químicamente parecido al analito de interés. Por lo general se realizan ensayos cualitativos, en cromatografía es común utilizar el tiempo de retención de los analitos para este tipo de análisis, adición de muestra u otras técnicas como espectroscopia infrarroja o espectrometría de masas.

Linealidad del sistema

Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y la señal producida en el detector, en este caso la señal obtenida por la técnica instrumental y la concentración del analito en estándares dentro de un intervalo determinado. La linealidad puede evaluarse mediante la inspección visual de un gráfico o curva de calibración donde se muestra la señal en función de la concentración del analito. Aunque esto depende de la escala y precisión de la gráfica y el observador para predecir si hay una relación lineal (ver figura 2.11). Los resultados de la prueba pueden evaluarse mediante el cálculo de una regresión lineal con el método de mínimos cuadrados el cual define que la relación funcional entre dos variables con comportamiento lineal esta descrita por la ecuación:

$$y=mx+b$$

Donde “y” es la variable dependiente, “x” es la variable independiente, “b” es la ordenada a la intercepción con el eje de las ordenadas y “m” la pendiente de la línea. La regresión lineal permite determinar si los valores están relacionados de manera proporcional, además de cual es esta proporción. El coeficiente de correlación r es una medida cuantitativa de la relación lineal que hay. En la técnica empleada se desea que la curva de calibración pase a través del origen, esto se traduce en que el valor de la ordenada debe aproximarse lo más posible al cero. Con esta información se toma la decisión de indicar cuál será la ecuación que permitirá realizar el análisis cuantitativo de la técnica en

cuestión, ya sea la indica por los mismos principios teóricos de la técnica o la ecuación de la línea recta.

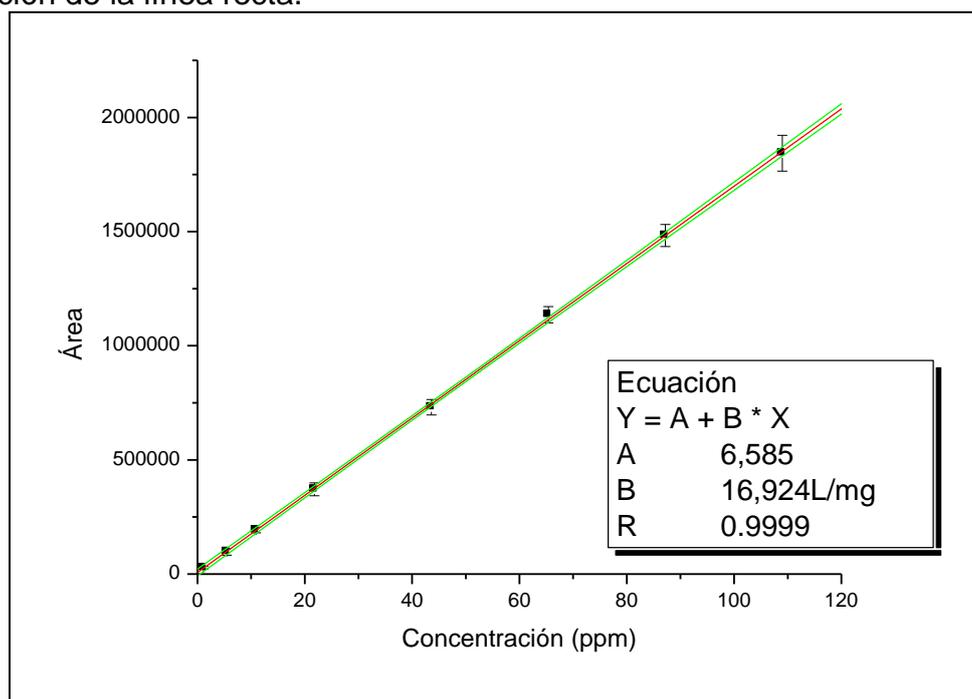


Fig. 2.11.- Curva patrón.

Para esto normalmente se realiza un tratamiento estadístico mediante una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen, utilizando como prueba estadística la “t de student”. Para realizar la inferencia estadística se debe establecer una hipótesis que se desea evaluar, para este procedimiento se utilizan hipótesis relativas a una media ya que lo que se desea demostrar es que el resultado experimental es igual o diferente a un valor de referencia, en este caso, el interés de conocer que tanto se aproxima la ordenada al cero. Para ello se plantean las siguientes hipótesis:

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

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

Para el estudio se realiza el cálculo del valor experimental de la variable “t de student” que llamaremos $t_{cal.}$ y que se calcula con la siguiente ecuación:

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

donde:

b= Ordenada al origen.

β = Ordenada al origen poblacional.

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

n= Número de determinaciones.

\bar{x} = Media experimental.

Se= Error típico de la estimación.

Este último se calcula con la siguiente ecuación:

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

donde:

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

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

$$Sxy = n \sum_{t=1}^n X_t Y_t - \left(\sum_{t=1}^n X_t \right) \left(\sum_{t=1}^n Y_t \right)$$

En las pruebas de hipótesis se compara el valor calculado de la “t de student” contra el valor de referencia de la “t de student” obtenido en tablas con un valor de significancia α , este indica el riesgo estadístico máximo que se está dispuesto a correr, generalmente del 5%, aunque se pueden bajar al 2 o 1%. Para esta prueba, t_α corresponde al valor de tablas de la “t de student” con n-2 grados de libertad, ya que los valores de “m” y “b” fueron remplazados por las estimaciones de mínimos cuadrados. Como se trata de una prueba bilateral el valor de comparación es $t_{\alpha/2}$, y los criterios de rechazo de la hipótesis nula son:

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

Se comparan los valores de t calculados con los valores en tablas para tomar la decisión correspondiente al rechazo o aceptación de la hipótesis nula planteada, con ello en consecuencia se llega a una conclusión con respecto al objetivo inicial. Una vez que se establece que la función de calibración es lineal y se sabe si tiende al origen o no, y con ello aplicar la ecuación respectiva para realizar el análisis cuantitativo.

Se calculan intervalos de confianza sobre los valores de calibración comúnmente conocido como cinturón de confianza, esta prueba se utiliza cuando se desea saber si un punto de la calibración se encuentra fuera de la tendencia de los datos y tomarse como un valor aberrante. Si un punto de la curva de calibración queda fuera del cinturón de confianza, se puede rechazar con un riesgo α .

También se realizan los cálculos de los intervalos de confianza para la ordenada al origen y para la pendiente de la ecuación lineal aceptada.

Las ecuaciones para el cálculo de estos intervalos son:

- Intervalo de confianza para la ordenada (IC_b).

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

- Intervalo de confianza para la pendiente (IC_m).

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

Precisión del sistema

Se refiere a la correspondencia entre los resultados de las pruebas independientes, cuyos valores son obtenidos por mediciones repetidas de cierta magnitud a condiciones específicas. Es el componente aleatorio de la incertidumbre, depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios, no tiene relación con el valor verdadero, en general depende de la concentración del analito. Se puede expresar matemáticamente como la desviación estándar, la varianza, o más comúnmente como el coeficiente de variación, esto bajo ciertas condiciones de medición.

La precisión de un sistema se evalúa preparando por lo menos siete disoluciones estándar a la misma concentración, cada una de ellas se analiza por quintuplicado, con los datos obtenidos se calculan los parámetros estadísticos requeridos. Es de suma importancia realizar el procedimiento siempre bajo las mismas condiciones para no incrementar la dispersión. Una vez obtenido el valor de dispersión experimental se prosigue con la prueba de hipótesis a través de la prueba estadística conocida como "ji cuadrada". Para realizar la inferencia estadística se utilizan hipótesis relativas a una varianza para saber si la dispersión de los resultados experimentales cumplen con determinada condición, en este caso, se desea saber si la varianza de los resultados es inferior a la varianza máxima aceptada, que esta relacionada con el coeficiente de variación cuyo valor en análisis químicos típicamente debe ser inferior al 5%, en el caso de la técnica de cromatografía instrumental se exige un valor inferior al 2% en la industria farmacéutica. Para desarrollar esta prueba se establecen las siguientes hipótesis:

$$\begin{aligned} H_0: s^2 &= \sigma^2 && \text{(hipótesis nula)} \\ H_1: s^2 &> \sigma^2 && \text{(hipótesis alterna)} \end{aligned}$$

donde:

s^2 = Varianza experimental.

σ^2 = Valor teórico de referencia del C.V., por lo menos del 5%.

Se calcula el valor estadístico para "ji cuadrada" experimental, que llamamos calculada:

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

donde:

n= Número de determinaciones.

s^2 = Varianza experimental.

σ_o^2 = Varianza máxima aceptada.

Se compara el valor calculado contra un valor de referencia obtenido de tablas con un nivel de significancia de $\alpha=5\%$. Para esta prueba χ^2_α es el valor de tablas con n-1 grados de libertad, como se trata de una prueba unilateral el criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

Se comparan los valores de χ^2 calculados con los valores en tablas para tomar la decisión correspondiente al rechazo o aceptación de la hipótesis planteada,

en consecuencia se llega a una conclusión con respecto al objetivo inicial que se establece si el sistema es preciso con referencia al coeficiente de variación establecido.

Se calcula el intervalo de confianza para establecer si los valores obtenidos de experimentos posteriores aun se encuentran dentro de los valores establecidos de precisión del sistema. En este caso se calcula el intervalo de confianza para $1-\sigma$, para σ^2 con la siguiente ecuación:

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

donde:

$$\chi_1^2 = \chi_{\alpha/2}^2$$

$$\chi_2^2 = \chi_{1-\alpha/2}^2$$

CAPÍTULO III

Desarrollo Experimental

MATERIAL

- Matracas volumétricos tipo A de 50 y 5mL, con intervalo de tolerancia de ± 0.04 mL, marca Blau Brand lote: 03,30 y 03,06, certificado ISO 1042.
- Micropipeta de émbolo de precisión, marca SoftGrip, Hamilton, no. de serie: 028450, certificado ISO 9001, capacidad: 1-10 μ L.
- Micropipeta de émbolo de precisión, marca SoftGrip, Hamilton, no. de serie: 028328, certificado ISO 9001, capacidad: 10-100 μ L.
- Micropipeta 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 Transferpette, Brand, lote: 03A6467, certificado ISO 9001-14001, capacidad: 0.5-5mL.
- Jeringa para cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, marca Hamilton con capacidad de 250 μ L.
- Balanza analítica, marca E. Mettler Zürich, capacidad máxima 110g, y sensibilidad 0.1mg.
- Vasos de precipitados de 25, 100 y 250mL
- Nave para pesar.
- Viales con capacidad de 20mL.
- Pipetas Pasteur.
- Equipo de filtración millipore.
- Parrilla con agitación magnética.
- Barra magnética.
- Espátula.

INSTRUMENTACIÓN

- Espectrofotómetro UV-Visible automatizado, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25, no de serie: 101N6081901.
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia isocrático, marca Knauer, modelo Smartline, éste fue el instrumento principal para realizar el trabajo de esta tesis, con las siguientes características:
 - ✓ Bomba de doble pistón marca Knauer, modelo Smartline 1000.
 - ✓ Válvula de inyección, marca Knauer, con capacidad de inyección de 20 µL.
 - ✓ Columna marca Phenomenex, no. de serie: 260436-2, de 50mm de longitud y 4.6mm de diámetro interno conteniendo una fase inversa (químicamente unida) de octadecilo (C₁₈), con un tamaño de partícula de 5 µm.
 - ✓ Detector UV-Visible de longitud variable, marca Knauer, modelo Smartline 2500.
 - ✓ Computadora Dell, con programa Eurochom for Windows.
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia, marca Shimadzu que permite trabajar con gradiente de elución, con las siguientes características:
 - ✓ Desgasificador modelo HD-1.
 - ✓ Mezclador de baja presión modelo FCV-10AL.
 - ✓ Sistema de bombeo modelo LC-10AD.
 - ✓ Válvula de inyección marca Rheodyne con tubería para inyectar 10 µl de muestra.
 - ✓ Columna empacada de fase estacionaria químicamente unida de Nucleosil C18, de 150mm de longitud x 4mm de d.i. y tamaño de partícula de 5 µm con porosidad de 100 Å.
 - ✓ Detector UV-VIS modelo SPD-10AV de longitud de onda variable.

REACTIVOS

- Vitamina D₃, marca chem sevices, lote: 310-90B CAS 67-97-0, sólido cristalino, con un 99% de pureza.
- Acetonitrilo, marca Mallinckrodt chrom RA, lote: H076 M51D65. CAS75-005-8, con 99.99% de pureza.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Espectrofotometría UV-Visible

Con ayuda de un espectrofotómetro de UV-Visible se determinó la longitud de máxima de absorción de una disolución estándar de vitamina D₃. Se preparó una disolución de 114ppm pesando 5.7mg y aforando con acetonitrilo en un matraz volumétrico de 50mL, de esta disolución se tomó un alícuota de 2.5mL y se llevó al aforo con acetonitrilo en un matraz volumétrico de 10mL, quedando finalmente una concentración de 28.5ppm. Se registró el espectro de UV-Visible, a las siguientes condiciones (ver el espectro de la página 34):

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

Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

Para esta parte del trabajo se utilizó un estándar de concentración de 28.5ppm. Las condiciones cromatográficas que se establecieron con base a un trabajo de tesis previo² y comprobando que seguían cumpliéndose en el instrumento marca Knauer fueron las siguientes (ver cromatograma página 35):

- Fase estacionaria: C₁₈.
- Fase móvil: Acetonitrilo (100%).
- Longitud de onda (λ): 265nm.
- Flujo: 1mL/min.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

La curva de calibración que se trabajó quedó en un intervalo de 1 a 100ppm, para esto se preparó una disolución madre de vitamina D₃ pesando 5.2mg del estándar y llevándolo a un aforo con acetonitrilo en un matraz volumétrico de 50mL, obteniendo una concentración de 104ppm. De la disolución madre se prepararon 5 disoluciones estándar, cada una por duplicado, se tomaron alícuotas de 48 μ L, 408 μ L, 960 μ L, 1.92mL y 3.84mL, que se trasvasaron a matraces volumétricos de 5mL, llevándolos al aforo con acetonitrilo, quedando del orden de 1.0, 10.0, 20.0, 39.9 y 79.9ppm respectivamente. Para la disolución de aprox. 100ppm se utilizó la disolución madre. Cada estándar (duplicado) se inyectó por triplicado en orden creciente de concentración.

La linealidad del sistema se realizó en tres ocasiones diferentes, con el fin de que el analista obtuviera experiencia así como mayor habilidad tanto en la preparación de disoluciones y manejo del instrumento.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

A partir de la disolución madre de 104ppm se prepararon siete disoluciones estándar de vitamina D₃, a una concentración de 50ppm, se tomaron alícuotas de 2.4mL llevándose a un matraz volumétrico de 5mL aforándolos con acetonitrilo, quedando una concentración de 49.9ppm. Cada estándar se

inyectó por quintuplicado en el orden de preparación. La precisión se repitió en tres ocasiones diferentes también.

REPRODUCIBILIDAD

Como en el laboratorio se tienen 2 cromatógrafos de líquidos en que los alumnos pueden realizar la práctica planteada, en esta etapa del trabajo lo que se realizó fue el análisis de la reproducibilidad de la linealidad y precisión del sistema con dos analistas y los dos cromatógrafos mencionados, para asegurar que se obtendrán resultados semejantes de linealidad y precisión de los sistemas, cumpliendo además los requisitos mínimos de validación que se plantean a estas pruebas. Cada analista trabajó con un cromatógrafo de líquidos, el analista 1 trabajó en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Knauer y el analista 2 trabajó en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Shimadzu.

Linealidad del sistema en los 2 cromatógrafos

Cada uno de los analistas preparó dos curvas patrón de vitamina D₃ de cinco puntos, y cada punto se inyectó por triplicado todo el mismo día. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera.

“Analista 1”

En este caso se utilizaron las disoluciones preparadas para la prueba de linealidad del sistema explicadas anteriormente en este capítulo.

“Analista 2”

Preparó una disolución madre de vitamina D₃ pesando 5mg del estándar y llevándolo a un matraz volumétrico de 50mL y aforándolo con acetonitrilo, obteniendo una concentración de 100ppm. De la disolución madre se prepararon 5 disoluciones estándar, cada una por duplicado, para esto se tomaron alícuotas de 50μL, 500μL, 1ml, 2mL y 4mL, que se trasvasaron a matraces volumétricos de 5mL, llevándolos al aforo con acetonitrilo, quedando del orden de 1, 10, 20, 40 y 80ppm respectivamente. Para la disolución de 100ppm se utilizó la disolución madre.

Precisión del sistema en los 2 cromatógrafos

Cada uno de los analistas preparó una serie de siete disoluciones estándar, uno de ellos a concentraciones de 20ppm y el otro de 50ppm aproximadamente de vitamina D₃, cada una de estas disoluciones se inyectó por quintuplicado. Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

“Analista 1”

En este caso se utilizaron las disoluciones preparadas para la prueba de precisión del sistema explicadas anteriormente en este capítulo.

“Analista 2”

Para las disoluciones de aprox. 20ppm, se pesaron 5mg de vitamina D₃, y se colocaron en un matraz volumétrico de 50mL aforando con acetonitrilo, obteniéndose una disolución madre de 100ppm, se tomaron siete alícuotas de

1mL c/u de la disolución madre y se colocaron en un matraz volumétrico de 5mL aforando con acetonitrilo.

CAPÍTULO IV

Resultados y análisis de resultados

El proyecto de esta tesis es el diseño de una práctica, se indicarán en este capítulo notas de lo que realizarán los alumnos así como que información recibirán por parte del profesor (se marcarán en negrillas), ya que en la experiencia de cátedra planteada en este trabajo no podrá desarrollarse de manera completa por los alumnos experimentalmente, lo anterior es por no alcanzar el tiempo de duración de las clases con respecto al tiempo real que necesitarían para obtener todo lo indicado en la parte experimental.

La asignatura en que se realizará la experiencia de cátedra se imparte actualmente en módulos y esta experiencia se llevará a cabo en el módulo de Técnicas de Separación.

Hay que indicar que los datos y resultados de todos los cálculos indicados en este capítulo se encuentran de manera completa en el Anexo I que se presenta en este trabajo.

CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Espectrofotometría UV-Visible

Se obtuvo el espectro UV-Vis de la vitamina D₃, éste le será entregado a los alumnos por parte del profesor para que con él discutan las opciones de longitudes óptimas para realizar el análisis por cromatografía de líquidos y lo que se podría esperar con ello.

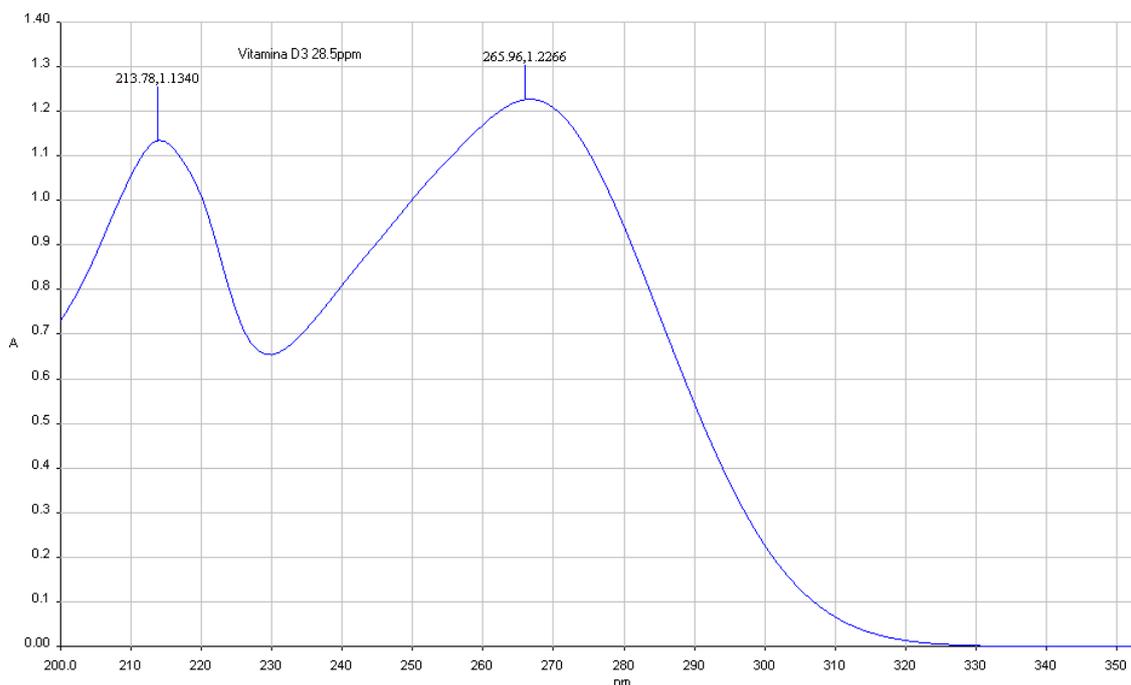


Fig. 4.1.- Espectro UV-Visible de la vitamina D₃.

Como se puede observar en el espectro de la vitamina D₃ se tienen 2 longitudes de máxima absorción una a 214nm y otra a 265nm.

Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

Para este trabajo se inyectó al cromatógrafo de líquidos el estándar de 28.5ppm obteniendo como resultado, obteniendo el siguiente cromatograma:

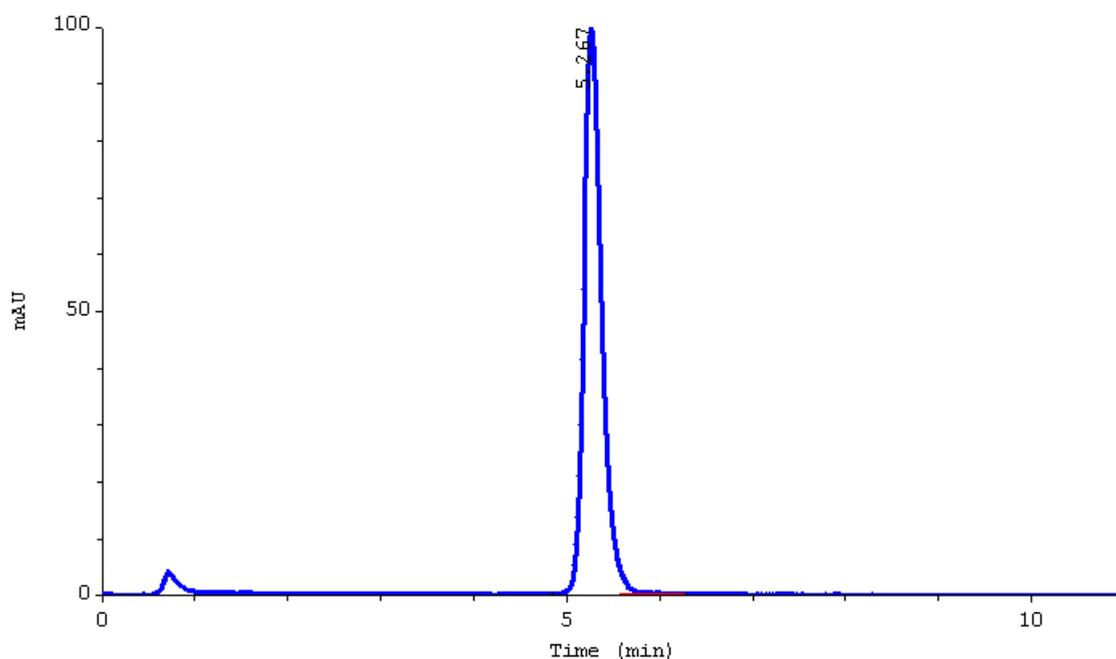


Fig. 4.2.- Cromatograma de la vitamina D₃ a las condiciones establecidas.

En éste se observa la señal de la vitamina D₃ a un tiempo de retención de aprox. 5.2 minutos, también se observa que no hay señales de impurezas.

En esta parte el profesor utilizará este trabajo experimental para enseñar también el manejo del instrumento y la parte de enseñanza práctica de la información obtenida por esta técnica.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Hay que indicar que esta parte en el desarrollo de la práctica, puede ser aplicada de 2 maneras por parte del profesor:

1) El profesor puede hacer que los alumnos realicen las inyecciones de los estándares indicados en la parte experimental (esto condiciona ya sea que los alumnos preparen los estándares o que el profesor los tenga preparados) y trabajen con los datos que ellos obtienen. El único problema de esto es que el tiempo sería demasiado para cumplir adecuadamente el trabajo.

2) El profesor hará que los alumnos inyecten por triplicado cada estándar (teniendo ya las disoluciones preparadas) con el objetivo de que los alumnos realicen experimentalmente la acción de inyectar. Para procesar, a los alumnos se les entregarán los datos obtenidos en este trabajo para que mientras uno de los alumnos inyecta un estándar (se estarán turnando los alumnos) los demás estén con el profesor aprendiendo a analizar y procesar la información que se les entrega, de la manera que se menciona más adelante en este capítulo. Con esto también se optimiza mejor el tiempo de la sesión práctica.

Obviamente la segunda opción es la que se considera en este trabajo como viable para el mejor aprendizaje de los alumnos y en un mejor rendimiento del tiempo que se tiene para dar las clases.

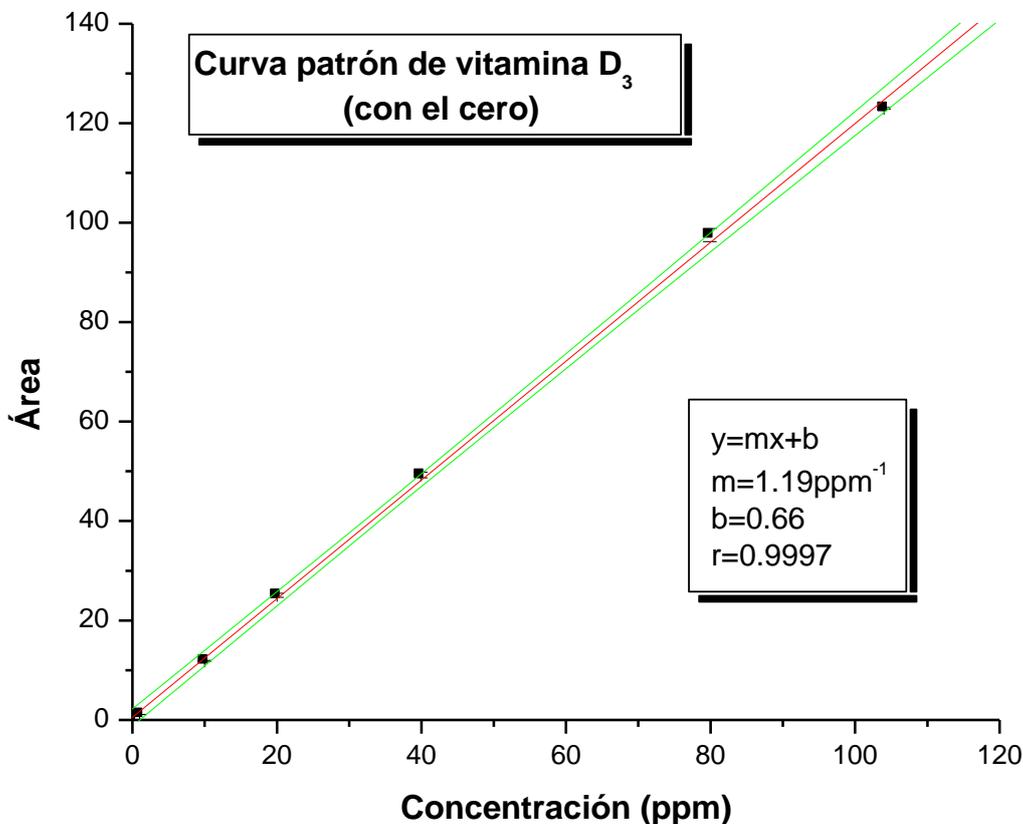
Con el siguiente experimento se buscó demostrar que la respuesta es directamente proporcional a la concentración del estándar de vitamina A en un intervalo de concentración amplio de 1 a 100ppm aproximadamente.

Conc. (ppm)	Área					
	Serie A			Serie B		
	1	2	3	1	2	3
0.0	0					
1.0	1.11593	1.11701	1.09951	1.10100	1.10819	1.10267
10.0	11.9336	11.9219	12.0374	11.7589	11.8017	11.8598
20.0	25.2648	25.7255	25.1594	24.8605	24.7563	24.5984
39.9	49.8966	49.7549	49.6327	48.8248	48.6999	48.7907
79.9	98.7285	99.3916	97.6501	96.5225	96.3521	96.3940
104.0	122.953	123.016	122.746	122.884	123.332	122.953

Tabla 4.1.- Resultados de la prueba de linealidad.

Con los datos que se proporcionan se pedirá a los alumnos que realicen el gráfico de área vs concentración con el propósito de que visualicen que la respuesta es directamente proporcional a la concentración de los estándares de manera lineal y que además realicen la regresión lineal tomando en cuenta todos los datos que les fueron entregados.

Con los datos obtenidos experimentalmente se realiza la curva patrón para realizar el estudio de la linealidad. Al graficar los datos (Área vs Concentración) de la tabla 4.1 se puede observar que el sistema presenta una tendencia lineal además de que parece que tiende al origen.



Gráfica 4.1. Curva patrón de vitamina D₃ en el intervalo de 1 a 100ppm.

Con la guía del profesor los alumnos podrán concluir al observar la curva patrón, alguna de las siguientes dos opciones:

- Que los datos obtenidos y graficados de los estándares tienen tendencia lineal y si además parece que tienden al origen, podrán utilizar la ecuación del método estándar externo $A=Fr \cdot C$ planteado en la Cromatografía.
- Que los datos obtenidos y graficados de los estándares tienen tendencia lineal y si además parece que no tienden al origen, entonces utilizarán la ecuación de la línea recta $y=mx+b$.

En esta curva patrón de la vitamina D₃ los alumnos podrán visualizar que los puntos de los estándares parece que tienen tendencia lineal y parece que tienden al origen (0,0).

Como parece tener tendencia al origen pero no se puede asegurar sólo a simple vista tomando en cuenta la variación de los datos se les enseñará el planteamiento de la prueba de hipótesis para ver si se cumple que tiende o no al origen, lo cual con la guía del profesor realizarán.

El profesor tendrá que ver el nivel de profundidad con la cual enseñará esta parte, ya sea que les lleve la información aquí obtenida o esperando que ellos realicen los cálculos. Como ya se dijo antes por el tiempo lo ideal será que se entregue ya la información para que se concentren más en entender el procedimiento.

El valor del coeficiente de correlación es de 0.9995, lo cual confirma su tendencia lineal.

Aunque visualmente la curva de calibración parece tener tendencia al origen, se aplica una prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen para confirmar si tiende al origen 0 y así decidir que ecuación se designará al sistema.

Por lo tanto se realiza la prueba de hipótesis, planteando las siguientes hipótesis:

$$\begin{aligned} H_0: b &= \beta, & \text{donde } \beta &= 0 \text{ (hipótesis nula)} \\ H_1: b &\neq \beta & & \text{(hipótesis alterna)} \end{aligned}$$

Se aplica la prueba estadística “t de student”, y se realizó el cálculo matemático para obtener la “t_{calculada}”:

$$t_{cal} = \left(\frac{(b) - \beta}{Se} \right) \sqrt{\frac{n(Sxx)}{Sxx + n(X)^2}}$$

donde:

b= ordenada al origen.

β = ordenada al origen poblacional.

Se = error típico de la estimación.

Sxx = suma de cuadrados de la variable independiente.

n = número de determinaciones.

x = media experimental.

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

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

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

$$Se = \sqrt{\frac{(1945873.4)(2767725.13) - (2319794.78)^2}{(37 - 2)37 * 1945873.4}} = 1.29$$

$$t_{cal.} = \frac{0.664 - 0}{1.29} \sqrt{\frac{37(1945873.4)}{1945873.4 + (37 * 41.3121)^2}} = 2.11$$

Considerando un nivel de significancia del 95%, y siendo una prueba de dos colas para n-2 grados de libertad la “t_{tablas}” obtenida es de:

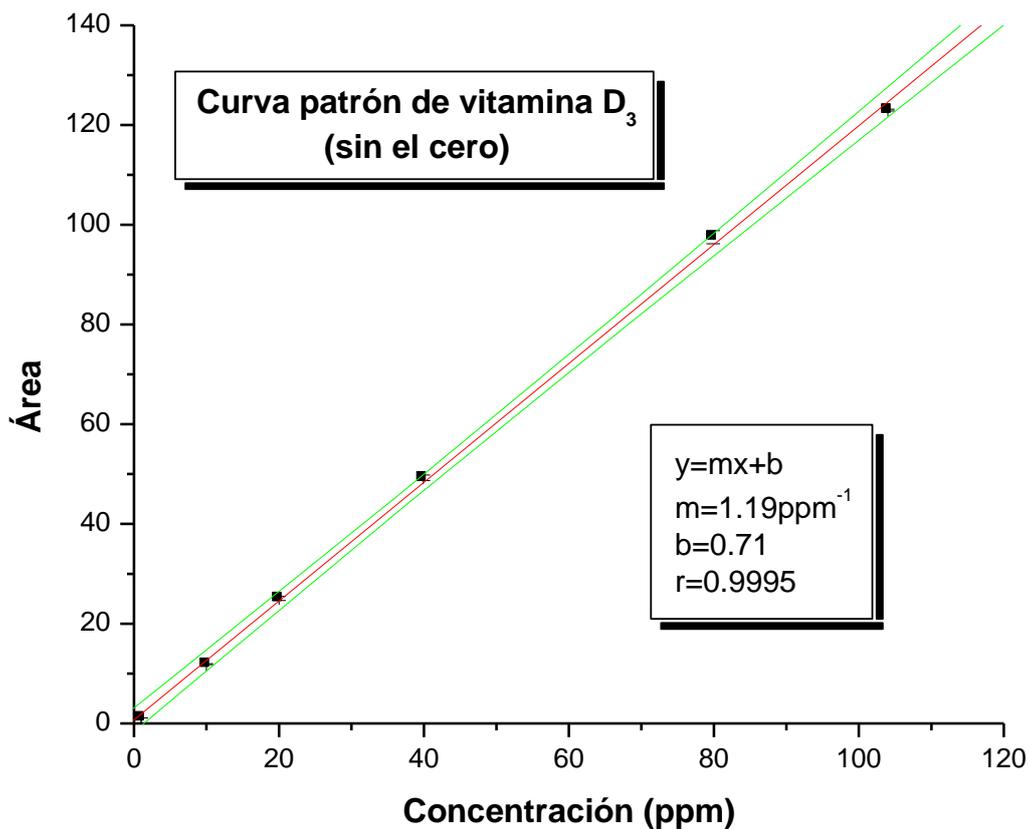
$$t_{tablas(0.025,35)} = 2.042$$

Considerando que para rechazar la hipótesis nula:

$$-t_{\text{cal.}} < -t_{\text{tablas}} \text{ o } t_{\text{cal.}} > t_{\text{tablas}}$$

Como $t_{\text{cal}} > t_{\text{tablas}}$ se rechaza la hipótesis nula lo que indica que la ordenada es diferente de cero, es decir no tiende al origen y por lo tanto la ecuación que se utilizará será la de la línea recta ($y=mx+b$) para realizar el análisis cuantitativo.

Como se rechaza la hipótesis nula a los alumnos se les indica que se vuelve a realizar de nuevo la curva patrón y regresión lineal sin incluir la ordenada al origen (0,0).



Gráfica 4.2.- Curva patrón de vitamina D₃ en el intervalo de 1 a 100ppm sin incluir la ordenada al origen (0,0).

Posteriormente los alumnos realizarán el cálculo del intervalo de confianza (al 95% de significancia) para la ordenada al origen y para la pendiente.

Se realizaron los cálculos necesarios para obtener los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente.

Intervalo para la ordenada al origen:

$$ICb = 0.7059 \pm (2.042 * 1.6998) \sqrt{\frac{(1830134.48) + (36 * 42.45)^2}{36 * 1830134.48}}$$

$$ICb=1.35>0.71>0.06$$

Intervalo para la pendiente:

$$ICm = 1.1916 \pm (2.042 * 1.6998) \sqrt{\frac{36}{1830134.48}}$$

$$ICm=1.20>1.19>1.18$$

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Como en el caso de la linealidad, el profesor puede aplicar las 2 maneras mencionadas para trabajar y como en ese caso la segunda opción que se marco en negrillas es la opción que se plantea en este trabajo como viable para el mejor aprendizaje de los alumnos y en un mejor rendimiento del tiempo que se tiene para dar las clases.

La tabla que se presenta a continuación contiene información acerca de los resultados obtenidos para la vitamina D₃.

No. de réplica	Áreas				
	No. de inyecciones				
	1	2	3	4	5
1	61.2	61.1773	60.9992	61.1582	61.2423
2	60.3472	60.7429	60.5908	60.658	60.9764
3	61.8031	61.2225	60.7939	61.2362	61.3453
4	61.3007	60.6526	60.9705	60.9422	60.835
5	61.2533	60.5875	60.8039	60.8953	61.0164
6	60.1931	59.716	59.8128	59.9092	59.5867
7	59.7069	59.2626	59.1637	59.2571	59.2741

Parámetros	
x	60.59
s	0.72
s ²	0.51
C.V.	1.18%

Tabla 4.2.- Datos de área para la vitamina D₃ así como los parámetros que se obtienen de las 7 disoluciones estándar inyectadas por quintuplicado.

El profesor entregará esta información a los alumnos para que la utilicen y con su guía aprendan el procesamiento de la información que se realiza para trabajar precisión del sistema.

Con los resultados obtenidos en la tabla 4.2 el profesor podrá explicar la idea de precisión que da cada uno de estos parámetros:

a) Desviación estándar: Da idea que tanto se desvían los datos con respecto a la media de éstos, pero para saber si es buena o mala se necesita conocer el valor de la media.

b) Variancia o varianza: Lo mismo que en el caso anterior solo que es más problemático porque se eleva al cuadrado por lo que no se usa comúnmente para hablar de precisión.

c) Coeficiente de variación, CV (% de desviación estándar relativa o %RSD por sus siglas en inglés): Esto es qué tanto se desvían los datos con respecto a su relación con la media de éstos, y como es un dato que se da en porcentaje de esa relación no se requiere informar a la gente el valor de la media cuando se da este parámetro.

Podrá plantear porque el uso del CV es muchas veces suficiente para indicar si se cumplen las precisiones planteadas por alguna instancia reguladora.

Entonces les indicará que cuando este resultado quede cercano al valor planteado por la instancia reguladora es importante realizar una prueba de hipótesis para ver si el valor esta significativamente cumpliendo o no con el valor estipulado.

El profesor trabajará con los alumnos la información para que entiendan el manejo de ésta y obtener las conclusiones sobre la precisión del sistema.

Como en este trabajo se plantea cumplir que se tenga una precisión mayor al 95% o un error no mayor al 5% como CV y el valor obtenido fue de 1.18% el profesor les indicará que aunque esta muy alejado del valor límite se realizará la prueba de hipótesis para que aprendan a seguir el procedimiento en el caso de que llegaran a tener valores cercanos a los límites establecidos.

Por lo tanto la prueba de hipótesis planteada sobre la varianza considerando un error no mayor del 5% del CV será:

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

$$H_1: s^2_1 > \sigma^2$$

donde:

s^2 = Varianza experimental.

σ^2 = Valor teórico de varianza tomada del CV, a un error de por lo menos del 5%.

Se calcula el valor de σ^2 , tomando le valor de 5% como coeficiente de variación, que se exige normalmente en el planteamiento inicial de un análisis, se realizó el siguiente cálculo:

$$\sigma^2 = (5 \cdot 60.5895 / 100)^2 = 9.1777$$

Se aplica la prueba estadística "Ji cuadrada" (χ^2), por lo que se obtiene la $\chi^2_{cal.}$:

$$\chi^2_{cal.} = \frac{(35 - 1)0.513}{9.1777} = 1.90$$

Obtenemos la χ^2_{tablas} :

$$\chi^2_{0.05,34} = 55.758$$

Teniendo como criterio de rechazo de la H_0 que:

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

Como la $\chi^2_{cal.}$ es menor a la χ^2_{tablas} la hipótesis nula no se rechaza, por lo tanto se concluye que el sistema presenta una precisión mínima del 95% estadísticamente hablando o con un error máximo del 5%.

Y se calculará el intervalo de confianza de la desviación estándar:

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

$$\sqrt{\frac{(35-1)0.5132}{19.80}} < 0.7163 < \sqrt{\frac{(35-1)0.5132}{51.96}}$$

$$0.58 < 0.72 < 0.94$$

El profesor discutirá todo el procedimiento con los alumnos de la prueba de hipótesis y las conclusiones que se obtuvieron. Les indicara que ahora realicen la prueba de hipótesis si se considera que para técnicas cromatográficas en la industria farmacéutica se exige un C.V. máximo del 2%, para ver si los alumnos entendieron el procedimiento.

Obteniendo al realizar este procedimiento que la:

$$\sigma^2 = (2 * 60.5895 / 100)^2 = 1.468$$

La obtención de la $\chi^2_{cal.}$:

$$\chi^2_{cal.} = \frac{(35 - 1)0.513}{1.468} = 11.88$$

La χ^2_{tablas} :

$$\chi^2_{0.05,34} = 55.758$$

Por lo que los alumnos concluirán que como la $\chi^2_{cal.}$ es menor a la χ^2_{tablas} la hipótesis nula no se rechaza, por lo tanto se concluye que el sistema presenta una precisión mínima del 98% estadísticamente hablando o con un error máximo del 2%, cumpliendo las condiciones de la industria farmacéutica para la precisión de un cromatógrafo de líquidos.

REPRODUCIBILIDAD

Como ya se mencionó en la parte del desarrollo experimental, en el laboratorio se tienen 2 cromatógrafos de líquidos, por lo que a continuación se procesan los datos obtenidos para la linealidad y precisión de los sistemas. Recordando que cada analista trabajó con un cromatógrafo de líquidos, el analista 1 (realizador de esta tesis) trabajó en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Knauer y el analista 2 trabajó en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Shimadzu.

En este caso el profesor podrá hacer la observación de las diferentes opciones de reporte que envían los programas del sistema de registro, en el caso de la computadora que tiene el equipo Knauer reporta áreas con magnitudes en el orden de enteros y hasta milésimas de enteros, en cambio el integrador que tiene el equipo Shimadzu reporta las áreas con magnitudes en orden de los miles y los millones.

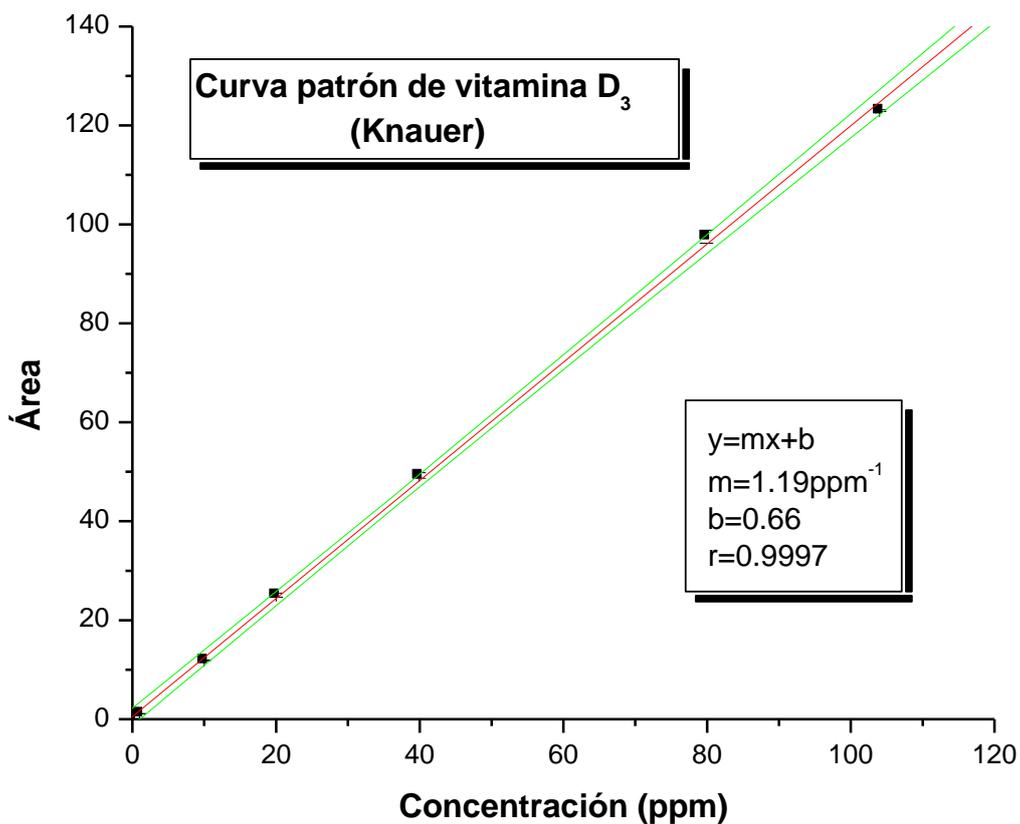
Para este caso el profesor podrá proporcionar la información obtenida de los procesos gráficos y estadísticos para que los alumnos lo procesen con él o dejarlo de ejercicios para casa para que ejerciten el procedimiento y se vea si los alumnos han asimilado los conocimientos del proceso de la validación de los sistemas.

Linealidad del sistema en los 2 cromatógrafos

A continuación se reportan los datos de las linealidades en cada instrumento.

ANALISTA 1						
	Áreas					
	Serie A			Serie B		
Conc (ppm)	1	2	3	1	2	3
0.0	0					
1.0	1.11593	1.11701	1.09951	1.101	1.10819	1.10267
10.0	11.9336	11.9219	12.0374	11.7589	11.8017	11.8598
20.0	25.2648	25.7255	25.1594	24.8605	24.7563	24.5984
39.9	49.8966	49.7549	49.6327	48.8248	48.6999	48.7907
79.9	98.7285	99.3916	97.6501	96.5225	96.3521	96.394
104.0	122.953	123.016	122.746	122.884	123.332	122.953

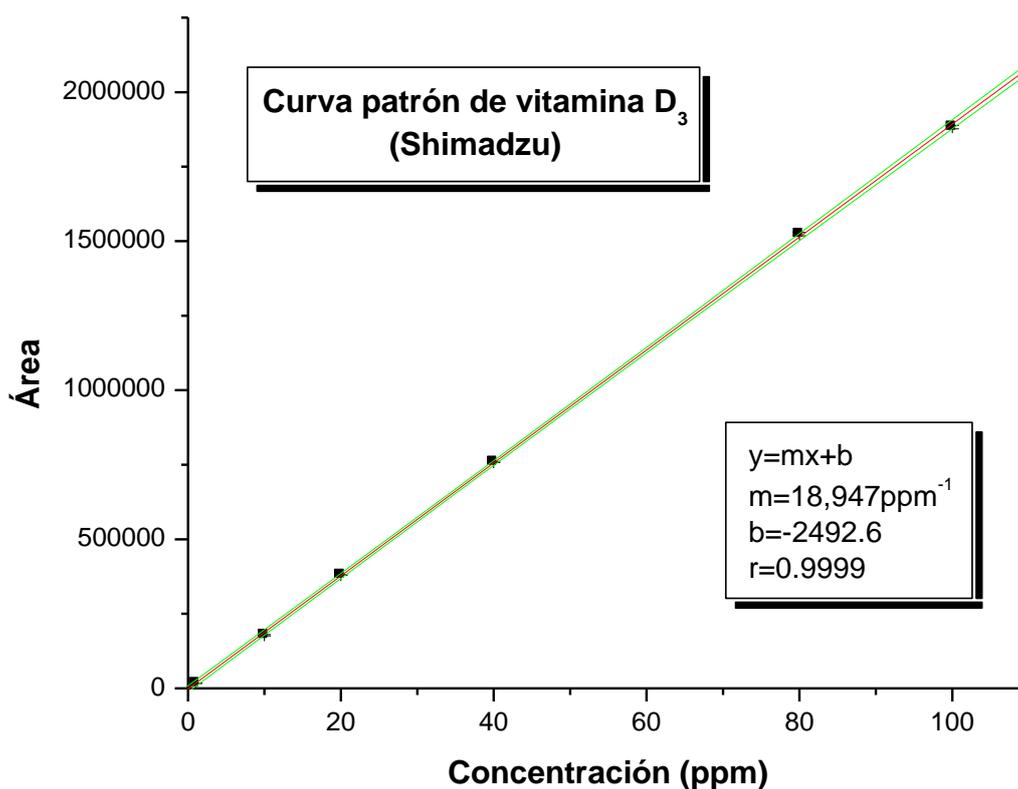
Tabla 4.3.- Resultados obtenidos por el analista 1.



Graficas 4.3.- Curva patrón de vitamina D₃ del analista 1.

ANALISTA 2						
	Áreas					
	Serie A			Serie B		
Conc. (ppm)	1	2	3	1	2	3
0.0	0					
1.0	16545	16685	16634	16756	16863	16685
10.0	178489	180958	180796	176719	176552	176435
20.0	381366	379647	380408	378809	379967	381267
40.0	756148	757371	757827	759895	760054	761418
80.0	1513273	1525453	1528069	1528959	1522618	1522858
100.0	1874511	1880697	1877796	1886713	1889297	1887334

Tabla 4.4.- Resultados obtenidos por el analista 2.



Gráficas 4.4.- Curva patrón de vitamina D₃ del analista 2.

Como los alumnos podrán observar, en los 2 instrumentos se tiene que las curva patrón obtenidas presentan tendencia lineal y tienden al origen (0,0).

Aplicando el procedimiento de la prueba de hipótesis ya explicado en páginas anteriores se obtiene para cada analista los siguientes resultados.

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
$t_{cal.}$	2.11	-1.28
$t_{tablas(0.025,35)}$	2.042	
Rechazo de H_0	$-t_{cal.} < -t_{tablas}$ o $t_{cal.} > t_{tablas}$	
Conclusión.	Se rechaza	No se rechaza
Se incluye el origen.	No	Si
Fórmula a aplicar.	$y=mx+b$	$A=FrC$
IC de la b	$1.35 > 0.71 > 0.06$	$1455.1 > -2492.6 > -6440.3$
IC de la m	$1.20 > 1.19 > 1.18$	$19019.0 > 18947.0 > 18874.9$

Tabla 4.5.- Resultados de las pruebas de hipótesis para la linealidad del sistema para cada analista.

El profesor discutirá con sus alumnos los resultados obtenidos.

Precisión del sistema en los 2 cromatógrafos

A continuación se reportan los datos de las precisiones en cada instrumento.

ANALISTA 1					
	Áreas				
	No. de inyecciones				
No. de réplica	1	2	3	4	5
1	61.2	61.1773	60.9992	61.1582	61.2423
2	60.3472	60.7429	60.5908	60.658	60.9764
3	61.8031	61.2225	60.7939	61.2362	61.3453
4	61.3007	60.6526	60.9705	60.9422	60.835
5	61.2533	60.5875	60.8039	60.8953	61.0164
6	60.1931	59.716	59.8128	59.9092	59.5867
7	59.7069	59.2626	59.1637	59.2571	59.2741

Tabla 4.6.- Resultados obtenidos del analista 1.

ANALISTA 2					
	Áreas				
	No. de inyecciones				
No. de replica	1	2	3	4	5
1	377835	391127	396527	397542	399402
2	406826	410746	410223	410721	409002
3	408855	408206	409821	412179	410152
4	403743	403632	405410	406356	406203
5	407817	407525	410243	406238	408942
6	404479	407005	407661	407576	408754
7	408000	407582	406573	408228	408883

Tabla 4.7.- Resultados obtenidos del analista 2.

Aplicando el procedimiento de la prueba de hipótesis (explicado en páginas anteriores) se obtiene para cada analista los siguientes resultados:

	ANALISTA 1	ANALISTA 2
x	60.59	405714.68
s	0.72	6,534.13
s²	0.51	42,694,923.8
C.V.	1.18%	1.61%
σ²	9.18	411,511,016
χ²_{cal.}	1.9	3.53
χ²_{tablas(0.05,34)}	55.758	
Rechazo de la H₀	$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{tablas}$	
Conclusión al 95%	No se rechaza	No se rechaza
Conclusión al 98%	No se rechaza	No se rechaza
Se cumplen los requisitos de precisión planteados.	Sí	Sí
I.C. sobre la s.	0.58<0.72<0.94	4,755.05<6,534.13<7,255.59

Tabla 4.8.- Resultados de las pruebas de hipótesis para la linealidad del sistema para cada analista.

El profesor concluirá con sus alumnos que los 2 sistemas cromatográficos presentan una buena linealidad y precisión de sistema por lo que son aptos para realizar el análisis cuantitativo de la vitamina D₃.

CAPÍTULO V

Conclusiones

Con respecto al trabajo analítico realizado en la validación del sistema cromatográfico se obtuvieron las siguientes conclusiones, cumpliendo con el primero de los objetivos planteados en este trabajo:

- El sistema presenta una buena linealidad para el intervalo de concentraciones trabajado (1 a 100ppm), y presentan un coeficiente de correlación mayor a 0.98, lo que indica que la variable dependiente (señal) es directamente proporcional a la variable independiente (concentración).
- Al realizar la prueba de hipótesis a la ordenada al origen para la curva de calibración, se obtiene que la ordenada al origen no tiende a cero, y por lo tanto la ecuación para el análisis cuantitativo será la ecuación de formal de una línea recta ($y=mx+b$).
- Se realizó el cálculo del intervalo de confianza a la ordenada y la pendiente de las curvas, lo que permitirá llevar un adecuado control de calidad en el sistema lineal que se obtenga periódicamente.
- El sistema demostró ser preciso con un error máximo del 5% (o una precisión mínima de 95%), por lo que se cumple perfectamente con la precisión mínima recomendada al desarrollar metodologías con las técnicas instrumentales que es del 5%. Además el sistema cumple aún lo planteado por la industria farmacéutica que es del 2% (se obtuvo 1.18%).

En cuanto a la comparación entre los dos sistemas cromatográficos Knauer y Shimadzu se concluye que:

- Los 2 sistemas presentan una buena linealidad para realizar el análisis cuantitativo de vitamina D₃. Aunque la diferencia sería en la ecuación a utilizar para realizar dicho análisis cuantitativo, para el sistema Shimadzu el análisis cuantitativo se realizará mediante la ecuación del estándar externo indicada para la cromatografía $A=FrC$, mientras que el sistema Knauer debe realizarse utilizando la ecuación matemática de la recta $y=mx+b$.
- Se encontró que ambos sistemas son precisos para el análisis de la vitamina D₃ con una precisión mayor del 98%, o un error mínimo del 2%.

En cuanto a la parte educativa se cumplieron los objetivos planteados:

- Se tienen los datos obtenidos durante este trabajo para la validación de los sistemas de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia. Con lo que el profesor podrá proporcionar la información a los alumnos tanto para trabajar en clase con la explicación y guía de él, como el proceso que entregarán posteriormente los alumnos para confirmar que entendieron la metodología enseñado.

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

- Los cromatógrafos de líquidos que se utilizaron para este estudio y que se tienen en el laboratorio 3F, permiten realizar el análisis de la vitamina D₃ y su cuantificación, con una buena linealidad y precisión.
- Por lo tanto se puede realizar el análisis de la vitamina D₃ en matrices reales con confiabilidad en los resultados obtenidos por los sistemas instrumentales mencionados.

- Se puede trabajar con la información obtenida por parte de los alumnos con la guía del profesor para que éstos entiendan tanto el proceso cualitativo y cuantitativo, y las conclusiones que se obtienen al explotar la información de la técnica utilizada en este trabajo.

CAPÍTULO VI

Bibliografía

- 1.- Zempleni, J. & cols. Handbook of Vitamins. CRC Press by Tylor &Francis Group. 4th edition. USA, 2007.
- 2.- Chavarría Cano, J.C. Validación del cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia de Lab. 3F para el análisis de vitamina D₃. Tesis de licenciatura. FQ. UNAM, México, 2010.
- 3.- Food and Agriculture Organization (FAO).
<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/Ah833s19.htm> (Fecha de consulta: diciembre 2012).
- 4.- Ran Zhang. Vitamin D in health and disease: Concurrent perspectives. Nutrition Journal. 9:65, 38
- 5.- Kazmi et all. Vitamin D₃ fortification and quantification in processed dairy products. International Dairy Journal. 17, (2007), 753-759.
- 6.- Christel Lamberg-allardt. Vitamin D in foods and as supplements. ELSEVIER. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 92, (2006), 33-2010
- 7.- Phillips et all. Development and validation of materials for the measurement of vitamin D₃ in selected US foods. ELSEVIER. Journal of Food Composition and Analysis. 21, (2008), 527-534.
- 8.- Shan et all. Method for simultaneous analysis of eight analogues of vitamin D using liquid chromatography tandem spectrometry. Chemistry Central Journal 6:112, 2012.
- 9.- NOM-131-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/131ssa15.html> (fecha de consulta: noviembre 2012).
- 10.- Daniel C. Harris. Análisis Químico Cuantitativo. Ed. Reverté, S.A. 2ª Edición, 2001.
- 11.- González Covarrubias L.R., Validación del Método de separación de la vitamina K por medio de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Tesis de licenciatura. FQ. UNAM, México, 2011.
- 12.- James N Miller, Jane C Miller., Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Ed. Prentice Hall, 4ª. Edición, Madrid 2002.

13.- Olmos Sanabria M., Desarrollo de una práctica para enseñar el proceso de validación de la técnica de cromatografía de gases para el análisis de fenoles contaminantes. Tesis de licenciatura. FQ. UNAM, México, 2012.

14.- U.S. Food and Drugs Administration (USFDA), <http://www.fda.gov> (fecha de consulta: noviembre 2012).

15.- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), <http://www.semarnat.gob.mx> (fecha de consulta: noviembre 2012).

ANEXO I

Tabla A1.- Datos y resultados para la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de la linealidad incluyendo al cero (Knauer).

Concentración (ppm)	Área	XX	YY	XY		
0	0	0	0	0	n	37
0.9984	1.11593	0.99680256	1.24529976	1.11414451	x	41.3121
0.9984	1.11701	0.99680256	1.24771134	1.11522278	Sxx	1945873.4
0.9984	1.09951	0.99680256	1.20892224	1.09775078	Syy	2767725.13
0.9984	1.101	0.99680256	1.212201	1.0992384	Sxy	2180800.45
0.9984	1.10819	0.99680256	1.22808508	1.1064169	Se	1.2902
0.9984	1.10267	0.99680256	1.21588113	1.10090573	Datos de regresión lineal	
9.984	11.9336	99.680256	142.410809	119.145062		
9.984	11.9219	99.680256	142.1317	119.02825	m	1.2
9.984	12.0374	99.680256	144.898999	120.181402	b	0.7
9.984	11.7589	99.680256	138.271729	117.400858	r	0.9997
9.984	11.8017	99.680256	139.280123	117.828173	tcal	2.11
9.984	11.8598	99.680256	140.654856	118.408243	g.l.	35
19.968	25.2648	398.721024	638.310119	504.487526	ttab	2.042
19.968	25.7255	398.721024	661.80135	513.686784	Conclusión:	
19.968	25.1594	398.721024	632.995408	502.382899	Se rechaza la hipótesis nula, la linealidad no tiende al origen.	
19.968	24.8605	398.721024	618.04446	496.414464	Por lo tanto se utiliza la ecuación de la recta para realizar el análisis cuantitativo $Y=mx+b$	
19.968	24.7563	398.721024	612.87439	494.333798		
19.968	24.5984	398.721024	605.081283	491.180851		
39.936	49.8966	1594.8841	2489.67069	1992.67062		
39.936	49.7549	1594.8841	2475.55007	1987.01169		
39.936	49.6327	1594.8841	2463.40491	1982.13151		
39.936	48.8248	1594.8841	2383.8611	1949.86721		
39.936	48.6999	1594.8841	2371.68026	1944.87921		
39.936	48.7907	1594.8841	2380.53241	1948.5054		
79.872	98.7285	6379.53638	9747.31671	7885.64275		
79.872	99.3916	6379.53638	9878.69015	7938.60588		
79.872	97.6501	6379.53638	9535.54203	7799.50879		
79.872	96.5225	6379.53638	9316.59301	7709.44512		
79.872	96.3521	6379.53638	9283.72717	7695.83493		
79.872	96.394	6379.53638	9291.80324	7699.18157		
104	122.953	10816	15117.4402	12787.112		
104	123.016	10816	15132.9363	12793.664		
104	122.746	10816	15066.5805	12765.584		
104	122.884	10816	15100.4775	12779.936		
104	123.332	10816	15210.7822	12826.528		
104	122.953	10816	15117.4402	12787.112		

Tabla A2.- Datos y resultados para la prueba de la regresión lineal sin incluir el cero (Knauer).

Concentración (ppm)	Área	XX	YY	XY	n	36
0.9984	1.11593	0.99680256	1.24529976	1.11414451	x	42.4597
0.9984	1.11701	0.99680256	1.24771134	1.11522278	Sxx	1830134.48
0.9984	1.09951	0.99680256	1.20892224	1.09775078	Syy	2600736.99
0.9984	1.101	0.99680256	1.212201	1.0992384	Sxy	2180800.45
0.9984	1.10819	0.99680256	1.22808508	1.1064169	Se	1.303
0.9984	1.10267	0.99680256	1.21588113	1.10090573	Datos de regresión lineal	
9.984	11.9336	99.680256	142.410809	119.145062		
9.984	11.9219	99.680256	142.1317	119.02825	m	1.2
9.984	12.0374	99.680256	144.898999	120.181402	b	0.7
9.984	11.7589	99.680256	138.271729	117.400858	r	0.9995
9.984	11.8017	99.680256	139.280123	117.828173	I.C. de b	
9.984	11.8598	99.680256	140.654856	118.408243	+	1.3484
19.968	25.2648	398.721024	638.310119	504.487526	-	0.0633
19.968	25.7255	398.721024	661.80135	513.686784	I.C. de m	
19.968	25.1594	398.721024	632.995408	502.382899	+	1.2035
19.968	24.8605	398.721024	618.04446	496.414464	-	1.1796
19.968	24.7563	398.721024	612.87439	494.333798		
19.968	24.5984	398.721024	605.081283	491.180851		
39.936	49.8966	1594.8841	2489.67069	1992.67062		
39.936	49.7549	1594.8841	2475.55007	1987.01169		
39.936	49.6327	1594.8841	2463.40491	1982.13151		
39.936	48.8248	1594.8841	2383.8611	1949.86721		
39.936	48.6999	1594.8841	2371.68026	1944.87921		
39.936	48.7907	1594.8841	2380.53241	1948.5054		
79.872	98.7285	6379.53638	9747.31671	7885.64275		
79.872	99.3916	6379.53638	9878.69015	7938.60588		
79.872	97.6501	6379.53638	9535.54203	7799.50879		
79.872	96.5225	6379.53638	9316.59301	7709.44512		
79.872	96.3521	6379.53638	9283.72717	7695.83493		
79.872	96.394	6379.53638	9291.80324	7699.18157		
104	122.953	10816	15117.4402	12787.112		
104	123.016	10816	15132.9363	12793.664		
104	122.746	10816	15066.5805	12765.584		
104	122.884	10816	15100.4775	12779.936		
104	123.332	10816	15210.7822	12826.528		
104	122.953	10816	15117.4402	12787.112		

Tabla A3.- Datos y resultados para la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de la linealidad (Shimadzu).

Concentración (ppm)	Área	XX	YY	XY		
0	0	0	0	0	n	37
1	16545	1	273737025	16545	x	40.7
1	16685	1	278389225	16685	Sxx	1839186
1	16634	1	276689956	16634	Syy	6.60E+14
1	16756	1	280763536	16756	Sxy	2.77E+10
1	16863	1	284360769	16863	Se	7869
1	16685	1	278389225	16685	Datos de la regresión lineal	
10	178489	100	3.1858E+10	1784890	b	-2492.6
10	180958	100	3.2746E+10	1809580	m	18947
10	180796	100	3.2687E+10	1807960	r	0.09999
10	176719	100	3.123E+10	1767190	tcal	-1.28
10	176552	100	3.1171E+10	1765520	g.l	35
10	176435	100	3.1129E+10	1764350	ttab	2.042
20	381366	400	1.4544E+11	7627320	Conclusión:	
20	379647	400	1.4413E+11	7592940	No se rechaza la hipótesis nula por lo tanto la linealidad tiende al origen.	
20	380408	400	1.4471E+11	7608160	Por lo tanto se utiliza la ecuación del método del estándar externo para realizar el análisis cuantitativo $A=Fr \cdot C$	
20	378809	400	1.435E+11	7576180	I.C. de b	
20	379967	400	1.4437E+11	7599340	+	1455.15
20	381267	400	1.4536E+11	7625340	-	-6440.35
40	756148	1600	5.7176E+11	30245920	I.C. de m	
40	757371	1600	5.7361E+11	30294840	+	19019.07
40	757827	1600	5.743E+11	30313080	-	18874.92
40	759895	1600	5.7744E+11	30395800		
40	760054	1600	5.7768E+11	30402160		
40	761418	1600	5.7976E+11	30456720		
80	1513273	6400	2.29E+12	121061840		
80	1525453	6400	2.327E+12	122036240		
80	1528069	6400	2.335E+12	122245520		
80	1528959	6400	2.3377E+12	122316720		
80	1522618	6400	2.3184E+12	121809440		
80	1522858	6400	2.3191E+12	121828640		
100	1874511	10000	3.5138E+12	187451100		
100	1880697	10000	3.537E+12	188069700		
100	1877796	10000	3.5261E+12	187779600		
100	1886713	10000	3.5597E+12	188671300		
100	1889297	10000	3.5694E+12	188929700		
100	1887334	10000	3.562E+12	188733400		

Tabla A4.- Datos y resultados de la prueba hipótesis sobre la precisión del sistema (Knauer), así como los intervalos de confianza.

Réplica	Áreas					Media (X)	s	CV
	1	2	3	4	5			
1	61.2	61.1773	60.9992	61.1582	61.2423	61.1554	0.09277211	0.15169897
2	60.3472	60.7429	60.5908	60.658	60.9764	60.66306	0.22889464	0.3773213
3	61.8031	61.2225	60.7939	61.2362	61.3453	61.2802	0.3603524	0.5880405
4	61.3007	60.6526	60.9705	60.9422	60.835	60.9402	0.23699322	0.38889472
5	61.2533	60.5875	60.8039	60.8953	61.0164	60.91128	0.24730912	0.40601531
6	60.1931	59.716	59.8128	59.9092	59.5867	59.84356	0.22895502	0.38258924
7	59.7069	59.2626	59.1637	59.2571	59.2741	59.33288	0.21368774	0.36015064

media	60.5895114	
s	0.7163823	
C.V. exp.	1.182	
n	35	
s ²	0.5132036	
C.V. teórico	5%	2%
σ teórico	3.02947557	1.21179023
σ^2	9.17772224	1.46843556
n-1	34	34
(n-1) s ²	17.4489226	17.4489226
(n-1) s ² / σ^2	1.90122583	11.8826614
$\chi^2_{cal.}$	1.90122583	11.8826614
χ^2_{tablas}	48.6024	48.6024
Criterio de rechazo:	$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{tablas}$	
Conclusión	H ₀ se acepta	H ₀ se acepta
El sistema es preciso a un 95% de confianza.		
Intervalo de confianza sobre la desviación estándar al 5% de C.V.	0.58<0.72<0.94	

Tabla A5.- Datos y resultados de la prueba hipótesis sobre la precisión del sistema (Shimadzu), así como los intervalos de confianza.

Réplica	Áreas					Media (x)	s	C.V.
	1	2	3	4	5			
1	377835	391127	396527	397542	399402	392486.6	8749.60789	2.22927557
2	406826	410746	410223	410721	409002	409503.6	1655.61931	0.40429909
3	408855	408206	409821	412179	410152	409842.6	1517.29803	0.37021482
4	403743	403632	405410	406356	406203	405068.8	1311.6641	0.32381267
5	407817	407525	410243	406238	408942	408153	1513.69796	0.37086533
6	404479	407005	407661	407576	408754	407095	1593.389	0.39140471
7	408000	407582	406573	408228	408883	407853.2	856.588408	0.21002371

media	405714.686	
s	6534.13528	
C.V. exp.	1.611	
n	35	
s ²	42694923.8	
C.V. teórico	5%	2%
σ teórico	20285.7343	8114.29371
σ^2	411511016	65841762.5
n-1	34	34
(n-1) s ²	1451627410	1451627410
(n-1) s ² / σ^2	3.5275542	22.0472137
$\chi^2_{cal.}$	3.5275542	22.0472137
χ^2_{tablas}	48.6024	48.6024
Criterio de rechazo:	$\chi^2_{calculada} > \chi^2_{tablas}$	
Conclusión	H ₀ se acepta	H ₀ se acepta
El sistema es preciso en un 95% de confianza.		
Intervalo de confianza sobre la desviación	4,755.05<6,534.13<7,255.59	