



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE
ANÁLISIS DE VITAMINA A EN HÍGADO
DE RES POR CROMATOGRFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA
(CLAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

SUSANA IVETT MARTÍNEZ SÁMANO



MÉXICO, D. F.

2005



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

m345271



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.

... a la Dirección General de Simulacros de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Martínez Sámano Susana

Ivett

FECHA: 10 JUNIO 2005

FIRMA: 

Jurado asignado:

- Presidente Profa. Ernestina Cervera Flores
- Vocal Prof. Francisco Rojo Callejas
- Secretario Prof. Adolfo García Osuna
- 1^{er}. Suplente Profa. Lucía Cornejo Barrera
- 2^o. Suplente Profa. María de Lourdes Osnaya Suárez

Sitio en el que se desarrolló el tema

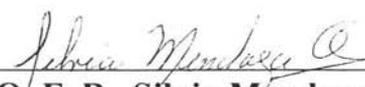
Departamento de Química Analítica
Edificio "A" Laboratorio 3-B y 3-F.
Facultad de Química, Cd. Universitaria.

Asesor del tema



Q. Adolfo García Osuna

Supervisor técnico



Q. F. B. Silvia Mendoza Arellano

Sustentante



Susana Ivett Martínez Sámano

AGRADECIMIENTOS

El inicio y el final de una etapa de tu vida siempre son importantes y más cuando se tiene tu fe y dedicación puestos en ella.

A Dios por permitirme llegar a esta meta.

A mis padres Susana y Rafael por haber elegido traerme a este mundo; también por el esfuerzo y paciencia que me han dedicado, por su apoyo y comprensión y por dejarme volar para alcanzar mis sueños. ¡Los quiero mucho!

A mis hermanos, quienes han sido tolerantes conmigo, gracias por su apoyo.

A mi asesor Adolfo García Osuna por confiar en mí, por haber hecho posible varios de mis sueños, por su amistad, consejos, apoyo, paciencia y empeño por transmitirme sus conocimientos.

A mi asesora técnica Silvia Mendoza Arellano por su amistad, apoyo, consejos y por permitirme aprender de ella.

A mis amigos que fueron, que son y que serán, por su compañía en este camino y a todos los que día a día nos damos la mano para ir construyéndolo. Especialmente a Tonantzin, Adriana, Elizabeth y Odemarís por su amistad, compañía, sonrisas y tolerancia para conmigo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que me brindó. Por mi raza hablará el espíritu.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
ANTECEDENTES	
VITAMINA A	
- GENERALIDADES	3
- FUNCIONES	4
- DIGESTIÓN, ABSORCIÓN Y METABOLISMO	6
- DEFICIENCIA	8
- EXCESO	9
- REQUERIMIENTOS	9
- FUENTES	10
ANÁLISIS DE VITAMINA "A" EN ALIMENTOS	12
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA	15
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	26
VALIDACIÓN DE MÉTODOS	31
METODOLOGÍA	41
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
- LINEALIDAD DE SISTEMA	61
- PRECISIÓN DE SISTEMA	64
- PRECISIÓN DEL MÉTODO	69
- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	83
- RECOBRO	86
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXO 1	93
ANEXO 2	108

INTRODUCCIÓN

Desde hace tiempo se sabe que la deficiencia de vitamina A es un problema de salud pública en el mundo y sobre todo en los países en desarrollo, pues su carencia ocasiona trastornos en el crecimiento, ceguera nocturna, xeroftalmia y resequedad en la piel, el consumo de cantidades elevadas de esta vitamina produce toxicidad. Por lo anterior la determinación de esta vitamina es de importancia en la nutrición y en la calidad de los alimentos, dado que se requiere de alimentos que contengan una cantidad adecuada de vitamina A y con ello un método de análisis que lleve a obtener resultados validos y confiables. Además la creciente tendencia hacia la globalización del comercio mundial ha estimulado el interés en el desarrollo de sistemas de calidad para el análisis de alimentos. Mientras esta tendencia se orienta para asegurar básicamente una mejor protección al consumidor, también ayudará a desarrollar una base para el establecimiento de acuerdos comerciales entre los países y al mismo tiempo, mejorar la estructura internacional para resolver problemas de seguridad alimentaria y de comercialización del producto.

Actualmente se utiliza el método general publicado por la Asociación Oficial de Químicos Analistas, 1995 (AOAC por sus siglas en inglés *Assotiation of Oficial Analytical Chemist*), realizando una determinación colorimétrica, pero la complejidad y tiempos largos del análisis, además de las cantidades grandes de material y reactivos que se utilizan, hacen que sea poco aplicable para análisis de rutina.

Debido a las dificultades que presenta un análisis de la vitamina A por encontrarse distribuida en los alimentos en diferentes formas (derivados) y su inestabilidad durante la extracción, ha sido tema de estudio en las diferentes técnicas de extracción, y con la falta de un método específico para cada alimento, hace que existan algunas diferencias en los valores reportados en la literatura y esto nos lleva al estudio de la optimización de un método de análisis para un producto en específico. Asimismo, se busca disminuir las cantidades de muestra, reactivos y tiempo de análisis.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE por sus siglas en español) es una técnica óptima para realizar el análisis de vitamina A como retinol y sus diferentes derivados. En el caso del retinol, se cuenta con una técnica validada para la cuantificación de vitamina A en el laboratorio 3F del Departamento de Química Analítica/Facultad de Química, demostrando que se tiene un método cuantitativo con buena resolución, linealidad, precisión, repetibilidad y

reproducibilidad, permitiendo cuantificarla en forma más rápida que otros procedimientos utilizados para la determinación de vitamina A como retinol.

Hoy resulta evidente que los aspectos tradicionales de normalización alimentaria, calidad, aprobación de los criterios de composición y etiquetado han vuelto una vez más a estar en primer plano, por lo que este trabajo tiene como objetivo optimizar las condiciones de la extracción de vitamina A (como retinol) en hígado de res por medio de una técnica que implica una hidrólisis alcalina, extracción líquido-líquido, purificación y concentración, que permita además disminuir las cantidades de muestra, reactivos y disolventes que normalmente se utilizan y aplicar en las etapas en las que fuera posible la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS por sus siglas en español) que es una de las nuevas técnicas de preparación de muestras que actualmente se busca aplicar en las metodologías modernas. Para los estudios cualitativos y cuantitativos obtenidos por dicha técnica de extracción de la vitamina A se aplica la técnica validada de CLAE. Además el método se valida en cuanto a su precisión como repetibilidad y reproducibilidad, estudio de estabilidad del extracto obtenido y realizando el estudio de recobro. Se elige al hígado de res por ser una matriz muy compleja por su composición y de la que no se tienen reportes bibliográficos de la extracción con la determinación cromatográfica de la vitamina A como retinol total.

OBJETIVOS

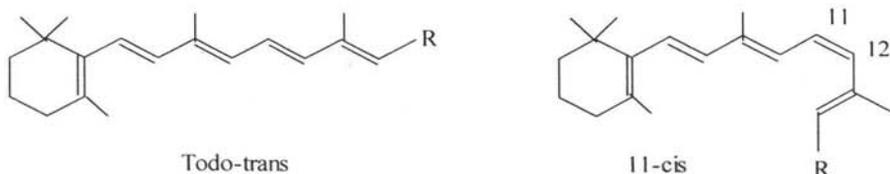
- Conocer los principios teóricos, el funcionamiento y manejo de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés).
- Desarrollar una metodología de extracción de la vitamina A como retinol y encontrar las condiciones óptimas para realizar ésta en hígado de res, realizando el análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos obtenidos por CLAE.
- Se buscará utilizar cantidades menores a las empleadas oficialmente tanto de muestra, reactivos y disolventes, lo que permitirá realizar la determinación de forma segura, tanto para el ambiente como para el analista.
- Adicionar en las etapas de la metodología desarrollada en donde sea posible la técnica de Extracción en Fase Sólida.
- Validar la metodología desarrollada para el análisis de vitamina A en hígado de res.

ANTECEDENTES

VITAMINA "A"

Generalidades^{3, 5, 6, 8}

La vitamina A es un alcohol cuya estructura es una cadena lateral con dobles ligaduras conjugadas unida a un ciclohexeno con metilos sustituyentes. La vitamina A puede presentarse en forma de alcohol (retinol), aldehído (retinal) o como ácido (ácido retinoico) ya sea en forma libre o esterificado con un ácido graso (por ejemplo, el palmitato de vitamina A). También la podemos encontrar como β -caroteno en los vegetales, la cual es una estructura compuesta por dos moléculas de retinol unidas entre sí. La presencia de dobles ligaduras hace posible la existencia de isómeros, pueden presentarse en forma trans, cis o cis-trans.



El grupo R puede ser:

CH ₂ OH	retinol
CH ₂ OCOCH ₃	acetato de retinilo
CH ₂ OCO(CH ₂) ₁₄ CH ₃	palmitato de retinilo
CHO	retinal
COOH	ácido retinoico

Fig. 1. Formas de vitamina A.

La vitamina A como retinol se presenta como cristales amarillos, solubles en solventes polares como metanol y etanol, así como en cloroformo, éter, grasas y aceites; es insoluble en agua o glicerol. Presenta absorción en la región ultravioleta del espectro electromagnético alrededor de los 325-330nm, la máxima absorción depende del disolvente utilizado, por ejemplo, en ciclohexano la máxima absorción es 328nm y en isopropanol es 326nm; también presenta fluorescencia a los 470-490nm. Los ésteres de retinol tienen las mismas características de solubilidad que el retinol libre.

Los carotenoides actúan como provitaminas o precursores de la vitamina A, son sustancias amarillas que existen en muchas sustancias vegetales. En algunos alimentos su color puede estar enmascarado por la clorofila, pigmento verde que con frecuencia se encuentra en íntima asociación con los carotenos y en general registran absorción en la región visible del espectro electromagnético. De casi los seiscientos carotenoides aislados en la naturaleza sólo unos cincuenta muestran actividad provitamina A, siendo el más activo, y cuantitativamente más importante, el β -caroteno.

En cuanto a estabilidad, la vitamina A, así como sus precursores, es una de las vitaminas más lábiles, tiene punto de ebullición de 62-64°C. Al ser un hidrocarburo insaturado, es susceptible a la isomerización, particularmente a pH ácidos en un medio acuoso, sensible a la oxidación, especialmente a temperaturas elevadas; este proceso se acelera considerablemente en presencia de catalizadores; como enzimas y metales de transición, con la radiación UV y en sistemas con actividad acuosa baja, es decir, se ve afectada por lo mismos factores que ocasionan la degradación de las grasas insaturadas en el mecanismo de auto-oxidación. La vitamina A está disponible comercialmente como una preparación que incluye antioxidantes como BHA (butilhidroxi-anisal), BHT (butilhidroxi-tolueno), galatos o vitamina E, los cuales estabilizan las preparaciones de vitamina A.

Funciones^{1, 4, 7, 9, 10}

Generalmente tiene tres funciones: (1) en el ciclo de la visión, (2) regulador del metabolismo de células epiteliales y (3) viabilidad del sistema de reproducción, entre otras.

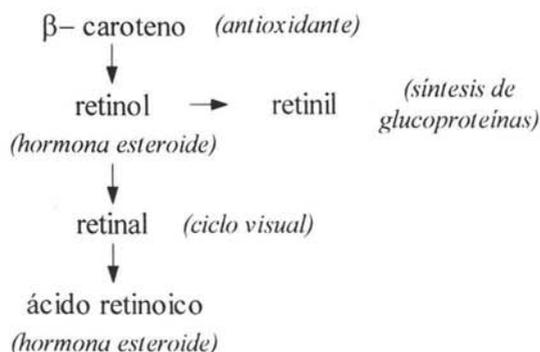


Fig. 2. Diagrama de funciones de vitamina A.¹⁰

La vitamina A es un componente importante de la púrpura visual de la retina, ya que participa en la formación de la rodopsina en el ojo, sin ella tiene lugar la ceguera nocturna. Se ha demostrado que en la retina existen pigmentos sensibles a la luz que contienen rodopsina, que es una combinación de un isómero cis de vitamina A aldehído y la proteína opsina, el trans-retinol es isomerizado a 11-cis-retinal. En la oscuridad el retinal se recombina con la opsina para producir rodopsina para iniciar el ciclo nuevamente.

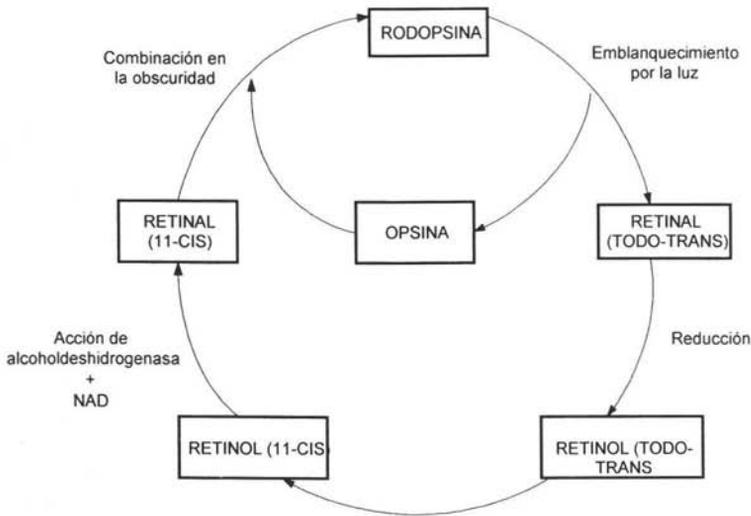


Fig. 3. El ciclo de la rodopsina-vitamina A.¹

En las células epiteliales que cubren las superficies o cavidades corporales, tractos respiratorio, urogenital, digestivo y la piel, se requiere vitamina A para su mantenimiento y funcionamiento, pues la vitamina A interviene en la síntesis de mucosa al formar retinilfosfato necesario para la síntesis de mucopolisacáridos, además de que evitan la síntesis de formas de queratina las cuales pueden ocasionar rigidez en dichos tejidos.

Se ha demostrado que la vitamina A y los carotenoides, son eficaces en el tratamiento y la prevención de las diversas enfermedades cutáneas como la fotosensibilidad (alergia al sol), así como el fortalecimiento del sistema inmune.

Otra función para la vitamina A es el crecimiento especialmente la regulación del crecimiento de los huesos durante la remodelación ósea.

En cuanto al sistema de reproducción parece actuar sobre la espermatogénesis, al menos en animales, habiéndose observado con ratas. También interfiere en el ciclo menstrual, desarrollo de la placenta y otros aspectos de la reproducción femenina, aunque es poco lo que se conoce sobre los sucesos implicados. Asimismo favorece la producción de progesterona, precursores de andrógenos y estrógenos.

La vitamina A y el β -caroteno protegen a las membranas y otras estructuras celulares del daño provocado por los radicales libres y por el oxígeno singulete. Pueden inhibir la oxidación excesiva de los lípidos de las células, aunque la capacidad de antioxidante de la vitamina A y el β -caroteno es diferente ya que este último tiene mayor afinidad por el oxígeno singulete y los radicales libres.

Digestión, Absorción y Metabolismo^{7,9,12}

La vitamina A al ser una vitamina liposoluble su absorción está en función de la digestión y absorción de los lípidos, por lo que se encontrará dispersa en micelas que se forman durante la absorción de las grasas.

En el estómago se lleva a cabo la descarga de los lípidos los cuales se mezclan con la bilis y secreciones pancreáticas. La emulsificación se lleva a cabo en la parte superior del intestino delgado donde son descargadas las sales biliares donde su acción detergente da lugar a micelas donde se encontrará la vitamina A, dichas esferas tienen de 5-10 μ m de diámetro⁷; este tamaño de partícula brinda una mayor superficie para la acción de las esterasas (lipasas) para hidrolizar el enlace éster al consumir la vitamina A como éster de retinil. La vitamina A libre se incorpora a las micelas de los lípidos y llega a las microvellosidades del yeyuno donde se transfiere a la célula de la mucosa, a través del transporte activo como retinol. Dentro de la célula de la mucosa, se reesterifica y se incorpora a los quilomicrones por lo que se hace más soluble y es transportado por el torrente sanguíneo hacia el hígado, donde se reesterifica con ácido palmítico u otros ácidos grasos y es almacenado, o bien son enviados al plasma como complejo con una proteína hacia otros tejidos. Mientras que el β -caroteno también se absorbe por medio de micelas, después se une a proteínas para dividirse dentro de la células de la mucosa intestinal por medio de una enzima dioxigenasa a retinal, y ésta por medio de una dehidrogenasa a retinol y éste es esterificado.

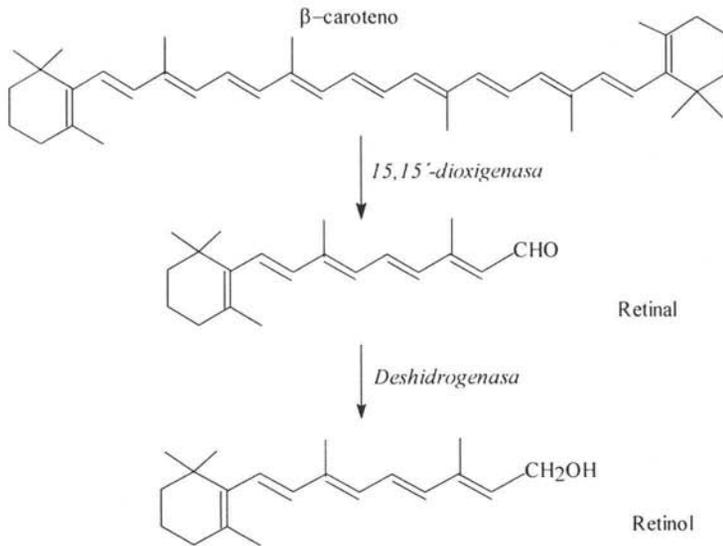


Fig. 4. Conversión de β-caroteno a retinol.⁹

Existen varios factores que actúan sobre la absorción de la vitamina A, así cualquier circunstancia que impida la digestión y la absorción de la grasa dificulta la absorción de la vitamina A; por ello una dieta pobre en grasa altera la capacidad de absorción de la vitamina y la provitamina. También, la capacidad de absorción de la vitamina varía entre cada especie al igual que la capacidad de conversión de β-caroteno en vitamina A, lo que probablemente se debe a la presencia o ausencia en la sangre de proteínas específicas que puedan formar los complejos que permitan su absorción.

En el caso de que los tejidos necesiten del retinol, el éster de retinil es convertido en retinol, el cual es transportado a través de la sangre unido a una proteína llamada APO-RBP (Retinol Binding Protein). Se origina así la holo-RBP que se procesa en el aparato de Golgi de las células hepáticas y se secreta al plasma. Los tejidos son capaces de captarla por medio de receptores de superficie. Una vez dentro de los tejidos, excepto el hepático, el retinol se une a la proteína fijadora de retinol o CRBP (Cellular Retinol Binding Protein). La RBP es una proteína sensible a la deficiencia de zinc y de proteínas (por desnutrición o kwashiorkor); por lo que si el aporte de estos nutrientes es escaso, la concentración de proteína de unión a retinol se hace insuficiente y se podría presentar un cuadro de deficiencia de vitamina A aunque su aporte sea el adecuado.

Deficiencia (Avitaminosis) ^{1, 4, 7, 12}

La deficiencia de vitamina A se encuentra almacenada en el hígado, por lo que la deficiencia aparece después de periodos prolongados de ingestión inadecuada; y tiene consecuencias en la salud humana y animal.

1. El primer síntoma de deficiencia es la ceguera nocturna; al intervenir en la regeneración de la rodopsina, la falta de ella implica la ausencia del ciclo fisiológico de la visión. También afecta a la córnea produciendo manchas blancas opacas, anomalía conocida como manchas de Bitot y en etapas avanzadas causa ceguera total lo cual es parte de la xeroftalmia.
2. La deficiencia de vitamina A afecta al crecimiento, ya que forma parte en la formación de nuevas células. Interviene en la formación del hueso, la vitamina A es necesaria para la liberación de lisosomas, responsables de la ruptura de la estructura proteínica del hueso; esta ruptura precede a la formación de nueva estructura ósea. Por ello, la deficiencia tiene como resultado una estructura anormal del hueso causada por un desequilibrio entre la descomposición y síntesis del hueso. Una de las lesiones mejor conocidas debidas a la deficiencia de vitamina A en el ganado en condiciones de pastoreo es un crecimiento desorganizado del hueso. La malformación de los huesos del cráneo en el ganado joven puede comprimir el nervio óptico, produciendo ceguera; o bien lesionar el nervio auditivo produciendo sordera.
3. La deficiencia de vitamina A causa queratinización de las células epiteliales del organismo, perdiendo sus cilios y progresivamente su capacidad para segregar mucus. El tejido queratinizado en el tracto respiratorio de los animales que tienen avitaminosis A aumenta la susceptibilidad a infecciones, al no tener protección el tracto puede ser invadido por microorganismos patógenos. La queratinización del tracto alimenticio produce diarrea, causa formación de cálculos en el riñón y en la vejiga, por la dificultad de eliminar orina. Se cree que el efecto de la avitaminosis A sobre la reproducción se debe a la queratinización de los tejidos epiteliales del aparato reproductor ocasionando dificultad en la reproducción, que incluyen abortos y nacimiento de crías débiles, y se asocia con un engrosamiento del epitelio vaginal, fallas reproductivas en machos debido a efectos sobre el epitelio espermatogénico.

4. Una alteración en la piel causada por una deficiencia de vitamina A en la dieta es la foliculosis, producida cuando las erupciones en la base del folículo piloso producen una queratinización local; y como consecuencia la piel se vuelve reseca y áspera.
5. Afecta a la gluconeogénesis y en la biosíntesis de los esteroides suprarrenales y del glucógeno.

Exceso (Hiperavitaminosis)^{1, 4, 12}

Esta enfermedad se caracteriza por una gran variedad de síntomas que incluyen fatiga, malestar abdominal, dolor óseo y articular, insomnio, intranquilidad, pérdida de pelo, huesos quebradizos y dolores de cabeza intensos.

Los síntomas pueden ser muy parecidos a los causados por la deficiencia, lo que se puede deber a que en ambos casos existe una alteración en los lisosomas, que contienen a muchas enzimas hidrolíticas. Los primeros síntomas de un consumo excesivo de vitamina A son comezón y sequedad en la piel que pueden manifestarse con dosis de 20,000UI al día.

Los síntomas como debilidad y malestar general pueden indicar alteraciones a cargo del sistema nervioso central que se observan después de mucho tiempo dosis de 50,000-100,000UI al día.

Requerimientos^{1, 4, 7, 9}

Los requerimientos de esta vitamina, así como de otros nutrientes, se van a ver modificados por varios factores, como el crecimiento, la edad, el aporte calórico, el gasto físico y situaciones especiales como es el embarazo o lactancia, así como el lugar de residencia (país). Por otra parte, las diferencias en las cantidades de vitamina A recomendadas también son consideradas a partir de las diferentes apreciaciones sobre la proporción de vitamina A y caroteno en una dieta y de diferentes interpretaciones de eficiencia de conversiones del caroteno en vitamina A. Además, los requerimientos de Vitamina A están influenciados por la cantidad de proteína en la dieta, al ingerir una cantidad inadecuada de proteína disminuye la eficiencia de la absorción, transporte y metabolismo del retinol. Con lo anterior, en México el requerimiento es de 300 µg de retinol/100 Kcal (INN Salvador Z.).

Tabla 1. Ingestión diaria recomendada (IDR) para México (1997).

Edad	Vitamina A en μg (ER)
Niños	
0-3 meses	400
3-6 meses	400
6-12 meses	400
1-3 años	400
3-7 años	500
7-10 años	700
Adultos	
hombres	1,000
mujeres	1,000
-	1,000
embarazadas	1,300
-lactancia	

Fuente: INN "Salvador Zubirán".

En cuanto a las unidades de actividad de la vitamina A, la unidad más conveniente a utilizar son los equivalentes de retinol (ER), por lo tanto:

$$1 \text{ ER} = 1\mu\text{g retinol} = 3.3 \text{ UI}$$

Y en cuanto a las equivalencias con el β -caroteno:

$$1\mu\text{g retinol} = 6\mu\text{g de } \beta\text{-carotenos} = 12\mu\text{g de otros carotenoides}$$

con lo anterior, tenemos que:

$$1 \text{ UI de vitamina A} = 0.3\mu\text{g de retinol} = 0.344\mu\text{g de acetato de retinilo}$$

$$1\mu\text{g } \beta\text{-caroteno} = 0.167\mu\text{g retinol y } 1\mu\text{g de otros carotenoides} = 0.084\mu\text{g retinol}$$

Fuentes

La vitamina A como retinol se encuentra solamente en tejidos animales. El hígado de res es el más rico en todos, ya que es el lugar donde se almacena la vitamina, también se encuentra en la yema de huevo, pescado y en los productos lácteos. Las plantas contienen únicamente precursores de la vitamina A, sólo suministran la vitamina como carotenos o carotenoides. En la tabla 2 se muestra el contenido de vitamina A de algunos alimentos reportados en diferentes fuentes bibliográficas.

Tabla 2. Contenido de vitamina A para los diferentes alimentos ya sean animales o vegetales.

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

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

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

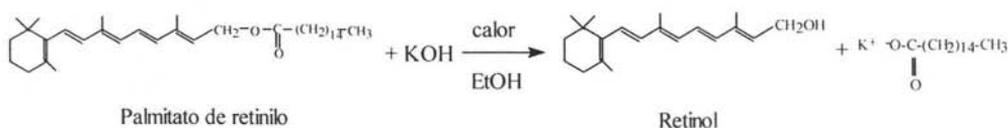
C = Tabla de composición de alimentos. Osborne. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Acribia.

D = Tabla de INN SZ

ANÁLISIS DE VITAMINA "A" EN ALIMENTOS ^{2,5,6,11,14}

La determinación de vitamina A generalmente se realiza con el método publicado por la Asociación Oficial de Químicos Analistas, 1995 (AOAC por sus siglas en inglés *Assotiation of Oficial Analytical Chemist*). El método se basa en que en la mayoría de alimentos y suplementos alimenticios que contienen vitamina A, ésta se encuentra en forma de éster. El retinol se extrae de los alimentos, por medio de una hidrólisis alcalina con hidróxido de potasio en un medio etanólico; lo anterior se realiza con la finalidad de eliminar lo más posible el material lipídico y proteínico y así liberar al retinol de la muestra convirtiendo los ésteres de retinol en retinol libre.

REACCIÓN



El procedimiento puede hacerse a reflujo o a temperatura ambiente, aunque este último implica periodos largos, aunque las condiciones están determinadas por la muestra, en cuanto a cantidad estimada y si es un líquido o un sólido.

Después de la realizar la hidrólisis, el retinol libre se encuentra en la parte insaponificable de la solución, éste es separado con un solvente no polar (hexano), mediante una extracción líquido-líquido. El extracto obtenido se lava con agua para liberarlo del alcalí remanente, posteriormente el extracto se seca y se concentra por evaporación, obteniéndose un extracto crudo, el cuál es purificado mediante una columna de alúmina, para después ser determinado por colorimetría.

El método por colorimetría consiste en hacer reaccionar la vitamina A con tricloruro de antimonio ($SbCl_3$) para dar lugar a la formación de un complejo de color azul en proporción directa a la concentración de vitamina A, pero el complejo obtenido es un poco inestable por lo que se requiere de un análisis rápido.

Por otra parte, aunque el método descrito anteriormente es el más utilizado, la hidrólisis del enlace éster para liberar al retinol también se puede realizar vía hidrólisis ácida pero la reacción es reversible y no se tiene buen rendimiento. También se utiliza la hidrólisis enzimática.

El análisis de vitamina A puede realizarse por otros métodos dependiendo de la forma en la que se quiera analizar; por ejemplo, la forma esterificada del retinol es la más común en la que se encuentra la vitamina A en los alimentos o suplementos alimenticios, y aunque puede emplearse el método descrito, también se pueden extraer por disolución de la muestra en un disolvente apropiado y realizar un análisis de los ésteres intactos.

Los solventes para la extracción líquido-líquido, pueden variar siendo utilizados solventes como hexano, cloroformo, éter etílico, o con mezclas como 2-propanol/diclorometano, cloroformo-acetona y acetato de etilo/butanol, el uso de solventes polares hace más eficiente la extracción, pero a su vez se tienen más interferencias.

El empleo de antioxidantes para la protección de la vitamina A durante el proceso ha sido necesario para evitar pérdidas en la extracción, para tal efecto se han empleado sustancias como ácido ascórbico, BHT (butilhidroxitolueno), galatos y vitamina E.

En la determinación cuantitativa de la vitamina A se han utilizado otras técnicas analíticas instrumentales como la Espectroscopia Ultravioleta (UV por sus siglas en español), pero al igual que la colorimetría se tienen muchas interferencias y la sensibilidad es limitada. También se han empleado métodos fluorométricos. La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE por sus siglas en español) es la técnica más utilizada en los últimos tiempos debido a que es una técnica que permite separar analitos no volátiles de mezclas complejas, permitiendo separar los isómeros trans o cis del retinol y sus otras formas, como los ésteres de retinol, que existen de forma natural en los alimentos.

La técnica de CLAE en fase inversa es la más aceptable para separar retinol de sus isómeros. Generalmente en las metodologías planteadas con esta técnica se utiliza como detector el espectrofotómetro UV pues provee la suficiente sensibilidad y selectividad para analizar ese compuesto, se pueden utilizar otros detectores que proporcionan una respuesta universal, pero dan una sensibilidad limitada como el detector de índice de refracción.

A continuación se presentan algunas de las condiciones que se han utilizado para la determinación de vitamina A como retinol u otros retinoides.

Tabla 3. Combinación de columnas, fases móviles y detectores utilizados en el análisis de vitamina A.

<i>REFERENCIA</i>	<i>COLUMNA</i>	<i>FASE MÓVIL</i>	<i>DETECCIÓN</i>
Kira and Sawyer (1991)	Partisil 10 ODS 2	Metanol/agua (90:10)	UV $\lambda=325\text{nm}$
Hiroshi Iwase (2002)	Inertsil ODS 80A	Metanol/etanol (50:50)	Fluorescencia $\lambda_{em}=350\text{nm}$
Pinheiro Sant'Ana, y col. (1998)	RP-18	Metanol/acetonitrilo- acetato de etilo (80:10:10)	UV $\lambda=325\text{nm}$
Stancher and Zonta (1984)	LiCHrosorb Si-60	Hexano/2-propanol	UV $\lambda=340\text{nm}$
Pikkarainen and Parviainen (1992)	ChromSep Nucleosil C-18	Metanol	UV $\lambda=325\text{nm}$
Ollilainen, y col. (2000)	μ Porasil column	Hexano/tetrahidrofurano/2- propanol (98:1:1)	Fluorescencia $\lambda=325\text{nm}$
Ramírez Hernández (2004)	Nucleosil C18	Metanol/agua (95:5)	UV $\lambda=325\text{nm}$

ODS: octadecil-silano

RP: siglas en inglés de fase inversa o reversa

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)^{14, 16, 17, 18}

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos¹⁴. La separación se basa en la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases, una móvil y una estacionaria, la fase móvil transporta a los componentes a través de la fase estacionaria. Cada componente se distribuirá de modo distinto dependiendo de la afinidad con cada fase como consecuencia de las interacciones (hidrofílicas-hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones bipolares, electrostáticas, etc.) de estos componentes con cada una de ellas; aquellos componentes que sean más afines a la fase estacionaria se dice que son fuertemente retenidos y por tanto tardan en eluir esto es, se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unan débilmente a la fase estacionaria eluyen más rápido. Esto se relaciona con las constantes de equilibrio que presentan los diferentes componentes de la muestra entre ambas fases, es decir, se establece un equilibrio que involucra la fracción de cada especie disuelta por cada fase en equilibrio:



$$K = \frac{[\text{Soluto}]_{FE}}{[\text{Soluto}]_{FM}}$$

La cromatografía de líquidos es una de las divisiones que se tiene en la cromatografía si se considera el tipo de fase móvil que se utiliza, y dependiendo de donde se coloca y de que está constituida la fase estacionaria se tienen diferentes subdivisiones de cromatografía de líquidos: plana (capa fina y papel) y en columna (líquido-líquido, sólido-líquido, fases químicamente unidas, par iónico, intercambio iónico, filtración y permeación en gel).

En este trabajo para la cuantificación de vitamina A se utilizó la técnica basada en la cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase químicamente unida. Dicha subdivisión consiste en tener a la fase estacionaria unida químicamente a la superficie de un soporte (generalmente partículas de sílice), teniendo como ventaja que la fase móvil difícilmente produce deterioro alguno en la fase estacionaria (a excepción de trabajar en medios con pH's extremos

que pueden romper el enlace químico por hidrólisis), problema que se presentaba con la cromatografía líquido-líquido.

Dependiendo de los grupos funcionales que contiene el compuesto que se une químicamente al soporte se pueden trabajar dos tipos de cromatografía¹⁴:

- ❖ *Cromatografía en fase normal*, donde los compuestos que se unen al soporte de la fase estacionaria contienen a grupos funcionales de tendencia polar como el grupo amino (-NH₂), el grupo nitrilo (-CN) o el grupo hidroxilo (-OH), y la fase móvil que se emplea es de tendencia no polar.
- ❖ *Cromatografía en fase inversa*, en este caso los componentes unidos al soporte son de tipo no polar como el grupo octil (-C₈H₁₇), octadecil (-C₁₈H₃₇), fenil (-C₆H₅) y se emplea fase móvil de tendencia polar.

Instrumentación

En una primera etapa, la cromatografía de líquidos se realizaba en columnas de vidrio, y para lograr análisis rápidos se aplicaba vacío o bombeo, pero se tenía baja eficiencia, posteriormente el avance de la tecnología hizo posible el incremento de la eficiencia empleando columnas de menor diámetro y menor tamaño de partícula, pero esta tecnología requiere una instrumentación sofisticada para poder trabajar altas presiones.

La Cromatografía de Líquidos Instrumental está constituida de las partes mostradas en el siguiente diagrama:



Fase móvil

La fase móvil (eluyente) debe tener ciertas características para poder ser utilizada en cromatografía líquida, como son: disolver a la muestra, debe ser de alta pureza, ser inerte, no tóxico ni peligroso, tener baja viscosidad, ser compatible con el tipo de detector utilizado, barato y accesible.

Los disolventes más empleados en cromatografía líquida de alta presión son: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, isopropanol, metanol y agua.

La fase móvil debe colocarse en recipientes libres de pequeñas partículas para evitar la obstrucción y daño en el sistema de bombeo y la columna, para disminuir estos problemas, la toma de los solventes se hace a través de filtros cuyo material debe ser inerte (generalmente de vidrio, teflón o acero inoxidable), además el material del cual estén elaborados no debe reaccionar con los solventes (vidrio, plástico o acero inoxidable). (Fig. 5)

Otro aspecto importante es la desgasificación de la fase móvil, debido a que el oxígeno, nitrógeno y otros gases se disuelven en ella, y como consecuencia de esto puede existir formación de burbujas al trabajar con los disolventes o realizar mezclas de estos, y dentro del instrumento pueden ocasionar daño en el sistema de bombeo, así como afectar el funcionamiento del detector y disminuir la eficiencia en la columna. Por tal motivo debe realizarse una remoción de dichos gases y para ello existen diversas técnicas: manual, filtración por membrana, ultrasonido, o bien mediante el burbujeo de gas inerte, esta última es la que se utilizó en este trabajo, y consiste en hacer burbujear en la fase móvil un gas inerte (helio), el cual elimina al oxígeno y nitrógeno contenido por desplazamiento.

En CLAE se pueden trabajar bajo dos tipos de elución, según convenga para la separación óptima de los analitos, estos tipos se conocen como:

- Elución Isocrática: consiste en mantener constante el poder de elución, esto es, el solvente o la mezcla de solventes que constituye(n) la fase móvil permanecen igual durante todo el tiempo de análisis de la muestra en el cromatógrafo.
- Elución por gradiente o Gradiente de elución: se varía durante el análisis el poder de elución, es decir, el solvente o la mezcla de solventes que constituye(n) la fase móvil se modifica(n) durante el tiempo que dure el análisis de la muestra en el cromatógrafo. En este tipo de trabajo la variación del poder de elución siempre se realiza de menor a mayor.



Fig. 5. En la imagen de la izquierda se muestran los contenedores de la fase móvil, así como el módulo de mezclado a baja presión y el de desgasificación, mientras que a la derecha se muestran los filtros de acero inoxidable.

Sistema de bombeo

El sistema de bombeo suministra y mantiene en movimiento a la fase móvil dentro del sistema, debe mantener un flujo constante, continuo (no pulsante) y vencer las altas presiones que se generan en el sistema instrumental.

En la CLAE, se han utilizado dos tipos de sistemas de bombeo: bombas mecánicas y bombas neumáticas, el instrumento empleado en este trabajo cuenta con bombas recíprocas y éstas pertenecen al primer tipo, por lo que se explicarán brevemente.

Las bombas recíprocas son bombas mecánicas que se utilizan en aproximadamente el 90% de los sistemas de CLAE comerciales¹³. Inicialmente las bombas estaban constituidas por un pistón y un sistema de válvulas; el pistón cargaba de fase móvil a la cámara que se encuentra en la cabeza de la bomba, y por medio de válvulas que se abren y cierran alternadamente, la cámara se llenaba y se vaciaba de forma alternada, dichas válvulas son conocidas como válvulas "check" (por su nombre en inglés) y son pequeñas esferas de cuarzo o zafiro.

Este tipo de bombas de un solo pistón cumplían con las condiciones para trabajar en CLAE excepto que producían un flujo constante pero pulsante, pues se tienen ciclos de llenado y vaciado de la cámara, y en cada ciclo el pistón expulsa la fase móvil de la cámara y en el ciclo complementario cierra su comunicación con la columna para tomar fase móvil, por lo que el flujo no es continuo; este problema se solucionó trabajando con dos pistones sincronizados, con el fin de que mientras uno de ellos carga la fase móvil, el otro la expulsa, enviándola al sistema cromatográfico. Este último, es el sistema que posee el instrumento utilizado (Fig. 6) y disminuye notablemente la pulsación, además la fase móvil al salir de la bomba se dirige a una tubería de

mayor diámetro que la tubería capilar que se utiliza en el sistema, eliminando totalmente esta pulsación.



Fig. 6. En esta imagen se puede apreciar el módulo de la bomba recíprocante, con el controlador de flujo, así como las “cabezas” de la bomba donde se encuentran los pistones.

Sistema de introducción de muestra

La muestra se introduce al sistema generalmente mediante una válvula de inyección o válvula de seis pasos (Fig. 7). La introducción de la muestra a esta válvula se puede realizar de forma manual o automatizada, en el primer caso mediante una jeringa y en el segundo, se utilizan válvulas de inyección automáticas.

La válvula se constituye de un rotor que gira en dos posiciones una de carga y otra de inyección, y una tubería de muestra externa, conocido como bucle o “loop” (por su nombre en inglés) en el que se introduce la muestra. El modo de operación de la válvula es el siguiente:

1. En la posición de carga, la muestra disuelta en la fase móvil se introduce mediante una jeringa para llenar un tubo capilar conocido por su expresión en inglés como “loop”, el cual puede ser de diferente capacidad (5 a 200 μ L). En esta posición, la fase móvil pasa de la bomba a la columna.
2. Al girar el rotor en posición de inyección, la fase móvil pasa a través del “loop” arrastrando la muestra hacia la columna para realizar la separación.



Fig. 7. El rotor de la válvula de seis pasos (izq.) y el “cuerpo” de la válvula (der.) donde se puede observar el “loop” y las conexiones de la tubería hacia columna, desechos y la que transporta a la fase móvil

Sistema de separación

El sistema de separación es una columna analítica de tipo empacada la cual contiene la fase estacionaria y en algunos casos algún aditamento, como una chaqueta de calentamiento. La columna consiste en una tubería, generalmente de acero inoxidable que le permite soportar altas presiones, las dimensiones varían en los siguientes intervalos: diámetro interno de 2 a 5mm y con una longitud de 5 a 25cm, el tamaño de partícula de la fase estacionaria oscila entre 3 a 5 μ m y su naturaleza dependerá del tipo de cromatografía que se quiera trabajar. (Fig. 8)

En este trabajo se utilizó una fase químicamente unida (Nucleosil C18), teniendo unido químicamente un octadecil $[-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3]$, este grupo le confiere a la fase estacionaria característica no polar por lo tanto el tipo de trabajo utilizado fue la cromatografía de fase inversa.



Fig. 8. Columnas analíticas de longitud 15cm y 5cm. Phenomex®.

Sistema de detección

El detector es el dispositivo que nos debe permitir medir en forma continua alguna propiedad física de los componentes de la muestra o de la fase móvil, generando una señal proporcional a la concentración de la muestra medida a la salida de la columna. Los detectores que se utilicen deben cumplir con características como tener respuesta universal o selectiva, es decir, responder a todo tipo de compuestos o algunos de ellos, tener una respuesta lineal y ser estables a cambios de temperatura y variación de flujo.

Los detectores más utilizados en CLAE se pueden clasificar en dos grupos dependiendo el fenómeno físico que se mide así, tenemos los de tipo Espectroscópico (Esp. UV-Vis, Esp. de Fluorescencia, Refractometría y Esp. de Masas) y los Electroquímicos (Conductímetro, Amperímetro, Voltamperímetro y Coulombimetría).

En este trabajo se utilizó un Espectrofotómetro de UV-Vis de longitud de onda variable (*Fig. 9*), del cual se dará una explicación detallada del funcionamiento de este detector.

Espectrofotómetro UV-Visible

El funcionamiento de este detector se basa en la absorción de la radiación electromagnética en la región del ultravioleta cercano y el visible (180-1,100nm) por parte de los electrones externos de los átomos de los compuestos, es un detector de tipo selectivo, ya que sólo se pueden trabajar con compuestos orgánicos que contienen dobles ligaduras conjugadas, sistemas aromáticos, algunos aniones de compuestos inorgánicos y los cationes de los metales de transición.

Existen dos tipos de detectores basados en espectrofotómetros UV-Vis los de tipo dispersivo y el arreglo de diodos. En el primer tipo se tienen:

- a) Fotómetros de longitud de onda fija que utilizan filtros como sistema dispersivo o monocromático y normalmente pueden trabajar a 254, 275 y 284nm.
- b) Espectrofotómetros de longitud de onda variable, los cuales tienen un sistema dispersivo o monocromático que permite variar la longitud de onda a la que se quiera trabajar, lo que permite optimizar la sensibilidad de este detector en comparación con lo obtenido por los fotómetros de longitud de onda fija.

En el segundo tipo se utiliza un espejo holográfico como sistema dispersivo que dirige a la radiación electromagnética hacia el detector conocido como arreglo de diodos, estos diodos responden a cada fotón de manera específica produciendo una respuesta electrónica inmediata, por lo que se puede obtener el espectro UV-Vis completo de los compuestos al mismo tiempo que se genera el cromatograma, además se pueden generar varios cromatogramas a diferentes longitudes de onda al mismo tiempo, lo cual no es posible realizar con los sistemas dispersivos. Para este detector se requiere una computadora como sistema de registro, debido a la cantidad de información que se almacena y procesamiento que realiza de los espectros obtenidos.

Dependiendo del detector que se tenga así como del compuesto con que se trabaje, en la mayoría de las muestras pueden detectarse cantidades de compuestos del orden de ppb y ppm lo que lo hace altamente sensible. En general presentan buena estabilidad lo que implica que no se ven afectados por cambios de flujo o temperatura.



Fig. 9. Detector UV-Vis de longitud de onda variable Shimadzu®, se observa la celda de flujo (lo que se observa a la derecha).

Sistema de registro

El sistema de registro proporcionará en forma gráfica la señal generada por los compuestos en el detector en relación al tiempo en que van saliendo de la columna y llegan al detector. Para tal función se pueden tener un registrador, un integrador electrónico (Fig. 10) o una computadora, y el gráfico que generan se conoce con el nombre de cromatograma.

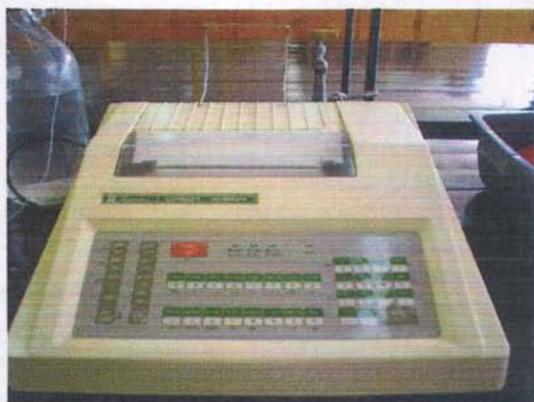


Fig. 10. Integrador electrónico. Shimadzu®.

Un cromatograma, según la IUPAC se define como “un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del efluente u otra cantidad usada como una medida de la concentración del efluente, versus el volumen de efluente o tiempo”.¹⁷

El cromatograma se genera a partir de que la muestra es inyectada, teniendo varias señales en el cromatograma (Fig.11), las cuales para los estudios cualitativos y cuantitativos son importantes, a continuación se describen algunas de ellas:

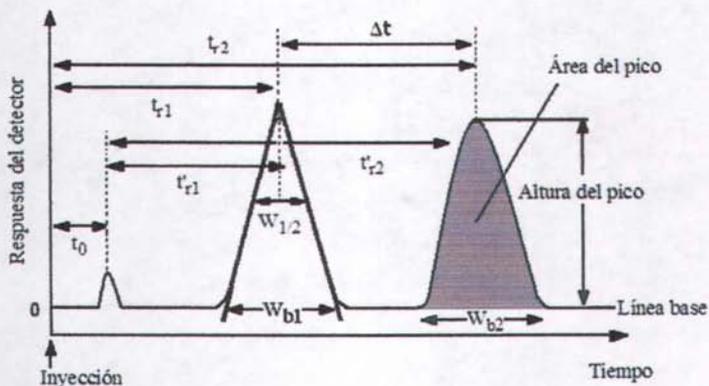


Fig. 11. Esquema de un cromatograma e información obtenida de éste.

- a) Tiempo muerto (t_0): es el tiempo que tarda en eluir una muestra que no es retenida en la fase estacionaria.
- b) 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.
- c) 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 .
- d) Área de pico: este parámetro permite determinar la concentración de cada componente separado en la fase estacionaria.
- e) 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 cromatográfico para 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:

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

t_{r_1}' = es el tiempo de retención corregido del compuesto que se tarda menos en eluir.

t_{r_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:

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

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:

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

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

$$R_s = 1.2 \left(\frac{\Delta t_r}{W \frac{1}{2} h_1 + W \frac{1}{2} h_2} \right)$$

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS) ^{17, 19, 20}

La preparación de muestras como paso previo para el análisis instrumental, es importante teniendo como objetivos principales una limpieza y/o concentración de la muestra. La limpieza se requiere cuando la muestra contiene impurezas que interfieren en la medición del analito de interés; por ejemplo, en el análisis por UV es necesario eliminar la impureza que absorba en la misma región que el analito, y es mucho más importante en Cromatografía de Gases y Cromatografía de Líquidos, ya que las impurezas pueden acortar la vida útil de las columnas, por lo que deben ser eliminadas antes de inyectar la muestra en las columnas. La concentración del analito, se realiza cuando el analito está en un orden de concentración (diluido) en la muestra que no puede ser medido de manera directa. Para esto se han utilizado técnicas clásicas de preparación de muestra como la extracción líquido-líquido, líquido-sólido, etc.; en los últimos 15 años han aparecido nuevas técnicas de preparación como la extracción en fase sólida, la extracción con fluidos supercríticos, purga y trampa, etc.

En este trabajo además de aplicar la técnica clásica de extracción líquido-líquido se aplicó en una etapa de la preparación de la muestra la técnica de extracción en fase sólida, que por ser menos conocida se dará una breve explicación de ésta.

La extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) es una modalidad de preparación de muestra que consiste en una extracción de tipo líquido-sólido a través de una columna o cartucho. El cartucho (*Fig. 12*) que contiene a la fase sólida tiene normalmente forma de jeringa y el material que lo forma puede ser de vidrio o de polipropileno y contiene, entre dos filtros de polietileno, al adsorbente (fase sólida) empacado en cantidades que varían entre los 100 a los 1,000mg; debido al desarrollo de esta metodología en los últimos años, en la actualidad permite operar columnas de materiales de relleno variado, desde adsorbentes muy polares como la sílica, materiales de intercambio iónico, de fase inversa como en CLAE, y con capacidades de volumen entre 1 a 6mL, con lo cual es posible aplicar esta técnica para un gran número de aplicaciones.

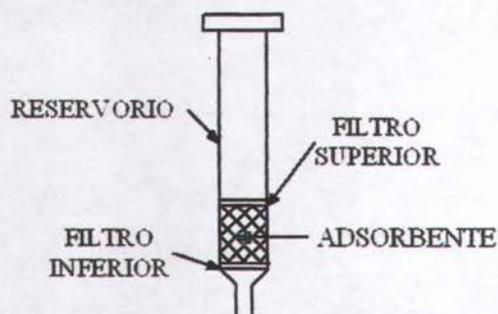


Fig. 12. Esquema de cartucho e imagen de cartucho J.T. Baker.⁰⁰

En la extracción en fase sólida se tienen mecanismos de adsorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas. La retención y la elución obedece a las distintas interacciones intermoleculares entre el analito y los grupos funcionales del adsorbente, las fuerzas que intervienen en estos mecanismos pueden ser iónicas, puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, Van der Waals, etc., existiendo un equilibrio entre la concentración del analito en la fase estacionaria y la fase móvil ($[A]_{FE} \leftrightarrow [A]_{FM}$).

Cada adsorbente posee la llamada capacidad de la columna, la cual es la cantidad total de compuestos (analitos e interferencias) que pueden ser retenidos de una muestra específica por la masa definida del adsorbente. La capacidad de la columna es específica para cada analito.

Tabla 4. Capacidad de columna para varios analitos.

Analito	Columna de 200mg	Adsorción mg/200mg	Disolvente
Hidroclortisona	Octadecil	8.0	Agua (pH 7)
Colesterol	Octadecil	6.0	Metanol/cloroformo(9:1)
Palmitato	Octadecil	~5.0	Metanol/cloroformo(9:1)
Hidroclortisona	Sílica	6.0	Cloruro de metileno

En la técnica de extracción en fase sólida se trabajan dos modalidades para el tratamiento de la muestra: limpieza y/o concentración.

a) Limpieza de la muestra.

Cuando se aplica la extracción en fase sólida para lograr lo que se llama limpieza de la muestra se pueden buscar dos cosas:

- (1) se busca que las impurezas pasen a través del cartucho y se quede(n) atrapado(s) el (los) analito(s) de interés para eluirlos posteriormente, o
- (2) se busca que las impurezas se retengan en el cartucho y el (los) analito(s) de interés pase a través del cartucho.

Ejemplos del primer caso son cuando el analito de interés es más polar que las impurezas asociadas, el uso de fase normal (adsorbente polar) es la más utilizada. Para la extracción en fase normal la muestra es disuelta en un solvente menos polar que el adsorbente, sílica por ejemplo, al pasar la solución a través del cartucho, el analito polar es adsorbido por la sílica y las impurezas no polares que tienen más afinidad por el solvente (fase móvil) pasan a través de la columna sin ser retenidas. El analito polar es removido posteriormente del cartucho con un solvente más polar, para desplazar al analito del adsorbente. Mientras que, cuando las impurezas son más polares que el analito, el uso de una fase inversa (adsorbente no polar) es la más efectiva, en ésta la muestra se disuelve en un medio polar y se pasa a través del adsorbente no polar, las impurezas polares tienen mayor afinidad por el solvente y pasan a través del cartucho sin ser retenidos y el (los) analito(s) menos polar(es) es (son) adsorbido(s) por la fase estacionaria. La adición de un solvente no polar en el que el analito es soluble, eluye al (o los) analito(s) libre(s) de impurezas polares.

Para el segundo caso la eliminación de moléculas grandes como grasas o colorantes por su tamaño en adsorbentes polares es muy utilizado.

b) Concentración de los analitos de interés.

Cuando el (los) analito(s) en la muestra se encuentra(n) muy diluido(s) y se requiere concentrarlo(s) para poder ser medido(s) en las técnicas de medición que se esté usando, por ejemplo el análisis de compuestos orgánicos en agua (en el orden de las ppb), suele utilizarse un adsorbente de tipo fase inversa, es decir, un adsorbente no polar, se procesan entre 0.5 a 1L de la muestra, los compuestos no polares son retenidos y después se eluye al analito con una mínima cantidad de solvente apropiado, evaporando posteriormente y obteniéndose un volumen final de

1mL se obtiene una concentración final del orden de las ppm, teniéndose una muestra limpia y concentrada en el orden en que la técnica de cromatografía puede cuantificar.

En este trabajo, la técnica de extracción en fase sólida se utilizó para realizar una limpieza del extracto obtenido, empleando como adsorbente sílica gel.

La sílica gel es un sólido amorfo y poroso, de gran área superficial (de 30 a aproximadamente $500\text{m}^2/\text{g}$), alto volumen de poro ($0.4\text{-}1.2\text{mL/g}$) y con un diámetro de poro comprendido entre los 60 y 300 \AA , aunque pueden emplearse mayores diámetros de poro en otras metodologías, como en la de exclusión molecular. Químicamente se puede definir como un óxido de silicio hidratado, de tipo $(\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O})_n$, en el cual sus átomos de silicio internos están ligados entre sí por átomos de oxígeno (puentes siloxano Si-O-Si) y los de la superficie a grupos hidroxilo, constituyendo los grupos silanoles (Si-OH) que son los responsables de la actividad superficial.

La sílica gel es higroscópica y el agua fijada por puentes de hidrógeno a los silanoles es responsable de su bloqueo y pérdida de actividad. La sílica gel es insoluble en solventes no polares, como los empleados en fase normal, pero es soluble en agua a temperatura ambiente y pH neutro, además el enlace de dicho material es estable en un intervalo de pH de 2 a 7.5, a un pH mayor de 7.5 la sílica se solubiliza en soluciones acuosas, y debajo de pH 2 ocurre la hidrólisis del enlace éter que une al grupo funcional unido químicamente a la sílica.

La selección de las condiciones óptimas para la extracción depende de la naturaleza del analito y de la matriz que lo rodea. Para trabajar con este sistema en el caso de este trabajo se contaba además de las columnas con un aparato de extracción al vacío (vacuum manifold en inglés), que permite trabajar con varias columnas al mismo tiempo.

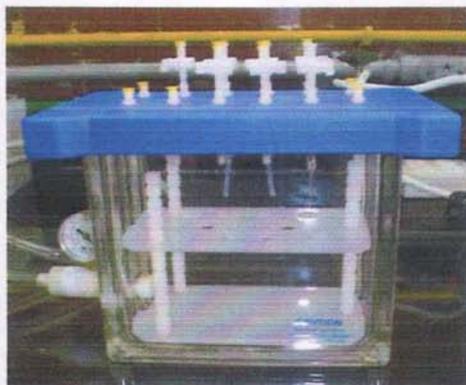


Fig. 13. Aparato de extracción al vacío. JT. Baker®.

Para trabajar con esta técnica se sigue el procedimiento a continuación descrito:

1. Acondicionamiento de la columna: esta operación tiene como objetivo solvatar los grupos funcionales del adsorbente. Los analitos no pueden interactuar con el relleno de la columna si sus grupos no se encuentran totalmente “activados” para lograr la interacción. Y además se realiza una limpieza del cartucho por si éste tuviera alguna impureza debida a su fabricación.
2. Aplicación de la muestra: la muestra se aplica en la columna, obligándola a pasar a través del adsorbente conectando la columna a una estación de extracción de vacío para aspirar por vacío o con presión positiva (con una jeringa), utilizando un flujo determinado, el cual no debe ser muy alto ya que no permitirá interactuar a los compuestos con el adsorbente. Esta operación puede efectuarse de dos maneras diferentes de acuerdo al modo de trabajo que se seleccione, estas dos modalidades son:
 - a) Aplicación directa de la solución a inyectar de manera tal de lograr la elución del analito y la retención de impurezas cuyo comportamiento sea muy afin a la columna. En este caso la preparación de la muestra finaliza con esta operación.
 - b) Retención del analito en la columna utilizando un solvente débil, en general seguido de un lavado con un solvente con el cual no eluya el analito y posterior elución con un solvente fuerte. Este método es el habitual y puede utilizarse para la concentración de muestras pasando grandes volúmenes a través de la columna.
3. Lavado de la columna: la columna que contiene al analito retenido se lava con un solvente adecuado que selectivamente eluya las impurezas pero permita que el analito se quede en la columna.
4. Elución del analito: el analito purificado se eluye con un solvente lo suficientemente fuerte para que desplace al analito del sorbente.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS^{26, 27, 28}

La validación es un término que se emplea para definir o demostrar la capacidad de un método o técnica analítica para satisfacer los requisitos para la aplicación analítica deseada. Los parámetros que se utilizan para la validación de un método, generalmente son:

- A. Condiciones óptimas de trabajo.
- B. Linealidad del sistema y del método.
- C. Precisión del sistema y del método (repetibilidad y reproducibilidad)
- D. Exactitud del sistema y del método.
- E. Límite de cuantificación del sistema y del método.
- F. Límite de detección del sistema y del método.
- G. Tolerancia del sistema.
- H. Recobro.
- I. Estabilidad de la muestra.

En este trabajo sólo se realizaron algunos de ellos, de los cuales se dará una breve explicación:

1. Condiciones óptimas de trabajo.

Al realizar la validación de un método es necesario encontrar las condiciones adecuadas de trabajo tanto en las técnicas de medición como de preparación de la muestra, en este caso la de la CLAE, como para la técnica de extracción del analito de interés desde la matriz elegida.

2. Linealidad del sistema.

La linealidad es una medida que nos asegura que la relación entre la respuesta obtenida y la concentración de analito tiende a una línea recta en un intervalo dado. Existe la linealidad del sistema y la linealidad del método, en ambas se debe probar que la variable dependiente es directamente proporcional a la variable independiente, por lo cual se hace una regresión lineal, en el caso de la linealidad del sistema la variable dependiente es la respuesta o señal y la variable independiente es la concentración del analito.

Para la linealidad del sistema el criterio de aceptación internacional es que debe observarse gráficamente una tendencia lineal y el valor de correlación de la regresión lineal aplicada a los datos de una curva de calibración sea:

$$r^2 \geq 0.98 \text{ ó } r \geq 0.98$$

Si se cumplen dichas condiciones se realiza una prueba de hipótesis a la ordenada al origen para demostrar si cumple o no la ecuación lineal planteada, y posteriormente se calcula el intervalo de confianza (I.C.) para la ordenada y la pendiente obtenidas.

La prueba de hipótesis para la ordenada al origen se realiza para comprobar si los resultados experimentales se ajustan a una línea recta con ordenada al origen (cero) o no, basados en la ecuación:

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

Estableciendo lo siguiente:

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

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

El estadístico de prueba a utilizar es la "t de student":

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

donde:

b = Ordenada al origen.

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

Se = Error típico de estimación.

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

n = Número de determinaciones.

\bar{X} = Media experimental.

Al tratarse de un ensayo de dos colas y tomando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ (5%), que corresponde a un valor que se toma a nivel internacional para la mayoría de las metodologías analíticas, y con $n-2$ grados de libertad el error típico de estimación se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

donde:

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

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

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

y el criterio que se toma para rechazar la hipótesis nula (H_0) es:

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

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

Ordenada

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

Pendiente

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

3. Precisión.

La precisión se define como el grado de concordancia entre varias mediciones individuales de una misma propiedad. Se puede calcular tanto para el sistema como para el método, esta última se expresa como repetibilidad y reproducibilidad.

a) Precisión del sistema

La precisión del sistema estará definida como el grado de concordancia de diferentes resultados de mediciones realizadas de varias soluciones de un analito provenientes de una misma solución madre; cada solución y medición la realiza un mismo analista bajo las mismas condiciones de trabajo. Los resultados de este ensayo, por tratarse de un sistema cromatográfico, no deben diferir más del 2% para concentraciones altas y del 5% para concentraciones del orden de trazas.

Para este ensayo se realizan pruebas de hipótesis sobre la varianza, con los datos obtenidos:

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

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

Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza σ_o^2 se utiliza la prueba de χ^2 con n-1 grados de libertad, y se comparará con la de tablas:

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

donde:

n = número de determinaciones.

s = desviación estándar muestral (experimental).

σ_o^2 = desviación estándar máxima aceptada, es decir, contra la que vamos a comparar (mínimo 5% del C.V.).

El criterio para rechazar la H_0 es:

$$\chi_{cal.}^2 > \chi_{\alpha}^2$$

y el intervalo de confianza, con un nivel de significancia de $1-\sigma$, para s^2 es:

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

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

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

c) Precisión del método

La repetibilidad es el grado de concordancia de las mediciones realizadas por un mismo analista utilizando el mismo método, instrumentos y/o aparatos.

La reproducibilidad en nuestro caso es el grado de concordancia de las mediciones realizadas por dos o más analistas utilizando el mismo método, instrumentos y/o aparatos.

Los resultados de este ensayo implican el efecto de varios aspectos, como la habilidad del analista, volúmenes, etc. Para comprobar esto se realizan pruebas de hipótesis con los datos obtenidos, tomando los siguientes criterios:

Repetibilidad

La hipótesis nula para el caso de repetibilidad del método es:

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

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

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

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

donde:

n = Número de determinaciones.

s = Desviación estándar muestral.

σ_0 = Desviación estándar máxima aceptada.

El criterio para rechazar la H_0 es:

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

Para calcular el intervalo de confianza al nivel de $1-\sigma$, para s^2 se aplica:

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

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

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

Reproducibilidad

La reproducibilidad del método se determina de la comparación de las varianzas y las medias de los resultados obtenidos por los dos analistas.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas es:

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

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

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

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

donde:

s_1^2 = es la varianza muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad.

s_2^2 = es la varianza muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad.

y se rechaza la hipótesis nula H_0 si:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2}, \text{ con grados de libertad } n_M-1, n_m-1.$$

Según el resultado obtenido sobre las varianzas se procede a realizar la prueba de hipótesis sobre las medias y ésta se establece como:

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

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

si en la prueba anterior de las varianzas demostró que las varianzas son semejantes, el estadístico de prueba utilizado es:

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

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

y se rechaza la hipótesis nula si:

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

En el caso de que las varianzas no son comparables, es decir los analistas no tienen la misma precisión, el estadístico de prueba utilizado es:

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

con ϕ grados de libertad, y este se calcula con la ecuación:

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

y la hipótesis nula se rechaza si:

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

4. Estabilidad de la muestra

En esta parte se monitorean las disoluciones patrón y/o estándares y/o la muestra preparada para su cuantificación durante un tiempo determinado, para observar si se conserva la concentración del analito, después de almacenarse bajo condiciones específicas, y con esto poder establecer las condiciones de almacenamiento. Para este estudio se realiza una prueba sobre las varianzas y sobre las medias de los datos obtenidos.

La prueba de hipótesis es sobre las varianzas y es que:

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

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

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

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

donde:

s_1^2 = es la varianza muestral mayor con $n_M - 1$, grados de libertad.

s_2^2 = es la varianza muestral mayor con $n_m - 1$, grados de libertad.

y se rechaza la hipótesis nula si:

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

con grados de libertad de n_M-1 , n_m-1 .

Después de realizar la prueba anterior y si se demuestra que las varianzas son iguales, se realiza el estadístico de prueba “t de student” sobre las medias.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

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

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

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

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

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

Se rechaza la prueba de hipótesis nula si:

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

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

5. Recobro

En el caso de muestras o matrices en los que no es simple realizar linealidad de método es común realizar cálculo de recobro para tomar a éste como un factor importante de corregir en los cálculos cuantitativos que se realicen sobre las muestras.

El recobro es el resultado expresado en porcentaje de la comparación entre la concentración del analito problema que se obtiene y la concentración que debe obtenerse después de tratar con el método una muestra a la cual se le adiciona una concentración conocida del analito. El cálculo se realiza con la siguiente ecuación.

$$R = \frac{[\text{Concentración}]_{\text{obtenida}}}{[\text{Concentración}]_{\text{teórica}}} \times 100$$

Este proceso se puede realizar ya sea fabricando una muestra sintética lo más parecida a la muestra que se va a trabajar en la que se le adicionaron cantidades conocidas y precisas del o los analito(s) a analizar y a la que se le aplicará la metodología desarrollada; o por medio de lo conocido como “adición a la muestra”, en la cual a una muestra que ya fue analizada con la metodología se le adicionan cantidades conocidas y precisas del o los analito(s) a analizar y a la que se le aplicará de nuevo la metodología desarrollada, esta última es la que se realizó en este trabajo.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en dos etapas, la primera consistió en desarrollar y optimizar la extracción de la vitamina A del hígado de res y la segunda fue la validación de la metodología planteada; para lo cual se empleó lo siguiente en muestras, material e instrumentación:

◆ Muestras

Para las pruebas de desarrollo y optimización de la metodología:

5Kg de hígado de res, adquiridos en Mercado Pantitlán, Deleg. Iztacalco,

Para la validación:

3 hígados de res, adquiridos en el Mercado Pantitlán, y cuya procedencia es de ganado del Estado de Tabasco.

◆ Reactivos

Compuesto	Grado	Compañía	Lote
Metanol	Nanogrado	Mallinckrodt	5160 V12401
Agua	ASTM Tipo 1	Obtenida con equipo Millipore	
Retinol sintético	95%	SIGMA	063K5004
Hidróxido de potasio (perlas)	ACS	Baker	N18C52
Alcohol etílico absoluto anhidro	ACS	Baker	M25C64
Ácido ascórbico		LABDEA	Donativo
Sulfato de sodio anhidro (granular)	R.A.	Mallinckrodt	8024 T11D03
Cloruro de sodio	Alimentario	“Elefante” Sal Refinada-yodatada-fluororada	22/12/03 L-38
Éter etílico	R.A.	Mallinckrodt	0850 P34D05

◆ Aparatos

- ▲ Parrilla Electromante ME. Electrothermal. No. 873157 UNAM
- ▲ Canastilla de calentamiento CLAS-COL APPARATUS CO.
- ▲ Reostato Type/2PF1010. Variable autotransformer. Staco, Inc. Dayton, Ohio.
- ▲ No. 198574 UNAM
- ▲ Parrilla Fischer Scientific. No. 2169770 UNAM.
- ▲ Balanza. Sartorius, modelo BL 120 S. Max 120g. precisión= 0.1mg.
- ▲ Aparato de extracción al vacío para cartuchos de SPE J.T. Baker.
- ▲ Columnas de filtración de 3mL con filtro dual de 20µm de polietileno. J.T. Baker. Lote G35552.
- ▲ Columna de extracción en fase sólida de sílica gel (SiOH) de 6mL de capacidad (1,000mg por columna). Lote V07551.

◆ Material de vidrio

- ▲ Matraz bola fondo plano de 250mL y refrigerante 24/40
- ▲ Equipo de reflujo Quickfit/Aldrich
 - Matraz bola de 100mL
 - Refrigerante
- ▲ Equipo de reflujo Wheaton
 - Microviales de extracción con fondo cónico de 5mL. Supelco. Inc. USA
 - Micro condensador 80mm rosca de tornillo 13-245
 - Conectores para viales y condensador Wheaton de tornillo 13-245 a 20-400. Aldrich. USA
- ▲ Pipetas graduadas de 1mL y 5mL
- ▲ Pipetas Pasteur
- ▲ Embudos de separación de 250mL
- ▲ Embudo de separación de 50mL
- ▲ Vasos de precipitados de 10. 20 y 50mL

◆ Material volumétrico

- ▲ Matraces aforados de 5mL. Blaubrand, volumen nominal 5.0mL, valor medio 5.0001mL, tolerancia ± 0.0400 mL. Certificado ISO 1042. Número de lote 03.06
- ▲ Matraces aforados de 10mL. Blaubrand, volumen nominal 10ml, valor medio 10.0054mL, tolerancia ± 0.0400 mL. Certificado ISO 1042. Número de lote 03.04
- ▲ Micropipetas de desplazamiento de aire.
 - Pipeta 10-100 μ L. Hamilton. SoftGrifp™. Certificado ISO 9001
 - Pipeta 100-1000 μ L. Hamilton. SoftGrifp™. Certificado ISO 9001
 - Pipeta 0.5-5mL. Transferpette®. Certificado ISO 9001-14001

◆ Instrumento

- ▲ Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia modular marca Shimadzu que permite gradiente de elución consistente de:
 - 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 μ L 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 μ m con porosidad de 100Å.
- ▲ Detector UV-VIS modelo SPD-10AV de longitud de onda variable.

Elección de muestra y técnica de extracción

Después de realizar la revisión bibliográfica, se encontró que el hígado de res contiene una concentración considerable de retinol, lo que permitirá diseñar una técnica apropiada de extracción de la vitamina en su forma de retinol como parte inicial de desarrollo de metodologías para la extracción de vitamina A.

La metodología empleada para la extracción de vitamina A del hígado de res se planteó considerando la información de las diferentes metodologías de extracción de vitamina A en diferentes matrices reportadas en la literatura^{5,6,11,15, 23, 24,25} y en la cual siempre se

plantean una hidrólisis alcalina, extracción con solventes, purificación o limpieza del extracto y concentración del extracto.

La hidrólisis alcalina es necesaria debido a que la vitamina A se encuentra en el hígado de res en forma esterificada con ácidos grasos por lo que se requiere realizar una hidrólisis del enlace éster con KOH en medio alcohólico, para obtener el retinol libre (como alcohol) además de la sal del ácido graso. Además de atacar el enlace éster de la vitamina A, se eliminan pigmentos y otras sustancias que podrían interferir en la determinación de la vitamina A. Al término de la reacción de hidrólisis, la vitamina A como retinol se encuentra en la parte insaponificable (no acuosa), lo cual hace necesaria la extracción líquido-líquido con un solvente de tendencia no polar.

Al realizar la extracción líquido-líquido, no sólo se extrae el retinol, por lo que se debe realizar una limpieza del extracto en una columna de sílica gel o alúmina, tomando en cuenta las posibles interacciones con el retinol, éste puede ser retenido por ambos adsorbentes, por lo tanto tenemos que liberar al retinol, por ello procedemos al lavado de la columna con el solvente apropiado. El extracto se concentra vía evaporación del disolvente de éste, ya que el extracto debe estar disuelto en la fase móvil a utilizar para su análisis en CLAE, en este caso la fase móvil tiene dos componentes metanol-agua, y por lo tanto se disuelve en uno de ellos, y en este caso fue el metanol.

Optimización de condiciones de extracción

Esta parte del trabajo consistió en cuatro etapas, las cuales se describen a continuación.

Primera Etapa

El primer ensayo realizado fue en base a lo encontrado en la literatura^{11, 15, 21, 23-25}, especialmente en la AOAC, modificando en primer lugar el solvente de extracción, ya que en dicho método se utiliza una mezcla de acetona y hexano, éste se cambió a éter etílico considerando que resulta de mayor afinidad para la extracción, información encontrada también en la literatura²⁵. Las cantidades empleadas fueron de acuerdo a lo planteado por la AOAC en cuanto al contenido de vitamina A, en este caso la cantidad de retinol que se espera esté presente en la muestra es alta por lo menos 8,660µg/100g de muestra, por lo tanto se puede pesar de la muestra entre 20-40g, los volúmenes y el material empleados fueron los recomendados por la AOAC (*Fig. 14*) dependiendo de la cantidad que se pesa de la muestra,

por lo tanto se pesaron 20g de la muestra homogeneizada con acetona como indica el método AOAC, se adicionaron 20mL de KOH acuosa al 50% y 80mL de etanol. Considerando que durante la hidrólisis se pueden tener pérdidas de la vitamina A, se adicionó un antioxidante, como lo sugiere la bibliografía⁵ para proteger a éste, el antioxidante elegido fue el ácido ascórbico utilizando 0.6g de acuerdo con lo reportado en la literatura⁶, la mezcla se colocó a reflujo durante 30 min., protegiendo de la luz el sistema con papel aluminio.

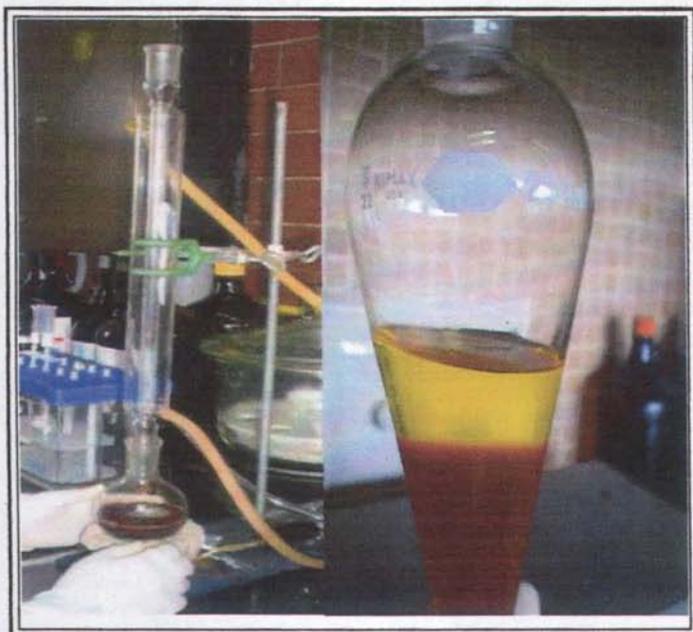


Fig. 14. Equipo utilizado en la extracción de vitamina A, durante la primera etapa, se puede observar la separación de fases.

Para la extracción con solvente, los volúmenes empleados fueron de 50mL realizando tres extracciones; el lavado del extracto para eliminar el alcali remanente se realizó con seis porciones de 40mL empleando una solución de NaCl al 10% con la finalidad de evitar la formación de espuma o emulsión, hecho que sucedió al realizar el lavado sólo con agua, lo que dificulta la separación de las fases. El extracto orgánico obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro.

En la técnica base se sugiere la utilización de una columna de purificación de alúmina, por lo que en esta parte se procedió a emplear la primera modificación con nuevas técnicas de preparación de muestras que nos interesa aplicar, y ésta fue utilizar los cartuchos de

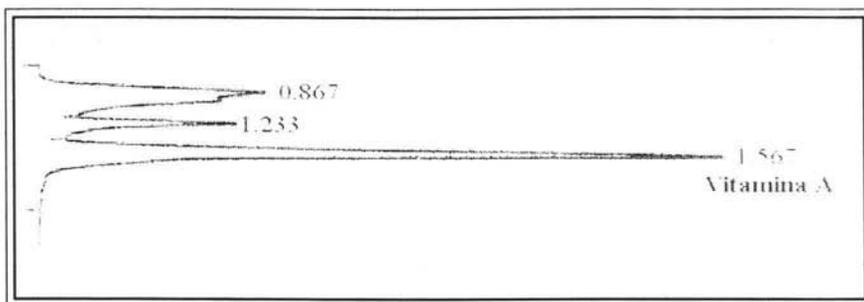
extracción de fase sólida de sílica gel, lo anterior se puede realizar ya que la interacción es parecida a la que presenta el retinol con la alúmina, esto es el retinol al ser un compuesto de tendencia no polar interactuará más fácil con el éter etílico que con la sílica por lo que el retinol pasa a través de la columna sin ser retenido en su totalidad, quedando retenidas partículas de mayor tamaño como esteroides, pigmentos, etc. Dado que el retinol posee una pequeña parte polar puede quedarse una cantidad pequeña de retinol retenido, por ello se realizó el lavado de la columna con el volumen de solvente sugerido por el método base, 50mL con éter etílico (posteriormente al optimizar la metodología se buscaría disminuir el volumen). Después es evaporado el solvente a baño María y se resuspende en metanol.

Como puede observarse las cantidades de reactivos y disolventes empleados en la metodología base y en otras encontradas en la literatura son grandes, lo cual ocasiona contaminación ambiental y puede resultar peligroso. Por lo anterior se busca la optimización de las cantidades empleadas para disminuir la contaminación y el peligro, además de reducir los costos del empleo de reactivos. Además después de realizar las primeras pruebas la cantidad de vitamina A que se puede extraer con este método es muy elevado alrededor de los 35,013µg/100g de muestra, por lo que se puede realizar una disminución de las cantidades empleadas, así como del material.

Por otra parte, al realizar el análisis cualitativo y cuantitativo en los cromatogramas se observa que, aunque la $R_s > 1.5$, la separación de los picos a simple vista es demasiado cercana (*Cromatograma 1*) y en caso de que el hígado que se trabaje tuviese un poco más de vitaminas adyacentes a la de la vitamina A se podría perder dicha resolución, por lo que se realizaron modificaciones en las condiciones cromatográficas de separación a los originalmente planteados en la técnica instrumental²⁸. Para lograr una mayor resolución, los analitos deben ser retenidos más por la fase estacionaria, por lo que se procedió a disminuir el poder de elución, lo cual podemos llevar a cabo modificando la polaridad de la fase móvil. Considerando que la fase estacionaria es no polar y el analito es de esta tendencia, para que permanezca mayor tiempo en la fase estacionaria, la fase móvil debe hacerse más polar, lo cual se logra al aumentar la proporción del solvente polar en la mezcla empleada como fase móvil, en este caso es el agua.

De lo anterior se fue modificando la relación de metanol/agua que se utiliza como fase móvil hasta obtener una mejor resolución en la base de los picos cromatográficos realizando el cálculo de éste, para esto se siguieron las siguientes modificaciones en la relación de los disolventes pero dejando constantes todos los demás parámetros cromatográficos planteados inicialmente:

a) Fase móvil : 95% Metanol – 5%Agua (condiciones originales)



Cromatograma 1. Separación en las condiciones originales.

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

donde :

tr_0 = tiempo muerto = 0.867min

tr_1 = tiempo de retención del analito 1 = 1.233min

tr_2 = tiempo de retención del analito 2 = 1.567min

$$tr'_1 = tr_1 - t_0$$

$$tr'_1 = 1.233 - 0.867 = 0.366 \text{ min}$$

$$tr'_2 = 1.567 - 0.867 = 0.7 \text{ min}$$

$$W_{1/2}h_1 = \left(\frac{6.2 \text{ seg} \times 1 \text{ min}}{60 \text{ seg}} \right) (0.9394) = 0.097 \text{ min}^*$$

$$W_{1/2}h_2 = \left(\frac{7 \text{ seg} \times 1 \text{ min}}{60 \text{ seg}} \right) (0.9394) = 0.109 \text{ min}$$

* Para obtener el ancho a la mitad de la altura ($W_{1/2}h$) corregido, el valor que nos proporciona el integrador utilizado se tiene que multiplicar por el factor 0.9394, dado que es el valor real al realizar la triangulación del pico.

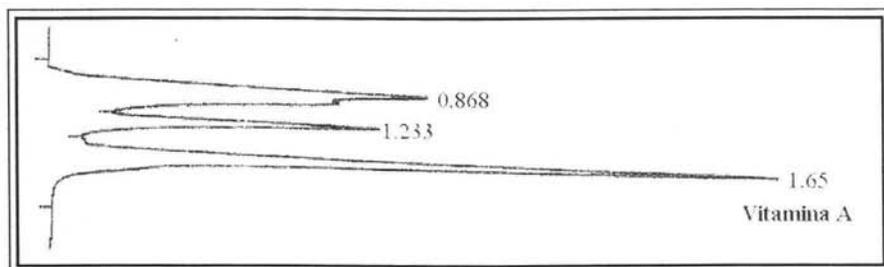
$$R_s = \frac{1.2(0.7 - 0.366)}{0.097 + 0.109}$$

$$R_s = \frac{1.2(0.334)}{0.206}$$

$$R_s = 1.94$$

Se realizaron los mismos cálculos de resolución a las modificaciones cambiando el porcentaje de agua en la fase móvil a 6%, 7%, 8% y 9% obteniendo las siguientes condiciones:

b) Fase móvil: 94% Metanol – 6% Agua



Cromatograma 2. Separación con la mezcla 94:6.

donde:

$$tr_0 = 0.868 \text{ min}$$

$$tr_1 = 1.233 \text{ min}$$

$$tr_2 = 1.65 \text{ min}$$

$$tr'_1 = 1.233 - 0.868 = 0.365 \text{ min}$$

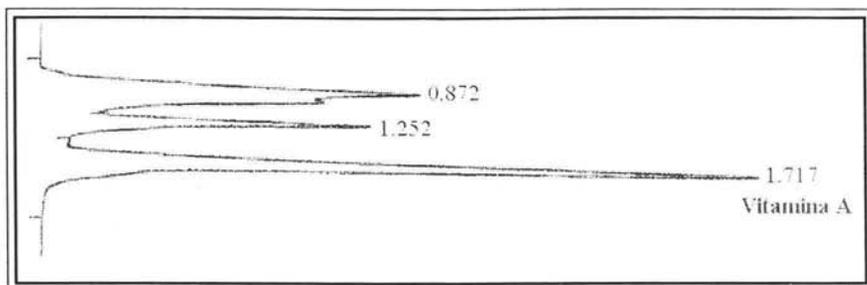
$$tr'_2 = 1.65 - 0.868 = 0.782 \text{ min}$$

$$W_{\frac{1}{2}h_1} = 0.1111 \text{ min}$$

$$W_{\frac{1}{2}h_2} = 0.1189 \text{ min}$$

$$R_s = 2.2$$

c) Fase móvil: 93% Metanol – 7% Agua



Cromatograma 3. Separación con la mezcla 93:7.

donde:

$$tr_0 = 0.872 \text{ min}$$

$$tr_1 = 1.252 \text{ min}$$

$$tr_2 = 1.717 \text{ min}$$

$$tr'_1 = 1.252 - 0.872 = 0.38 \text{ min}$$

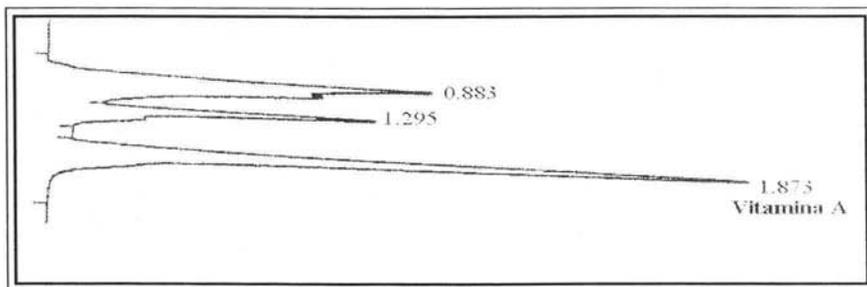
$$tr'_2 = 1.717 - 0.872 = 0.845 \text{ min}$$

$$W_{\frac{1}{2}h_1} = 0.1096 \text{ min}$$

$$W_{\frac{1}{2}h_2} = 0.1237 \text{ min}$$

$$R_s = 2.4$$

d) Fase móvil: 92% Metanol – 8% Agua



Cromatograma 4. Separación con la mezcla 92:8.

donde:

$$tr_0 = 0.883 \text{ min}$$

$$tr_1 = 1.295 \text{ min}$$

$$tr_2 = 1.873 \text{ min}$$

$$tr'_1 = 1.296 - 0.883 = 0.412 \text{ min}$$

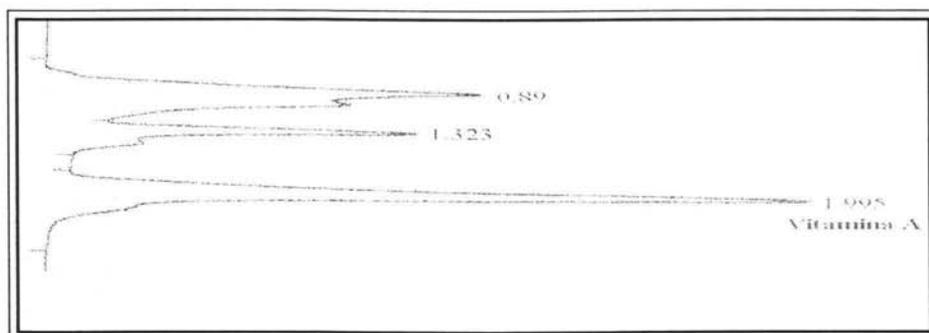
$$tr'_2 = 1.873 - 0.883 = 0.99 \text{ min}$$

$$W_{1/2}h_1 = 0.1159 \text{ min}$$

$$W_{1/2}h_2 = 0.1284 \text{ min}$$

$$Rs = 2.8$$

e) Fase móvil: 91% Metanol – 9% Agua



Cromatograma 5. Separación con la mezcla 91:9.

donde:

$$tr_0 = 0.89 \text{ min}$$

$$tr_1 = 1.323 \text{ min}$$

$$tr_2 = 1.995 \text{ min}$$

$$tr'_1 = 1.323 - 0.89 = 0.433 \text{ min}$$

$$tr'_2 = 1.995 - 0.89 = 1.105 \text{ min}$$

$$W_{1/2}h_1 = 0.1299 \text{ min}$$

$$W_{1/2}h_2 = 0.1378 \text{ min}$$

$$Rs = 3.0$$

Con lo anterior se decide trabajar con la fase móvil de 92% metanol – 8% agua por obtener una buena resolución y un tiempo de análisis corto observando los picos adyacentes a la vitamina A del cromatograma separados de ésta (*Cromatograma 4*), lo que permitirá cuantificar adecuadamente a la vitamina A. Con este cambio de condiciones de la fase móvil es necesario elaborar la curva patrón a las nuevas condiciones para comprobar que el sistema sigue siendo lineal, posteriormente se describirá como se realizó esta prueba.

Al obtener esta información se procedió a cuantificar a las muestras y como ya se mencionó anteriormente al observar que con las cantidades utilizadas de muestra y reactivos planteadas inicialmente se extrae una cantidad considerable de retinol (13,783 μ g de retinol/100g de hígado de res), se decide realizar la siguiente etapa de optimización para disminuir en lo posible la cantidad de muestra, disolventes y reactivos.

Segunda Etapa

La segunda etapa experimental fue la reducción de volúmenes y del material de vidrio para el tratamiento de la muestra en un equipo Quickfit de Aldrich (*Fig. 15*), las cantidades de los reactivos fueron reducidas a la mitad con respecto al utilizado en la primera etapa, planteándose el procedimiento con las siguientes cantidades: 10g de muestra, 10mL de la disolución de KOH, 40mL etanol, 0.03g de ácido ascórbico, 25mL de éter para cada extracción y 50mL de solución NaCl al 10% (para cada uno de los tres lavados) y 25mL para el lavado de la columna de EFS. Como se logró la extracción de la vitamina A con buena concentración (38,805 μ g de retinol/100g de hígado de res) se decidió que se pueden reducir más los volúmenes.

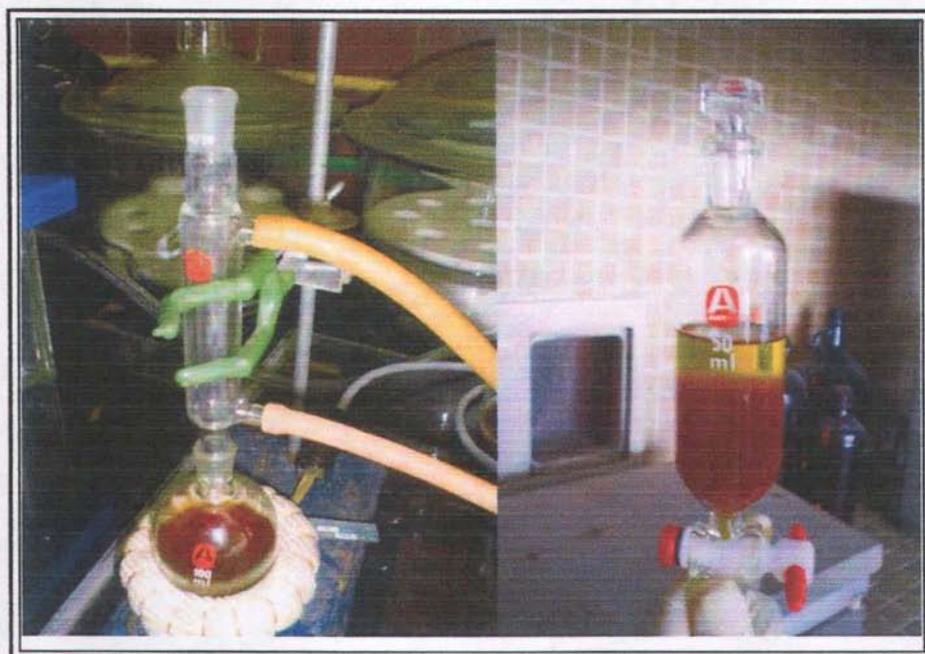


Fig. 15. Equipo utilizado en segunda etapa de optimización, nótese la diferencia de volumen con el presentado en la etapa 1.

Tercera Etapa

En la tercera etapa el material utilizado fue el sistema de extracción de marca Wheaton el cual consiste en material mas reducido en cuanto al tamaño (y por lo tanto volumen) de las diferentes partes que lo conforman, como por ejemplo viales donde se realizan las reacciones, extracciones, etc., con capacidad de 5mL.

Los volúmenes son mucho menores que en la etapa 1 utilizando 0.5g de muestra homogeneizada, 0.5mL de KOH acuosa al 50%, 1mL de etanol, 0.0250g de ácido ascórbico, 2mL de éter etílico para cada extracción, 6mL de NaCl al 10% y 6mL para lavar columna; con lo que se reduce la contaminación y el peligro relacionado con el éter etílico, además de que el tiempo de análisis disminuyó a 1.5hrs para la muestra. Cabe mencionar que durante esta etapa se tuvieron problemas con los volúmenes para la extracción con éter etílico por lo que se optimizaron dada la capacidad de los viales empleados. Además durante el secado del extracto se presentaron problemas al adicionar de manera directa al sulfato de sodio anhidro, por lo que se optimizó el secado elaborando columnas de sulfato de sodio anhidro donde se vierte el extracto para eliminar el agua que pudo haber quedado después del lavado con la disolución de NaCl al 10%.

La concentración de retinol obtenida en el hígado de res fue de 20,082µg de retinol/100g de hígado de res, por lo que al disminuir las cantidades empleadas de muestra, disolventes y reactivos, se puede extraer con éxito al retinol, decidiendo que era el método de extracción que se validaría, ya que cumple parte de los objetivos planteados que es el disminuir la cantidad de muestra, reactivos y por lo tanto los residuos de cada etapa.

Cuarta Etapa

En esta etapa se procedió a la optimización del método empleando el equipo Wheaton, dando lugar al siguiente procedimiento de extracción de vitamina A, el cual fue validado:

1) Preparación de la muestra.

Hígado de res.

La muestra es adquirida en una cantidad de 500g, se guarda en una bolsa de plástico oscura para protegerla de la luz y se refrigera. Antes del análisis se pone a temperatura ambiente.

Se toman 200g representativos de la muestra que fue cortada en trozos pequeños (aprox. 1cm^3), se colocan en la licuadora con 40mL de acetona, se homogeneiza en velocidad 1 durante 30seg.



Fig. 16. Homogeneización de la muestra

2) Hidrólisis alcalina

Se pesan aproximadamente 0.5g de muestra homogeneizada y se colocan en un vial de 5mL (Fig. 17), se adicionan 0.5mL de KOH acuosa al 50%, 1mL de etanol y 0.025g de ácido ascórbico. La mezcla anterior se coloca a reflujo por 30min en una parrilla de calentamiento. Al término del reflujo se deja enfriar a temperatura ambiente o en baño de agua.^a

^a El vial se protege de la luz envolviendo con papel aluminio o bien con una hoja de color negro. En la parrilla empleada el nivel de calentamiento es en el No. 3, manteniéndose durante el reflujo. Por otra parte, el conteo del tiempo de reflujo inicia a partir de que éste comience. Controlar la ebullición para evitar derrames y por tanto pérdidas.



Fig. 17. Hidrólisis alcalina.

3) Extracción

Se adiciona 1mL de éter etílico a la solución hidrolizada (Fig. 18). Se extrae por agitación durante 2 min (frecuencia de 4 movimientos/seg en posición vertical)^b, con pausas para dejar salir los vapores. Se separa la fase orgánica (capa superior) dejando reposar por 4min y se transfiere a otro vial que contenga 0.01g de ácido ascórbico. Se realizan dos extracciones más y se juntan las fracciones orgánicas.

El extracto etéreo se lava 3 veces, cada una con 2mL de la solución de cloruro de sodio al 10%. El primer lavado se realiza con 4 movimientos/seg manteniendo el vial en forma vertical, y 4min de reposo, el segundo la agitación es más suave realizando 2 movimientos/seg y en el tercero el vial se coloca en forma horizontal y la agitación es de forma suave con 2 movimientos/seg. Se separan las fases descartando la fase acuosa (capa inferior).^c

^b La agitación se recomienda que se realice en la posición que se muestra en la Fig.18, realizando el movimiento sólo con la mano.

^c Los movimientos sugeridos es con la finalidad de evitar la formación de emulsión, lo que dificultaría la separación. En caso de tener dicho problema, se puede agregar un poco de sal y agitar un poco, y esperar que separen las fases. Durante el reposo proteger de la luz. Los lavados serán necesarios hasta que la solución de lavado (soluc. NaCl 10%) tenga pH de 7.



Fig. 18. La extracción se realiza en el mismo vial donde se realizó la hidrólisis.

El extracto etéreo es vertido en una columna que contenga 2.5g de sulfato de sodio anhidro (la columna debe estar conectada al vacío), se pasa el extracto a través de la columna y posteriormente se lava con 6mL de éter etílico.^d

^d De no realizar este lavado puede quedarse atrapado un poco de retinol, lo cual se traduce a pérdidas.



Fig. 19. Aparato de extracción al vacío utilizado para la EFS, al cual se conectan las columnas de sulfato de sodio anhidro y sílica gel.

4) Purificación

El extracto seco se purifica en una columna de extracción en fase sólida de sílica gel (Fig. 20) previamente acondicionada con 5mL de éter etílico. Después de verter el extracto, la columna se lava con 6mL de éter etílico.^c

^c La columna se acondiciona haciendo pasar el solvente a través de la columna, dejando un poco de solvente por encima de la superficie, no dejar que la columna se seque. El flujo del solvente y extracto a través de la columna es importante para que se pueda tener una interacción adecuada y se logre en el caso del solvente una solvatación completa de la columna y una purificación del extracto exitosa. Un flujo rápido no es conveniente.



Fig. 20. Columna de purificación conectada a vacío.

5) Concentración

Al extracto purificado se le adiciona 0.01g de ácido ascórbico y se somete a evaporación en baño de agua caliente (85°C aprox.), hasta 0.5mL aprox., se resuspende en 1mL de metanol y se afora a 5mL.^f

El extracto de la muestra se analiza en CLAE, o bien se guarda en refrigeración protegido de la luz para su análisis posterior, por no más de 17 días.

6) Cuantificación

La muestra se analizó en el CLAE bajo las siguientes condiciones:

- ◇ Columna empacada de fase inversa químicamente unida de Nucleosil C-18 de 150mm de longitud x 4mm de d.i. con tamaño de partícula de 5µm y 100Å de porosidad.
- ◇ Fase móvil: 92% Metanol-8% Agua.
- ◇ Flujo: 2mL/min.
- ◇ Volumen de inyección de muestra: 10µL.
- ◇ Detector UV a una $\lambda=325\text{nm}$

^f Durante esta etapa debe protegerse de la luz. Realizar en campana.

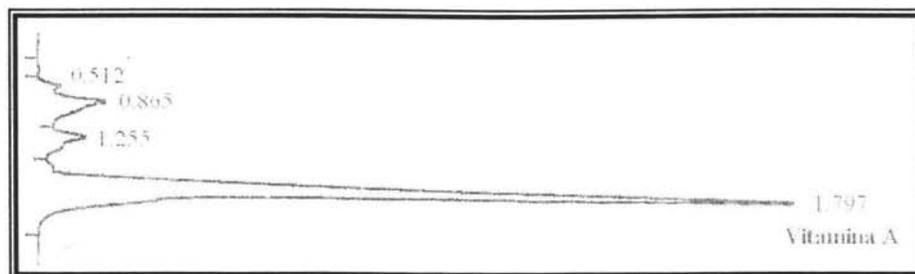


Fig. 21. Cromatograma del extracto de hígado de res.

La metodología establecida para ser validada se encuentra de manera completa como diagrama en el Anexo 2.

Validación

Los datos que se obtuvieron en el desarrollo experimental se sometieron a las pruebas necesarias para ser validado ya explicadas en los antecedentes.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema se obtuvo realizando 8 soluciones estándar de retinol en metanol de 1 a 100ppm, se inyectaron por triplicado obteniéndose la curva patrón, la cual se sometió a pruebas estadísticas para comprobar que se tiene la linealidad y tendencia al origen.

Preparación de las soluciones de retinol

Se pesaron 9.5mg del estándar de retinol y se aforó a un volumen de 10mL con metanol, obteniéndose una solución madre de 950ppm (mg/L). De la solución madre se tomaron ocho diferentes alícuotas (10, 50, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 μ L) con las micropipetas para obtener las concentraciones de: 0.95, 4.75, 9.5, 19, 38, 57, 76, 95ppm (mg/L) en matraces aforados de 10mL.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

La precisión del sistema se determinó preparando siete soluciones de 8.08ppm y siete de 50.53ppm e inyectando por triplicado, para las cuales se pesaron 16.3mg de retinol y se aforaron a un volumen de 10mL con metanol, obteniéndose una solución madre de 1,630ppm; se tomó una alícuota de 5mL y se aforó a un volumen de 10mL con metanol, obteniendo una solución secundaria de concentración de 815ppm. A partir de la solución secundaria se tomaron siete alícuotas de 0.62mL cada una, aforando a un volumen de 10mL con metanol, obteniéndose las siete soluciones estándar de 50.53ppm.

Para las soluciones de 8.08ppm se tomó una alícuota de 0.62mL de la solución madre y se aforó a un volumen de 10mL con metanol, obteniendo una solución secundaria de concentración de 101ppm. De esta solución se tomaron siete alícuotas iguales de 0.8mL y cada una se aforó a un volumen de 10mL con metanol, obteniéndose siete soluciones estándar de 8.08ppm.

PRECISIÓN DEL MÉTODO

En este caso por realizarse el desarrollo de un método completo la precisión se determinará como el estudio estadístico de repetibilidad y reproducibilidad.

A) REPETIBILIDAD

Se emplearon tres muestras de hígado, cada una se trabajó en dos porciones de muestra por día, durante tres días en una semana e inyectando los extractos obtenidos por triplicado, lo anterior lo realizó un mismo analista (analista 1, la que escribe), con los mismos reactivos, aparatos e instrumento.

B) REPRODUCIBILIDAD

Para evaluar la reproducibilidad, un segundo analista realizó por duplicado (inyectando por sextuplicado) la extracción de vitamina A, siguiendo el método establecido, y utilizando una muestra de hígado anteriormente procesada por el analista 1. Los resultados se sometieron a pruebas estadísticas para saber si los resultados que obtiene este analista 2 se pueden relacionar con los resultados obtenidos por el analista 1 al utilizar el mismo método.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

También se realizó el estudio de estabilidad de los extractos obtenidos que contienen a la vitamina A extraída de la muestra cuando ésta es almacenada, lo anterior para conocer el tiempo que se puede esperar antes de realizar el análisis cualitativo y cuantitativo en el sistema cromatográfico. Para ello una de las disoluciones obtenidas de los extractos de las de muestras trabajadas después de su análisis por la CLAE se guardó en refrigeración, en viales de color ámbar y selladas, cada semana se cuantificó el analito por un período de 17 días (inyectando por triplicado), se realizó el estudio estadístico para determinar si no existen cambios y por lo tanto conocer el tiempo mínimo para poder inyectar las muestras en el CLAE.

RECOBRO

A una muestra de hígado de res ("Muestra 3") a la cual se le determinó la cantidad de retinol por la metodología propuesta se le adicionó una cantidad de retinol que le sumará $23,338\mu\text{g}/100\text{g}$ a la cantidad encontrada en el hígado de res previamente analizado; posteriormente esta muestra adicionada fue procesada mediante el método propuesto para su cuantificación, realizando la metodología por sextuplicado e inyectando por triplicado cada extracto. El cálculo se realizó haciendo una comparación de la cantidad de retinol que se debía obtener considerando ahora la adición de retinol, además de la ya encontrada en la muestra sin adición, obteniéndose el resultado del porcentaje de recobro.

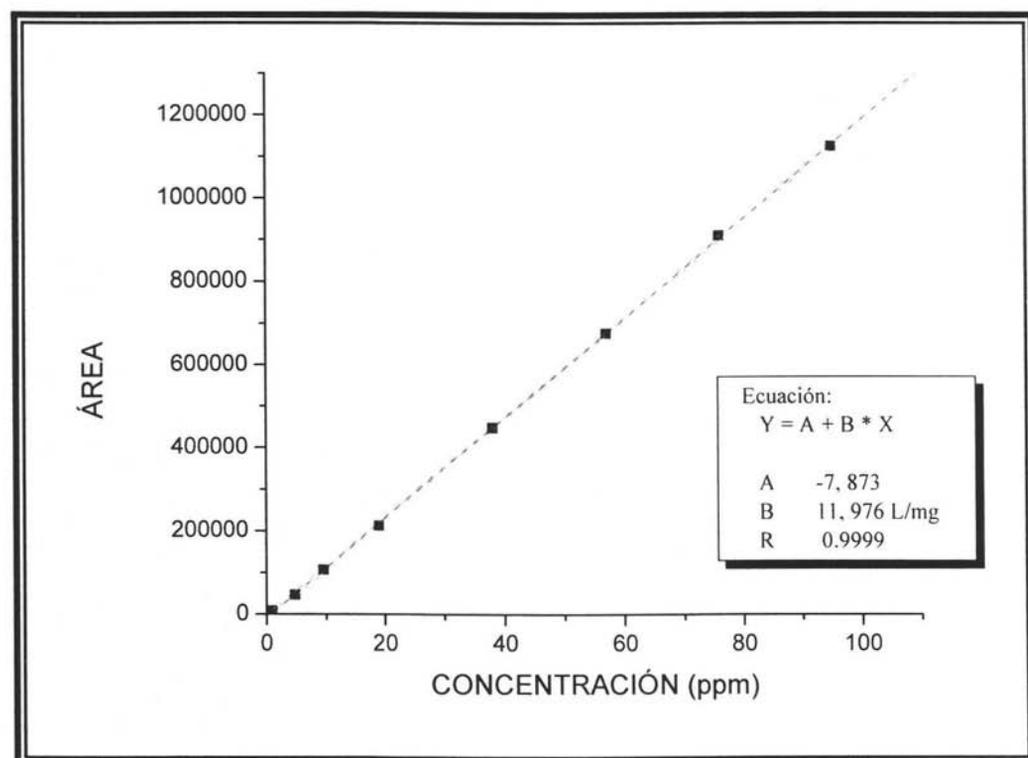
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En esta parte hay que indicar que en el Anexo I de esta tesis se encuentran las impresiones de las hojas Excel con los datos y cálculos obtenidos para cada una de las pruebas y que permite llegar a las conclusiones que se presentan y analizan a continuación. Los valores presentados en este capítulo, en algunos casos están redondeados.

El método a validar se encuentra resumido en el Anexo 2.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

Con este experimento se demuestra que la relación entre el área obtenida y la concentración del analito tiende a una línea recta, es decir son proporcionales. Así, se obtuvo la siguiente gráfica de los resultados anotados debajo de ésta y que fueron procesados para determinar la linealidad del sistema.



Gráfica 1. Curva patrón de vitamina A (retinol) en metanol en un intervalo de 1 a 100ppm aproximadamente.

Tabla 5. Datos de las disoluciones estándar para la regresión lineal

Concentración (ppm)	Área	Área	Área
0.95	8,387	8,497	8,392
4.75	46,634	47,003	46,448
9.50	107,845	104,587	107,436
19.0	212,903	213,127	212,017
38.0	448,499	448,493	446,371
57.0	679,706	669,688	678,848
76.0	911,540	907,847	908,809
95.0	1,129,835	1,111,108	1,132,820

Obteniéndose los siguientes datos de la regresión lineal:

Pendiente: $11,976\text{ppm}^{-1}$

Ordenada: $-7,873$

Coefficiente de correlación: 0.9999

Como se puede observar en la gráfica obtenida se presenta una tendencia lineal en nuestro sistema (es mayor a 0.98) y además parece que tiende al origen.

Por lo observado anteriormente se procedió a realizar la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen:

$H_0: b = \beta$, donde $\beta = 0$

$H_1: b \neq \beta$

La prueba estadística utilizada es la "t de student" tomando un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$) y 22 grados de libertad ($n - 2$).

$$t_{cal} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + nX^2}}$$

La condición para rechazar la H_0 es que:

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

de donde $t_{\alpha/2 (0.025, 22)} = 2.074$

$$X = 37.525$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 626,667.12$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 8.99 \times 10^{+13}$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right) = 7.51 \times 10^{+9}$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 6,154.44$$

$$t_{\text{cal}} = -6.104$$

Con lo anterior se tiene que $-6.104 < -2.074$, por lo que se rechaza la hipótesis nula, así la ordenada al origen es diferente de cero, pero tiene tendencia lineal nuestro sistema. Por lo anterior, la ecuación de la curva de patrón a utilizar fue:

$$Y (\text{Área}) = 11,976 * X (\text{Conc.}) + (-7.873)$$

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

Para la ordenada

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

$$IC = -7,873 \pm 3,946$$

$$-11,819 < -7,873 < -3,926$$

Para la pendiente

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

$$IC = 11,976 \pm 79$$

$$11,897 < 11,976 < 12,055$$

PRECISIÓN DEL SISTEMA

Este experimento se realizó para conocer el grado de concordancia de los resultados obtenidos de diferentes mediciones para estándares de 8 y 50ppm aprox.

Para concentraciones bajas

Tabla 6. Resultados de la disolución de concentraciones bajas.

Conc.(ppm)	Área	Conc.(ppm)	Área
8.08	100,874	8.08	100,537
8.08	107,303	8.08	102,957
8.08	101,082	8.08	105,922
8.08	100,214	8.08	103,623
8.08	103,322	8.08	103,655
8.08	107,290	8.08	108,110
8.08	101,427	8.08	103,299
8.08	99,932	8.08	100,374
8.08	102,010	8.08	103,271
8.08	98,851	8.08	100,760
8.08	99,533		

n	21
Media	102,588
s exp	2,694
s² exp	7,256,547
%CV exp	2.63
%CV teórico	5
s teórica	5,129
s² teórica	26,310,696

La prueba de hipótesis que se plantea para este caso es:

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

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

En esta prueba se plantea una hipótesis relativa a la varianza, donde el estadístico a utilizar es la prueba:

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

donde:

n = número de datos = 21

s² = varianza experimental = 7, 256, 547

σ_o² = varianza contra la que se va a comparar = 26, 310, 696

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

$$\text{la } \chi_{\alpha, n-1}^2 = \chi_{0.05, 20}^2 = 31.41$$

y aplicando la ecuación:

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(21-1)7,256,547}{26,310,696}$$

$$\chi_{cal}^2 = 5.52$$

Con lo anterior se puede concluir, que $5.52 < 31.41$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, por lo que se tiene una precisión con un C.V. del 5% como máximo.

Al trabajar los mismos datos para buscar cual fue el valor más pequeño de error que se obtenía se encontró que era del 3% sobre el C.V.

Se realizó el cálculo de intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar s :

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

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para s con el mismo nivel de significancia:

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

$$\chi_{(1-\alpha/2)}^2 = \chi_{0.975,20} = 9.59$$

$$\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025,20} = 34.17$$

$$\sqrt{\frac{(20)7,256,547}{34.17}} < s < \sqrt{\frac{(20)7,256,547}{9.59}}$$

$$2,061 < 2,694 < 3,890$$

Para concentraciones altas

Tabla 7. Resultados de la disolución de concentraciones altas.

Conc.(ppm)	Área	Conc.(ppm)	Área
50.53	659,216	50.53	652,089
50.53	672,794	50.53	622,662
50.53	685,817	50.53	640,967
50.53	631,844	50.53	633,257
50.53	620,863	50.53	651,283
50.53	626,607	50.53	667,012
50.53	642,150	50.53	628,052
50.53	669,543	50.53	597,982
50.53	667,861	50.53	624,719
50.53	641,816	50.53	639,130
50.53	636,222		

n	21
Media	643,423
s exp	21,300
s² exp	453,689,916
%CV exp	3.31
%CV teórico	5
s teórica	32,171
s² teórica	1,034,983,352

La prueba de hipótesis que se plantea para este caso es:

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

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

Nuevamente se plantea una hipótesis relativa a una varianza, donde el estadístico a utilizar es:

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

donde:

n = número de datos = 21

s^2 = varianza experimental = 453, 689,916

σ_0^2 = varianza contra la que se va a comparar = 1, 034, 983, 352

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

$$\chi^2_{cal.} > \chi^2_{\alpha, n-1}$$

$$\chi^2_{\alpha} = \chi^2_{0.05, 20} = 31.41$$

$$\chi^2_{cal} = \frac{(21-1)453,689,916}{1,034,983,352}$$

$$\chi^2_{cal} = 8.77$$

Con lo anterior se puede concluir, que $8.77 < 31.41$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, por lo que el sistema es preciso para concentración alta con un error máximo del 5% de C.V.

Al trabajar los mismos datos para buscar cual fue el valor más pequeño de error que se obtenía se encontró que era del 3% sobre el C.V.

Se realizó el cálculo de intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar s :

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

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para s con el mismo nivel de significancia:

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

$$\chi^2_{(1-\alpha_2)} = \chi^2_{0.975, 20} = 9.59$$

$$\chi^2_{\alpha_2} = \chi^2_{0.025, 20} = 34.17$$

$$\sqrt{\frac{(20)453,689,916}{34.17}} < s < \sqrt{\frac{(20)453,689,916}{9.59}}$$

$$16,296 < 21,300 < 30,760$$

PRECISIÓN DEL MÉTODO

1) REPETIBILIDAD

En este experimento se obtuvieron datos para cada una de las muestras para poder conocer la repetibilidad del método para una misma muestra y posteriormente se reunieron los datos de las tres muestras para entender la dificultad que se puede presentar por la variación biológica presentada por cada animal.

Muestra 1

Tabla 8. Resultados del hígado de res "Muestra 1"

Concentración (µg retinol/100g de hígado de res)	
71,423	84,222
71,358	84,006
73,357	84,260
78,495	79,398
78,332	79,137
79,109	78,101
75,354	88,022
76,600	87,514
77,700	87,582

n	18
Media	79,665
s exp	5,256
s² exp	27,626,485
%CV exp	6.59
%CV teórico	6
s teórica	4,780
s² teórica	22,847,441

Esta muestra fue trabajada posterior a la optimización de la metodología de preparación de muestra, al procesar estadísticamente la información obtenida de este hígado, se obtuvo un coeficiente de variación (C.V.) del 6% de los datos obtenidos, éste fue el valor que se toma para realizar la prueba de hipótesis para esta muestra de hígado.

Como en el caso de la precisión del sistema se plantea una hipótesis relativa a una varianza, donde el estadístico a utilizar es:

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

donde:

n = número de datos = 18

s² = varianza experimental = 27, 626,485

σ²_o = varianza contra la que se va a comparar = 22, 847,441

La prueba de hipótesis que se plantea para el caso de repetibilidad del método es:

H₀: s² = σ²_o, donde σ²_o es 22,847,441

H₁: s² > σ²_o

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es:

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

$$\chi_{\alpha}^2 = \chi_{0.05, 17}^2 = 27.59$$

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(18-1)27,626,485}{22,847,441}$$

$$\chi_{cal}^2 = 20.56$$

Con lo anterior se puede concluir, que $20.56 < 27.59$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula, por lo que el método fue repetible para la muestra 1 con un C.V. del 6% como máximo.

Lo anterior nos da un valor de partida para considerar que con un mayor entrenamiento en la metodología utilizada se obtendrá una mejor repetibilidad por parte del analista, lo contrario sucederá en caso de que el analista pierda ese entrenamiento.

Una vez realizado el cálculo anterior se realizó el cálculo de intervalo de confianza al 95% de nivel de significancia para la desviación estándar s :

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

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad obtenemos el intervalo de confianza para s con el mismo nivel de significancia:

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

$$\chi_{(1-\alpha/2)}^2 = \chi_{0.975,17}^2 = 7.6$$

$$\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025,17}^2 = 30.2$$

$$\sqrt{\frac{(17)27,626,485}{30.2}} < s < \sqrt{\frac{(17)27,626,485}{7.6}}$$

$$3,934 < 5,256 < 7,861$$

Se trabajó el cálculo de intervalo de confianza (con un 95% de nivel de significancia) para la “Muestra 1”:

$$I.C. = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0,025,17} = 2.11$$

$$I.C. = 79,665 \pm 2.11 \frac{5,256}{\sqrt{18}} = \pm 2,614$$

Por lo tanto el resultado en la “Muestra 1” fue de:

79,665 ± 2,614 µg de retinol/100g de hígado de res.

Muestra 2

Tabla 9. Resultados del hígado de res “Muestra 2”

Concentración (µg retinol/100g de hígado de res)	
30,522	29,595
30,357	29,673
30,169	30,004
28,949	29,775
28,735	30,003
28,925	29,724
28,144	29,642
28,361	29,277
28,509	29,376

n	18
Media	29,430
s exp	696
s ² exp	484,340
%CV exp	2.36
%CV teórico	2
s teórica	589
s ² teórica	346,451

En el caso de esta muestra el analista ya cuenta con una mayor habilidad en el trabajo y no ha dejado lapsos de tiempo sin trabajar con la metodología, por lo que es lógico que se obtuviera un C.V. del orden del 2%.

Por lo tanto se repite la misma prueba de hipótesis que se planteó para la “Muestra 1” pero ahora con ése valor de C.V.:

$$H_0: s^2 = \sigma_o^2, \text{ donde } \sigma_o^2 \text{ es } 346,451$$

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

El criterio para rechazar la hipótesis nula es:

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

$$\chi^2_{\alpha} = \chi^2_{0.05, 17} = 27.59$$

$$\chi^2_{cal} = \frac{(18-1)484,340}{346,451}$$

$$\chi^2_{cal} = 23.77$$

Con lo anterior se puede concluir, que $23.77 < 27.59$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y el método para la “Muestra 2” es preciso con un C.V. del 2% como máximo, y que nos indica como era de esperarse que el analista ha obtenido una mayor habilidad de trabajo y eso mejora su repetibilidad.

Se realiza el cálculo del intervalo de confianza para la desviación estándar:

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

$$\chi^2_{(1-\alpha/2)} = \chi^2_{0.975,17} = 7.6$$

$$\chi^2_{\alpha/2} = \chi^2_{0.025,17} = 30.2$$

$$\sqrt{\frac{(17)484,340}{30.2}} < s < \sqrt{\frac{(17)484,340}{7.6}}$$

$$522 < 696 < 1,041$$

También se trabajó el cálculo de intervalo de confianza (con un 95% de nivel de significancia) para la “Muestra 2”:

$$I.C. = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0.025,17} = 2.11$$

$$I.C. = 29,430 \pm 2.11 \frac{696}{\sqrt{18}} = \pm 346$$

Por lo tanto el resultado de la “Muestra 2” fue de:

$$29,430 \pm 346 \mu\text{g de retinol}/100\text{g de hígado de res.}$$

Muestra 3

Tabla 10. Resultados del hígado de res "Muestra 3"

Concentración (µg retinol/100g de hígado de res)	
71,096	73,948
71,728	78,488
72,021	79,024
63,133	72,940
63,905	70,794
63,659	72,442
79,214	76,251
80,414	77,651
80,429	72,610

n	18
Media	73,319
s exp	5,559
s² exp	30,900,335
%CV exp	7.58
%CV teórico	6
s teórica	4,399
s² teórica	19,352,546

En el caso de esta muestra el analista dejó de realizar por un mes la metodología, por lo que se esperaba que su C.V. aumentara, como puede observarse en la tabla éste fue del orden del 6%, y con este valor realizaremos la prueba estadística correspondiente.

La prueba de hipótesis que se plantea para el caso de precisión del método es:

$$H_0: s^2 = \sigma_o^2, \text{ donde es } 19,352,546$$

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

El criterio para rechazar la hipótesis nula es:

$$\chi^2_{\text{cal}} > \chi^2_{\alpha, n-1}$$

$$\chi^2_{\alpha} = \chi^2_{0.05, 17} = 27.59$$

$$\chi_{cal}^2 = \frac{(18-1)30,900,335}{19,352,546}$$

$$\chi_{cal}^2 = 27.14$$

Con lo anterior se puede concluir, que $27.14 < 27.59$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y el método para la "Muestra 3" es preciso con un C.V. del 6% como máximo.

Como se puede observar la falta de entrenamiento en el desarrollo de la metodología de preparación de muestra lleva a aumentar el error en el análisis de la vitamina a en la muestra de hígado, lo que sí nos indica es que para el peor de los casos el error sería del 6% como máximo para el analista.

En este caso también se realiza el cálculo del intervalo de confianza para la desviación estándar:

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

$$\chi_{(1-\alpha/2)}^2 = \chi_{0.975,17} = 7.6$$

$$\chi_{\alpha/2}^2 = \chi_{0.025,17} = 30.2$$

$$\frac{(17)30,900,335}{30.2} < s < \sqrt{\frac{(17)30,900,335}{7.6}}$$

$$4,171 < 5,559 < 8,314$$

También se trabajó el cálculo de intervalo de confianza (con un 95% de nivel de significancia) para la "Muestra 3":

$$I.C. = x \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0,025,17} = 2.11$$

$$\text{I.C.} = 73,319 \pm 2.11 \frac{5,559}{\sqrt{18}} = \pm 2,764$$

Por lo tanto el resultado de la “Muestra 3” fue de:

$$73,319 \pm 2,764 \mu\text{g de retinol}/100\text{g de hígado de res.}$$

De los estudios realizados en cada muestra se encuentra que la metodología es repetible y que en el caso del analista que la diseño tiene un intervalo de repetibilidad que varía de 2 al 6%.

También se puede observar que en estas 3 muestras se obtuvieron concentraciones diferentes de vitamina A, lo cual era esperado ya que se emplearon tres muestras de diferentes animales, estas variaciones se deben principalmente a las diferencias biológicas entre las fuentes de la muestra (donde fueron criadas las reses), por lo que la determinación de retinol considerando a todas las muestras tendrá un C.V. mucho más alto. A continuación se presentan los resultados que se obtienen para las tres muestras en conjunto, con lo cual se confirma lo mencionado anteriormente:

Muestras totales

Tabla 11. Resultados para las tres muestras de hígado de res.

Concentración (μg retinol/100g de hígado de res)			
71,423	78,101	29,673	79,214
71,358	88,022	30,004	80,414
73,357	87,514	29,775	80,429
78,495	87,582	30,003	73,948
78,332	30,522	29,724	78,488
79,109	30,357	29,642	79,024
75,354	30,169	29,277	72,940
76,600	28,949	29,376	70,794
77,700	28,735	71,096	72,442
84,222	28,925	71,728	76,251
84,006	28,144	72,021	77,651
84,260	28,361	63,133	72,610
79,398	28,509	63,905	
79,137	29,595	63,659	

n	54
Media	60,805
s exp	22,962
s² exp	527,238,438
%CVexp	37,76

2) REPRODUCIBILIDAD

Para evaluar la reproducibilidad, un segundo analista (compañera del laboratorio) realizó por duplicado la metodología planteada, utilizando la "Muestra 1" de hígado de res empleado por el analista 1 (la que escribe esta tesis) y obteniendo los siguientes resultados:

Analista 2

Tabla 12. Resultados del hígado de res "Muestra 1", obtenida por el Analista 2

Concentración (µg retinol/100g de hígado de res)	
90,339	62,496
89,699	62,253
90,051	61,887
90,382	61,972
90,230	61,596
84,236	61,097

n	12
Media	75,520
s exp	14,340
s² exp	205,636,024
%CV exp	18.98
%CV teórico	6
s teórica	4,531
s² teórica	20,531,630

Tomando un nivel de significancia del 95% para el cálculo del intervalo de confianza obtenemos que:

$$I.C. = x \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0.025, 11} = 2.201$$

$$I.C. = 75,520 \pm 2.201 \frac{14,340}{\sqrt{12}} = \pm 9,111$$

Y por lo tanto el resultado obtenido para la “Muestra 1” por parte del analista 2 fue de:

75,520 ± 9,111 µg de retinol/100g de hígado de res.

Tabla 13. Resultados del hígado de res “Muestra 1”, obtenidos por el Analista 1

Concentración (µg retinol/100g de hígado de res)	
71,423	84,222
71,358	84,006
73,357	84,260
78,495	79,398
78,332	79,137
79,109	78,101
75,354	88,022
76,600	87,514
77,700	87,582

n	18
Media	79.665
s exp	5.256
s² exp	27,626,485
%CV exp	6.59
%CV teórico	6
s teórica	4.780
s² teórica	22.847,441

Para saber si los datos entre los dos analistas son comparables se realizan pruebas de hipótesis relativas a las medias, con esto sabremos si los dos analistas con el mismo método obtienen resultados reproducibles para una misma muestra.

Antes de realizar la prueba de hipótesis para las medias se realiza el análisis de las varianzas para comparar la precisión de los dos analistas, para ello utilizamos la prueba estadística F de Snedecor.

La prueba de hipótesis sobre las varianzas quedaría:

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

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

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

donde:

s_1^2 = es la varianza muestral mayor con $n_M - 1$ grados de libertad.

s_2^2 = es la varianza muestral menor con $n_m - 1$ grados de libertad.

Se rechaza la hipótesis nula H_0 , si:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2} \text{ con g.l. } (n_M - 1, n_m - 1)$$

$$F_{cal} = \frac{205,636,024}{27,626,485}$$

$$F_{cal} = 7.44$$

En tablas encontramos que $F_{0.025, 11, 17} = 2.87$ por lo que se concluye que $7.44 > 2.87$, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula, es decir, las varianzas de los dos analistas son diferentes, dado que para la analista 2 la varianza resulta más grande, comparada con la de la analista 1, esto es esperable por el hecho de que la analista 1 tiene mayor tiempo de realizar el método, por tanto tiene una mayor habilidad en el manejo de la metodología, mientras que para la analista 2 fueron su primera determinación.

Ahora bien, al no ser comparables las varianzas se realiza el estudio estadístico sobre las medias con el planteamiento de varianzas diferentes.

La prueba de hipótesis sobre las medias se establece como:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

y para este estudio se utiliza la prueba “t de student”:

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

y para rechazar la H_0 se tiene que cumplir que:

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

$$t_{0.025, 14} = 2.16$$

$$t_{cal} = \frac{75,520 - 79,665}{\sqrt{\frac{205,636,024}{12} + \frac{27,626,485}{18}}}$$

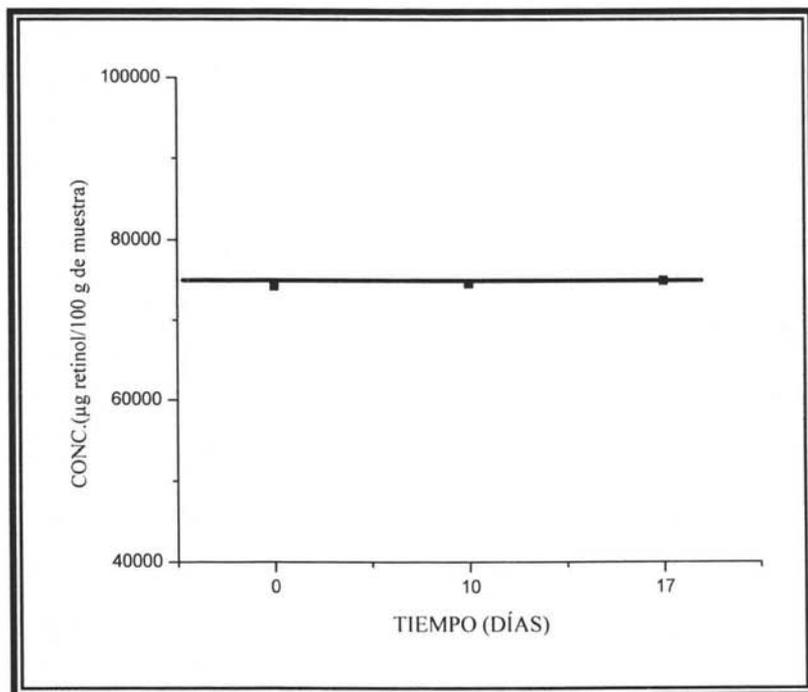
$$t_{cal} = -0.96$$

Por lo anterior $-0.96 > -2.16$, consecuentemente la hipótesis nula se acepta, es decir, las medias de los analistas son iguales, por tanto, los resultados obtenidos por los 2 analistas pertenecen a la misma población y en este caso se comprueba que son del mismo hígado y por lo tanto la metodología da resultados reproducibles.

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Una de las muestras se monitoreo para establecer la estabilidad del extracto obtenido en condiciones de refrigeración, en viales ámbar y sellados. El monitoreo se llevó a cabo durante 17 días, obteniéndose los siguientes resultados:

Se realizó primero un estudio gráfico para visualizar si se mantiene estable la muestra, esto se puede ver en la Gráfica 2.



Gráfica 2. Estabilidad de la muestra (extracto), monitoreado en los días 0, 10 y 17.

Como puede observarse en la gráfica se tiene una tendencia de estabilidad de la muestra durante el tiempo marcado para el estudio de estabilidad.

Además del estudio gráfico para comprobar la estabilidad de la muestra se realiza el estudio también por pruebas estadísticas.

Solo se ejemplificará el estudio estadístico para el día 0 al 17, aunque en el Anexo 1 en donde se encuentran las hojas Excel con los cálculos y razonamientos se encuentra también el del día 0 al 10.

Día cero

Concentración (μg retinol/100g de hígado de res)	
	75,354
	76,600
	77,700

n	3
Media	76,551
s exp	1,174
s² exp	1,378,232

Día 17

Concentración (μg retinol/100g de hígado de res)	
	74,746
	75,292
	75,054

n	3
Media	75,030
s exp	274
s² exp	74,902

En primer lugar se tuvo que realizar una prueba de hipótesis sobre las varianzas para los días cero y 17, por lo tanto aplicamos la prueba de Snedecor:

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

y las hipótesis a aplicar fueron:

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

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

donde:

$$s_1^2 = 1,378,232 \text{ con } 2 \text{ grados de libertad.}$$

$$s_2^2 = 74,902 \text{ con } 2 \text{ grados de libertad.}$$

y se rechaza la hipótesis nula si:

$$F_{cal} > F_{\alpha/2} \text{ con g.l. } (n_M - 1, n_m - 1)$$

$$F_{cal} = \frac{1,378,232}{74,902}$$

$$F_{cal.} = 18.4$$

En tablas encontramos que $F_{0.025, 2, 2} = 39$, por lo anterior $18.4 < 39$, por lo que aceptamos la hipótesis nula y las varianzas son iguales, por lo que se realizó la prueba de hipótesis sobre las medias para varianzas iguales.

Las hipótesis sobre las medias son:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

$$t_{cal} = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

y para rechazar la H_0 :

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

$$t_{0,025, 4} = 2.78$$

$$t_{cal} = \frac{76,551 - 75,030}{\sqrt{(2)1,378,232 + (2)74,902}} \sqrt{\frac{9(4)}{6}}$$

$$t_{cal} = 2.19$$

Lo que indica que $2.19 < 2.78$, por lo que se acepta la hipótesis nula y por lo tanto las medias son iguales y pertenecen a la misma población, es decir, la muestra tiene la misma concentración durante 17 días, por lo tanto la muestra (extractos) es estable por lo menos durante 17 días para su análisis.

RECOBRO

Se realizó como primera parte de este estudio, el cálculo de retinol presente en los residuos obtenidos en 3 de las partes de la metodología de preparación de muestra. Esto para saber que cantidad de retinol se quedaba en cada una de éstas etapas.

La muestra elegida para este estudio fue la “Muestra 3” del estudio de repetibilidad, y se obtuvieron los siguientes resultados:

ETAPA	Concentración (μg retinol/100g de hígado de res)	% con respecto al total de retinol encontrado en el hígado (suma del reportado en repetibilidad más el TOTAL de pérdidas)
EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	2,885	3.76
SECADO	332	0.43
PURIFICACIÓN	128	0.17
TOTAL	3,345	4.36

Como se puede observar en la extracción líquido-líquido se tiene la pérdida mayor que en las etapas siguientes, esto representa un 3.8 % del total de retinol que debería obtenerse, lo cual se debe a que en la solución hidrolizada y en el lavado con la solución de NaCl al 10% se queda un poco de retinol debido a que tiene cierta afinidad con la parte acuosa dado su grupo hidroxilo.

Posteriormente se realizó la cuantificación de retinol en el mismo hígado de res, tomando 7.7g del hígado de res al cual se le adicionó 1.8mg de retinol, lo cual representa 23,338 μg retinol/100g de hígado de res adicionado.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra 3 fortificada

Concentración (μg retinol/100g de hígado de res)	
88,053	88,146
88,099	87,780
88,565	88,143
80,172	98,962
80,364	100,120
79,933	99,762
88,630	112,266
88,955	112,014
89,265	113,093

n	18
Media	92,907
s exp	10,724
s² exp	115,012,920

Se procedió a realizar el cálculo de concentración retinol con su intervalo de confianza, al 95% de nivel de significancia.

$$I.C. = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$t_{\alpha/2, n-1} = t_{0,025, 17} = 2.11$$

$$I.C. = 92,907 \pm 2.11 \frac{10,724}{\sqrt{18}} = 5,333$$

92,907 ± 5,333 µg de retinol/100g de hígado de res

Al realizar la extracción del retinol en la muestra sin adicionar se obtuvo una concentración de 73,319 µg retinol/100g de hígado de res ("Muestra 3, pág. 61), considerando que se tiene una pérdida del 3,345 µg retinol/100g de hígado de res está representa el 4.4 % de lo obtenido, entonces el 73,319 µg retinol/100g de hígado de res es el 95.6% del contenido de vitamina A como retinol de la muestra, por lo tanto lo que se debió obtener eran 76,693 µg retinol/100g de hígado de res (consideraremos esto como valor real) que sumado con la cantidad adicionada debíamos obtener 100,031 µg retinol/100g de hígado de res como resultado en el hígado adicionado con Vitamina A.

Considerando las pérdidas en cada paso de la metodología de extracción mencionados anteriormente, se espera obtener 95,630 µg retinol/100g de hígado de res, por lo tanto para calcular el recobro se realiza el siguiente cálculo:

$$R = \frac{92,907}{95,630} \times 100$$

Así, el porcentaje de recobro fue de 97.15 %, lo cual es un buen valor de extracción de vitamina A como retinol de la matriz estudiada.

CONCLUSIONES

Una vez realizado todo el trabajo anterior se puede concluir lo siguiente:

- La optimización de la metodología desarrollada en este trabajo comparada a la encontrada en la literatura, permite disminuir las cantidades de muestra, reactivos y disolventes empleados para la extracción de la Vitamina A como retinol.
- Debido a lo anterior tenemos un método que contamina menos el ambiente y el riesgo de trabajar con éter es menor, lo que permite realizar la determinación de forma segura, tanto para el ambiente como para el analista; además de que el costo de la determinación se reduce.
- Se introduce en el proceso la utilización de cartuchos de la técnica de EFS que nos permite el manejo de menor cantidad de reactivos, ahorrando tiempo en las partes de secado y limpieza del extracto obtenido de la muestra, para después ser analizada por CLAE.
- Aprovechando ya la técnica analítica de cromatografía de líquidos que había sido validada para el cromatógrafo de líquidos del laboratorio 3F, se pudo realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de la vitamina A.
- El sistema empleado para el análisis cualitativo y cuantitativo de la vitamina A, tiene tendencia lineal y se tiene una precisión del sistema menor al 5% (se puede alcanzar el 3%).
- Al realizar las pruebas estadísticas a la metodología desarrollada se obtuvo que el método tiene una buena precisión, pudiéndose encontrar una repetibilidad del 3% y en el peor de los casos del 6%, esto dependerá del entrenamiento que tenga el analista en la metodología de preparación de muestra. Además se tiene una reproducibilidad que no es mayor del 6%, pudiendo mejorarse probablemente con un mayor entrenamiento de los analistas en el proceso de la metodología (se puede llegar al menos al 3%).
- El estudio de estabilidad indicó que los extractos de vitamina A obtenidos de las muestras por la metodología establecida en este proyecto, permanecen estables por lo menos durante 17 días manteniéndolos almacenados en refrigeración y protegidos de la luz, para su análisis durante ese lapso de tiempo por la técnica CLAE.
- La metodología empleada para la extracción de vitamina A como retinol presentó un recobro del 97.25% para la matriz estudiada.

- **Con todo lo mencionado anteriormente se puede concluir que método desarrollado permite la extracción de vitamina A como retinol de una matriz compleja como el hígado de res.**
- Al realizar el estudio de diferentes muestras de hígado es observable que los resultados de concentración obtenidos en estos son bastante variables debido a las diferencias biológicas entre las muestras empleadas generadas por su alimentación y la procedencia de las fuentes de la muestra (reses), que se comprueba con el C.V. del 37.76% obtenido al comparar los resultados obtenidos de las diferentes muestras que se estudiaron. Esto es interesante estudiarlo para un próximo proyecto ya que ahora se tiene una metodología para su análisis confiable.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Lloyd, L.E. et al.** Fundamentos de nutrición. Ed. Acribia Zaragoza. España, 1990 p.184-190.
2. **Osborne, D.R. y Voogt, P.** Análisis de los nutrientes de los alimentos. Ed. Acribia Zaragoza. España, 1999, p. 85-94,191-200.
3. **Ottaway, Berry P.** The Technology of vitamins in food. Ed. Chapman & Hall. Gran Bretaña, 1993, Págs.1-2, 20-21, 43-44, 91-92,246-247,179-182.
4. **Matti, Tolonen.** Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición. Ed. Acribia Zaragoza. España, 1995, págs. 132 – 140.
5. **Adrian, J., Potus, J. y Poiffait, A.** Análisis nutricional de los alimentos. Ed. Technique et Documentation Lavoisier. España, 2000. p.116-117.
6. **Ball, G.F.M.** Fat-soluble vitamin assays in food análisis. Elsevier Applied Science. London and New York, 1989
7. **Church, D.C-Pond, W.G.** Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Ed. Limusa. México, 1987. p. 119-121
8. **Badui D., S.** Química de los Alimentos. Addison Wesley. México, 1999. 3ªed. p. 338-340
9. **Brody, Tom.** Nutricional Biochemistry. Academia Press. USA (Sn. Diego California) 1994. p. 400-409
10. **Devlin, Thomas M.** Bioquímica. Libro de Texto con aplicaciones clínicas. Tomo 2. Reverté. Barcelona, España, 1991. p. 1226
11. **Matissek, R.- Schnepel, F. M.- Steiner, G.** Análisis de los Alimentos. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones. Acribia (Zaragoza). España, 1998. p.209-212
12. **Church-Gary-Smith.** Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Vol. 2. Acribia. (Zaragoza). España, 1974. p. 278-297
13. **Skoog, D.- Holler, F.J.-Nieman, T.** Principios de Análisis instrumental. Mc. Graw-Hill. España, 2001. 5ªed. p. 786
14. **McNair, H. M.** Cromatografía líquidos de alta presión. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía 10, Washington, D.C., 1973.
15. **AOAC.** Official Methods of Analysis Chemists. Capítulo 45. Washington, D.C 30ªed., 1995.
16. **Yost, R.W-Ettre,L.S.-Conlon, R.D.** Practical Liquid Chromatography. An Introduction. Perkin- Elmer. United States of America, 1980.

17. **Quattrocchi, O.A.-Abelaira, S.I. Laba, R. F.** Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina, 1992.
18. **Sandra, P.** "Resolution-Definition and Nomenclatura". *Journal of High Resolution chromatography*, 12, 1989, p. 82-86
19. **Hiroshi Iwase.** "Simultaneous sample preparation for high-performance liquid chromatographic determination of Vitamin A and β -carotene in emulsified nutritional supplements after solid-phase extraction". *Analytica Chimica Acta*, 463, 2002, p. 21-29.
20. **Pinheiro, H., et al.** "Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service". *Food Chemistry*, 61, 1998, p. 145-151.
21. **Pikkarainen, S. A y Parviainen, M.** "Determination of retinyl palmitate and total vitamin A content in liver and liver-based ready-to-eat-foods". *Journal of Chromatography, B*, 577, 1992, p. 163-166.
22. **Salo-Väänänen, P. et al.** "Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction". *Food Chemistry*, 71, 2000, p. 535-543.
23. **Escrivá et al.** Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, 947, 2002, p. 313-318.
24. **Miller, J. N.-Miller, J. C.** Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Prentice Hall. España, 2002. 4ª ed.
25. **Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.** Guía de Validación de Métodos Analíticos. 2002
26. **Ramírez, H. Adriana.** "Validación de la Técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para la cuantificación de vitamina A". Tesis de licenciatura. UNAM, 2004.
27. **Varian. Handbook:** Sorbent Extraction Technology. 2º ed. 1993 Varian Associates. Inc.
28. **J:T:Baker.** Solid Phase Extarction for Simple Preparation. 1988

ANEXO 1

Conc. (ppm) (x)	Área (Y)	x ²	y ²	xy		
0.95	8387	0.9025	70341769	7967.65	n=	24
0.95	8497	0.9025	72199009	8072.15	Sxx	626667.12
0.95	8392	0.9025	70425664	7972.4	Syy	8.99027E+13
4.75	46634	22.5625	2174729956	221511.5	Sxy	7505102471
4.75	47003	22.5625	2209282009	223264.25	Sxx*Syy	5.63391E+19
4.75	46448	22.5625	2157416704	220628	(Sxy) ²	5.63266E+19
9.5	107845	90.25	11630544025	1024527.5	(n-2)nSxx	330880239.4
9.5	104587	90.25	10938440569	993576.5	(Sxx*Syy)-(Sxy) ²	1.25328E+16
9.5	107436	90.25	11542494096	1020642	(Sxx*Syy)-(Sxy) ² /(n-2)nSxx	37877163.9
19	212903	361	45327687409	4045157	Se	6154.442615
19	213127	361	45423118129	4049413	<i>PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA LA ORDENADA</i>	
19	212017	361	44951208289	4028323	b	-7872.60405
38	448499	1444	2.01151E+11	17042962	nSxx	15040010.88
38	448493	1444	2.01146E+11	17042734	media X	37.525
38	446371	1444	1.99247E+11	16962098	nX ²	33795.015
57	669688	3249	4.48482E+11	38172216	b-β	-7872.60405
57	678848	3249	4.60835E+11	38694336	b-β/Se [A]	-1.279174174
57	679706	3249	4.62E+11	38743242	nSxx/Sxx+nX ²	22.77195025
76	911540	5776	8.30905E+11	69277040	raíz de nSxx/Sxx+nX ² [B]	4.771996464
76	907847	5776	8.24186E+11	68996372	t cal [A]*[B]	-6.104
76	908809	5776	8.25934E+11	69069484	t tablas α/2, n-2 (0.025, 22)	2.074
95	1129835	9025	1.27653E+12	107334325	Rechazar Ho si: t _{cal} < -t _{α/2} ó t _{cal} > t _{α/2}	
95	1111108	9025	1.23456E+12	105555260	Conclusión: Ho se rechaza (-6.10 < -2.07),	
95	1132820	9025	1.28328E+12	107617900	la ordenada es diferente de cero.	
Sumatoria(Σ)	900.6	10596840	59906.145	8.42482E+12	710359024	

INTERVALOS DE CONFIANZA

Para la ordenada	
(nX) ²	811080.36
Sxx + (nX) ²	1437747.5
Sxx + (nX) ² /nSxx [C]	0.0955948
raíz ² de (A) [D]	0.3091842
Se*[b] [E]	1902.8562
t tablas*[E]	3946.2864
Máximo	-3926.318
Mínimo	-1118.890

Para la pendiente	
m	11.976.21857
n/Sxx	3.82978E-05
raíz ² de n/Sxx	0.006188525
Se*raíz ² de n/Sxx [F]	38.08692
t tablas*[F]	78.98753
Máximo	12.055.206
Mínimo	11.897.231

A1. Tabla para el cálculo de linealidad del sistema

Conc. (ppm)	Area	n	21
8.08	100.874	Media	102588
8.08	107.303	s exp	2693.80
8.08	101.082	s ² exp	7256546.69
8.08	100.214	%C.V.exp	2.63
8.08	103.322	%C.V. teórico	5
8.08	107.290	s teórica	5129.40
8.08	101.427	s ² teórica	26310695.51
8.08	99.932	α	0.05
8.08	102.010	g.l. (n-1)	20
8.08	98.851	χ ² de tablas α (0.05,20)	31.41
8.08	99.533	χ ² calculada (exp)	5.516
8.08	100.537	χ ² de tablas α/2 (0.025,20)	34.17
8.08	102.957	χ ² de tablas (1- α/2) [0.975,20]	9.59
8.08	105.922	Mínimo para s	2.061
8.08	103.623	Máximo para s	3.890
8.08	103.655	Rechazar Ho sí: $\chi^2_{cal} > \chi^2_{tab}$	
8.08	108.110	Conclusión: Ho no se rechaza, la variancia experimental es menor a la propuesta, por lo tanto el sistema es preciso con un C.V. del 5%.	
8.08	103.299		
8.08	100.374		
8.08	103.271		
8.08	100.760		

Conc.(ppm)	Area	n	21
8.08	100.874.0	Media	102, 588
8.08	107.303.0	s exp	2.693.80
8.08	101.082.0	s ² exp	7.256.546.69
8.08	100.214.0	%C.V.exp	2.63
8.08	103.322.0	%C.V. teórico	3
8.08	107.290.0	s teórica	3.077.64
8.08	101.427.0	s ² teórica	9.471.850.38
8.08	99.932.0	α	0.05
8.08	102.010.0	g.l. (n-1)	20
8.08	98.851.0	χ ² de tablas α (0.05,20)	31.41
8.08	99.533.0	χ ² calculada (exp)	15.32
8.08	100.537.0	χ ² de tablas α/2 (0.025,20)	34.17
8.08	102.957.0	χ ² de tablas (1- α/2) [0.975,20]	9.59
8.08	105.922.0	Mínimo	2,061
8.08	103.623.0	Máximo	3,890
8.08	103.655.0	Rechazar Ho sí: $\chi^2_{cal} > \chi^2_{tab}$	
8.08	108,110.0	Conclusión: Ho no se rechaza, la variancia experimental es menor a la propuesta, por lo tanto el sistema es preciso con un C.V. del 5%.	
8.08	103,299.0		
8.08	100,374.0		
8.08	103,271.0		
8.08	100,760.0		

A2. Tabla para cálculos de precisión del sistema para concentraciones 8.08ppm para C.V. de 3 y 5%

Conc.(ppm)	Area	n	21
50.53	659.216	Media	643,423
50.53	672.794	s exp	21,299.998
50.53	685.817	s ² exp	453,689.916.129
50.53	631.844	%C.V.exp	3.31
50.53	620.863	%C.V. teórico	5
50.53	626.607	s teórica	32,171.16
50.53	642.150	s ² teórica	1,034,983.351.91
50.53	669.543	α	0.05
50.53	667.861	g.l. (n-1)	20
50.53	641.816	χ ² de tablas α (0.05,20)	31.41
50.53	636.222	χ ² calculada (exp)	8.77
50.53	652,089	χ ² de tablas α/2 (0.025,20)	34.17
50.53	622.662	χ ² de tablas (1- α/2) [0.975,20]	9.59
50.53	640.967	Mínimo para s exp	16,296
50.53	633,257	Máximo para s exp	30,760
50.53	651.283	Rechazar Ho sí: $\chi^2_{cal} > \chi^2_{tab}$	
50.53	667.012	Conclusión: Ho no se rechaza, la variancia experimental es menor a la propuesta, por lo tanto el sistema es preciso con un C.V. del 3%.	
50.53	628.052		
50.53	597.982		
50.53	624.719		
50.53	639,130		

Conc.(ppm)	Area	n	21
50.53	659.216	Media	643,423
50.53	672.794	s exp	21,299.998
50.53	685.817	s ² exp	453,689.916
50.53	631.844	%C.V.exp	3.3
50.53	620.863	%C.V. teórico	3
50.53	626.607	s teórica	19,303
50.53	642.150	s ² teórica	372,594.007
50.53	669.543	α	0.05
50.53	667.861	g.l. (n-1)	20
50.53	641.816	χ ² de tablas α (0.05,20)	31.41
50.53	636.222	χ ² calculada (exp)	24.353
50.53	652,089	χ ² de tablas α/2 (0.025,20)	34.17
50.53	622.662	χ ² de tablas (1- α/2) [0.975,20]	9.59
50.53	640.967	Mínimo	265,548.678
50.53	633,257	Máximo	946,172.922
50.53	651.283	Rechazar Ho sí: $\chi^2_{cal} > \chi^2_{tab}$	
50.53	667.012	Conclusión: Ho no se rechaza, la variancia experimental es menor a la propuesta, por lo tanto el sistema es preciso con un C.V. del 3%.	
50.53	628.052		
50.53	597.982		
50.53	624.719		
50.53	639,130		

A3. Tabla para cálculos de precisión del sistema para concentraciones 50.53ppm para un C.V. de 3 y 5%

Ordenada -7872.60405							
Clave	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (µg)	Conc. µg/ 100g
M2 2454	0.4903	830910	11976.21857	70.03734936	0.350186747	350.1867468	71.423
	0.4903	830149	11976.21857	69.97380677	0.349869034	349.8690338	71.358
	0.4903	853629	11976.21857	71.93435883	0.359671794	359.6717942	73.357
M1 2554	0.6768	1264603	11976.21857	106.2501988	0.531250994	531.250994	78.495
	0.6768	1261966	11976.21857	106.0300124	0.530150062	530.1500622	78.332
	0.6768	1274563	11976.21857	107.081847	0.535409235	535.4092348	79.109
M2 2554	0.4938	883389	11976.21857	74.41928342	0.372096417	372.0964171	75.354
	0.4938	898132	11976.21857	75.65030638	0.378251532	378.2515319	76.600
	0.4938	911142	11976.21857	76.7366259	0.383683129	383.6831295	77.700
M1 2654	0.7173	1439145	11976.21857	120.8242481	0.604121241	604.1212406	84.222
	0.7173	1435448	11976.21857	120.515553	0.602577765	602.5777651	84.006
	0.7173	1439811	11976.21857	120.8798583	0.604399292	604.3992916	84.260
M1 2754	0.8047	1522492	11976.21857	127.7836234	0.638918117	638.9181172	79.398
	0.8047	1517455	11976.21857	127.3630399	0.6368152	636.8151997	79.137
	0.8047	1497495	11976.21857	125.6964037	0.628482018	628.4820184	78.101
M2 2754	0.4145	866031	11976.21857	72.96991107	0.364849555	364.8495554	88.022
	0.4145	860988	11976.21857	72.54882657	0.362744133	362.7441329	87.514
	0.4145	861665	11976.21857	72.60535527	0.363026776	363.0267763	87.582

n	18
Media	79,665
s exp	5256.090
s ² exp.	27.626.484.58
%C.V.exp	6.59
%C.V. teórico	6
s teórica	4779.90
s ² teórica	22847440.91
α	0.05
g.l. (n-1)	17
χ ² de tablas α (0.05,17)	27.59
χ ² calculada (exp)	20.56
t α/2 , n-1	2.11
s/raiz de n	1238.87
I.C. para la media (±)	2,613 796
Rechazar Ho si: $\chi_{cal} > \chi_{tab}$	
Conclusión: Ho no se rechaza, la varianza experimental es menor a la propuesta, por lo tanto el método es preciso con un C.V. del 6%	

A4. Tabla para cálculo de concentraciones y precisión para la "Muestra 1"

Ordenada -7872.60405							
Clave	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (µg)	Conc. µg/ 100g
M1 3154	0.9165	662.153	11976.21857	55.94634067	0.279731703	279.7317033	30.522
	0.9165	658532	11976.21857	55.64399148	0.278219957	278.2199574	30.357
	0.9165	654415	11976.21857	55.30022688	0.276501134	276.5011344	30.169
M2 3154	0.6935	473000	11976.21857	40.15229024	0.200761451	200.7614512	28.949
	0.6935	469448	11976.21857	39.85570247	0.199278512	199.2785124	28.735
	0.6935	472596	11976.21857	40.11855672	0.200592784	200.5927836	28.925
M1 264	0.4786	314758	11976.21857	26.93927154	0.134696358	134.6963577	28.144
	0.4786	317248	11976.21857	27.14718357	0.135735918	135.7359179	28.361
	0.4786	318947	11976.21857	27.28904805	0.13644524	136.4452403	28.509
M2 264	0.5792	402706	11976.21857	34.28282489	0.171414124	171.4141244	29.595
	0.5792	403793	11976.21857	34.37358809	0.17186794	171.8679405	29.673
	0.5792	408384	11976.21857	34.75693113	0.173784656	173.7846557	30.004
M1 364	0.439	305220	11976.21857	26.14285989	0.130714299	130.7142994	29.775
	0.439	307617	11976.21857	26.34300653	0.131715033	131.7150327	30.003
	0.439	304682	11976.21857	26.09793753	0.130489688	130.4896876	29.724
M2 364	0.7047	492463	11976.21857	41.77742758	0.208887138	208.8871379	29.642
	0.7047	486299	11976.21857	41.26274092	0.206313705	206.3137046	29.277
	0.7047	487970	11976.21857	41.40226743	0.207011337	207.0113372	29.376

n	18
Media	29.430
s exp	695.945
s ² exp	484.340.028
%C.V.exp	2.3647
%C.V. teórico	2
s teórica	588.60
s ² teórica	346451.47
α	0.05
g.l. (n-1)	17
χ ² de tablas α (0.05,17)	27.59
χ ² calculada (exp)	23.77
t α/2 , n-1	2.11
s/raíz de n	164.036
I.C. para la media (±)	346.086
Rechazar Ho si: χ ² cal > χ ² tab	
Conclusión: Ho no se rechaza, la varianza experimental es menor a la propuesta, por lo tanto el método es preciso con un C.V. del 2%	

A5. Tabla para cálculo de concentraciones y precisión para la "Muestra 2"

Ordenada -7872.60405							
Clave	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (µg)	Conc. µg/100g
M1 984	0.615	1034972	11925.23913	87.44852766	0.437242638	437.2426383	71.096
	0.615	1044243	11925.23913	88.22595442	0.441129772	441.1297721	71.728
	0.615	1048532	11925.23913	88.58561177	0.442928059	442.9280589	72.021
M1 1084	0.4718	702545	11925.23913	59.57260867	0.297863043	297.8630433	63.133
	0.4718	711225	11925.23913	60.30047667	0.301502383	301.5023833	63.905
	0.4718	708456	11925.23913	60.06828007	0.3003414	300.3414003	63.659
M2 1084	0.5401	1012539	11925.23913	85.56739138	0.427836957	427.8369569	79.214
	0.5401	1027987	11925.23913	86.86279517	0.434313976	434.3139758	80.414
	0.5401	1028185	11925.23913	86.87939861	0.434396993	434.396993	80.429
M1 1184	0.3947	688261	11925.23913	58.37481298	0.291874065	291.8740649	73.948
	0.3947	730997	11925.23913	61.95847277	0.309792364	309.7923639	78.488
	0.3947	736039	11925.23913	62.38127352	0.311906368	311.9063676	79.024
M2 1184	0.4749	818288	11925.23913	69.27832599	0.34639163	346.3916299	72.940
	0.4749	793983	11925.23913	67.24021172	0.336201059	336.2010586	70.794
	0.4749	812643	11925.23913	68.80496022	0.344024801	344.0248011	72.442
M2 1284	0.4661	839784	11925.23913	71.08088942	0.355404447	355.4044471	76.251
	0.4661	855348	11925.23913	72.38602048	0.361930102	361.9301024	77.651
	0.4661	799307	11925.23913	67.68665979	0.338433299	338.433299	72.610

n	18
Media	73.319
s exp	5558.81
s ² exp	30900334.56
%C.V.exp	7.58
%C.V. teórico	6
s teórica	4399.15
s ² teórica	19352545.57
α	0.05
g.l. (n-1)	17
χ ² de tablas α (0.05,17)	27.587
χ ² calculada (exp)	27.144
t α/2, n-1	2.110
s/raiz ² de n	1310.22
I.C. para la media (±)	2764.33
Rechazar Ho sí: $\chi_{cal}^2 > \chi_{tab}^2$	
Conclusión: Ho no se rechaza, la varianza experimental es menor a la propuesta, por lo tanto el método es preciso con un C.V. del 6%	

A6. Tabla para cálculo de concentraciones y repetibilidad para la "Muestra 3"

Conc. µg/ 100g			n	54
71423	30522	71096	Media	60805
71358	30357	71728	s exp	22961.67
73357	30169	72021	s ² exp	527238438.2
78495	28949	63133	%C.V. exp	37.76
78332	28735	63905	%C.V.	33
79109	28925	63659	s teórica	20065.56999
75354	28144	79214	s ² teórica	402627099.2
76600	28361	80414	α	0.05
77700	28509	80429	g.l. (n-1)	53
84222	29595	73948	χ ² de tablas α (0.05,20)	70.99
84006	29673	78488	χ ² calculada (exp)	69.4
84260	30004	79024	t α/2 , n-1	2.005745046
79398	29775	72940	s/raíz ² de n	3124.687949
79137	30003	70794	I.C. (±)	6267
78101	29724	72442	Rechazar Ho sí: $\chi^2_{cal} > \chi^2_{tab}$	
88022	29642	76251	Conclusión: Ho no se rechaza, la varianza	
87514	29277	77651	experimental es menor a la propuesta, por lo	
87582	29376	72610	tanto el método es preciso con un C.V. del 33%	

A7. Tabla para cálculo de precisión para las tres muestras.

ANALISTA 2

Se trabajó con la "Muestra 1" para el estudio de repetibilidad

		Conc. (ppm)	Area	Fr		Fr		
		57	662299	11619.2807	Media =	11599.61988		
		57	660723	11591.63158	Ordenada =	-7872.60405		
		57	660513	11587.94737				
Clave	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (µg)	Conc. µg/ 100g	
M1 90604	0.6079	1266167	11599.6199	109.8345995	0.549172997	549.1729974	90,339	
	0.6079	1257138	11599.6199	109.0562119	0.54528106	545.2810596	89,699	
	0.6079	1262097	11599.6199	109.4837259	0.54741863	547.4186296	90,051	
	0.6079	1266765	11599.6199	109.8861529	0.549430765	549.4307645	90,382	
	0.6079	1264618	11599.6199	109.7010606	0.548505303	548.5053031	90,230	
	0.6079	1180097	11599.6199	102.4145288	0.512072644	512.0726438	84,236	
M2 90604	0.5814	835076	11599.6199	72.67036442	0.363351822	363.3518221	62,496	
	0.5814	831793	11599.6199	72.38733791	0.36193669	361.9366895	62,253	
	0.5814	826861	11599.6199	71.96215156	0.359810758	359.8107578	61,887	
	0.5814	828004	11599.6199	72.06068927	0.360303446	360.3034464	61,972	
	0.5814	822935	11599.6199	71.62369219	0.358118461	358.118461	61,596	
	0.5814	816203	11599.6199	71.04332835	0.355216642	355.2166417	61,097	

ANALISTA 1	
n	18
Media	79,665
s exp	5,256.09
s ² exp	27,626,484.58
%C.V.exp	6.59
%C.V. teórico	6
s teórica	4,779.89
s ² teórica	22,847,440.91
α	0.05
g.l. (n-1)	17.00
t α/2 , n-1	2.11
s/raiz de n	1238.87
I.C. para la media (±)	2,614

ANALISTA 2	
n	12
Media	75,520
s exp	14,340.015
s ² exp	205,636,024.09
%C.V.exp	18.98
%C.V. teórico	6
s teórica	4,531.18
s ² teórica	20,531,630
α	0.05
g.l. (n-1)	11
t α/2 , n-1	2.201
s/raiz de n	4,139.61
I.C. para la media (±)	9,111.22

A8.1. Tabla para cálculos para reproducibilidad entre Analista 1 y Analista 2

<i>Prueba de hipótesis para las varianzas</i>			
$s^2_{exp(A1)}$ [2]	27626484.6	n	18
$s^2_{exp(A2)}$ [1]	205636024	n	12
g.l.(n1-1,n2-1)	11,17	n1-1	11
F _{cal}	7.44	n2-2	17
F _{tab $\alpha/2$}	2.87		
Rechazar Ho sí: $F_{cal} > F_{\alpha/2}$			
Conclusión: Se rechaza Ho, dado que F _{cal} es mayor a F de tablas, por lo que las varianzas de los analistas son diferentes			

<i>Prueba de hipótesis para las medias</i>			
media A1 [2]	79,665	n2	18
$s^2_{exp(A1)}$ [2]	27626484.6	n1	12
media A2 [1]	75,520	n2-1	17
$s^2_{exp(A2)}$ [1]	205636024	n1-1	11
$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	- 4,145	suma A+B	18671140.04
$s^2(1)/n1$ [A]	17136335.3	raíz ² A+B	4321.01146
$s^2(2)/n2$ [B]	1534804.7	t _{exp.}	-0.959325997
(A+B) ² [C]	3.4861E+14	(B) ² /n2-1 [E]	1.38566E+11
(A) ² /n1-1 [D]	2.6696E+13	D+E [F]	2.68344E+13
g.l. (C/F)	13	t tab $\alpha/2$, g.l.	2.16036824
Rechazar Ho sí: $t_{exp} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{exp} > t_{\alpha/2}$			
Conclusión: Ho se acepta, las dos medias son iguales, las muestras pertenecen a la misma población, es decir, el mismo hígado; por lo tanto el método es reproducible			

A8.2. Tabla para cálculos para reproducibilidad entre Analista 1 y Analista 2

Ordenada		-7872.60405					
Clave	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc.(mg)	Conc.(µg)	Conc. µg/ 100g
<i>DÍA CERO</i>							
M2 2554	0.4938	883389	11976.21857	74.41928342	0.37209642	372.096417	75,354
	0.4938	898132	11976.21857	75.65030638	0.37825153	378.251532	76,600
	0.4938	911142	11976.21857	76.7366259	0.38368313	383.683129	77,700
<i>DÍA 10</i>							
M2 2554	0.4938	864676	11392.91813	76.58692832	0.38293464	382.934642	77,549
	0.4938	871691	11392.91813	77.2026617	0.38601331	386.013308	78,172
	0.4938	875217	11392.91813	77.51215221	0.38756076	387.560761	78,485
<i>DÍA 17</i>							
M2 2554	0.4938	833142	11392.91813	73.81906853	0.36909534	369.095343	74,746
	0.4938	839284	11392.91813	74.35817536	0.37179088	371.790877	75,292
	0.4938	836606	11392.91813	74.12311706	0.37061559	370.615585	75,054

<i>DÍA CERO</i>	
Media	76,551
s exp	1,173.98
s ² exp	1,378,232.204

<i>DÍA 10</i>	
Media	78,069
s exp	476.8967487
s ² exp	227430.5089

<i>DÍA 17</i>	
Media	75,030
s exp	273.682
s ² exp	74,901.728

A9.1. Tabla para cálculos de estabilidad durante 10 y 17 días

Prueba sobre las varianzas para Día 0 y 10	
$s^2(1)$	1378232.204
$s^2(2)$	227,430.51
n_1	3
n_2	3
g.l. (n1-1,n2-1)	2, 2
Fcal	6.060014597
Ftablas(0.025,2,2)	39
Rechazar Ho si: $F_{exp} > F_{\alpha/2}$	
Conclusión: la Ho se acepta por lo que las varianzas son iguales	

Prueba de hipótesis sobre las medias para Día 0 y 10			
media 1	76,551	F+G [J]	3,211,325.43
media 2	78,069	Raíz² de J [K]	1792.017139
m1-m2 [A]	-1517.324	A/K [L]	- 0.85
(n1-1) [B]	2	D*I/H [M]	6
(n2-1) [C]	2	raíz² de M	2.45
n1*n2 [D]	9	t cal	- 2.07
B*s²(1) [F]	2756464	t $\alpha/2$,g.l.n1+n2-2 (0.025,4)	2.776
C*s²(2) [G]	454861	Rechazar Ho si: $t_{exp} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{exp} > t_{\alpha/2}$	
(n1+n2) [H]	6	Conclusión: Ho se acepta, las medias son iguales por lo tanto la muestra es estable por 10 días	
(n1+n2)-2 [I]	4		

Prueba sobre las varianzas para Día 0 y 17	
$s^2(1)$	1378232.204
$s^2(2)$	74,901.73
n_1	3
n_2	3
g.l. (n1-1,n2-1)	2, 2
Fcal	18.40053957
Ftablas(0.025,2,2)	39
Rechazar Ho si: $F_{exp} > F_{\alpha/2}$	
Conclusión: la Ho se acepta por lo que las varianzas son iguales	

Prueba de hipótesis sobre las medias para Día 0 y 17			
media 1	76,551	F+G [J]	2,906,267.81
media 2	75,030	Raíz² de J [K]	1704.777936
m1-m2 [A]	1,521	A/K [L]	0.89
(n1-1) [B]	2	D*I/H [M]	6
(n2-1) [C]	2	raíz² de M	2.45
n1*n2 [D]	9	t cal	2.19
B*s²(1) [F]	#####	t $\alpha/2$,g.l.n1+n2-2 (0.025,4)	2.776
C*s²(2) [G]	149,803	Rechazar Ho si: $t_{exp} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{exp} > t_{\alpha/2}$	
(n1+n2) [H]	6	Conclusión: Ho se acepta, las medias son iguales por lo tanto la muestra es estable por 17 días	
(n1+n2)-2 [I]	4		

A 9.2. Tabla para cálculos de estabilidad durante 10 y 17 días (pruebas de hipótesis)

Ordenada -7872.60405

EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO								
Clave		Peso muestra (g)	Área	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (µg)	Conc. µg/ 100g
M2 984	1884	0.6439	30324	10677.96053	3.577144152	0.017885721	17.88572076	2.778
		0.6439	18180	10677.96053	2.43984832	0.012199242	12.1992416	1.895
		0.6439	16102	10677.96053	2.245241869	0.011226209	11.22620935	1.743
M1 1084	1984(1)	0.4718	26189	10677.96053	3.189897918	0.01594949	15.94948959	3.381
		0.4718	25372	10677.96053	3.11338518	0.015566926	15.5669259	3.299
		0.4718	25259	10677.96053	3.102802634	0.015514013	15.51401317	3.288
M1 1184	2084(1)	0.3947	10633	10677.96053	1.733065411	0.008665327	8.665327056	2.195
		0.3947	10784	10677.96053	1.747206688	0.008736033	8.736033442	2.213
		0.3947	10117	10677.96053	1.684741576	0.008423708	8.423707882	2.134
M2 1284	2084(2)	0.4661	30961	10677.96053	3.636799739	0.018183999	18.18399869	3.901
		0.4661	31325	10677.96053	3.670888645	0.018354443	18.35444323	3.938
		0.4661	30513	10677.96053	3.594844161	0.017974221	17.97422081	3.856

SECADO (COLUMNA DE SULFATO)								
Clave		Peso muestra (g)	Área	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (µg)	Conc. µg/ 100g
M2 984	1984(2)	0.6439	5397	10677.96053	1.2427096	0.002485419	2.485419199	386
		0.6439	5164	10677.96053	1.220888953	0.002441778	2.441777907	379
		0.6439	5127	10677.96053	1.217423872	0.002434848	2.434847744	378
M1 1084	1984(3)	0.4718	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.4718	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.4718	0	10677.96053	0	0	0	0
M1 1184	2084(3)	0.3947	12096	10677.96053	1.870076594	0.003740153	3.740153188	948
		0.3947	11887	10677.96053	1.850503568	0.003701007	3.701007135	938
		0.3947	12249	10677.96053	1.884405173	0.00376881	3.768810345	955
M2 1284	2084(4)	0.4661	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.4661	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.4661	0	10677.96053	0	0	0	0

PURIFICACIÓN (COLUMNA DE SILICA GEL)								
Clave		Peso muestra (g)	Área	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (µg)	Conc. µg/ 100g
M2 984	2084 (5)	0.6439	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.6439	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.6439	0	10677.96053	0	0	0	0
M1 1084	2084(6)	0.4718	5017	10677.96053	1.207122279	0.002414245	2.414244559	512
		0.4718	5058	10677.96053	1.210961964	0.002421924	2.421923928	513
		0.4718	5050	10677.96053	1.210212757	0.002420426	2.420425514	513
M1 1184	2084(7)	0.3947	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.3947	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.3947	0	10677.96053	0	0	0	0
M2 1284	2084(8)	0.4661	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.4661	0	10677.96053	0	0	0	0
		0.4661	0	10677.96053	0	0	0	0

A10.1. Tablas para cálculos de concentración de las pérdidas por etapas.

Clave	(EXTRACC. LIQ-LIQ)		SECADO		PURIFICACION	
		Conc. µg/ 100g		Conc. µg/ 100g		Conc. µg/ 100g
1884		2,778		386		-
		1,895		379		-
		1,743		378		-
1984(1)		3,381		-		513
		3,299		-		513
		3,288		-		513
2084(1)		2,195		948		-
		2,213		938		-
		2,134		955		-
2084(2)		3,901		-		-
		3,938		-		-
		3,856		-		-
	Media	2,885	Media	332	Media	128

Media 73,319 µg /100g al realizar la extracción con la "Muestra 3"
 Ahora bien si se obtiene 73.319 µg de retinol/100g más la cantidad que se pierde 3.345µg de retinol/100g se debe obtener 76.664µg de retinol/100g, considerando esta cantidad se obtienen los siguientes porcentajes de pérdida

	Conc. µg/ 100g	%
EXTRACC. LIQ-LIQ	2,885	3.763
SECADO	332	0.433
PURIFICACIÓN	128	0.1673
TOTAL	3,345	4.3638

A10.2. Tablas para cálculos de concentración de las pérdidas por etapas y pérdida total.

Ordenada		-7872.60405					
Clave	Peso muestra (g)	Area	Fr	Conc. (ppm)	Conc. (mg)	Conc. (μg)	Conc. mg/ 100g
M1 1394	0.3091	637099	11848.61404	54.43435005	0.27217175	272.1717503	88053
		637439	11848.61404	54.46304539	0.272315227	272.315227	88099
		640853	11848.61404	54.75118036	0.273755902	273.7559018	88565
M2 1394	0.3291	617366	11848.61404	52.7689232	0.263844616	263.844616	80172
		618868	11848.61404	52.89568908	0.264478445	264.4784454	80364
		615508	11848.61404	52.61211161	0.263060558	263.0605581	79933
M2 1494	0.4565	950904	11848.61404	80.91888226	0.404594411	404.5944113	88630
		954428	11848.61404	81.21630101	0.406081505	406.0815051	88955
		957781	11848.61404	81.4992877	0.407496438	407.4964385	89265
M3 1494	0.4509	933976	11848.61404	79.49019196	0.39745096	397.4509598	88146
		930069	11848.61404	79.16044875	0.395802244	395.8022437	87780
		933940	11848.61404	79.48715362	0.397435768	397.4357681	88143
M1 1594	0.4194	975676	11848.61404	83.00959092	0.415047955	415.0479546	98962
		987180	11848.61404	83.98050617	0.419902531	419.9025308	100120
		983624	11848.61404	83.68038668	0.418401933	418.4019334	99762
M2 1594	0.6526	1728307	11848.61404	146.5301848	0.732650924	732.6509239	112266
		1724409	11848.61404	146.2012012	0.731006006	731.0060058	112014
		1741093	11848.61404	147.6092983	0.738046492	738.0464917	113093

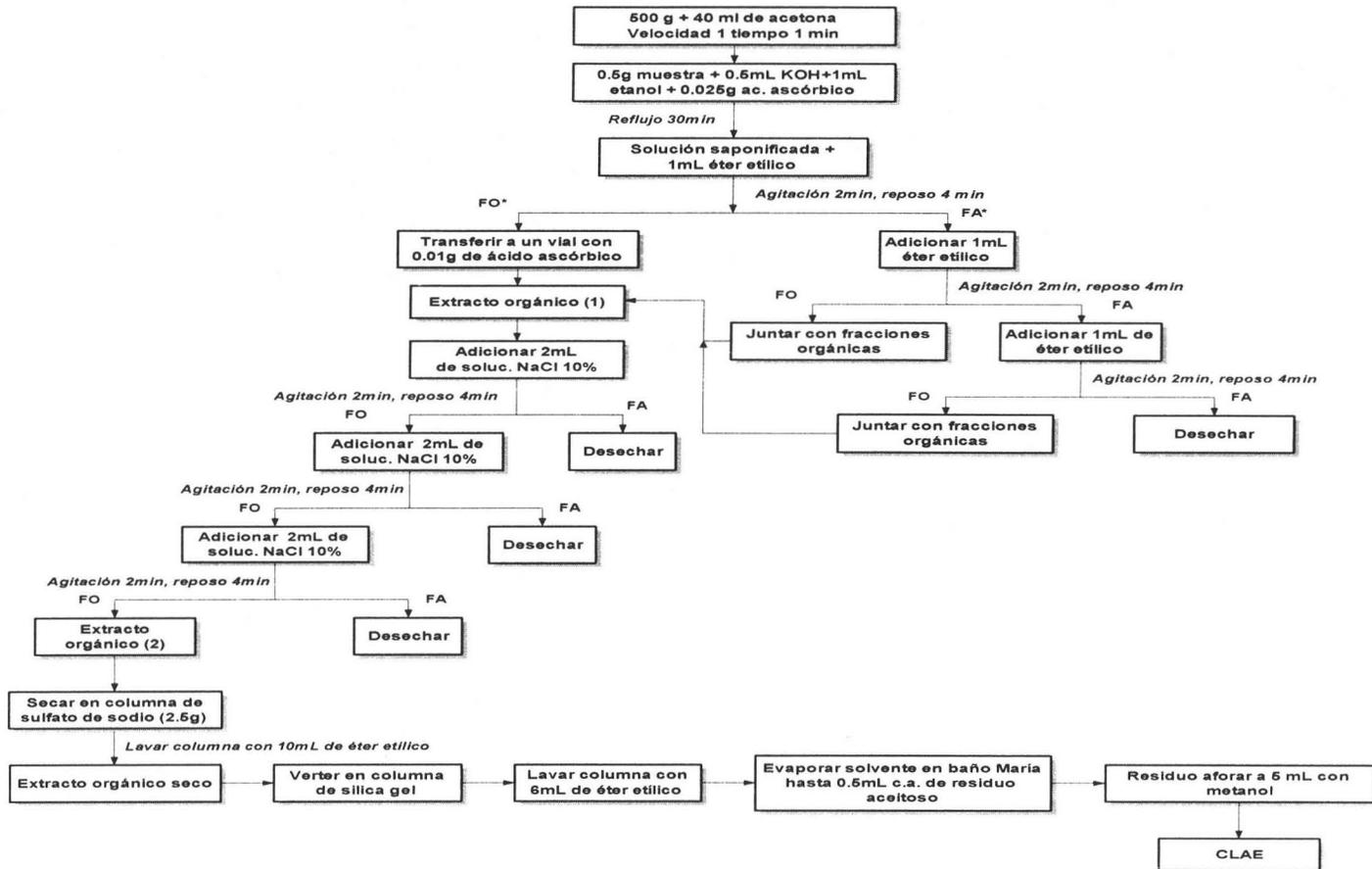
n	18
Media	92.907
s exp	10.724.41
s ² exp	115012920.1
α	0.05
g.l. (n-1)	17
t $\alpha/2$, n-1	2.11
s/raiz de n	2528
I.C. (\pm) para la media	5.333

"Muestra 3" resultado experimental 73319 μg / 100g de hígado de res
 Considerando que es el 95.6 %, dadas las pérdidas, el 100% es 76,693 μg / 100g de hígado de res sería la concentración real del hígado. Al realizar la adición con 23,338 μg de retinol/100g de híg de res (1.800 μg retinol en 7.7127g híg. Res)
 Entonces considerando la conc. real de retinol y la adición, la concentración sería de 100.031 μg /100g de hígado de res pero considerando la pérdida del 4.4 %, **debo obtener 95,630 μg / 100g de hígado de res**
Pero se obtuvo 92,907 μg / 100g de hígado de res. Entonces se tiene que 95,630 es el 100%, así el 92,907 es el 97.15%
Por lo tanto se tiene un recobro del 97.15%

A11. Tablas para cálculos de concentración de Muestra 3 fortificada y cálculo de recobro.

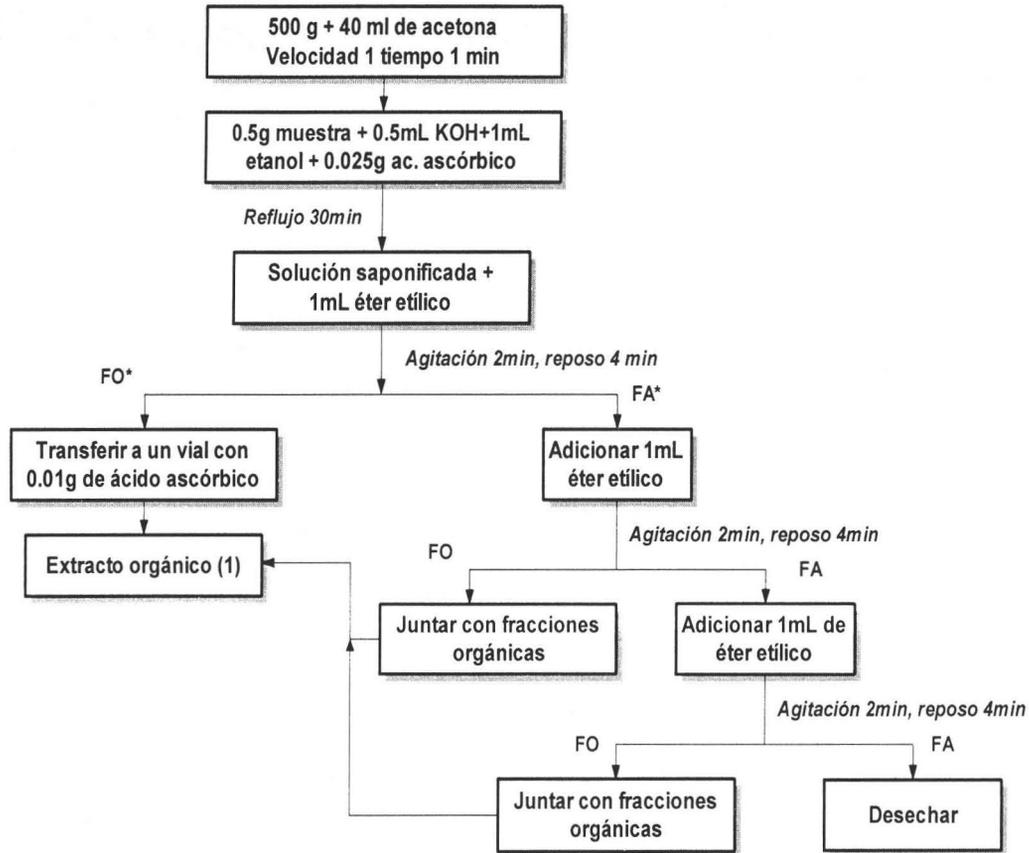
ANEXO 2

DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN



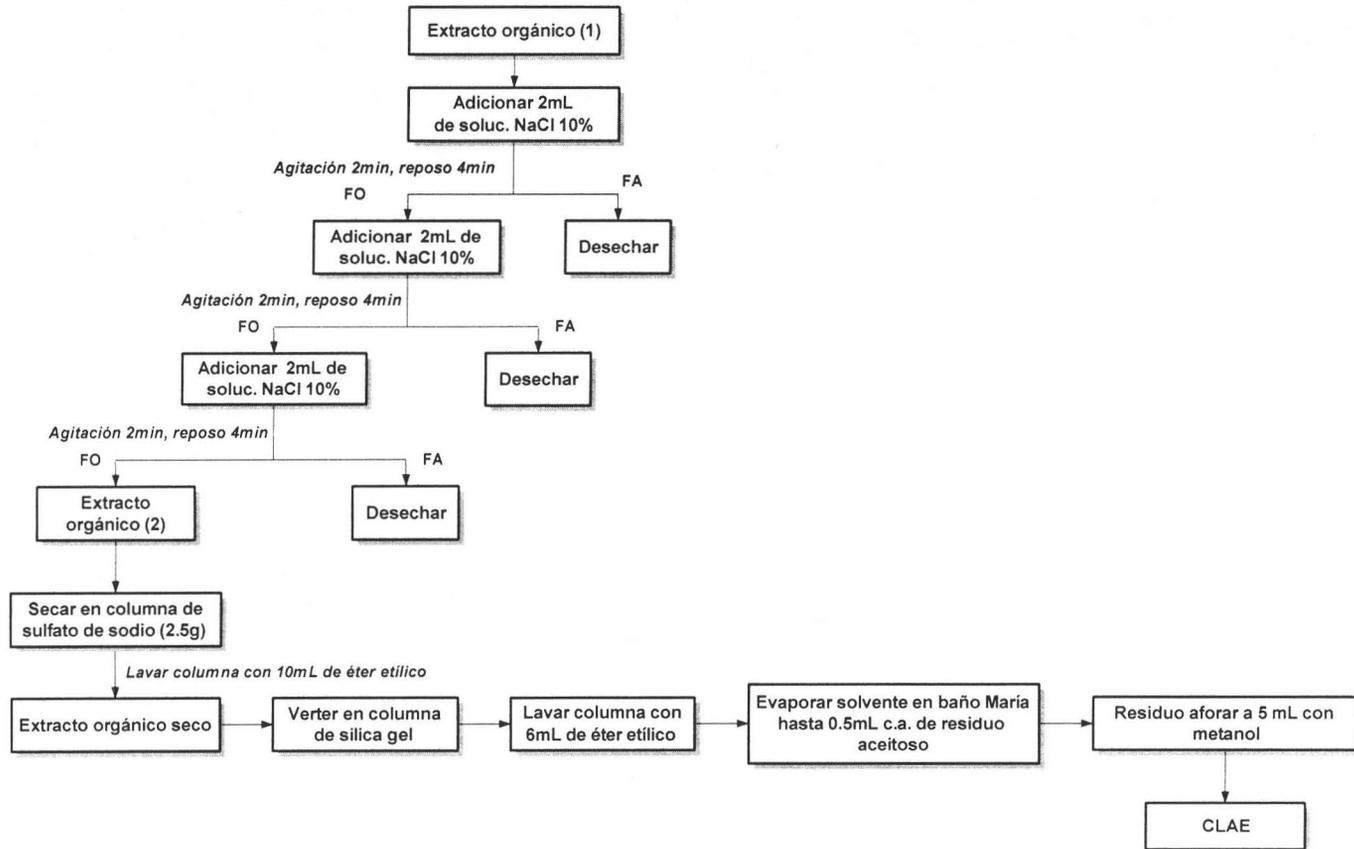
FO*: Fase orgánica. FA*: Fase acuosa

DIAGRAMA GENERAL DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A DEL HÍGADO DE RES PARTE I



FA: Fase acuosa, FO: Fase orgánica

DIAGRAMA GENERAL DE EXTRACCIÓN DE VITAMINA A DEL HÍGADO DE RES PARTE II



FA: Fase acuosa. FO: Fase orgánica