



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS
DE VITAMINA E EN ACEITE DE OLIVA**

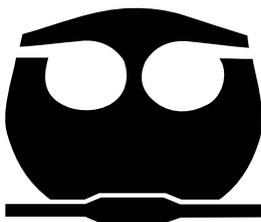
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

MAYELL SOTO MEJÍA



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

| | |
|---------------------------------|---|
| Presidente | Prof. Adolfo García Osuna |
| Vocal | Profa. Georgina Artemisa Duarte Lisci |
| Secretario | Profa. Bertha Julieta Sandoval Guillén |
| 1^{er}. Suplente | Profa. María de Lourdes Osnaya Suárez |
| 2^o. Suplente | Prof. José Guadalupe De la Rosa Canales |

Sitio en el que se desarrolló el tema:

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

Asesor del tema

Q. Adolfo García Osuna

Supervisor técnico

Q.F.B. Silvia Mendoza Arellano

Sustentante

Mayell Soto Mejía

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por el apoyo incondicional, por sus consejos y por guiarme por la senda correcta Gracias. En especial te agradezco a ti madre, por aguantar mis enojos, frustraciones y reclamos sin sentido, solo quiero decir que no hay día que no le de gracias al cielo por haber puesto a un ángel a mi lado desde que vi por primera vez la luz..

Quiero agradecerle a mi asesor Q. Adolfo García Osuna todo el apoyo, paciencia y tiempo brindado para el desarrollo de esta tesis.

A mi supervisora técnica Q. F. B. Silvia Mendoza Arellano y sinodales, por el tiempo invertido para la revisión de este trabajo.

A las amigas del Lab.3B, Adriana, Susana, Elizabeth, Odemaris, Alia, Lilia del Carmen, por su apoyo y tolerancia

A mis amigas de la Facultad de Química: Isaura Hernández, Victoria Cervantes, Lizeth Meza, Guadalupe Ponce, Amanda Ochoa, Erandi Alcalá Lilita Torres, Aracne Huerta, Roxana Peralta, Paola Aguilar, Elizabeth Zavala, Silvia Godínez, por haberme dejado entrar en su círculo de amigos, por sus risas y ocurrencias que alegraron mis días tristes, por sus consejos en momentos difíciles y por que me han hecho ver la vida de una forma diferente, Gracias por todo...

A los amigos: Samuel Santos, Saúl Santos, Rogelio Ibarra, Víctor Gamero, Christian Velásquez, Omar Escalante, José de la Rosa, José Cravioto, Israel Mena, Miguel Ángel Chávez, por que hemos compartido algunas ideas, sueños y aventuras, Gracias...

Gracias a la Máxima Casa de Estudios: La UNAM, por que desde mi paso por el CCH Oriente hasta la Facultad de Química, los profesores que la integran, me han formado e inculcado valores que me permitirán ser una persona de provecho para el beneficio de la sociedad. "Por mi raza hablará el espíritu".

Ya ti Gran Dios Omnipotente, te agradezco me hayas brindado una segunda oportunidad para llegar al cierre de un ciclo de mi vida en compañía de mis seres queridos, solo puedo decir que mereces todo mi respeto...

| ÍNDICE | Página |
|---|---------------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVOS | 2 |
| ANTECEDENTES | |
| Vitamina E | 4 |
| Nomenclatura y Estructura | 4 |
| Función | 6 |
| Fuentes alimentarias e Ingesta diaria | 7 |
| Digestión y absorción | 10 |
| Deficiencia y toxicidad | 10 |
| Análisis de vitamina E | 11 |
| Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) | 14 |
| Extracción en fase sólida (EFS) | 24 |
| Validación métodos | 27 |
| METODOLOGÍA | 37 |
| RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS | |
| Linealidad del sistema | 57 |
| Precisión del sistema | 60 |
| Precisión del método (Repetibilidad) | 63 |
| Estabilidad de los extractos | 67 |
| Recobro | 70 |
| CONCLUSIONES | 75 |
| BIBLIOGRAFÍA | 76 |
| ANEXOS | 79 |

INTRODUCCIÓN

La función principal que tiene la vitamina E es actuar como un potente antioxidante de sustancias de carácter lipofílico, así como de membranas biológicas y tejidos en los seres vivos, es esta razón por la cual en la industria alimentaria y farmacéutica, la vitamina E ha adquirido gran importancia. Es posible encontrar en el mercado una gama de productos que contienen esta vitamina, tales como el huevo, las nueces, el hígado de cerdo, el aguacate, los aceites vegetales como el de germen de trigo, el de maíz, el de oliva, además de bebidas, complementos alimenticios, multivitamínicos, etc.

Como una sustancia lipofílica, la vitamina E está íntimamente asociada con los componentes lipídicos en la matriz de la muestra. Existen varios procedimientos de preparación de muestra para extraer la parte lipídica de diferentes matrices para poder liberar por medio de una saponificación a la vitamina E y además de realizar su extracción, también su cuantificación. Cabe mencionar que en la actualidad se utiliza a nivel mundial la técnica oficial propuesta por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC por sus siglas en inglés), pero la cantidad de reactivos que se requiere y los residuos que se obtienen para el análisis es grande (del orden de litros), por lo que el material utilizado es de volúmenes grandes; así mismo, los tiempos de análisis son largos (aproximadamente 4 horas por muestra). Por ello es necesario llevar a cabo el desarrollo de un método optimizado que permita disminuir la cantidad de reactivos, muestra y tiempos de análisis. En este trabajo en particular se desarrolló una metodología de análisis en un producto alimenticio específico como el aceite de oliva.

Se utilizó la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE por sus siglas en español) ya que es una técnica óptima para realizar el análisis de la vitamina E y sus diferentes derivados con respecto a otras vitaminas liposolubles, permitiendo la separación y cuantificación de los distintos compuestos con actividad de vitamina E. En el laboratorio donde se desarrolló este trabajo ya se cuenta con la técnica validada de CLAE para el análisis de esta vitamina, desarrollada en la tesis “Validación de la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) para la cuantificación de vitamina E”, en la cual se demostró que la señal que genera la vitamina E presenta una buena resolución con respecto a otras vitaminas liposolubles, además que el sistema presenta una buena linealidad y precisión, permitiendo cuantificar a la vitamina E en forma más rápida.

Hoy resulta evidente que los aspectos tradicionales de normalización alimentaria, calidad, conformidad a criterios de composición y etiquetado han vuelto una vez más a estar en primer plano, por lo cual es necesario que los métodos de análisis cumplan con los requisitos de la aplicación analítica por la que fueron elegidos o desarrollados, en otras palabras, deben de estar validados, ya que con ello se asegura se cumple el atributo de confiabilidad.

Se elige al aceite de oliva extra virgen ya que se ha observado dentro de la población un incremento en cuanto a su consumo debido a la tendencia a ingerir alimentos con nulo o mínimo tratamiento industrial, además que se reporta en la literatura una buena presencia de esta vitamina en este aceite.

OBJETIVOS

- Encontrar las condiciones óptimas para realizar la extracción de vitamina E en aceite de oliva virgen. Realizando el análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos obtenidos por CLAE.
- Realizar la validación de la metodología desarrollada para el análisis de vitamina E en el aceite de oliva virgen.

ANTECEDENTES

VITAMINA E

Los primeros en identificar un compuesto liposoluble presente en aceites vegetales, esencial para la reproducción de ratas de laboratorio fueron Herbert Evans y Catherine Bishop en 1922, a este compuesto lo denominaron *Tocoferol* (del griego *tocos*, parto, y *feros*, llevar), posteriormente en 1924 Sure lo denomina vitamina E¹.

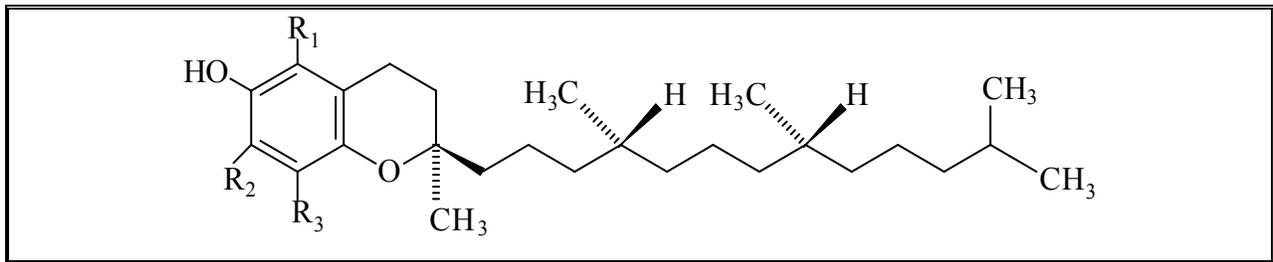
Las características de la vitamina E en su forma pura son las siguientes:

Es un líquido amarillo viscoso que se descompone fácilmente en presencia de luz, iones de metales de transición (en niveles de traza), oxígeno y en pH alcalino, es resistente a pH ácidos, es insoluble en agua, pero soluble en grasa y en solventes orgánicos².

Nomenclatura y estructura².

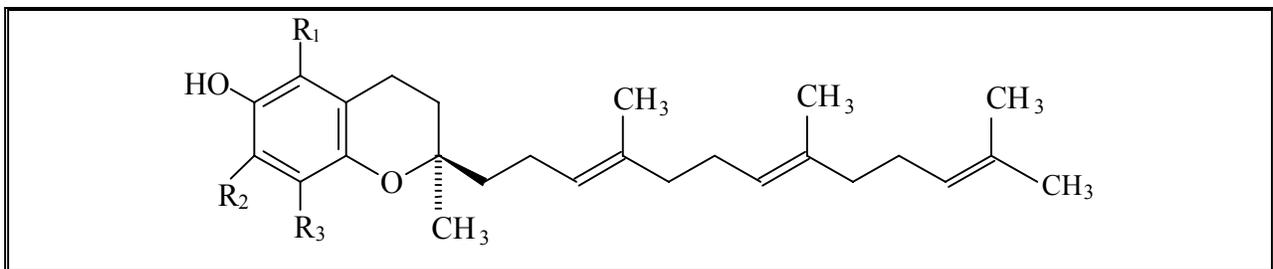
Existen 8 compuestos naturales con actividad de vitamina E, los α , β , γ y σ tocoferoles y los correspondientes tocotrienoles. La estructura básica está constituida por un núcleo hidroxicromona ó 6-cromanol (o dihidro-gamma-pirano) al que se une una cadena de fitilo. El sitio activo de la vitamina es el grupo 6-Hidroxilo del anillo de cromanol, el cual se sitúa a nivel de membrana en la superficie polar, mientras que la cadena de fitilo se localiza interactuando con los ácidos grasos de los fosfolípidos en la región no polar. Existen al menos 8 formas isoméricas, las cuales se dividen en 2 grandes grupos; un primer grupo constituido por cuatro isómeros con una cadena saturada de fitilo (formas α -, β -, σ -, γ - tocoferol), el segundo constituido por 4 isómeros que muestran una cadena de fitilo con 3 dobles enlaces en las posiciones 3', 7', 11' (formas α -, β -, σ -, γ - tocotrienol). Las diferencias entre las formas isoméricas se encuentran en la posición de los subgrupos metilo en el anillo bencénico. Los tocoferoles contienen unidades isoprenoides saturadas con 3 centros de simetría en los carbonos 2, 4 y 8, con la conformación R, los tocotrienoles contienen una unidad trieno isoprenoide de 16 carbonos, con las configuraciones 2R, 3 trans y 7 trans, (*Fig. 1*).

Tocoferoles



| Tocoferol | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Nombre Químico |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| α | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | 5,7,8-Trimetiltocol |
| β | CH ₃ | H | CH ₃ | 5,8-Dimetiltocol |
| γ | H | CH ₃ | CH ₃ | 7,8-Dimetiltocol |
| δ | H | H | CH ₃ | 8-Metiltocol |

Tocotrienoles



| Tocotrienoles | R ₁ | R ₂ | R ₃ | Nombre Químico |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| α | CH ₃ | CH ₃ | CH ₃ | 5,7,8-Trimetiltocotrienol |
| β | CH ₃ | H | CH ₃ | 5,8-Dimetiltocotrienol |
| γ | H | CH ₃ | CH ₃ | 7,8-Dimetiltocotrienol |
| δ | H | H | CH ₃ | 8-Metiltocotrienol |

Fig. 1. Estructura de tocoferoles y tocotrienoles.²

Función.

Sin lugar a dudas, la principal función fisiológica de esta vitamina es la de actuar como antioxidante. Los tocoferoles son antioxidantes enérgicos capaces de impedir la oxidación de las grasas, así como también de las vitaminas A y C mediante la eliminación de los radicales libres.

La vitamina E actúa como un agente reductor en el mecanismo de inhibición de la oxidación, especialmente de lípidos¹. Durante esta reacción de inhibición, el α -tocoferol puede reaccionar con un radical peroxilo (ROO^\bullet) u otros radicales libres (como el oxígeno singlete $^1\text{O}_2$, el radical superóxido O_2^\bullet , y el radical hidroxilo HO^\bullet) para formar un hidroperóxido y un radical α -tocoferilo (fig. 2). Este radical es poco reactivo debido a que el electrón no apareado resuena en todo el anillo fenólico.

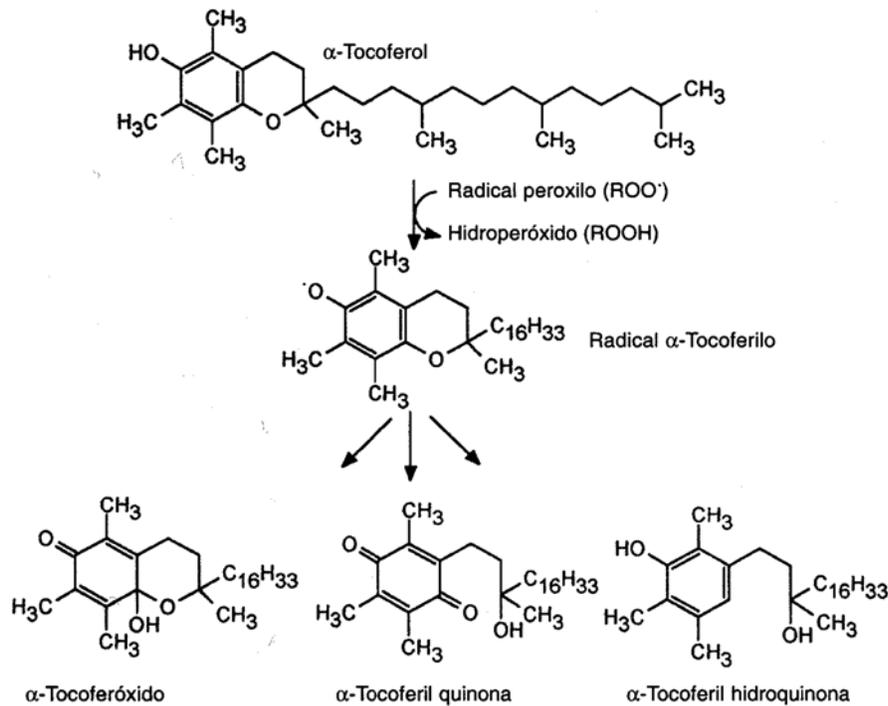


Fig. 2. Degradación oxidativa de la vitamina E y sus productos.

Las reacciones de terminación del radical pueden conllevar a la formación de dímeros covalentemente ligados (sin actividad de radical libre), por ejemplo, si reacciona con otro radical tocoferilo, se forma un dímero (que ya no es un radical libre), si reacciona con otro radical peroxilo (LOO^\bullet) se propicia la formación de un aducto (compuesto que tampoco tiene actividad

oxidante), aunque también la oxidación y reestructuración adicionales pueden producir tocoferoxido, tocoferil hidroquinona y tocoferil quinona (*fig. 2*). Para evitar que el radical tocoferilo pueda sustraer un átomo de hidrógeno de los lípidos o de un hidroperóxido (LOOH) e iniciar de nuevo la cadena de reacciones de oxidación, el radical tocoferilo puede reaccionar con un agente reductor tal como la vitamina C, el ubiquinol o glutatión para regenerarse el α -tocoferol y evitar la oxidación³.

Fuentes alimentarias e ingesta diaria recomendada.

La vitamina E está distribuida en la naturaleza, de todas las formas, el α -tocoferol es el predominante en muchas especies siendo a su vez la forma activa biológicamente, así como el mejor antioxidante liposoluble en células de mamíferos y sangre.

En los alimentos de origen vegetal está presente como un constituyente de la materia insaponificable, usualmente se puede encontrar junto a los fosfolípidos, carotenoides, y clorofilas. En los animales, se encuentra en el tejido adiposo. Los alimentos más ricos en tocoferoles son los aceites vegetales, especialmente los de mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados, como girasol, maíz, oliva, pero también se encuentra en margarina, mayonesa, nueces, almendras, pistaches, trigo, avena, arroz, aguacate, espinaca, brócoli, espárragos yema de huevo, carne, hígado, mantequilla, etc¹. En la *tabla 1* se muestra la actividad biológica de algunos tocoferoles, siendo el α -tocoferol natural (d- α -tocoferol o RRR- α -tocoferol) el que posee la mayor actividad:

| Forma de tocoferol | Actividad (UI /mg) |
|---------------------------------------|--------------------|
| Acetato de d, l- α -tocoferol* | 1 |
| d-l- α -tocoferol* | 1.1 |
| Acetato de d- α -tocoferol* | 1.4 |
| d- α -tocoferol | 1.5 |
| d-l- β -tocoferol* | 0.3 |
| d-l- γ -tocoferol* | 0.15 |
| d-l- δ -tocoferol* | 0.01 |

Tabla 1: Actividad biológica de algunos tocoferoles⁴

La actividad de la vitamina E de los compuestos activos se expresa en términos de mg de α -tocoferol equivalente:

1 mg de α -tocoferol equivalente = 1 mg de d- α -tocoferol

1.1 mg de acetato de d- α -tocoferol

1.36 mg (1.49 UI) acetato de d y l- α -tocoferol¹

En la *tabla 2* se observan algunos de los alimentos en los que se reporta la presencia de la vitamina E, existe una tabla más extensa en cuanto a contenido de vitamina E en los alimentos, es la del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en la cual se encuentran tanto productos naturales como procesados⁵.

Las consideraciones de ingesta diaria recomendada por el Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán⁶” son las siguientes:

| mg de α tocoferol equivalente | Infantes | | Niños y Púberes | | | Adultos | Mujeres Embarazadas | Mujeres Lactando |
|--|--------------|---------------|-----------------|-------------|--------------|---------------------------|------------------------|---------------------|
| | 0.5 meses | 6-11 meses | 1-3 años | 4-6 años | 7-18 años | 18 años en adelante | | |
| | 3 | 4 | 6 | 7 | 10 | 10 | | |

| ALIMENTO | CANTIDAD (mg/100g)¹ | CANTIDAD (mg/100g)³ | CANTIDAD (mg/100g)⁷ |
|-----------------------------|---|---|---|
| Hígado de cerdo | 0.17 | - | - |
| Carne magra | 0.15 | 2.24 | - |
| Huevo de gallina | 1.6 | - | - |
| Yogurt natural | 0.04 | - | - |
| Leche entera pasteurizada | 0.09 | - | - |
| Almendra secas | 20 | - | 25 |
| Arroz | 0.1 | - | - |
| Tomate | 0.89 | - | - |
| Pimiento | 0.8 | - | - |
| Espinaca | 1.6 | 26.05 | - |
| Uva | 0.7 | - | - |
| Pera | 0.89 | - | - |
| Aguacate | 2.27 | - | - |
| Aceite de oliva | 48.7 | 9 | 12 |
| Aceite de girasol | 5.1 | 56.4 | 55 |
| Aceite de hígado de bacalao | 20 | - | - |
| Aceite de maíz | 17.2 | 27.2 | 31 |
| Aceite de germen de trigo | 215.4 | - | - |
| Germen de trigo | - | - | 30 |
| Avellanas | - | - | 26 |
| Coco | - | - | 17 |
| Germen de maíz | - | - | 16 |
| Aceite de soya | - | 17.9 | 14 |
| Soya germinada | - | - | 13 |
| Margarina | - | - | 10 |
| Cacahuates y nueces | - | - | 9 |

Tabla 2. Contenido de vitamina E en distintos alimentos.

Digestión y Absorción de vitamina E.

La vitamina E alimentaria se compone mayoritariamente de α y γ tocoferol, estando las formas ingeridas en estado libre o formando ésteres. Como vitamina liposoluble que es, se encuentra a nivel intestinal disuelta en las grasas alimentarias, lo que hace que su digestión y absorción dependan de la asimilación de las grasas, así como de una buena funcionalidad biliar y pancreática¹. La absorción de la vitamina E es relativamente pobre, sólo del 20 al 40 % de la cantidad ingerida es absorbida⁸.

No existe un órgano concreto para el almacenamiento de la vitamina E, siendo posiblemente el tejido adiposo la principal reserva, aunque la liberación de esta vitamina desde este tejido es muy lenta. En el hígado existe también una cierta capacidad de depósito para la vitamina E, pero dada la rápida movilización de sustancias que allí ocurre, la capacidad es pequeña. Otro órgano donde se puede almacenar es en el tejido muscular⁹. Realmente, el tocoferol absorbido se distribuye ampliamente por todos los tejidos y células sanguíneas incorporándose a las membranas de las células junto al colesterol y los fosfolípidos¹.

Deficiencia y toxicidad.

La deficiencia de esta vitamina en humanos, con origen exclusivamente alimentario, es bastante rara y queda limitada a los cuadros multicarenciales propios de países subdesarrollados o en vías de desarrollo. La mayoría de los síntomas de esta deficiencia está relacionada con la ausencia de protección antioxidante, siendo uno de los signos más característicos la tendencia de los eritrocitos a la lisis (destrucción).

Pueden asimismo aparecer deficiencias asociadas a patología como el síndrome de mal absorción, fibrosis quística, enfermedades crónicas del hígado, anemias hemolíticas, así como también degeneración tubular renal, pigmentación de los depósitos lipídicos, distrofia muscular. Se ha observado que grandes y prolongadas ingestas de esta vitamina (superior a 1,200 mg/día) parece interferir en la absorción de las vitaminas A y K, así como dar lugar a un incremento de la creatinuria e interferir en el metabolismo de la vitamina K; por otra parte elevadas dosis intravenosas parecen aumentar el riesgo de sepsis, tanto bacteriana como fúngica en prematuros. En adultos se han observado alteraciones gastrointestinales pasajeras¹.

Análisis de vitamina E

Al encontrarse la vitamina E inmersa en la matriz de la muestra es necesario liberarla para su posterior análisis cualitativo y cuantitativo. En la literatura existen procedimientos los cuales sirven para liberar la parte grasa de la matriz alimenticia y así poder separar a la vitamina E de los demás componentes para su análisis cualitativo-cuantitativo. Pero todos estos procedimientos utilizan uno o más de los siguientes pasos:

Una extracción de un solo paso con un solvente orgánico miscible, una extracción en dos pasos con un alcohol y un solvente orgánico inmiscible, la tercera, la saponificación con la cual se reducen la cantidad de sustancias orgánicas extraíbles e hidroliza los ésteres de tocoferol obteniendo así el α -tocoferol libre⁴. En la extracción en un solo paso, la muestra es disuelta o diluida en un solvente orgánico miscible en agua como por ejemplo alcohol o acetona. En la extracción en dos pasos, la lipofílica vitamina E es extraída de una fase acuosa con un solvente orgánico miscible en agua, a menudo se utiliza metanol, etanol o isopropanol. Después se adiciona el solvente inmiscible, las fases se separan y la vitamina E se encuentra en la fase orgánica junto con otros componentes no polares tales como los triglicéridos, los fosfolípidos, esteroides, etc. Una vez que se ha obtenido la fracción lipídica se procede a saponificar. La saponificación consiste en colocar la fracción lipídica (o la muestra) en un matraz, se homogeniza con un volumen de agua a la que se le adiciona rápidamente un volumen de una solución de KOH en etanol y un antioxidante, la duración de este proceso va de 10 a 30 minutos a reflujo. Después de enfriarse la solución saponificada se procede a la extracción con el solvente elegido (extracción líquido-líquido), los extractos se lavan con agua y se llevan a un volumen conocido de solvente propio para el análisis cualitativo y/o cuantitativo que se vaya a realizar².

En la actualidad también hay técnicas alternativas de extracción del material lipídico que involucran la utilización de fluidos supercríticos¹⁰.

Una de las primeras formas en que se cuantificaban los tocoferoles en los alimentos era basado en una reducción cuantitativa de iones férricos (Fe^{3+}) a iones ferrosos (Fe^{2+}) por acción de

los tocoferoles. La cantidad de iones ferrosos formados se estimaba con una reacción colorimétrica con α, α' -Dipiridol (en la que se forma un complejo de color rosa a rojizo) el cual se media en un fotómetro a 520 nm y se relacionaba a los tocoferoles presentes en la muestra.¹¹

Posteriormente se utilizó la cromatografía en capa fina para realizar estudios cualitativos, ya que este método separa los homólogos de tocoferol. Éste fue un avance significativo respecto a los ensayos colorimétricos ya que en ellos había interferencias por parte de otras sustancias reductoras contenidas en los alimentos por ejemplo, antioxidantes adicionados para protección de los tocoferoles en la saponificación, la grasa misma, los carotenos etc².

Actualmente para el análisis de la vitamina E en alimentos el método más utilizado es la propuesta por la Asociación Nacional de Químicos Analistas (*Association of Official Analytical Chemists*, AOAC por su nombre y siglas en inglés), este método menciona que las muestras que contengan vitamina E en forma natural, se someten primero a una extracción del material lipídico, ya sea con el aparato de Soxhlet o con el aparato de Goldfish. Posteriormente el extracto lipídico se saponifica con KOH en medio etanólico a reflujo, como la vitamina se encuentra en la parte insaponificable de la solución, después de la saponificación se procede a una extracción líquido-líquido con éter. El extracto obtenido se lava con agua para eliminar el álcali remanente, después del lavado se procede a un secado utilizando sulfato de sodio granular (Na_2SO_4) y por último se concentra por evaporación. El extracto crudo, se hace pasar por una columna de alumina para su purificación y de esta forma se realiza una cromatografía en capa fina para identificar el α -tocoferol, posteriormente se confirma su presencia con una reacción colorimétrica con tricloruro de hierro (FeCl_3) en batofenantrolina. El complejo colorido (rojo) es inestable (aproximadamente dura 90 min.) por lo que la determinación se debe hacer rápido¹².

En la década de los 90's hubo una proliferación de técnicas que utilizan la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para el análisis cualitativo y cuantitativo de la vitamina E, ya que con esta técnica es posible medir las formas específicas de los compuestos con actividad de vitamina E, además, la técnica de HPLC tiene una gran flexibilidad y conveniencia por el manejo de muestras de provenientes de diferentes matrices. Esto se entiende cuando uno considera que el análisis de vitamina E se realiza en una gran variedad de muestras que difieren en el contenido de esta vitamina y en la complejidad del alimento (matriz), por ejemplo de las formulaciones farmacéuticas a los alimentos naturales, de los complementos multivitamínicos a los cereales para el desayuno².

En la *tabla 3* se presentan algunas condiciones cromatográficas encontradas en la literatura que se han utilizado para determinar vitamina E como α -tocoferol y β -tocoferol.

| REFERENCIA | COLUMNA | FASE MÓVIL | DETECCIÓN | Matriz |
|---|---------------------------|---|---------------|---|
| Carbajal Jarquín E. (2005) | Luna C ₁₈ | Acetonitrilo- metanol (85: 15) | UV-292 nm | Vitamina E |
| Gomez Coronado, et al. (2004) | Discovery C ₁₈ | Acetonitrilo- metanol-ácido acético (70:30:0.1) | UV 295 nm | Espicias y vegetales |
| M. M. Delgado Zamarreño et al. (1996) | C ₁₈ | Metanol-agua (99:1) | Amperométrica | Semillas y nueces |
| S. Albalá-Hurtado, et. al. (1997) | ODS-2 (C ₁₈) | Metanol-agua- acetonitrilo (95: 4: 1) | UV-292 nm | Formula Láctea |
| B. Rodas Mendoza, et al. (2003) | ODS-2 (C ₁₈) | Metanol | UV- 292 nm | Formula Láctea |
| H. Qian, M Sheng. (1998) | Novapak C ₁₈ | Metanol | UV-290 nm | Alimento para mascotas |
| A. Schieber et. al. (2001) | C ₃₀ | Metanol- terbutilmetiléter- agua (90: 6: 4) | UV-292 nm | Suplemento alimenticio para beber |

Tabla 3. Combinaciones de columnas, fase móvil y detector en el análisis de vitamina E.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA

La cromatografía es una técnica de separación física que permite separar, aislar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil, de tal manera que se establece un equilibrio entre ambas fases, el cual se puede representar por medio de una constante de equilibrio¹⁹:

$$K_{eq} = \frac{[Conc\ analito]_{FASE\ EST}}{[Conc\ analito]_{FASE\ MÓVIL}}$$

Cada componente se distribuirá de modo diferente dependiendo de la afinidad con cada fase como consecuencia de las interacciones que se generen entre el analito y las fases (pueden ser de tipo hidrofílicas, hidrofóbicas, interacciones polares, electrostáticas, Fuerzas de Van Der Waals, etc.)²⁰. De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía; una de estas clasificaciones que se puede dar es aquella que se divide respecto a la fase móvil y después se puede subdividir por su fase estacionaria, tal como se muestra en la *figura 3*.

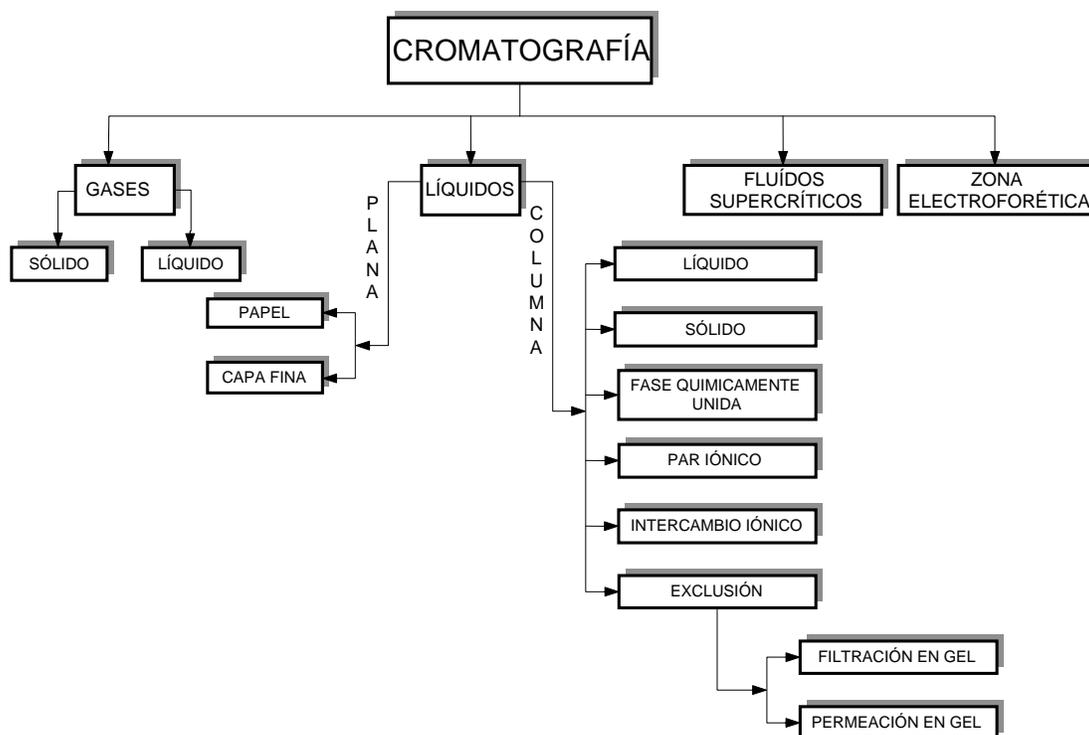


Fig.3. Clasificación general de las técnicas cromatográficas.

Instrumentación.

Durante muchos años se practicó la cromatografía líquida en una forma “clásica” la cual consistía de una columna de vidrio rellena con algún material, como sílice o alúmina en la que se introducía la muestra disuelta en la fase móvil después se adicionaba más fase móvil para hacer eluir la muestra a través de la columna. Como el disolvente o fase móvil fluía a través de la columna por efecto de la gravedad, apenas se producía una débil presión ejercida para que la muestra pasara a través del relleno, con lo cual los tiempos de análisis se hacían muy largos (horas o días), el material de relleno solo se podía utilizar una vez debido a que parte de la muestra se absorbe en forma irreversible, además que la identificación y cuantificación de los componentes eluidos debía realizarse con otras técnicas analíticas. Debido a estos inconvenientes surgió la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE por sus siglas) junto con todo el instrumental que lo compone que permite grandes ventajas respecto a la forma “clásica”¹⁹.

La *figura 4* muestra los componentes principales de un sistema de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

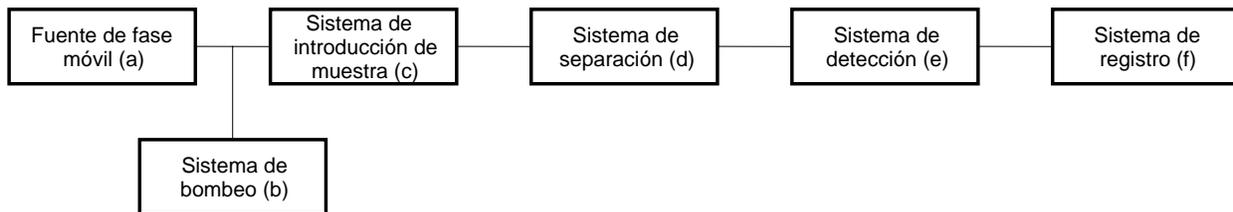


Fig. 4. Componentes principales del sistema cromatográfico²⁰.

A).- Fuente de fase móvil.

Para el almacenamiento de la fase móvil se pueden utilizar recipientes de vidrio (*fig. 5*), acero inoxidable o plástico inerte, de una capacidad de 1 a 3 litros. La fase móvil puede estar constituida por un solo disolvente o una mezcla de disolventes, los cuales deben de cumplir las siguientes condiciones:

- ✓ Disolver la muestra.
- ✓ Deben de ser de alta pureza.
- ✓ Tener baja viscosidad.
- ✓ Ser inertes.
- ✓ Que no sean tóxicos o peligrosos.
- ✓ Ser compatible con el detector a utilizar.
- ✓ Ser barato o accesible.

Además de las características descritas, es necesario que los disolventes no contengan partículas o impurezas sólidas que pudieran entrar al sistema cromatográfico ya que pueden obstruir la tubería o dañar el sistema de bombeo así como la columna. Para evitar esto, en los equipos existen filtros de material inerte para la toma de fase móvil (generalmente de teflón, acero inoxidable o vidrio), los cuales evitan la entrada de estas partículas (*fig. 5*).

Otro aspecto importante es la desgasificación de la fase móvil, por que hay una gran probabilidad de formación de burbujas al trabajar con el disolvente o al hacer mezclas de ellos (para preparar la fase móvil) debido a que el oxígeno y el nitrógeno componentes del aire se encuentran disueltos en ellos, y en caso de que las burbujas ingresen al equipo puede dañar el sistema de bombeo, disminuir la eficiencia de la columna y afectar el funcionamiento del detector. “Actualmente, en muchos instrumentos, el recipiente que contiene la fase móvil está acondicionado para efectuar la remoción de estos gases o esta acoplado al instrumento un mezclador y desgasificador en línea con los cuales se remueven estos gases. De no contar con estos instrumentos, una forma es aplicar vacío sobre el recipiente que contiene la fase móvil, mientras se agita el líquido con un agitador magnético, si esto no es suficiente, se procede además a calentar ligeramente el líquido en tanto que el espacio libre del recipiente se purga con nitrógeno o con algún otro gas inerte menos soluble”¹⁹. Los disolventes más empleados para CLAE son:

Polares: Acetonitrilo, isopropanol, metanol, agua.

No polares: Hexano, cloruro de metileno, cloroformo.



Fig. 5. Recipiente de vidrio y filtro de teflón.

Dependiendo si la fase móvil mantiene el mismo poder de elución (composición) durante la corrida o varía, se puede trabajar bajo dos formas de elución conocidas como:

- *Isocrática*: Se mantiene el mismo poder de elución, esto es, que se mantiene la misma composición de la fase móvil (la proporción del disolvente o los disolventes que la constituyen no varían en el tiempo que dure el análisis en el cromatógrafo).
- *Gradiente de elución*: Se varía el poder de elución, en esta forma hay una variación en la que la composición de la fase móvil durante el tiempo que dura el análisis en el cromatógrafo.

B).- Sistema de bombeo.

Las columnas que se utilizan en la cromatografía de líquidos están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas (del orden de 15-5 μ m), lo cual hace que la resistencia (presión) al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente largos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo para la técnica de CLAE son:

- Presión máxima de operación (usualmente 400 atm).
- Intervalo de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 mL/ min).
- Reproducibilidad y constancia del flujo (aproximadamente 1 %).
- Características de flujo (continuo o pulsado).

De acuerdo a las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas:

- Bombas neumáticas.
- Bombas mecánicas.

En lo que atañe a las mecánicas existen dos tipos distintos:

- Bombas recíprocas (pistón o diafragma).
- Bombas de desplazamiento continuo.

Debido a que se trabaja con un cromatógrafo de líquidos que tiene integrada una bomba de doble pistón (reciprocante), sólo se explicará el funcionamiento de dicha bomba.

Inicialmente las bombas estaban constituidas por un pistón que desplazaba flujos de volumen constante en forma no continua, sino más bien pulsante. La máxima presión que se puede obtener es de aproximadamente 600 atm. La forma en como operan es la siguiente: mediante el movimiento del pistón y a través de un sistema de válvulas (llamadas válvulas “check” que son esferas usualmente de cuarzo o zafiro) que alternadamente se abren y cierran, se llena y vacía, de modo alternativo en una pequeña cámara¹⁹. Una de las desventajas que tenía esta bomba es que el flujo que se obtenía un flujo en forma pulsante y no en forma continua y uniforme. Lo anterior puede causar pérdida en la eficiencia de la columna e inestabilidad del detector y por tanto era necesario eliminar dichas pulsaciones. Este problema se solucionó implementando en el sistema un juego de dos pistones sincronizados, con el fin de que mientras uno de ellos carga la fase móvil hacia la cámara, el otro la expulsa hacia el sistema cromatográfico, con esto es posible mantener volúmenes y flujos constantes ya no pulsantes, por lo que se eliminan las posibles de afectar el sistema cromatográfico¹³ (fig. 6).



Fig. 6. Sistema de bombeo cromatógrafo Marca Knauer y cabezales de los pistones de la bomba.

C).- Sistema de introducción de muestra.

Para introducir la muestra al sistema, se utiliza una válvula de inyección o una válvula de seis pasos. La introducción de la muestra a esta válvula se puede realizar en forma manual o automatizada, la primera es con una jeringa (fig. 7).

La válvula tiene un rotor que gira es dos posiciones una de carga (load por su nombre en inglés) y otra de inyección (inject por su nombre en inglés), además cuenta con una tubería capilar de acero inoxidable llamada “loop” en inglés (que puede ser de 5 a 200 μL de capacidad)

en la cual la muestra es contenida antes de introducirla al sistema. La forma en que funciona esta válvula es la siguiente:

En la posición de carga (fig. 8 derecha), la muestra disuelta en la fase móvil es introducida mediante el inyector (Manual o automático) para llenar el “loop”, además en esta posición, la fase móvil pasa del sistema de bombeo a la columna.



Fig. 7. Jeringa de vidrio para introducción de muestra, capacidad 250 μ L.

En la posición de inyección, se permite el paso de la fase móvil al “loop” para arrastrar a la muestra hacia la columna y que se lleve a cabo la separación¹⁹.

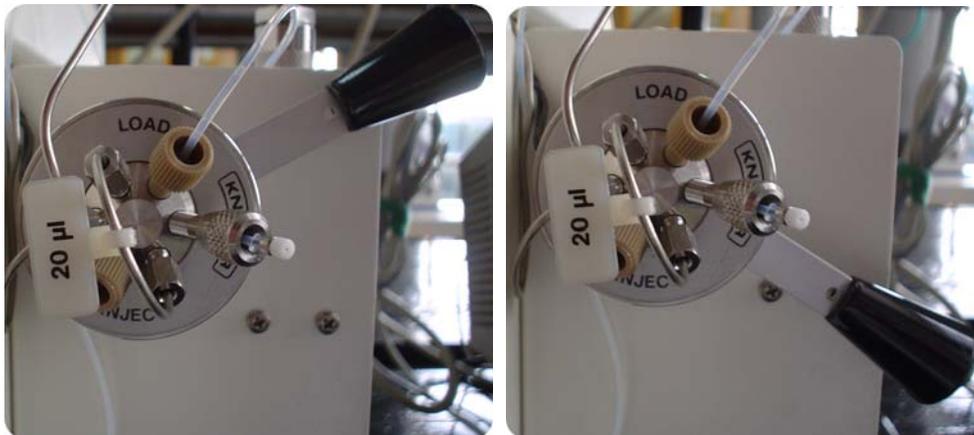


Fig. 8. A la izquierda se observa la válvula en la posición de carga (load) y a la derecha se observa la válvula en posición de inyección (inject).

D).-Sistema de separación.

En todo sistema cromatográfico, ya sea en fase líquida o gaseosa, la columna es el “corazón” del sistema puesto que en ella se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra en estudio, por lo que se hará una descripción de las características generales de ésta.

Básicamente, la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte (usualmente acero inoxidable), de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones empacada con la fase estacionaria.

La longitud de la columna es por lo general, de entre 5-25 cm, aunque en ocasiones puede ser más larga. El diámetro interno en la mayoría de los casos es de 3-4 mm, pero en columnas de tipo preparativo es de hasta 1 cm. El tamaño de la partícula que se empaca oscila entre los 3-5 μm ¹⁹ (fig. 9).



Fig. 9. Columna analítica Luna C-18 de 50 mm de longitud.

El tipo de la fase estacionaria con que se empaca la columna será dependiendo el tipo de cromatografía que se quiera trabajar como se indicó en la *fig. 3*.

Las fases estacionarias más utilizadas para empacar las columnas en CLAE son las fases químicamente unidas, en éstas se unen los grupos activos de la fase estacionaria a un soporte (generalmente partículas de sílica). Una ventaja de esta unión es que permite que la fase móvil no disuelva a la fase estacionaria y por consecuencia no produzca un deterioro considerable en ella, por lo que su tiempo de vida útil aumenta²⁰.

Dependiendo de los grupos activos que se unan al soporte y el tipo de sustancias que se quieran analizar, se podrán trabajar 2 modalidades en la CLAE:

- *Cromatografía en Fase Normal:* Este tipo de modalidad implica la utilización de una columna con tendencia polar, la cual se logra uniendo grupos funcionales con tendencia polar al soporte en la columna. Los grupos que generalmente se utilizan son el grupo amino ($-\text{NH}_2$), el grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) y el grupo nitrilo ($-\text{CN}$), y la fase móvil a utilizar es de tendencia no polar como hexano, tolueno, etc.
- *Cromatografía en Fase Reversa:* En esta modalidad la columna debe de tener una fase estacionaria de tendencia no polar, por lo que se unen al soporte grupos funcionales con

esta característica, tales como: el grupo octil ($-C_8H_{17}$), el octadecil ($-C_{18}H_{37}$), fenil ($-C_6H_5$) y la fase móvil que se emplea es de carácter polar como el agua, metanol, acetonitrilo, etc.

En este trabajo se empleo una columna de fase químicamente unida Luna C-18 (octadecilo), y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo-metanol. Como se puede observar la naturaleza de los grupos funcionales de la columna y la fase móvil que se utilizó nos indica que se trabajó con una cromatografía en fase reversa.

E).-Sistema de detección.

El detector que se utilice debe ser capaz de generar y/o medir algún fenómeno físico de los compuestos (y/o de la fase móvil) en forma continua a medida que sale de la columna, y generar una señal eléctrica proporcional a la concentración de la muestra.

*Las características que debe de cumplir el detector son:

- **Respuesta:** Puede ser universal o selectiva, según la capacidad que tenga el detector de trabajar con todo tipo de compuestos o con solo un tipo de compuestos en específico.
- **Sensibilidad:** Es la razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.
- **Ruido:** Variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra sino a alguna falla electrónica, fluctuaciones del voltaje, variaciones en el flujo, temperatura, etc.
- **Linealidad:** Para utilizar la señal generada por el detector como una medida cuantitativa, dicha señal debe guardar una relación lineal con la concentración del analito en estudio.
- **Estabilidad:** Un buen detector debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación del flujo.

*Los detectores más usados son de tipo:

- **Espectroscópico:** UV-Visible, Fluorescencia y Refractometría.
- **Electroquímico:** Amperométrico y conductimétrico²¹.

El cromatógrafo que se utilizó para el análisis de la vitamina E en este trabajo cuenta con un detector UV-Visible de longitud de onda variable (*fig. 10*). El cual funciona a partir de que la muestra contiene analitos capaces de absorber radiación electromagnética perteneciente al intervalo del UV cercano al visible (que va de 180-400 nm para el UV cercano y de 400-800 nm para el visible). Los analitos contenidos en la muestra que absorben dicha radiación son llamados

cromóforos y éstos son: compuestos con dobles ligaduras conjugadas y sistemas aromáticos. Pero también pueden absorber algunos iones de compuestos inorgánicos y algunos cationes de los metales de transición²².



Fig. 10. A la izquierda se observa el detector UV-Visible del cromatógrafo de la marca Knauer, a la derecha se observa la celda de dicho detector.

F).-Sistema de registro.

La función que cumple este dispositivo es la de representar en forma gráfica la señal generada por los compuestos en el detector, esto se puede lograr mediante un registrador, un integrador electrónico o una computadora (*fig. 11*). Al gráfico obtenido se le asigna el nombre de “Cromatograma”, el cual puede visualizarse en la *fig. 12*.

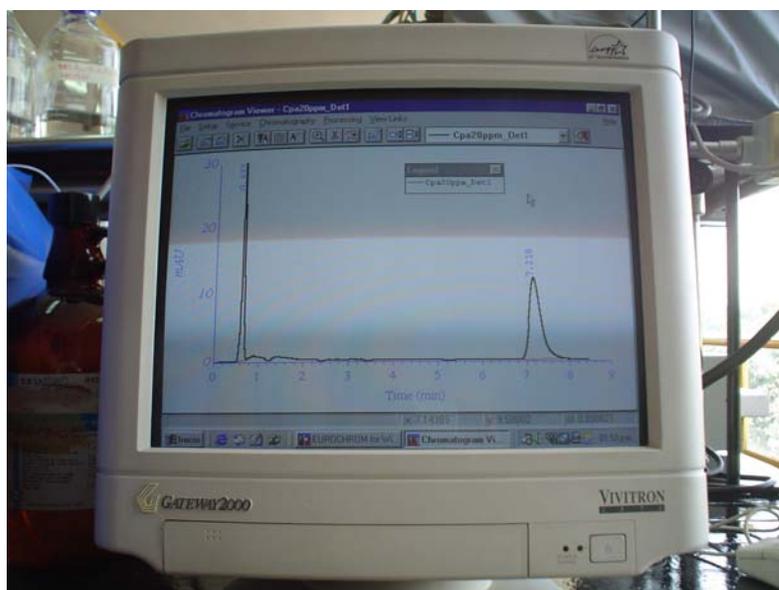


Fig. 11. Sistema de registro del cromatógrafo de la marca Knauer.

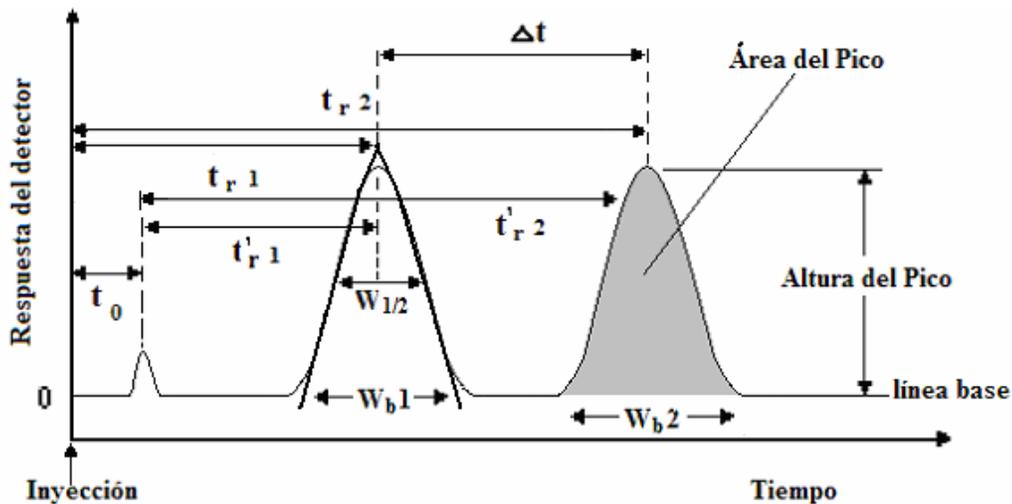


Fig. 12. Cromatograma y señales que se obtienen.

En el cromatograma de la *fig. 12*, se pueden observar varias señales las cuales son importantes de conocer para llevar a cabo estudios de carácter cualitativo-cuantitativo. Estas señales son:

- ♣ Tiempo de retención (t_r): es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce al sistema hasta el momento que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. El tiempo de retención es característico de la muestra, la fase estacionaria, la fase móvil y la temperatura.
- ♣ Tiempo muerto (t_0): Es el tiempo requerido para que salga del sistema una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil, o bien una muestra con características similares a ella.
- ♣ Tiempo de retención ajustado (t'_r): Es la diferencia entre t_r y t_0 , es decir es la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria.
- ♣ Ancho de la base del pico (w_b) o ancho a la altura media del pico ($w_{1/2h}$): es la porción de línea base interceptada por tangentes trazadas en ambos lados de una señal cromatográfica.
- ♣ Área del pico. Con esta medida es posible calcular la concentración de la muestra separada en la fase estacionaria.

Con la información obtenida del cromatograma es posible determinar ciertos parámetros cromatográficos, los cuales al interpretarlos dan información de si las condiciones de trabajo son

viabiles para la óptima separación de los analitos de interés, con lo que se puede lograr un análisis cuantitativo.

- Factor de capacidad (k'): se define como la cantidad de analito que se encuentra en la fase móvil entre la cantidad de analito en la fase estacionaria, el cálculo de este parámetro es de la siguiente forma:

$$k' = \frac{tr'_1}{t_0}$$

- Selectividad (α): da una idea de la afinidad de analito por la fase estacionaria (una medida cualitativa de separación). Para su cálculo se requieren al menos dos analitos.

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

- Eficiencia (N): está definido como el número de equilibrios (platos teóricos) que se establecen entre el analito y la fase estacionaria. Este parámetro nos dice la capacidad de columna para llevar a cabo la separación de un analito de la muestra. El cálculo de este parámetro se hace utilizando la siguiente ecuación:

$$N = 16 \left(\frac{tr'_1}{w_b} \right) = 5.545 \left(\frac{tr'_1}{w_{1/2}b} \right)$$

- Resolución (R_s): Nos da información cuantitativa acerca de la separación del área de un pico respecto a otro, si la resolución (R_s) > 1.5 indica que tenemos el 99.75% de separación entre los compuestos, y se calcula de la siguiente manera¹³:

$$R_s = \frac{1.18(tr_2 - tr_1)}{w_{1/2}h_1 + w_{1/2}h_2}$$

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

La preparación de la muestra antes de su análisis instrumental es de máxima importancia ya que con esto se logran 2 objetivos en particular: limpiar la muestra y/o realizar una concentración de ella. La limpieza de la muestra es necesaria cuando existen impurezas que pueden interferir en la medición del analito de interés. Por ejemplo, si se analiza la muestra con UV puede ocurrir que una impureza absorba en la misma región que el analito de interés y con

ello dar un falso resultado por lo que es necesario eliminarla de la muestra antes del análisis final. Además, las impurezas pueden acortar la vida útil de las columnas para la cromatografía de gases y líquidos, por lo que es necesario eliminar dichas impurezas antes de inyectarlas en los cromatográficos.

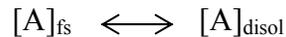
La concentración de las muestras incrementa la concentración del analito por unidad de volumen del solvente y se aplica cuando la solución de la muestra con el analito de interés es muy diluida para su análisis instrumental directo.

Por muchos años (y hasta la fecha), los procedimientos clásicos de preparación de muestras han sido utilizados para lograr los objetivos antes expuestos y éstos son la extracción líquido-sólido, líquido-líquido, centrifugación, filtración, destilación, precipitación, cromatografía en columna abierta, liofilización, etc. Pero como una alternativa a estas técnicas, por los años 80's se introdujeron nuevas técnicas de preparación de muestras, entre ellas la extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés)²². Por utilizarse esta técnica nueva en la metodología de extracción de la vitamina E en el aceite de oliva planteado en este trabajo se explicarán las características más importantes de ésta.

No se toman en cuenta propiedades de solubilidad, lo cual origina que tengamos una mayor elección de disolventes para trabajar, amplia selección de fases, que permite una mejor elección del mecanismo de extracción para una mejor optimización del análisis, además de un bajo consumo de disolvente, que se traduce en una mayor seguridad en la preparación de muestras, así como una reducción del impacto ambiental.²³

La extracción en fase sólida, es una técnica que consiste en una extracción líquido-sólido a través de columnas o cartuchos de plástico (usualmente de polipropileno) rellenas con una variedad de adsorbentes. El adsorbente en las columnas está empacado entre dos filtros de polietileno (de 20 μm) con 100, 200, 500 o 1,000 mg de adsorbente de tendencias polares (por ejemplo sílica, cianopropil, diol, etc.), no polares (ejemplo octadecilo, octil, etil, etc.) o intercambio iónico (ejemplo carboximetil, sulfonilpropil, dietilaminopropil, etc.). El volumen de muestra que se puede manejar con las columnas va de 1 a 6 mL y para eluir la muestra generalmente se utiliza una jeringa, pero también las columnas se adaptan a un equipo conectado al vacío, dicho equipo tiene la ventaja de que se pueden manipular varias columnas con muestra²². La extracción en fase sólida se lleva a cabo mediante mecanismos de sorción-desorción de los analitos en la superficie del material activo de las columnas. La retención y

elución obedece o bien a una partición o bien a interacciones moleculares tales como: interacciones iónicas, dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, etc. Como la disolución de la muestra pasa a través del adsorbente, el o los analito(s) de interés se concentran en la superficie del adsorbente, pero existe un equilibrio entre la concentración de analito(s) en la fase sólida $[A]_{fs}$ y el disolvente $[A]_{disol.}$, es decir:



Para que el analito presente en la muestra se retenga en la columna este equilibrio debe de estar desplazado hacia a la izquierda, mientras que para conseguir la elución del analito en cuestión el equilibrio debe desplazarse a la derecha²⁴.

Cada adsorbente posee la llamada “capacidad de columna” la cual se refiere a la cantidad total de analito (o impurezas) que puede retener una masa específica de adsorbente y esta característica es particular de cada adsorbente.

La mejor forma de utilizar la extracción en fase sólida es evaluando que concentración de analito se requiere, la complejidad de la matriz de la muestra, la naturaleza de los analitos así como las interferencias que pueda presentar la matriz. De esta evaluación dependerá si utilizamos la SPE para realizar una concentración de la muestra, una limpieza de la muestra o eliminamos la matriz de la muestra²⁵.

Para la preparación de muestras con esta técnica se utilizan los pasos que se describen a continuación:

- **Lavado y activación de la columna.** Esta operación tiene por objetivo solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna por que los analitos no pueden interactuar con el relleno si sus grupos no se encuentran totalmente “activados”.
- **Aplicación de la muestra.** La muestra se aplica en la columna la cual esta acoplada a una estación de vacío, haciendo que la muestra pase a través de la columna utilizando un flujo determinado (para asegurar la completa interacción entre el analito y los grupos del adsorbente). Otra forma de aplicación de la muestra es por medio de una jeringa.

Esta operación puede efectuarse de dos maneras diferentes de acuerdo al modo de trabajo que se seleccione, estas modalidades son:

- ❖ 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 afín al adsorbente.

En este caso la preparación de la muestra finaliza con esta operación.

- ❖ Retención del analito en la columna utilizando un solvente débil, 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 más habitual y puede utilizarse para la pre-concentración de muestras pasando grandes volúmenes a través de la columna.
- **Lavado de la columna.** Esta operación se refiere a la eliminación de las impurezas retenidas en el paso anterior utilizando un solvente relativamente débil con el cual el analito no eluye. El lavado de la columna no es indispensable, pero en general es recomendable por que produce muestras más limpias, con menos sustancias que pueden interferir.
- **Elución del analito.** Finalmente el analito se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elución apropiada para romper la interacciones que el analito estableció con el adsorbente²⁴.

VALIDACIÓN

La validación es un término que se emplea para demostrar la capacidad que tiene un método o técnica analítica para satisfacer ciertos requisitos, mediante el suministro de evidencia objetiva, con los cuales se le puedan dar un grado de aceptación o rechazo a los datos obtenidos por los métodos o técnicas analíticas desarrolladas o aplicadas.

La validación de métodos se puede justificar por los siguientes aspectos:

- Moral y ética: La toma de decisiones dentro de una empresa se realiza basándose en resultados obtenidos con métodos analíticos.
- Aseguramiento de la calidad: Los métodos analíticos están definidos como un sistema crítico en el aseguramiento de la calidad de una empresa, ya que impactan de manera directa en la calidad del producto.
- Económica: En una empresa es importante que los métodos de prueba se apliquen en periodos de tiempo menor, disminuya su costo pero que sean confiables ya que de ellos depende la liberación del producto para su venta.

Un método debe ser validado cuando es necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para su uso en un problema analítico en particular, por ejemplo:

- Se desarrolla un nuevo método para un problema en particular.
- Se quiere hacer modificaciones a un método establecido o se quiere utilizar en un nuevo problema.
- Cuando el control de calidad de una empresa indica que el método de prueba se cambia con el tiempo.
- Un método de prueba se utiliza en un laboratorio diferente o se cambia de analista e instrumental.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos.²⁶

La validación de un procedimiento analítico normalmente consta de 3 pasos:

1. Establecimiento de las condiciones por cumplir por parte de la metodología, los cuales se determinan por normatividad o por petición de un cliente.
2. Determinación de los parámetros del procedimiento; los cuales son determinados por el responsable que desarrolla la metodología.
3. La valoración de los resultados, que es la comparación de los parámetros obtenidos con las condiciones establecidas y la decisión de la validez del procedimiento para el propósito establecido; esta decisión se toma considerando las pruebas estadísticas a las cuales fueron sometidos los datos obtenidos con la metodología desarrollada.²⁷

Los parámetros estadísticos que se utilizaron para validar el método desarrollado en este trabajo fueron: Condiciones óptimas de trabajo, Linealidad del sistema, Precisión del sistema y del método (este último expresado como Repetibilidad), Estabilidad de extractos obtenidos y Recobro. Por lo tanto se dará una descripción de cada una de estas pruebas a continuación.

I.-CONDICIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO

Para la validación de un método lo primero que se debe realizar es encontrar las condiciones adecuadas de trabajo para el análisis cualitativo y/o cuantitativo del analito o analitos planteados, para este trabajo fue el plantear una técnica de extracción de la vitamina E de la

muestra de aceite de oliva tratando de utilizar la menor cantidad de muestra y reactivos, así como determinar si era posible la introducción de la técnica de extracción en fase sólida en las etapas del tratamiento de la muestra en los procesos de limpieza y purificación de los extractos de muestra obtenidos, antes de su inyección en el sistema.

También se comprobó que el analista y el sistema cromatográfico a utilizar para el análisis cualitativo y cuantitativo de la vitamina E se mantenían en control en cuanto a su linealidad y precisión del sistema bajo las condiciones mínimas planteadas en este proyecto.

II.-LINEALIDAD DEL SISTEMA

La linealidad del sistema es una medida que asegura que la relación entre la respuesta obtenida por el instrumento y la concentración del analito tiene una tendencia o comportamiento lineal en un intervalo dado. En esta prueba se quiere comprobar si hay una variación directa y proporcional entre dos variables: La variable dependiente, que en este caso sería la respuesta o señal del equipo y una variable independiente la cual es la concentración del analito.

Para la linealidad del sistema un criterio de aceptación internacional es que debe observarse gráficamente una tendencia lineal de los datos obtenidos, así como que el valor del coeficiente de correlación de la regresión lineal aplicada a los datos de la curva de calibración sea²⁸:

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

Si se cumple con estas condiciones, se aplica una prueba de hipótesis a la ordenada obtenida de la regresión, para observar si la curva de calibración parte del origen, esto se realiza para decidir el tipo de ecuación a utilizar para el cálculo cuantitativo. Posteriormente se calculan los intervalos de confianza tanto para la ordenada como para la pendiente de la curva obtenida que permitirá llevar el control de calidad de lotes de muestras de trabajo posteriormente.

La prueba de hipótesis a la ordenada, se realiza para observar si los datos obtenidos con una técnica o método, tienen una tendencia lineal, con una ordenada que parte del origen, basados en la ecuación:

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

Se establece la siguiente prueba de hipótesis:

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

$$H_1: b \neq \beta$$

El estadístico de prueba que se utiliza para este estudio es la “t de Student” para n-2 grados de libertad, ya que los coeficientes de regresión β (ordenada al origen) y γ (pendiente) son remplazados por las estimaciones de mínimos cuadrados, para esto se realiza el análisis de los datos para obtener una “t calculada” con los datos experimentales que se compara con una “t de tablas”:

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

Dónde:

b = Ordenada al origen.

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

Se = Error típico de estimación.

Sxx = Suma de cuadrados de la variable independiente.

n = Número de determinaciones.

\bar{x} = Media experimental.

Ya que se trata de un ensayo bilateral ó de dos colas, donde α es el nivel de significancia, que se toma del 5% ($\alpha = 0.05$), que corresponde a un valor usual de riesgo de cometer un error y que se toma a nivel internacional en el desarrollo de la mayoría de las metodologías analíticas; el error típico de estimación se calcula de la siguiente forma:

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

Dónde:

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

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

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

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

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

Para calcular el intervalo de confianza para la ordenada al origen con el mismo nivel de significancia se utiliza la ecuación:

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

Para calcular el intervalo de confianza para la pendiente con el mismo nivel de significancia se utiliza la ecuación:

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

III.- PRECISIÓN

La precisión se define como el grado de concordancia de las mediciones repetidas de una misma propiedad (concentración en este proyecto). La precisión se puede determinar tanto para el sistema como para el método.

a) Precisión del sistema.

La precisión del sistema se define como el grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad, la validación de técnicas analíticas (clásica o instrumental) se denomina como precisión del sistema.

Los resultados de esta prueba normalmente no deben ser mayores del 2% del coeficiente de variación (o desviación estándar relativa) para concentraciones altas y no más del 5% para concentraciones del orden de trazas para técnicas cromatográficas.

Para realizar esta prueba, se realizan pruebas de hipótesis con los datos obtenidos, tomando en consideración los siguientes criterios:

La hipótesis nula para el caso de precisión del sistema es:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 \text{ se calcula despejándola del Coeficiente de Variación}$$

Considerando un valor máximo del 5%.

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

Para muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza σ_0^2 , se utiliza la prueba estadística χ^2 con n-1 grados de libertad para su obtención en tablas, y se realiza su comparación con una χ^2 calculada con la siguiente fórmula:

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

Dónde:

n = Número de determinaciones.

s^2 = Varianza estándar muestral.

σ_0^2 = Varianza estándar máxima aceptada.

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

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

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

El intervalo de confianza al nivel de $1-\sigma$, para la varianza de los datos (s^2) es:

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

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad se obtiene el intervalo de confianza para “s” con el mismo nivel $1-\sigma$.

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

Para este estudio se consideran dos colas iguales, a pesar de que la distribución χ^2 no es simétrica para evitar cálculos complicados.

b) Precisión del método.

Ésta se puede expresar como repetibilidad o reproducibilidad, como en este proyecto sólo se realizó la repetibilidad, sólo se explicará en este trabajo su procedimiento para calcularlo.

Repetibilidad

La repetibilidad esta definida como el grado de concordancia entre determinaciones independientes de soluciones con una concentración conocida, proveniente de una solución madre, que contiene una muestra homogénea del producto. Los ensayos son realizados por el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo.

Los resultados de esta prueba (igual que en el caso de precisión del sistema) normalmente no deben ser mayores del 2% del coeficiente de variación (o desviación estándar relativa) para concentraciones altas y no más del 5% para concentraciones del orden de trazas para metodologías con aplicación de técnicas cromatográficas.

La prueba de hipótesis que se establece para este caso es el siguiente:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 \text{ se calcula despejándola del Coeficiente de Variación}$$

Considerando un valor máximo del 5%.

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

Para muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza σ_0^2 , se utiliza la prueba estadística χ^2 con n-1 grados de libertad para su obtención en tablas, y se realiza su comparación con una χ^2 calculada con la siguiente fórmula:

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

Dónde:

n = Número de determinaciones.

s^2 = Varianza estándar muestral.

σ_0^2 = Varianza estándar máxima aceptada.

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

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

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

El intervalo de confianza al nivel de $1-\sigma$, para la varianza de los datos (s^2) es:

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

Tomando la raíz cuadrada de cada miembro de la desigualdad se obtiene el intervalo de confianza para “s” con el mismo nivel $1-\sigma$.

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

Para este estudio igual que en precisión del sistema se consideran dos colas iguales, a pesar de que la distribución χ^2 no es simétrica para evitar cálculos complicados.

IV.- ESTABILIDAD DE MUESTRA

Se trata de observar el efecto que tiene el disolvente sobre el analito, vitamina E en este caso. Se recomienda un mínimo de 16 horas de almacenamiento. Para ello se dejan las muestras ya preparadas ya sea a temperatura ambiente, bajo luz solar, en refrigeración, etc.

El objetivo es establecer las condiciones adecuadas de almacenamiento de las muestras. Es posible utilizar las muestras que se hayan preparado para la prueba de repetibilidad de un mismo analista para el día 1.

Las pruebas de hipótesis son aplicadas a las varianzas y quedarían de la siguiente manera:

$$H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$$

$$H_1: \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$$

Como se trata de determinar si las dos muestras provienen de la misma población con varianzas iguales (es decir misma precisión), se utiliza el estadístico F de Fisher o Snedecor comparando la F en tablas con n_{M-1} , n_{m-1} grados de libertad con respecto a una F calculada que se obtiene de la siguiente manera:

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

Dónde:

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

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

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

Para rechazar la hipótesis nula, se utiliza el siguiente criterio:

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

Una vez sabiendo el resultado de la prueba de hipótesis de las varianzas, se realiza la prueba de hipótesis sobre las medias ya sea considerando varianzas semejantes o diferentes, estableciendo como prueba de hipótesis:

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

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

Para esto se realiza la prueba “t de student”, en caso de ser semejantes las varianzas se utiliza la siguiente ecuación para obtener el resultado de esta prueba:

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

Con grados de libertad de $(n_1 + n_2) - 2$.

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

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

Con ϕ grados de libertad y éstos se calculan con la ecuación:

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

En cualquiera de los 2 casos el criterio de rechazo de la hipótesis es:

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

V.-Recobro o Recuperación

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

En este caso el recobro es el resultado expresado en términos de porcentaje de la comparación entre la concentración del analito problema que se obtiene y la concentración que debe obtenerse después de tratar una muestra a la que se le ha adicionado una concentración conocida de analito lo que es conocido como “muestra fortificada”²⁸.

Para obtener el % de recobro se aplica la siguiente operación:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{[Conc. analito]_{obtenida}}{[Conc. analito]_{Teórica}} \times 100$$

METODOLOGÍA

Para llevar a cabo el trabajo experimental de este proyecto se utilizó el siguiente material, muestras, reactivos, aparatos y equipos:

MATERIAL

- Matraz bola de fondo plano de 250 mL y refrigerante 24/40.
- Equipo de reflujo marca “Quickfit/Aldrich”:
 - ❖ Matraz bola de fondo plano de 100 mL.
 - ❖ Refrigerante.
- Equipo de reflujo marca “Wheaton”:
 - ❖ Microviales de reacción con fondo cónico de 5 mL. Supelco Inc. USA.
 - ❖ Microcondensador 80 mm rosca de tornillo 13-245.
 - ❖ Conectores para viales 13-245 a 20-400 Aldrich, USA.
- Pipetas graduadas de 1 mL y 5 mL.
- Embudos de separación de: 250 mL y 50 mL marca Quickfit/Aldrich.
- Vasos de precipitados de 10, 20,50 y 100 mL.
- Matraz aforado de 20 mL marca MBL, volumen Nominal 20 mL, tolerancia ± 0.04 mL.
- Matraces aforados de 10 mL Blaubrand, con volumen nominal de 10 mL, valor medio 10.0054 mL, tolerancia ± 0.0400 mL certificado ISO1042, No. de lote 03.04.
- Matraces aforados de 5 mL Blaubrand, con volumen nominal de 5 mL, valor medio 5.0001 mL, tolerancia ± 0.0400 mL certificado ISO 1042, No. de lote 03.06.
- Micropipetas de desplazamiento de aire:
 - ❖ 10-100 μ L marca Hamilton Soft-Grip con certificado ISO 9001.
 - ❖ 100-1000 μ L Hamilton Soft-Grip con certificado ISO 9001.
 - ❖ 0.5-5 mL Transferpette con certificado ISO 9001:14001.
- Columnas para filtración de 3 mL con filtro dual de 20 μ m de polietileno, J. T. Baker. Lote F51503.
- Columnas de extracción en fase sólida de sílica gel (SiOH) de 6 mL de capacidad (1,000 mg por columna). Lote B02550 J. T. Baker.
- Filtros desechables de disco de 0.45 μ m de nylon. J. T. Baker, Lote V50420.
- Jeringa de 10 mL de capacidad con punta Luer para filtros de disco.

MUESTRAS

- ▲ Para el desarrollo y optimización de la metodología de extracción:
 - Aceite de Oliva Extra Virgen Marca Borges producido en España por Aceites Borges Pont S.A. Lote:104975.
- ▲ Para la validación de la metodología:
 - Aceite de Oliva Extra Virgen marca Borges lote: 104975.
 - Aceite de Oliva Extra Virgen marca Ybarra Distribuido por Ybarra comercial de México S.A Lote:005/75.

REACTIVOS

| Compuesto | Grado | Compañía | Lote |
|-------------------------------------|---------------|--|-------------|
| Vitamina E | 98% de pureza | Chem service | 306-76B |
| Metanol | HPLC | J.T. Baker | F46267 |
| Acetonitrilo | HPLC | Mallinckrodt | H076M51D56 |
| Alcohol etílico absoluto anhidro | ACS | J.T. Baker | M25C64 |
| Ácido Ascórbico | --- | Laboratorio de desarrollo experimental de alimentos* | Donativo |
| Agua | ASTM tipo I | Obtenida con equipo Millipore | --- |
| Hidróxido de potasio (perlas) | ACS | J.T. Baker | N18C52 |
| Éter Etilico | RA | Mallinckrodt | 0850-P34D05 |
| Sulfato de sodio anhidro (granular) | RA | Mallinckrodt | 8024T11D03 |
| NaCl (cloruro de sodio) | Alimentario | Sales del Istmo S.A. | L-38 |

*Departamento de Alimentos, Facultad de Química, UNAM

APARATOS

- Balanza analítica modelo Sartorius BL-120 S, peso máximo 120 g, incertidumbre 0.1 mg.
- Canastilla para calentamiento Class-Col Apparatus Co.
- Reóstato type/ 2PF1010. variable autotransformer. Staco, IC. Dayton Ohio No. 198574 UNAM.
- Parrilla de calentamiento con agitación marca Barnstead/thermolyne, Modelo SP46615.
- Aparato de extracción al vacío para cartuchos de extracción en fase sólida, J. T. Baker.

EQUIPO

- Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia modular marca “Knauer”, permite trabajar en forma isocrática, que cuenta con:
 - ❖ Sistema de Bombeo modelo Smartline Pump 1000 V7603 10/2003.
 - ❖ Válvula de inyección Wellchrom 6-port/3 channel con un “loop” que permite inyectar 20 μL de muestra.
 - ❖ Columna empacada de fase estacionaria químicamente unida Luna C-18 de 50 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno y tamaño de partícula de 5 μm , con tamaño de poro de 100 Å. Marca Phenomenex.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA LA INYECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los extractos obtenidos en las diferentes etapas experimentales se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos bajo las siguientes condiciones¹³:

- ▲ Fase móvil: 85% acetonitrilo - 15% metanol.
- ▲ Flujo: 1 mL/ min.
- ▲ Vol. de inyección: 20 μL .
- ▲ λ_{max} . en el detector UV: 292 nm.

El trabajo experimental desarrollado en este proyecto se dividió en dos etapas:

- La primera consistió en estudiar la reproducibilidad de la técnica determinando la linealidad y la precisión del sistema para observar si no había variaciones en ésta (meses después de haber sido validado) y asegurando el trabajo por parte del nuevo analista; posteriormente se procedió al desarrollo y optimización de la metodología de extracción de vitamina E del aceite.
- La segunda etapa de este trabajo fue validar la metodología propuesta, en cuanto a su repetibilidad, estabilidad de los extractos de las muestras y recobro.

VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Linealidad del sistema

Se prepararon 8 soluciones estándar de vitamina E en metanol de 1 a 100 ppm de concentración. Posteriormente se inyectó por triplicado cada solución y se obtuvo la curva patrón, misma que se analizó con pruebas estadísticas para comprobar si los datos tienen una tendencia lineal y parten del origen.

Para preparar las soluciones se pesaron 4.8 mg de estándar de vitamina E, los cuales se disolvieron en metanol hasta el aforo en un matraz aforado de 20 mL, con ello se obtuvo una solución madre de 240 ppm. De esta solución madre, con las micropipetas se tomaron 8 alícuotas diferentes (21, 110, 210, 420, 840 μ L y 1.3, 1.7, 2.1 mL), las cuales se vertieron en matraces aforados de 5 mL obteniéndose las soluciones con las siguientes concentraciones: 1.0, 5.3, 10.1, 20.2, 40.3, 62.4, 81.6, 101 ppm.

Precisión del sistema

Esta prueba se realizó inyectando por triplicado 9 soluciones de una concentración de 49.9 ppm, las cuales se prepararon tomando alícuotas de 1.04 mL de una solución madre de 240 ppm (la misma que se fue preparada para la prueba de linealidad) y aforando en matraces de 5 mL con metanol.

Con los datos obtenidos se procedió a realizar las pruebas estadísticas para calcular la precisión respectiva.

DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN

Después de realizar estas dos pruebas e interpretar los resultados se procedió a desarrollar la metodología para extraer la vitamina E del aceite de oliva. Esta parte del proyecto se dividió en 3 estudios en los que después de realizar cálculos respectivos y verificar la presencia de la vitamina E en el cromatograma, se continuaba con la siguiente etapa.

1ER. ESTUDIO

Extracción de la vitamina E por el Método AOAC (971.30)¹²

En esta parte se utilizó la metodología base propuesta por la AOAC para conocerla. El procedimiento fue el siguiente:

Se pesaron 4.989 g de aceite de oliva en un vaso de precipitados de 50 mL, el contenido se transfirió a un matraz bola de 250 mL de capacidad, se adicionaron 20 mL de alcohol etílico anhidro, además de 1.502 g de ácido ascórbico (que tiene la función de actuar como antioxidante). La mezcla anterior se calienta en una canastilla eléctrica por medio de un reóstato hasta ebullición. Después del calentamiento, se retira el refrigerante, con una pipeta graduada de vidrio se adicionan al matraz bola 5 mL de solución concentrada de KOH, se coloca nuevamente el refrigerante en posición de reflujo y se calienta la mezcla por 15 min. Una vez que concluye el tiempo de calentamiento, se retira el refrigerante de la posición de reflujo (*fig. 13 izquierda*). El matraz bola se coloca en un recipiente con agua fría, cuando disminuye su temperatura, se adicionan 100 mL de agua. El contenido se transfiere a un embudo de separación de 250 mL. Se adicionan 25 mL de éter etílico, se tapa, se agita de forma manual por 10 seg y se retira el tapón. Se deja reposar el embudo hasta visualizar la completa separación de las fases, (la fase acuosa es la inferior; la fase orgánica es la superior). Las fases separadas se colectan en vasos de precipitado de 250 mL. La fase acuosa se transfiere nuevamente al embudo de separación y la extracción con éter se realiza 4 veces más (la cantidad total de éter utilizado fue de 125 mL), (*fig. 13 derecha*) las fases se colectan en los vasos destinados para ellas. Las fases orgánicas colectadas se colocan en el embudo, se adicionan 20 mL de agua, se tapa el embudo, se agita de forma manual por 10 seg y se retira la tapa, se toma una pequeña cantidad de la fase acuosa en un

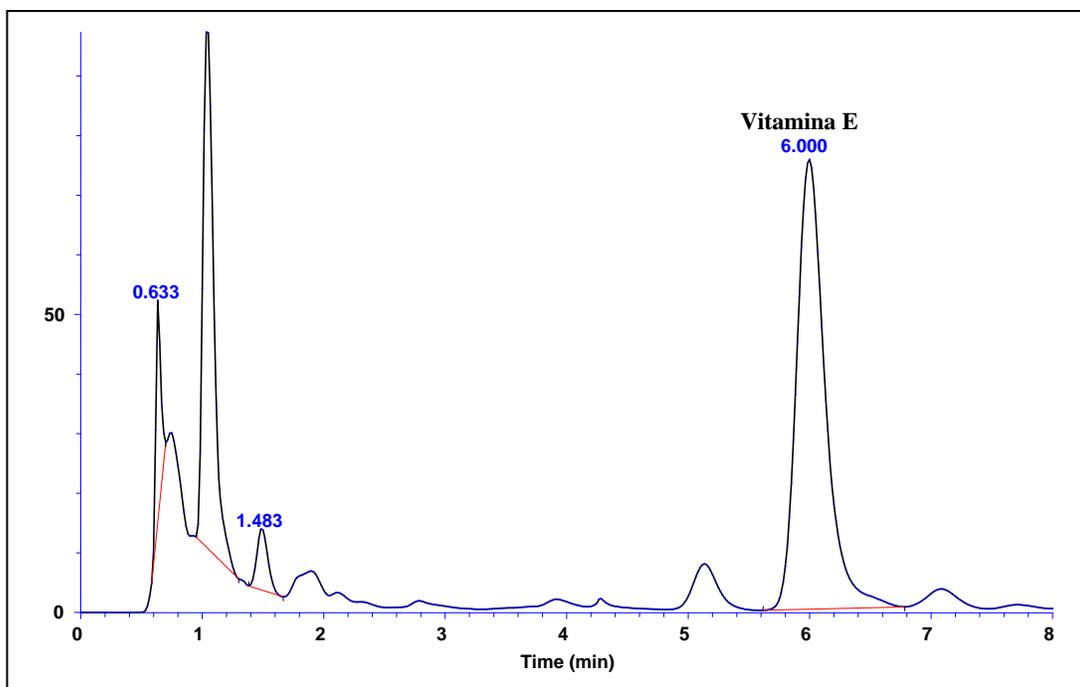
vaso de precipitados de 10 mL al cual se le agregan 2 gotas de indicador de fenolftaleína (la fase acuosa restante se elimina). Si se presenta una coloración fucsia intenso adicionar 20 mL más de agua, repetir los pasos anteriores hasta lograr pH neutro (cuando la fenolftaleína no presente coloración), una vez que se observe esta condición se detiene el lavado. La fase orgánica se colecta en el vaso de precipitados de 250 mL, al cual se le adiciona poco a poco Na_2SO_4 anhidro, hasta que se observa la formación de un aglomerado en el fondo del vaso y que ya no haya partículas de sulfato dispersas en la fase orgánica, se decanta, la fase orgánica se coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.



Fig. 13. Etapa de saponificación (izquierda) y extracción líquido-líquido (derecha) con el método de la AOAC. El material utilizado tiene una capacidad de 250 mL.

Se evapora el disolvente por medio de baño María en una campana hasta observar un residuo aceitoso. Después de la evaporación, se adicionan 5 mL de metanol y se agita hasta disolver el residuo. El contenido es vertido a un matraz aforado de 10 mL, y se lleva al aforo con metanol. El contenido se coloca en un vaso de precipitados de 10 mL, con una jeringa se toma la solución del matraz y se pasa a través de un filtro de 0.45 μm recibiendo el filtrado en frascos viales de color ámbar.

Se procede a la inyección de esta disolución en el cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia de la marca Knauer, obteniéndose el siguiente cromatograma:



Cromatograma del extracto de vitamina E obtenido por método de AOAC.

Después de corroborar la presencia de la vitamina E y observar que las cantidades de reactivos y solventes utilizados son grandes (como lo ilustra la *fig. 13*), lo cual trae como consecuencia inicial un análisis costoso, peligro para el analista y contaminación ambiental, por lo que se trató de optimizar inicialmente la técnica disminuyendo a la mitad las cantidades de reactivos, solventes y muestra.

2DO. ESTUDIO

Extracción de la vitamina E por medio del material “Quickfit”

Después de realizar la extracción con el método de la AOAC, comprobar la presencia y concentración de la vitamina E en los extractos obtenidos de la muestra, se procedió a disminuir las cantidad de muestra, los volúmenes de reactivos y disolventes para empezar a cumplir el desarrollo y la optimización de la metodología para extraer la vitamina E en materiales más pequeño, por lo anterior el material de vidrio tenía que disminuir por lo que se procedió a utilizar el material de la marca “Quickfit” y así poder manejar de manera adecuada las nuevas cantidades a utilizar. El procedimiento fue el siguiente:

Para la saponificación de la muestra se pesaron 2.5 g de aceite de oliva, se adicionan 10 mL de alcohol etílico anhidro, 0.75 g de ácido ascórbico y 3 mL de solución concentrada de KOH en un matraz bola de 100ml y se pone la mezcla a reflujo por 15 min. (*fig. 14 izquierda*).

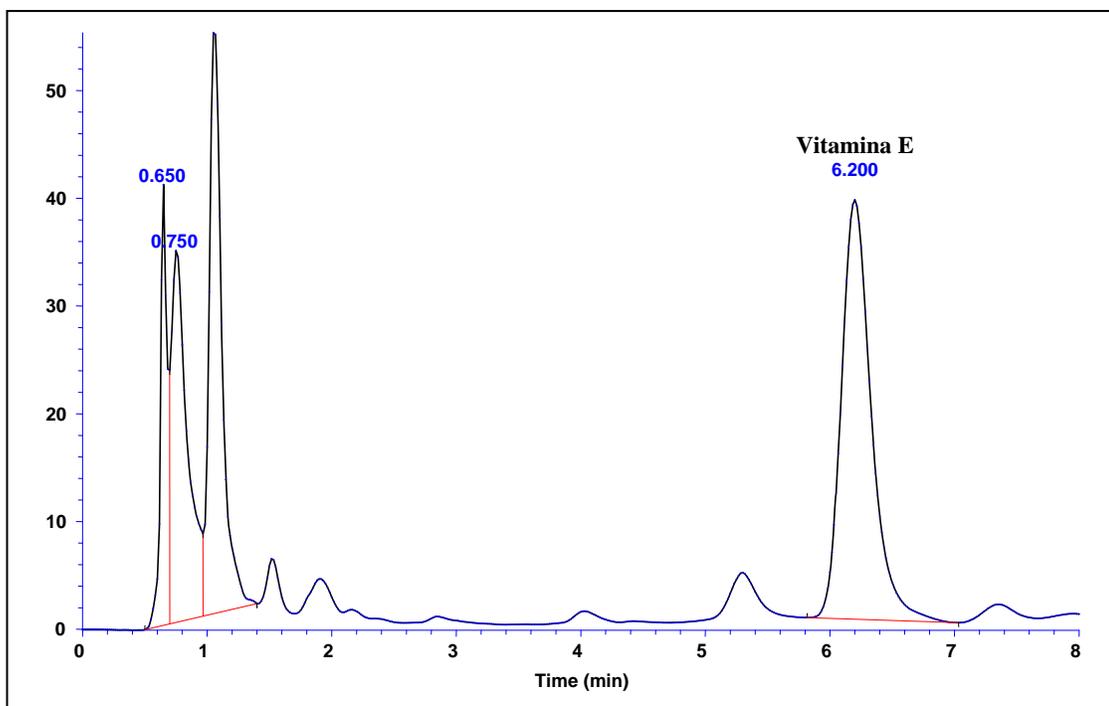
Para la extracción y lavado (*fig. 14 derecha*) de los extractos de la muestra se adicionaron 10 mL de agua, 13 mL de éter etílico por extracción realizando 5 extracciones sucesivas (el volumen total de éter utilizado para la extracción fue de 65 mL) con 7 segundos para agitación en forma manual. Posteriormente se adicionan 5 mL de agua para cada lavado realizando 5 lavados sucesivos (se utilizaron 25 mL totales de agua para el lavado).



Fig. 14. Etapa de saponificación (izquierda) y etapa de extracción líquido-líquido (derecha) con el material Quickfit.

El secado de la muestra se realizó adicionando Na_2SO_4 anhidro, después del secado se realizó la evaporación del solvente, se disolvió el residuo con metanol y se aforó a 10 mL.

Antes de la inyección al cromatógrafo de líquidos, se filtró dicha solución con los filtros de nylon de $0.45\ \mu\text{m}$ acoplados a la jeringa, colocando el extracto en frascos viales color ámbar; las disoluciones obtenidas de las muestras se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos, obteniéndose el siguiente cromatograma:



Cromatograma del extracto de Vitamina E con material Quickfit.

Después de la inyección e interpretación del cromatograma obtenido, se corroboró la presencia de la vitamina E por lo que la etapa siguiente de este proyecto fue disminuir todavía más las cantidades de muestra, reactivos y solventes.

3ER. ESTUDIO

Extracción de la vitamina E por medio del material “Wheaton”

Para trabajar en este último proceso de disminución ya mencionado y poder manipular cantidades más pequeñas se utilizó el material de marca “Wheaton” el cual, permite manejar volúmenes de 5 mL.

Este último proceso de disminución al dar un resultado positivo en la extracción de vitamina E del aceite de oliva, es el que se procedió a validar. Para ello se realizaron pruebas iniciales en las cantidades para la saponificación (fueron de 0.5 g de muestra, 4 mL de alcohol etílico, 0.15 g de ácido ascórbico, 0.5 mL de KOH concentrada), se hicieron las adecuaciones y optimizaciones correspondientes, las cuales dieron como resultado el siguiente procedimiento experimental, en el que se definen las etapas en que se divide la metodología desarrollada para una mejor comprensión de éste.

Tratamiento de la muestra

Se pesa 0.5 g de aceite de oliva en un vaso de precipitados de 10 mL, el contenido se transfiere a un vial de reacción de la marca “Wheaton” (Vial I), se adicionan 0.4 mL de alcohol etílico anhidro y 0.15 g de ácido ascórbico; se adapta un refrigerante de la marca “Wheaton” en posición de reflujo, se procede a calentar en una parrilla con agitación hasta ebullición de la mezcla anterior. Después del calentamiento, se retira el refrigerante.

Saponificación

Con una pipeta graduada de vidrio de 1 mL de capacidad, se adicionan al vial 0.2 mL de solución concentrada de KOH, se coloca nuevamente el refrigerante en posición de reflujo y se calienta la mezcla por 15 min. (*fig. 15 izquierda*). Una vez que concluye el tiempo de calentamiento, se retira el refrigerante de la posición de reflujo. El vial se coloca en un recipiente con agua fría.

Extracción líquido-líquido

Después de que ha disminuido la temperatura del vial, se adiciona 1 mL de éter etílico. El vial se tapa y se agita de forma manual suavemente 30 veces^a. Se deja reposar hasta la separación de fases (aproximadamente 2 min.)^b (*fig. 15 derecha*). Se retira la tapa, con una pipeta Pasteur, transferir la fase orgánica (la fase de arriba) a otro vial de reacción vial (II). Al vial que contiene la fase acuosa (la fase de abajo) adicionar 1 mL de éter, tapar y agitar de forma manual suavemente 30 veces. Se deja reposar hasta la separación de fases. Se quita la tapa y se transfiere la fase orgánica al vial (II). Este procedimiento se repite 1 vez más (en total se utilizan 3 mL de éter etílico). Las fases acuosas se desechan a un frasco de residuos bien etiquetado y destinado para ello.

^a La agitación es colocando el vial en posición vertical y con el movimiento de la muñeca se gira el vial cambiando su posición

^b Durante el tiempo que transcurre la extracción y separación de fases, el vial se cubrió con papel aluminio para evitar la interacción con la luz



Fig.15. Equipo Wheaton para saponificación de la muestra (izquierda) y extracción líquido-líquido (derecha). La capacidad de este material es de 5 mL.

Lavado del extracto

Al vial (II), se le adicionan 2 mL de agua, se tapa, se agita de forma manual 15 veces, el vial se deja reposar hasta observar la separación de las fases (1 min. aproximadamente)^c Se destapa, con otra pipeta Pasteur se colecta la fase acuosa (la fase de abajo). En una placa de toques se colocan 2 gotas de la fase acuosa (el resto se desecha en el frasco) y 2 gotas de indicador de fenolftaleína. Si presenta coloración (fucsia intenso) se repite el procedimiento descrito hasta que la mezcla de fase acuosa e indicador no presente coloración (aproximadamente se utilizan 5 mL de agua para este lavado).

Eliminación de agua residual y purificación del extracto.

Después del lavado, para eliminar el agua residual, el extracto orgánico se coloca en un vaso de precipitados de 10 mL y se hace pasar a través de una columna de extracción de fase sólida que contiene Na_2SO_4 anhidro (aproximadamente 2.5 g) conectada al equipo de extracción al vacío recibiendo la solución en el vial (III). La columna se enjuaga con 2 mL de éter y se reciben en el mismo vial.

^c Al igual que en la extracción, se cubrió el vial con papel aluminio para evitar la interacción con la luz

Una vez que se haya eliminado el agua residual, se procede a purificar el extracto orgánico, para lo cual se acopla una columna de sílica gel de extracción en fase sólida al equipo de extracción con vacío (*fig. 16*), se adicionan 3 mL de éter a dicha columna para limpiarla y activarla, y se hace fluir a través de la columna con un flujo constante, los 3 mL usados de éter se desechan. Se adiciona el extracto orgánico a la columna, se deja “interaccionar” por 1 minuto (sin aplicar vacío) y posteriormente se hace fluir la solución a través de la columna a un flujo constante, colectando el extracto en el vial (IV). Se adicionan 4 mL de éter etílico a través de la columna para su enjuague, que se reciben en el vial.



Fig. 16. Equipo de extracción con vacío en con los cartuchos en fase sólida (Manifold por su nombre en inglés).

Evaporación del solvente y disolución del residuo.

En una campana de extracción, el vial (IV) se coloca en un baño de agua para evaporar el solvente (cuidando de que el agua no este demasiado caliente ya que haber una rápida ebullición del solvente que puede provocar su expulsión del vial y se traduzca en pérdidas de la vitamina)^d Se retira del baño el vial cuando se observa un residuo graso o cuando queden aproximadamente 0.5 mL de solvente. Después, se adicionan al vial (IV) 3 mL de metanol, se agita hasta re-disolver

^d Se recomienda que la temperatura del agua se encuentre entre 40-50° C

el residuo. El contenido es vertido a un matraz aforado de 5 mL, para llevar al aforo se adiciona más metanol. El contenido del matraz aforado se coloca en un vaso de precipitados de 10 mL, con una jeringa tomar el contenido del vaso, adaptar un filtro de nylon de 0.45 μm a la punta de la jeringa, filtrar y colocar la solución en viales de color ámbar de 5 mL (*fig. 17*).



Fig. 17. Equipo para filtración de la muestra antes de su análisis instrumental.

La metodología para el análisis de la vitamina E en el aceite de oliva queda resumido en el siguiente diagrama:

Diagrama de extracción de vitamina E con el material marca “Wheaton”

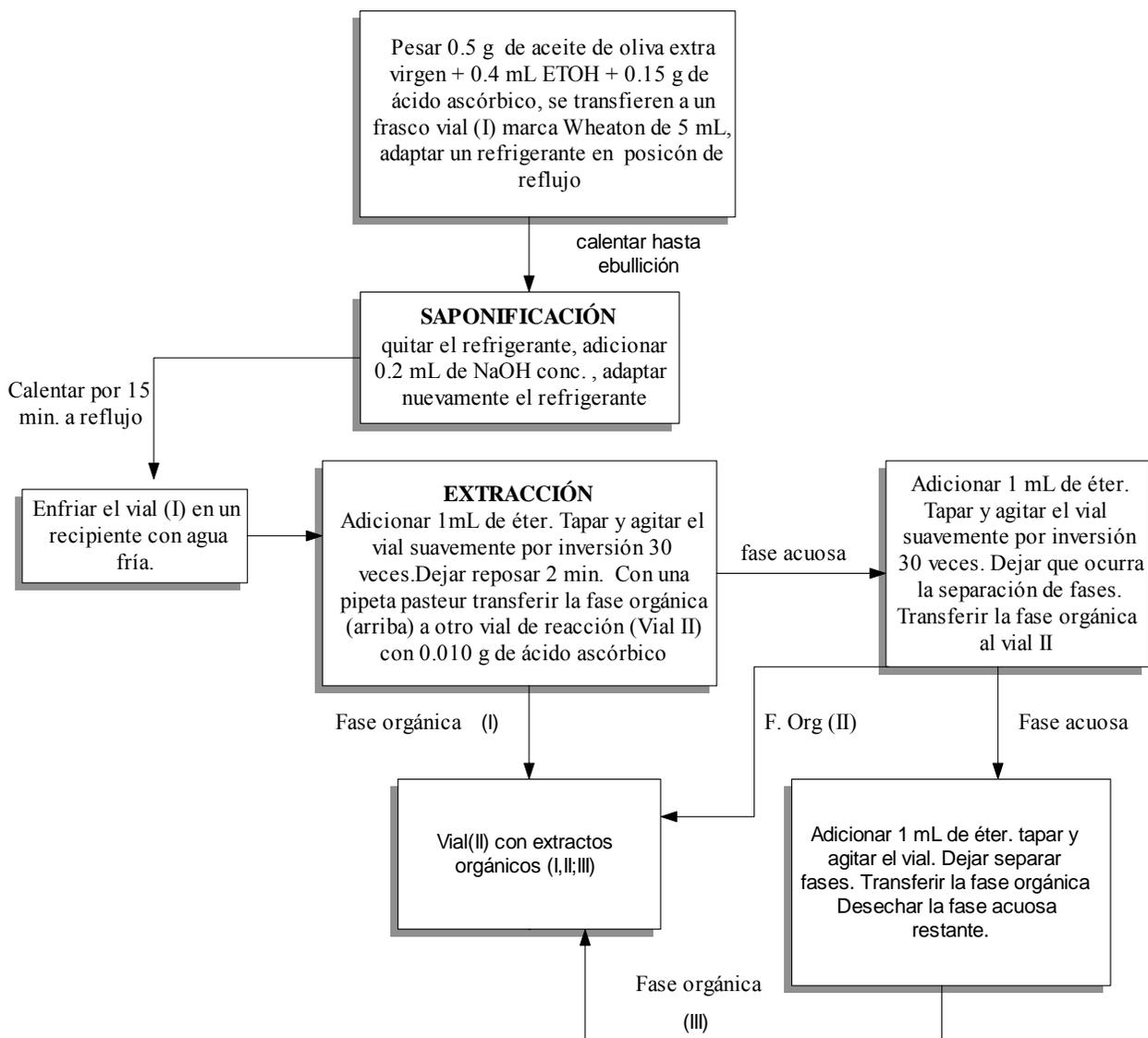
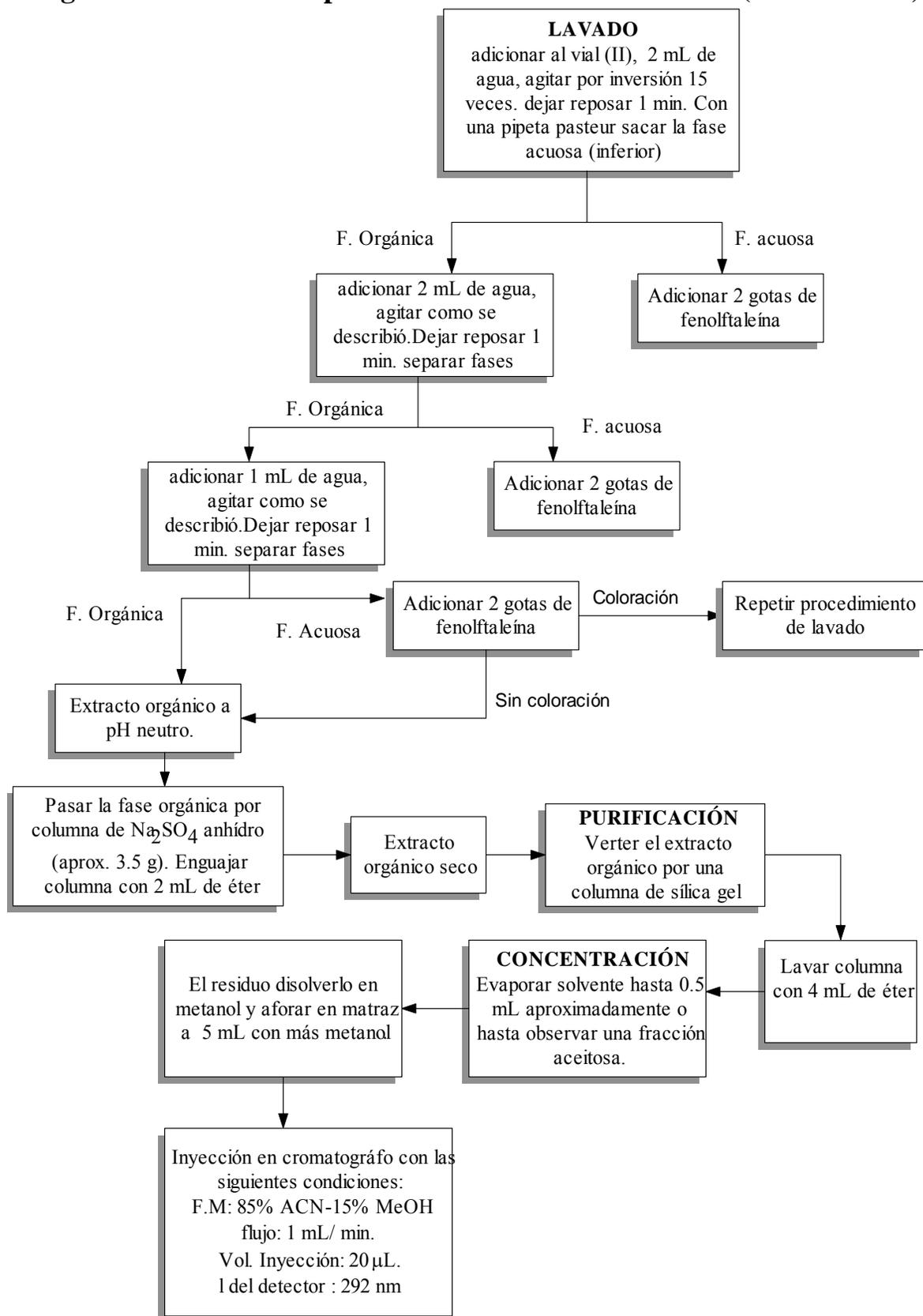
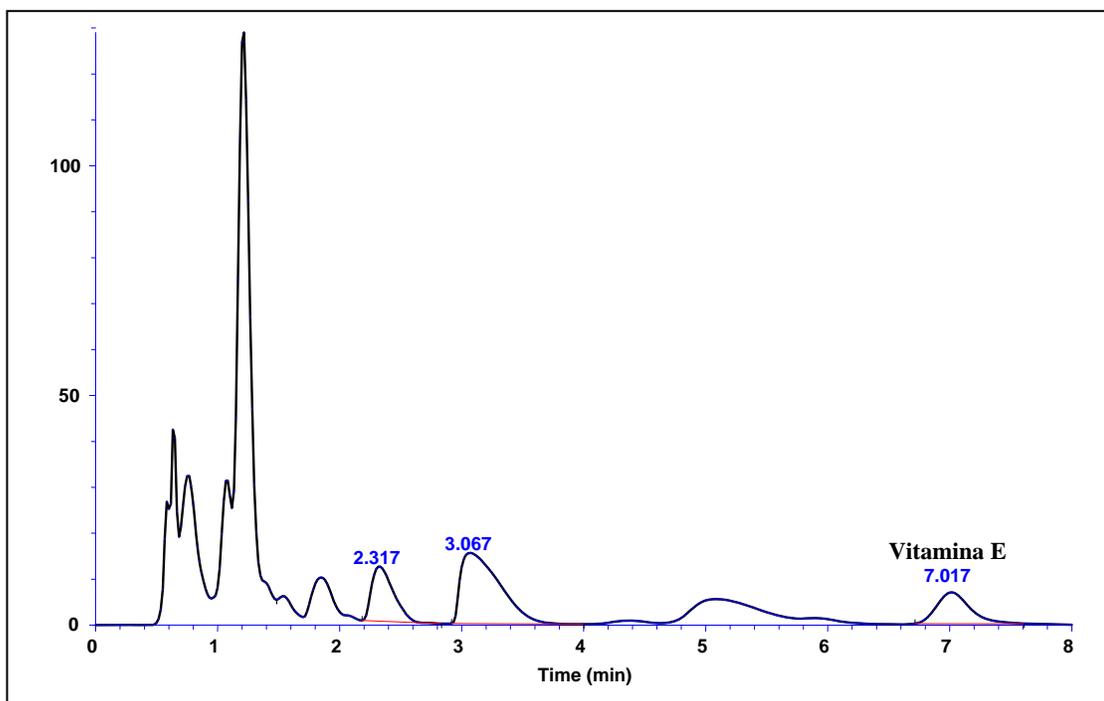


Diagrama de extracción para material marca “Wheaton” (continuación)



Análisis cualitativo y cuantitativo

Como ya se ha indicado en los estudios anteriores los análisis cualitativos y cuantitativos se realizan inyectando las muestras en el cromatógrafo de líquidos a las condiciones ya validadas en este trabajo, obteniéndose el siguiente cromatograma:



Cromatograma de Vitamina E (Método con equipo Wheaton).

Después de haber realizado la extracción en este tercer estudio y comprobar la presencia de la vitamina E al obtener el cromatograma, la siguiente fase del proyecto fue realizar la validación de la metodología propuesta.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Precisión del método (Repetibilidad)

En este estudio se hace una comparación de la variación de los datos obtenidos contra un valor fijo, en el caso del desarrollo o planteamiento de nuevas metodologías el criterio a utilizar es no rebasar un error mayor al 5% con respecto al coeficiente de variación.

Para realizar esta prueba, con el método planteado se trabajaron 8 análisis de la muestra de aceite de oliva extra virgen de la marca Borges por 4 días (dos análisis de muestra por día), obteniendo al final 8 extractos (disoluciones) de la muestra, cada una se inyectó por triplicado en el cromatógrafo de líquidos para su análisis a las condiciones ya establecidas.

Para observar si hay cambios en los resultados que da el método al cambiar de aceite de oliva (variaciones debido a diferencias en la matriz) se trabajó la muestra de aceite de oliva extra virgen de la marca Ybarra con el mismo método planteado, de ésta sólo se realizaron 3 análisis los cuales se inyectaron también por triplicado en el cromatógrafo de líquidos para su análisis.

Estabilidad de los extractos

El estudio de estabilidad se realizó trabajando 5 de los extractos obtenidos en la prueba de repetibilidad para el aceite de oliva marca Borges, éstos se colocaron en viales ámbar, sellando la tapa de los viales con cinta de teflón y almacenándolos a una temperatura de 4° C (refrigeración). Posteriormente se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo de líquidos para su análisis a los 7 y 17 días después de haber realizado su primer análisis para el estudio de repetibilidad indicado como día uno.

Recobro

Esta prueba pretende dar información acerca de la cantidad de analito que se pierde por la aplicación de la metodología establecida.

Para realizar esta prueba, primero se pesaron 3.2 mg de estándar de vitamina E los cuales se disolvieron en éter etílico y se aforaron con el mismo disolvente en un matraz aforado de 20 mL, dando una concentración para esta solución madre de 0.16 mg de vit. E / mL. Después en un vaso de precipitados se colocó un agitador magnético y se pesaron 8.017 g de aceite de oliva marca Borges, al vaso se le adicionaron 3.48 mL de la solución previamente preparada, lo cual representan 0.556 mg de vitamina E adicionada al aceite. Considerando que en el estudio de repetibilidad, se encontró una concentración de 12.08 mg de vit. E / 100 g de muestra, por lo que en el aceite pesado habrá 0.968 mg de vitamina, en consecuencia, la muestra madre adicionada para el análisis contendrá 1.524 mg de vit E.

Al final de cada análisis, la concentración que se espera obtener de vitamina E es de 19 mg de vit. E / 100 g de muestra.

Una vez realizada la adición, el vaso se llevó a una campana de extracción, se colocó en una parrilla con agitación, se cubrió con papel aluminio y se procedió a mantenerlo en agitación constante por 30 minutos para homogenizar perfectamente la muestra.

A esta muestra adicionada se le realizan 4 análisis con la metodología planteada, trabajando esta prueba durante 2 días (dos análisis por día), e inyectando por triplicado cada extracto en el cromatógrafo de líquidos para su análisis.

Para esta prueba la muestra de aceite de oliva marca Ybarra la cantidad de aceite a pesar fue de 7.877 g, de la solución madre utilizada en el análisis del aceite de oliva Borges se adicionaron 3.48 mL (que contienen 0.556 mg de vitamina E). En la muestra de aceite Ibarra se obtuvo una concentración de 10.274 mg de vit. E / 100 g de muestra, por lo que para la cantidad de aceite a utilizar se tiene la cantidad de 0.809 mg de vit. E que sumados a los mg adicionados, se obtienen 1.365 mg de vitamina E, y la concentración esperada será de 17.332 mg de vitamina E / 100g de muestra.

Al igual que con la muestra Borges, la muestra se sometió al mismo procedimiento de homogeneización. Se realizaron 4 análisis (al final de 2 días) de la muestra adicionada con la metodología planteada, inyectando los extractos por triplicado en el cromatógrafo para su análisis.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

VALIDACIÓN DEL SISTEMA

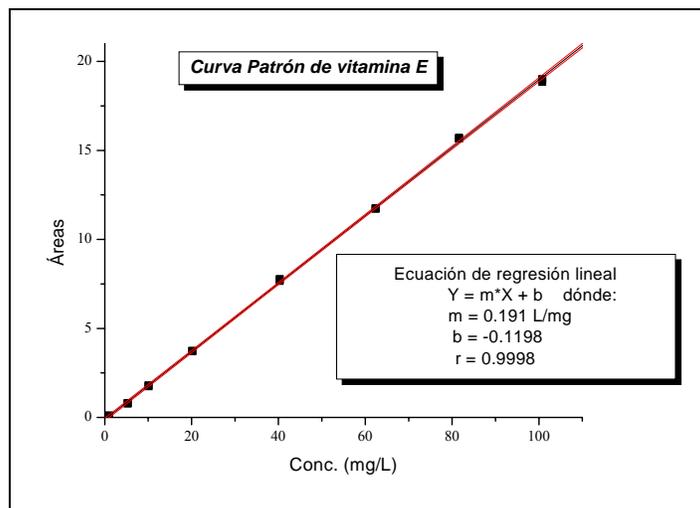
Como se mencionó en la parte de metodología, lo primero que se hizo fue comprobar las condiciones en las que se encuentra el sistema cromatográfico mediante las pruebas de linealidad y precisión para asegurar que seguía en control y conocer el manejo de la técnica. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Linealidad del sistema

De la inyección por triplicado de las soluciones estándar indicadas en la parte experimental se obtuvieron los siguientes valores:

| Conc. (mg / L) | Área ₁ | Área ₂ | Área ₃ |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1.01 | 0.089 | 0.111 | 0.099 |
| 5.28 | 0.818 | 0.763 | 0.795 |
| 10.08 | 1.765 | 1.807 | 1.737 |
| 20.16 | 3.713 | 3.745 | 3.719 |
| 40.32 | 7.732 | 7.651 | 7.779 |
| 62.40 | 11.707 | 11.724 | 11.752 |
| 81.60 | 15.663 | 15.718 | 15.663 |
| 100.80 | 18.839 | 19.008 | 18.996 |

Estos valores se procesaron para obtener la gráfica correspondiente y su regresión lineal.



Gráfica 1. Curva patrón de vitamina E en un intervalo de 1 a 100 ppm.

En la gráfica se puede observar que los datos presentan linealidad y tendencia al origen. Al realizar la regresión lineal a los datos se obtiene que:

$$\text{Pendiente (m)} = 0.191 \text{ L / mg}$$

$$\text{Ordenada al origen (b)} = -0.1198$$

$$\text{Coeficiente de correlación (r)} = 0.9998$$

El coeficiente de correlación es mayor a 0.98, por lo que cumple lo marcado para la linealidad al desarrollar una metodología²⁸.

Se procedió a verificar si la curva patrón parte del origen por lo que se realizó el análisis estadístico a la ordenada de la ecuación obtenida. La prueba de hipótesis planteada es:

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

$$H_1: b \neq \beta$$

El estadístico de prueba a aplicar es la llamada "t" de Student, se toma un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$). Lo anterior con los datos obtenidos da con 22 grados de libertad (n-2), una "t" ($\alpha/2 = 0.025$) en tablas de 2.074.

Se realiza el cálculo de la $t_{cal.}$ por medio de la siguiente ecuación:

$$t_{cal.} = \frac{b - \beta}{Se} \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{x})^2}} = -2.910$$

dónde:

$$b = -0.1198$$

$$\beta = 0$$

$$n = 24$$

$$\bar{x} = 40.206$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right)^2 = 715,925.475$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right)^2 = 26,116.852$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i \right) \left(\sum_{i=1}^n Y_i \right) = 136,715.486$$

$$Se = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{(n-2)nS_{xx}}} = 0.132$$

El criterio de rechazo a la hipótesis nula de esta prueba es: $t_{\text{cal.}} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{\text{cal.}} > t_{\alpha/2}$

Ahora, el valor de $t_{\text{cal.}} = -2.910$ y el de $t_{\alpha/2}$ es -2.074 comparando los resultados se obtiene que la $t_{\text{cal.}} < -t_{\alpha/2}$, por lo que se rechaza la hipótesis nula, esto significa que los datos tienen tendencia lineal pero no parten del origen.

Con esta prueba se demostró que la relación entre el área obtenida y la concentración del analito tienen una tendencia lineal, es decir, hay proporcionalidad entre ellos.

Por consiguiente la ecuación de la curva patrón a utilizar es:

$$y = 0.191 \text{ L/mg} * x + (-0.119)$$

Una vez definida la ecuación, se procede al cálculo de los intervalos de confianza para la ordenada y la pendiente con un 95 % de intervalo de confianza, obteniendo los siguientes resultados:

Para la ordenada al origen

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

$$IC = -0.119 \pm 0.098$$

Para la pendiente de la recta

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

$$IC = 0.191 \pm 0.001$$

Precisión del sistema

Con esta prueba se comprueba la habilidad del analista en cuanto a la preparación de soluciones y la estabilidad del instrumento utilizado, ésta se realizó conociendo la dispersión que tienen los resultados de las inyecciones por triplicado de las 9 soluciones de 49.92 ppm de concentración.

| Solución | Área₁ | Área₂ | Área₃ |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 9.946 | 10.036 | 10.110 |
| 2 | 10.524 | 10.491 | 10.326 |
| 3 | 9.488 | 9.396 | 9.492 |
| 4 | 10.104 | 9.826 | 9.963 |
| 5 | 9.661 | 9.669 | 9.725 |
| 6 | 9.660 | 9.580 | 9.639 |
| 7 | 10.104 | 10.139 | 10.143 |
| 8 | 10.178 | 10.611 | 10.231 |
| 9 | 10.202 | 10.158 | 10.107 |

Tabla 4. Áreas obtenidas de la inyección de las soluciones.

Los datos anteriores se procesaron estadísticamente y se obtuvieron los siguientes resultados:

| | |
|----------------------|-------|
| n | 27 |
| \bar{x} | 9.982 |
| s | 0.332 |
| s² | 0.110 |
| C.V. | 3.326 |

Con los resultados anteriores, se aplicó la prueba de hipótesis relativa a la varianza, en la cual el estadístico de prueba a utilizar es la χ^2 con n-1 grados de libertad, ya que se comparó contra un valor puntual (5 % como máximo del coeficiente de variación).

El planteamiento de la prueba de hipótesis es el siguiente:

$H_0: s^2 = \sigma_0^2$, donde σ_0^2 lo obtengo del 5% de error máximo aceptado.

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

La χ^2 en tablas con 95% de nivel de significancia y 26 grados de libertad tiene un valor de 38.885.

El cálculo de σ_0 (desviación estándar máxima aceptada contra la que se van a comparar los resultados obtenidos) se realiza de la siguiente manera:

C.V. = $\frac{\sigma_0}{x}$ x 100 por lo tanto despejando se obtiene que:

$$\sigma_0 = [(C.V.) (\bar{x})]/100 = [(5 \%) (9.982)]/100 = 0.499$$

Se realiza el cálculo de la $\chi^2_{cal.}$ de la siguiente manera:

$$\chi^2_{cal.} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_o^2} = \left(\frac{(27-1)(0.332)^2}{(0.499)^2} \right) = 11.509$$

El criterio de rechazo de la H_0 es si la $\chi^2_{cal.} > \chi^2_{tablas}$ y como $11.509 < 38.885$ se tiene que $\chi^2_{cal.} < \chi^2_{tablas}$, por lo que se acepta la hipótesis nula, por lo cual el sistema es preciso con un error máximo del 5 %.

Se procedió posteriormente a calcular el intervalo de confianza (a un 95 % de nivel de significancia) de la desviación estándar (s):

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

Dónde:

$$\chi^2_{\alpha/2} = \chi^2_{0.025, 26} = 41.923$$

$$\chi^2_{1-\alpha/2} = \chi^2_{0.975, 26} = 13.846$$

$$\sqrt{\frac{(27-1)(0.332)^2}{41.923}} < s < \sqrt{\frac{(27-1)(0.332)^2}{13.846}}$$

Obteniendo que el intervalo de confianza es:

$$\mathbf{0.261 < s < 0.455}$$

La realización de estas 2 pruebas demostraron que el sistema cromatográfico utilizado y el analista se mantenían en control (cumpliendo los requisitos establecidos) y cuyos valores iniciales habían sido planteados en un trabajo previo¹².

Una vez demostrado lo anterior y con el planteamiento de la metodología de extracción de la vitamina E en el aceite de oliva utilizando el material “Wheaton” y que fue explicado en la parte experimental se realizó el estudio de la información obtenida en la validación de esta metodología planteada.

VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA

Precisión del método (repetibilidad)

Como se describió en la parte experimental, se trabajaron 2 muestras de aceite para conocer si el método es repetible, así como para observar la variación que puede haber entre las muestras debida a su diferencia biológica.

Muestra Borges

| | mg de vit. E / 100 g muestra | | |
|----------|------------------------------|-------------------|-------------------|
| Extracto | Conc ₁ | Conc ₂ | Conc ₃ |
| 1 | 10.916 | 10.839 | 10.931 |
| 2 | 13.323 | 13.081 | 12.654 |
| 3 | 11.888 | 11.645 | 11.447 |
| 4 | 11.565 | 11.863 | 12.088 |
| 5 | 12.257 | 12.246 | 12.216 |
| 6 | 12.630 | 12.635 | 12.247 |
| 7 | 12.736 | 12.343 | 12.328 |
| 8 | 11.496 | 12.597 | 12.083 |

Tabla 5. Resultados obtenidos para muestra Borges.

Las concentraciones de los extractos se procesaron para obtener los siguientes parámetros que permiten realizar el estudio estadístico correspondiente:

| | |
|------------------------------------|--------|
| n | 24 |
| \bar{x} | 12.086 |
| s_{exp} | 0.657 |
| s²_{exp} | 0.431 |
| C.V. | 5.433 |

Como en el caso de precisión del sistema, se plantea una prueba de hipótesis relativa a la varianza, donde también se utiliza el estadístico de prueba de χ^2 con n-1 grados de libertad. El juego de hipótesis es el siguiente:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 \text{ lo obtengo del 5\% de error máximo aceptado.}$$

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

La χ^2 en tablas con 95% de nivel de significancia y 23 grados de libertad tiene un valor de 35.172.

El cálculo de σ_0 (desviación estándar máxima aceptada contra la que se van a comparar los resultados obtenidos) se realiza de la siguiente manera:

$$\text{C.V.} = \frac{\sigma_0}{x} \times 100 \text{ por lo tanto despejando se obtiene que:}$$

$$\sigma_0 = [(\text{C.V.}) (\bar{x})]/100 = [(5\%) (12.086)]/100 = 0.604$$

Se realiza el cálculo de la $\chi^2_{\text{cal.}}$ de la siguiente manera:

$$\chi^2_{\text{cal.}} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = \left(\frac{(24-1)(0.657)^2}{(0.604)^2} \right) = 27.214$$

El criterio de rechazo de la H_0 es si la $\chi^2_{\text{cal.}} > \chi^2_{\text{tablas}}$ y como $27.214 < 35.172$ se tiene que $\chi^2_{\text{cal.}} < \chi^2_{\text{tablas}}$, por lo que se acepta la hipótesis nula, por lo cual el sistema es repetible con un error máximo del 5 %.

Se calculó el intervalo de confianza al 95 % de nivel de significancia para la desviación estándar (s).

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

dónde:

$$\chi^2_{\alpha/2} = \chi^2_{0.025, 23} = 38.076$$

$$\chi^2_{1-\alpha/2} = \chi^2_{0.975, 23} = 11.689$$

$$\sqrt{\frac{(24-1)(0.657)^2}{38.076}} < s < \sqrt{\frac{(24-1)(0.657)^2}{11.689}}$$

Obteniendo que el intervalo de confianza es:

$$\mathbf{0.510 < s < 0.921}$$

El valor de vitamina E encontrado en esta muestra con su intervalo de confianza (a un 95 % de nivel de significancia) sin tomar en cuenta el % de recobro, se realizó de la siguiente manera:

$$\bar{X} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Dónde:

$$\bar{X} = 12.086$$

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

$$n = 24$$

$$s = 0.657$$

$$Conc. = 12.086 \pm 2.074 * \frac{0.657}{\sqrt{24}} = 12.086 \pm 0.278 \text{ mg vit. E / 100 g muestra}$$

Muestra Ybarra

| | mg vit. E / 100 g muestra | | |
|----------|---------------------------|-------------------|-------------------|
| Extracto | Conc ₁ | Conc ₂ | Conc ₃ |
| 1 | 10.356 | 10.614 | 10.459 |
| 2 | 10.460 | 10.111 | 10.525 |
| 3 | 10.522 | 10.058 | 9.360 |

Tabla 6. Resultados obtenidos con el aceite Ybarra.

Al igual que con la muestra Borges se calcularon los parámetros estadísticos para aplicar la prueba de hipótesis a la varianza utilizando el mismo estadístico de prueba (χ^2 con n-1 g.l.):

| | |
|------------------------------------|--------|
| n | 9 |
| \bar{x} | 10.274 |
| s_{exp} | 0.391 |
| s²_{exp} | 0.153 |
| C.V. | 3.808 |

Se plantea la prueba de hipótesis relativa a la varianza, se utiliza el estadístico de prueba de χ^2 con n-1 grados de libertad. El juego de hipótesis es el siguiente:

$$H_0: s^2 = \sigma_0^2, \text{ donde } \sigma_0^2 \text{ lo obtengo del 5\% de error máximo aceptado.}$$

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

La χ^2 en tablas con 95% de nivel de significancia y 8 grados de libertad da un valor de 15.507.

El cálculo de σ_0 (desviación estándar máxima aceptada contra la que se van a comparar los resultados obtenidos) se realiza de la siguiente manera:

$$\text{C.V.} = \frac{\sigma_0}{x} \times 100 \text{ por lo tanto despejando se tiene que:}$$

$$\sigma_0 = [(\text{C.V.}) (\bar{x})]/100 = [(5\%) (10.274)]/100 = 0.514$$

Se realiza el cálculo de la $\chi^2_{\text{cal.}}$ de la siguiente manera:

$$\chi^2_{\text{cal.}} = \frac{(n-1)s^2}{\sigma_0^2} = \left(\frac{(9-1)(0.391)^2}{(0.514)^2} \right) = 4.640$$

El criterio de rechazo de la H_0 es si la $\chi^2_{\text{cal.}} > \chi^2_{\text{tablas}}$ y como $4.640 < 15.507$ se tiene que $\chi^2_{\text{cal.}} < \chi^2_{\text{tablas}}$, por lo que se acepta la hipótesis nula, lo cual indica que el sistema es repetible con un error máximo del 5 %

Se calculó el intervalo de confianza al 95 de nivel de significancia para la desviación estándar (s)

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

Dónde:

$$\chi^2_{\alpha/2} = \chi^2_{0.025, 8} = 17.535$$

$$\chi^2_{1-\alpha/2} = \chi^2_{0.975, 8} = 2.180$$

$$\sqrt{\frac{(9-1)(0.391)^2}{17.535}} < s < \sqrt{\frac{(9-1)(0.391)^2}{2.180}}$$

Obteniendo que el intervalo de confianza es:

$$\mathbf{0.264 < s < 0.750}$$

El valor de vitamina E encontrado en esta muestra con su intervalo de confianza (a un 95 % de nivel de significancia) sin tomar en cuenta el % de recobro, se realizó de la siguiente manera:

$$\bar{X} \pm t_{\alpha/2} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

dónde:

$$\bar{X} = 10.274$$

$$t_{\alpha/2, (0.025, 7)} = 2.365$$

$$n = 9$$

$$s = 0.391$$

$$Conc. = 10.274 \pm 2.365 * \frac{0.391}{\sqrt{9}} = 10.274 \pm 0.308 \text{ mg vit. E / 100 g muestra}$$

Estabilidad de los extractos o muestra

Como se indicó en el capítulo de metodología se analizaron 5 extractos obtenidos de la muestra del aceite de oliva Borges trabajados en la prueba de repetibilidad, por lo anterior se les mantienen sus números que se le dieron durante ese estudio y así se colocaron en la *tabla 6*.

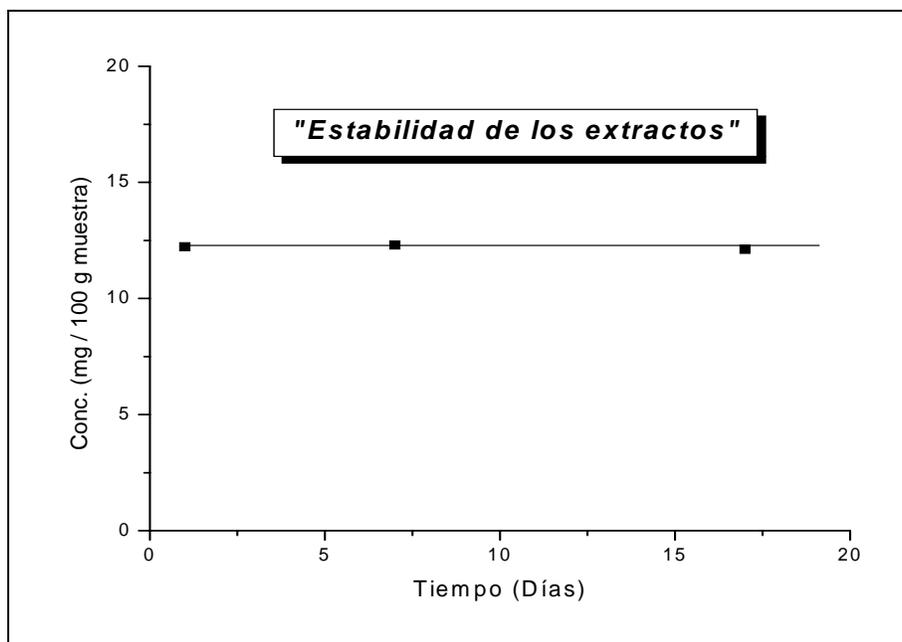
Los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad de estos extractos, serán manejados como el primer día de análisis para el estudio de estabilidad.

| | Día 01 | | | Día 07 | | | Día 17 | | |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Muestra | Conc₁ | Conc₂ | Conc₃ | Conc₁ | Conc₂ | Conc₃ | Conc₁ | Conc₂ | Conc₃ |
| 4 | 11.565 | 11.863 | 12.088 | 11.201 | 11.309 | 10.811 | 12.181 | 12.006 | 11.904 |
| 5 | 12.257 | 12.246 | 12.216 | 11.874 | 12.190 | 12.384 | 12.052 | 11.383 | 11.935 |
| 6 | 12.630 | 12.645 | 12.247 | 13.038 | 13.002 | 12.890 | 12.252 | 12.426 | 12.507 |
| 7 | 12.736 | 12.373 | 12.328 | 12.477 | 12.398 | 12.428 | 11.622 | 12.084 | 12.189 |
| 8 | 11.496 | 12.597 | 12.083 | 12.494 | 12.808 | 13.195 | 12.191 | 12.458 | 12.577 |

Tabla 7. Resultados de la prueba de estabilidad en mg vit. E / 100 g muestra.

Con los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros, además de elaborar el gráfico correspondiente (*Gráfico 2*).

| | Día 01 | Día 07 | Día 17 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|
| n | 15 | 15 | 15 |
| \bar{x} | 12.225 | 12.300 | 12.118 |
| s_{exp} | 0.370 | 0.715 | 0.326 |
| s^2_{exp} | 0.137 | 0.511 | 0.106 |



Gráfica 2. Prueba de estabilidad de los extractos.

Como puede observarse en la gráfica los extractos de vitamina E presentan una mínima variación en la concentración del analito, por lo que se puede afirmar que los extractos son estables por lo menos 17 días para su análisis.

Para confirmar lo anterior se realizaron las pruebas de hipótesis respectivas a los resultados obtenidos. La prueba estadística que se presentará (para ejemplificar el procedimiento) será entre el día 1 y el día 17, en el anexo A8- al anexo A11 se encuentran además de éstos, los cálculos de la prueba que se aplicó a los datos del día 1 y el día 7.

La prueba de hipótesis que se aplicó a las varianzas con un nivel de significancia al 95% fue el siguiente:

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

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

Se realiza el cálculo experimental de la F de Snedecor:

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

Dónde:

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

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

Por lo que se tiene:

$s_1^2 = 0.137$ con 14 grados de libertad

$s_2^2 = 0.106$ con 14 grados de libertad

Obteniendo:

$$F_{\text{cal.}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{0.137}{0.106} = 1.285$$

En tablas se encuentra que con grados de libertad $(n_M - 1, n_m - 1)$ y un nivel de significancia al 95% el valor de $F_{\alpha/2 (0.025, 14, 14)} = 2.979$

El criterio de rechazo de la hipótesis nula es $F_{\text{cal.}} > F_{\alpha/2}$ con n_{M-1}, n_{m-1} por lo tanto como $1.285 < 2.979$, es decir, la $F_{\text{cal.}} < F_{\text{tablas}}$ y se acepta la hipótesis nula, se concluye que el analista presentó la misma precisión y por lo tanto la prueba de hipótesis sobre las medias se hizo considerando varianzas iguales.

Lo anterior plantea la siguiente prueba de hipótesis para las medias:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

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

Para realizar esta prueba el estadístico que se utiliza es la “t” de Student, por lo que se realiza el cálculo de ésta con la ecuación para varianzas semejantes.

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

$$t_{cal} = \frac{12.225 - 12.118}{\sqrt{(14)(0.137) + (14)(0.106)}} \sqrt{\frac{(15)(15)(15 + 15 - 2)}{15 + 15}} = 0.839$$

Tomando en cuenta el número de datos se encuentra que en tablas la $t_{\alpha/2}$ con $(n_1 + n_2) - 2$ grados de libertad es igual a: $t_{(0.025, 28)} = 2.048$

El criterio de rechazo de esta prueba es que la $t_{cal.} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{cal.} > t_{\alpha/2}$, como se puede observar $0.839 < 2.048$ por lo que la $t_{cal.} < t_{tablas}$ por lo cual se acepta la hipótesis nula, lo que indica que las muestras provienen de la misma población, con lo que se concluye que los extractos son estables por lo menos 17 días para llevar a cabo su análisis cualitativo y cuantitativo manteniendo los extractos guardados en viales color ámbar, sellados de la tapa con cinta de teflón y en refrigeración.

Recobro

Muestra Borges adicionada

En el caso de esta muestra se obtuvieron los siguientes resultados:

| Muestra | Conc. (mg/100g muestra) | % Recobro |
|----------------|------------------------------------|------------------|
| 1 | 15.530 | 81.739 |
| | 15.457 | 81.354 |
| | 14.337 | 75.460 |
| 2 | 13.792 | 72.588 |
| | 13.649 | 71.839 |
| | 13.085 | 68.868 |
| 3 | 15.983 | 84.120 |
| | 14.966 | 78.767 |
| | 15.468 | 81.410 |
| 4 | 15.434 | 81.230 |
| | 16.171 | 85.112 |
| | 14.913 | 78.487 |

Tabla 8. Resultados de la prueba de recobro para el aceite de oliva de la marca Borges.

Se realizan los cálculos de los parámetros estadísticos de los datos:

| | Conc. (mg/100g muestra) | % Recobro |
|---|------------------------------------|------------------|
| Promedio | 14.899 | 78.42 |
| Desviación estándar (s) | 0.978 | 5.145 |
| Coefficiente de variación (C.V.) | 6.561 | 6.561 |

Como ejemplo del cálculo del % recobro para esta prueba se tiene que:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{(14.899 \text{ mg vit. E} / 100 \text{ g mta})}{(19 \text{ mg vit. E} / 100 \text{ g mta})_{teo}} \times 100 = \mathbf{78.42\%}$$

En promedio para la muestra Borges el valor del recobro es de 78.42 %, lo que indica que en la metodología hay pérdidas de la vitamina E de aproximadamente 21.58 %.

Ahora bien, ya teniendo el valor del recobro, se calculó la concentración de vitamina E contenida en la muestra marca Borges (considerando el valor del recobro) realizando la siguiente operación:

Concentración promedio de vitamina E en la muestra: 12.086 mg vit. E / 100 g muestra

Valor promedio del Recobro: 78.42%.

$$\frac{(12.086 \text{ mg vit. E})(100)}{78.42} = 15.411 \text{ mg Vit. E} / 100 \text{ g muestra}$$

Muestra Ybarra adicionada

En el caso de esta muestra se obtuvieron los siguientes resultados:

| Muestra | Conc. (mg/100g muestra) | % Recobro |
|---------|----------------------------|-----------|
| 1 | 17.062 | 98.444 |
| | 16.823 | 97.064 |
| | 16.542 | 95.441 |
| 2 | 12.397 | 71.526 |
| | 12.235 | 70.594 |
| | 12.461 | 71.893 |
| 3 | 15.088 | 87.053 |
| | 14.930 | 86.142 |
| | 15.330 | 88.447 |
| 4 | 15.410 | 88.908 |
| | 14.726 | 84.963 |
| | 14.440 | 83.317 |

Tabla 9. Resultados de la prueba de recobro para el aceite de oliva de la marca Ybarra.

Se realizan los cálculos de los parámetros estadísticos de los datos:

| | Conc. (mg/100g muestra) | % Recobro |
|--|----------------------------|-----------|
| Promedio | 14.787 | 85.32 |
| Desviación estándar (s) | 1.678 | 9.679 |
| Coefficiente de variación (C. V.) | 11.345 | 11.345 |

Como ejemplo del cálculo del % recobro para esta muestra se tiene que:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{(14.787 \text{ mg vit. E} / 100 \text{ g mta})}{(17.332 \text{ mg vit. E} / 100 \text{ g mta})_{teo}} \times 100 = \mathbf{85.32\%}$$

En promedio para la muestra Ibarra el valor del recobro es de 85.32 %, lo que indica que en algún paso de la extracción hay pérdidas de la vitamina E de aproximadamente 14.68 %.

Una vez que se obtuvo el valor del recobro, se procedió a calcular el contenido de vitamina en la muestra de la marca Ybarra.

Concentración promedio de la vitamina: 10.274 mg de vit. E / 100 g muestra

Valor promedio del recobro: 85.32 %

$$\frac{(10.274 \text{ mg vit. E})(100)}{85.32} = 12.041 \text{ mg Vit. E} / 100 \text{ g muestra}$$

Comparando las concentraciones reales de vitamina E calculadas en las muestras (considerando el valor del recobro) y los valores reportados en la literatura^{1, 3, 7} se observa que hay muy poca diferencia entre ellos, esto indica que si se afina el método en sus diferentes etapas en las que podría haber pérdida de vitamina (por ejemplo, el tiempo y temperatura de saponificación, en el paso de la extracción líquido-líquido utilizar otro disolvente o una mezcla de disolventes por citar alguno éter de petróleo-éter etílico) se podrá mejorar la recuperación de la vitamina E de la muestra.

CONCLUSIONES

Después del trabajo experimental y las distintas pruebas estadísticas aplicadas a los datos obtenidos con la metodología desarrollada, las conclusiones finales de este proyecto son

- Comparando las cantidades gastadas por la metodología de extracción desarrollada con la metodología oficial propuesta por la AOAC, se observa que hay un menor gasto en reactivos, solventes y muestra.
- La consecuencia de esta reducción, es la generación de menos sustancias contaminantes, un menor riesgo del analista (por utilizar volúmenes pequeños de solventes inflamables), menor costo y manejo de varias muestras.
- Se introduce en el proceso la utilización de cartuchos de la técnica de EFS que 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 E, ya que el sistema para realizar el análisis cualitativo-cuantitativo de la vitamina mantuvo una respuesta con tendencia lineal y una precisión con un error máximo del 5%.
- La metodología desarrollada es repetible con un error máximo del 5%.
- Las condiciones de almacenamiento óptimas para los extractos obtenidos por la metodología desarrollada son: ser almacenados bajo refrigeración (4° C) en frascos viales color ámbar, sellándolos de la tapa con cinta de teflón, dichas condiciones los mantienen estables por lo menos 17 días para su análisis instrumental.
- La metodología empleada para la extracción de vitamina E presentó un recobro que va del 78 al 85 % para la matriz de aceite de oliva estudiada.
- **Con todo lo mencionado anteriormente se puede concluir que método desarrollado permite la extracción de vitamina E de una matriz con características semejantes al aceite de oliva.**
- Al realizar el estudio a diferentes muestras de aceite de oliva se observó que los resultados de concentración obtenidos son bastante cercanos de entre 12 a 15 mg / 100 g de muestra, los cuales entran dentro del intervalo que se puede observar en la literatura.

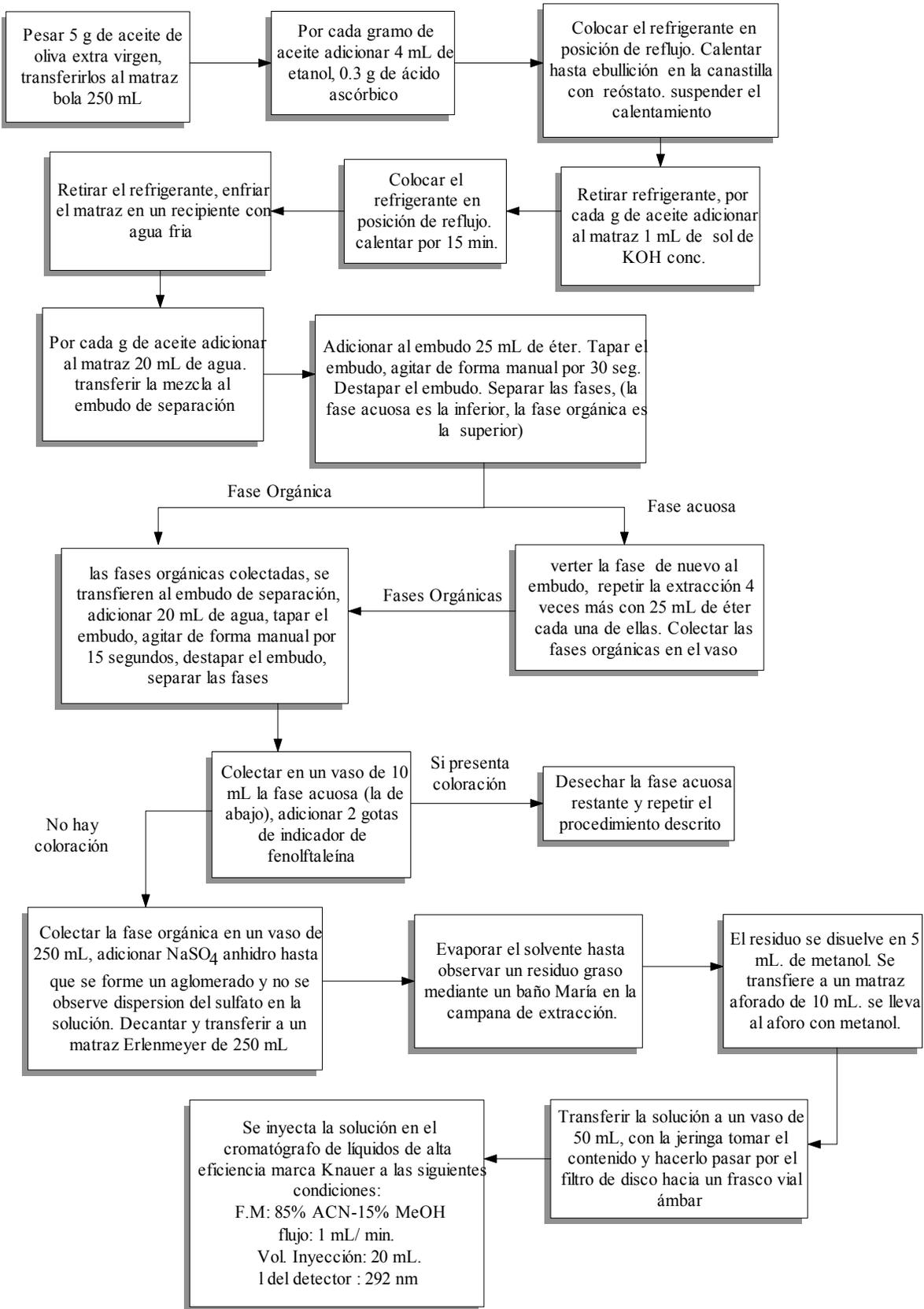
BIBLIOGRAFÍA

- ▲ 1.- MATAIX, V. J. “Nutrición y alimentación humana,” Vol. I, ED. Ergón, Madrid, España, 2002, p. 184-190.
- ▲ 2.- P. LEENHEER, E. LAMBERT, J. NELIS, “Modern Chromatographic Analysis of Vitamins”, 2ª edición, Ed. Marcel Dekker, U.S.A., 1992, p. 153-191.
- ▲ 3.-FENNEMA, O. R. “Química de los alimentos”, Capítulo 8, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1991.
- ▲ 4.- D. Belitz H. W. Grosch, “Química de los alimentos”, ED. Acribia, España 1997, p. 1087
- ▲ 5.- USDA, National Nutrient Data Base for Standard Release 18, vista en www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp, 18 de septiembre de 2006
- ▲ 6.-Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Tablas de composición de los alimentos. Ingestión diaria recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas y nutrimentos inorgánicos para la población mexicana, 1997.
- ▲ 7.- <http://www.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/guianutr/compo41.html> 18 de septiembre de 2006
- ▲ 8.- PITA RODRIGUEZ, G., “Funciones de la vitamina E en la nutrición humana”, Revista Cubana de Alimentos y Nutrición, Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, 1997.
- ▲ 9.- LLOYD, McDONALD, CRAMPTON, “Fundamentos de nutrición” Ed. Acribia, España, 1982, p. 196-200.
- ▲ 10.- GÓMEZ-CORONADO, IBAÑEZ, RUPÉREZ, BARBAS. “Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin”, Journal of Chromatography A, Septiembre, 2004.
- ▲ 11.- JACOB, B. M. “The chemical analysis of foods and foods products” 3ª edición, Ed. Robert E. Krieger, USA, 1973, p. 738-740.
- ▲ 12.- “Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC” 17ª edición, editado por William Horwitz,, U. S. A., 2000, Cap. 45, p. 30-40

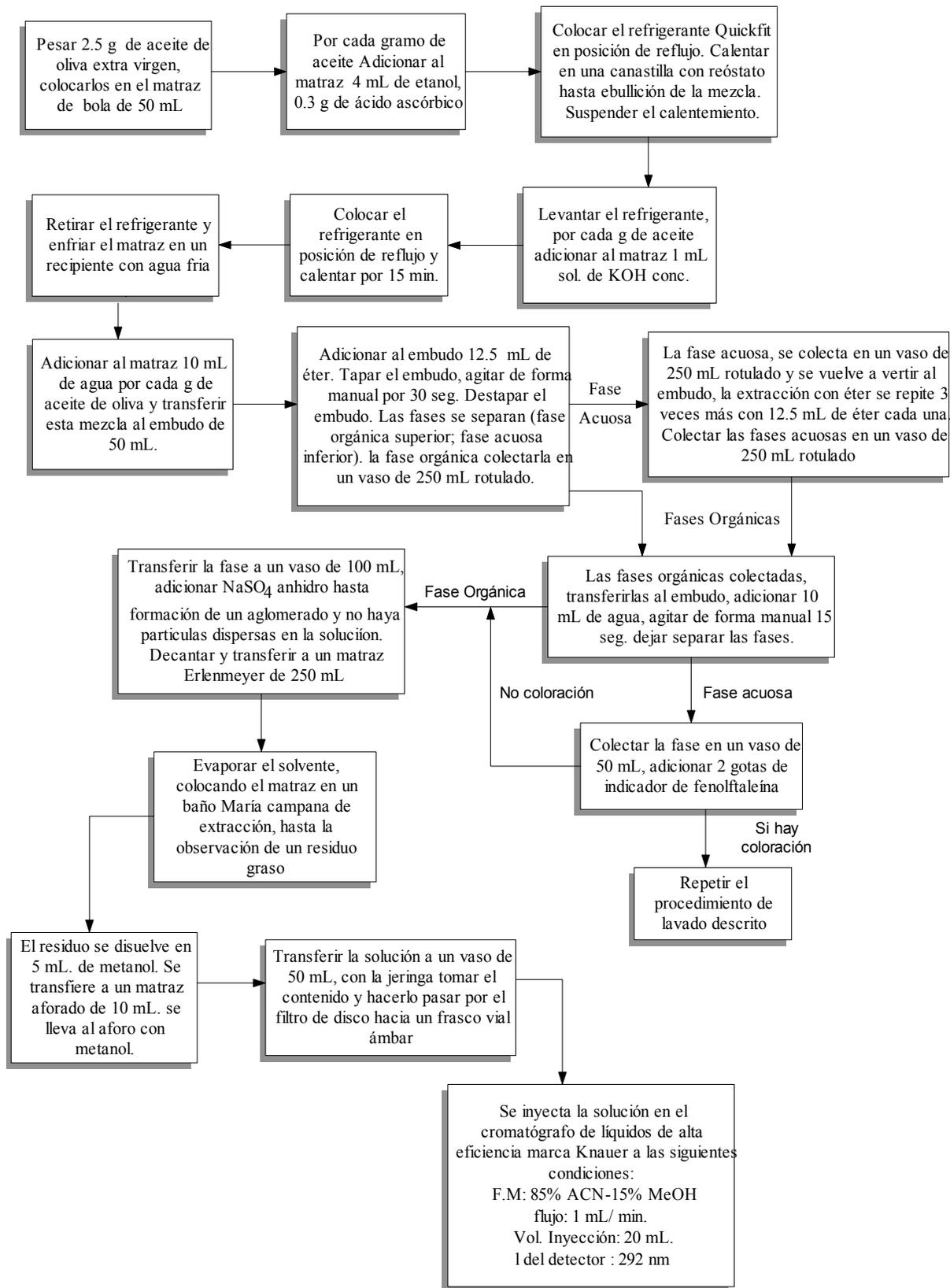
- ▲ 13.- CARBAJAL JARQUÍN E. “Validación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para el análisis de vitamina E” Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2006.
- ▲ 14.- DELGADO, BUSTAMANTE, SÁNCHEZ, CARABIAS, “Pressurized liquid extraction prior to liquid chromatography with electrochemical detection for the analysis of vitamin E isomers in seeds and nuts” Journal of Chromatography A, Noviembre 2004.
- ▲ 15.-ALBALÁ, NOVELLA, VECIANA, MARINÉ, “Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography”, Journal of Chromatography A, Agosto 1997
- ▲ 16.- RODAS, MORERA, CASTELLOTE, LOPEZ, “Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas”, Journal of Chromatography A, Agosto, 2003.
- ▲ 17.- H. QIAN, M. SHENG, “Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro vitamin D in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis” Journal of Chromatography A, Septiembre, 1998.
- ▲ 18.- SCHIEBER, MARX, CARLE, “Simultaneous determination of carotenes and tocopherols in ATBC drinks by high-performance liquid chromatography” Food chemistry, Julio, 2003.
- ▲ 19.- McNAIR, H. M. “Cromatografía líquidos de alta presión.” Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Monografía 10, Washington, D.C., U.S.A., 1973.
- ▲ 20.- MARTÍNEZ SÁMANO S. I. “Validación de un método de análisis de vitamina A en hígado de res por cromatografía de líquidos de alta eficiencia” Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2005.
- ▲ 21.- SKOOG, WEST, “Química Analítica” 7^a Edición, Ed. Mc-GrawHill, México, 2000, p 415-418
- ▲ 22.- J. T. BAKER, “Solid phase extraction for sample preparation manual”, U.S.A., 1988.
- ▲ 23.- Soporte técnico, seminario de alimentos, Perkin-Elmer, Mayo 2006.

- ▲ 24.- QUATTROCCHI ABELAIRA, LABA, “Introducción al HPLC; aplicación y práctica”, Ed. Artes Gráficas Faro, Argentina, 1992, p 211-218
- ▲ 25.- VARIAN TECHNOLOGY, “Handbook of sorbent extraction technology”, 2^a edición, U.S.A., 1993.
- ▲ 26.- EURACHEM GUIDE “The Fitness for purpose of Analytical Methods” 1998
- ▲ 27.- HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, A., “Validación de metodologías instrumentales” Trabajo Escrito Vía Cursos de Educación Continua (4ta. Opción), Facultad de Química, UNAM, México, 2005.
- ▲ 28.- “Guía de validación de Métodos Analíticos”, editada por el colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C.; registro ante la DGP-032; edición 2002.

ANEXOS



ANEXO A1. Diagrama de extracción método adaptado de la AOAC



ANEXO A2. Diagrama de extracción elaborado para material Quickfit/Aldrich

| Conc. (X) | Areas (Y) | X ² | Y ² | X*Y | n | 24 |
|-------------------------|------------|----------------|-------------------|---------------|--|-----------------|
| 100.8 | 18.839 | 10,160.640 | 354.908 | 1,898.971 | n-2 | 22 |
| 100.8 | 19.008 | 10,160.640 | 361.304 | 1,916.006 | (nX) ² | 931116.923 |
| 100.8 | 18.996 | 10,160.640 | 360.848 | 1,914.797 | m | 0.191 |
| 81.6 | 15.663 | 6,658.560 | 245.330 | 1,278.101 | b | -0.119 |
| 81.6 | 15.718 | 6,658.560 | 247.056 | 1,282.589 | Media X | 40.206 |
| 81.6 | 15.663 | 6,658.560 | 245.330 | 1,278.101 | Sxx | 715925.475 |
| 62.4 | 11.707 | 3,893.760 | 137.054 | 730.517 | Syy | 26116.852 |
| 62.4 | 11.724 | 3,893.760 | 137.452 | 731.578 | Sxy | 136715.486 |
| 62.4 | 11.752 | 3,893.760 | 138.110 | 733.325 | Sxx*Syy | 18697719646.132 |
| 40.32 | 7.732 | 1,625.702 | 59.784 | 311.754 | (Sxy) ² | 18691124182.215 |
| 40.32 | 7.651 | 1,625.702 | 58.538 | 308.488 | n*Sxx | 17182211.402 |
| 40.32 | 7.779 | 1,625.702 | 60.513 | 313.649 | (n-2) nSxx | 378008650.838 |
| 20.16 | 3.713 | 406.426 | 13.786 | 74.854 | Se | 0.132 |
| 20.16 | 3.745 | 406.426 | 14.025 | 75.499 | b/Se | -0.901 |
| 20.16 | 3.719 | 406.426 | 13.831 | 74.975 | t _{cal} | -2.910 |
| 10.08 | 1.765 | 101.606 | 3.115 | 17.791 | t _{α/2, (22,0.025)} | 2.074 |
| 10.08 | 1.807 | 101.606 | 3.265 | 18.215 | Prueba de hipótesis para la ordenada H ₀ = b = β donde β = 0 H ₁ = b ≠ β Criterio de rechazo t _{cal} < -t _{α/2} ó que t _{cal} > t _{α/2} Conclusión: Como -2.910 < -2.074 Rechazo H₀, por lo tanto b ≠ β Esto es, que la ordenada es diferente de cero. | |
| 10.08 | 1.737 | 101.606 | 3.017 | 17.509 | | |
| 5.28 | 0.818 | 27.878 | 0.669 | 4.319 | | |
| 5.28 | 0.763 | 27.878 | 0.582 | 4.029 | | |
| 5.28 | 0.795 | 27.878 | 0.632 | 4.198 | | |
| 1.008 | 0.089 | 1.016 | 0.008 | 0.090 | | |
| 1.008 | 0.111 | 1.016 | 0.012 | 0.112 | | |
| 1.008 | 0.099 | 1.016 | 0.010 | 0.100 | | |
| Suma (Σ) | 964.944 | 181.393 | 68,626.767 | 2,459.178 | | 12,989.566 |
| (Suma (Σ)) ² | 931116.923 | 32,903.420 | 4,709,633,092.873 | 6,047,556.519 | | 168,728,813.230 |

Intervalo de confianza para ordenada

| | |
|---------------|--------|
| Máximo | -0.034 |
| Mínimo | -0.204 |

Intervalo de confianza para la pendiente

| | |
|---------------|-------|
| Máximo | 0.193 |
| Mínimo | 0.189 |

Anexo A3. Prueba de hipótesis para la ordenada al origen

| Solución | Áreas | n | 27 |
|----------|--------|--|--------|
| 1 | 9.946 | X (media) | 9.982 |
| 1 | 10.036 | s_{exp} | 0.332 |
| 1 | 10.110 | s²_{exp} | 0.110 |
| 2 | 10.524 | C.V._{exp} | 3.326 |
| 2 | 10.491 | C.V._{Teó} | 5 |
| 2 | 10.326 | σ_{Teó} | 0.499 |
| 3 | 9.488 | σ²_{Teó} | 0.249 |
| 3 | 9.396 | α | 0.05 |
| 3 | 9.492 | G. L (n-1) | 26 |
| 4 | 10.104 | χ²_{cal} | 11.503 |
| 4 | 9.826 | χ²_{tablas} (0.05,26) | 38.885 |
| 4 | 9.963 | χ²_(0.025,26) | 41.923 |
| 5 | 9.661 | χ²_(0.975,26) | 13.844 |
| 5 | 9.669 | | |
| 5 | 9.725 | Prueba de hipótesis: | |
| 6 | 9.66 | H ₀ = s ² = σ ² donde: σ ² = 5 % de error máximo | |
| 6 | 9.58 | H ₁ = s ² > σ ² | |
| 6 | 9.639 | Criterio de rechazo de H₀: | |
| 7 | 10.104 | χ ² _{cal} > χ ² _{tablas} | |
| 7 | 10.139 | | |
| 7 | 10.143 | Conclusión: Como χ ² _{cal} < χ ² _{tablas} | |
| 8 | 10.178 | Se acepta la H₀ lo cual quiere decir que: | |
| 8 | 10.611 | El sistema es preciso | |
| 8 | 10.231 | con un error máximo del 5 % | |
| 9 | 10.202 | | |
| 9 | 10.158 | | |
| 9 | 10.107 | | |

Intervalos de confianza para desv. Est.

Mínimo 0.261

Máximo 0.455

Anexo A4. Prueba de hipótesis para determinar la precisión del sistema

| Muestra | Peso de la muestra (g) | Áreas | *Conc. (ppm) | **Conc. (mg/100 g mta) |
|---------|------------------------|-------|--------------|------------------------|
| 1 | 0.5108 | 2.13 | 11.152 | 10.916 |
| 1 | 0.5108 | 2.115 | 11.073 | 10.839 |
| 1 | 0.5108 | 2.133 | 11.168 | 10.931 |
| 2 | 0.5089 | 2.59 | 13.560 | 13.323 |
| 2 | 0.5089 | 2.543 | 13.314 | 13.081 |
| 2 | 0.5089 | 2.46 | 12.880 | 12.654 |
| 3 | 0.5157 | 2.342 | 12.262 | 11.888 |
| 3 | 0.5157 | 2.294 | 12.010 | 11.645 |
| 3 | 0.5157 | 2.255 | 11.806 | 11.447 |
| 4 | 0.5102 | 2.254 | 11.801 | 11.565 |
| 4 | 0.5102 | 2.312 | 12.105 | 11.863 |
| 4 | 0.5102 | 2.356 | 12.335 | 12.088 |
| 5 | 0.5126 | 2.4 | 12.565 | 12.257 |
| 5 | 0.5126 | 2.398 | 12.555 | 12.246 |
| 5 | 0.5126 | 2.392 | 12.524 | 12.216 |
| 6 | 0.513 | 2.475 | 12.958 | 12.630 |
| 6 | 0.513 | 2.476 | 12.963 | 12.635 |
| 6 | 0.513 | 2.4 | 12.565 | 12.247 |
| 7 | 0.5264 | 2.561 | 13.408 | 12.736 |
| 7 | 0.5264 | 2.482 | 12.995 | 12.343 |
| 7 | 0.5264 | 2.479 | 12.979 | 12.328 |
| 8 | 0.5085 | 2.233 | 11.691 | 11.496 |
| 8 | 0.5085 | 2.447 | 12.812 | 12.597 |
| 8 | 0.5085 | 2.347 | 12.288 | 12.083 |

Factor de respuesta (Fr) = 0.191

Ecuación utilizada para cálculo de concentración en ppm:

$$*Conc. = \text{Área} / Fr$$

Ecuación utilizada para el cálculo de conc. En mg / 100 g muestra

$$**C \text{ (mg /100 g muestra)} = (\text{conc en ppm}) (0.005 L) (100 \text{ g /g mta})$$

Anexo A5. Resultados concentración de vitamina E en la muestra marca Borges

| Muestra | Conc. | n | 24 |
|---------|--------|---|--------|
| 1 | 10.916 | X (media) | 12.086 |
| | 10.839 | s_{exp} | 0.657 |
| | 10.931 | s²_{exp} | 0.431 |
| 2 | 13.323 | C.V._{exp} | 5.433 |
| | 13.081 | C.V._{Teó} | 5 |
| | 12.654 | σ_{Teó} | 0.604 |
| 3 | 11.888 | σ²_{Teó} | 0.365 |
| | 11.645 | α | 0.05 |
| | 11.447 | G. L (n-1) | 23 |
| 4 | 11.565 | χ²_{cal} | 27.153 |
| | 11.863 | χ²_{tablas (0.05,23)} | 35.172 |
| | 12.088 | χ²_(0.025,23) | 38.076 |
| 5 | 12.257 | χ²_(0.975,23) | 11.689 |
| | 12.246 | | |
| | 12.216 | | |
| 6 | 12.630 | | |
| | 12.635 | | |
| | 12.247 | | |
| 7 | 12.736 | | |
| | 12.343 | | |
| | 12.328 | | |
| 8 | 11.496 | | |
| | 12.597 | | |
| | 12.083 | | |

Prueba de hipótesis:

$H_0 = s^2 = \sigma^2$ donde: $\sigma^2 = 5\%$ de error máximo

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

Criterio de rechazo de H_0 :

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

Conclusión: Como $\chi^2_{cal} < \chi^2_{tablas}$

Se acepta la H_0 lo cual quiere decir que para la muestra Borges

El método es repetible con un error máximo del 5 %

Intervalos de confianza para la desv. Est.

Mínimo 0.510

Máximo 0.921

Anexo A6. Prueba de Hipótesis para determinar la repetibilidad del método con la muestra marca Borges

| Muestra | Peso de la muestra (g) | Áreas | *Conc. (ppm) | **Conc. (mg/100 g muestra) |
|---------|------------------------|--------|--------------|----------------------------|
| 1 | 0.5076 | 2.008 | 10.513 | 10.356 |
| 1 | 0.5076 | 2.0581 | 10.775 | 10.614 |
| 1 | 0.5076 | 2.028 | 10.618 | 10.459 |
| 2 | 0.5248 | 2.097 | 10.979 | 10.460 |
| 2 | 0.5248 | 2.027 | 10.613 | 10.111 |
| 2 | 0.5248 | 2.11 | 11.047 | 10.525 |
| 3 | 0.5135 | 2.064 | 10.806 | 10.522 |
| 3 | 0.5135 | 1.973 | 10.330 | 10.058 |
| 3 | 0.5135 | 1.836 | 9.613 | 9.360 |

Factor de respuesta (Fr) =
0.191

Ecuación utilizada para cálculo de concentración en ppm:

$$*Conc. = \text{Área} / Fr$$

Ecuación utilizada para el cálculo de conc. En mg / 100 g muestra

$$**C \text{ (mg / 100 g muestra)} = (\text{conc en ppm}) (0.005 \text{ L}) (100 \text{ g / g mta})$$

Conclusión: Como $\chi^2_{\text{cal}} < \chi^2_{\text{tablas}}$

Se acepta H_0 lo cual quiere decir que para la muestra Ybarra el método es repetible con un error máximo de 5 %

| Muestra | **Conc. (mg/100 g muestra) | n | 9 |
|---------|----------------------------|--------------------------------------|--------|
| 1 | 10.356 | X (media) | 10.274 |
| 1 | 10.614 | s_{exp} | 0.391 |
| 1 | 10.459 | s^2_{exp} | 0.153 |
| 2 | 10.460 | C.V. $_{\text{exp}}$ | 3.808 |
| 2 | 10.111 | C.V. $_{\text{Teó}}$ | 5 |
| 2 | 10.525 | $\sigma_{\text{Teó}}$ | 0.514 |
| 3 | 10.522 | $\sigma^2_{\text{Teó}}$ | 0.264 |
| 3 | 10.058 | α | 0.050 |
| 3 | 9.360 | G. L (n-1) | 8 |
| | | χ^2_{cal} | 4.640 |
| | | χ^2_{tablas} (0.05,8) | 15.507 |
| | | $\chi^2_{(0.025,8)}$ | 17.535 |
| | | $\chi^2_{(0.975,8)}$ | 2.180 |

Prueba de hipótesis:

$$H_0 = s^2 = \sigma^2 \text{ donde: } \sigma^2 = 5 \% \text{ de error max.}$$

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

Criterio de rechazo de H_0 :

$$\chi^2_{\text{cal}} > \chi^2_{\text{tablas}}$$

Intervalos de confianza para la desv. Est.

Mínimo 0.264

Máximo 0.750

Anexo A7. Resultados y prueba de hipótesis para determinar repetibilidad de método con la muestra marca Ybarra

DÍA 01

| Muestra | Áreas | Peso de la mta (g) | *Conc. (ppm) | **Conc. (mg/100 g mta) |
|---------|-------|-------------------------------------|--------------|------------------------|
| 4 | 2.254 | 0.5102 | 11.801 | 11.565 |
| 4 | 2.312 | 0.5102 | 12.105 | 11.863 |
| 4 | 2.356 | 0.5102 | 12.335 | 12.088 |
| 5 | 2.4 | 0.5126 | 12.565 | 12.257 |
| 5 | 2.398 | 0.5126 | 12.555 | 12.246 |
| 5 | 2.392 | 0.5126 | 12.524 | 12.216 |
| 6 | 2.475 | 0.513 | 12.958 | 12.630 |
| 6 | 2.478 | 0.513 | 12.974 | 12.645 |
| 6 | 2.4 | 0.513 | 12.565 | 12.247 |
| 7 | 2.561 | 0.5264 | 13.408 | 12.736 |
| 7 | 2.488 | 0.5264 | 13.026 | 12.373 |
| 7 | 2.479 | 0.5264 | 12.979 | 12.328 |
| 8 | 2.233 | 0.5085 | 11.691 | 11.496 |
| 8 | 2.447 | 0.5085 | 12.812 | 12.597 |
| 8 | 2.347 | 0.5085 | 12.288 | 12.083 |
| | | Promedio | 12.572 | 12.225 |
| | | S_{exp} | 0.476 | 0.370 |
| | | S²_{exp2} | 0.226 | 0.137 |

DÍA 07

| Muestra | Áreas | Peso de la mta (g) | *Conc. (ppm) | **Conc. (mg/100 g mta) |
|---------|-------|-------------------------------------|--------------|------------------------|
| 4 | 2.183 | 0.5102 | 11.429 | 11.201 |
| 4 | 2.204 | 0.5102 | 11.539 | 11.309 |
| 4 | 2.107 | 0.5102 | 11.031 | 10.811 |
| 5 | 2.325 | 0.5126 | 12.173 | 11.874 |
| 5 | 2.387 | 0.5126 | 12.497 | 12.190 |
| 5 | 2.425 | 0.5126 | 12.696 | 12.384 |
| 6 | 2.555 | 0.513 | 13.377 | 13.038 |
| 6 | 2.548 | 0.513 | 13.340 | 13.002 |
| 6 | 2.526 | 0.513 | 13.225 | 12.890 |
| 7 | 2.509 | 0.5264 | 13.136 | 12.477 |
| 7 | 2.493 | 0.5264 | 13.052 | 12.398 |
| 7 | 2.499 | 0.5264 | 13.084 | 12.428 |
| 8 | 2.427 | 0.5085 | 12.707 | 12.494 |
| 8 | 2.488 | 0.5085 | 13.026 | 12.808 |
| 8 | 2.563 | 0.5085 | 13.419 | 13.195 |
| | | Promedio | 12.649 | 12.300 |
| | | S_{exp} | 0.768 | 0.715 |
| | | S²_{exp1} | 0.590 | 0.511 |

Factor de respuesta (Fr) = 0.191

Ecuación utilizada para cálculo de concentración en ppm: * Conc. = Área / Fr

Ecuación utilizada para el cálculo de conc. En mg / 100 g muestra
****C (mg /100 g muestra) = (conc en ppm) (0.005 L) (100 g /g mta utilizada)**

Anexo A8. Concentración de los extractos de vitamina E del día 01 al día 07

Prueba de hipótesis sobre las varianzas día 01 y día 17

| | |
|------------------------------------|--------|
| s^2_{exp1} | 0.5107 |
| s^2_{exp2} | 0.137 |
| n_1 | 15 |
| n_2 | 15 |
| G.L ₁ ($n_1 - 1$) [H] | 14 |
| G.L ₁ ($n_2 - 1$) [I] | 14 |
| F_{cal} | 3.74 |
| $F_{\alpha/2} (0.025, 14, 14)$ | 2.979 |

$$H_0 : s^2_{\text{exp1}} = s^2_{\text{exp2}}$$

$$H_1 = s^2_{\text{exp1}} \neq s^2_{\text{exp2}}$$

Criterio de rechazo de H_0

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

Conclusión: Se rechaza H_0 por lo tanto, las varianzas son diferentes

Prueba de hipótesis sobre las medias día 01 y día 17

| | |
|----------------------------|-----------|
| X_1 (prom) | 12.300 |
| X_2 (prom) | 12.225 |
| $X_1 - X_2$ [A] | 0.075 |
| s^2_1 / n_1 [B] | 0.034 |
| s^2_2 / n_2 [C] | 0.009 |
| (Raíz(B+C)) [D] | 0.208 |
| $t_{\text{cal}} = (A/D)$ | 0.362 |
| $(B+C)^2$ [E] | 0.002 |
| B^2/H [F] | 8.279E-05 |
| C^2/I [G] | 5.921E-06 |
| G.L (Φ) = E/F+G | 20.989 |
| $t_{\alpha/2} (0.025, 21)$ | 2.080 |

Prueba de hipótesis a las medias

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

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

Criterio de rechazo de H_0 : $t_{\text{cal}} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{\text{cal}} > t_{\alpha/2}$

Conclusión: Acepto H_0 ya que $t_{\text{cal}} < t_{\alpha/2}$, esto indica que las medias son iguales, por lo tanto los extractos, son estables por lo menos 07 días para su análisis

Anexo A9. Prueba de hipótesis para determinar la estabilidad de los extractos de vitamina E del día 01 al día 07

Día 01

| Muestra | Áreas | Peso de la mta (g) | *Conc. (ppm) | **Conc. (mg/100 g mta) |
|---------|-------|-------------------------------------|--------------|------------------------|
| 4 | 2.254 | 0.5102 | 11.801 | 11.565 |
| 4 | 2.312 | 0.5102 | 12.105 | 11.863 |
| 4 | 2.356 | 0.5102 | 12.335 | 12.088 |
| 5 | 2.4 | 0.5126 | 12.565 | 12.257 |
| 5 | 2.398 | 0.5126 | 12.555 | 12.246 |
| 5 | 2.392 | 0.5126 | 12.524 | 12.216 |
| 6 | 2.475 | 0.513 | 12.958 | 12.630 |
| 6 | 2.478 | 0.513 | 12.974 | 12.645 |
| 6 | 2.4 | 0.513 | 12.565 | 12.247 |
| 7 | 2.561 | 0.5264 | 13.408 | 12.736 |
| 7 | 2.488 | 0.5264 | 13.026 | 12.373 |
| 7 | 2.479 | 0.5264 | 12.979 | 12.328 |
| 8 | 2.233 | 0.5085 | 11.691 | 11.496 |
| 8 | 2.447 | 0.5085 | 12.812 | 12.597 |
| 8 | 2.347 | 0.5085 | 12.288 | 12.083 |
| | | Promedio | 12.572 | 12.225 |
| | | S_{exp} | 0.476 | 0.370 |
| | | S²_{exp1} | 0.226 | 0.137 |

DÍA 17

| Muestra | Áreas | Peso de la mta (g) | *Conc. (ppm) | **Conc. (mg/100 g mta) |
|---------|-------|-------------------------------------|--------------|------------------------|
| 4 | 2.374 | 0.5102 | 12.429 | 12.181 |
| 4 | 2.34 | 0.5102 | 12.251 | 12.006 |
| 4 | 2.32 | 0.5102 | 12.147 | 11.904 |
| 5 | 2.36 | 0.5126 | 12.356 | 12.052 |
| 5 | 2.229 | 0.5126 | 11.670 | 11.383 |
| 5 | 2.337 | 0.5126 | 12.236 | 11.935 |
| 6 | 2.401 | 0.513 | 12.571 | 12.252 |
| 6 | 2.435 | 0.513 | 12.749 | 12.426 |
| 6 | 2.451 | 0.513 | 12.832 | 12.507 |
| 7 | 2.337 | 0.5264 | 12.236 | 11.622 |
| 7 | 2.43 | 0.5264 | 12.723 | 12.084 |
| 7 | 2.451 | 0.5264 | 12.832 | 12.189 |
| 8 | 2.368 | 0.5085 | 12.398 | 12.191 |
| 8 | 2.42 | 0.5085 | 12.670 | 12.458 |
| 8 | 2.443 | 0.5085 | 12.791 | 12.577 |
| | | Promedio | 12.459 | 12.118 |
| | | S_{exp} | 0.325 | 0.326 |
| | | S²_{exp2} | 0.106 | 0.106 |

Factor de respuesta (Fr) = 0.191

Ecuación utilizada para cálculo de concentración en ppm:

$$*Conc. = \text{Área} / Fr$$

Ecuación utilizada para el cálculo de conc. En mg / 100 g muestra

$$**C \text{ (mg /100 g muestra)} = (\text{conc en ppm}) (0.005 \text{ L}) (100 \text{ g /g mta utilizada})$$

Anexo A10. Concentración de los extractos de vitamina E del día 01 al día 17

Prueba de hipótesis sobre las varianzas día 01 y día 17 Prueba de hipótesis sobre las medias día 01 y día 17

| | |
|-----------------------------|-------|
| s^2_{exp1} | 0.137 |
| s^2_{exp2} | 0.106 |
| n_1 | 15 |
| n_2 | 15 |
| $G.L_1(n_1 - 1)$ | 14 |
| $G.L_2(n_2 - 1)$ | 14 |
| F_{cal} | 1.285 |
| $F_{\alpha/2(0.025,14,14)}$ | 2.979 |

$$H_0 : s^2_{exp1} = s^2_{exp2}$$

$$H_1 = s^2_{exp1} \neq s^2_{exp2}$$

Criterio de rechazo de H_0 : $F_{cal} > F_{\alpha/2}$

**Conclusión: Acepto H_0 por lo tanto
las varianzas son iguales**

| | |
|---------------------------|--------|
| X_1 (prom) | 12.225 |
| X_2 (prom) | 12.118 |
| $X_1 - X_2$ [A] | 0.107 |
| $(n_1-1)*s^2_1$ [B] | 1.912 |
| $(n_2-1)*s^2_2$ [C] | 1.488 |
| $(A/ Raíz(B+C))$ [D] | 0.058 |
| $n_1 * n_2$ [E] | 225 |
| $(n_1 + n_2 - 2)$ [F] | 28 |
| $n_1 + n_2$ [G] | 30 |
| $Raíz((E*F)/G)$ [H] | 14.491 |
| $t_{cal} = (D*H)$ | 0.839 |
| $t_{\alpha/2(0.025, 28)}$ | 2.048 |

Prueba de hipótesis a las medias

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

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

Criterio de rechazo de H_0 : $t_{cal} < -t_{\alpha/2}$ ó $t_{cal} > t_{\alpha/2}$

**Conclusión: Acepto H_0 ya que $t_{cal} < t_{\alpha/2}$, esto indica que
las medias son iguales, por lo tanto los extractos,
son estables por lo menos 17 días para su análisis**

Anexo A11. Prueba de hipótesis para determinar la estabilidad de los extractos de vitamina E del día 01 al día 17

| Muestra | Areas | Conc. (ppm)* | Conc. (mg/100g muestra)** | % Recobro (mg/ 100 g muestra) |
|------------------|--------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 3.012 | 15.770 | 15.530 | 81.739 |
| | 2.9978 | 15.695 | 15.457 | 81.354 |
| | 2.7806 | 14.558 | 14.337 | 75.460 |
| 2 | 2.7538 | 14.418 | 13.792 | 72.588 |
| | 2.7254 | 14.269 | 13.649 | 71.839 |
| | 2.6127 | 13.679 | 13.085 | 68.868 |
| 3 | 3.1901 | 16.702 | 15.983 | 84.120 |
| | 2.9871 | 15.639 | 14.966 | 78.767 |
| | 3.0873 | 16.164 | 15.468 | 81.410 |
| 4 | 3.1306 | 16.391 | 15.434 | 81.230 |
| | 3.2802 | 17.174 | 16.171 | 85.112 |
| | 3.0249 | 15.837 | 14.913 | 78.487 |
| Promedio | 2.965 | 15.525 | 14.899 | 78.415 |
| Desv.Est. | 0.204 | 1.071 | 0.978 | 5.145 |
| C.V. | 6.896 | 6.896 | 6.561 | 6.561 |

*C (ppm) = A / Fr ; donde el Fr = 0.191

**C = (conc en ppm) (0.005 L) (100 g / g muestra)

% Recobro = (mg vit. Obt * 100)/ 19 mg teó vit E)

Anexo A12. Resultados de la prueba de recobro con la muestra marca Borges

| Muestra | Áreas | *Conc (ppm) | **Conc (mg /100 g muestra) | % de recobro (mg/ 100g) |
|-------------------|--------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 3.390 | 17.748 | 17.062 | 98.444 |
| | 3.342 | 17.499 | 16.823 | 97.064 |
| | 3.287 | 17.207 | 16.542 | 95.441 |
| 2 | 2.434 | 12.744 | 12.397 | 71.526 |
| | 2.402 | 12.578 | 12.235 | 70.594 |
| | 2.447 | 12.809 | 12.461 | 71.893 |
| 3 | 2.924 | 15.308 | 15.088 | 87.053 |
| | 2.893 | 15.148 | 14.930 | 86.142 |
| | 2.971 | 15.553 | 15.330 | 88.447 |
| 4 | 3.333 | 17.450 | 15.410 | 88.908 |
| | 3.185 | 16.675 | 14.726 | 84.963 |
| | 3.123 | 16.352 | 14.440 | 83.317 |
| Promedio | 2.978 | 15.589 | 14.787 | 85.316 |
| Desv. Est. | 0.370 | 1.938 | 1.678 | 9.679 |
| C. V. | 12.432 | 12.432 | 11.345 | 11.345 |

*C (ppm) = A / Fr ; donde el Fr = 0.194

**C = (conc en ppm) (0.005 L) (100 g / g muestra)

% Recobro = (mg vit. Obt * 100)/ 20 mg teó vit E)

Anexo A13. Resultados de la prueba de recobro con la muestra marca Ybarra