

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



TRABAJO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA
DETERMINACIÓN DE VITAMINA A EN ACEITES VEGETALES
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA HPLC**

POR: GILDA LINA CRUZ OCHOA

TUTORES: M. Sc. JUAN ANTONIO ALVARADO K.

M. Sc. MARCO QUINO HUASCO

LA PAZ – BOLIVIA

Febrero, 2022

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a la institución de IBMETRO, por haberme abierto las puertas, y brindado el apoyo durante el tiempo que realicé mis prácticas profesionales. A los profesionales que integran el equipo de trabajo en la institución de IBMETRO, por compartir sus conocimientos y experiencias, en especial agradecer al M. Sc. Marco Quino Huasco director de Metrología Industrial y Científica y a todo el equipo del Laboratorio de Calibraciones Químicas y Materiales de Referencia, en el área de Metrología Química, por sus valiosas colaboraciones, sugerencias y orientaciones brindadas.

A mi segundo hogar la Universidad Mayor de San Andrés y a la Carrera de Ciencias Químicas por cobijarme en sus aulas y laboratorios. Al Ph.D. Oswaldo Ramos Ramos docente de la materia de Prácticas Profesionales y a todo el plantel docente, quienes con sus enseñanzas y su vasta experiencia y dedicación me transfirieron sus conocimientos científicos, para mi formación profesional. A mis tutores M.Sc. Juan A. Alvarado K. y M. Sc. Marco Quino Huasco quienes por su comprensión y orientación me guiaron y apoyaron continuamente para poder desarrollar el presente proyecto de igual manera a mi tribunal Ph.D. Sulema Nieves Valdez Castro, de quien he recibido sugerencias constructivas, que me ayudaron a mejorar y desarrollar este proyecto.

A mis padres Filomena Ochoa y José Cruz, por siempre apoyarme en mis estudios, a mis hermanos Jhoselyn, Juan y Orlando, por siempre apoyarme moralmente en esta etapa de mi vida y a mi pareja Jenry Sirpa Poma por siempre brindarme su apoyo en todo momento y guiarme con todos sus conocimientos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
CAPITULO I	2
1. Introducción	2
1.1. Problemática	4
1.2. Hipótesis	5
1.3. Justificación	5
1.4. Antecedentes	6
CAPÍTULO II	10
2. Objetivos	10
1.1 Objetivo General	10
1.2 Objetivos Específicos	10
CAPÍTULO III	11
3. Marco Teórico	11
3.1. Vitaminas	11
3.1.1. Vitaminas liposolubles.	11
3.1.2. Vitamina A	12
3.2. Acción biológica de la vitamina A	14
3.3. Características de los aceites de soya y girasol	15

3.4.	Otros factores de calidad y composición	17
3.4.1.	Características de calidad	17
3.4.2.	Características químicas y físicas	17
3.5.	Análisis de vitamina A en alimentos	18
3.6.	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	18
3.6.1.	Principios de HPLC.....	18
3.6.2.	El cromatógrafo de HPLC	20
3.6.3.	La línea fluídica.....	21
3.6.3.1.	Reservorios de fase móvil	23
3.6.4.	Sistemas de bombeos y gradientes	24
3.6.5.	Inyectores y autoinyectores	25
3.6.5.1.	Inyectores manuales	25
3.6.6.	Columnas y precolumnas	26
3.6.6.1.	La columna cromatográfica.....	26
3.6.6.2.	Protocolos de chequeo, limpieza y regeneración de columnas	27
3.6.6.3.	Precolumnas	28
3.6.6.4.	Verificación de columnas	29
3.6.6.5.	Equilibrado y acondicionamiento de columnas.....	29
3.6.6.6.	Limpieza y regeneración de columnas	30

3.6.6.7. Detectores de HPLC	30
3.7. Detectores diode array (arreglo de diodos).....	33
3.8. Validación.....	37
3.8.1. Parámetros para la validación o parámetros de desempeño	39
3.8.1.1. Selectividad	39
3.8.1.2. Límite de detección	39
3.8.1.3. Precisión	40
3.8.1.4. Linealidad y rango de trabajo	40
3.8.1.5. Exactitud.....	41
3.8.1.6. Incertidumbre	41
CAPÍTULO IV.....	43
4. Metodología Experimental.....	43
4.1. Identificación del analito	43
4.2. Alcance	43
4.3. Condiciones ambientales	43
4.4. Calibración de equipos y materiales.....	43
4.5. Muestra	44
4.6. Desarrollo del método	44
4.6.1. Materiales, equipos y reactivos para la extracción de vitamina A en aceite vegetal comestible.....	44

4.6.1.1.	Materiales y equipos.....	44
4.6.1.2.	Reactivos	45
4.6.1.3.	Preparación de reactivos.....	45
4.6.2.	Procedimiento de extracción de la vitamina A.....	45
4.6.2.1.	Saponificación.....	46
4.6.2.2.	Extracción con hexano	46
4.6.3.	Elaboración de la curva estándar patrón de vitamina A.....	47
4.6.4.	Determinación de la longitud de onda de máxima absorción	48
4.6.5.	Configuración de parámetros para la cuantificación de vitamina A por HPLC-DAD	48
4.6.6.	Validación del método desarrollado.....	49
4.6.6.1.	Precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia.....	50
4.6.6.2.	Sesgo	56
4.6.6.3.	Rango de trabajo.....	58
4.6.6.4.	Linealidad.....	60
4.6.6.5.	Límite de detección y límite de cuantificación	62
4.6.6.6.	Robustez (ASTM E 1169).....	64
4.6.6.7.	Incertidumbre de medición (ISO 21748).....	66
CAPÍTULO V.....		69
5.	Resultados y Discusión.....	69

5.1.	Determinación de longitud de onda de máxima absorción.....	69
5.2.	Configuración de parámetros para la cuantificación de vitamina A por HPLC-DAD70	
5.3.	Elaboración de la curva estándar patrón de vitamina A	71
5.4.	Validación del método.....	73
5.4.1.	Precisión	73
5.4.2.	Sesgo	74
5.4.3.	Rango de trabajo.....	75
5.4.4.	Linealidad.....	77
5.4.5.	Límites de detección y cuantificación	80
5.4.6.	Robustez	80
5.4.7.	Incertidumbre de medición.....	82
5.5.	Cuantificación de vitamina A por HPLC en muestras de aceites vegetales	84
CAPÍTULO VI.....		86
6.	Conclusiones.....	86
7.	Recomendaciones	89
8.	Bibliografía	90
9.	Anexos	94

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Acción biológica de la vitamina A. Ciclo de síntesis de la rodopsina.....	15
Figura 2 Conversión de 11-cis-retinal a trans-retinal por acción de la luz	15
Figura 3 Los cinco módulos ineludibles de cromatógrafo de HPLC: bomba, inyector, columna, detector y sistema de recogida de datos.	21
Figura 4 Las conexiones de HPLC deben cumplir dos condiciones: mínimo volumen muerto y alta presión. Izquierda: el comienzo del tubo ha quedado lejos de su asiento y ese volumen muerto hará perder eficiencia.....	21
Figura 5 Conexiones de HPLC: a la izquierda, el conjunto tubo-cono-tuerca debe penetrar hasta una profundidad dada; en el centro, cuatro tipos de conos; a la derecha, conector de volumen muerto cero.	22
Figura 6 Izquierda: tubos de HPLC de 1/16”de diámetro externo con distinto diámetro interno. Derecha: cortatubos.	23
Figura 7 Inyector, bucles de inyector, estator y rotor seals.....	25
Figura 8 Inyectores automáticos (imágenes cortesía de Agilent Technologies y Perkin-Elmer).	26
Figura 9 La columna cromatográfica rellena de micropartículas.....	27
Figura 10 Columnas de HPLC (imagen cortesía de Agilent Technologies).....	27
Figura 11 Emplazamiento de precolumnas: arriba, ubicación clásica, precediendo a la columna; centro, previa al inyector, captura componentes de fase móvil que podrían perjudicar las muestras; abajo, antes del detector.....	28
Figura 12 Detector diode array (imagen cortesía de Agilent Technologies). A la derecha, con sus lámparas y celda desmontadas.	33

Figura 13 Esquema óptico de un detector diode array	34
Figura 14 Las curvas de pureza a lo largo de un pico estiman el “índice de similitud”, cociente del espectro durante el tiempo de retención del pico dividido por el espectro tomado en su ápice. El valle que muestran ambos gráficos denota la existencia de una impureza	35
Figura 15 Detector diode array	36
Figura 16 Espectro obtenido con un detector diode array: de arriba abajo, el espectro, su primera derivada y su segunda derivada	36
Figura 17 Importancia del ancho de rendija de entrada al policromador: arriba, rendijas anchas originan espectros de baja resolución y cromatogramas poco ruidosos; abajo, rendijas estrechas originan espectros de alta resolución y cromatogramas más ruidosos.....	37
Figura 18 Longitud de onda de máxima absorbancia para la vitamina A.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Estabilidad de algunos nutrimentos	12
Tabla 2 Características generales de la vitamina A	13
Tabla 3 Gamas de composición de ácidos grasos de aceites vegetales determinados mediante CGL de muestras auténticas (expresadas en porcentaje del contenido total de ácidos grasos).....	16
Tabla 4 Características de los aceites.....	17
Tabla 5 Características químicas y físicas de aceites vegetales crudo.....	17
Tabla 6 Nombres y definiciones de técnicas de HPLC.....	19
Tabla 7 Materiales de los tubos de HPLC.....	23
Tabla 8 Tipos de bombas de líquidos.....	24
Tabla 9 Solventes en los que se guardan las columnas.....	29
Tabla 10 Detectores de HPLC y Mínima Cantidad Detectable (MCD).....	31
Tabla 11 Parámetros y configuraciones iniciales para el equipo HPLC-DAD.....	48
Tabla 12 Definición de parámetros de desempeño	49
Tabla 13 Diseño experimental para la robustez	65
Tabla 14 Factores experimentales.....	65
Tabla 15 Parámetros y configuraciones experimentales en el equipo HPLC	70
Tabla 16 Parámetros instrumentales configurados en el equipo de HPLC.....	71
Tabla 17 Datos promedios para la curva estándar patrón	72

Tabla 18 Datos obtenidos para la repetibilidad.....	73
Tabla 19 Determinación de la desviación estándar de la repetibilidad.....	73
Tabla 20 Datos obtenidos para la precisión intermedia	74
Tabla 21 Determinación de la desviación estándar de precisión intermedia	74
Tabla 22 Datos obtenidos para el sesgo	75
Tabla 23 Determinación del sesgo	75
Tabla 24 Datos obtenidos para la linealidad y rango de trabajo	76
Tabla 25 Estadísticas de regresión (polinomio de 1er grado).....	77
Tabla 26 Análisis de varianza	78
Tabla 27 Análisis de varianza (continuación).....	78
Tabla 28 Evaluación de significancia	78
Tabla 29 Análisis del cumplimiento del criterio de validación.....	79
Tabla 30 Datos obtenidos para el límite de detección y límite de cuantificación.....	80
Tabla 31 Datos obtenidos para la robustez	81
Tabla 32 Evaluación de los efectos	81
Tabla 33 Contribución de las incertidumbres típicas	83

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Espectrofotómetro UV-VIS	94
Anexo 2 Cromatógrafo de HPLC.....	94
Anexo 3 pH-metro y soluciones buffer	95
Anexo 4 Balanza analítica.....	95
Anexo 5 Planificación de validación del método.....	103

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Curva estándar patrón de vitamina A.....	72
Gráfica 2 Gráfica de Youden para las recuperaciones del rango de trabajo	77
Gráfica 3 Zona de detección y cuantificación.....	80
Gráfica 4 Comportamiento de la significancia de los efectos de los factores estudiados.	82
Gráfica 5 Contribución de las fuentes de incertidumbre.....	84
Gráfica 6 Cromatograma de vitamina A.....	84

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar un método analítico para la determinación de la vitamina A en aceites comestibles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) desarrollado en el Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO. Para el proceso de validación del método, se desarrolló el análisis de los siguientes parámetros de desempeño: precisión (en términos de repetibilidad ($S_r = 0,0393$) y precisión intermedia ($S_w = 0,2029$)), sesgo ($\overline{\%b} = -0,17$), linealidad (para el que se cumplió que el sesgo o desvío de linealidad \leq Error permitido), rango de trabajo (1 UI/g a 20 UI/g), límite de detección (LD = 0,0105 UI/g), límite de cuantificación (LC = 0,0210 UI/g), robustez (para el cual se cumplió la condición $t_m \leq t_{cri}$) e incertidumbre de la medición ($U_R = 0,7057 \%$), para el cual se identificó las fuentes posibles de incertidumbre, las cuales estaban relacionadas con algunos de los parámetros de desempeño mencionados previamente, estos fueron: repetibilidad, reproducibilidad intermedia, sesgo y otras fuentes del laboratorio que está relacionado a la vez con el proceso de medición. El método desarrollado para la cuantificación de vitamina A por HPLC fue óptimo en términos del parámetro de desempeño del sesgo, haciendo una comparación entre los datos teóricos y los resultados experimentales de un aceite con contenido de vitamina A conocido. Al analizar los extractos de las muestras de aceite vegetal de soya y mezcla de soya-girasol, se reportaron los valores junto con la incertidumbre de medición calculada, obteniéndose un valor de $62,34 \pm 1,13$ para el aceite de soya, y un valor de $64,24 \pm 1,10$, para un factor de cobertura de $k = 2,23$. Para el aceite de mezcla soya-girasol. Según la Norma Boliviana para los aceites comestibles de soya y mezcla de soya-girasol NB 161:2016 y NB 685:2016 respectivamente, el contenido de vitamina A debe encontrarse en un rango de 60 a 65 [UI/g], los resultados obtenidos nos indican que tanto el aceite de soya como el aceite de mezcla soya-girasol, están dentro de los límites establecidos según las Normas Bolivianas mencionadas.

Palabras clave: validación, HPLC, cuantificación de vitamina A.

CAPITULO I

1. Introducción

Actualmente, el análisis de alimentos en el campo de la investigación química es muy importante, debido a la necesidad del conocimiento sobre las propiedades y beneficios de los productos alimenticios, además de que estos sean seguros y saludables. Aunque inicialmente hubo mayor interés en el análisis de la presencia de aditivos, toxinas, contaminantes o residuos en los alimentos, los estudios están siendo encaminados al análisis de la composición de los constituyentes elementales de los alimentos, como azúcares, lípidos, vitaminas, entre otros, debido a la importancia que tienen en la nutrición. Por ello, determinar el contenido de vitaminas no sólo es de importancia para el control de calidad empresarial, sino también para los consumidores, quienes adoptan una postura más exigente respecto a los beneficios de los alimentos que consumen.

Esta necesidad de los consumidores por mejorar su alimentación y conocer los nutrientes que tienen los alimentos que se consumen, conduce a la búsqueda de técnicas analíticas más precisas y eficientes para cuantificar estos nutrientes, entre ellos vitaminas.

Las vitaminas son un grupo de sustancias orgánicas, caracterizadas por ser moléculas grandes con grupos alifáticos lineales o cíclicos en algunos casos aromáticos. Son compuestos heterogéneos imprescindibles para la vida, que al ingerirlos de forma equilibrada y en dosis esenciales promueven el correcto funcionamiento metabólico. Se dividen en dos grupos, vitaminas liposolubles y vitaminas hidrosolubles.

Hoy en día, el análisis de vitaminas en alimentos se convirtió en un estudio rutinario usando diferentes ensayos como colorimetría, fluorimetría, ensayos biológicos, ensayo inmunoenzimático, voltamperometría, potenciometría, cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con diferentes sistemas de detección. Desde mediados de los años 70 el método escogido para el análisis de

vitaminas en alimentos es HPLC (Palacios Sánchez, 2013), debido a que esta técnica no necesita derivatización de la muestra, no es una técnica destructiva y la detección es selectiva. Considerando que la vitamina A es sensible a la luz y el oxígeno, el tiempo es vital para su análisis, entonces el método de HPLC presenta ventajas al momento de agilizar el proceso de análisis gracias a su módulo de inyección automático, también cuenta con la ventaja de tener un módulo de bomba cuaternaria con lo cual se evita la necesidad de tener que cambiar o preparar disolventes además de que se puede incluir gradientes, ahorrándonos tiempo, haciendo que la vitamina se mantenga tan estable como sea posible.

En los últimos años se han desarrollado diversas formas de emplear la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para el análisis de vitaminas en alimentos, pero se hace necesario que cada laboratorio busque mejorar las condiciones de estos análisis, además, de lograr buenos resultados con los equipos y materiales con los que cuentan. El interés por mejorar estos análisis y además validar los métodos que se lleven a cabo es asegurar que se produzcan resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto.

Entre los muchos requisitos que deben cumplir los aceites vegetales comestibles en Bolivia, se encuentra el contenido de vitamina A, que gracias al Decreto Supremo N° 28094, de 27 de abril de 2005, es que se dio inicio al proceso de fortificación de los aceites vegetales comestibles con vitamina A, y según la Norma Boliviana NB 161:2016, se tiene los requisitos que debe cumplir el aceite comestible de soya en cuanto a su contenido de vitamina A se refiere, y según la Norma Boliviana NB 685:2016, se establece los requisitos que debe cumplir el aceite comestible de mezcla de soya y girasol en cuanto al contenido de vitamina A, y en ambos casos se indica que el rango en contenido de vitamina A debe encontrarse entre 6000 a 6500 [UI/100 g].

Existen normas bolivianas para la cuantificación de vitamina A por HPLC, estas son las normas bolivianas NB 34044:2005 Aceites y grasas - Determinación de vitamina A en aceites comestibles y alimentos - Método por cromatografía líquida de alta

resolución, que establece el método para determinar vitamina A y se aplica en aceites comestibles y alimentos. Y la NB 34045:2005 Aceites y grasas - Determinación de vitamina A como retinol en aceites y grasas comestibles por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), que establece el método para determinar el contenido de vitamina A como retinol; pero estas no se pueden implementar en el IBMETRO por no contar con los reactivos óxido de aluminio, hidróxido de potasio y el antioxidante BHT (butilhidroxitolueno) según el método de la norma NB 34045:2005, y según los resultados de los ensayos previos, los solventes de extracción: hexano y éter, utilizados según el método de la norma NB 34044:2004 no generan buenos rendimientos de extracción, ello hace necesario desarrollar un método con base a los métodos descritos en las normas mencionadas.

Este trabajo se realiza en el Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO desarrollando un método analítico para la determinación y cuantificación de vitamina A en aceites comestibles que son, aceite comestible de soya y aceite comestible de mezcla de soya y girasol, utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector de arreglo de diodos. Esto debido a la misión del IBMETRO de prestar el servicio a sectores agroindustriales de la región, los cuales requieren que estos análisis sean realizados con un alto grado de confiabilidad y precisión, pues esta información es presentada a las entidades reguladoras y a los consumidores en las etiquetas de los productos.

1.1. Problemática

El Instituto Boliviano de Metrología requiere implementar un método cuantitativo para la determinación de la vitamina A por cromatografía líquida de alta eficiencia - HPLC en aceites comestibles de soya y mezcla de soya con girasol, y hacer la respectiva validación del método de determinación de vitamina A, ya que según la Norma Boliviana para los aceites comestibles de soya y mezcla de soya con girasol NB 161:2016 y NB 685:2016 respectivamente, el contenido de vitamina A debe encontrarse en un rango de 6000 a 6500 [UI/100 g] y para comprobar que los aceites vegetales de

soya y mezcla de soya con girasol cumplan con las normas establecidas. Por lo que se ve indispensable el desarrollo, validación e implementación de este método.

En este sentido ¿Se podrá desarrollar y validar el método de cuantificación de vitamina A en aceites comestibles por HPLC para así poder brindar este servicio de análisis en el IBMETRO a las empresas o entidades que así lo requieran, cumpliendo así con la normativa correspondiente?

1.2.Hipótesis

Se desarrolla y valida un método para cuantificar vitamina A por HPLC verificando que el contenido de esta vitamina para los aceites de soya y mezcla de soya con girasol cumple con las Normas Bolivianas NB 161:2016 y NB 685:2016 respectivamente, estableciendo el contenido de vitamina A entre 6000 a 6500 UI/100g.

1.3.Justificación

Los aceites vegetales comestibles, son de los alimentos más consumidos por la mayor parte de la población, según el Ministerio de Desarrollo Productivo y Economía Plural (2020), para el periodo 2014-2018 se tuvo una tasa de crecimiento de la venta de aceite comestible del 64 % para el aceite de girasol, 52 % para el aceite de oliva y 23 % para el aceite de soya. Es por ello que, para contar con un producto de aceite vegetal de calidad (con el contenido de vitamina A dentro de un rango aceptable [6000 a 6500 UI/100g] según Normas Bolivianas NB 161:2016 y NB 685:2016) es fundamental contar con un método de cuantificación adecuado y preciso para la vitamina A presente en el producto, para que cumpla con los estándares de calidad.

Por todo lo mencionado, el presente trabajo, pretende brindar un método de análisis de vitamina A en aceites vegetales comestibles para así fortalecer, mejorar y complementar los servicios que ofrece IBMETRO, contribuyendo a un adecuado control de calidad de la producción nacional.

1.4. Antecedentes

En el trabajo de Pérez Calderón, se buscó controlar la calidad de alimentos infantiles instantáneos, realizando para ello la validación de la metodología para la determinación de la vitamina A por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Para la precisión del sistema se evaluaron tres parámetros: tiempo de retención, área y altura, hallándose una desviación estándar relativa (RSD) máxima de 1,78%. En la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación $r=0,99$ y una precisión con un RSD de 2,70%. La exactitud del método se evaluó en términos de recuperación mediante la adición de vitamina A al alimento obteniéndose un porcentaje de recuperación de 97,98%; y para la sensibilidad del método se obtuvo un límite de detección (LOD) de 0,06 mg/g y un límite de cuantificación (LOQ) de 0,58 mg/g. Con los resultados obtenidos se demostró que el método en estudio es preciso, exacto, lineal y altamente sensible para ser utilizado en el control de calidad de alimentos infantiles instantáneos para la determinación de vitamina A (Pérez Calderón, 2000).

En el trabajo de Sierra y otros, se presentó resultados del desarrollo y de la validación de una metodología analítica para la cuantificación simultánea de vitamina A palmitato, vitamina D₃ y vitamina E acetato en inyectables de uso pecuario. El procedimiento consistió en una separación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en fase inversa empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo, metanol, agua (45:50:2.5), una columna C18 a 45 °C y detección a una longitud de onda de 280 nm. Se encontró que el método es selectivo, lineal y preciso. Estas características junto con su sencillez hacen que el método sea adecuado y conveniente para el objetivo propuesto. La robustez de la metodología fue también investigada. El método validado se aplicó para la determinación de las vitaminas en tres productos inyectables del mercado colombiano con registro sanitario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (Sierra y otros, 2007).

En el trabajo de López Casanova, se desarrolló y validó una metodología para la determinación simultánea de vitaminas liposolubles (A, D y E) mediante cromatografía

líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detector de arreglo de diodos (DAD) en muestras biológicas (polen y pan de abeja de origen multifloral), utilizando distintos parámetros analíticos tales como límite de decisión ($Cc\alpha$), capacidad de detección ($Cc\beta$), exactitud y precisión. La validación del método cromatográfico, mostró un límite de decisión ($Cc\alpha$) para vitamina A de 0,4 $\mu\text{g/g}$ e igual cantidad para vitamina D_2 y para vitamina E fue de 0,8 $\mu\text{g/g}$, mientras que la capacidad de detección ($Cc\beta$) fue de 1,8 $\mu\text{g/g}$ para vitamina A, de 0,6 $\mu\text{g/g}$ para vitamina D_2 y de 7,0 $\mu\text{g/g}$ para vitamina E. Se obtuvo una precisión de 3,2% para vitamina A, 2,3% para vitamina D_2 y 2,8% para vitamina E. En tanto que la exactitud presentó valores de recuperación correspondientes a 111,6% para vitamina A, 125,0% para vitamina D_2 y 106,3% para vitamina E resultando por tanto ser un método exacto y preciso (López Casanova, 2013).

El objetivo del trabajo de Araujo y otros fue validar un método para la determinación de vitamina A en leche en polvo. Se utilizaron tres marcas de leche en polvo de distribución masiva en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia. En el proceso de extracción se fijó el tiempo de calentamiento de la muestra en 40 min. El contenido de vitamina A, se determinó utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con una columna C18 y un detector de UV-visible. La longitud de onda se fijó en 300 nm y el flujo de la fase móvil en 1,2 mL/min. Para la evaluación estadística de los resultados se utilizó el programa SPSS versión 20.0. La selectividad del método se verificó empleando pruebas de degradación artificial (termólisis, oxidación y fotólisis) que permitieron observar los productos de degradación de la vitamina A en los cromatogramas. Se prepararon ocho estándares de vitamina A, para elaborar una curva de calibración que arrojó un coeficiente de correlación de 0,991. Para la repetibilidad del método se obtuvo una Desviación Estándar Relativa (RSD) de 1,37% y para la reproducibilidad una RSD de 1,33%. Se obtuvo un límite de detección (LOD) de 2,12 ppm y un límite de cuantificación (LOQ) de 5,54 ppm. El tiempo de retención de la vitamina A fue de $2,4 \pm 0,15$ min. El método estudiado resultó ser preciso, selectivo y exacto. Se encontró que el contenido de vitamina A de las tres marcas de leche estudiadas

está por debajo del valor establecido por la Norma Venezolana COVENIN 1481:2001 (Araujo, y otros, 2013).

Otro trabajo que se enfocó en el análisis de vitaminas liposolubles A, E, y también en vitamina hidrosoluble C por HPLC, fue el de Sánchez Reyes, en el cual se desarrolló un método analítico para la determinación y cuantificación de vitamina C en jugos y productos néctar, además se confirmó un método para el análisis de vitaminas liposolubles A y E en productos lácteos. Se determinaron las figuras analíticas de mérito para confirmar que los resultados obtenidos por estas técnicas fueran válidos, coherentes y confiables para las entidades reguladoras y los clientes. Además, se confirmó el empleo de estos métodos para el análisis de muestras comerciales, confirmando que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos y los reportados por el comerciante. Para la validación del método, la linealidad se evaluó con los datos obtenidos de la curva de calibración donde se observaron $R^2 > 0,999$, límites de detección y cuantificación en el intervalo de 0,06-1,79 ppm y 0,19-5,96 ppm respectivamente. La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia de los tiempos de retención y las áreas, obteniendo porcentajes de CV $< 5\%$. La exactitud del método de vitamina C se determinó analizando un material de referencia certificado y se comprobó la veracidad de los resultados utilizando una prueba estadística t student, por último, para el método de vitaminas liposolubles la exactitud se evaluó como porcentaje de recuperación obteniendo porcentajes en un intervalo de 86-108% (Sánchez Reyes, 2016).

En el trabajo de Martínez Rojano y otros, se tuvo como objetivo el reportar la utilidad de un método simplificado con extracción directa de la leche materna y detección por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, para la cuantificación de retinol y α -tocoferol. Posterior a la extracción de la leche materna, las muestras se saponificaron con hidróxido de potasio-metanol, se extrajeron con éter de petróleo y se secaron y reconstituyeron con etanol. Para establecer las condiciones del sistema cromatográfico se utilizaron columnas microbondapack con detector UV/visible: fase móvil metanol-agua (96:4 v/v), longitud de onda 325 nm para retinol y 290 nm para α -tocoferol. Los parámetros analíticos fueron linealidad: $r^2 = 0,9955$ (retinol), $r^2 = 0,9808$

(α -tocoferol); límites de detección y de cuantificación: 1,1 y 2,7 $\mu\text{g/dL}$ (retinol), 0,9 y 2,3 $\mu\text{g/dL}$ (α -tocoferol); precisión del método: desviación estándar relativa 4,5% intradía y 4,8% entre días (retinol) y 4,9% intradía y 4,1% entre días (α -tocoferol); exactitud: recuperación = $85,8 \pm 7,8\%$ para retinol y $98 \pm 1,9\%$ para el α -tocoferol. El método permitió cuantificar la concentración de retinol y α -tocoferol eficientemente. Una vez validado el método, se aplicó para la cuantificación de retinol y α -tocoferol en 100 muestras de leche materna. Los valores fueron para retinol $63,9 \pm 5,2$ y para α -tocoferol $359 \pm 115 \mu\text{g/dL}$. El método fue selectivo, lineal, preciso, sensible y exacto, características que junto con su sencillez hacen de él un método conveniente para la determinación de retinol y α -tocoferol simultáneamente en leche materna (Martínez Rojano, y otros, 2016).



CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de la vitamina A en aceites comestibles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en el Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO).

1.2 Objetivos Específicos

- Desarrollar un método de análisis por HPLC para la determinación y cuantificación de vitamina A en aceites vegetales comestibles.
- Validar el método desarrollado para la determinación y cuantificación de vitamina A en aceites vegetales comestibles.
- Evaluar los parámetros de desempeño: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, repetibilidad, precisión intermedia, sesgo y robustez.

CAPÍTULO III

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Vitaminas

Las vitaminas son un grupo de sustancias orgánicas de variada estructura y baja masa molecular, sin valor energético propio, que actúan como catalizadores y son requeridas en pequeñas cantidades por el organismo humano para su normal funcionamiento y como este sólo sintetiza algunas vitaminas, estas deben ser ingeridas en la dieta diaria o en suplementos multivitamínicos (Sánchez Reyes, 2016; Bravo Bravo, 2013). Son requeridos por los seres vivos en pequeñas cantidades y contribuyen al completo desarrollo de las funciones metabólicas en los organismos vivos (Sierra y otros, 2007). Se conocen 13 vitaminas esenciales en la nutrición humana y son clasificadas en dos grupos de acuerdo a su solubilidad, las vitaminas liposolubles que están representadas por las vitaminas A, D, E y K y las vitaminas hidrosolubles que comprenden la vitamina C y el grupo de las vitaminas B (Sánchez Reyes, 2016).

3.1.1. Vitaminas liposolubles.

Las vitaminas de este grupo (A, D, E y K) son solubles en disolventes orgánicos y en aceites (Badui Dergal, 2006; López Casanova, 2013), se almacenan en tejidos adiposos del cuerpo y en el hígado, por lo que no es necesario consumir diariamente alimentos ricos en estas vitaminas (Sánchez Reyes, 2016). Sus estructuras contienen enlaces dobles que las hacen sensibles a las reacciones de oxidación; las vitaminas A y E son las más propensas al deterioro oxidativo.

La composición química de los alimentos puede influir fuertemente en la estabilidad de las vitaminas. Los agentes oxidantes influyen directamente en la degradación del ácido ascórbico, vitamina A, E y carotenoides, pudiendo afectar indirectamente a la degradación de otras vitaminas. Su importancia se debe a la concentración del agente oxidante y el potencial de oxidación. A diferencia de los agentes

reductores, como el ácido ascórbico e isoascórbico que proporcionan una mayor estabilidad a las vitaminas oxidables, debido a su acción reductora y como secuestradores de oxígeno y radicales libres. Debido a la posible isomerización de estos nutrientes durante su análisis, existen factores que conllevan a la pérdida parcial o total de las vitaminas, en valores extremos de pH, altas temperaturas y alto poder rédox, los que deben ser considerados durante el desarrollo del método analítico (López Casanova, 2013).

A modo de resumen, en la Tabla 1 se presentan los factores que influyen en la estabilidad de las vitaminas, tales como: pH, oxígeno, luz y calor (Badui Dergal, 2006).

Tabla 1 Estabilidad de algunos nutrimentos

Nutrimentos	Neutro pH=7	Ácido pH<7	Alcalino pH>7	Oxígeno o aire	Luz	Calor	Pérdidas máximas en el cocimiento (%)
Vitamina A	E	I	E	I	I	I	40
Ác. ascórbico	I	E	I	I	I	I	100
Biotina	E	E	E	E	E	I	60
Caroteno	E	I	E	I	I	I	30
Colina	E	E	E	I	E	E	5
Cobalamina	E	E	E	I	I	E	10
Vitamina D	E	-	I	I	I	I	40
Ácido fólico	I	I	E	I	I	I	100
Inositol	E	E	E	E	E	I	95
Vitamina K	E	I	I	E	I	E	5
Niacina	E	E	E	E	E	E	75
Ác. pantoténico	E	I	I	E	E	I	50
Ác. p-amino benzoico	E	E	E	I	E	E	5
Piridoxina (B6)	E	E	E	E	I	I	40
Riboflavina (B2)	E	E	I	E	I	I	75
Tiamina (B1)	I	E	I	I	E	I	80
Tocoferoles	E	E	E	I	I	I	55

I = Inestable; E = Estable

Fuente: (Badui Dergal, 2006)

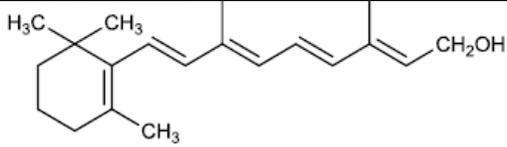
3.1.2. Vitamina A

La vitamina A se utiliza como un nombre genérico para describir al retinol, sus ésteres y los correspondientes isómeros (Bravo Bravo, 2013). La vitamina A pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles y es esencial para el organismo, ya que ayuda a la formación y mantenimiento de la piel, tejidos blandos y óseos, dientes, membranas mucosas de nariz, garganta y pulmones (Araujo, y otros, 2013). Es un alcohol primario

poliénico isoprenoide con 5 enlaces dobles conjugados. Para la actividad biológica es esencial la existencia de un anillo de 6 carbonos (ciclo-hexano), pero la introducción de ciertas modificaciones en el anillo producirá disminución en la actividad biológica. Esta vitamina se encuentra presente solo en alimentos de origen animal, aunque en los vegetales se encuentra en forma de β -caroteno (Sánchez Reyes, 2016). Evidencias epidemiológicas indican que la administración de altas cantidades de carotenos, presentes en vegetales verdes y amarillos, contribuye a reducir el riesgo de varios tipos de cáncer. Esto ha planteado la posibilidad de usar los β -carotenos y sus isómeros para prevenir el cáncer, además de su posible utilización en la prevención de enfermedades crónicas y deficiencias de vitamina A, ya sea como suplemento puro o en los alimentos de la dieta (M. Baracaldo & Castro de Navarro, 1998).

La vitamina A es relativamente estable al calor y la luz, pero se destruye por oxidación. Por esto la cantidad de vitamina A presente en los alimentos depende del tiempo que dure el almacenado y de la forma de conservación. En la Tabla 2, se presenta la estructura, función, algunas propiedades fisicoquímicas y las fuentes primarias de esta vitamina (Sánchez Reyes, 2016).

Tabla 2 Características generales de la vitamina A

Vitamina A (retinol) C₂₀H₃₀O	Nombre IUPAC: 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil) -nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol.
Fuentes	Productos animales: Leche, crema, mantequilla, queso, huevos, carne, hígado, aceite de hígado de bacalao. Productos de origen vegetal: espinacas, zanahoria, espárragos, calabaza y en frutas como la naranja, el mango y el melón.
Estructura	
Función	Promueve el crecimiento, la reproducción, el desarrollo fetal. Es de gran importancia su presencia en el ciclo visual, protege la piel y participa en la elaboración de enzimas en el hígado y de hormonas sexuales y suprarrenales.
Propiedades fisicoquímicas	Punto ebullición: 122,5°C, punto de fusión: 63°C, Color: amarillo, soluble en: metanol, acetona y cloroformo.
Fuente:	(Sánchez Reyes, 2016 y Carbajal Azcona, 2013)

La dosis de vitamina A recomendada por el CODEX es de 2500 UI/750 µg para adultos, 3750 UI/1125 µg para madres lactantes y para niños 1667 UI/ 500 µg. La carencia de vitamina A trae diversas consecuencias, entre las que se destacan, inmunidad reducida, ceguera nocturna, xeroftalmia, daños en el tracto respiratorio y aparato digestivo, detención del crecimiento y desmejora en los procesos de reproducción y lactancia (Araujo, y otros, 2013).

3.2. Acción biológica de la vitamina A

En la conversión del β-caroteno en vitamina A, ocurren reacciones de oxidación-reducción que primero lo transforman en retinal, después en retinol, para finalmente almacenarse en el hígado como el derivado palmitato. En teoría, la ruptura enzimática de los dos carbonos centrales del β-caroteno en la mucosa intestinal liberaría dos moléculas de retinal; sin embargo, en la práctica esta transformación no se logra totalmente y sólo se alcanza el 50% de efectividad; por esto el β-caroteno, que es la provitamina más activa, sólo tiene un poder del 50% de la vitamina A (Badui Dergal, 2006).

Los carotenos, además de su papel como provitamina A, también actúan como antioxidantes y anticancerígenos en el organismo, jugando un importante papel preventivo en algunas enfermedades degenerativas (Carbajal Azcona, 2013).

El término vitamina A se emplea genéricamente para todos los derivados de los carotenoides y retinoides que poseen actividad biológica de todo trans retinol. Cada forma de vitamina A realiza tareas específicas; por ejemplo, el retinal es activo en la visión y es también intermediario en la conversión a ácido retinoico; el ácido retinoico actúa semejante a una hormona que regula la diferenciación celular, el crecimiento y el desarrollo embrionario (M. Baracaldo & Castro de Navarro, 1998).

Su actividad más conocida es cuando interviene como 11-cis-retinal y se combina con la proteína opsina por medio del grupo amino ε de la lisina, en la síntesis del pigmento rodopsina; en el ciclo visual de los bastones, la rodopsina sufre una transformación cis-trans por la acción de la luz, al tiempo que se rompe en opsina y en trans-retinal, para

nuevamente isomerizarse y realizar un proceso cíclico (Figura 1). Por esta razón, su deficiencia causa xerofthalmia (disminución de la transparencia de la córnea) en los niños y ceguera nocturna en los adultos (Badui Dergal, 2006).

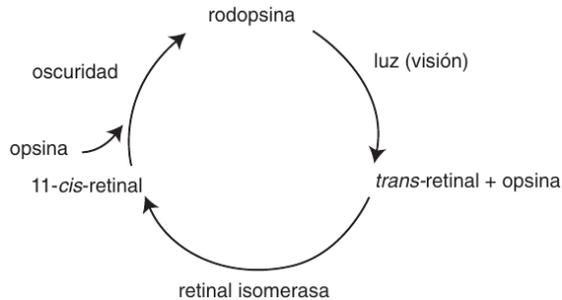


Figura 1 Acción biológica de la vitamina A. Ciclo de síntesis de la rodopsina.

Fuente: (Badui Dergal, 2006).

Las estructuras de 11-cis-retinal y trans-retinal se muestran a continuación en la Figura 2:

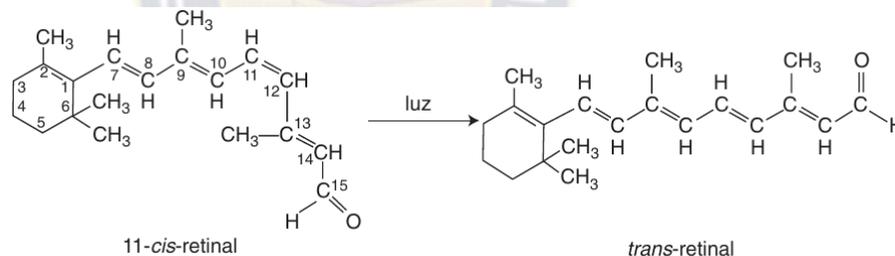


Figura 2 Conversión de 11-cis-retinal a trans-retinal por acción de la luz

Fuente: (Badui Dergal, 2006).

3.3. Características de los aceites de soya y girasol

Según el CODEX ALIMENTARIUS, los aceites vegetales comestibles se definen como: productos alimenticios constituidos principalmente por glicéridos de ácidos grasos obtenidos únicamente de fuentes vegetales. Podrán contener pequeñas cantidades de otros lípidos, tales como fosfátidos, de constituyentes insaponificables y de ácidos grasos libres naturalmente presentes en la grasa o el aceite (F.A.O. & O.M.S., 2019).

Otra definición de los productos de aceite de soya y aceite de girasol según el CODEX son:

El aceite de soya (aceite de semilla de soya) se obtiene de las semillas de soya (semillas de *Glycine max* (L.) Merr.) (F.A.O. & O.M.S., 2019).

El aceite de girasol (aceite de semillas de girasol) se obtiene de las semillas de girasol (semillas de *Helianthus annuus* L.) (F.A.O. & O.M.S., 2019).

Los aceites vegetales, según la materia prima de donde se obtengan, pueden variar en su composición en cuanto a ácidos grasos se refiere, en la Tabla 3 se muestran la composición de ácidos grasos que fueron determinados mediante cromatografía gas-líquido (CGL):

Tabla 3 Gammas de composición de ácidos grasos de aceites vegetales determinados mediante CGL de muestras auténticas (expresadas en porcentaje del contenido total de ácidos grasos)

Ácidos Grasos	Aceite de soya	Aceite de girasol
C6:0	ND	ND
C8:0	ND	ND
C10:0	ND	ND
C12:0	ND-0,1	ND-0,1
C14:0	ND-0,2	ND-0,2
C16:0	8,0-13,5	5,0-7,6
C16:1	ND-0,2	ND-0,3
C17:0	ND-0,1	ND-0,2
C17:1	ND-0,1	ND-0,1
C18:0	2,0-5,4	2,7-6,5
C18:1	17-30	14,0-39,4
C18:2	48,0 -59,0	48,3-74,0
C18:3	4,5-11,0	ND-0,3
C20:0	0,1-0,6	0,1-0,5
C20:1	ND-0,5	ND-0,3
C20:2	ND-0,1	ND
C22:0	ND-0,7	0,3-1,5
C22:1	ND-0,3	ND-0,3
C22:2	ND	ND-0,3
C24: 0	ND-0,5	ND-0,5
C24:1	ND	ND

ND – no detectable, definido como $\leq 0,05\%$

Fuente: (F.A.O. & O.M.S., 2019)

3.4. Otros factores de calidad y composición

Estos factores de calidad y composición constituyen la información suplementaria a los factores esenciales de composición y calidad (F.A.O. & O.M.S., 2019).

3.4.1. Características de calidad

El color, olor y sabor de cada producto deberán ser característicos del producto designado, que deberá estar exento de olores y sabores extraños o rancios (F.A.O. & O.M.S., 2019). En la Tabla 4 se muestran las características generales de los aceites.

Tabla 4 Características de los aceites

	Dosis máxima
Materia volátil a 105 °C	0,2% m/m
Impurezas insolubles	0,05% m/m
Contenido de jabón	0,005% m/m
	Hierro (Fe)
Aceites refinados	1,5 mg/kg
	Cobre (Cu)
Aceites refinados	0,1 mg/kg
	Índice de ácido
Aceites refinados	0,6 mg de KOH/g de aceite
	Índice de peróxido
Aceites refinados	hasta 10 miliequivalente de oxígeno activo/kg de aceite

Fuente: (F.A.O. & O.M.S., 2019).

3.4.2. Características químicas y físicas

En la Tabla 5 se muestra las características químicas y físicas de aceites vegetales:

Tabla 5 Características químicas y físicas de aceites vegetales crudo

	Aceite de soya	Aceite de girasol
Densidad relativa (x °C/agua a 20 °C)	0,919 – 0,925 x = 20 °C	0,918 – 0,923 x = 20 °C
Índice de refracción (ND 40°)	1,466 – 1,470	1,461 – 1,468
Índice de saponificación (mg KOH/g de aceite)	189 – 195	188 – 194
Índice de yodo	124 – 139	118 – 141
Materia insaponificable (g/Kg)	≤ 15	≤ 15

Fuente: (F.A.O. & O.M.S., 2019).

3.5. Análisis de vitamina A en alimentos

La vitamina A y los correspondientes ésteres muestran un espectro de absorción característico, la posición del máximo depende del disolvente; en isopropanol es a 326 nm, en ciclohexano a 328 nm. El retinol tiene un coeficiente de absorción molar $\epsilon_{1\text{cm}}=1835$ en etanol y de 1826 en n-hexano. El retinol y sus ésteres son rápidamente destruidos por la luz, el oxígeno y los ácidos. Deben almacenarse en frascos ámbar sellados con gas inerte. Una Unidad Internacional (UI) corresponde a la actividad de 0,344 g de acetato de vitamina A puro cristalino; 0,300 μg de retinol o 0,550 μg de palmitato de retinol corresponden a 1 UI; 1 μg de retinol es equivalente a 3,333 UI de vitamina A (Bravo Bravo, 2013).

La mayoría de los procedimientos de análisis utilizan una etapa de saponificación antes de la extracción con un disolvente orgánico adecuado. Las condiciones para la saponificación pueden variar, pero en general, la muestra se saponifica preferentemente bajo nitrógeno utilizando una mezcla de hidróxido de potasio acuoso, etanol o metanol, agua y con la adición de un antioxidante como ácido ascórbico, pirogalol o butilhidroxitolueno (BHT).

Principalmente pueden utilizarse dos modos de cromatografía (fase normal y fase reversa) para la cuantificación de la vitamina A. La cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica de análisis de carotenos y de retinol en alimentos, esta técnica es rápida, reproducible y cuantitativamente sensible (Gariner C. & Restrepo, 1997).

3.6. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

3.6.1. Principios de HPLC

La cromatografía es un método analítico en el que los analitos de una mezcla se separan al ser distribuidos en dos fases, una fase móvil (solvente), que puede ser líquida o un fluido supercrítico y una fase estacionaria, que puede ser líquida o sólida (empaquete de la columna). La cromatografía líquida de alta eficiencia es la automatización de la cromatografía líquida tradicional en condiciones tales que se logran mejores separaciones

durante períodos de tiempo más cortos, utilizando partículas de relleno muy pequeñas, columnas de diámetros menores y alta presión de fluido (Guardado Pérez & Mercader Trejo, 2005).

La HPLC constituye un grupo de métodos y técnicas (Tabla 6), capaces de separar analitos en una enorme variedad de muestras y matrices, proporcionando información cualitativa y cuantitativa (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Tabla 6 Nombres y definiciones de técnicas de HPLC

Diámetro de columna	Flujo	Nombre
4-7,5 mm	2-10 mL/min	semipreparativa
7,5-21 mm	10-50 mL/min	preparativa
>21 mm	50-1000 mL/min	industrial
3,2-4,6 mm	0,5-2,0 mL/min	analítica
1,5-3,2 mm	100-500 µL/min	narrowbore
0,5-1,5 mm	10-100 µL/min	HPLC micro
150-500 µm	1-10 µL/min	HPLC capilar
10-150 µm	10-1000 nL/min	HPLC nano

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria se divide en cuatro tipos (Guardado Pérez & Mercader Trejo, 2005):

- a) Cromatografía de adsorción
- b) Cromatografía de partición
- c) Cromatografía de intercambio iónico
- d) Cromatografía de exclusión

Además, se hace otra división de los dos primeros tipos de cromatografía anteriormente mencionados, basándose en la polaridad de la fase estacionaria (Guardado Pérez & Mercader Trejo, 2005).

1. **Cromatografía de fase normal:** la fase estacionaria es de naturaleza polar (por ejemplo, sílice o alúmina) y la fase móvil es no polar (por ejemplo, hexano). En este modo, las muestras polares son retenidas más fuertemente por la columna, Por lo tanto, se eluirán primero los compuestos no polares.

2. **Cromatografía en fase reversa:** La fase estacionaria es no polar (por ejemplo, hidrocarburos) y la fase móvil es polar (por ejemplo, agua o metanol). Siendo este el inverso exacto de cromatografía en fase normal, esto quiere decir que los compuestos no polares se retienen más tiempo en la columna.

Otra clasificación es según el modo de operación, que se basa en el mecanismo por el cual se extrae la muestra de la columna (Guardado Pérez & Mercader Trejo, 2005):

1. Desarrollo por elución
2. Desplazamiento
3. Análisis frontal

El primer método tiene dos formas de empleo, la elución isocrática (que es la más popular) es cuando se lleva a cabo con un solo disolvente o con una mezcla de disolventes, constante, en el tiempo de análisis; y la elución por gradiente que se lleva a cabo variando de forma continua la composición de los disolventes, de modo que su fuerza vaya incrementando durante el tiempo de análisis. Este método es útil para eliminar analitos con valores de coeficiente de distribución (K) muy variables y se usa especialmente en cromatografía de fase reversa (Guardado Pérez & Mercader Trejo, 2005).

3.6.2. El cromatógrafo de HPLC

Se compone de al menos 5 módulos, unidos mediante tubería de acero o de otros materiales. Esos cinco ineludibles módulos son (Figura 3): **el sistema de bombeo** (una o varias bombas, con o sin formación de gradientes), **el inyector de muestras** (manual o automático), **la columna** (con o sin precolumna), **el detector** (uno o más de uno) y **el procesador de datos**, que exhibe los cromatogramas con los cálculos oportunos (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

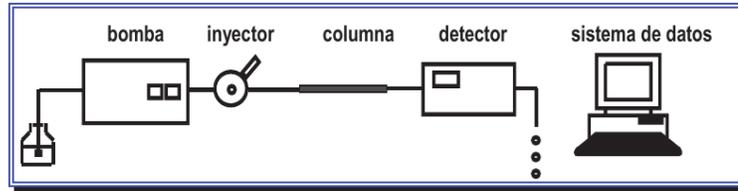


Figura 3 Los cinco módulos ineludibles de cromatógrafo de HPLC: bomba, inyector, columna, detector y sistema de recogida de datos.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016)

3.6.3. La línea fluidica

Los diferentes módulos del cromatógrafo de HPLC se unen mediante tubos, cuyo conjunto conforma la “**línea fluidica**”, por la que discurre la fase móvil, atravesando todos los componentes del sistema en la secuencia **bomba-inyector-columna-detector**. Los módulos y tramos de tubería se enlazan en uniones o “**juntas**”, en el esquema tubo-cono-tuerca. Utilizar conos y tuercas incorrectos conllevará inevitablemente a la aparición de fugas en la unión o a griparla. El aspecto más crítico de la unión tubo-cono-tuerca es su volumen muerto (Figura 4) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

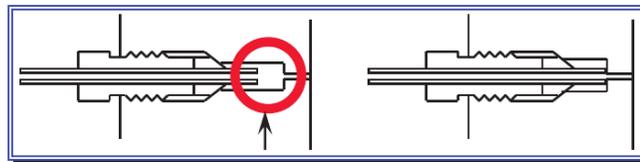


Figura 4 Las conexiones de HPLC deben cumplir dos condiciones: mínimo volumen muerto y alta presión. Izquierda: el comienzo del tubo ha quedado lejos de su asiento y ese volumen muerto hará perder eficiencia.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016)

Lo más importante es que el tubo quede alojado en el receptáculo exactamente en la profundidad óptima, en su asiento máximo: si lo hace antes, dejará un volumen muerto, una “piscina” en el argot cromatográfico, mientras que, si lo hace después, no hará una buena junta y fugará la fase móvil (Figura 5) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

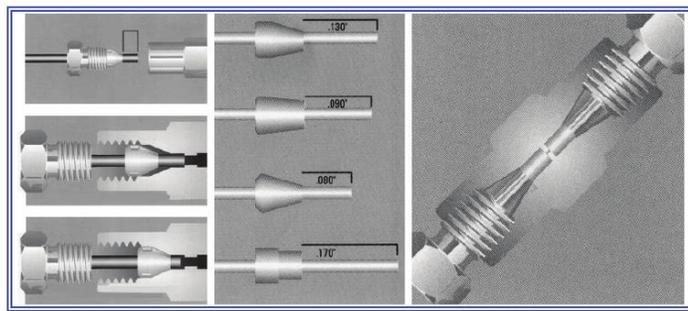


Figura 5 Conexiones de HPLC: a la izquierda, el conjunto tubo-cono-tuerca debe penetrar hasta una profundidad dada; en el centro, cuatro tipos de conos; a la derecha, conector de volumen muerto cero.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016)

Existen guías y directrices para la correcta manipulación de conexiones, tuercas y conos (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016):

- ✓ Emplear conexiones de la misma marca.
- ✓ No sobreapretar las uniones, pues podrían griparse: se apretarán con la mano tanto como sea posible y, luego, solo media vuelta con una llave.
- ✓ Tras hacer las conexiones, se debe comprobar la existencia de fugas.

Los tubos, tuercas y conos se construyen de diversos materiales (Tabla 7) siendo **el acero inoxidable, en su variedad SS 316** (Figura 6), el material más empleado y estándar por sus excelentes propiedades de dureza física, facilidad de ser doblado sin obturarse ni quebrarse y resistir presiones de 1.000 kg/cm². Sin embargo, es corroído por los ácidos (a partir de pH 2) y altas concentraciones salinas, aunque resiste bien los haluros. Además de que se puede fabricar tubos de prácticamente cualquier diámetro interno y externo con este material (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Tabla 7 Materiales de los tubos de HPLC.

Metales	No metales
Acero inoxidable SS 316	PEEK (poliéter-étercetona)
Nitronic 50	PTFE (politetrafluoroetileno)
EFNI (electroformed nickel)	FEP (fluoroetilén-propileno)
Níquel 200 (aleación Ni-Cu-C-Si)	PPS (sulfuros de polifenilo)
Hastelloy C-22 (aleac. Ni-Cr-Mb)	Sílice fundida (HPLC capilar)
Inconel 600	
Titanio	
Otros metales: tántalo, zirconio	
Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).	

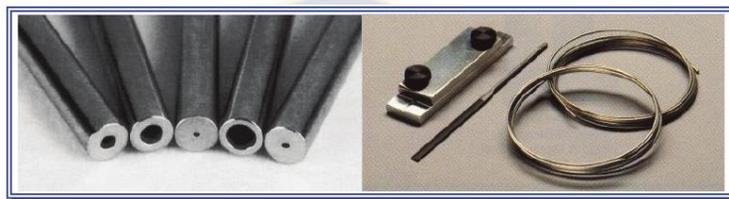


Figura 6 Izquierda: tubos de HPLC de 1/16" de diámetro externo con distinto diámetro interno. Derecha: cortatubos.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016)

3.6.3.1. Reservorios de fase móvil

Con la misión de albergar la fase móvil previamente a ser bombeada por la bomba del equipo. Algunos reservorios instrumentales permiten ciertas importantes funciones “en línea” viables también fuera del equipo (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016):

- 1) **Filtrar la fase móvil**, la cual siempre debe filtrarse para evitar posibles obturaciones del sistema poniendo filtros en los reservorios, generalmente “frits” de acero inoxidable de 0,2 μm en el extremo inicial de su tubo “de pesca”, que la llevará hasta el sistema de bombeo.
- 2) **Desgasificar**, tarea obligada en sistemas de gradientes a baja presión, sobre todo en fase reversa, para asegurar una atmósfera inerte, más aún con fases móviles higroscópicas.
- 3) **Termostatar**, forzoso con fases móviles de bajo punto de ebullición o muy viscosas.

- 4) **Desoxigenar**, pues el oxígeno puede causar problemas en la detección electroquímica con fases móviles (y muestras) oxidables.
- 5) **Agitar fases móviles resultantes de mezclar disolventes poco miscibles**, disponiendo algunos reservorios de dispositivos agitadores o emplazando los reservorios sobre un agitador magnético externo.

Los reservorios se construyen con diversos materiales, siendo el vidrio (transparente o ámbar) el más utilizado (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.4. Sistemas de bombeos y gradientes

La bomba cromatográfica impele la fase móvil al flujo seleccionado dotándola de la presión necesaria para atravesar la columna y el resto del sistema. HPLC emplea casi exclusivamente bombas de pistón (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

La Tabla 8 también muestra los dos modos de bombear fases móviles: a flujo constante y a presión constante. En el primer caso la bomba traduce el flujo deseado en frecuencia de sus emboladas (en las bombas de pistón) o en velocidad de desplazamiento (en las bombas de jeringa), quedando así la presión condicionada al flujo. Las bombas de presión constante estiman el empuje realizado sobre un fluido intermedio, regulando el flujo para mantener un valor de presión constante según sea la resistencia opuesta por el sistema y la columna (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Tabla 8 Tipos de bombas de líquidos.

	Peristálticas
Bombas de flujo constante	De pistón
	De jeringa
	Rotatorias de paletas
Bombas de presión constante	De presión directa mediante un gas
	De intensificador neumático
	De intensificador hidráulico
Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).	

3.6.5. Inyectores y autoinyectores

Interpuesto entre la salida de la bomba y la columna, el inyector ha de ser un dispositivo hermético, capaz de incorporar la muestra a la fase móvil previamente a la columna sin pérdidas de presión que puedan alterar el flujo proporcionado por la bomba. Prácticamente todos los equipos utilizan inyectores de válvulas, por su reproducibilidad, capacidad de inyectar volúmenes muy amplios (desde nL a mL) y resistir las altas presiones (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.5.1. Inyectores manuales

3.6.5.1.1. Inyectores de válvulas o de bucle

Prácticamente todos los inyectores de HPLC, manuales o automáticos, son “de válvulas”. (Figura 7) Su precisión, por inyectar siempre el mismo volumen (el de su bucle), les exime de errores humanos o del volumen de la jeringa de inyección. Mantienen la presión conferida por la bomba a la fase móvil, siendo mínimo su volumen interno y sus piezas internas son fácilmente reemplazables, al igual que el mismo inyector entero. Resisten presiones de 500 bares. Si por error se inyectase más muestra desde la posición de inyección (inject), ésta iría directamente al desagüe. Los inyectores manuales han establecido un volumen estándar de inyección de 5 ó 10 μL (su volumen de bucle) en aplicaciones analíticas (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).



Figura 7 Inyector, bucles de inyector, estator y rotor seals

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.5.1.2. Inyectores automáticos

El cromatografista exige al autoinyector capacidades obvias, principalmente volúmenes de inyección variables y robotización para poder manipular las muestras, realizar diluciones, derivatizaciones, mezclas entre viales, extracciones, etc. (Figura 8) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

La mayoría pueden realizar programas de tratamiento previo a la inyección de las muestras (diluciones, derivatizaciones), con secuencias de pipeteado para evitar efectos debidos a la matriz de las muestras o a la viscosidad del solvente, permitiendo programar las velocidades de succión de muestra y de dispensación de la misma (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).



Figura 8 Inyectores automáticos (imágenes cortesía de Agilent Technologies y Perkin-Elmer).

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Por otra parte, según la zona de inyección, los inyectores automáticos pueden ser de tres tipos: de bucle; con línea de transferencia, y de bucle con línea de transferencia (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.6. Columnas y precolumnas

3.6.6.1. La columna cromatográfica

La columna, un cilindro usualmente metálico que alberga micropartículas con la fase estacionaria (Figuras 9 y 10) es la parte más importante del sistema cromatográfico.

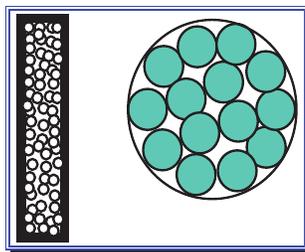


Figura 9 La columna cromatográfica rellena de micropartículas.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Existen rellenos porosos con gran variedad de diámetros de poro, nuevos núcleos poliméricos, de zirconio, titanio, carbón poroso, hidroxiapatita, alúmina, etc., en rellenos más uniformes cuya superficie particular mejor recubierta presentan menores niveles de metales residuales. Han aparecido nuevas fases (fenil, C30, carbamato, amida, quirales), con “end-capping”, mejores y más efectivas, así como materiales estructurales de las carcasas de columna alternativos al acero (vidrio, plástico, polímeros), revolucionarias combinaciones con precolumnas y nuevos diseños de sus “fritts” y discos (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).



Figura 10 Columnas de HPLC (imagen cortesía de Agilent Technologies).

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.6.2. Protocolos de chequeo, limpieza y regeneración de columnas

Cada cierto tiempo se debe verificar el estado de la columna mediante un test específico con patrones, comprobando los límites de cada parámetro cromatográfico, sobre todo aquellos que afectan a la eficiencia y resolución, mediante pruebas de idoneidad (Suitability Test), que nunca están de más para confirmar la eficiencia de cada columna nueva o la calidad de fabricación del lote. Tras su uso, es conveniente “limpiar”

o “lavar” la columna cada cierto tiempo de las impurezas acumuladas durante su utilización, para lo cual, lo mejor es bombear una fase móvil de naturaleza lo menos lejana a su fase estacionaria (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.6.3. Precolumnas

La precolumna (Figura 11) aumenta el tiempo útil de la columna cromatográfica, especialmente en condiciones de alta presión, que provocan en el relleno de columna un espacio en cabeza, motivo de ensanchamiento de los picos (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

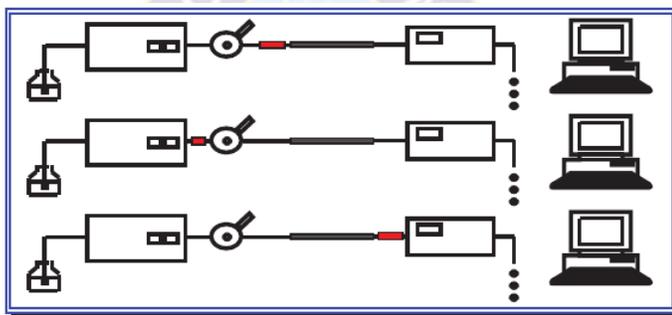


Figura 11 Emplazamiento de precolumnas: arriba, ubicación clásica, precediendo a la columna; centro, previa al inyector, captura componentes de fase móvil que podrían perjudicar las muestras; abajo, antes del detector.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

En definitiva, la precolumna asume las siguientes funciones (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016):

- ✓ **Físicamente** representa dos filtros más.
- ✓ **Químicamente** la precolumna satura la fase móvil en fase estacionaria exigiendo que los rellenos de precolumna y columna sean exactamente iguales.
- ✓ **Cromatográficamente** el conjunto alcanza más platos teóricos y mayor resolución, por ser idénticos sus rellenos.
- ✓ **Económicamente** el precio de las precolumnas es muy inferior al de las columnas con igual relleno.

Las precolumnas, con fases estacionarias idénticas a las de “sus” columnas, son mucho más cortas que éstas (1,5, 3 ó 5 cm) y de diámetro similar para evitar fenómenos de difícil interpretación. Aunque similar, el relleno de la precolumna suele tener un tamaño de partícula algo superior al de la columna, para no causar demasiada sobrepresión (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.6.4. Verificación de columnas

Cada vez que se reciba una nueva columna se verifica que la columna trae puestas sus propias tuercas, que impiden la evaporación del disolvente en que se conserva la columna tras su fabricación, ya que algunas fases estacionarias son sensibles a permanecer secas algún tiempo y el disolvente asegura su estabilidad durante su almacenaje y transporte (Tabla 9) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Tabla 9 Solventes en los que se guardan las columnas

Fase estacionaria	Solvente de almacenamiento
Amino	1 % acetato de etilo en hexano
Diol	1 % acetato de etilo en hexano
C18, C8, ODS	60% agua : 40% acetonitrilo
Sílice	1 % acetato de etilo en hexano
Ciano	4% isopropanol en hexano
Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).	

Las columnas suelen mostrar una flecha indicativa de la dirección del flujo cuando se rellenaron en fábrica. Lo correcto es mantener el flujo de fase móvil en la misma dirección de la flecha. Es importante usar tubería de diámetro interno de 0,12 a 0,19 mm para unir la columna con el inyector y el detector (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.6.5. Equilibrado y acondicionamiento de columnas

Antes de su uso la columna debe ser “equilibrada” con suficiente fase móvil. Una columna se equilibra bombeando aproximadamente 10 veces su volumen de columna: por ejemplo, 25 ml en el caso de las columnas analíticas (de 250 x 4,6 mm) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

En cualquier caso, el primer signo de equilibrado es alcanzar un valor de presión constante en el sistema de bombeo, siendo el segundo obtener una línea de base estable y plana, y el tercero y definitivo la estabilidad de los tiempos de retención de patrones (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.6.6.6. Limpieza y regeneración de columnas

Con el uso, algunas moléculas irreversiblemente retenidas van recubriendo paulatinamente las partículas del relleno de columna, causando su deterioro y pérdida de capacidad, resolución y eficiencia (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

- A veces se recurre a “dar la vuelta” a la columna para “sacar” picos considerados irreversibles.
- Otro procedimiento es bombear una fase móvil de polaridad más parecida (menos alejada) a la columna.
- Si el equipo dispone de horno de columnas, una temperatura relativamente alta (40 °C) podría coadyuvar a la limpieza de las columnas.

3.6.6.7. Detectores de HPLC

El detector es un dispositivo que emite una respuesta a una propiedad del eluyente o fase móvil, puede ser el componente más sofisticado y caro del sistema. La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del efluente. Este se debe escoger teniendo en cuenta las propiedades del eluyente, como índice de refracción, constante dieléctrica, densidad, o basándose en las propiedades del soluto como: absorbancia, fluorescencia, corriente límite (Guardado Pérez & Mercader Trejo, 2005).

3.6.6.7.1. Consideraciones Generales

Más académico y habitual es clasificar los detectores por su fundamento físico - instrumental en (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016):

- **Detectores ópticos**, basados en la interacción de una radiación con los analitos (detectores UV-VIS, arreglo de diodos, fluorimétricos, refractométricos, polarimétricos, de dispersión de luz (light-scattering)).
- **Detectores eléctricos**, basados en la medida de una propiedad eléctrica (electroquímicos, conductimétricos)
- Otros **detectores específicos** (radiométricos, viscosimétricos)
- **Detección híbrida**, acoplando HPLC a otras técnicas (LC-MS, LC-ICP, LC-RMN, LC-FTIR, etc.)

Un buen detector de HPLC, junto a las propiedades inherentes de responder ante muestras en estado líquido y trabajar en condiciones de flujo continuo, debe mostrar mínima deriva y ruido, alta sensibilidad, rápida respuesta, varios órdenes de linealidad, pequeño volumen muerto, acusar poco los cambios externos (de flujo, de temperatura, de fase móvil), ser robusto, tener un manejo sencillo y comprensible, no ser destructivo para las muestras, capaz de detectar todos los analitos objeto del análisis y mostrar cierta selectividad ante los posibles contaminantes (Tabla 10) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Tabla 10 Detectores de HPLC y Mínima Cantidad Detectable (MCD)

Detector	Aplicabilidad	MCD
UV-VIS	selectivo	ng
Diode array	selectivo	ng
Fluorimétrico	muy selectivo	pg
Refractométrico	universal	µg
Polarimétrico	muy selectivo	
Electroquímico	muy selectivo	fg
Conductimétrico	universal	ng
Radiométrico	muy selectivo	pg
Viscosimétrico	polímeros	
Light scattering evapor.	universal	
Light scattering láser	polímeros	
Quimioluminiscencia	muy selectivo	

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Para el análisis de alimentos algunos de los detectores usados son: UV-VIS, fluorescencia, espectrómetro de masas, electroquímico y de quimioluminiscencia. Dada la necesidad que presentan los laboratorios de demostrar que los métodos que realizan

proporcionan resultados fiables y adecuados a su finalidad y propósito inicial, se deben realizar actividades de control para el aseguramiento de la calidad como lo es la validación de cada método que se realiza (Guardado Pérez & Mercader Trejo, 2005).

3.6.6.7.2. Aspectos Cuantitativos del detector de HPLC

Los requerimientos generales cuantitativos del detector quedan supeditados a seis aspectos importantes, comunes a todo detector de HPLC, expuestos a continuación (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016):

- ✓ Número máximo de picos detectados
- ✓ Volumen de celda
- ✓ Constante temporal
- ✓ Concentración detectable
- ✓ Sensibilidad
- ✓ Linealidad de la respuesta.

3.6.6.7.3. Tipos de detectores

Existe una gran variedad de detectores para HPLC, cada uno con un propósito específico, entre los detectores existentes se puede mencionar:

- ❖ Detectores espectrofotométricos UV-VIS
- ❖ Detectores de arreglo de diodos
- ❖ Detectores fluorimétricos
- ❖ Detectores refractométricos
- ❖ Detectores polarimétricos
- ❖ Detectores láser
- ❖ Detectores electroquímicos
- ❖ Detectores conductimétricos
- ❖ Detectores radiométricos
- ❖ Detectores viscosimétricos
- ❖ Detectores de light scattering

- ❖ Detectores de quimioluminiscencia
- ❖ Detectores de ultrasonidos

3.7. Detectores diode array (arreglo de diodos)

Siempre con el objetivo de proporcionar una confirmación positiva de los picos eluidos y resolver eventuales problemas de coelución, y como paso consecutivo a los detectores de barrido rápido, se sugiere los detectores de arreglo de diodos, en la actualidad los más extendidos en los equipos de HPLC (Figura 12) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).



Figura 12 Detector diode array (imagen cortesía de Agilent Technologies). A la derecha, con sus lámparas y celda desmontadas.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Los detectores de arreglo de diodos poseen “óptica invertida”, pues disponen su celda de medida a continuación de la fuente de radiación y antes del elemento dispersante. Constan de una o dos fuentes de radiación, una de deuterio para la zona ultravioleta y otra de halógeno-tungsteno para la zona visible (o una sola de vapor de xenón). Posterior a ellas, un colimador enfoca la radiación de las lámparas sobre la celda de flujo continuo. A veces un shutter o cuña reduce el área de la radiación incidente sobre la cubeta de flujo continuo, cuya arquitectura generalmente es en Z y con lentes a ambos lados para minimizar la deriva causada por los gradientes, principalmente a bajas longitudes de onda. Tras la celda, la óptica de los detectores de arreglo de diodos finaliza en un policromador, que alinea un conjunto de diodos en serie (Figura 13) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

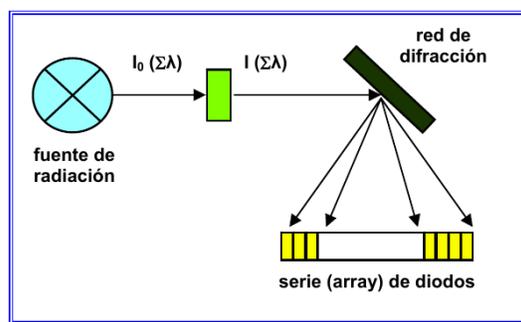


Figura 13 Esquema óptico de un detector diode array

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Los detectores de arreglo de diodos introducen una tercera dimensión en la detección espectrofotométrica de los análisis cromatográficos, permitiendo disponer de más información (los espectros de los analitos y algunos cálculos realizados con ellos) y, sobre todo, la confirmación de los resultados. Trabajan generando espectros continuamente, pues el barrido electrónico de los diodos sucede en pocos milisegundos: generalmente entregan cada 100 ms o menos un espectro completo, promedio de muchos espectros individuales, dependiendo de su constante de integración (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Las ventajas de los detectores de arreglo de diodos pueden resumirse en tres (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016):

- a) En primer lugar, su capacidad de obtener cromatogramas a todas las longitudes de onda UV-VIS, mostrando la absorbancia de todas y cada una de las longitudes de onda del espectro UV-VIS y enviarlas al ordenador, que las memoriza, y si aparecen inesperados analitos, metabolitos o contaminantes, que podrían absorber a otras longitudes de onda distintas, el detector de arreglo de diodos las podrá detectar al reprocesar los datos sin necesidad de reinyectar la muestra.
- b) La segunda ventaja es permitir seleccionar la longitud de onda óptima para el análisis e incluso la respuesta integral de varias, para trabajar de forma muy selectiva (con cromatogramas en zonas en que solo absorben los analitos de interés) o muy universal (en zonas donde absorben todos los picos detectados).

- c) La tercera y última ventaja de un detector de arreglo de diodos es poder calcular de forma inmediata la pureza de picos, como cociente múltiple entre varias longitudes de onda (Figura 14).

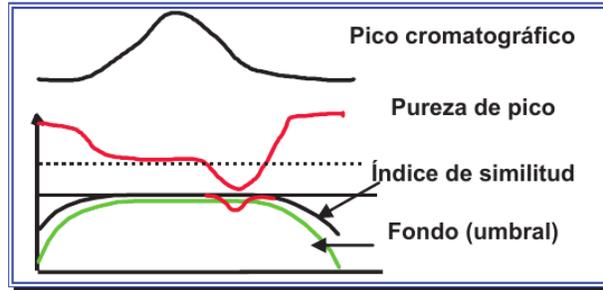


Figura 14 Las curvas de pureza a lo largo de un pico estiman el “índice de similitud”, cociente del espectro durante el tiempo de retención del pico dividido por el espectro tomado en su ápice. El valle que muestran ambos gráficos denota la existencia de una impureza

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Por el contrario, el principal inconveniente de los detectores diode array es ser destructivos para las muestras fotosensibles, ya que su diseño de óptica invertida hace incidir sobre la celda de muestras toda la radiación de las fuentes, a todas las longitudes de onda. Asimismo, puede limitar su uso su ligera menor sensibilidad que los detectores espectrofotométricos convencionales (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Los detectores diode array corresponden enfáticamente a módulos del tipo “caja negra”, sin teclado ni display (Figura 15); ejecutándose todo su manejo y funciones desde un ordenador con software específico, que responde a los requerimientos: obtener, exhibir, imprimir y almacenar datos tridimensionales e isogramas con alta resolución, presentándolos desde ángulos variables, extraer tras el análisis cromatogramas convencionales a cualquier longitud de onda y ancho de banda para reintegrarlos, compararlos, etc (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).



Figura 15 Detector diode array

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Otras útiles capacidades de los detectores de arreglo de diodos es obtener cromatogramas virtuales, que representan en cada momento la máxima longitud de onda de absorción frente al tiempo, así como hacer zoom sobre cualquier pantalla gráfica (cromatogramas, isogramas, espectros) para apreciar con nitidez todos los detalles del análisis (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Otra interesante propiedad de los detectores de arreglo de diodos es poder realizar derivadas de cromatogramas y espectros. La simple visión de la derivada de un espectro (Figura 16) y de un cromatograma permite decidir si el pico es puro o no, y si presenta coelución, siguiendo la sempiterna máxima de que “cualquier conclusión negativa lo es al 100%, mientras que cualquier conclusión positiva debe esperar más confirmaciones” (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

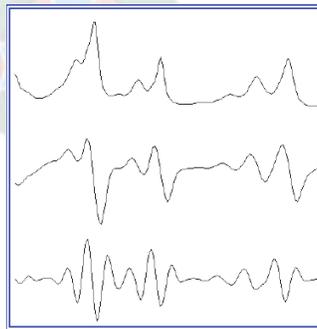


Figura 16 Espectro obtenido con un detector diode array: de arriba abajo, el espectro, su primera derivada y su segunda derivada.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

Los detectores de arreglo de diodos pueden trabajar simultáneamente con alta resolución espectral y alta sensibilidad en toda la zona UV-VIS. Generalmente poseen entre 500 y 1000 diodos, con exactitud fotométrica de 1 nm. También se debe tener en cuenta la anchura de la rendija del policromador y el ancho de banda espectral, no olvidando que en los detectores de arreglo de diodos la sensibilidad está reñida con la resolución espectral (Figura 17) (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

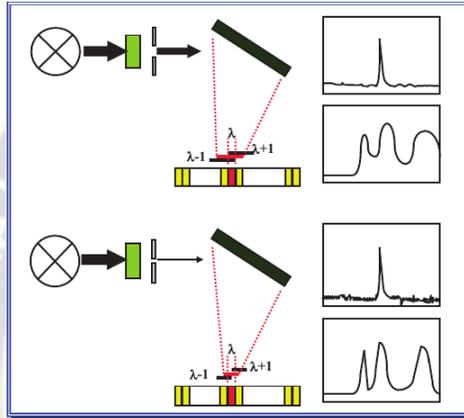


Figura 17 Importancia del ancho de rendija de entrada al policromador: arriba, rendijas anchas originan espectros de baja resolución y cromatogramas poco ruidosos; abajo, rendijas estrechas originan espectros de alta resolución y cromatogramas más ruidosos.

Fuente: (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016).

3.8. Validación

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos han de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

La validación se define como la “Confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” esto según la definición ISO 8402:1994 (Guardado Pérez & Mercader Trejo, 2005).

El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. La validación debe ser tan amplia como sea necesaria para satisfacer las necesidades de la aplicación o del campo de aplicación dados. La validación puede incluir procedimientos para muestreo, manipulación y transporte de los ítems de ensayo o calibración. Las técnicas utilizadas para la validación del método pueden ser una de las siguientes o una combinación de ellas (ISO/IEC, 2017):

- a) La calibración o evaluación del sesgo y precisión utilizando patrones de referencia o materiales de referencia;
- b) Una evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado;
- c) La robustez del método de ensayo a través de la variación de parámetros controlados, tales como la temperatura de la incubadora, el volumen suministrado;
- d) La comparación de los resultados obtenidos con otros métodos validados;
- e) Las comparaciones interlaboratorio;
- f) La evaluación de la incertidumbre de medición de los resultados basada en la comprensión de los principios teóricos de los métodos y en la experiencia práctica del desempeño del método de muestreo o ensayo.

Cuando se hacen cambios a un método validado, se debe determinar la influencia de estos cambios, y cuando se encuentre que éstos afectan la validación inicial, se debe realizar una nueva validación del método. Las características de desempeño de los métodos validados tal como fueron evaluadas para su uso previsto, deben ser pertinentes para las necesidades del cliente y deben ser coherentes con los requisitos especificados. Las características de desempeño pueden incluir, pero no se limitan a, el rango de medición, la exactitud, la incertidumbre de medición de los resultados, el límite de detección, el límite de cuantificación, la selectividad del método, la linealidad, la repetibilidad o la reproducibilidad, la robustez ante influencias externas o la sensibilidad cruzada frente a las interferencias provenientes de la matriz de la muestra o del objeto de ensayo y el sesgo (ISO/IEC, 2017).

La validación o la verificación de un método se realizan mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo. Una vez validados o verificados los métodos, su utilización habitual en el laboratorio debe ser autorizada formalmente por la persona responsable, por ejemplo, el director del mismo (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

3.8.1. Parámetros para la validación o parámetros de desempeño

3.8.1.1. Selectividad

La selectividad se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes, en la matriz de la muestra (Araujo, y otros, 2013).

Este parámetro se relaciona con el grado en que otras sustancias interfieren en la identificación y, si procede, en la cuantificación de los analitos de que se trate. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias, endógenas o exógenas, en una muestra de la matriz en las condiciones exigidas por el método (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

3.8.1.2. Límite de detección

Se trata de la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de certidumbre. El límite de detección se define también como la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

3.8.1.3. Precisión

La precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes, obtenidos en condiciones predeterminadas (López Casanova, 2013).

La precisión mide el grado de acuerdo entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método. Las condiciones en que se mide la precisión se dividen, en condiciones repetibles y condiciones reproducibles (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

La repetibilidad de las condiciones existe cuando el mismo analista analiza muestras el mismo día y con el mismo instrumento (por ejemplo, cromatógrafo en fase gaseosa) o los mismos materiales (por ejemplo, reactivos para pruebas visuales) y en el mismo laboratorio. Cualquier cambio de estas condiciones (por ejemplo, diferentes analistas, diferentes días, diferentes instrumentos, diferentes laboratorios) implica que las condiciones serán reproducibles (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

3.8.1.4. Linealidad y rango de trabajo

Tradicionalmente se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida cuando se aplica el método y la concentración del analito en la matriz dentro del rango de concentraciones del analito buscado (rango de trabajo) (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

El rango de trabajo viene definido por la finalidad del método y puede representar sólo una parte de la totalidad de la línea recta. Habitualmente los criterios de aceptación implican una prueba de la “bondad de ajuste”. Frecuentemente se utiliza como criterio de la linealidad un coeficiente de correlación (r) elevado, del 0,99. Sin embargo, este criterio

no basta para demostrar que existe una relación lineal, por lo que cabe considerar que se puede utilizar un método que no permita establecer un coeficiente de correlación tan alto como el 0,99 pero permita cumplir los fines previstos. Estos parámetros no son aplicables a los métodos cualitativos salvo si se establece un umbral de concentración para reflejar resultados (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

3.8.1.5. Exactitud

La exactitud corresponde a la medición de la diferencia entre los resultados del ensayo y el valor de referencia aceptado (López Casanova, 2013), debido a un error sistemático del método y del laboratorio (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010) normalmente se expresa en porcentaje. La exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado (MRC) si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

Lo normal es estimar la exactitud analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo. La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta. Los criterios de aceptación de la exactitud deben ser similares a los utilizados para medir la precisión (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

3.8.1.6. Incertidumbre

En metrología, la incertidumbre se define como un parámetro asociado con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que puede atribuirse razonablemente al mensurando (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

Los laboratorios deben identificar las contribuciones a la incertidumbre de medición. Cuando se evalúa la incertidumbre de medición, se deben tener en cuenta todas las contribuciones que son significativas, incluidas aquellas que surgen del muestreo, utilizando los métodos apropiados de análisis (ISO/IEC, 2017).

En términos más prácticos la incertidumbre se puede definir como la probabilidad o el nivel de confianza. Cualquier medición que hagamos entrañará un cierto grado de incertidumbre, por lo que el intervalo de incertidumbre que se fije será el rango dentro del cual se situará el valor real con un determinado grado de confianza. Normalmente se utiliza un grado de confianza del 95%. La incertidumbre de las mediciones, por lo general, tiene muchos componentes. La incertidumbre se calcula estimando los errores que se producen en las distintas etapas del análisis, por ejemplo, la etapa preanalítica, la homogeneización, el pesaje, el pipeteado, la inyección, la extracción, la derivatización, la recuperación y las curvas de calibración. Los datos exigidos para la validación, por ejemplo, la exactitud y precisión en condiciones de repetibilidad/ reproducibilidad, reflejan ya muchos de estos factores y deben ser utilizados. Pueden hacerse estimaciones de la incertidumbre (con el nivel exigido de confianza del 95%) utilizando la siguiente fórmula (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010):

$$U = 2x \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$$

En la que u_1 , u_2 etc., son los componentes individuales de incertidumbre (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

Los componentes individuales de incertidumbre, que representen menos del 20% del motivo más importante, tienen escasa incidencia en la incertidumbre general y pueden omitirse en el cálculo (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2010).

CAPÍTULO IV

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. Identificación del analito

Las muestras objetivo fueron aceites vegetales comestibles comerciales: soya y mezcla de soya con girasol, ambos fortificados con vitamina A. Para asegurarse de que el contenido de vitamina A presente en los aceites represente el máximo que se haya agregado en las empresas que los elaboraron, se eligieron muestras de lotes lo más recientemente producidas, para el caso del aceite de soya tiene como fecha de fabricación el 4 de septiembre de 2021 y fecha de vencimiento el 4 de septiembre de 2022, para el caso del aceite de mezcla soya-girasol tiene como fecha de fabricación en junio de 2021 y fecha de vencimiento en junio de 2022. Ambas muestras de aceites se conservaron bajo refrigeración (4 °C) y protegidos contra la luz durante todo el tiempo del proceso de validación.

4.2. Alcance

El método que se desarrolla será aplicable a la cuantificación de vitamina A en una matriz de aceites vegetales comestibles de soya y mezcla de soya-girasol, tomando en cuenta las especificaciones del método para el procesamiento de las muestras, desde la extracción de vitamina A hasta su cuantificación por HPLC.

4.3. Condiciones ambientales

La temperatura de trabajo en laboratorio, se mantiene constante en un rango de 22 a 24 °C, y al ser un ambiente cerrado no hay corriente de aire.

4.4. Calibración de equipos y materiales

Todos los equipos y materiales utilizados para el método desarrollado fueron previamente calibrados y están bajo control metrológico.

4.5.Muestra

De un lote de la muestra inicial de un aceite, se procedió a dividirlo en 20 frascos ámbar de 250 mL de volumen, conservándolos en refrigeración a 4 °C durante todo el proceso de validación. Cada día de análisis se elige un frasco al azar para su análisis respectivo.

4.6.Desarrollo del método

4.6.1. Materiales, equipos y reactivos para la extracción de vitamina A en aceite vegetal comestible

4.6.1.1. Materiales y equipos

- 1 soportes universales
- 1 balón base plana de 250 mL
- 4 pinzas de nuez (de 3 dedos)
- 1 termómetro
- 1 refrigerante serpentín
- 1 bol metálico para realizar el baño maría
- 1 Placa calefactora
- Perlas de ebullición para el bol metálico
- 10 Vasos de precipitado de 25 mL
- 25 unidades de Tubos Falcon
- Jeringas de 5 mL
- Micropipetas de 5 y 1 mL
- Espectrofotómetro UV-VIS (Agilent) (ver Anexo 1)
- Cromatógrafo HPLC (Agilent) (ver Anexo 2)
- pH-metro (Mettler Toledo) (ver Anexo 3)
- Balanza analítica (Mettler Toledo) (ver Anexo 4)

4.6.1.2. Reactivos

- Hidróxido de sodio, p.a. (Merck)
- Etanol absoluto, p.a.
- Ácido ascórbico, 99,7 % (Scharlau)
- Cloruro de sodio, p.a. (Merck)
- n-hexano, grado HPLC (Merck)
- Acetona, p.a. (Merck)
- Retinol, 95 % (Sigma Aldrich)
- Metanol, grado HPLC (Merck)

4.6.1.3. Preparación de reactivos

4.6.1.3.1. Solución de hidróxido de sodio 50%

Pesar 50 g de hidróxido de sodio y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Agitar vigorosamente y guardar en frascos de polietileno.

4.6.1.3.2. Solución de cloruro de sodio 1%

Pesar 1 g de cloruro de sodio, disolverlo con 100 mL de agua bidestilada, agitar vigorosamente. Preparar en el momento de análisis.

4.6.1.3.3. Mezcla de extracción

Mezclar acetona p.a. y n-Hexano grado HPLC relación 6:4 respectivamente.

4.6.2. Procedimiento de extracción de la vitamina A

Para el procedimiento de extracción de la vitamina A, se hizo la sustitución del hidróxido de sodio por hidróxido de sodio, esto debido a que ambos son bases fuertes y al pertenecer al mismo grupo (alcalinos) (Chang & Godsby, 2017), estos cuentan con propiedades similares. Para el solvente de extracción se hizo uso de una mezcla de n-hexano con acetona (según recomendación del AOAC) con relación 4:6 (P. De Leenheer

y otros, 2000) en lugar de utilizar únicamente n-hexano como lo indica la norma NB 34044, o una mezcla de n-hexano con éter dietílico como lo indica la norma NB 34045, para la extracción de vitamina A en aceites vegetales. Para la preparación de la curva de calibración de vitamina A se hizo la sustitución de etanol, reactivo que es utilizado según las normas NB 34044 y NB 34045, por metanol grado HPLC, debido a que este último presenta mayor afinidad (más apolar) (Wade, 2011) respecto al patrón de vitamina A, haciendo que este sea más fácil de disolverse, reduciendo el tiempo de preparación y evitando la degradación de la vitamina por efectos de oxidación y la luz.

4.6.2.1. Saponificación

Pesar 5 g de muestra, se agrega en un balón de fondo plano de 250 mL, adicionar 50 mL de etanol absoluto, 0,01 g de ácido ascórbico y 10 mL de hidróxido de sodio al 50%.

Poner el balón en un baño de agua en ebullición con un condensador de reflujo. Reflujar por 2 h y luego enfriar por 5 min.

Transferir el contenido completo del balón a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con agua bidestilada.

4.6.2.2. Extracción con hexano

En un embudo de separación poner 10 mL de muestra, 2 mL de etanol absoluto, 2 mL de cloruro de sodio al 1 % y 5 mL de mezcla.

Agitar vigorosamente durante 2 min, dejar separar las dos fases y usando una pipeta, coloque la fase orgánica (superior) en un embudo de separación, agregar 5 mL de mezcla, 2 mL de etanol y 2 mL de cloruro de sodio a la fase orgánica y repetir el procedimiento. Lavar la fase orgánica en el embudo de separación agregando 10 mL de agua bidestilada hasta que no se evidencie un cambio color con 3 gotas de fenolftaleína o medir su pH hasta que la solución se encuentre a un pH = 7.

Finalmente extraer la fase orgánica y evaporar a baño maría el solvente para después disolverlo en 2 mL de metanol para su respectivo análisis por HPLC. Analizar el extracto lo más pronto posible.

4.6.3. Elaboración de la curva estándar patrón de vitamina A

Para la curva estándar patrón fue necesario elaborar una curva con un rango de concentración de vitamina A (Retinol, 95 % (Sigma Aldrich)) entre 1 a 20 UI/g, en 5 puntos de concentración. Para la preparación de la solución madre del patrón de vitamina A se utilizó la siguiente relación:

$$10 \text{ g} \times \frac{1000 \text{ UI}}{1 \text{ g}} \times \frac{1 \mu\text{g}}{3,33 \text{ UI}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{100 \text{ g}}{95 \text{ g}} = 0,0032 \text{ g vitamina A}$$

Para preparar las 5 soluciones estándar a partir de la solución madre se utilizó la siguiente relación:

$$3 \text{ g} \times \frac{1 \text{ UI}}{\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ UI}} = 0,0030 \text{ g de solución madre}$$

La misma relación se utiliza para calcular la cantidad de solución madre que se requiere para preparar las 4 concentraciones restantes de 5, 10, 15 y 20 UI/g. El solvente para prepará la solución madre y los patrones fue metanol grado HPLC. Por cada día de trabajo, se realiza un duplicado de análisis y la preparación de las soluciones patrón es única para cada análisis.

Se decidió usar masas y no volúmenes para la preparación de los patrones fue gravimétrica debido a que se considera más preciso y exacto el uso de masas en lugar de volúmenes, ya que para medir la masa se hace uso de una balanza analítica el cual tiene un precisión de 0,0001 g, en cambio al medir volúmenes se tienen errores diferentes, dependiendo del material que se esté utilizando, que varían desde 0,1 mL (como en el caso de las pipetas volumétricas) a 0,001 mL (en el caso de las micropipetas) y se puede

considerar que estos errores son mayores que los que se reportan al medir la masa en una balanza analítica.

4.6.4. Determinación de la longitud de onda de máxima absorción

Para la determinación de la longitud de onda de máxima absorción, se utilizó el patrón de concentración 10 UI/g, preparado previamente, el cual fue analizado en un espectrofotómetro UV-Vis, con una celda de cuarzo de 1 mL de capacidad y un paso óptico de 1 cm. El barrido de longitud de onda fue de 250 nm a 400 nm.

4.6.5. Configuración de parámetros para la cuantificación de vitamina A por HPLC-DAD

Se trabajará con una configuración de parámetros del equipo de HPLC-DAD inicial según se observa en la Tabla 11, esta configuración inicial se basa en las normas NB 34044 y NB 34045.

Tabla 11 Parámetros y configuraciones iniciales para el equipo HPLC-DAD

Parámetros experimentales o configuración en el equipo HPLC		Configuración de parámetros	
		NB 34044	NB 34045
Columna		C18 Discovery 25cmX4,6mm,5µm	ODS C18 fase reversa
Detector		UV	UV
Longitud de onda	nm	325	325
Fase móvil	Metanol : Agua	Metanol : Agua	92:8
Flujo	[mL/min]	1	1
Temperatura de columna	[°C]	-	30
Volumen de inyección	[µL]	10	20
Tiempo de cromatograma	min	-	12
Tiempo de retención	min	-	7,8

Fuente: Elaboración propia

Con la configuración establecida en el equipo de HPLC-DAD, se procede a introducir la muestra en el inyector para obtener un cromatograma.

4.6.6. Validación del método desarrollado

Para la validación del método desarrollado es necesario evaluar diferentes parámetros de desempeño según el tipo de ensayo, los cuales se observan en la Tabla 12.

Tabla 12 Definición de parámetros de desempeño

Parámetro de desempeño	Métodos de ensayos físicoquímicos	
	Cuantitativo	Cualitativo
Precisión (repetibilidad, reproducibilidad interna, reproducibilidad)	Si	No
Veracidad (Sesgo)	Si	Si
Linealidad	Si	No
Rango de trabajo	Si	No
Límite de detección	Si	Si
Límite de cuantificación	Si	No
Sensibilidad	Si	Si
Selectividad	Si	Si
Especificidad	Si	Si
Robustez	Si	Si
Incertidumbre	Si	No

Fuente: (Guerrero Postigo, Parte 2, Diseño del plan de verificación y validación, 2021)

Entre los diferentes parámetros de desempeño descritos, no se podrán realizar todos en el presente trabajo debido a las limitantes de tiempo y falta de reactivos, por lo que a continuación se mencionará todos los parámetros de desempeño que se llevarán a cabo:

- a) Precisión (en término de repetibilidad y precisión intermedia)
- b) Sesgo
- c) Rango de trabajo
- d) Linealidad
- e) Límite de detección
- f) Límite de cuantificación
- g) Robustez
- h) Incertidumbre de medición

4.6.6.1. Precisión en términos de repetibilidad y precisión intermedia

Para el estudio de este parámetro de desempeño será necesario la preparación de un aceite con contenido conocido de vitamina A, ya que en el mercado no se cuenta con materiales de referencia certificados para aceites vegetales fortificados con vitamina A. Entonces se fortificará un aceite neutro (sin contenido de vitamina A) agregando una cantidad conocida de vitamina A (como retinol) y se lo considerará como muestra de referencia, el cual se procesará según el procedimiento de extracción descrito previamente. Este aceite preparado tendrá una concentración de 100 UI/g.

4.6.6.1.1. Repetibilidad

La precisión en términos de repetibilidad depende de diferentes factores, los cuales deben permanecer constantes durante todo el proceso de análisis, estos factores son: muestra, método, equipos, reactivos, patrones, instalaciones, condiciones ambientales, tiempo, personal. (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021)

Para ello se realizarán 5 determinaciones de una muestra durante 5 días consecutivos. Cada día se trabajará con extractos de vitamina recién preparados ya que la vitamina A es sensible a la luz, oxígeno y calor, por lo que es complicado tratar de conservar la vitamina para otros días de análisis. El resultado que se obtendrá será la repetibilidad en términos de desviación estándar (S_r), este valor de repetibilidad será considerado aceptable si se cumple que el valor del coeficiente de variación (CV_r) sea menor o igual al 3 %. (López Casanova, 2013)

4.6.6.1.1.1. Análisis de consistencia y valores atípicos intra-ensayos (ISO 16268-4)

Para evaluar si todos los resultados son consistentes en condiciones de repetibilidad se utiliza la prueba “k” de Mandel (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021):

- a) Calcular la desviación estándar de las mediciones individuales (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde n es el número de mediciones individuales.

- b) Calcular “k” para cada resultado (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$k = \frac{S\sqrt{N}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N S_i^2}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde N es el número S estudiadas.

- c) Comparar el valor k con un valor crítico tabulado k_{cri} para un determinado nivel de significación y un número de datos de conjunto (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

Si $k \geq k_{cri}$ el dato S_i no es consistente y S debe rechazarse o analizar los datos y eliminar hasta que S sea aceptable.

Si $k < k_{cri}$ el dato S_i es consistente.

Para evaluar si todos los resultados pertenecen a la misma población estadística y si existen valores atípicos, se utiliza la prueba “C” de Cochran:

- a) Calcular la desviación estándar de las mediciones individuales (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_k - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde n es el número de mediciones individuales.

- b) Calcular “C” para cada resultado (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$C = \frac{s_i^2}{\sqrt{\sum_{i=1}^N s_i^2}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde N es el número S estudiadas.

- c) Comparar el valor C con un valor crítico tabulado C_{cri} para un determinado nivel de significación y un número de datos de conjunto (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

Si $C \geq C_{cri}$ el dato S_i debe rechazarse.

Si $C < C_{cri}$ el dato S_i debe aceptarse.

4.6.6.1.1.2. Cálculo de la desviación estándar de repetibilidad (ISO 5725-2)

Con los datos de la desviación estándar de la misma población estadística se procede a calcular la desviación estándar de repetibilidad en términos porcentuales (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (n-1)S_i^2}{\sum_{i=1}^n (n-1)}} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$S_r (\%) = \sqrt{\frac{\sum (n-1)CV_i^2}{\sum (n-1)}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde: S_r es la repetibilidad, S es la desviación estándar de las tres mediciones individuales; n es el número mediciones individuales; CV es el coeficiente de variación.

4.6.6.1.2. Precisión intermedia

La precisión en términos de precisión intermedia depende de diferentes factores, de las cuales algunas pueden permanecer constantes y otras pueden cambiar, durante el proceso de análisis, estos factores son (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021):

Factores variables: Equipos, reactivos, patrones, condiciones ambientales, tiempo, personal.

Factores constantes: Muestra, método, instalaciones.

Se realizarán 5 determinaciones de una muestra durante 5 días. Cada día se trabajará con extractos de vitamina recién preparados. El resultado que se obtendrá será la precisión intermedia en términos de desviación estándar (S_w), este valor de precisión intermedia será considerado aceptable si se cumple que el valor del coeficiente de variación (CV_L) respectivo sea menor o igual al 3 % (López Casanova, 2013). Los factores variables para los ensayos fueron: condiciones ambientales, como la temperatura del laboratorio, el cual se encuentra entre 22 a 24 °C, el tiempo, trabajando en diferentes días y el personal, en el cual participarán 2 analistas.

4.6.6.1.2.1. Análisis de consistencia y valores atípicos inter-ensayos (ISO 16269-4)

Para evaluar si todos los resultados son consistentes en condiciones de precisión intermedia se utiliza la prueba “h” de Mandel (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021):

- a) Calcular el promedio de las mediciones individuales (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).
- b) Calcular el promedio del promedio de las mediciones individuales (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$\bar{X}_d = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde N es el número \bar{X}_i considerados en el estudio.

- c) Calcular la desviación estándar de los promedios de las mediciones individuales (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{X}_i - \bar{X})^2}{N-1}} \quad \text{Ecuación 7}$$

- d) Calcular “h” para cada resultado (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$h = \frac{\bar{X}_i - \bar{X}}{S_d} \quad \text{Ecuación 8}$$

- e) Comparar el valor h con un valor crítico tabulado G_{cri} para un determinado nivel de significación y un número de datos de conjunto (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

Si $h \geq h_{cri}$ el dato S_i no es consistente y X_i debe rechazarse o analizar los datos y eliminar hasta que X_i sea aceptable.

Si $h < h_{cri}$ el dato X_i es consistente

Para evaluar si todos los resultados pertenecen a la misma población estadística se utiliza la prueba “G” de Grubbs (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

- a) Calcular el promedio de las mediciones individuales.
b) Calcular el promedio del promedio de las mediciones individuales

$$\bar{X}_d = \frac{\sum_{i=1}^N \bar{X}_i}{N}$$

Donde N es el número \bar{X}_i considerados en el estudio.

- c) Calcular la desviación estándar de los promedios de las mediciones individuales (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2}{N - 1}}$$

- d) Calcular “G” para cada resultado (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

$$G = \frac{\bar{X}_i - \bar{\bar{X}}}{S_d} \quad \text{Ecuación 9}$$

- e) Comparar el valor G con un valor crítico tabulado G_{cri} para un determinado nivel de significación y un número de datos de conjunto (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021).

Si $G \geq G_{\text{cri}}$ el dato \bar{X}_i debe rechazarse.

Si $G < G_{\text{cri}}$ el dato \bar{X}_i debe aceptarse

4.6.6.1.2.2. Cálculo de la desviación estándar de precisión intermedia

Con los datos de la desviación estándar de la misma población estadística se procede a calcular la desviación estándar de precisión intermedia en términos porcentuales como sigue a continuación (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021):

- a) Calcular la desviación estándar de repetibilidad (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021):

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (n - 1) S_i^2}{\sum_{i=1}^n (n - 1)}}$$

- b) Calcular la desviación estándar entre los grupos (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021):

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N n(\bar{X}_i - \bar{X})^2}{N-1}} \quad \text{Ecuación 10}$$

- c) Calcular la desviación estándar de precisión intermedia (Guerrero Postigo, Parte 3, Estudio de precisión, 2021):

$$S_{EG} = \sqrt{\frac{S_d^2 - S_r^2}{\bar{n}}} \quad \text{Ecuación 11}$$

$$S_w = \sqrt{S_r^2 + S_{EG}^2} = \sqrt{\frac{(\bar{n}-1)S_r^2 + S_d^2}{\bar{n}}} \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde: S_r es la repetibilidad, S_d es la desviación estándar de las mediciones individuales y S_w es la precisión intermedia.

4.6.6.2. Sesgo

Muestra el grado de concordancia entre el resultado de una medición y un valor de referencia aceptado (López Casanova, 2013). Para evaluar este parámetro, se hizo uso del método adición, donde se agrega una cantidad conocida de un patrón y comparar con los resultados obtenidos, para ello será necesario la preparación de un aceite con contenido conocido de vitamina A, ya que en el mercado no se cuenta con materiales de referencia certificados para aceites vegetales fortificados con vitamina A. Entonces se fortificará un aceite neutro (sin contenido de vitamina A) agregando una cantidad conocida de vitamina A (como retinol) y se lo considerará como muestra de referencia, el cual se procesará según el procedimiento de extracción descrito previamente. Este aceite preparado tendrá una concentración de 100 UI/g.

Como criterio de aceptación del sesgo, se utilizará el análisis de consistencia y valores atípicos, aplicando para ello el estadístico G de Grubbs, si todos los datos

consistentes, se procede a calcular el sesgo y su desviación estándar respectiva (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

4.6.6.2.1. Análisis de consistencia, valores atípicos y sesgo (ISO 16269-4)

Para ello se aplica el criterio de Grubbs, el cual se basa en la relación de la diferencia (valor individual con el promedio general) con la dispersión (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021):

- a) Calcular el promedio de las mediciones individuales (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).
- b) Calcular el sesgo (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

$$b_i = \bar{X} - \mu \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde: b_i es el sesgo, \bar{X} es el promedio de las mediciones individuales y μ es valor de referencia.

- c) Calcular el sesgo relativo (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

$$\%b_i = \frac{b_i}{\mu} \times 100 \quad \text{Ecuación 14}$$

- d) Calcular el promedio del sesgo relativo para un nivel de concentración (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

$$\overline{\%b} = \frac{\sum_{i=1}^N \%b_i}{N} \quad \text{Ecuación 15}$$

- e) Calcular la desviación estándar S_b de los valores del sesgo relativo (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

$$S_{\%b} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\%b_i - \overline{\%b})^2}{N-1}} \quad \text{Ecuación 16}$$

Donde: N es el número de mediciones en un nivel de concentración.

- f) Calcular el valor G de Grubbs (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021)

$$G = \frac{\%b_i - \overline{\%b}_i}{S_{\%b}} \quad \text{Ecuación 17}$$

- g) Comparar el valor G con el valor de G_t para un determinado nivel de significación y un número dado de datos (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

$G \leq G_t$; El dato de b_i se acepta

$G > G_t$; El dato de b_i se rechaza

- h) Si un dato es rechazado el valor es eliminado y se repite el procedimiento hasta que todos los valores sean aceptados (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

4.6.6.3. Rango de trabajo

Es un intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable, además este viene definido por la finalidad del método (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

Para determinar el rango de trabajo, se hizo uso de la curva estándar patrón, considerando una concentración entre 1 UI/g a 20 UI/g para dicha curva, este se elaborará considerando que las muestras de aceites vegetales contienen alrededor de 5 UI/g para el extracto diluido. El análisis será realizado para 5 puntos de la curva estándar patrón y para poder analizar todos los datos en conjunto se calculará los porcentajes de recuperación, la consistencia de los mismos será evaluados con el estadístico G de Grubbs, y elaborando

el gráfico de Youden se determinará si el rango de trabajo es aceptable o no (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

4.6.6.3.1. Análisis de consistencia y valores atípicos

Se aplica el criterio de Grubbs, el cual se basa en la relación de la diferencia (valor individual con el promedio general) con la dispersión (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

- a) Llevar los promedios de los resultados en términos de recuperación (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$\text{Recuperación} = RR = \frac{x}{\mu} \times 100 \quad \text{Ecuación 18}$$

- b) Calcular el promedio de las recuperaciones (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$\overline{RR} = \frac{\sum_{i=1}^N RR_i}{N} \quad \text{Ecuación 19}$$

- c) Calcular la desviación estándar de las recuperaciones (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$S_{RR} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (RR_i - \overline{RR})^2} \quad \text{Ecuación 20}$$

- d) Calcular el valor G de Grubbs (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$G = \frac{RR_i - \overline{RR}}{S_{RR}} \quad \text{Ecuación 21}$$

- e) Comparar el valor G con el valor de G_t para un determinado nivel de significación y un número dado de datos (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$G \leq G_t$; El dato de RR_i se acepta

$G > G_t$; El dato de RR_i se rechaza

Si un dato es rechazado el valor es eliminado y se repite el procedimiento hasta que todos los valores sean aceptados.

4.6.6.3.2. Estudio de las recuperaciones

- a) Calcular el intervalo de confianza (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$\text{Intervalo de Confianza} = IC = t_{1-\alpha/2} * \frac{S_{RR}}{\sqrt{N}} \quad \text{Ecuación 22}$$

- b) Evaluar si el valor objetivo (100%) se encuentra dentro del IC (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$\text{Límite Inferior} = LI_{IC} = \overline{RR} - \frac{t_{1-\alpha/2} \times S_{RR}}{\sqrt{N}} \quad \text{Ecuación 23}$$

$$\text{Límite Superior} = LI_{IC} = \overline{RR} + \frac{t_{1-\alpha/2} \times S_{RR}}{\sqrt{N}} \quad \text{Ecuación 24}$$

- c) Graficar

El intervalo siempre debe contener al valor de referencia. Si el intervalo de confianza contiene al valor de referencia (100%) los niveles de recuperación afectados por los errores sistemáticos (sesgo) se consideran adecuados para el rango estudiado (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

4.6.6.4. Linealidad

Para el análisis de la linealidad se realizará un estudio de regresión lineal con polinomios de primer, segundo y tercer grado. Lo que se buscará es analizar que el sistema de medición tenga la misma exactitud con respecto a todos los valores de referencia en el

rango estudiado. Para ello se hará uso del estadístico t para evaluar la significancia de las variables (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

Si $t \leq t_{cri}$ Variable No significativa

Si $t > t_{cri}$ Variable significativa

Si las variables resultaran significativas, entonces se puede proceder a realizar un análisis del cumplimiento de criterio de validación, el cual depende del valor del sesgo perteneciente al estudio del sesgo (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

4.6.6.4.1. Análisis del cumplimiento del criterio de validación

Si: El sesgo o desvío de linealidad \leq Error permitido: El sistema de medición tiene la misma exactitud con respecto a todos los valores de referencia en el rango estudiado

Si: El sesgo o desvío de linealidad $>$ Error permitido: El sistema de medición No tiene la misma exactitud con respecto a todos los valores de referencia en el rango estudiado y se debe verificar las posibles causas.

- a) Calcular la diferencia (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

$$D_{EL} = \frac{X_{MP} - X_{1er}}{X_{1er}} \times 100 \quad \text{Ecuación 25}$$

Donde: X_{MP} es el valor estimado según el modelo del polinomio con mayor valor de t y X_{1er} es el valor estimado según el modelo de primer orden.

- b) Calcular el criterio de validación (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

$$\text{Criterio } V = 0,05 \times ET \quad \text{Ecuación 26}$$

Donde: ET es el error total que es igual al sesgo calculado en el estudio de sesgo.

- c) Comparar la diferencia (Guerrero Postigo, Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad, 2021).

$$|D_{EL}| \leq \text{Criterio}_V \quad \text{Ecuación 27}$$

4.6.6.5. Límite de detección y límite de cuantificación

4.6.6.5.1. Evaluación de la consistencia de las recuperaciones

Se aplica el criterio de Grubbs, el cual se basa en la relación de la diferencia (valor individual con el promedio general) con la dispersión (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

- a) Llevar los promedios de los resultados en términos de recuperación (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$\text{Recuperación} = RR = \frac{x}{\mu} \times 100$$

- b) Calcular el promedio de las recuperaciones (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$\overline{RR} = \frac{\sum_{i=1}^N RR_i}{N}$$

- c) Calcular la desviación estándar de las recuperaciones (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$S_{RR} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (RR_i - \overline{RR})^2}$$

- d) Calcular el valor G de Grubbs (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$G = \frac{RR_i - \overline{RR}}{S_{RR}}$$

- e) Comparar el valor G con el valor de G_t para un determinado nivel de significación y un número dado de datos (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$G \leq G_t$; El dato de RR_i se acepta

$G > G_t$; El dato de RR_i se rechaza

Si un dato es rechazado el valor es eliminado y se repite el procedimiento hasta que todos los valores sean aceptados.

- f) Evaluación de linealidad (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

Si $tr > t_{cri}$: El modelo es lineal

Si $tr < t_{cri}$: El modelo no es lineal

4.6.6.5.2. Límite de Detección (ISO 11842-2)

Es la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de certidumbre. Se utilizan los datos del modelo lineal (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$LD = t * \frac{S_y}{b} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n_y} + \frac{\bar{\mu}^2}{S_{XX}}} \quad \text{Ecuación 28}$$

Donde: $S_{x/y}$ es la desviación estándar residual; b es la pendiente; t es el test estadístico al 95%, n es el número total de las mediciones individuales para todos los MR usados, m en el número de réplicas, $\bar{\mu}$ es el promedio entre los patrones utilizados.

4.6.6.5.3. Límite de Cuantificación (ISO 11842-2)

Mínima concentración de un analito o sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada pero no cuantificada bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método. Se utilizan los datos del modelo lineal (Guerrero Postigo, Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842), 2021).

$$LC = 2 * t * \frac{S_y}{b} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n_y} + \frac{\bar{\mu}^2}{S_{XX}}} \quad \text{Ecuación 29}$$

Donde: $S_{x/y}$ es la desviación estándar residual; b es la pendiente; t es el test estadístico al 95%, n es el número total de las mediciones individuales para todos los MR usados, m en el número de réplicas, $\bar{\mu}$ es el promedio entre los patrones utilizados.

4.6.6.6. Robustez (ASTM E 1169)

Es la medida de la capacidad del método a permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. Un método analítico es robusto si los resultados no son muy sensibles a las variaciones en las condiciones experimentales (Guerrero Postigo, Parte 6, Estudio de selectividad, especificidad y robustez, 2021).

Se planteó un diseño experimental de 3 factores, donde cada factor tiene 2 niveles, uno superior (+) y otro inferior (-), bajo la configuración establecida en la Tabla 11, se llevará a cabo 4 medidas. Los factores que se tendrán en cuenta para este estudio serán: Reactivo de saponificación, Tiempo de reflujo y Temperatura de reflujo, los niveles de estos factores se observan en la Tabla 12.

4.6.6.6.1. Arreglo experimental

El diseño experimental propuesto se muestra en la Tabla 13, para $k = N - 1$ variables en N corridas, donde N es un múltiplo de 4 (Guerrero Postigo, Parte 6, Estudio de selectividad, especificidad y robustez, 2021).

Tabla 13 Diseño experimental para la robustez

Nº	A	B	C
1	+	+	-
2	-	+	+
3	+	-	+
4	-	-	-

Fuente: Elaboración propia

$$Efecto E = \frac{\sum E(+)}{N/2} - \frac{\sum E(-)}{N/2} \quad \text{Ecuación 30}$$

Donde: E (+) es la respuesta o resultados cuando la variable de la cual se desea conocer su efecto se encuentra en su nivel alto, mientras que E (-) es la respuesta o resultados cuando la variable de la cual se desea conocer su efecto se encuentra en su nivel bajo.

En la Tabla 14 se muestra los 3 factores experimentales con los que se analizará la robustez del ensayo.

Tabla 14 Factores experimentales

Factor	Descripción	Nivel inferior (-)	Nivel superior (+)
A	Reactivo de saponificación	KOH	NaOH
B	Tiempo de reflujo	1,5 h	2 h
C	Temperatura de reflujo	70 °C	85 °C

Fuente: Elaboración propia

4.6.6.2. Criterio de aceptación y rechazo

Calcular la desviación estándar (Guerrero Postigo, Parte 6, Estudio de selectividad, especificidad y robustez, 2021).

$$S = \sqrt{\frac{\sum d_E^2}{N-1}} \quad \text{Ecuación 31}$$

Donde: d_E es la diferencia entre los efectos ($E_{\max} - E_{\min}$) por cada factor y N es el número de factores (según el diseño).

Calcular el valor de “t” para cada factor E como sigue a continuación (Guerrero Postigo, Parte 6, Estudio de selectividad, especificidad y robustez, 2021):

$$t = \frac{\text{Efecto } E_{\text{promedio}}}{\frac{2S}{\sqrt{nN}}} \quad \text{Ecuación 32}$$

Donde: t es el test estadístico de Student experimental, S es la desviación estándar del proceso de medición, n número de mediciones individuales y N es el número de factores (según el diseño).

Comparar t en valor absoluto con un valor tabulado t_{cri} para un determinado nivel de significación (p), un número de datos de conjunto y dos colas (Guerrero Postigo, Parte 6, Estudio de selectividad, especificidad y robustez, 2021).

Si $t < t_{\text{cri}}$ Los efectos no son significativos; y el método es robusto a los cambios realizados.

Si $t \geq t_{\text{cri}}$ los efectos son significativos; entonces es necesario identificar las condiciones que deben ser cuidadosamente controladas y descubrir aquellas circunstancias bajo las cuales se necesita un cuidado especial.

4.6.6.7. Incertidumbre de medición (ISO 21748)

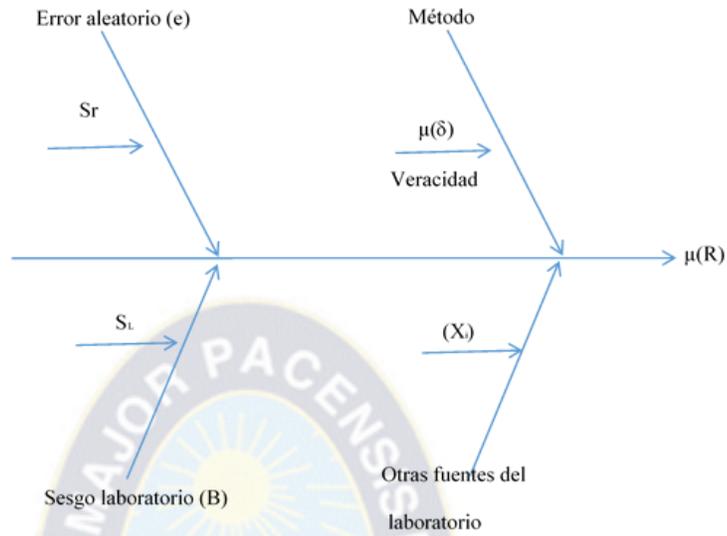
Es la probabilidad o el nivel de confianza. La incertidumbre se calcula estimando los errores que se producen en las distintas etapas del análisis (Guerrero Postigo, Evaluación de la incertidumbre de medición, 2021).

4.6.6.7.1. Ecuación de medición

$$R = \mu + \delta + B + \sum_{i=1,n} C_i X_i + e \quad \text{Ecuación 33}$$

Donde: R es el resultado de la medición; μ es el valor esperado; δ es el sesgo intrínseco del método; B es el componente del sesgo del laboratorio (medido por S_L); e es el error aleatorio (medio por S_r); X_i desviación respecto al valor nominal, C_i es el coeficiente de sensibilidad (Guerrero Postigo, Evaluación de la incertidumbre de medición, 2021).

4.6.6.7.2. Identificación de las fuentes de incertidumbre



4.6.6.7.3. Incertidumbre combinada:

$$\mu^2(R) = \mu^2(\delta) + S_L^2 + \sum_{i=1,n} C_i^2 \mu^2(X_i) + S_r^2 \quad \text{Ecuación 34}$$

Donde (Guerrero Postigo, Evaluación de la incertidumbre de medición, 2021):

S_w = *Precisión intermedia* (del estudio de precisión)

S_r = *Repetibilidad* (del estudio de precisión)

C_i = Es la pendiente del estudio de linealidad

$\mu^2(X_i)$ = Varianza entre los grupos del estudio de sesgo usando ANOVA

$$\mu(\delta) = \sqrt{S_\delta^2 + \mu^2(\tilde{\mu})} = \sqrt{\frac{S_L^2 - (1 - \frac{1}{n})S_r^2}{N} + \mu^2(\tilde{\mu})} \quad \text{Ecuación 35}$$

$\mu^2(\tilde{\mu})$ = Varianza dentro de los grupos del estudio de sesgo usando ANOVA

$C_i \mu(X_i)$ = Variación del valor nominal

4.6.6.7.4. Incertidumbre expandida

$$U(R) = k * \mu(R) \quad \text{Ecuación 36}$$

Donde: k es el factor de cobertura y $\mu(R)$ es la incertidumbre combinada (Guerrero Postigo, Evaluación de la incertidumbre de medición, 2021).



CAPÍTULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación de longitud de onda de máxima absorción

La longitud de onda a la que la absorbancia es máxima para el patrón de vitamina A de concentración 10 UI/g, se muestra en la Figura 18.

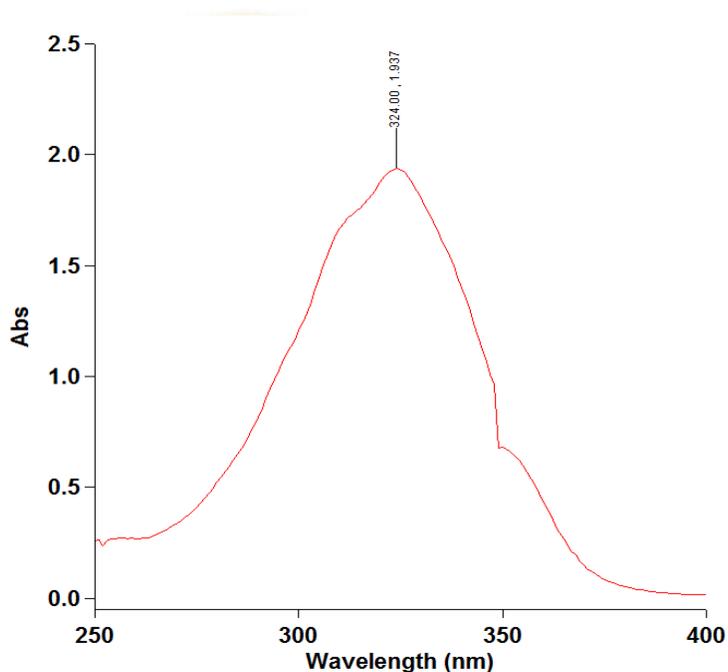


Figura 18 Longitud de onda de máxima absorción para la vitamina A

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con el espectro obtenido, se determinó que 324 nm es la longitud de onda apropiada para la detección y cuantificación de vitamina A en aceites vegetales comestibles. Este resultado es aproximado respecto a la longitud de onda de trabajo (325 nm) según las normas NB 34044 y NB 34045.

5.2. Configuración de parámetros para la cuantificación de vitamina A por HPLC-DAD

El extracto obtenido de vitamina A de aceites vegetales comestibles se trasvaso a un vial para su inyección en el equipo de HPLC-DAD. Se utilizó diferentes configuraciones sobre los parámetros instrumentales en el equipo de HPLC para encontrar la configuración más óptima, para encontrar dicha configuración se preparó un aceite que contenga una concentración de 65 UI/g de vitamina A, que se considera como el valor de referencia, ya que en el mercado no se cuenta con materiales de referencia certificados para aceites vegetales fortificados con vitamina A. El valor de este aceite se comparó con los resultados experimentales obtenidos, estos se muestran en la Tabla 15:

Tabla 15 Parámetros y configuraciones experimentales en el equipo HPLC

Parámetros experimentales o configuración en el equipo HPLC	Parámetros de referencia	Resultado para el parámetro experimental o la configuración especificada				Valor de referencia
Columna ODC C18		-				-
Detector	UV	DAD				-
Longitud de onda nm	325	324				-
Fase móvil Metanol : Agua	92:8	(50:50) %	(75:25) %	(92:8) %	(100:0) %	-
Concentración vitamina A [UI/g]		46,839	53,292	62,376	65,212	65,338
Flujo [mL/min]	1	0,9	0,95	1	-	-
Concentración vitamina A [UI/g]		63,417	64,449	65,015	-	65,338
Temperatura de columna [°C]	30	20	25	30	-	-
Concentración vitamina A [UI/g]		62,678	64,181	64,960	-	65,338
Volumen de inyección [µL]	20	10	20	-	-	-
Concentración vitamina A [UI/g]		64,8436	64,8941	-	-	65,3380

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos de concentración de vitamina A para cada configuración establecida en el equipo de HPLC, el valor de referencia fue utilizado para discriminar entre las diferentes configuraciones utilizadas, para el caso del volumen de inyección solamente se evaluó 2 configuraciones. Entonces se puede definir la configuración más adecuada considerando a aquellos valores de vitamina A experimentales que se acercaron más al valor de referencia. La configuración con la que se trabajará se muestra en la Tabla 16:

Tabla 16 Parámetros instrumentales configurados en el equipo de HPLC

Fase móvil	Metanol 100%
Flujo	1 mL/min
Columna	ODC C18
Detector	DAD
Longitud de onda	324 nm
Temperatura de la columna	30 °C
Volumen de inyección	20 µL
Fuente: Elaboración propia	

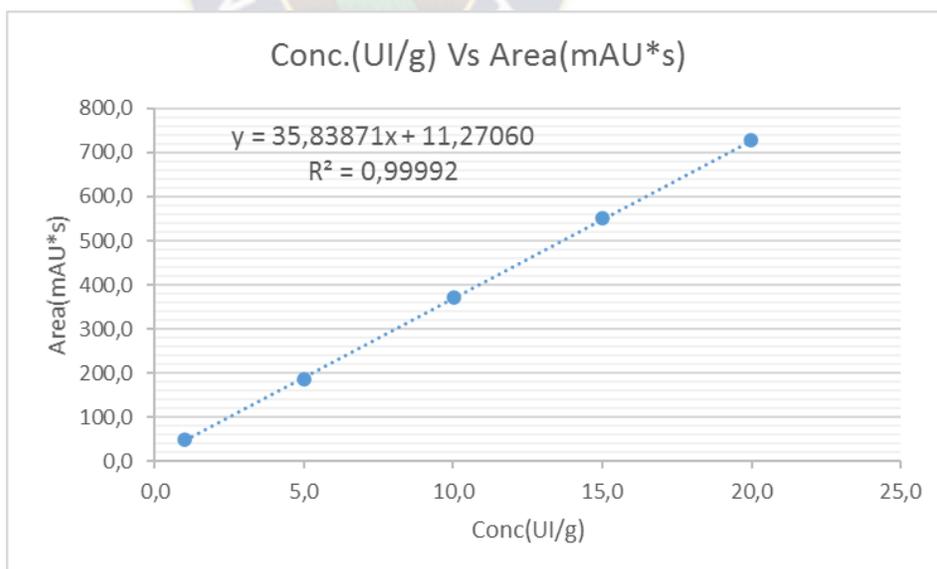
5.3. Elaboración de la curva estándar patrón de vitamina A

Para la elaboración de la curva estándar se empleó el equipo de HPLC-DAD, con el cual se obtuvieron los valores de áreas (mAU*s) respectivas para cada patrón medido. Los valores de las concentraciones de cada patrón, se las calculó a partir de los datos experimentales de los pesajes utilizados durante la preparación de los mismos, como se detalló en la sección experimental. Para lo obtención de datos, se trabajó durante 6 días consecutivos, por cada día de trabajo se realizó 2 ensayos, obteniéndose un total de 10 ensayos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17 Datos promedios para la curva estándar patrón

Día 1	C _{patrón} [UI/g]	1,00	5,00	10,0	15,0	20,0
	Área [mAU*s]	52,9	199	368	554	719
Día 2	C _{patrón} [UI/g]	1,01	4,99	10,0	15,0	20,0
	Área [mAU*s]	52,5	187	374	554	725
Día 3	C _{patrón} [UI/g]	1,00	4,97	10,0	15,0	20,0
	Área [mAU*s]	47,9	185	369	551	734
Día 4	C _{patrón} [UI/g]	1,01	5,03	10,0	15,0	20,0
	Área [mAU*s]	40,2	186	367	547	739
Día 5	C _{patrón} [UI/g]	1,00	5,01	10,0	15,0	20,0
	Área [mAU*s]	45,7	186	372	551	724
Día 6	C _{patrón} [UI/g]	1,01	5,01	10,0	15,0	20,0
	Área [mAU*s]	58,3	182	382	556	741
Promedios	C _{patrón} [UI/g]	1,00	5,00	10,0	15,0	20,0
	Área [mAU*s]	49,6	187	372	552	730
Desviación Estándar de C _{patrón}		0,00403	0,0204	0,0168	0,0193	0,00374
Desviación Estándar del Área		6,34	5,82	5,57	3,05	9,03
CV C _{patrón}		0,402	0,408	0,168	0,129	0,0187
CV Área		12,8	3,11	1,50	0,552	1,24
Fuente: Elaboración propia						

La Gráfica 1 muestra los resultados de la curva estándar patrón de vitamina A.



Gráfica 1 Curva estándar patrón de vitamina A

Fuente: Elaboración propia

La ecuación para la curva estándar patrón es la siguiente:

$$y = bx + a$$

Donde: b es la pendiente de la curva estándar patrón y a es el intercepto.

$$y = 35,8x + 11,3$$

$$R^2 = 0,9999$$

5.4. Validación del método

5.4.1. Precisión

Este parámetro se estableció mediante los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia. Se evaluó la precisión en términos de Desviación Estándar de Repetibilidad (S_r) (Tabla 18 y 19) y Desviación Estándar de Precisión intermedia (S_w) (Tabla 20 y 21).

Tabla 18 Datos obtenidos para la repetibilidad

N°	Responsable	Mediciones			Consistencia intra ensayos		Valores atípicos de dispersión	
		UI/g	UI/g	UI/g	k	k<kcri	C	C<Ccri
		x1	x2	x3				
1	T1	99,7506	99,7521	99,7048	0,6827	Consistente	0,0932	Dato aceptado
2	T1	99,6870	99,6864	99,6854	0,0203	Consistente	0,0001	Dato aceptado
3	T1	99,5617	99,5817	99,5896	0,3652	Consistente	0,0267	Dato aceptado
4	T1	99,3104	99,2060	99,2233	1,4222	Consistente	0,4045	Dato aceptado
5	T1	99,7324	99,6293	99,7361	1,5419	Consistente	0,4755	Dato aceptado

Fuente: Elaboración propia

Tabla 19 Determinación de la desviación estándar de la repetibilidad

N	n	$\sum_{i=1}^N S_i^2$	$\sum_{i=1}^N (n - 1)$	kcri (95%)	Ccri (95 %)	\bar{X}	S_r	CVr
5	3	0,007741	10	1,6235	0,684	99,5891	0,03935	0,03951

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la Tabla 19, el valor del CV_r es menor al 3 %, y considerando nuestro criterio de aceptación de “CV_r ≤ 3 %”, entonces el método tiene una buena precisión en términos de repetibilidad (S_r).

Tabla 20 Datos obtenidos para la precisión intermedia

N	Responsable	Mediciones			Consistencia inter ensayos		Valores atípicos de centralidad	
		UI/g	UI/g	UI/g	h	h<hc _{ri}	G	G<G _{cri}
		x1	x2	x3				
1	T1	99,7506	99,7521	99,7048	0,73	Dato consistente	0,73	Dato aceptado
2	T2	99,6870	99,6864	99,6854	0,48	Dato consistente	0,48	Dato aceptado
3	T1	99,5617	99,5817	99,5896	-0,06	Dato consistente	-0,06	Dato aceptado
4	T2	99,3104	99,2060	99,2233	0,38	Dato consistente	0,38	Dato aceptado
5	T1	99,7324	99,6293	99,7361	0,55	Dato consistente	0,55	Dato aceptado

Fuente: Elaboración propia

Tabla 21 Determinación de la desviación estándar de precisión intermedia

N	\bar{n}	$\sum_{i=1}^N (n - 1)$	hc _{ri} (95%)	G _{cri} (95%)	\bar{X}	$S_{\bar{x}}$	S_r	CV _r	S_d	CV _d	S_w	CV _w
					UI/g	UI/g	UI/g	%	UI/g	%	UI/g	%
5	3,0	10	1,57	1,72	99,59	0,20	0,03935	0,040	0,347	0,348	0,2029	0,204

Fuente: Elaboración propia

Según la Tabla 21, el valor del CV_w es menor al 3 %, considerando nuestro criterio de aceptación de “CV_w ≤ 3 %”, entonces el método tiene una buena precisión en términos de precisión intermedia (S_w).

5.4.2. Sesgo

Para el estudio de este parámetro de desempeño, se comparó el contenido conocido de vitamina A de una muestra de referencia preparada con el valor medido

experimentalmente (Tabla 22), obteniéndose el promedio del sesgo en términos relativos $\overline{\%b} = -0,17$ (Tabla 23) obtenidos en 5 días consecutivos.

Tabla 22 Datos obtenidos para el sesgo

N°	Responsable	μ UI/g	Mediciones UI/g			Valores atípicos de centralidad	
			x1	x2	x3	G	G<Gcri
1	T1	99,7595	99,7506	99,7521	99,7048	0,7321	Dato aceptado
2	T1	99,7595	99,6870	99,6864	99,6854	0,4849	Dato aceptado
3	T1	99,7595	99,5617	99,5817	99,5896	-0,0571	Dato aceptado
4	T2	99,7595	99,3104	99,2060	99,2233	-1,7098	Dato aceptado
5	T3	99,7595	99,7324	99,6293	99,7361	0,5498	Dato aceptado

Fuente: Elaboración propia

Como todos los vales medidos son aceptados según el análisis de consistencia y valores atípicos, se procede a calcular el valor del sesgo y su desviación estándar.

Tabla 23 Determinación del sesgo

N	n	Gcri (95%)	$\overline{\%b}$	$S_{\%b}$
5	3	1,7150	-0,1708	0,2008

Fuente: Elaboración propia

5.4.3. Rango de trabajo

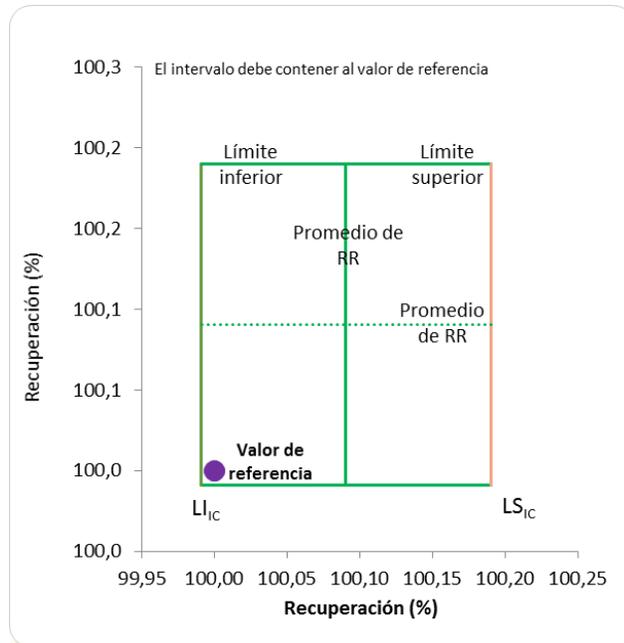
Para determinar el rango de trabajo, se hizo uso de la curva estándar patrón, considerando una concentración entre 1 UI/g a 20 UI/g para dicha curva, los resultados obtenidos para los 5 puntos de la curva estándar patrón con su respectivo análisis de consistencia de datos se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24 Datos obtenidos para la linealidad y rango de trabajo

N°	Responsable	μ	Mediciones UI/g		\bar{X}	G	G≤Geri
		UI/g	x1	x2	UI/g		
1	T1	1,000	1,0010	1,0078	1,0044	1,6213	Dato Aceptado
2	T1	1,000	0,9997	1,0134	1,0065	2,6262	Dato Aceptado
3	T1	1,000	1,0010	1,0090	1,0050	1,9151	Dato Aceptado
4	T1	1,000	0,9992	1,0051	1,0021	0,5819	Dato Aceptado
5	T1	5,000	5,0033	4,9854	4,9943	-0,9585	Dato Aceptado
6	T1	5,000	5,0001	5,0000	5,0000	-0,4213	Dato Aceptado
7	T1	5,000	4,9717	5,0309	5,0013	-0,3022	Dato Aceptado
8	T1	5,000	5,0081	5,0064	5,0073	0,2567	Dato Aceptado
9	T1	10,000	9,9850	10,0009	9,9930	-0,7549	Dato Aceptado
10	T1	10,000	9,9983	9,9999	9,9991	-0,4668	Dato Aceptado
11	T1	10,000	9,9949	9,9952	9,9951	-0,6555	Dato Aceptado
12	T1	10,000	10,0330	10,0102	10,0216	0,5882	Dato Aceptado
13	T1	15,000	14,9800	14,9730	14,9765	-1,1600	Dato Aceptado
14	T1	15,000	14,9999	15,0002	15,0001	-0,4228	Dato Aceptado
15	T1	15,000	15,0055	14,9900	14,9978	-0,4943	Dato Aceptado
16	T1	15,000	14,9937	15,0268	15,0102	-0,1045	Dato Aceptado
17	T1	20,000	19,9942	19,9977	19,9959	-0,5195	Dato Aceptado
18	T1	20,000	19,9999	19,9999	19,9999	-0,4269	Dato Aceptado
19	T1	20,000	19,9945	19,9965	19,9955	-0,5307	Dato Aceptado
20	T1	20,000	20,0037	20,0008	20,0023	-0,3716	Dato Aceptado

Fuente: Elaboración propia

Como todas las mediciones son aceptables según el estadístico G de Grubbs, se procedió a la elaboración del gráfico de Youden, este gráfico demuestra si el rango de trabajo planteado es adecuado para el método de análisis, este se muestra en la Gráfica 2.



Gráfica 2 Gráfica de Youden para las recuperaciones del rango de trabajo

Fuente: Elaboración propia

El valor de referencia (punto morado) en la Gráfica 2, se encuentra dentro de los límites inferior (LI_{IC}) y superior (LS_{IC}) del intervalo de confianza, por lo tanto, se acepta el rango de trabajo planteado.

5.4.4. Linealidad

Para este estudio, se determinó: R (coeficiente de correlación múltiple), R² (coeficiente de determinación), a (intercepto) y b (pendiente), para el 95% de confianza en un análisis de regresión – polinomio de 1er grado (Tablas 25, 26 y 27).

Tabla 25 Estadísticas de regresión (polinomio de 1er grado)

Coefficiente de correlación múltiple	0,99999997
Coefficiente de determinación R²	0,99999994
R² ajustado	0,99999992
Error típico	0,00221011
Observaciones	5
Fuente: Elaboración propia	

Tabla 26 Análisis de varianza

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	230,640128	230,640128	47217917,3	6,7969E-12
Residuos	3	1,4654E-05	4,8846E-06		
Total	4	230,640143			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 27 Análisis de varianza (continuación)

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Intercepción	0,00392	0,00178	2,19891	0,115289	-0,00175	0,009595	-0,001754	0,009594
Variable X 1	0,99965	0,00014	6871,53	6,78E-12	0,999190	1,000117	0,999191	1,000117

Fuente: Elaboración propia

Se utilizó el estadístico t para determinar si las variables son o no significativas (Tabla 28)

Tabla 28 Evaluación de significancia

Grados de libertad	t _{cri}	t ≤ t _{cri}
13	2,160	Variable significativa
13	2,160	Variable significativa

Fuente: Elaboración

Con el estadístico t se encontró que para el análisis de regresión con polinomio de 1er grado las variables eran significativas, entonces fue necesario realizar un análisis del cumplimiento del criterio de validación (Tabla 29), donde se debe cumplir que: “sesgo o desvío de linealidad ≤ Error permitido”.

Tabla 29 Análisis del cumplimiento del criterio de validación

P	μ UI/g	\bar{X} UI/g	Predicción 1er orden UI/g	Predicción 2do orden UI/g	Predicción 3er orden UI/g	D_{EL}	ET %	Criterio V	$ D_{EL} $ \leq Criterio_V
1	1	1,005	1,004	1,004	1,004	0,072	0,171	0,085	Criterio de verificación cumplido
2	5	5,001	5,002	5,002	5,003	0,007	0,171	0,085	Criterio de verificación cumplido
3	10	$\frac{10,00}{2}$	10,000	10,000	10,000	- 0,008	0,171	0,085	Criterio de verificación cumplido
4	15	$\frac{14,99}{6}$	14,999	14,998	14,998	- 0,007	0,171	0,085	Criterio de verificación cumplido
5	20	$\frac{19,99}{8}$	19,997	19,998	19,998	0,005	0,171	0,085	Criterio de verificación cumplido

Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos nos muestran que se cumple el criterio de validación, por lo tanto, el sistema de medición tiene la misma exactitud con respecto a todos los valores de referencia en el rango estudiado.

Para este estudio se obtuvo un valor de $R = 0,9999$, $R^2 = 0,9999$, con una ecuación de la recta $y = 0,99966x + 0,0039205$.

De los estudios de rango de trabajo y linealidad se obtuvo que:

$$\begin{aligned} \text{Rango lineal} &= 1,000 \text{ a } 20,00 \text{ UI/g} \\ \text{Rango de trabajo} &= LC \text{ a } LSRL \text{ UI/g} \\ \text{Rango de trabajo} &= 0,0210^1 \text{ a } 20,00 \text{ UI/g} \end{aligned}$$

LC = Límite de Cuantificación

¹ Del estudio de Límite de Detección y Cuantificación

LSRL = Límite Superior del Rango Lineal

5.4.5. Límites de detección y cuantificación

Para determinar los límites de detección y cuantificación, se aplicó el criterio G de Grubbs, para aceptar o rechazar los datos obtenidos (Tabla 30),

Tabla 30 Datos obtenidos para el límite de detección y límite de cuantificación

N°	Responsable	μ UI/g	Mediciones UI/g						\bar{X} UI/g	G	G ≤ Geri
			x1	x2	x3	x4	x5	x6			
1	T1	1,000	1,0010	1,0010	0,9997	1,0078	0,9992	1,0051	1,0023	1,3717	Aceptado
2	T1	5,000	5,0033	5,0000	5,0001	5,0309	5,0081	5,0064	5,0081	0,7686	Aceptado
3	T1	10,000	9,9999	9,9949	9,9983	9,9952	10,0009	10,0102	9,9999	0,7009	Aceptado
4	T1	15,000	14,9800	15,0055	14,9999	14,9900	14,9937	15,0268	14,9993	0,7349	Aceptado
5	T1	20,000	19,9977	19,9999	19,9999	19,9965	20,0037	20,0008	19,9998	0,7045	Aceptado

Fuente: Elaboración propia

Para calcular los valores del límite de detección y el límite de cuantificación se utilizó las Ecuaciones 28 y 29. En la Gráfica 3 se muestran los resultados obtenidos para el límite de detección y el límite de cuantificación.



Gráfica 3 Zona de detección y cuantificación

Fuente: Elaboración propia

5.4.6. Robustez

La robustez de la metodología se estableció realizando variaciones en 3 factores del método que fueron: reactivo de saponificación, temperatura de reflujo y tiempo de reflujo (Tabla 14).

En la Tabla 31 se muestran las mediciones obtenidas para el estudio de robustez.

Tabla 31 Datos obtenidos para la robustez

N°	Responsable	VR UI/g	Medición UI/g		\bar{X} UI/g
			X1	X2	
1	T1	99,7595	99,5556	99,6823	99,6189
2	T1	99,7595	99,5661	99,5823	99,5742
3	T1	99,7595	99,5056	99,5323	99,5189
4	T1	99,7595	99,7546	99,7493	99,7519

Fuente: Elaboración propia

Según el estadístico t que se describió en la sección experimental, se evaluó la significancia de los efectos individuales (Tabla 32).

Tabla 32 Evaluación de los efectos

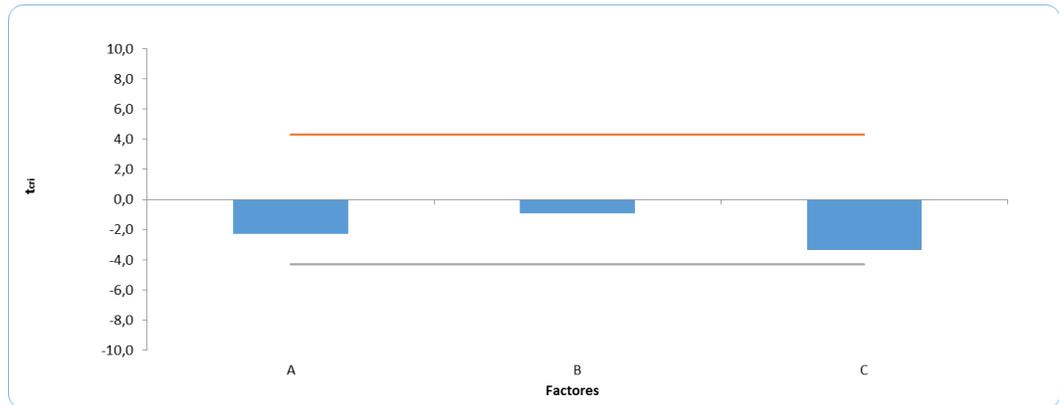
Factor	Descripción	Efecto E	S	t	$ t \leq t_{cri}$
A	Reactivo de saponificación	-0,094	0,059	-2,3	Efecto no significativo
B	Tiempo de reflujo	-0,039	0,059	-0,9	Efecto no significativo
C	Temperatura de reflujo	-0,139	0,059	-3,3	Efecto no significativo

$t_{cri} = 4,30$

Fuente: Elaboración propia

De la tabla anterior, se observa que los efectos de la variación de los factores no son significativos, estos resultados se pueden observar en la Gráfica 4.

En la Gráfica 4 se puede observar las significancias de los efectos de los factores.



Gráfica 4 Comportamiento de la significancia de los efectos de los factores estudiados

Fuente: Elaboración propia

Las líneas superior (línea roja) y límite inferior (línea azul) muestran los límites por fuera de los cuales, los efectos de los factores se consideran significativos, pero como se observa en la gráfica anterior, los 3 factores que fueron evaluados para el estudio de robustez (reactivo de saponificación, tiempo de reflujo y temperatura de reflujo) se encuentran dentro los límites superior e inferior, entonces se considera que los efectos de los factores no son significativos, por lo tanto la capacidad del método es buena al permanecer inalterado por variaciones de los factores mencionados.

5.4.7. Incertidumbre de medición

Se identificó las fuentes de incertidumbre del método, los cuales fueron: error aleatorio en términos de repetibilidad (S_r), obtenido del estudio de precisión, sesgo del laboratorio en términos de precisión intermedia (S_w), obtenido del estudio de precisión, incertidumbre del método asociado a la veracidad ($\mu(\delta)$), calculado a partir de los datos de repetibilidad y precisión intermedia (ecuación 35), y otras fuentes de laboratorio durante las mediciones ($\mu(X_i)$), calculados a partir del valor de la pendiente del polinomio de 1er orden obtenido del estudio de linealidad y de datos obtenidos del análisis de varianza del estudio del sesgo.

Las incertidumbres típicas de cada fuente mencionada se muestran en la Tabla 33. La incertidumbre típica de la repetibilidad (S_r) y la precisión intermedia (S_w) se obtuvo del estudio de precisión.

Tabla 33 Contribución de las incertidumbres típicas

Magnitud	Unidad	Incertidumbre típica ($\mu(y)$)
Repetibilidad (S_r)	UI/g	0,03935
Precisión intermedia (S_w)	UI/g	0,02733
Sesgo (δ)	UI/g	0,03554
Variación del valor nominal ($C_i \cdot u(X_i)$)	UI/g	0,3469

Fuente: Elaboración propia

A partir de las incertidumbres típicas se calculó la incertidumbre combinada, el resultado fue el siguiente:

$$\mu(R) = 0,3520[UI/g]$$

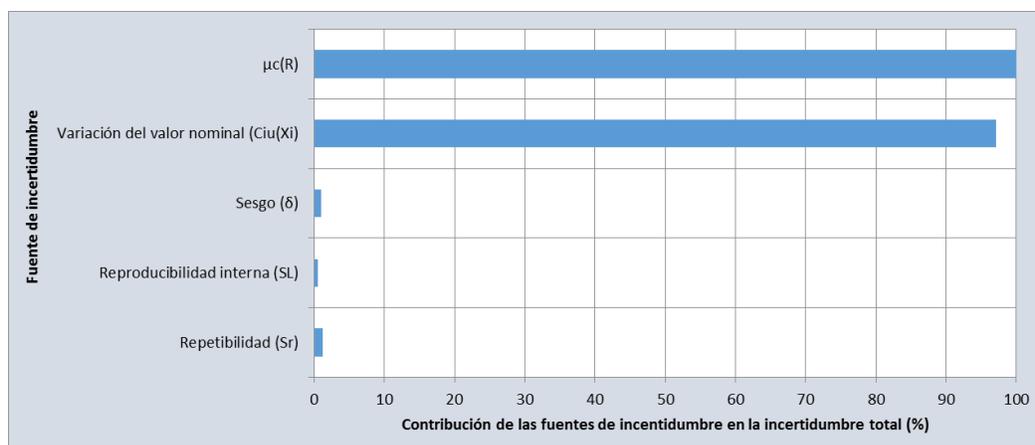
Con los datos de grados efectivos de libertad $\vartheta_{efectivos} = 10,60$ y el factor de cobertura $k = 2$ se calculó la incertidumbre expandida:

$$U(R) = 0,7040[UI/g]$$

Entonces la incertidumbre expandida relativa es de:

$$U_R = 0,7057 \%$$

Las contribuciones de las fuentes de incertidumbre sobre la incertidumbre total se muestran en la Gráfica 5.

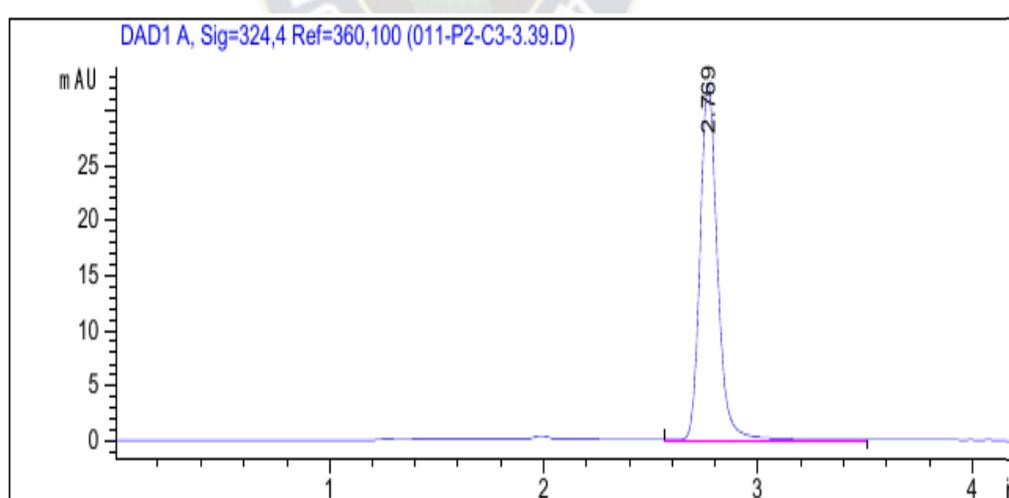


Gráfica 5 Contribución de las fuentes de incertidumbre

Fuente: Elaboración propia

5.5. Cuantificación de vitamina A por HPLC en muestras de aceites vegetales

Para el análisis de HPLC se determinó experimentalmente que el tiempo de cromatograma más adecuado fue de 5 min, y un tiempo de retención para la vitamina A de 2,769 min. El cromatograma obtenido para la vitamina A se muestra en la Gráfica 6.



Gráfica 6 Cromatograma de vitamina A

Fuente: Elaboración propia

Las muestras utilizadas para el análisis fueron aceite comercial de soya y aceite mezcla de soya-girasol, los valores calculados acompañados con su valor de incertidumbre correspondiente fueron:

Soya-girasol	Soya
$(64,24 \pm 1,10)$ UI/g	$(62,34 \pm 1,13)$ UI/g

Para un factor de cobertura de $k = 2,23$.



CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES

Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de la vitamina A en aceites comestibles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en el Instituto Boliviano de Metrología (IBMETRO).

Se desarrolló un método de análisis para la cuantificación de vitamina A por HPLC en aceites vegetales comerciales de soya y mezcla de soya-girasol, para el cual se elaboró un protocolo donde se detallan el método desarrollado en la institución de IBMETRO, el cual se muestra en el Anexo II.

Los resultados obtenidos del parámetro de desempeño de precisión, en términos de repetibilidad ($S_r=0,03935$) y precisión intermedia ($S_w=0,2029$), cumplieron satisfactoriamente con los criterios de aceptación establecidos. Entonces podemos concluir que el método reúne todas las condiciones apropiadas para el uso previsto.

Para el estudio del sesgo, se obtuvo un resultado de $\overline{\%b} = -0,17$, el cual nos muestra que el proceso de extracción y cuantificación de vitamina A desarrollado fue bastante eficiente al mostrar valores de medición muy cercanos al valor de referencia.

Para el estudio de rango de trabajo, se evaluó los niveles de concentración 1, 5, 10, 15 y 20 UI/g. Se encontró que el intervalo de confianza contiene al valor de referencia, por lo tanto, se acepta el rango de trabajo estudiado entre 1 a 20 UI/g como aceptable.

Para el estudio del parámetro de linealidad, se utilizó el estadístico t y un criterio de validación $|D_{EL}| \leq \text{Criterio } V$ para evaluar la significancia de los resultados, como el desvío de linealidad \leq Error permitido, el sistema de medición tiene la misma exactitud con respecto a todos los valores de referencia en el rango estudiado.

Del estudio de rango de trabajo y linealidad, se obtuvo que el rango lineal se encuentra entre 1,00 a 20,0 UI/g.

Para el análisis del parámetro de límite de detección y cuantificación, se hizo uso del estadístico de "t" para encontrar que la calidad de la recta obtenida fue aceptable. A través de los datos obtenidos de la evaluación de la linealidad, se calculó el límite de detección (0,0105 UI/g) y el límite de cuantificación (0,0210 UI/g), los cuales nos muestran los límites de la zona de detección y la zona de cuantificación.

Para el estudio del parámetro de desempeño de robustez, se evaluó la significancia de los efectos debido a la variación de 3 factores experimentales a través del estadístico t, el cual nos mostró que los efectos de los 3 factores no fueron significativos. Entonces el impacto de los errores de los componentes sistemáticos y aleatorios asociados al método de ensayo debido a la variación en 3 factores, no afectó la robustez del método dentro de rango de trabajo, por lo tanto, el método de ensayo es robusto y sólido para la matriz donde se aplica (aceite vegetal comestible) y el rango de trabajo ya definido, según las condiciones establecidas en el procedimiento.

Para la estimación de la incertidumbre de la medida, se identificó las fuentes posibles de incertidumbre, se calculó las contribuciones a la incertidumbre típica, y se encontró que la fuente de mayor incertidumbre proviene de la variación del valor nominal el cual representa un 97,13 % de la incertidumbre. A través de la incertidumbre típica se calculó la incertidumbre combina $\mu(R) = 0,3520 [UI/g]$, y el factor de cobertura $k = 2$ para finalmente calcular la incertidumbre expandida $U(R) = 0,7040 [UI/g]$ y la incertidumbre expandida relativa $U_R = 0,7057 \%$.

Por lo descrito en párrafos anteriores, se logró validar un método de cuantificación de vitamina A por HPLC, el cual es aplicable en el laboratorio donde se desarrolló el método, con todas las condiciones que le corresponden. Haciendo uso del método desarrollado y validado, se analizó 2 aceites comerciales, aceite vegetal de soya y mezcla de soya-girasol, para los cuales se determinó los valores de concentración de vitamina A correspondientes a cada aceite junto con la incertidumbre de medición para un factor de cobertura de $k = 2,23$, obteniéndose una concentración de $(62,34 \pm 1,13)$ UI/g para el aceite de soya, y $(64,24 \pm 1,10)$ UI/g para el aceite de mezcla soya-girasol.

Según la Norma Boliviana para los aceites comestibles de soya y mezcla de soya-girasol NB 161:2016 y NB 685:2016 respectivamente, el contenido de vitamina A debe encontrarse en un rango de 6000 a 6500 [UI/100 g] o su equivalente de 60 a 65 [UI/g], los resultados obtenidos nos indican que tanto el aceite de soya como el aceite de mezcla soya-girasol, están dentro de los límites establecidos según las Normas Bolivianas mencionadas.



7. RECOMENDACIONES

Para la validación de la metodología es recomendable utilizar un material de referencia certificado (MRC) de aceite vegetal con contenido de vitamina A para poder realizar análisis con mayor fiabilidad.

Es recomendable el uso de un gas (como el nitrógeno) que no interactúe con la vitamina A, evitando así su degradación por acción del oxígeno del ambiente durante el proceso de extracción de la vitamina.



8. BIBLIOGRAFÍA

- Araujo, K., Páez, G., Mármol, Z., Arenas, E., Cáceres, A., & Aiello Mazzarri, C. (2013). Validación de un método cromatográfico para la determinación de vitamina A en muestras de leche. *Revista Tecnocientífica URU*(5), 69-77.
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* (Cuarta ed.). México: PEARSON EDUCACIÓN.
- Bravo Bravo, M. d. (2013). *Hifenaciones Instrumentales entre la Cromatografía Líquida, Diferentes Sistemas Detectores y Nuevos Métodos de Pretratamiento de Muestras Para la Determinación de Vitaminas en Alimentos*. Murcia [Memoria: Universidad de Murcia].
- Carbajal Azcona, Á. (2013). *Vitamina A. Manual de Nutrición y Dietética* (Vol. 12). Obtenido de <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2013-07-24-cap-11-vitaminas.pdf>
- Chang, R., & Godsbey, K. A. (2017). *Química* (Duodécima ed.). McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.
- F.A.O., & O.M.S. (2019). *CODEX ALIMENTARIUS, NORMA PARA ACEITES VEGETALES ESPECIFICADOS, CXS 210-1999*. [Revisada y enmendada en 2019].
- García de Marina Bayo, A., & Yusá Marco, D. J. (2016). *HPLC instrumental* (Primera ed.). Universitat Politècnica de València.
- Gariner C., D. M., & Restrepo, P. (1997). DETERMINACIÓN DE VITAMINA A POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE) EN BIENESTARINA CRUDA. *Revista Colombiana de Química*, 26(1), 31-41.
- Guardado Pérez, J. A., & Mercader Trejo, F. E. (2005). *MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO "Guía de Laboratorio para la Validación de*

Métodos y Temas Relacionados" (Segunda ed.). México. Recuperado el 7 de Abril de 2021

Guerrero Postigo, H. P. (2021). *Evaluación de la incertidumbre de medición*. [Diapositiva de PowerPoint] Material del curso de "Estimación de la incertidumbre en las mediciones" según NB/ISO/IEC 17025:2018.

Guerrero Postigo, H. P. (2021). *Parte 2, Diseño del plan de verificación y validación*. [Diapositiva de PowerPoint] Material del curso de "Validación de métodos de ensayo para laboratorio" según NB/ISO/IEC 17025:2018.

Guerrero Postigo, H. P. (2021). *Parte 3, Estudio de precisión*. [Diapositiva de PowerPoint] Material del curso de "Validación de métodos de ensayo para laboratorio" según NB/ISO/IEC 17025:2018.

Guerrero Postigo, H. P. (2021). *Parte 4, Estudio de veracidad y linealidad*. [Diapositiva de PowerPoint] Material del curso de "Validación de métodos de ensayo para laboratorio" según NB/ISO/IEC 17025:2018.

Guerrero Postigo, H. P. (2021). *Parte 5, Estudio del rango de trabajo (ISO 13530, ISO 11842)*. [Diapositiva de PowerPoint] Material del curso de "Validación de métodos de ensayo para laboratorio" según NB/ISO/IEC 17025:2018.

Guerrero Postigo, H. P. (2021). *Parte 6, Estudio de selectividad, especificidad y robustez*. [Diapositiva de PowerPoint] Material del curso de "Validación de métodos de ensayo para laboratorio" según NB/ISO/IEC 17025:2018.

IBNORCA. (2005). *Aceites y grasas - Determinación de vitamina A como retinol en aceites y grasas comestibles por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (NB 34045)*. Julio.

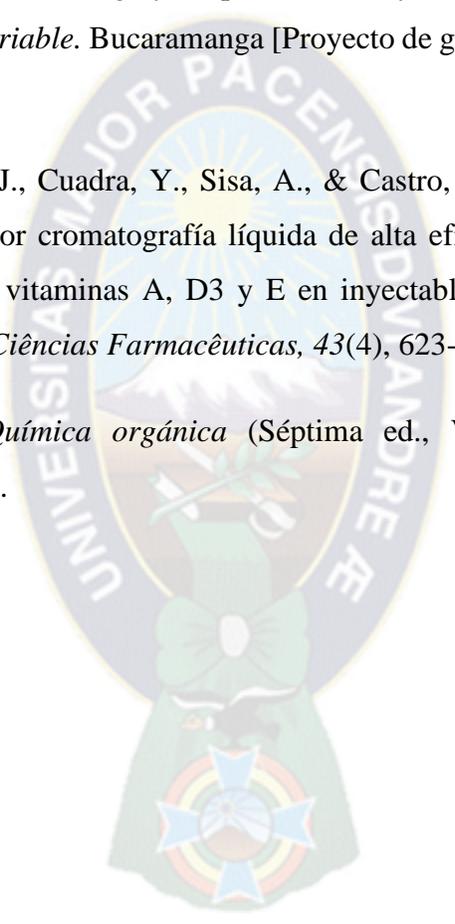
- IBNORCA. (2005). *Aceites y grasas - Determinación de vitamina A en aceites comestibles y alimentos - Método por cromatografía líquida de alta resolución (NB 34044)*. Enero.
- ISO/IEC. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (ISO/IEC 17025:2017)* (Tercera ed.).
- López Casanova, V. B. (2013). *Desarrollo y Validación de Metodología para la Determinación Simultánea de Vitaminas Liposolubles (A, D y E) en Muestras Biológicas*. Valdivia [Memoria: Universidad Austral de Chile], Chile.
- M. Baracaldo, C., & Castro de Navarro, L. (1998). Biodisponibilidad de carotenoides. *Biomédica*, 18(4), 285-290. Obtenido de <https://doi.org/10.7705/biomedica.v18i4.999>
- Martínez Rojano, H., Sámano, R., Tolentino, M., Morales Hernández, R. M., Ramírez, C., & Pizano Zárate, M. L. (2016). Utilidad de un método que determina simultáneamente retinol y alfa-tocoferol en leche materna por cromatografía líquida de alta resolución. *Perinatología y Reproducción Humana*, 30(4), 151-158. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.rprh.2016.11.009>
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Nueva York.
- P. De Leenheer, A., E. Lambert, W., & Van Bocxlaer, J. F. (2000). *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins* (Third ed.). New York: Marcel Dekker.
- Palacios Sánchez, L. (2013). Breve historia de las vitaminas. *Rev. Médica Sanitas*, 16(3), 142-145.

Pérez Calderón, R. (2000). ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA A EN ALIMENTOS INFANTILES INSTANTÁNEOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (HPLC). *Rev. Med. Exp.*, 17, 26-29.

Sánchez Reyes, L. M. (2016). *Desarrollo e implementación de métodos analíticos para la determinación y cuantificación de vitaminas A, E y C en jugos y productos lácteos usando cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta visible multivariable*. Bucaramanga [Proyecto de grado, Universidad Industrial de Santander].

Sierra, N., H. Rojas, J., Cuadra, Y., Sisa, A., & Castro, G. (2007). Validación de una metodología por cromatografía líquida de alta eficiencia para la determinación simultánea de vitaminas A, D3 y E en inyectables de uso veterinario. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(4), 623-630.

Wade, L. (2011). *Química orgánica* (Séptima ed., Vol. I). México: PEARSON EDUCACIÓN.



9. ANEXOS

ANEXO I

Equipos de laboratorio

Anexo 1 Espectrofotómetro UV-VIS



Marca Agilent Technologies, Cary Series UV-Vis Spectrophotometer

Modelo Cary 100 UV-Vis

Fuente: Elaboración propia

Anexo 2 Cromatógrafo de HPLC



Marca Agilent, Modelo 1260 Infinity II

Fuente: Elaboración propia

Anexo 3 pH-metro y soluciones buffer



Marca Mettler Toledo, Seven compact

Fuente: Elaboración propia

Anexo 4 Balanza analítica



Marca Mettler Toledo, Modelo XS204

Fuente: Elaboración propia

ANEXO II

Protocolo de cuantificación de vitamina A validado

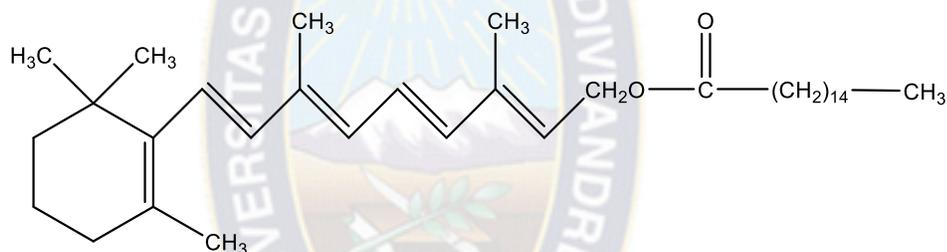
Objeto y campo de aplicación

Este protocolo establece el método para determinar vitamina A y se aplica en aceites vegetales comestibles de soya y mezcla de girasol-soya.

Definiciones

Analito

Vitamina A palmitato. $C_{36}H_{60}O_2$, $M = 524,86$ g/mol



Método de ensayo

Principio del método

Este es un método muy selectivo que no requiere de blancos. La muestra se saponifica con hidróxido de sodio en el etanol con dos propósitos (IBNORCA, 2005):

- a) Liberar el retinol de la matriz gelatinosa de la microcápsula.
- b) Hidrolizar el retinol de sus ésteres. Para extraer el retinol de la matriz, se utiliza el siguiente método:
 - a. Extracción con un solvente orgánico (n-hexano y acetona). El retinol se separa por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), utilizando una fase estacionaria apolar (ODC C_{18}) y como

fase móvil, metanol. El retinol se detecta con un detector de arreglo de diodos a 324 nm.

Punto críticos y precauciones

Es preferible separar y determinar la cantidad de retinol libre en vez de su palmitato, ya que el sistema de HPLC utilizado tiene mayor resolución, sensibilidad, precisión y rapidez con el primero (IBNORCA, 2005).

Para no tener problemas de degradación es recomendable utilizar antioxidantes (IBNORCA, 2005).

El método aquí descrito ha sido probado para aceites vegetales comestibles de soya y mezcla de soya-girasol fortificadas con vitamina A, sin embargo, este puede ser utilizado para otros aceites, con los consiguientes ajustes y validación (IBNORCA, 2005).

Materiales y equipos

- 1 soportes universales
- 1 balón base plana de 250 mL
- 4 pinzas de nuez (de 3 dedos)
- 1 termómetro
- 1 refrigerante serpentín
- 1 bol metálico para realizar el baño maría
- 1 Placa calefactora
- Perlas de ebullición para el bol metálico
- 10 Vasos de precipitado de 25 mL
- 25 unidades de Tubos falcon
- Jeringas de 5 mL
- Micropipetas de 5 y 1 mL
- Espectrofotómetro UV-VIS (Agilent) (ver Anexo 1)
- Cromatógrafo HPLC (Agilent) (ver Anexo 2)

- pH-metro (Mettler Toledo) (ver Anexo 3)
- Balanza analítica (Mettler Toledo) (ver Anexo 4)

Reactivos

- Hidróxido de sodio, p.a. (Merck)
- Etanol absoluto, p.a.
- Ácido ascórbico, 99,7 % (Scharlau)
- Cloruro de sodio, p.a. (Merck)
- n-hexano, grado HPLC (Merck)
- Acetona, p.a. (Merck)
- Retinol, 95 % (Sigma Aldrich)
- Metanol, grado HPLC (Merck)

Solución de hidróxido de sodio 50%

Pesar 50 g de hidróxido de sodio y aforar a 100 mL con agua bidestilada. Agitar vigorosamente y guardar en frascos de polietileno.

Solución de cloruro de sodio 1%

Pesar 1 g de cloruro de sodio, disolverlo con 100 mL de agua bidestilada, agitar vigorosamente. Preparar en el momento de análisis.

Mezcla de extracción

Mezclar acetona p.a. y n-Hexano grado HPLC relación 6:4 respectivamente.

Soluciones patrón

Solución madre de vitamina A (retinol)

Pesar 0,0032 g vitamina A (retinol 95 %) en un frasco ámbar, diluir con metanol grado HPLC hasta llegar a un peso total de 10 g.

Solución patrón de vitamina A (retinol) de 1 UI/g

Tomar un alícuota de 0,0030 g de la solución madre de vitamina A a un frasco ámbar, diluir con metanol grado HPLC hasta un peso total de 3 g.

Solución patrón de vitamina A (retinol) de 5 UI/g

Tomar un alícuota de 0,0150 g de la solución madre de vitamina A a un frasco ámbar, diluir con metanol grado HPLC hasta un peso total de 3 g.

Solución patrón de vitamina A (retinol) de 10 UI/g

Tomar un alícuota de 0,0300 g de la solución madre de vitamina A a un frasco ámbar, diluir con metanol grado HPLC hasta un peso total de 3 g.

Solución patrón de vitamina A (retinol) de 15 UI/g

Tomar un alícuota de 0,04500 g de la solución madre de vitamina A a un frasco ámbar, diluir con metanol grado HPLC hasta un peso total de 3 g.

Solución patrón de vitamina A (retinol) de 20 UI/g

Tomar un alícuota de 0,0600 g de la solución madre de vitamina A a un frasco ámbar, diluir con metanol grado HPLC hasta un peso total de 3 g.

Procedimiento

Saponificación

Pesar 5 g de muestra, se agrega en un balón de fondo plano de 250 mL, adicionar 50 mL de etanol absoluto, 0,01 g de ácido ascórbico y 10 mL de hidróxido de sodio al 50%. Poner el balón en un baño de agua en ebullición con un condensador de reflujo. Reflujar por 2 h y luego enfriar por 5 min. Transferir el contenido completo del balón a un matraz volumétrico de 100 mL y aforar con agua bidestilada.

Extracción con hexano

En un embudo de separación poner 10 mL de muestra, 2 mL de etanol absoluto, 2 mL de cloruro de sodio al 1 % y 5 mL de mezcla. Agitar vigorosamente durante 2 min, dejar separar las dos fases y usando una pipeta, coloque la fase orgánica (superior) en un embudo de separación, agregar 5 mL de mezcla, 2 mL de etanol y 2 mL de cloruro de sodio a la fase orgánica y repetir el procedimiento. Lavar la fase orgánica en el embudo de separación agregando 10 mL de agua bidestilada hasta que no se evidencie un cambio color con 3 gotas de fenolftaleína o medir su pH hasta que la solución se encuentre a un pH = 7. Finalmente extraer la fase orgánica y evaporar a baño maría el solvente para después disolverlo en 2 mL de metanol para su respectivo análisis por HPLC. Analizar el extracto lo más pronto posible.

Cromatografía

Filtrar el extracto de vitamina A con un filtro de membrana de 0,45 μm y recoger el filtrado a un vial de ámbar para HPLC.

Inyectar las soluciones patrón y las muestras con las siguientes condiciones cromatográficas.

Fase móvil	Metanol 100%
Flujo	1 mL/min
Columna	ODC C18
Detector	DAD
Longitud de onda	324 nm
Temperatura de la columna	30°C
Volumen de inyección	20 μL
Tiempo de retención	2,8 min
Tiempo de cromatograma	5 min

Expresión de los resultados

Es necesario elaborar la curva de calibración y así obtener la ecuación lineal cuyo factor de correlación debe ser mayor o igual a 0,9996 para su segura aplicación en la evaluación del contenido de vitamina A en la muestra (IBNORCA, 2005).

X (Estándar)	Y
Concentración de Retinol $\mu\text{g/mL}$ de metanol	Área en HPLC
N1	A f(N1)
N2	A f(N2)
N3	A f(N3)

$$Y = a + bX$$

$$X = \frac{(Y - a)}{b} \text{ (Ecuación de la curva de calibración del estándar)}$$

Donde:

Y = área

X = concentración de retinol ($\mu\text{g/mL}$)

Para la el cálculo de la concentración de retinol en la muestra se aplica la siguiente expresión matemática (IBNORCA, 2005).

$$\text{Retinol } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{C_{\text{HPLC}} \times V_r \times V_i}{V_a \times P} \times 100$$

Donde:

C_{HPLC} : Concentración de Retinol $\mu\text{g/mL}$ calculado para la muestra en función de su área en la ecuación de la curva de calibración del estándar.

V_r : Volumen de metanol en el que se disolvió la muestra para inyectar al sistema (2 mL)

V_a : Volumen de alícuota para extraer (10 mL)

V_i : Volumen inicial de la muestra (100 mL)

P: Peso de la muestra

Se debe tener registrado todos los datos desde el comienzo del análisis, desde el peso inicial, volumen inicial, alícuota tomada para la extracción y el volumen de dilución de la muestra para inyectar al HPLC (IBNORCA, 2005).

Equivalencia

Como la expresión de los alimentos fortificados que contienen vitamina A suele estar expresado en término de Unidades Internacionales de Vitamina A contenido, se presenta la siguiente equivalencia.

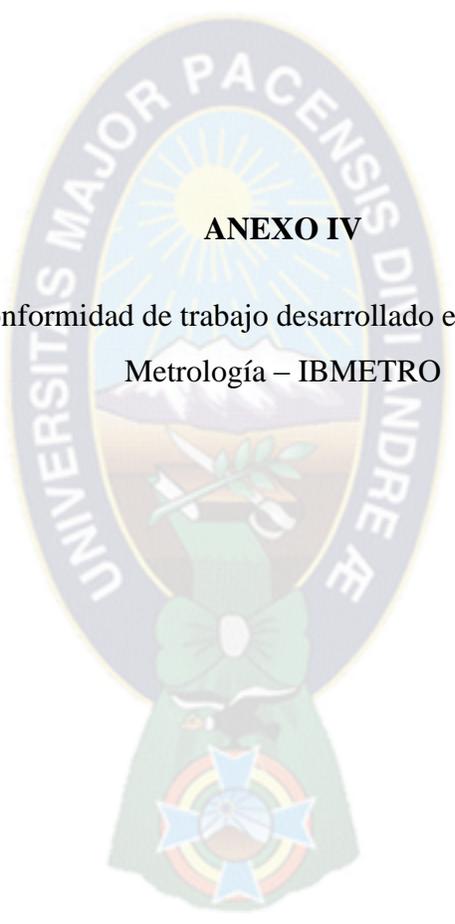
1 U.I. de vitamina A = 0,3 µg de Retinol All Trans



ANEXO III

Anexo 5 Planificación de validación del método

N°	Actividad	Estado a la fecha (%)	Mes 1				Mes 2				Mes 3				Mes 4			
			Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
1	Validación	100																
2	Establecimiento del plan de validación	100																
3	Determinación de la Precisión (repetibilidad, reproducibilidad interna)	100																
4	Determinación de la Veracidad (sesgo)	100																
5	Determinación de la Linealidad	100																
6	Determinación del Rango de trabajo	100																
7	Determinación del Límite de detección	100																
8	Determinación del Límite de cuantificación	100																
9	Determinación de la Robustez	100																
10	Determinación de la Incertidumbre de medición	100																
11	Evaluación de los resultados obtenidos en el proceso de validación	100																
12	Elaboración del protocolo de cuantificación de vitamina A por HPLC en aceites vegetales comestibles	100																



ANEXO IV

Documento de conformidad de trabajo desarrollado en el Instituto Boliviano de
Metrología – IBMETRO



INSTITUTO BOLIVIANO
DE METROLOGÍA



ESTADO PLURINACIONAL DE
BOLIVIA

MINISTERIO DE DESARROLLO
PRODUCTIVO Y ECONOMÍA PLURAL

La Paz 03 de febrero de 2022

Dr. Heriberto Castañeta M.
DIRECTOR DE CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS
Presente.-

Ref.: Conformidad de trabajo desarrollado en el Instituto Boliviano de Metrología - IBMETRO

Distinguido doctor, mediante la presente doy **CONFORMIDAD** que la universitaria GILDA LINA CRUZ OCHOA, con C.I. 10022616 LP., realizó su trabajo dirigido para optar al grado de licenciatura, con título "**DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA A EN ACEITES VEGETALES POR CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**" en el Laboratorio de Orgánica de la Unidad de Metrología Química correspondiente a la Dirección de Metrología Industrial y Científica, el cual ha cumplido y concluido con las exigencias requeridas.

Es cuanto certifico para fines que convengan a la interesada.



Miembro de:



g. l. p.
Marcos L. Quiró
DIRECTOR DE METROLOGÍA
INDUSTRIAL Y CIENTÍFICA
INSTITUTO BOLIVIANO DE METROLOGÍA
IBMETRO

LA PAZ: Av. Camacho No. 1488 - Telf./Fax (+591 2) 2372046, 2310037, 2147945
COCHABAMBA: Calle Tumusla No. 510 esq. México - Telf./Fax (+591 4) 4520856
SANTA CRUZ: Calle Combate Bella Flor N° 3230 - Telf./Fax (+591 3) 3410922

TARIJA: Calle Ingavi N° 156 Edif. Coronado Piso 2 of. 204 Telf./Fax (+591 4) 6658866
SUCRE: Calle Luis Paz Arce y George Rouma N° 108 - Telf. (+591) 71559129
RIBERALTA: Av. Amazonica S/N CADEXNOR - Telf./Fax (+591) 67359342
COBIJA: Carretera Porvenir km 14.5 Zona Franca - Telf. (+591) 71525861

800-10-9999

www.ibmetro.gob.bo

info@ibmetro.gob.bo