

**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 DETECTOR ULTRAVIOLETA VISIBLE MULTIVARIABLE.**

**LINA MARÍA SÁNCHEZ REYES**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**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 DETECTOR ULTRAVIOLETA VISIBLE MULTIVARIABLE.**

**LINA MARÍA SÁNCHEZ REYES**

**Cód. 2091640**

**Proyecto de Grado en modalidad de Trabajo de Investigación para optar al título de Química**

**DIRECTOR**

**LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO**

**PHD QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y CIENCIA DE ALIMENTOS**

**CO-DIRECTOR**

**ARLEY RENÉ VILLAMIZAR JAIMES**

**QUÍMICO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2016**

A Dios y a mi principal fuente de  
Inspiración mi hijo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Laboratorio de alimentos CICTA, especialmente a mi Director de tesis el profesor Luis Javier López y a mi codirector Arley Villamizar por darme la oportunidad de trabajar con ellos y por depositar su confianza en mi trabajo. También a los demás profesionales del laboratorio por compartir su conocimiento y experiencia conmigo.

Agradecerles a mi mamá, mi papá y mi hermana por el apoyo, confianza y acompañamiento que me brindaron, que a pesar de todo siguieron a mi lado hasta el último momento, ayudándome a cumplir este logro. A mi hijo porque fue quien estos dos últimos años me impulso a seguir adelante para brindarle un mejor futuro.

También quiero agradecerles a las tres personitas más especiales que conocí durante mi paso por la universidad, mi consejero espiritual, Andresito, porque ha sido quien me llena de paz en momento de tempestad, a Giselle y Luz porque llegaron a mi vida en el momento ideal para brindarme su amistad incondicional y alegrarme la vida a su manera.

Por último, la profesora Luz Ángela Carreño por su orientación y compromiso con la evaluación de mi proyecto de grado y a todas aquellas personas gratas que aportaron algo a mi formación profesional y como persona.

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	15
1. OBJETIVOS.....	18
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
2. MARCO TEORICO .....	19
2.1. MARCO CONCEPTUAL.....	19
2.1.1. VITAMINAS .....	19
2.1.1.1. VITAMINAS LIPOSOLUBLES. ....	19
2.1.1.1.1. VITAMINA A (RETINOL).....	19
2.1.1.1.2. VITAMINA E. ....	21
2.1.1.2. VITAMINAS HIDROSOLUBLES. ....	23
2.1.1.2.1. VITAMINA C.....	23
2.1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) .....	24
2.1.2.1. GENERALIDADES EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	24
2.1.2.2. DETECTORES USADOS COMÚNMENTE EN HPLC .....	26
2.2 ANTECEDENTES.....	27
2.2.1 ANÁLISIS DE VITAMINAS LIPOSOLUBLES EN ALIMENTOS (VITAMINA A Y E).....	27
2.2.2 ANÁLISIS DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES (VITAMINA C) EN ALIMENTOS. ....	30
2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	34
2.4 INCERTIDUMBRE.....	36
2.5. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA.....	37

3. PARTE EXPERIMENTAL.....	39
3.1. MATERIALES Y REACTIVOS.....	39
3.1.1. REACTIVOS Y SOLVENTES.....	39
3.1.1.1. VITAMINAS LIPOSOLUBLES (A Y E). .....	39
3.1.1.2. VITAMINA C. ....	39
3.1.2. PATRONES Y MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO.....	39
3.1.3. MUESTRAS .....	39
3.2. EQUIPOS Y MATERIAL DE LABORATORIO .....	40
3.2.1. MATERIAL DE LABORATORIO.....	40
3.2.2. CROMATÓGRAFO LÍQUIDO .....	40
3.3. PROCEDIMIENTO .....	40
3.3.1 PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL ANÁLISIS DE VITAMINA A Y E..	40
3.3.2 PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL ANÁLISIS DE VITAMINA C.....	41
3.3.2. EXTRACCIÓN DE LAS VITAMINAS LIPOSOLUBLES (VITAMINA A Y E)	41
3.3.3. EXTRACCIÓN DE VITAMINA C.....	42
3.4. FIGURAS DE MÉRITO PARA LA VALIDACIÓN .....	42
3.4.1. SENSIBILIDAD .....	42
3.4.2. RANGO DINÁMICO LINEAL (RDL) .....	42
3.4.3. NIVEL MÍNIMO DE DETECCIÓN (NMD) Y DE CUANTIFICACIÓN (NMQ)	43
3.4.4. PRECISIÓN.....	43
3.4.5. RECUPERACIÓN .....	44
3.4.6. EXACTITUD.....	44
3.5. INCERTIDUMBRE.....	45
3.5.1. TIPO A O ALEATORIO.....	45
3.5.2. TIPO B O SISTEMÁTICO .....	45
4. RESULTADOS.....	47

4.1. ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL ESTUDIO DE LA VITAMINA C.....	47
4.2. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA LA VALIDACIÓN.....	48
4.2.1. EVALUACIÓN DEL RANGO DINÁMICO LINEAL Y SENSIBILIDAD DEL MÉTODO.....	48
4.2.2. DETERMINACIÓN DEL NIVEL MÍNIMO DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	51
4.2.3. DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN DEL MÉTODO.....	52
4.2.4. DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO.....	55
4.2.5. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.....	56
4.2.6. DETERMINACIÓN DE VITAMINAS EN MUESTRAS COMERCIALES. .	57
4.2.7. DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA. ....	64
5. CONCLUSIONES.....	66
6. RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	77

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Características generales de la vitamina A.....	20
Tabla 2.	Cienciometría del análisis de vitaminas liposolubles en condiciones experimentales similares a las utilizadas en este trabajo.....	32
Tabla 3.	Cienciometría del análisis de vitamina C utilizando HPLC-UV .....	33
Tabla 4.	Parámetros del equipo de HPLC para el análisis de vitaminas .....	41
Tabla 5.	Evaluación del rango dinámico lineal y sensibilidad. ....	50
Tabla 6.	Nivel mínimo de detección y cuantificación de las vitaminas A, E y C .	51
Tabla 7.	Repetibilidad de los tiempos de retención para vitamina C. ....	52
Tabla 8.	Repetibilidad de las áreas para la vitamina C.....	53
Tabla 9.	Repetibilidad de tiempos de retención de una mezcla de vitamina A y E en tres concentraciones diferentes. ....	53
Tabla 10.	Repetibilidad de áreas de una mezcla de vitamina A y E en tres concentraciones diferentes. ....	53
Tabla 11.	Precisión intermedia de los tiempos de retención para la vitamina C .....	54
Tabla 12.	Precisión intermedia de las áreas para la vitamina C .....	54
Tabla 13.	Precisión intermedia tiempos de retención para una mezcla de vitamina A y E en tres concentraciones diferentes.....	54
Tabla 14.	Precisión intermedia de áreas de una mezcla de vitamina A y E en tres concentraciones diferentes. ....	55
Tabla 15.	Resultados para determinar la exactitud del método. ....	55
Tabla 16.	Resultados del porcentaje de recuperación. ....	56
Tabla 17.	Resultados generales de validación y confirmación de los métodos cromatográficos.....	57
Tabla 18.	Resultados del análisis de vitaminas A y E en muestras comerciales. ....	63
Tabla 19.	Resultados del análisis de vitamina C en muestras comerciales .....	63

Tabla 20. Resultados de prueba t para la determinación de vitaminas A y E en lácteos.....	64
Tabla 21. Resultados de prueba t para la determinación de vitamina C en jugos ... ..	64
Tabla 22. Incertidumbre para el método de la vitamina C.....	65
Tabla 23. Incertidumbre de la medida para el método de determinación de vitaminas liposolubles .....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los vitámeros de la vitamina E .....	22
Figura 2. Estructura de la vitamina C .....	24
Figura 3. Distribución t .....	38
Figura 4. Perfil cromatográfico de un jugo certificado con fase móvil Parte superior solución de ácido ortofosfórico a pH 2,8, parte inferior Solución Buffer fosfato de sodio (0,1M a pH 3) .....	47
Figura 5. Curva de calibración vitamina C .....	49
Figura 6. Curva de calibración vitamina A .....	49
Figura 7. Curva de calibración vitamina E .....	50
Figura 8. Perfil cromatográfico del análisis de vitaminas A y E en leche fortikids.	58
Figura 9. Perfil cromatográfico del análisis de vitaminas A y E en leche en polvo. .....	59
Figura 10. Perfil cromatográfico del análisis de vitaminas A y E en mantequilla. .... .....	59
Figura 11. Perfil cromatográfico del análisis de vitaminas A y E en yogurt. ....	60
Figura 12. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en jugo de naranja. ....	61
Figura 13. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en jugo néctar. ....	61
Figura 14. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en jugo con fibra. ....	62
Figura 15. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en bocadillo. ....	62
Figura 16. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en pulpa de guayaba. ... .....	63

## RESUMEN

**TÍTULO:** 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.\*

**Autor:** Lina María Sánchez Reyes\*\*

**Palabras clave:** Vitaminas liposolubles e hidrosolubles, HPLC, UV-Vis longitud de onda multivariable, validación, implementación, confirmación.

### **Descripción:**

En el presente proyecto 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.

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%.

Los resultados obtenidos permiten demostrar que los métodos desarrollados son precisos, exactos, lineales y confiables, pueden ser empleados en análisis de rutina en el laboratorio de alimentos CICTA para determinar vitaminas liposolubles en productos lácteos y análisis de vitamina C en jugos y productos néctar.

\*Trabajo de Grado

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director; Luis Javier López Giraldo.

## ABSTRACT

**Title:** Development and implementation of analytic methods for vitamins A, E and C determination and quantification in juices and milk products using High Performance liquid chromatography with multivariable ultraviolet – visible detection.\*

**Author:** Lina María Sánchez Reyes\*\*

**KeyWords:** Hydrosoluble and fat-soluble vitamins. HPLC. Multivariable UV-Vis wavelength. Validation. Implementation. Confirmation.

### Description

In the present work, an analytic method for vitamin C determination in nectar juices and products was developed; also a method for fat-soluble vitamins A and E analysis in milk products was confirmed. The merit analytic figures were determined to confirm that the obtained results by these techniques were valid, coherent and reliable for regulator entities and customers. Furthermore, the use of these methods for the analysis of samples is confirmed, confirming that there are no significant differences between the results and those reported by the merchant

Linearity was evaluated with the obtained results from de calibration curve where  $R^2 > 0.999$  and detection limits ad quantification between 0,06-1,79 ppm and 0,19-5,96 ppm values respectively were observed. Precision was evaluated in terms of retention times and area repeatability and intermediate accuracy, obtaining percentages of CV < 5%. Vitamin C method accuracy was determined analyzing a certificated reference material and results veracity was proved using a t student statistical test. Finally, for fatsoluble vitamins method, the accuracy was evaluated as recovery percentage, obtaining values between 86-108%.

The obtained results demonstrate that developed methods are precise, accurate, linear and reliable. They can be used in routine analysis in CICTA food laboratory to determine fat-soluble vitamins in milk products and vitamin C analysis in nectar products and juices

\*Grade work

\*\* Faculty of Science, School of Chemistry. Director; Luis Javier Giraldo López.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, el análisis de alimentos es un campo de investigación importante en la química, debido a la necesidad de productos alimenticios que sean más seguros, saludables y funcionales. Aunque inicialmente hubo mayor interés en la presencia de aditivos, toxinas, contaminantes o residuos en los alimentos, los estudios también han sido 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 estos en la nutrición. Por ello, la determinación del contenido de vitaminas no solo es de importancia para el control de calidad de las empresas, sino también para los consumidores, quienes han adoptado una postura más estricta respecto a los beneficios de los alimentos que consumen.

Esta necesidad de los consumidores por mejorar su alimentación y conocer los nutrientes que traen los alimentos que consumen, conduce a la búsqueda de técnicas analíticas más precisas y eficientes para cuantificar vitaminas. En la literatura se encuentra gran variedad de publicaciones con estudios realizados mediante diferentes técnicas analíticas, que incluyen aproximaciones fluorimétricas, colorimétricas, potenciométricas y cromatográficas.[1–3]

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 fisiológico. Se divide 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, fluorometría, 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 70s el método escogido para el análisis de vitaminas en alimentos es HPLC [4], debido a que esta técnica no necesita derivatización de la muestra, no es una técnica destructiva y la detección es selectiva.

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 cuenten. El interés por mejorar estos análisis y además validar los métodos que se lleven a cabo es asegurar que se producen resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto.

En la resolución 333 de 2011[5], se establece el reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano. En esta resolución el ministerio de protección social obliga la declaración de nutrientes en cualquier tipo de alimento que declare información nutricional. Allí se dispone que las cantidades de vitaminas A, C y E deben expresarse con el número entero más cercano a la unidad en porcentajes del valor diario por porción de alimentos, pero no hacen obligatoria este reporte para alimentos que contiene cantidades inferiores al 2% del valor de referencia por porción de alimento; pero si se debe reportar al final de la tabla nutricional que este alimento no es fuente significativa de estas vitaminas. Estos valores reportados deben ser el resultado de estudios realizados por métodos analíticos y que hayan sido validados, que se haya comprobado que es un método sensible, robusto, veraz, y confiable.

Debido a esta resolución y a la importancia de reportar los valores de vitaminas en los alimentos empacados, se hace completamente necesario que en los laboratorios que se quiera realizar estos análisis, se validen los métodos desarrollados y se compruebe con materiales de referencia la confiabilidad de los resultados.

En este trabajo realizado en el Laboratorio de Alimentos CICTA de la Universidad Industrial de Santander se desarrolló e implemento un método analítico para la determinación de vitamina C en jugos y se confirmó un método para la cuantificación de vitaminas liposolubles (vitamina A y vitamina E) en productos lácteos, utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia con un detector de radiación ultravioleta multivariable (UV-VIS). Esto debido a la necesidad del laboratorio de alimentos CICTA 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. OBJETIVOS**

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar e implementar un método analítico para la determinación de vitamina C en jugos, y confirmar una metodología para la cuantificación de vitamina A y E en productos lácteos para el Laboratorio de Alimentos de la Universidad Industrial de Santander CICTA.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Desarrollar un método cromatográfico para la determinación y cuantificación de vitamina C.

Implementar un método cromatográfico para determinación y cuantificación de vitaminas liposolubles (A y E).

Construir las figuras analíticas de mérito para la confirmación de los métodos analíticos desarrollados por HPLC.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. MARCO CONCEPTUAL

#### 2.1.1. Vitaminas

Las vitaminas son un grupo de sustancias orgánicas de variada estructura y bajo peso 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 solo sintetiza algunas vitaminas, estas deben ser ingeridas en la dieta diaria o en suplementos multivitamínicos[6]. Aunque se necesiten en pocas cantidades, su ausencia determinará el éxito o fracaso en los procesos básicos y fundamentales del metabolismo celular. Se conocen 13 vitaminas esenciales en la nutrición humana y son clasificadas en dos grupos de acuerdo a su solubilidad[6–8], 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.

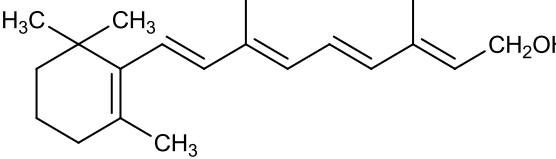
2.1.1.1. Vitaminas liposolubles. Estas vitaminas son solubles en grasas y aceites, se almacenan en tejidos adiposos del cuerpo y en el hígado, por lo que no es necesario consumir diariamente alimentos ricos en estas vitaminas[9].

2.1.1.1.1. Vitamina A (Retinol). Fue descubierta por una pareja de investigadores (Elmer Verner Mc Collum y Marguerite Davis) de la Universidad de Wisconsin-Madison y al mismo tiempo, por otra pareja de científicos de la Universidad de Yale (Lafayette Mendel y Thomas Burr Osborne) en 1917, mientras estudiaban los efectos de la grasa en la dieta. La llamaron A, al considerarla como el primer factor que afectaba a las personas con sobrepeso y obesas. Harry Steenbock, descubrió en 1919 la relación que había entre los pigmentos amarillos de algunas plantas ( $\beta$ -caroteno) y la vitamina A [10].

La vitamina A es un alcohol primario poliénico isopropenoide 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  $\beta$ -caroteno. [11]

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 almacenado y de la forma de conservación[12]. En la tabla 1, se presenta la estructura, función, algunas propiedades fisicoquímicas y las fuentes primarias de esta vitamina.

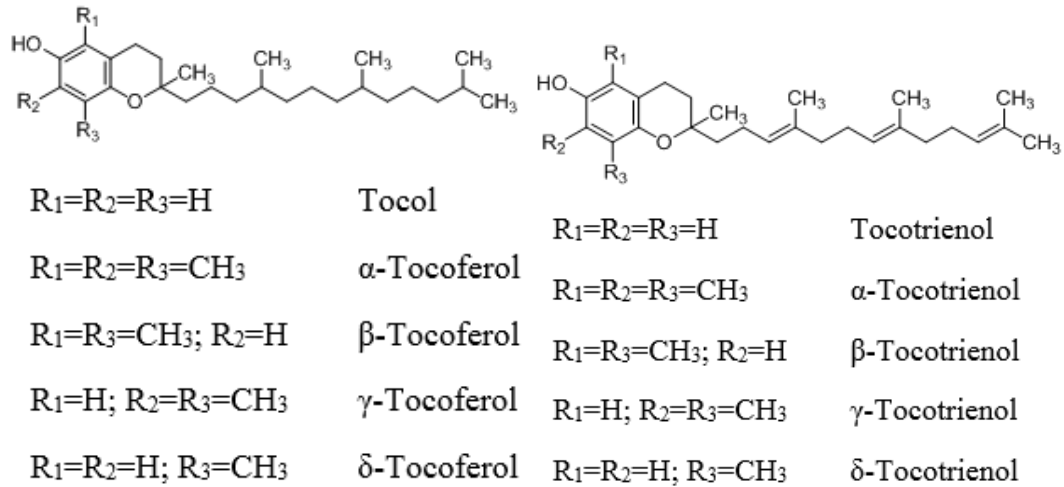
Tabla 1. Características generales de la vitamina A

Vitamina A (retinol) $C_{20}H_{30}O$	Nombre IUPAC: 3,7-dimetil-9-(2, 6,6-trimetil-1-ciclohexenil) -nona-2, 4, 6,8-tetraen-1-ol.	Cita bibliográfica
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.	[9,12]
Estructura		[13]
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.	[14]
Propiedades fisicoquímicas	Punto ebullición: 122.5°C, punto de fusión: 63°C, Color: amarillo, soluble en: metanol, acetona y cloroformo.	[13]

2.1.1.1.2. Vitamina E. Fue descubierta por dos estadounidenses en 1922, Herbert Mclean Evans y Katehrine Bishop [10]. Al realizar un experimento con ratas, donde las alimentaban con alimentos que contenían únicamente vitaminas conocidas hasta ese momento (A, B, C y D) y observaron que éstas no podían reproducirse. Luego las empezaron a alimentar con germen de trigo y lechuga y este problema se resolvió, así pudieron concluir que en estos alimentos había un componente que ayudaba a la reproducción. Años después, en 1925, Evans propuso denominarlo vitamina E, y al conocer los efectos que causaba la falta de esta vitamina en el cuerpo la denominó “tocoferol” (del griego Tocos: descendencia y Pherein: llevar) [15].

El termino vitamina E es utilizado para designar un grupo de ocho isómeros naturales de tocoferoles y tocotrienoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) (figura 1). Los tocoferoles derivan del tocol, que tiene un anillo aromático, llamado cromano con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide. Si la cadena poliprenoide es saturada corresponderán a los tocoferoles y si es insaturada a los tocotrienoles. Estos ocho isómeros varían según el grupo que se encuentre en la posición 5, 7 y 8 del anillo central de cromanol. El isómero  $\alpha$ -tocoferol es la forma más abundante en la naturaleza y es la que tiene mayor actividad biológica. [(15),(16)]

Figura 1. Estructura de los vitámeros de la vitamina E



La principal función que tiene la vitamina E es su acción antioxidante, la cual se le atribuye por su capacidad de proteger las membranas celulares, impidiendo la oxidación de éstas por los radicales libres [17]. Otras propiedades de esta vitamina son: inhibir la síntesis de prostaglandinas y la agregación plaquetaria; su déficit aumenta la posibilidad de que ocurra hemólisis en los eritrocitos; inhibir la actividad de ciertas enzimas como la creatinina kinasa y xantina oxidasa. Estas propiedades de la vitamina E son las que relacionan su deficiencia con enfermedades como las cataratas, cáncer, diabetes, Alzheimer, etc. También se ha encontrado que la vitamina E tiene gran importancia biológica en la reproducción y esencialmente como micronutriente; y tiene efectos sobre la señalización celular y la expresión génica.[10,16]

Las fuentes principales de esta vitaminas son los aceites vegetales (soja, maíz, algodón, y girasol), granos, hojas y partes verdes de las plantas y en el tejido adiposo de los animales. Productos de cereales integrales, pescado, carne, huevos, productos lácteos también proporcionan cantidades significativa de vitamina E. [17,18]

2.1.1.2. Vitaminas hidrosolubles. Estas vitaminas actúan como coenzimas o precursores de ellas, que tienen un funcionamiento activo en el organismo y exhiben actividad *in vivo*, son compuestos solubles en agua. Las vitaminas hidrosolubles son esenciales para las funciones metabólicas y fisiológicas de los seres humanos [19].

2.1.1.2.1. Vitamina C. La vitamina C es un cofactor redox y catalizador en una amplia gama de reacciones y procesos bioquímicos [20]. Con este nombre se designa a todos los compuestos que tienen una actividad biológica equivalente al ácido ascórbico, el cual tiene la capacidad de curar y prevenir el escorbuto.

El ácido ascórbico es un derivado de los hidratos de carbono, tiene una estructura de cetona cíclica que corresponde a la forma enólica de la 3-ceto-1-gulofuranolactona (figura 2); contiene un enol entre los carbonos 2 y 3 que lo hace un agente ácido y altamente reductor, por lo que se oxida muy fácilmente. Se puede sintetizar químicamente a partir de la glucosa, mediante una serie de reacciones enzimáticas [20–22].

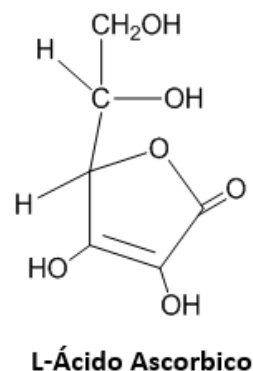
Naturalmente se encuentra en vegetales frescos y frutas. En las frutas que se encuentra mayor cantidad de vitamina C es en los cítricos, melón, kiwi, mango, papaya, piña, fresas, frambuesas, moras y arándanos (frutos rojos) y sandía; y los vegetales con mayor cantidad de vitamina C son: brócoli, coles de bruselas, coliflor, pimientos rojos y verdes, espinaca, repollo, nabos verdes y otras verduras de hoja, papa y tomates. Es importante incluir estos alimentos en la dieta diaria pues esta vitamina no la produce el cuerpo aunque sí es almacenada en él [22–24]. Entre las funciones de la vitamina C se encuentran:

- Participa en la síntesis de colágeno, lípidos, proteínas, norepinefrina, serotonina y L-carnitina.

- Se necesita para el crecimiento y reparación de tejidos en todas las partes del cuerpo.
- Es un importante antioxidante que bloquea parte del daño causado por los radicales libres.

Su deficiencia en el cuerpo causa el escorbuto, esta enfermedad vuelve al individuo muy susceptible a contraer diversas infecciones, también provoca inflamación articular, hemorragias subcutáneas e incapacidad de los osteoblastos para funcionar. [22,25].

Figura 2. Estructura de la vitamina C



### 2.1.2. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

2.1.2.1. Generalidades en cromatografía líquida. 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) [26]. 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. Esta técnica se desarrolló a principios de 1960, y se ha convertido en una

herramienta esencial para el análisis químico de diversas sustancias. Una de las aplicaciones más comunes es el análisis de alimentos, campo en el cual se ha ganado gran aceptación dada la necesidad de realizar análisis rápidos de nutrientes y la facilidad de automatizar los procedimientos analíticos [27].

Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria se divide en cuatro tipos [28]:

1. Cromatografía de adsorción
2. Cromatografía de partición
3. Cromatografía de intercambio iónico
4. Cromatografía de exclusión

A demás se hace otra división de los dos primeros tipos de cromatografía anteriormente mencionados, basándose en la polaridad de la fase estacionaria

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.[27]

Otra clasificación es según el modo de operación, que se basa en el mecanismo por el cual se extrae la muestra de la columna [26]:

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.[23-24], [26]

2.1.2.2. Detectores usados comúnmente en 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.

Hay dos clases de detectores, detectores selectivos (dan diferente respuesta dependiendo de la estructura molecular de la muestra que se está analizando, por ejemplo, detectores de absorbancia y fluorescencia) y los detectores universales (la respuesta es similar para la mayoría de compuestos, por ejemplo, detector de índice de refracción) [27]. Los requisitos principales para escoger un buen detector es su sensibilidad, que dé respuesta lineal amplia, rápida y reproducible [29].

Para el análisis de alimentos algunos de los detectores usados son: detector UV-Vis, de fluorescencia, espectrómetro de masas, electroquímico y de quimioluminiscencia. El detector de UV-Vis, es predominantemente un detector sensible a las propiedades del soluto, por eso se debe elegir una fase móvil

completamente transparente a la longitud de onda del detector. Hay tres tipos de este detector, el detector de longitud de onda fija, el detector de longitud de onda variable y el detector de arreglo de diodos [28–30]. Las características más importantes de este tipo de detectores son: que otorga un funcionamiento óptimo con mínimo ruido, poseen una sensibilidad mejorada, le otorga una relación señal/ruido mejorada gracias al uso de la lámpara de deuterio y permite controlar la variación térmica

## **2.2 ANTECEDENTES**

### **2.2.1 Análisis de vitaminas liposolubles en alimentos (vitamina A y E)**

La presencia de vitaminas en el cuerpo es esencial para la producción de energía y para mantener un buen metabolismo, dado que el cuerpo no almacena estos compuestos y la mayoría no son producidos por él, estos nutrientes deben ser ingeridos en los alimentos de consumo diario. Por esto, se han desarrollado diferentes métodos para realizar estos análisis, pero en los últimos años [31] el método cromatográfico se ha convertido en una técnica indispensable para la determinación rápida y específica de las vitaminas en los alimentos. Más exactamente la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es la técnica cromatográfica más utilizada y prácticamente estándar para estos análisis, gracias a que se puede automatizar y es una técnica muy sensible e incluso fácil de realizar [9].

El contenido de vitaminas liposolubles en los productos alimenticios puede variar dependiendo de los alimentos que lo componen y los tratamientos a los que estén sometidos. Por ejemplo la vitamina A varía según la forma en que se prepara y almacena, esta puede ser bastante inestable a pH inferiores de 4,5, estas condiciones de pH bajo causan isomerización de trans-retinol a cis-retinol que es la forma menos potente de esta vitamina; también puede ocurrir desesterificación de los ésteres de esta vitamina formando el retinol más lábil. La vitamina E varía

según el origen de los alimentos, la preparación, la temperatura de almacenamiento y la edad del producto alimenticio.

En la literatura se encuentran publicaciones de estudios donde han analizado las vitaminas según su clasificación. En 1995 Hewavitharana *et al.* [32], adecuaron un método para la determinación simultánea de las vitaminas A, E y  $\beta$ -carotenos en muestra de lácteos, el cual ahorra tiempo y resulta económico para el laboratorio que lo realice. Encontraron que el método logra mostrar un valor real de vitamina A, teniendo en cuenta las diferentes formas isoméricas y sus actividades biológicas. En este método primero se extrajo la materia grasa de los lácteos utilizando una versión modificada del método de Rose-Gottlieb [33], este extracto se analizó por HPLC en fase normal usando columna de sílice y un detector de fluorescencia y UV-Vis. Otros autores realizan análisis simultáneo de vitaminas liposolubles por HPLC pero varían el detector utilizado. Por ejemplo, Delgado *et al.*, en 1996 [34] emplearon un método para la detección de vitaminas A, D<sub>3</sub> y E en yogurt utilizando HPLC con un detector electroquímico. Ellos utilizaron HPLC en fase inversa con una columna C-18 y los compuestos se cuantificaron usando la detección amperométrica con un electrodo de carbono vítreo a un potencial de + 1,300 mV (frente a un electrodo de referencia de Ag / AgCl). Los resultados obtenidos para el análisis de las vitaminas A y E en las muestras analizadas son consistentes con los porcentajes reportados en los empaques de los yogurts analizados, pero para la vitamina D<sub>3</sub> solo se logró obtener buenos resultados cuando se analizaron yogurts fortificados en esta vitamina, en los yogurts comunes se encuentra la presencia de esta vitamina en muy baja cantidad.

Entre los múltiples alimentos que se analizan para determinar la cantidad de vitamina presente en ellos, se encuentran, la leche de fórmula para bebés, a estos productos se les hace control pues es importante que estén enriquecidas y fortificadas en vitaminas. Desde hace algunos años se han ido estableciendo métodos estándar para realizar el análisis de estos productos, además también se

encuentran normas nacionales que se deben seguir para dar más confiabilidad a los estudios realizados en los laboratorios. En un estudio realizado en 1997 por Hurtado *et al.* [35], se desarrolló una metodología que proporciona el análisis de vitamina A y E en leche de fórmula para lactantes, el análisis se llevó a cabo en una sola corrida cromatográfica, utilizando la técnica de HPLC en fase inversa con una columna C-18 y un detector UV-Vis de longitud de onda variable. A la muestra se le realizó una saponificación a temperatura ambiente y posteriormente se extrajeron las vitaminas con n-hexano. Autores como Rodas *et al.* (2003)[14] emplearon HPLC en fase inversa con un detector de fotiodo, ellos en este estudio proponen dos métodos de extracción directa simples, eliminando la etapa de saponificación que se creía esencial y hacia el análisis más largo y tedioso. La técnica empleada para analizar vitaminas ha sido modificada cambiando detectores, variando la fase en la que se realiza la separación y hasta implementando diferentes columnas cromatográficas, Por ejemplo, Heudi *et al.* (2004) [36], utilizaron HPLC en fase normal y flujo isocrático con detector de espectrometría de masa y observaron que el método propuesto redujo considerablemente el tiempo requerido para los procedimientos de preparación de muestras y por lo tanto aumentó el rendimiento analítico. Años después, Chávez *et al.* (2006)[37], utilizan un detector de arreglo de diodos y además mejoran el sistema cromatográfico utilizando una columna más estrecha la cual requiere menor cantidad de disolvente y mejora la sensibilidad, de esta forma facilitan el análisis simultáneo de las vitaminas A y E en la leche de fórmula para infante.

Un gran número de autores se han enfocado en estudiar el contenido de vitaminas en leche y productos lácteos, algunos buscan comprobar si los valores registrados en los empaques de estos productos son reales y además cuales son las formas estructurales de estas vitaminas en ciertos alimentos, esto para poder predecir qué factores pueden hacerlas variar químicamente [38–40] otros comparan métodos de extracción y desarrollan métodos eficaces combinando las mejores condiciones para estos análisis [3,41–44]. Otros productos estudiados han sido

harinas [45], suplementos dietarios [43] leche materna [46], unos de estos productos ricos naturalmente en estas vitaminas y otros fortificados especialmente en ciertas vitaminas específicas gracias a su gran importancia en la alimentación humana.

### **2.2.2 Análisis de Vitaminas hidrosolubles (vitamina C) en alimentos.**

Al hablar de vitamina C nos referimos a todos los compuestos que exhiben actividad biológica equivalente al L-ácido ascórbico (LAA), este grupo incluye los productos de oxidación, isómeros, ésteres, y las formas sintéticas. El L-ácido ascórbico se encuentra naturalmente en la mayoría de frutas y verduras, este compuesto debe ser ingerido en la dieta diaria dado que el cuerpo humano no es capaz de sintetizarlo. Se oxida muy fácilmente a condiciones de temperatura alta y pH altos, también cuando se expone a la presencia de oxígeno o metales y por la acción enzimática. El producto de la oxidación del L-ácido ascórbico es el ácido deshidroascórbico el cual exhibe la misma actividad biológica que el LAA, esta característica es importante porque permite cuantificar la cantidad total de vitamina C en los alimentos. Dado que el objetivo principal de un método analítico es medir el contenido real del analito de interés, sin cambiar artificialmente su estructura ni estabilidad, se debe tener cuidado con la extracción y análisis para evitar la pérdida y degradación del LAA [47]. Teniendo en cuenta esto, se hizo necesario validar los métodos analíticos utilizados para determinar el contenido de vitamina C en los alimentos, ofreciendo a los clientes resultados fiables. Por años se hizo difícil el estudio de estos dos compuestos en un mismo análisis, varias técnicas fueron utilizadas pero ninguna de ellas fiables, pues habían interferencias de otros agentes reductores [48]. El análisis de HPLC se hizo más confiable y selectivo en comparación de métodos espectrofotométricos, de titulación o enzimáticos. Esta técnica ha sido muy empleada con sistemas de detección UV-Vis [49–54], detección electroquímica [55,56] o espectrometría de masas [57, 58] que proporcionara la mayor sensibilidad y selectividad pero también es el método con

mayor costo de funcionamiento lo cual lo hace inaccesible para muchos laboratorios.

En la tabla 2 y 3 se muestran ciertas especificaciones sobre el método que usaron algunos autores que reportan el uso de HPLC-UV-Vis para el análisis de vitaminas A y E (tabla 2) y vitamina C (tabla 3).

El laboratorio de alimentos, CICTA, de la Universidad Industrial de Santander necesitó desarrollar métodos para el análisis de vitaminas en alimentos con el fin de complementar los servicios para ofrecer análisis de obligatoria declaración para la tabla nutricional de los productos alimenticios. En este trabajo se desarrolló e implementó un método para la determinación de vitaminas A, E en matrices lácteas extrayendo los analitos de la matriz utilizando el método de saponificación y posterior extracción con solvente (hexano) y vitamina C en jugos, haciendo extracción directa con ácido metafosfórico. Se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 con inyector automático, una columna SEA 18 y detector UV-visible de longitud de onda multivariable. Las condiciones cromatográficas empleadas permitieron obtener resultados que se encuentran dentro de los intervalos obtenidos por otros autores y sobre todo están dentro de lo establecido en normas de validación como la de EURACHEM [59] y la NTC-ISO/IEC 17025:2005.

Tabla 2. Ciencimetría del análisis de vitaminas liposolubles en condiciones experimentales similares a las utilizadas en este trabajo.

Autor y año	Analito y muestra	Columna y Detector	Extracción	Fase Móvil	Sensibilidad (LOD y LOQ) $\mu\text{g/mL}$	Recuperación	Resolución
Sarafraz <i>et al</i> (2013)[60]	Vitaminas A y E en Leche de fórmula infantil	RP-18 (100mmx 4,6mm x 5 $\mu\text{m}$ ) (5mm x 4mm). UV-VIS ( $\lambda=292$ nm: VE, $\lambda=323$ nm: VA)	Saponificación y extracción con bencina de petróleo	100% metanol	LOD=0,003V <sub>A</sub> , LOD=0,08V <sub>E</sub>	97,5%-104%	3,9-5,1%
Chen <i>et al</i> (2011)[61]	Vitaminas A, E, D3, K1 en Leche fortificada y tabletas multivitaminicas	Zorbax SB-C18 (250mm x 4,6mm x 5 $\mu\text{m}$ ). Arreglo de diodos ( $\lambda=284$ nm: acetato de tocoferol, $\lambda=327$ nm: acetatos de retinol)	Extracción en fase sólida.	100% metanol	LOD=0,1:VA Y 0,2:VE	>90%	< 5%
Villanueva <i>et al</i> (2014)[42]	Tocoferoles ( $\alpha$ , $\gamma$ , $\delta$ ) acetato de $\alpha$ -tocoferol, retinol y acetato de retinol, $\beta$ -caroteno en leche	Luna RP-18 (250mmx 4,6mm x 5 $\mu\text{m}$ ) Arreglo de diodos ( $\lambda=290$ nm: tocoferol, $\lambda=325$ nm: retinol)	Extracción directa con hexano	Metanol: THF: agua (67:27:6)	LOD=0,05-0,9; LOQ=0,07-2	----	RSD <2,9% (intra-día), RSD < 4,6%(interdía)

Tabla 3. Cienciometría del análisis de vitamina C utilizando HPLC-UV

Autor y año	Analito y muestra	Columna	Detector	Fase Móvil	Sensibilidad (LOD y LOQ) µg/mL	Resolución
Fontannaz <i>et al.</i> (2005)[49]	Vitamina C en Alimentos fortificados	Lichrospher RP-18 (5 µm; 4,6 mm x 250mm)	UV-Vis (265 nm)	Solución de decilamina, acetonitrilo, acetato de sodio, ácido fosfórico y TCEP·HCl	LOD=0,1	RSD=4,6%
Romeu <i>et al.</i> (2005)[50]	Vitamina C en Leche humana	C18 tracer spherisorb	UV-Vis (254nm)	Ácido acético: metanol (95:5)	LOD=0,3 LOQ=0,9	---
Odriozola <i>et al.</i> (2007)[53]	Ácido ascórbico y vitamina C total en Fresas, tomates, manzanas	C-18 Spherisorb	UV-vis (245 nm)	Solución 0.01% de ácido sulfúrico ajustado a pH 2.6	LOD=0,17 LOQ=0,57	RSD=0,6-3,9%
Ciulu <i>et al.</i> (2011)[54]	Vitaminas hidrosolubles en miel	Alltima C-18 (250 mm x 4,6mm, 5µm)	UV-vis, longitud de onda variable	Ácido trifluoroacético y acetonitrilo	LOD=0,1 LOQ=0,3	---
Tarrago <i>et al.</i> (2012)[52]	Vitamina C en Jugo de frutas, especias secas y alimentos ricos en grasa,	C18	UV-Vis arreglo de diodos	Ácido fórmico 0,05% o ácido orto-fosfórico 0,02%	LOD=0,06 LOQ=0,09	RSD=1.1-2%
Sami <i>et al.</i> (2014)[51]	Vitamina C en OKRA	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18( 250 x 4.6mm x 5 µm )	UV-vis (254nm)	A(Acetato de potasio 0,1M pH 4.9) B(acetonitrilo-agua 50:50) A/B:33/67	----	----

## 2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

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. 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”* según la NTC-ISO/IEC 17025:2005 [59].

Por lo general se considera que la validación del método está ligada estrechamente con el desarrollo del método. De hecho, no es posible determinar exactamente donde termina el desarrollo del método y donde empieza la validación. Según la Eurachem [59], una asociación europea de laboratorios centrada en el mejoramiento y estandarización de los métodos de análisis químico, un método analítico se debe validar cuando es necesario verificar que los parámetros de desempeño son adecuados para el uso de éste en la solución de un problema analítico específico. Para la validación se requiere la determinación de ciertos parámetros como lo son:

- La especificidad/selectividad: Grado en que otras sustancias interfieren en el análisis. Mide la capacidad del método para identificar/cuantificar los analitos en presencia de otras sustancias. ¿Qué hacer para medir la selectividad? Analizar muestras y materiales de referencia con el método desarrollado y aparte analizar por este mismo método muestras que contengan interferencias sospechadas en presencia del analito de interés[62].
- Límite de detección: Es la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba. Para estimar el límite de detección

pueden utilizarse varios métodos, uno de ellos depende del análisis de blanco y el examen de la relación entre la señal y el ruido[59,63], o se puede utilizar las medidas del patrón de concentración más baja de la curva de calibración.

- Límite de cuantificación: Concentración más baja de un analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud. Para su cálculo se utilizan las curvas de calibración y blancos de muestra.[59]
- Linealidad: Define la habilidad del método para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito. La evaluación de la linealidad es muy útil para determinar qué tipo de calibración es requerido en el uso rutinario del método, este define si la curva de calibración requiere solo un punto o tantos como sean necesarios para obtener una regresión adecuada [62].
- Exactitud: Se analiza la proximidad entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. 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.[63]
- Sensibilidad: Es el cambio en la respuesta de un instrumento de medición que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Es la pendiente de la curva de calibración [59].
- Precisión: Grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras homogéneas bajo condiciones prescritas. Se evalúa mediante análisis de réplicas, análisis repetidos de un estándar estable o análisis de adiciones conocidas sobre la muestra. La precisión indica la variabilidad de un método de ensayo y expresa en que rango es aceptable la variación de una misma muestra a condiciones reales. Se deben considerar tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad [59,62,63].

La reproducibilidad: Resultados que se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en diferentes laboratorios, por diferentes operadores, usando diferentes equipos.

Precisión intermedia: La precisión intermedia expresa la variación dentro de un laboratorio en diferentes días, diferentes analistas, diferente equipo, etc.

Repetibilidad: Resultados que se obtienen con el mismo método, sobre objetos de prueba idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y dentro de intervalos de tiempo cortos.

- Robustez: Es una medida de la capacidad de un método de permanecer inalterado por variaciones pequeñas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

## **2.4 INCERTIDUMBRE**

Según el Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales en Metrología, VIM, la incertidumbre es “el parámetro asociado con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que deberían ser atribuidos al mensurando”[64]. Reportar el valor de la incertidumbre de medición no genera duda acerca de la validez de un mensurando; por el contrario, este valor implica el incremento de la confianza en la validez del resultado de medición [65].

El procedimiento general para la estimación de la incertidumbre de medición consta de los siguientes pasos. [66, 67]

1. Especificar el mensurando: Explicación clara de que es lo que se está midiendo.
2. Identificar las fuentes de incertidumbre: Listar las posibles fuentes de incertidumbre.

3. Cuantificar la incertidumbre estándar: hallar el tamaño de la incertidumbre asociada a cada fuente identificada.
4. Determinar la incertidumbre combinada y expandida del mensurando: combinar las incertidumbres estándar. Luego multiplicar el valor obtenido por el factor de cobertura elegido para obtener una incertidumbre expandida.

Es importante luego de validar o confirmar un método analítico en el laboratorio, determinar las diferentes fuentes de incertidumbre de medición que pueden ser: muestreo, efectos de la muestra, sesgos instrumentales, pureza de reactivos, analista, condiciones de medición, método, entre otros.

El cálculo de la incertidumbre puede realizarse según dos tipos: [68]

- Tipo A: Determinación de un componente por análisis estadístico de los resultados obtenidos en condiciones de medición definidas. Por ejemplo: mediciones en condiciones de repetibilidad.
- Tipo B: Determinación de un componente por otros medios distintos a los del tipo A. Por ejemplo. Información basada en un certificado de calibración.

## **2.5. PRUEBA DE SIGNIFICANCIA**

En la presentación de los datos obtenidos de un método analítico es necesario indicar el nivel de confianza de los datos, este nivel es un intervalo en el que con una probabilidad determinada, que puede ser del 95% al 99%, el valor será verdadero. La probabilidad de equivocación se llama nivel de significancia, como su nombre lo indica, esta aproximación prueba si los resultados son significativamente diferentes o si se pueden justificar sólo por variaciones aleatorias.

Al realizar una prueba de significancia se comprueba la veracidad de una hipótesis denominada hipótesis nula mediante la cual un método no se encuentra sujeto a errores sistemáticos [69]. Para comparar el resultado de un análisis realizado por dos métodos diferentes se aplica la prueba de t de student, la cual plantea la hipótesis de que los dos valores son iguales. Al realizar esta prueba si el t calculado es mayor que el t tabulado entonces los dos métodos son iguales. En la figura 3, se encuentra la tabla de valores t con intervalo de confianza de 90% a 99%.

Figura 3. Distribución t

**Tabla A.1** La distribución t

Valor de t para un intervalo de confianza de Valor crítico de  t  para valores de P de Número de grados de libertad	90%	95%	98%	99%
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Los valores críticos de |t| son adecuados para una prueba de *dos* colas. Para una prueba de *una* cola el valor se toma de la columna para dos veces el valor de P deseado, por ejemplo, para una prueba de una cola,  $P = 0.005$ , 5 grados de libertad, el valor crítico se lee de la columna  $P = 0.10$  y es igual a 2.02.

(tomada del libro Estadística para química analítica [69]).

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. MATERIALES Y REACTIVOS**

##### **3.1.1. Reactivos y solventes**

3.1.1.1. Vitaminas liposolubles (A y E). Los solventes utilizados fueron metanol grado HPLC (Merck), agua ultra pura tipo HPLC obtenida del equipo Aqua Solutions del laboratorio de alimentos CICTA. Los reactivos utilizados fueron: ácido gálico (antioxidante), solución acuosa de hidróxido de potasio 50%, n-hexano grado HPLC, corriente de nitrógeno.

3.1.1.2. Vitamina C. Se utilizó como solvente una solución de ácido ortofosfórico pH 2.8. Los reactivos empleados fueron: ácido metafosfórico 3%, sodio dihidrógeno fosfato monohidrato (Merck), disodio hidrógeno fosfato (Merck), agua ultra pura tipo HPLC obtenida del equipo Aqua Solutions del laboratorio de alimentos CICTA.

##### **3.1.2. Patrones y material de referencia certificado**

Se emplearon patrones de L-ácido ascórbico 99% pureza ref. A92902, +- $\alpha$ -tocoferol 96% pureza ref. T3251 y retinol 95% pureza ref. R7632 que fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. El material de referencia certificada fue un jugo de naranja ref. IA0915 obtenida de MOLLABS.

##### **3.1.3. Muestras**

Las muestras para el análisis de vitaminas liposolubles fueron yogurt, leche en polvo, mantequilla y leche fortikids. Para el análisis de vitamina C se analizaron muestras de jugo de naranja, jugo con fibra, jugo néctar, bocadillo y pulpa de fruta

natural casera; los productos comerciales fueron obtenidos de supermercados locales

## **3.2. EQUIPOS Y MATERIAL DE LABORATORIO**

### **3.2.1. Material de laboratorio**

Balanza analítica OHAUS, probetas de 25mL, balones aforados de 250mL, pipetas de 10mL, pipetas pasteur, micropipetas de 2-20, 100-1000  $\mu$ L, puntas plásticas para micropipetas, jeringas plásticas, filtros de membrana WHATMAN uniflo de 0,45  $\mu$ m, viales ámbar.

### **3.2.2. Cromatógrafo líquido**

Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo líquido HPLC Thermo Dionex Ultimate 3000 equipado con desgasificador, inyector automático, un horno para variar la temperatura de la columna, una columna SEA 18 5 $\mu$ m 25 x 0,46 y un detector UV-Visible RS de múltiple longitud de onda.

## **3.3. PROCEDIMIENTO**

Para el análisis de vitaminas liposolubles e hidrosolubles en muestras comerciales se emplearon ciertos parámetros iguales, los cuales están reportados en la tabla 4.

### **3.3.1 Pruebas preliminares para el análisis de vitamina A y E**

Para el análisis de vitaminas liposolubles (vitaminas A y E) el método empleado fue el método desarrollado en el 2008 en el centro de investigación CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander [69]. Hubo la necesidad de hacer ciertas variaciones, primero solo se requería analizar dos vitaminas de las 11 para las que habían realizado este método, por ello, el gradiente escogido fue un gradiente de

solvente metanol-agua 95%-5% los primeros 10 minutos y 100% metanol hasta los 25 min. Otro cambio fue el rango de concentración de la curva de calibración, por lo cual se realizaron pruebas en el intervalo reportado por Freys Serrano (0,5 a 50 µg/mL) y además se realizaron pruebas en un intervalo más alto que fue de 5-500 µg/mL.

### 3.3.2 Pruebas preliminares para el análisis de vitamina C

Para establecer la fase móvil que mejor resolución aportara para el análisis de vitamina C se estudió inicialmente la fase móvil de Buffer fosfato de sodio (0,1M a pH 3) Metanol 80%-20%[71]. Y luego se empleó la fase móvil en modo isocrático de una solución acuosa de ácido ortofosfórico a pH 2,8. [72]

Tabla 4. Parámetros del equipo de HPLC para el análisis de vitaminas

Parámetros	Especificaciones
Columna	SEA 18 5µm 25 x 0,46
Temperatura	30°C
Volumen de inyección	20µL
Flujo	1mL/min

### 3.3.2. Extracción de las vitaminas liposolubles (vitamina A y E)

Para la extracción de las vitaminas liposolubles en las muestras comerciales se realizó inicialmente una saponificación (hidrólisis alcalina) con solución acuosa KOH 50% (p/v), ácido gálico como antioxidante y metanol por 30 min a 90°C, pasado este tiempo se pone en baño de hielo por 10 minutos y se procedió a hacer la extracción [69]. Para la extracción con solvente se utilizó n-hexano, en este paso ocurre una separación de fases de la cuales se tomó la fase orgánica (parte superior). Se realizó la extracción por triplicado mezclando las fases orgánicas obtenidas y se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno. Por último el residuo se mezcló con 2mL de metanol grado HPLC y se filtró para su posterior inyección en el cromatógrafo [40].

### 3.3.3. Extracción de vitamina C

Para la preparación de la muestra en el análisis de vitamina C, se realizó una prefiltración en el caso de productos con fibra y con la pulpa de fruta natural. La extracción de ácido ascórbico se realizó con ácido metafosfórico (MPA) 3g/100mL, el cual se mezcló con la muestra y se centrifugó a 4500 g por 10 min [72]. Luego el sobrenadante se filtró en filtro de 0,45 micras y se inyectó en el cromatógrafo

## 3.4. FIGURAS DE MÉRITO PARA LA VALIDACIÓN

### 3.4.1. Sensibilidad

Se realizó una curva de calibración con 7-9 niveles de concentración y cada nivel se analizó por triplicado. Para analizar este parámetro se toma el valor de la pendiente, dado que la sensibilidad se define como la pendiente de la curva,  $b$ , ya que ésta define la razón de cambio de la propiedad medida por unidad de concentración. Entre mas alto el valor de la pendiente significa que el analito es más sensible al detector del equipo. La sensibilidad se expresa de la siguiente forma:

Ecuación 1. Forma de expresar la sensibilidad

$$b \pm t * Sb$$

$t = 2,36$  (t de student para un nivel de confianza del 95%).

$Sb$ =Desviación estándar de la pendiente

### 3.4.2. Rango dinámico lineal (RDL)

Con los datos obtenidos en las mediciones de la curva de calibración por triplicado se calculó el rango dinámico lineal, el cual se determina evaluando el intervalo en que la respuesta del detector es lineal (coeficiente de correlación de la curva de calibración). El coeficiente de correlación es el cociente entre la covarianza y el producto de las desviaciones típicas de ambas variables:

Ecuación 2. Coeficiente de correlación

$$r^2 = \left( \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y} \right)^2$$

$\sigma_{xy}$  = covarianza de (x, y)

$\sigma_x$  = desviación típica de x

$\sigma_y$  = desviación típica de y

### 3.4.3. Nivel mínimo de detección (NMD) y de cuantificación (NMQ)

De la curva de calibración también se calculó los límites de detección y cuantificación [71] utilizando el patrón de concentración más baja de la curva de calibración, que sería la señal analítica más pequeña que pueda ser medida y que no corresponda a una medida del blanco.

Para determinar el nivel mínimo de detección se debe hallar la desviación estándar de las medidas realizadas y se multiplica por un factor k, el cual es un valor que se elige según el nivel de confianza que se desee trabajar, generalmente se utiliza 3, para hallar el NMQ se definió un valor de k=10.[73]

Ecuación 3. Nivel mínimo de detección

$$NMD = \frac{3S}{m}$$

Ecuación 4. Nivel mínimo de cuantificación.

$$NMQ = \frac{10S}{m}$$

### 3.4.4. Precisión

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia, se evaluó mediante el análisis de patrones haciendo cinco repeticiones en el mismo día y la precisión intermedia se calculó midiendo la misma muestra estándar por duplicado durante tres días diferentes[69]. De estas medidas se tendrán en cuenta los tiempos de retención y las áreas, se hallará el promedio de cada medida (Pm)

y la desviación estándar de la media (Sm). Con estos valores se calculó finalmente el coeficiente de variación (%CV), el cual debe ser menos del 5%. [74]

Ecuación 5 Coeficiente de variación

$$CV = \frac{Sm}{Pm} \times 100$$

### 3.4.5. Recuperación

Se enriqueció una muestra con el analito de interés y luego se analizaron la muestra enriquecida y sin enriquecer. Con estos datos se halló el porcentaje de recuperación.

Ecuación 6. Porcentaje de recuperación

$$\%recuperación = \frac{CE - CNE}{CSE} \times 100$$

Donde:

CE: Concentración de vitamina en la muestra enriquecida.

CNE: Concentración de vitamina en la muestra no enriquecida.

CSE: Concentración de la solución enriquecedora.

### 3.4.6. Exactitud

Esta figura de mérito se determinó mediante el análisis de una muestra de material de referencia certificada. Se calculó la diferencia absoluta entre el valor medido y el valor certificado [42].

Ecuación 7. Diferencia entre el valor experimental y el valor certificado [71]

$$\Delta m = |Xm - Xcrm|$$

Para evaluar si hay diferencia significativa entre los valores medidos y el reportado se realizó la prueba t, en la cual si el  $t_{calc} < t_{crit}$  los valores se aceptan. [67]

Ecuación 8. Valor de t calculado.

$$t_{calc} = (x - x_a) \sqrt{\frac{n}{S}}$$

Dónde:

$t_{\text{calc}} = t$  calculado

$x_a$  = Valor asignado al material de referencia

$x$  = Valor de las lecturas analizadas

$S$  = Desviación estándar absoluta

$n$  = Número de lecturas o valores observados

### 3.5. INCERTIDUMBRE

#### 3.5.1. Tipo A o aleatorio.

Este tipo de incertidumbre se determinó por medio del valor de desviación estándar de las medidas de repetibilidad de áreas de la curva de calibración y el error típico de la ecuación de la recta. Además también se tuvo en cuenta el error aportado por la desviación estándar de las mediciones de la muestra real.

Ecuación 9. Determinación de la incertidumbre estándar tipo A.[75]

$$u = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

$S$ : Desviación estándar de las mediciones realizadas

$n$ : Numero de repeticiones

#### 3.5.2. Tipo B o sistemático

Se determinó teniendo en cuenta la incertidumbre aportada por los equipos y material volumétrico utilizado:

- Balanza analítica
- Balones aforados
- Micropipetas
- Pureza del patrón.

Se utilizaron dos ecuaciones para hallar la incertidumbre tipo B, la ecuación 10 que es para la incertidumbre de la pesada y la ecuación 11 que es para calcular la incertidumbre de la disolución.

Ecuación 10. Cálculo para la incertidumbre de la pesada [70]

$$u_{mstd} = \sqrt{(u_{bal})^2 + (u_{repe})^2}$$

$u_{bal}$ =incertidumbre de la balanza

$u_{repe}$ =incertidumbre de la repetibilidad de las medidas

Ecuación 11. Cálculo para la incertidumbre de la dilución. [70]

$$u_{dil} = C(dil)x \sqrt{\left(\frac{u(cstd)}{Cstd}\right)^2 + \left(\frac{u(vstd)}{vstd}\right)^2 + \left(\frac{u(vfin)}{vfin}\right)^2}$$

$u(cstd)$ =incertidumbre de la concentración del estándar

$u(vstd)$ =incertidumbre del volumen del estándar

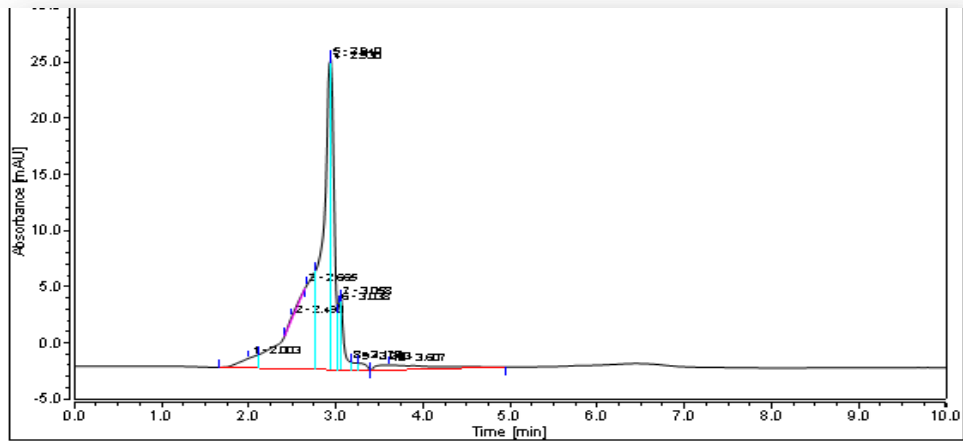
$u(vfin)$ =incertidumbre del volumen final

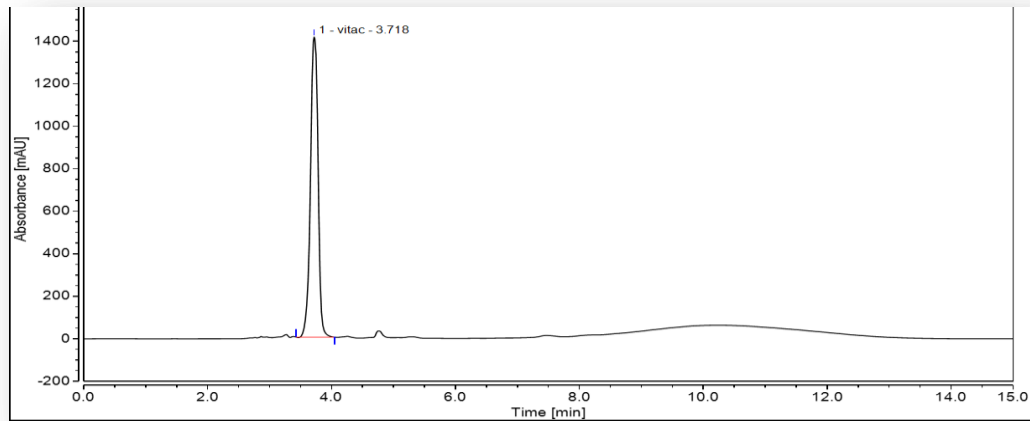
## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL ESTUDIO DE LA VITAMINA C

En las pruebas preliminares se realizaron corridas cromatográficas utilizando dos fases móviles diferentes. Como se puede observar en la **figura 4** se encuentran dos perfiles cromatográficos del material de referencia, y se aprecia que en el cromatograma de la parte superior se obtiene un pico con mejor resolución que en el cromatograma de la parte inferior, donde se observa una señal más ancha que solapa diferentes picos. Por lo tanto, la fase móvil seleccionada fue la solución de ácido ortofosfórico a pH 2,8 en modo isocrático.

Figura 4. Perfil cromatográfico de un jugo certificado con fase móvil **Parte superior** solución de ácido ortofosfórico a pH 2,8, **parte inferior** Solución Buffer fosfato de sodio (0,1M a pH 3)





## 4.2. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO PARA LA VALIDACIÓN

### 4.2.1. Evaluación del rango dinámico lineal y sensibilidad del método.

Estos parámetros se calcularon por medio de la curva de calibración obtenida para cada vitamina por separado. Los rangos de concentración de las curvas de calibración fueron:

- Vitamina C: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (se tomaron 9 puntos)
- Vitamina A: 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( se tomaron 7 puntos)
- Vitamina E: 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (se tomaron 7 puntos)

Figura 5. Curva de calibración vitamina C

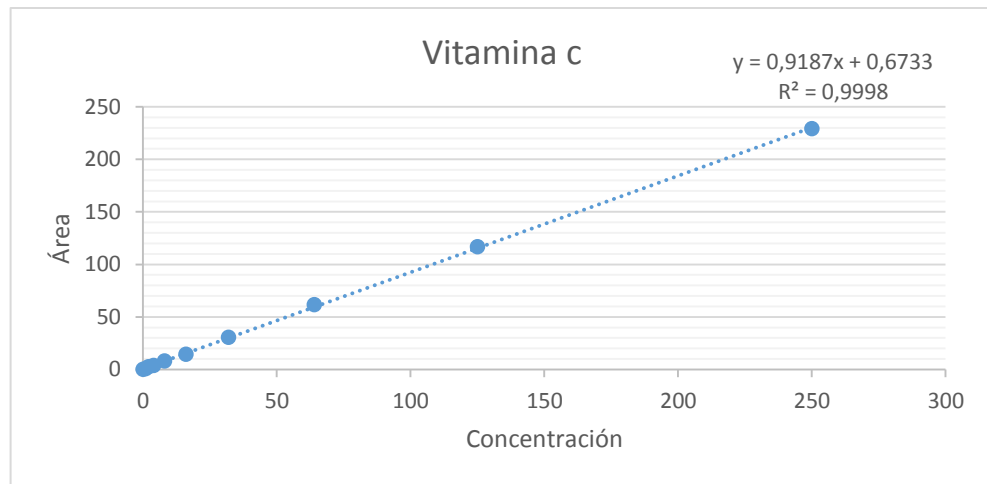


Figura 6. Curva de calibración vitamina A

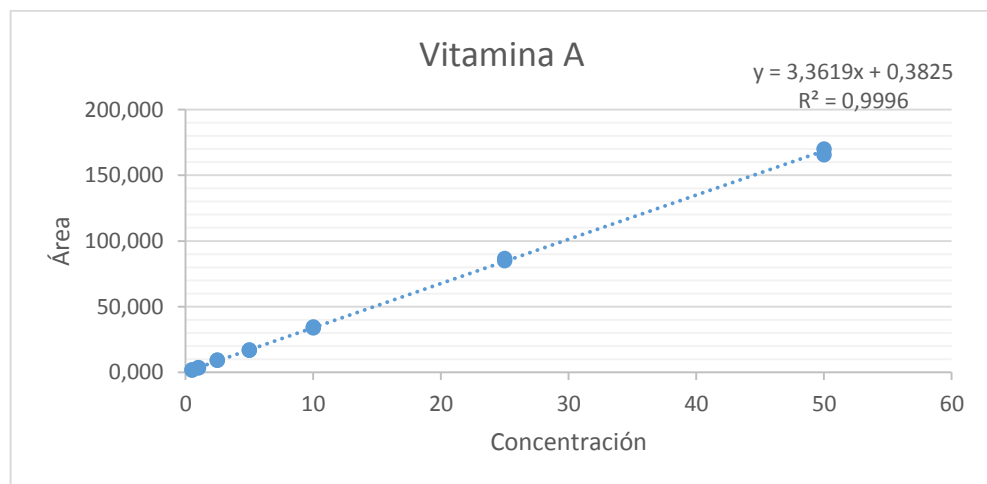
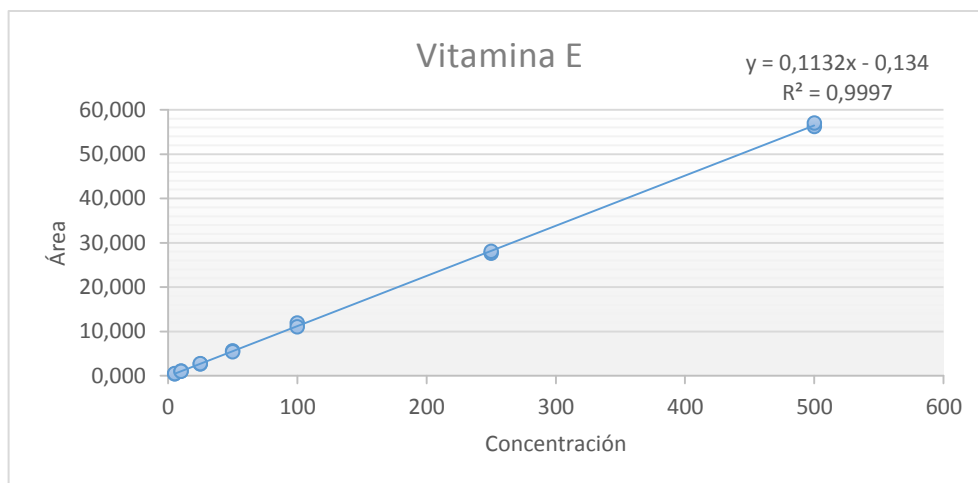


Figura 7. Curva de calibración vitamina E



Para evaluar el rango dinámico lineal se elaboró un diagrama de dispersión entre la variable X que es la concentración (independiente) y la variable Y que es el área (dependiente), los datos obtenidos se encuentran en los anexos y los gráficos se pueden observar de la figura 5 a la figura 7, en ellos se aprecia que las líneas de tendencia marcan una relación lineal entre las dos variables. Pero aunque visualmente se ve la linealidad es necesario tener en cuenta el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de la curva, el cual muestra el ajuste de la curva para el rango de concentraciones evaluado. En varios trabajos [63,68,76] reportan que el  $R^2$  debe ser mayor a 0,99. En la tabla 5 se muestra las ecuaciones de cada curva de calibración con el valor de  $R^2$ , la pendiente y la desviación estándar de la pendiente la cual se utilizó para medir la sensibilidad del método.

Tabla 5. Evaluación del rango dinámico lineal y sensibilidad.

Analito	Ecuación de la recta	$R^2$	Pendiente (b)	Desviación estándar ( $S_b$ )	$b \pm tS_b$
Vitamina C	$y = 0,9187x + 0,673$	0,9998	0,918	0,345	$0,9187 \pm 0,88$
Vitamina A	$y = 3,3619x + 0,382$	0,9996	3,362	0,018	$3,3619 \pm 0,04$
Vitamina E	$y = 0,1132x - 0,134$	0,9997	0,113	0,001	$0,1132 \pm 0,001$

t: 2,57 para un 95% de confianza

Como se puede observar en la tabla 5, los valores obtenidos de coeficiente de correlación para las tres curvas de calibración están en valores mayores a 0,99 lo que permite concluir que el método es aplicable en los intervalos de concentración empleados. Además se puede observar los valores de las pendiente de las curvas con las cuales se determinó la sensibilidad del método, de los valores tabulados se infiere que el método empleado es sensible para el analito de interés, en el caso de la vitamina A, por el contrario valores bajos de pendiente como por ejemplo 0,1132, pendiente obtenida en la curva de calibración de la vitamina E, indican baja sensibilidad para determinar el analito. Además se reporta el valor de pendiente con un intervalo del 95% confianza.

#### 4.2.2. Determinación del nivel mínimo de detección y cuantificación

Para la determinación de estos parámetros se siguió lo establecido en la sección 3.4.3 y los resultados obtenidos se reportaron en la tabla 6.

Tabla 6. Nivel mínimo de detección y cuantificación de las vitaminas A, E y C

Vitamina	S	NMD ppm	NMQ ppm
Vitamina C	0,200	0,060	0,190
Vitamina A	0,120	0,100	0,350
Vitamina E	0,070	1,790	5,960

Luego de realizar la Ciencimetría para el análisis de vitaminas liposolubles e hidrosolubles se recopilaron los datos obtenidos por otros autores, encontrando que la mayoría de estos métodos tiene un intervalo de NMD de 0,003 ppm a 0,1ppm (vitamina A), 0,08-0,2 ppm (vitamina E), 0,06-0,3ppm (vitamina C). Como se puede observar en la tabla 6 los valores obtenidos para NMD están dentro de estos intervalos y se puede asumir que el equipo y las condiciones cromatográficas elegidas son aptos para determinar y cuantificar estas vitaminas a concentraciones bajas. Para el NMQ han reportado intervalos de 0,07-6 ppm para

vitamina A y E y de 0,09-0,9 ppm para vitamina C, como se puede observar el NMQ obtenido en este trabajo se encuentra entre los intervalos reportados.

#### 4.2.3. Determinación de la precisión del método

La precisión se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia de áreas y tiempos de retención. Para la vitamina C se analizaron todos los puntos de la curva de calibración, para las vitaminas A y E se analizaron tres mezclas de concentraciones diferentes (10, 25 y 100 µg/mL), tomando estas tres concentraciones por ser los puntos centrales de las curvas de calibración, y se calculó para cada una de ellas el coeficiente de variación. Para estudiar la repetibilidad se analizó cada muestra por triplicado en el mismo día, los resultados obtenidos se encuentran en las tablas 7-10.

Para hallar la precisión intermedia se analizó cada muestra en tres días diferentes, con el mismo analista, el mismo equipo, los resultados de los coeficientes de variación se observan en las tablas 11 a 14.

Tabla 7. Repetibilidad de los tiempos de retención para vitamina C.

Concentración [ppm]	Tr			Promedio	Desviación Estándar	%CV
	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3			
1	3,676	3,677	3,673	3,675	0,002	0,06%
2	3,693	3,696	3,699	3,696	0,003	0,08%
4	3,657	3,660	3,659	3,659	0,002	0,04%
8	3,660	3,663	3,663	3,662	0,002	0,05%
16	3,660	3,667	3,662	3,663	0,004	0,10%
32	3,660	3,661	3,663	3,661	0,002	0,04%
64	3,690	3,687	3,683	3,687	0,004	0,10%
125	3,683	3,683	3,68	3,682	0,002	0,05%
250	3,710	3,710	3,713	3,711	0,002	0,05%

Tabla 8. Repetibilidad de las áreas para la vitamina C

Concentración [ppm]	Área			Promedio	Desviación Estándar	%CV
	MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3			
1	0,708	0,712	0,711	0,710	0,002	0,29%
2	2,526	2,480	2,502	2,503	0,023	0,92%
4	3,725	3,718	3,719	3,721	0,004	0,10%
8	8,147	8,137	8,147	8,144	0,006	0,07%
16	14,549	14,565	14,597	14,570	0,024	0,17%
32	29,102	29,057	28,787	28,982	0,170	0,59%
64	60,528	60,548	60,477	60,518	0,037	0,06%
125	118,364	118,026	118,162	118,184	0,170	0,14%
250	228,276	227,254	227,564	227,698	0,524	0,23%

Tabla 9. Repetibilidad de tiempos de retención de una mezcla de vitamina A y E en tres concentraciones diferentes.

Analito	Concentración [ppm]	Tr			Promedio	S	%CV
		MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3			
Vitamina A	10	6,124	6,132	6,132	6,129	0,005	0,08%
	25	6,136	6,136	6,14	6,137	0,002	0,04%
	100	6,149	6,144	6,149	6,147	0,003	0,05%
Vitamina E	10	17,149	17,161	17,161	17,157	0,007	0,04%
	25	17,165	17,169	17,165	17,166	0,002	0,01%
	100	17,182	17,178	17,182	17,181	0,002	0,01%

S: Desviación estándar

Tabla 10. Repetibilidad de áreas de una mezcla de vitamina A y E en tres concentraciones diferentes.

ANALITO	Concentración [ppm]	Área			Promedio	S	%CV
		MEDIDA 1	MEDIDA 2	MEDIDA 3			
Vitamina A	10	29,716	29,556	29,467	29,580	0,126	0,43%
	25	81,736	80,229	81,286	81,084	0,774	0,95%
	100	344,201	351,489	343,677	346,456	4,367	1,26%
Vitamina E	10	1,249	1,224	1,269	1,247	0,023	1,81%
	25	2,669	2,569	2,567	2,602	0,058	2,24%
	100	12,952	13,409	13,29	13,217	0,237	1,79%

S: Desviación estándar

Tabla 11. Precisión intermedia de los tiempos de retención para la vitamina C

Concentración [ppm]	Tr			Promedio	Desviación Estándar	%CV
	Día 1	Día 2	Día 3			
1	3,698	3,669	3,697	3,688	0,016	0,45%
2	3,696	3,696	3,699	3,697	0,002	0,05%
4	3,657	3,700	3,702	3,686	0,025	0,69%
8	3,660	3,700	3,705	3,688	0,025	0,67%
16	3,659	3,704	3,703	3,689	0,026	0,70%
32	3,660	3,709	3,695	3,688	0,025	0,69%
64	3,660	3,709	3,687	3,685	0,025	0,67%
125	3,659	3,709	3,681	3,683	0,025	0,68%
250	3,659	3,711	3,677	3,682	0,026	0,72%

Tabla 12. Precisión intermedia de las áreas para la vitamina C

Concentración [ppm]	Área			Promedio	Desviación Estándar	%CV
	Día 1	Día 2	Día 3			
1	0,728	0,685	0,711	0,708	0,022	3,07%
2	2,506	2,505	2,533	2,515	0,016	0,64%
4	3,819	3,697	3,601	3,706	0,109	2,95%
8	8,241	8,051	8,241	8,178	0,110	1,34%
16	14,955	14,537	14,478	14,657	0,260	1,77%
32	28,858	30,691	30,802	30,117	1,092	3,63%
64	60,639	61,655	60,655	60,983	0,582	0,95%
125	118,466	116,563	120,468	118,499	1,952	1,65%
250	225,564	226,669	225,329	225,854	0,716	0,32%

Tabla 13. Precisión intermedia tiempos de retención para una mezcla de vitamina A y E en tres concentraciones diferentes.

ANALITO	Concentración [ppm]	Tr			Promedio	Desviación Estándar	%CV
		Día 1	Día 2	Día 3			
Vitamina A	10	6,179	6,127	6,143	6,150	0,027	0,43%
	25	6,177	6,132	6,156	6,155	0,023	0,37%
	100	6,186	6,134	6,144	6,155	0,028	0,45%
Vitamina E	10	17,334	17,277	17,177	17,263	0,079	0,46%
	25	17,261	17,162	17,203	17,209	0,050	0,29%
	100	17,269	17,166	17,363	17,266	0,099	0,57%

Tabla 14. Precisión intermedia de áreas de una mezcla de vitamina A y E en tres concentraciones diferentes.

ANALITO	Concentración [ppm]	Área			Promedio	Desviación Estándar	%CV
		Día 1	Día 2	Día 3			
Vitamina A	10	28,295	29,978	29,834	29,369	0,933	3,18%
	25	82,230	81,470	80,819	81,506	0,706	0,87%
	100	333,297	340,775	330,253	334,775	5,414	1,62%
Vitamina E	10	1,145	1,154	1,155	17,209	0,050	0,29%
	25	2,415	2,408	2,491	2,438	0,046	1,89%
	100	13,178	12,610	13,102	12,963	0,308	2,38%

En estas tablas se pueden observar coeficientes de variación menores al 5% por lo cual se puede decir que el método es preciso según las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y que los resultados que se obtendrán al analizar muestras comerciales serán resultados confiables.

#### 4.2.4. Determinación de la exactitud del método

Este parámetro es importante en la validación dado que expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero. Se determinó como sesgo, analizando el material de referencia certificado (MRC) IA0915 para la vitamina C. Dado que para las vitaminas liposolubles no se contaba con un MRC se determinó la exactitud como porcentaje de recuperación (sección 4.2.5) [59]. Los cálculos para determinar la exactitud se reportaron en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados para determinar la exactitud del método.

Analito	Xm $\mu\text{g/g}$	Xmrc $\mu\text{g/g}$	$\Delta\text{m}$	S	t calculado	t tabulado
Vitamina C	617,540	620,000	2,460	0,452	5,845	6,960
	616,901	620,000	3,099			

Como se puede ver en la tabla 15, al realizar la prueba t con un 98% de confianza, se obtuvo que el valor de  $t_{\text{calc}}$  es menor que el de  $t_{\text{tab}}$ , lo que indica que no existen diferencias significativas por lo que se puede decir que el método propuesto es exacto.

#### 4.2.5. Determinación del porcentaje de recuperación

Este parámetro se calcula con el fin de saber que tan exitoso ha sido el método para extraer el analito de la matriz. En este caso para el análisis de la vitamina C se utilizó una matriz de jugo con fibra y para las vitaminas A y E la matriz seleccionada fue una muestra de leche en polvo. Como se puede observar en la tabla 16 los porcentajes de recuperación obtenidos están entre 86% a 108%, valores que según la literatura se encuentran en el intervalo aceptado que es de 70-120% [59]. Como se puede ver se aceptan porcentajes de recuperación mayores al 100% dado que al enriquecer la muestra este analito no estará tan fuertemente ligado como el que se encuentra naturalmente en ella y como consecuencia abra un porcentaje más alto de analito en la muestra.[59]

Tabla 16. Resultados del porcentaje de recuperación.

Analito	<sup>2</sup> CNE	<sup>1</sup> CE	<sup>3</sup> CSE	%R
Vitamina C	0,016	1,834	2	90,89
	0,003	1,725	2	86,10
Vitamina A	0,187	10,207	10	100,20
	0,192	9,912	10	97,19
Vitamina E	1,915	12,766	10	108,51
	2,862	13,604	10	107,42

<sup>1</sup>CE: Concentración de vitamina en la muestra enriquecida.

<sup>2</sup>CNE: Concentración de vitamina en la muestra no enriquecida.

<sup>3</sup>CSE: Concentración de la solución enriquecedora

En la tabla 17 se hace un resumen de los resultados obtenidos de las figuras de mérito determinadas para los métodos empleados.

Tabla 17. Resultados generales de validación y confirmación de los métodos cromatográficos

Parámetro	Prueba realizada	Valor	Criterio
<b>Sensibilidad</b>	Curva de calibración	Vitamina A=3,362	Valor de la pendiente: valores altos, sensible al analito.
		Vitamina E=0,113	
		Vitamina C=0,918	
<b>Linealidad</b>	RDL	Vitamina A=0,9996	$R^2 > 0,999$
		Vitamina E=0,9997	
		Vitamina C=0,9998	
	Regresión Lineal	Vitamina A: $y = 3,3619x + 0,382$	$y=mx + b$
		Vitamina E: $y = 0,1132x - 0,134$	
		Vitamina C: $y = 0,9187x + 0,673$	
	NMD	Vitamina A: 0,10	3S/m
		Vitamina E: 1,79	
		Vitamina C: 0,06	
	NMQ	Vitamina A: 0,35	10S/m
		Vitamina E: 5,96	
		Vitamina C: 0,19	
<b>Precisión</b>	Repetibilidad	intervalo de 0,01%-1,81%	CV < 5%
	Precisión intermedia	intervalo de 0,05%-3,63%	
<b>Exactitud</b>	Comparación con un material de referencia	t calculado = 5,845	Prueba t = t calculado < t tabulado
	Recuperación %	86% - 108%	70-120%

#### 4.2.6. Determinación de vitaminas en muestras comerciales.

Luego de determinar las figuras de mérito para la validación de los métodos propuestos, se aplican estos al análisis de muestras comerciales. Para la vitamina C se analizó un jugo de naranja, un jugo néctar, un jugo con fibra y un bocado adquirido en tiendas locales y una pulpa de fruta de guayaba (casero). Para las vitaminas A y E se analizaron muestras de yogurt, mantequilla, leche en polvo y leche fortikids. Los perfiles cromatográficos obtenidos se pueden observar en las figuras 8 a la 16.

Figura 8. Perfil cromatográfico del análisis de vitaminas A y E en leche fortikids.

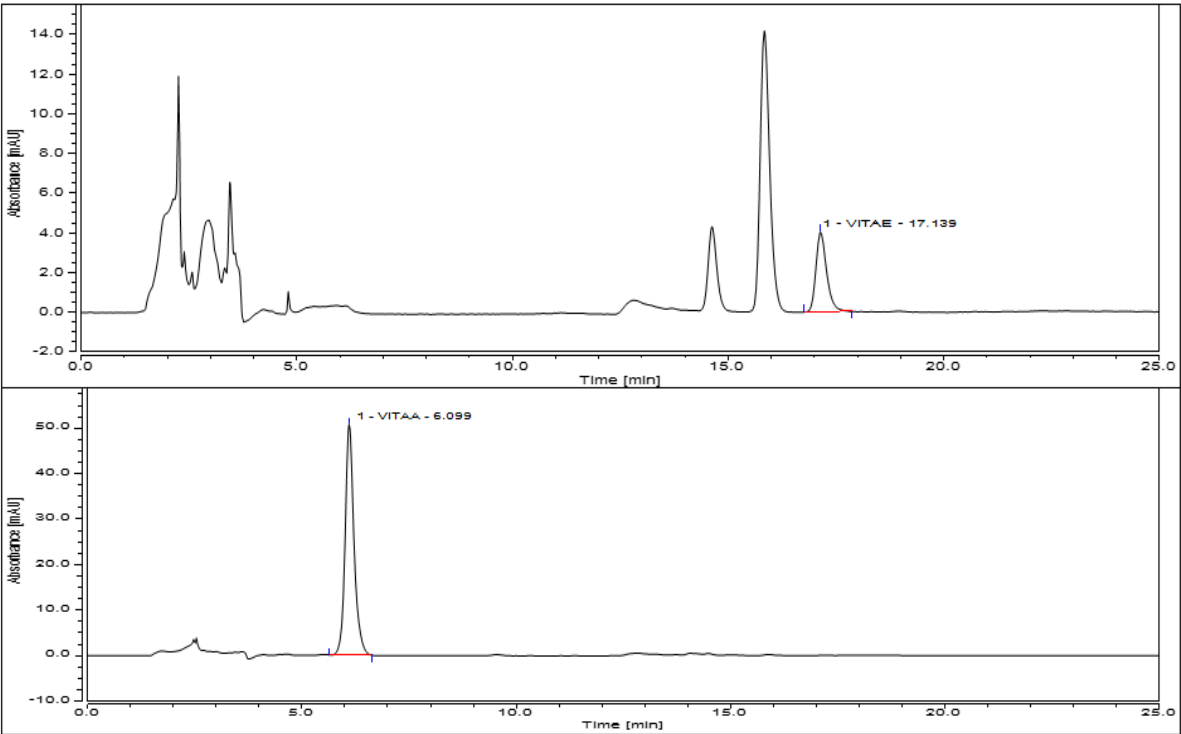


Figura 9. Perfil cromatográfico del análisis de vitaminas A y E en leche en polvo.

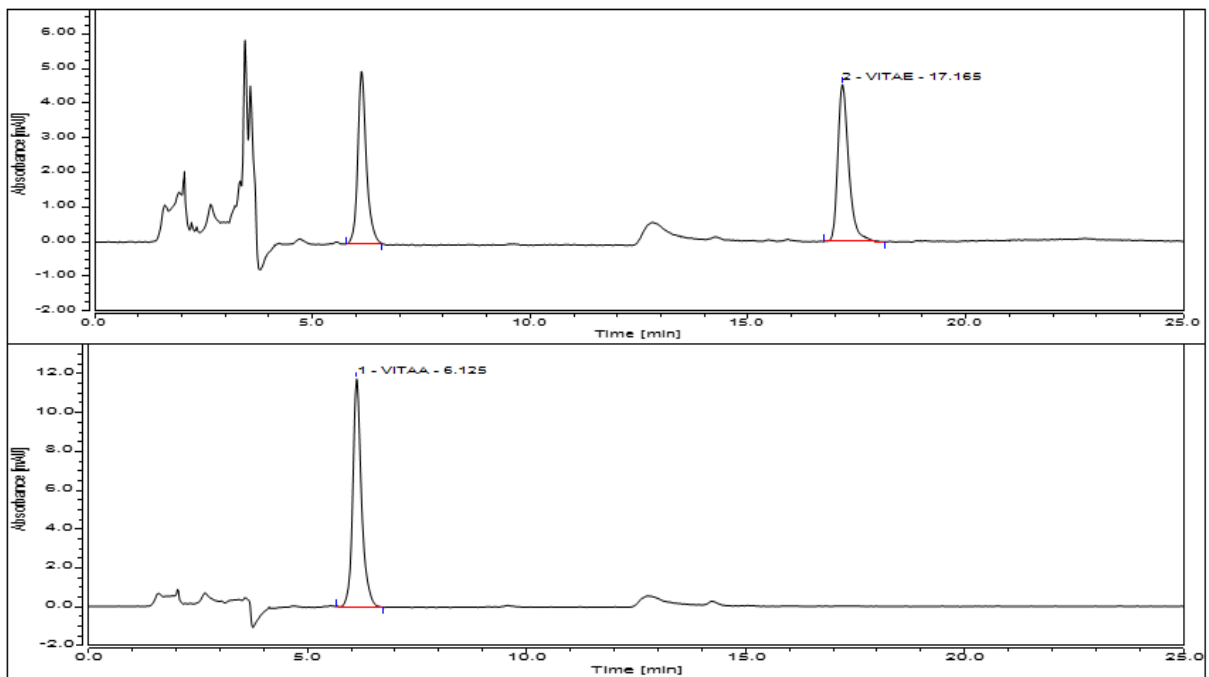


Figura 10. Perfil cromatográfico del análisis de vitaminas A y E en mantequilla.

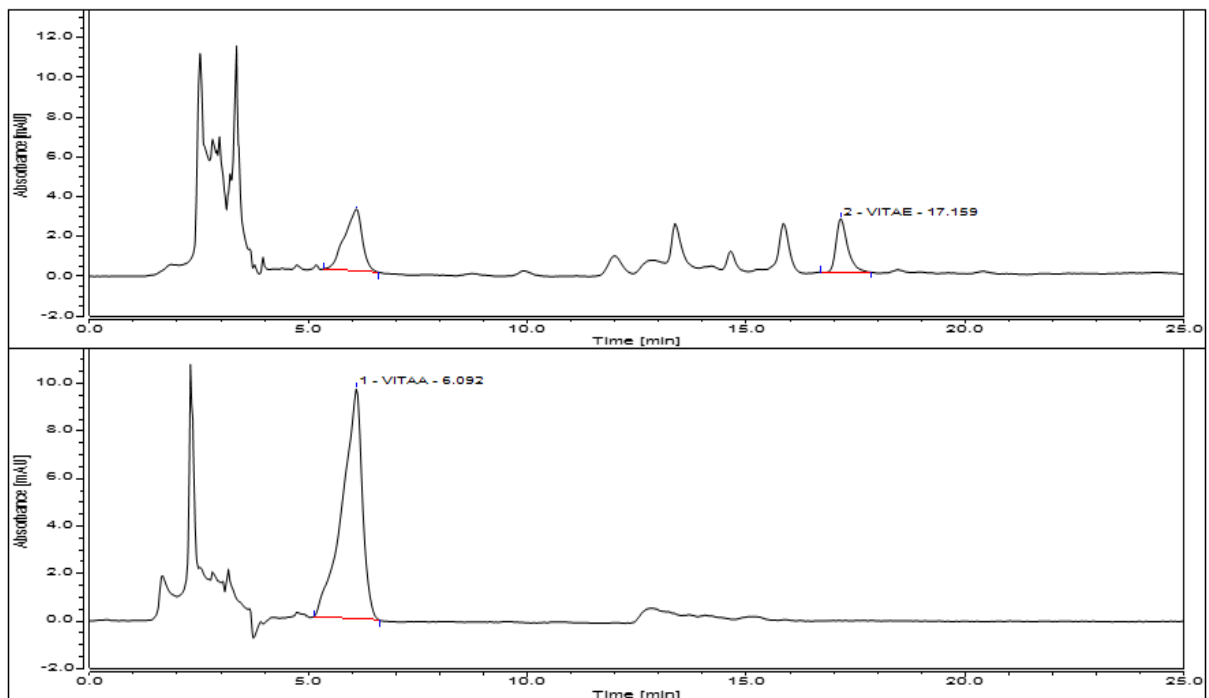


Figura 11. Perfil cromatográfico del análisis de vitaminas A y E en yogurt.

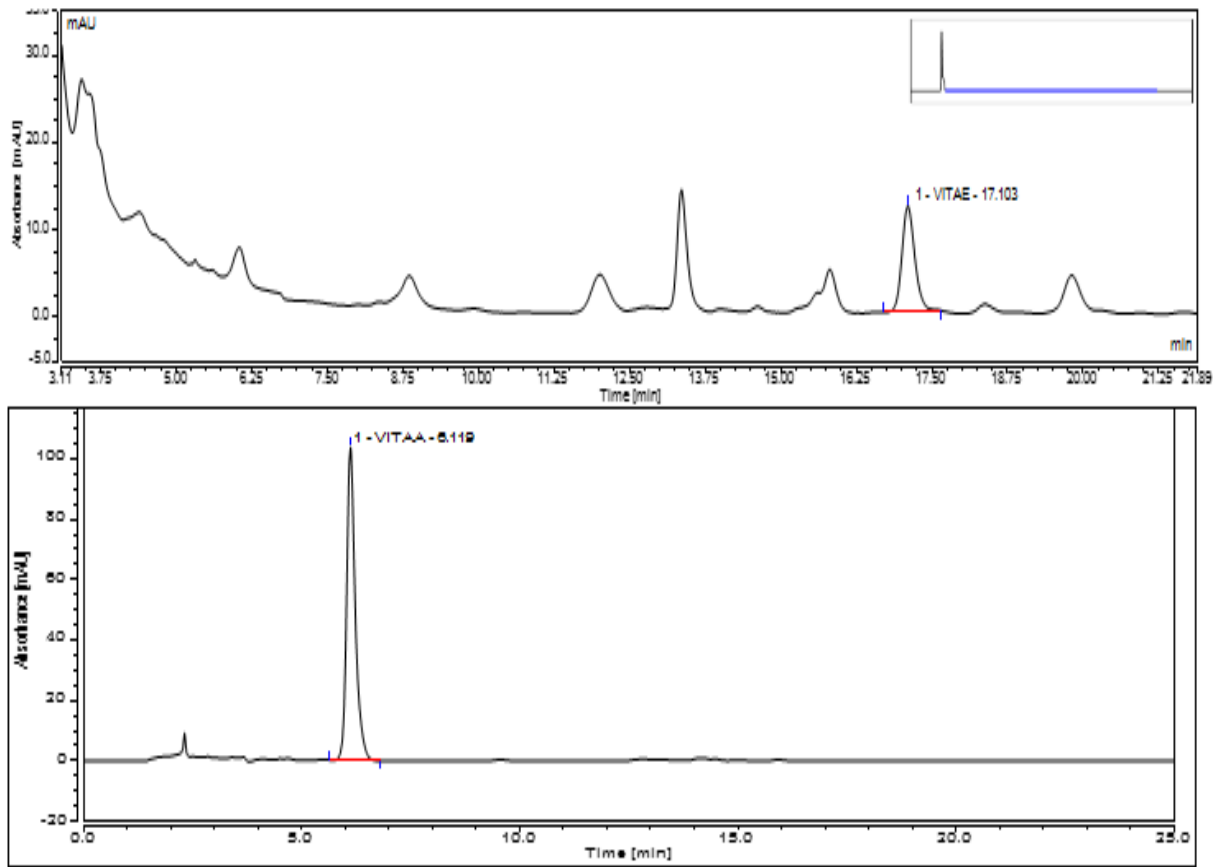


Figura 12. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en jugo de naranja.

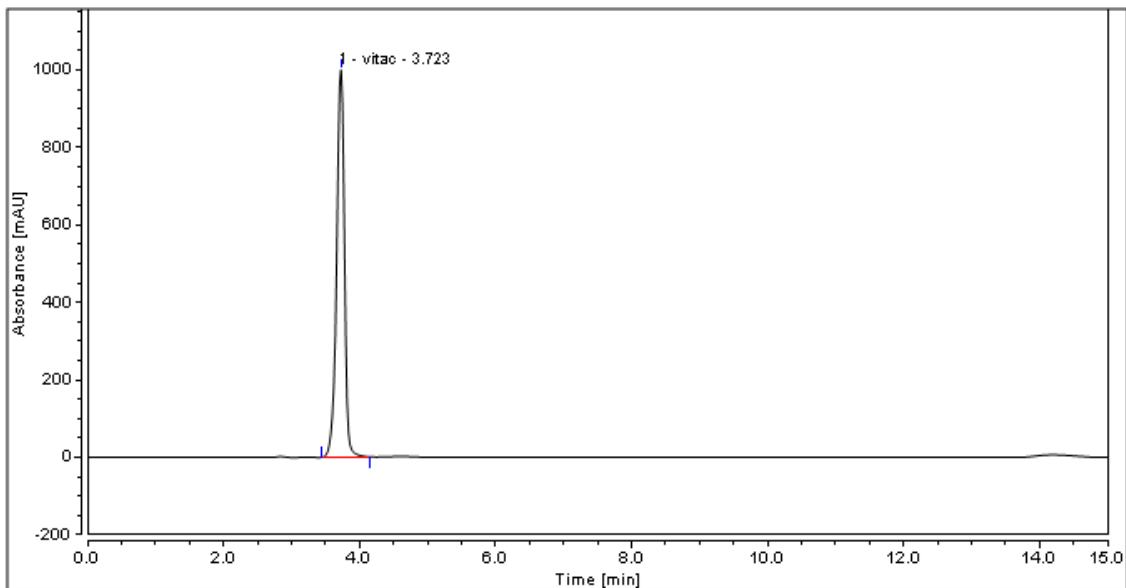


Figura 13. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en jugo néctar.

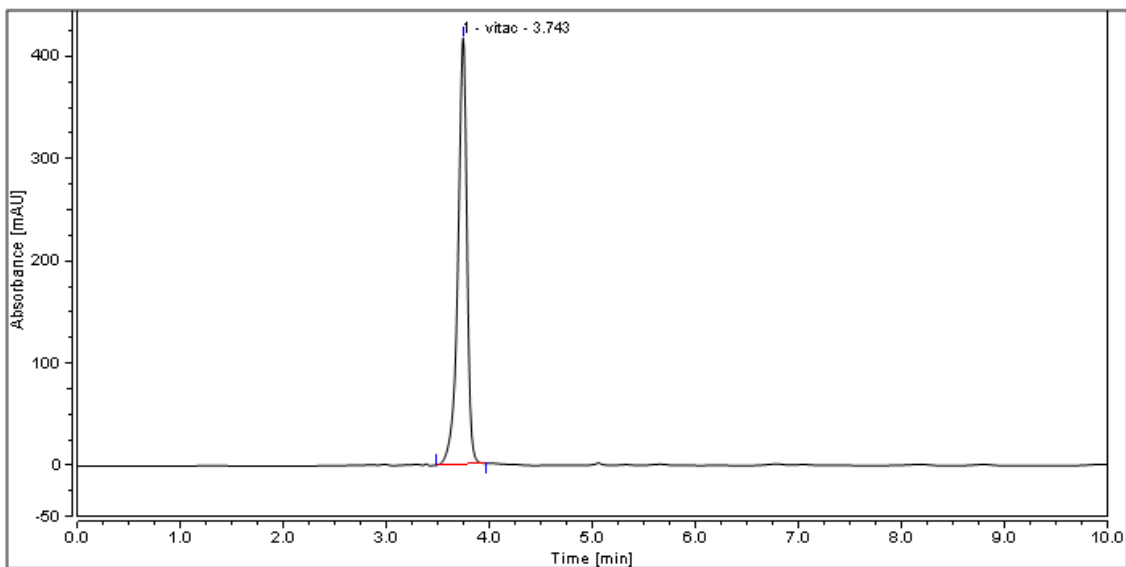


Figura 14. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en jugo con fibra.

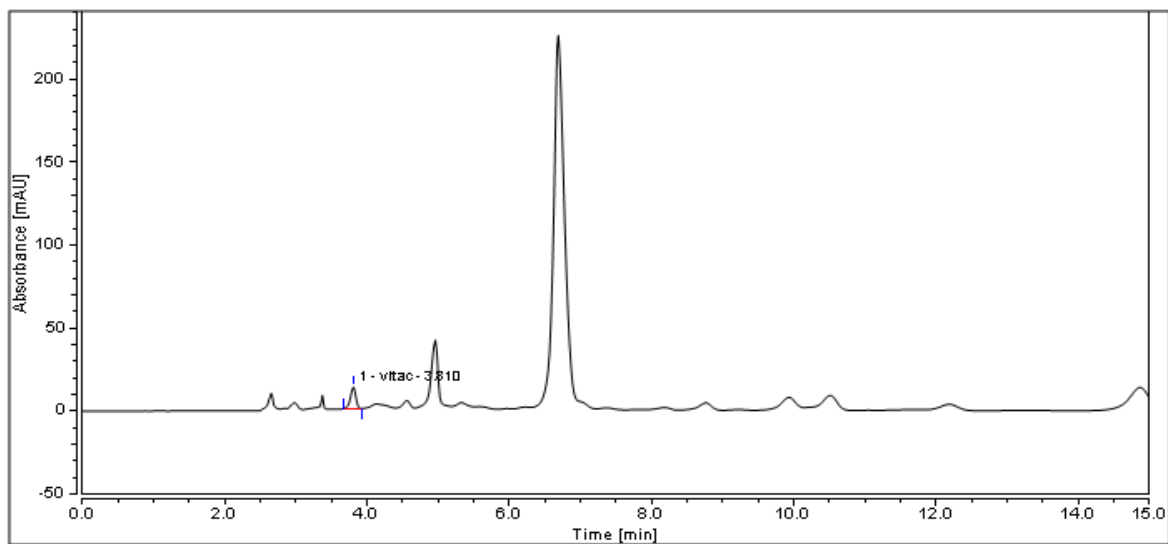


Figura 15. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en bocado.

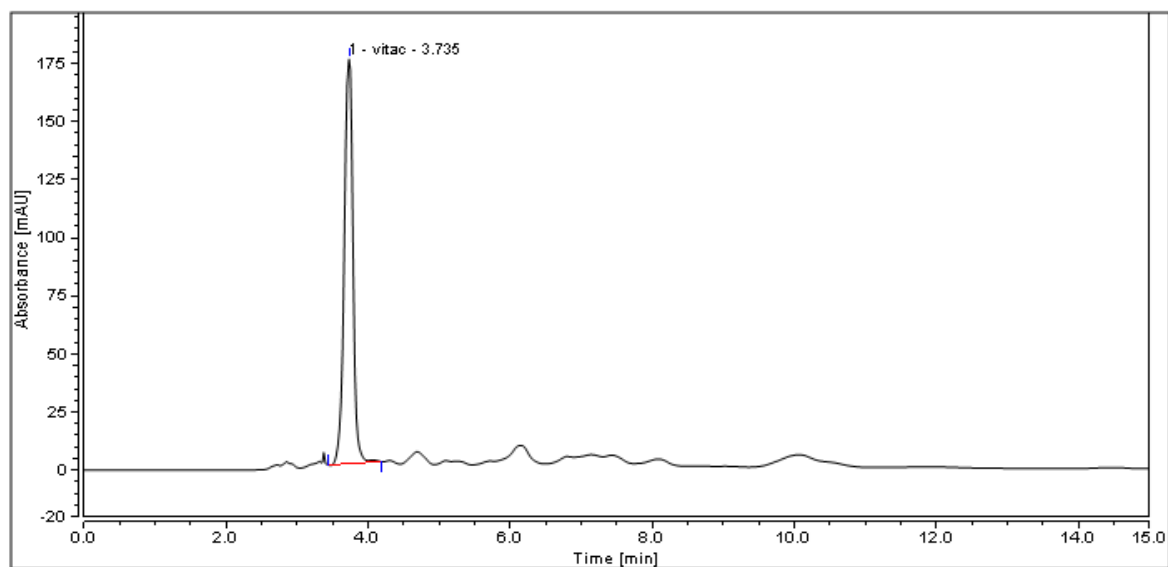
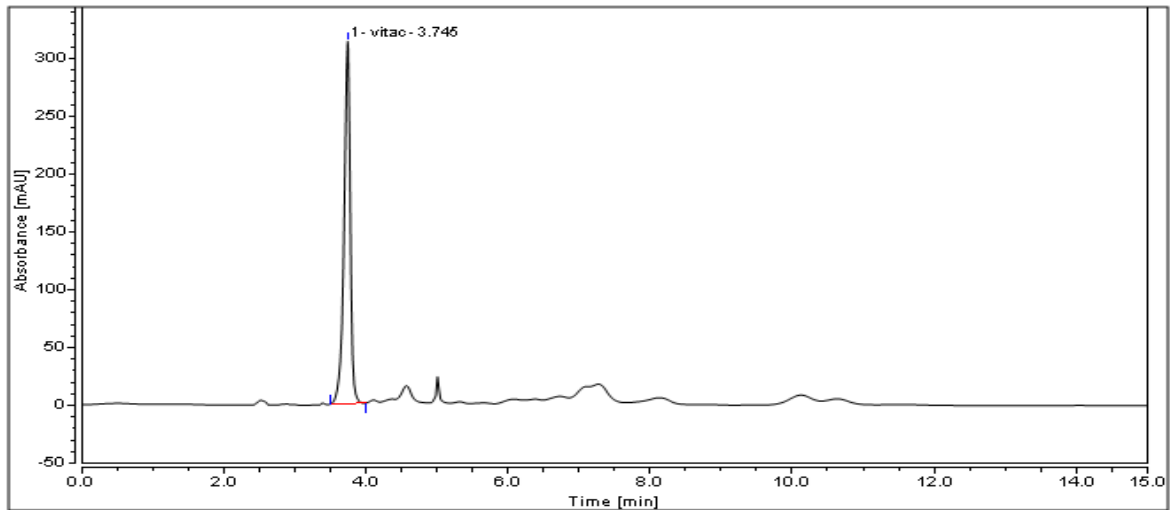


Figura 16. Perfil cromatográfico del análisis de vitamina C en pulpa de guayaba.



En la tabla 18 y 19. Se reportan las concentraciones de las vitaminas en las muestras analizadas. El valor reportado en las tablas es el valor de concentración corregido con el porcentaje de recuperación. Este valor se halla dividiendo el valor obtenido sobre el porcentaje de recuperación por 100.

Tabla 18. Resultados del análisis de vitaminas A y E en muestras comerciales.

Analito	Leche fortikids	VR	Leche en polvo	V R	Mantequilla	VR	yogurt	VR
	µg/mL		µg/g					
vitamina A	2,63 ± 0,1	2,92	6,98 + 1,14	9	14,31 + 0,3	15	0,30 + 0,03	NR
Vitamina E	14,52 + 0,2	15,00	38,34 + 1,04	N R	12,14 + 0,01	NR	0,12 + 0,04	NR

VR: valor de referencia

Tabla 19. Resultados del análisis de vitamina C en muestras comerciales

Analito	Jugo de naranja (Tampico)	VR	Jugo néctar (California)	VR	Jugo con fibra (Pulpy colanta)	VR	Guayaba	Bocadillo
	µg/mL					µg/10g		
vitamina C	244,82 ± 1,9	250	45,21 ± 0,2	NR	21,91 ± 0,15	22,5	170,79 ± 0,4	131,79 ± 0,1

VR: valor de referencia

En estas tablas se puede observar que el valor medido no esta tan alejado del reportado en las tablas nutricionales de estos alimentos, al igual que para la determinación de la exactitud se realizó una prueba t para verificar si la diferencia entre el valor experimental y el reportado por el vendedor son significativos. Estos resultados se encuentran reportados en las tablas 20 y 21.

Tabla 20. Resultados de prueba t para la determinación de vitaminas A y E en lácteos.

Analito	Leche fortikids	Leche en polvo	Mantequilla	Yogurt
	$t_{cal} < t_{tab}=4,30$			
Vitamina A	4,1	2,5	3,25	--
Vitamina E	3,39	--	--	--

Tabla 21. Resultados de prueba t para la determinación de vitamina C en jugos

Analito	Jugo de naranja	Jugo con fibra
	$t_{cal} < t_{tab}=4,30$	
Vitamina C	4,18	4,17

En las tablas anteriores (20 y 21) se puede observar que al realizar la prueba t para un valor de confianza del 95% y un  $n=2$ , el valor calculado es menor que el tabulado (ver tabla en sección 2.5) en todos los casos, por lo cual se puede decir que estas metodologías desarrolladas se aplican a diferentes matrices y que los resultados obtenidos son confiables.

#### 4.2.7. Determinación de la incertidumbre de medida.

Para determinar el valor de incertidumbre de los métodos propuestos se aplicaron las fórmulas y criterios descritos en la sección 3.5. En las tablas 22 y 23 se encuentran reportados los resultados del cálculo de incertidumbre para cada

método. La incertidumbre expandida se determinó con un factor de cobertura  $k=2$ , para obtener un nivel de confianza del 95%.

Tabla 22. Incertidumbre para el método de la vitamina C

Fuente de incertidumbre $u_x$	Tipo de incertidumbre	$u_x$ original	Incertidumbre estándar $u_{xi}$	Incertidumbre combinada	Incertidumbre expandida
<b>Equipo</b>	Tipo A	0,345	0,1725	0,201	0,401
<b>Repetibilidad</b>		0,29	0,097		
<b>Balanza</b>	Tipo B (incertidumbre por masa)	0,00018 y 0,00003	0,09		
<b>Material volumétrico</b>	Tipo B. incertidumbre por dilución	0,04	0,103		
<b>Micropipetas (Transferpette)</b>		0,6			
<b>Pureza del patrón</b>		0,1			

Tabla 23. Incertidumbre de la medida para el método de determinación de vitaminas liposolubles

Fuente de incertidumbre $u_x$	Tipo de incertidumbre	$u_x$ original	Incertidumbre estándar $u_{xi}$	Incertidumbre combinada	Incertidumbre expandida
<b>Equipo</b>	Tipo A	0,018	0,09	0,833	1,66
<b>Repetibilidad</b>		1,41	0,57		
<b>Balanza</b>	Tipo B (incertidumbre por masa)	0,00018 y 0,00003	0,09		
<b>Material volumétrico</b>	Tipo B. incertidumbre por dilución	0,04	0,64		
<b>Micropipetas (Transferpette)</b>		0,6			
<b>Pureza del patrón</b>		0,4 (vit E) y 0,5 (vit A)			

## 5. CONCLUSIONES

Los métodos desarrollados para el análisis de vitaminas liposolubles (A y E) y vitaminas hidrosolubles (vitamina C) utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia, en fase reversa, son válidos bajo las condiciones de análisis establecidas y para un intervalo de 0,5-50  $\mu\text{g/mL}$ , 5-500  $\mu\text{g/mL}$  y 1-250  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

Se confirmó que el método desarrollado para vitaminas liposolubles arroja valores de figuras de mérito satisfactorios, que hacen al método selectivo, lineal, preciso y exacto; demostrando que con este método los resultados de análisis de muestras comerciales serán confiables y de calidad.

Se desarrolló un método analítico para la determinación de vitamina C utilizando como fase móvil solución de ácido ortofosfórico a pH 2.8 y se determinaron las figuras de mérito necesarias para demostrar que el método es selectivo para ácido ascórbico (vitamina C), lineal en el intervalo de concentraciones establecido, preciso y exacto.

Se comprobó la funcionalidad de estos métodos analíticos al realizar el análisis de vitaminas en productos comerciales y obtener resultados cercanos a los reportados por el comerciante. Esto se corroboró realizando la prueba estadística  $t$ , la cual permite afirmar que no hay diferencias significativas entre el valor experimental y el reportado en la etiqueta.

## 6. RECOMENDACIONES

Evaluar la reproducibilidad del método concursando en pruebas interlaboratorio para comprobar además la robustez del método variando el laboratorio y el analista.

Es importante tener en cuenta que en la preparación de muestra se debe evitar la exposición a la luz y oxígeno además de utilizar material ámbar para almacenar las muestras. También se debe procurar inyectar la muestra al instante de hacerle la extracción, si por algún caso no se puede, se debe guardar a temperatura menos de 10°C.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mexicana S, Marques B, Pinto M, An S, Sensorial L, Asc C, et al. Análisis Sensorial Y Ácido Ascórbico De Hortalizas En. *Cienc y Tecnol Aliment*. 2004;4:240–5.
2. Zago G KI, García F MY, Di Bernardo ML, Vit P, Luna JR, Gualtieri M. Determinación del contenido de vitamina C en miel de abejas venezolanas por volumetría de óxido-reducción. *Rev del Inst Nac Hig Rafael Rangel* [Internet]. 2010;41(1):25–30. Available from: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04772010000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772010000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
3. Chotyakul N, Pateiro-Moure M, Saraiva J., Torres J., Pérez-Lamela C. Simultaneous HPLC-DAD quantification of vitamins A and E content in raw, pasteurized, and UHT cow's milk and their changes during storage. *Eur Food Res Technol*. 2014;238(4):535–47.
4. Palacios Sánchez L. Breve historia de las vitaminas. *Rev Medica Sanitas*. 2013;16(3):142–5.
5. Ministerio de la protección social. Resolución 333 de 2011. *Diario oficial No 47984*. 2011.
6. Friedrich W. *Biochemistry and Physiology of the vitamins: Introduction*. Vitamins. Walter de Gruyter & co; 2000. p. 3–10.
7. Entrala bueno A. Generalidades. *Vitaminas: aspectos prácticos en medicina*. Diaz de Santos; 1995. p. 3–11.
8. Sanders T, Emery P. *Vitamins. Molecular Basis Of Human Nutrition*. CRC press; 2003. p. 94–114.
9. Crawley H. Natural occurrence of vitamins in food. In: Berry Ottaway P, editor. *The technology of Vitamins in food*. Springer Science & Business media; 2012. p. 19–27.
10. Organization WH, Nations F and AO of the U. *Vitamin and mineral*

requirements in human nutrition. SECOND EDI. Organization WH, editor. 2004. 17-37 p.

11. Pérez Calderón R. Estudio de validación de la metodología para la determinación de vitamina A en alimentos infantiles instantáneos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2005;17:26–9.
12. López M del C, López H, Olea MF. Las vitaminas. *Toxicología alimentaria*. Ediciones Díaz de Santos; 2012. p. 539–41.
13. Illera M, Illera del portal J, Illera del portal JC. *Vitaminas y Minerales*. Primera Ed. Editorial Complutense S.A; 2000. 13-20 p.
14. Rodas Mendoza B, Morera Pons S, Castellote Bargalló a. I, López-Sabater MC. Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of Vitamins A and E in infant formulas. *J Chromatogr A*. 2003;1018(2):197–202.
15. Eitenmiller R. Vitamin E. *Vitamin E Food chemistry, composition and analysis*. CRC press; 2004. p. 1–38.
16. Ball G. Vitamin E. *Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability, and Stability*. 2005. p. 119–32.
17. Sayago A, Marín MI, Aparicio R, Morales MT. Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y aceites*. 2007;58(1):74–86.
18. Packer L, Obermuller-Jevic UC. Vitamin E: An introduction. *Antioxid Vitam C E [Internet]*. 2002;133–51. Available from: <Go to ISI>://WOS:000182085900009
19. Heer M, Titze J, Smith SM, Baecker N. *Water-soluble Vitamins. Nutrition Physiology and Metabolism in Spaceflight and Analog Studies*. Springer International Publishing; 2015. p. 37–40.
20. Russell LF. *Water-Soluble Vitamins*. In: Nollet L, Toldrá F, editors. *Food Analysis by HPLC*. Third edit. CRC press; 2012. p. 325–442.
21. Russell LF. *Water-Soluble Vitamins. Handbook of Food Analysis*. Second edi. CRC press; 2004. p. 487–571.

22. Rucker R, Steinberg F, Johnston C. Ascorbic acid. In: Zempleni J, Rucker R, McCormick D, Suttie J, editors. Handbook of vitamins. Fourth Ed. CRC press; 2007. p. 490–510.
23. Serra HM, Cafaro TA. Ácido ascórbico : desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. Acta Bioquim Clin Latinoamericana. 2007;41(4):525–32.
24. Dergal SB, Rodriguez HB, Morales AA. Vitaminas y nutrientes inorgánicos. Química de los alimentos. 1981. p. 363–98.
25. Higdon J, Frei B. Vitamin C: An Introduction. In: Packer L, Traber M, Kraemer K, Frei B, editors. Antioxidants. AOCS Publishing; 2003.
26. Weston A, Brown PR. High Performance Liquid Chromatography. In: Brown AWR, editor. HPLC and CE. Academic Press; 1997. p. 1–23.
27. Bélanger JMR, Paré J, Sigouin M. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and applications. In: Paré JR., Bélanger JM., editors. Instrumental Methods in food Analysis. Elsevier Science B.V.; 1997. p. 38–58.
28. Bélanger JMR, Paré J, Bissonnette MC. Chromatography: Principles and applications. Instrumental Methods in food Analysis. 1997. p. 1–32.
29. Scott RPW. Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography. In: Cazes J, editor. Analytical Instrumentation Handbook. Third. CRC press; 2004. p. 687–726.
30. Conte LS, Moret S, Purcaro G. HPLC in Food Analysis. In: Corradini D, editor. Handbook of HPLC. Second Ed. CRC press; 2010. p. 561–660.
31. Rizzolo A, Polesello S. Chromatographic determination of vitamins in foods. J Chromatogr A. 1992;624:103–52.
32. Hewavitharana a. K, Van Brakel a. S, Harnett M. Simultaneous liquid chromatographic determination of vitamins A, E and  $\beta$ -carotene in common dairy foods. Int Dairy J. 1996;6(6):613–24.
33. Pinto, M., Carrasco E, Fraser B. VALIDACION DEL METODO BUTIROMETRICO DE GERBER POR COMPARACION CON EL METODO

DE REFERENCIA DE RÖSE GOTTLIEB PARA LA DETERMINACION DE MATERIA GRASA EN LECHE. *Agro sur*. 2000;28:123–31.

34. Zamarreño MMD, Perez a S, Rodriguez MS, Perez MCG, Mendez JH. Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection. *Talanta*. 1996;43:1555–63.
35. Albalá-Hurtado S, Novella-Rodríguez S, Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1997;778(1-2):243–6.
36. Heudi O, Trisconi MJ, Blake CJ. Simultaneous quantification of Vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004;1022(1-2):115–23.
37. Chávez-Servín JL, Castellote AI, López-Sabater MC. Simultaneous analysis of Vitamins A and E in infant milk-based formulae by normal-phase high-performance liquid chromatography-diode array detection using a short narrow-bore column. *J Chromatogr A*. 2006;1122(1-2):138–43.
38. Escrivá a., Esteve MJ, Farré R, Frígola a. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2002;947(2):313–8.
39. Herrero-Barbudo MC, Granado-Lorencio F, Blanco-Navarro I, Olmedilla-Alonso B. Retinol, alpha-and gamma-tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A- and E-fortified dairy products commercialized in Spain. *Int Dairy J*. 2005;15(5):521–6.
40. Plozza T, Craige Trener V, Caridi D. The simultaneous determination of vitamins A, E and  $\beta$ -carotene in bovine milk by high performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry (HPLC–MSn). *Food Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;134(1):559–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.121>
41. Hulshof PJM, van Roekel-Jansen T, van de Bovenkamp P, West CE. Variation in retinol and carotenoid content of milk and milk products in The Netherlands. *J Food Compos Anal*. 2006;19(1):67–75.

42. Andrés V, Villanueva MJ, Tenorio MD. Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and  $\beta$ -carotene in milk- and soy-juice based beverages by HPLC with diode-array detection. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;58(2):557–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.025>
43. Patriche E., Croitoru O, Coman G, Stefan C., Tutunaru D, Cuciureanu R. Validation of HPLC method for the determination of retinol in different dietary supplements. *Rom Biotechnol Lett*. 2014;19:9875–82.
44. Blanco D, Fernández M., Gutiérrez M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column. *Analyst*. 2000;125(3):427–31.
45. Ake M, Fabre H, Malan AK, Mandrou B. Column liquid chromatography determination of vitamins A and E in powdered milk and local flour: A validation procedure. *J Chromatogr A*. 1998;826(2):183–9.
46. Kamao M, Tsugawa N, Suhara Y, Wada A, Mori T, Murata K, et al. Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2007;859(2):192–200.
47. Phillips KM, Tarragó-Trani MT, Gebhardt SE, Exler J, Patterson KY, Haytowitz DB, et al. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *J Food Compos Anal*. 2010;23(3):253–9.
48. Nováková L, Solich P, Solichová D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trac Trends Anal Chem*. 2008;27:942–58.
49. Fontannaz P, Kiliç T, Heudi O. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem*. 2006;94(4):626–31.
50. Romeu-Nadal M, Morera-Pons S, Castellote a. I, López-Sabater MC. Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2006;830(1):41–6.

51. Sami R, Li Y, Qi B, Wang S, Zhang Q, Han F, et al. HPLC Analysis of Water-Soluble Vitamins (B2, B3, B6, B12, and C) and Fat-Soluble Vitamins (E, K, D, A, and  $\beta$ -Carotene) of Okra (*Abelmoschus esculentus*). 2014;2014.
52. Tarrago-Trani MT, Phillips KM, Cotty M. Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods. *J Food Compos Anal* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;26(1-2):12–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2012.03.004>
53. Odriozola-Serrano I, Hernández-Jover T, Martín-Belloso O. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.* 2007;105(3):1151–8.
54. Ciulu M, Solinas S, Floris I, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, et al. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;83(3):924–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.059>
55. Iwase H. Routine high-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods using L-methionine for the pre-analysis sample stabilization. *Talanta.* 2003;60(5):1011–21.
56. Iwase H. Use of an amino acid in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in food by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr A.* 2000;881(1-2):317–26.
57. Shui G, Leong LP. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2004;1022(1-2):67–75.
58. Gayosso-García Sancho LE, Yahia EM, González-Aguilar GA. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;44(5):1284–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.001>
59. Guardado J, Mercader F. Métodos analíticos adecuados a su propósito. 2005.

60. Yazdi AS, Yazdinezhad SR. Simultaneous Determination of Vitamin a and E in Infant Milk Formulas Using Semi-Micro Liquid–Liquid Extraction Followed By Hplc-Uv. *J Liq Chromatogr Relat Technol* [Internet]. 2014;37(3):391–403. Available from:  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826076.2012.745143>
61. Chen L, Liu Z, Kang X, Zhou X, Zheng S, Gu Z. Determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplements using packed-fiber solid phase extraction (PFSPE) for sample preconcentration/ clean-up. *Procedia Environ Sci* [Internet]. 2011;8(November):588–95. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.091>
62. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(23):2224–34.
63. NATA´s. Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative teste methods. 2013.
64. Joint Committee For Guides In Metrology (JCGM). International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM). *VIM3 Int Vocab Metrol* [Internet]. 2008;3(Vim):104. Available from:  
[http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM\\_200\\_2008.pdf](http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_200_2008.pdf)
65. Ruiz S, Luis F. *Incertidumbre de la Medición, Teoría y Práctica*. L&S Consultores CA [Internet]. 2001. p. 2–8. Available from:  
<http://www.lysconsultores.com/descargar/imtp.pdf>
66. Maroto A. *Incertidumbre en métodos analíticos de rutina*. 2002.
67. Eurachem. *Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas*. 2000.
68. Chile I de SP de. *Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición* [Internet]. 2010. Available from:  
[http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia T?cnica\\_1\\_validaci?n\\_de M?todos\\_y\\_determinaci?n\\_de\\_la\\_incertidumbre\\_de\\_la\\_medici?n\\_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_T?cnica_1_validaci?n_de_M?todos_y_determinaci?n_de_la_incertidumbre_de_la_medici?n_1.pdf)

69. Miller J., Miller J. Estadística para Química Analítica. Segunda Ed. 1998. 40-44 p.
70. Serrano F. IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO (HPLC/DAD) PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VITAMINAS LIPOSOLUBES EN LECHE. Universidad Industrial de Santander; 2008.
71. Gutiérrez T, Hoyos O, Páez M. Determinación de contenido de ácido ascórbico de uchuva (*Physalis peruviana* L) por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). *Fac Ciencias Agropecu.* 2007;5(1):10.
72. Mazurek A, Jamroz J. Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method – Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food. *Food Chem [Internet]. Elsevier Ltd;* 2015;173:543–50. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614016276>
73. Chebrolu KK, Jayaprakasha GK, Yoo KS, Jifon JL, Patil BS. An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC. *LWT - Food Sci Technol [Internet]. Elsevier Ltd;* 2012;47(2):443–9. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.004>
74. Horwitz W. Evaluation of analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Anal Chem.* 1982;54:67.
75. Ayala G. Validación de un método para la determinación de flavonoides y metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia-aplicación en el análisis de grano de cacao. 2014.
76. Schmid, Wolfgang A, Lazos Marínes RJ. Guía para estimar la incertidumbre de la medición [Internet]. Centro Nacional de Metrología. México. 2000. Available from:  
<http://www.paginaspersonales.unam.mx/files/473/Asignaturas/78/Archivo1.23.pdf>
77. Naidis I, Turpeinen S. 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. 2010.

## BIBLIOGRAFÍA

Entrala bueno A. Generalidades. Vitaminas: aspectos prácticos en medicina. Diaz de Santos; 1995. p. 3–11

Eurachem. Cuantificación de la Incertidumbre en Mediciones Analíticas. 2000

Guardado J, Mercader F. Métodos analíticos adecuados a su propósito. 2005.

Ministerio de la protección social. Resolución 333 de 2011. Diario oficial No 47984. 2011.

Sanders T, Emery P. Vitamins. Molecular Basis Of Human Nutrition. CRC press; 2003. p. 94–114