



Universidad de Los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Laboratorio de Productos Naturales

**“Determinación de *ácido ascórbico* en un suplemento nutricional  
mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección  
UV - arreglo de diodos.”**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Por:

María Andreína Pernía Rojas.

Mérida, Noviembre de 2017.



Universidad de Los Andes  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Laboratorio de Productos Naturales

**“Determinación de *ácido ascórbico* en un suplemento nutricional  
mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección  
UV - arreglo de diodos.”**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Por:

María Andreína Pernía Rojas.

Realizado con la asesoría de:

Dr. Carmelo Rosquete Porcar (ULA)

Lcdo. Junior Eubaldo Quintero León (Laboratorios VALMOR, C.A)

Mérida, Noviembre de 2017.

**A** *mis padres,*  
*de cuyos*  
*cabellos*

*grises yo soy una de las*  
*principales causas.*

*Con amor para ustedes,*  
*quienes son los que me*  
*permiten soñar.*

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este trabajo de investigación va en agradecimiento a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo, dedicación y tiempo.

En primera instancia a Dios Todopoderoso, fuente inagotable de fe, esperanza para seguir luchando, y patrocinador oficial de sueños y metas para los que en ÉL confían.

A mi madre; Isabel Rojas, y mi padre; Wuilian Pernía, mi norte, mi pilar fundamental de vida, y la razón por la que llegué hasta aquí. Gracias por haber formado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

A mis hermanos; Oriana, Winifer, Wuilliams, Sebastián y Hernán, unidos por el amor y la sangre, recuerden que este triunfo también es de ustedes.

A la ilustre Universidad de Los Andes (ULA), por brindarme la oportunidad de una formación profesional. Y en particular a la Facultad de Ciencias, por ser mi segundo hogar, pero en especial por abrirme sus puertas al conocimiento.

A la Industria Farmacéutica Nacional, Laboratorios VALMOR, C.A, y a todos los que en ella laboran, resaltando en particular al Dr. Ismer Bracho, quienes dieron en mí una visión del mundo profesional. Gracias por materializar mi meta al permitir ejecutar este proyecto de investigación en sus instalaciones.

Al Lcdo Junior Quintero, por el impecable orden de su cabeza. Gracias por el apoyo en los momentos difíciles, los valiosos conocimientos, la firmeza en los momentos que se requería, y por nunca escatimar tiempo y esfuerzo.

Al Dr. Carmelo Rosquete, por ser un extraordinario científico, y guía para el asesorado. Gracias por su valiosa paciencia, colaboración y gran ayuda en el desarrollo, corrección y culminación de este proyecto de investigación.

A todos, ¡MIL GRACIAS!

***María Andreína Pernía Rojas.***

ÍNDICE GENERAL

|  |      |
|--|------|
| Abreviaturas y símbolos .....                      | XII  |
| Glosario.....                                      | XIII |
| Resumen.....                                       | XIV  |
| CAPÍTULO 1   |      |
| 1.1 Introducción.....                              | 1    |
| 1.2 Planteamiento del problema.....                | 3    |
| 1.3 Hipótesis .....                                | 4    |
| 1.4 Objetivos .....                                | 4    |
| 1.4.1 Objetivo general.....                        | 4    |
| 1.4.2 Objetivos específicos.....                   | 4    |
| 1.5 Antecedentes .....                             | 5    |
| CAPÍTULO 2   |      |
| Marco teórico.....                                 | 10   |
| 2.1 Ácido ascórbico .....                          | 10   |
| 2.1.1 Estructura química .....                     | 10   |
| 2.1.2 Propiedades fisicoquímicas.....              | 12   |
| 2.1.3 Funciones de la vitamina C.....              | 12   |
| 2.1.4 Fuentes de ácido ascórbico .....             | 13   |
| 2.2 Suplementos nutricionales .....                | 14   |
| 2.2.1 Características del producto.....            | 16   |
| 2.2.2 Información nutricional .....                | 17   |
| 2.3 Cromatografía líquida de alta resolución.....  | 17   |
| 2.3.1 Descripción general y conceptos básicos..... | 18   |
| 2.3.2 Cromatograma .....                           | 20   |
| 2.3.3 Tiempo de retención ( $t_R$ ).....           | 21   |
| 2.3.4 Tiempo muerto ( $t_M$ ).....                 | 21   |
| 2.3.5 Factor de capacidad .....                    | 21   |
| 2.3.6 Constante de distribución.....               | 22   |
| 2.3.7 Eficiencia en cromatografía .....            | 22   |
| 2.3.8 Separación y resolución de la columna.....   | 24   |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.9 Ventajas y desventajas de la cromatografía líquida de alta resolución.....                              | 25 |
| 2.4 Instrumentación.....  | 26 |
| 2.4.1 Bomba.....  | 27 |
| 2.4.2 Inyector (Automuestreador).....   | 27 |
| 2.4.3 Compartimiento de la columna.....   | 28 |
| 2.4.4 Columna de separación.....  | 28 |
| 2.4.5 Detector.....   | 31 |
| 2.4.6 Dispositivo de recolección de datos.....  | 31 |
| 2.5 Validación de métodos analíticos.....   | 33 |
| 2.5.1 Parámetros de validación de métodos analíticos.....   | 34 |
| 2.5.1.1 Selectividad.....   | 34 |
| 2.5.1.2 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....                                       | 34 |
| 2.5.1.3 Intervalo lineal.....   | 35 |
| 2.5.1.4 Precisión.....  | 35 |
| 2.5.1.5 Exactitud.....  | 36 |
| CAPÍTULO 3  |    |
| Metodología experimental.....   | 37 |
| 3.1 Materiales, reactivos y equipos.....  | 37 |
| 3.1.1 Materiales.....   | 37 |
| 3.1.2 Reactivos.....  | 38 |
| 3.1.3 Equipos.....  | 39 |
| 3.2 Selección del método analítico para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales..... | 39 |
| 3.3 Selectividad del método.....  | 40 |
| 3.4 Parámetros cromatográficos.....   | 40 |
| 3.5 Validación del método.....  | 41 |
| 3.5.1 Curva de calibración sencilla.....  | 41 |
| 3.5.2 Curva de adición de estándar.....   | 42 |
| 3.5.3 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....   | 42 |
| 3.5.4 Intervalo lineal.....   | 43 |
| 3.5.5 Precisión.....  | 43 |

|   |    |
|---|----|
| 3.5.6 Exactitud o porcentaje de recuperación .....  | 43 |
| 3.6 Evaluación del cumplimiento con las especificaciones .....  | 44 |
| 3.6.1 Análisis adicionales de control de calidad .....  | 44 |
| CAPÍTULO 4  |    |
| Análisis de resultados .....  | 45 |
| 4.1 Selección del método analítico para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales..... | 45 |
| 4.1.1 Esquema de extracción para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales.....        | 48 |
| 4.2 Selectividad del método.....  | 49 |
| 4.3 Parámetros cromatográficos .....  | 53 |
| 4.4 Validación del método .....   | 54 |
| 4.4.1 Curva de calibración sencilla y curva de calibración de adición de estándar.....                        | 54 |
| 4.4.2 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) .....  | 57 |
| 4.4.3 Intervalo lineal .....  | 60 |
| 4.4.4 Precisión.....  | 60 |
| 4.4.5 Exactitud o porcentaje de recuperación .....  | 66 |
| 4.5 Evaluación del cumplimiento con las especificaciones .....  | 68 |
| 4.5.1 Análisis adicionales de control de calidad del suplemento nutricional .....                             | 70 |
| Conclusiones.....   | 72 |
| Recomendaciones .....   | 73 |
| Referencias bibliográficas.....   | 74 |
| Apéndice .....  | 79 |
| Anexos.....   | 84 |

ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla N° 1. Clasificación de las vitaminas en función de su solubilidad.....  | 15 |
| Tabla N° 2. Características fisicoquímicas del suplemento nutricional.....  | 16 |
| Tabla N° 3. Información nutricional de la mezcla en polvo fabricado por Laboratorios VALMOR, C.A.....   | 17 |
| Tabla N° 4. Ventajas y desventajas de la técnica de cromatografía líquida. ....   | 25 |
| Tabla N° 5. Características de la columna cromatográfica utilizada.....   | 30 |
| Tabla N° 6. Especificaciones de los reactivos empleados en el método de análisis desarrollado.....  | 38 |
| Tabla N° 7. Concentración final para cada punto de la construcción de la curva de calibración sencilla. ....  | 41 |
| Tabla N° 8. Concentración final para cada punto de la construcción de la curva de calibración de adición de estándar. ....  | 42 |
| Tabla N° 9. Metodologías de extracción utilizadas para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales.....  | 46 |
| Tabla N° 10. Parámetros cromatográficos óptimos para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales.....  | 53 |
| Tabla N° 11. Resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla y curva de adición de estándar para la determinación de ácido ascórbico en los diferentes lotes de análisis. .... | 56 |
| Tabla N° 12. Resultados obtenidos para la curva de calibración para el estudio de los límites de detección y cuantificación en el método desarrollado. ....                             | 57 |
| Tabla N° 13. Límite de detección y límite de cuantificación del método de análisis desarrollado.....  | 59 |
| Tabla N° 14. Intervalo lineal o intervalo útil de trabajo en el método desarrollado.....  | 60 |
| Tabla N° 15. Primer análisis de precisión de los lotes de estudio. ....   | 60 |
| Tabla N° 16. Segundo análisis de precisión de los lotes de estudio. ....  | 61 |
| Tabla N° 17. Tercer análisis de precisión de los lotes de estudio.....  | 61 |
| Tabla N° 18. Precisión de los lotes de análisis del suplemento nutricional sabor a vainilla. ....   | 62 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla N° 19. Análisis de precisión intermedia. ....   | 62 |
| Tabla N° 20. Análisis de repetibilidad.....   | 63 |
| Tabla N° 21. Precisión del sistema instrumental para la determinación de vitamina c en suplementos nutricionales.....   | 64 |
| Tabla N° 22. Adición de patrón a los lotes de análisis para el estudio del porcentaje de recuperación.....  | 66 |
| Tabla N° 23. Porcentaje de recuperación para las muestras de análisis en el método.....   | 67 |
| Tabla N° 24. Evaluación del cumplimiento con las especificaciones del contenido de ácido ascórbico en los diferentes lotes de producción del suplemento nutricional. .... | 69 |
| Tabla N° 25. Evaluación del cumplimiento con las especificaciones de densidad aparente y porcentaje de humedad en los diferentes lotes de producción. ....                | 71 |

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

|   |    |
|---|----|
| Gráfico N° 1. Representación de las curvas de calibrado (curva de calibración sencilla (CCS) y curva de calibración por adición de estándar (CCAЕ)). LOTE: G87508A00...                                 | 55 |
| Gráfico N° 2. Representación de las curvas de calibrado (curva de calibración sencilla (CCS) y curva de calibración por adición de estándar (CCAЕ)). LOTE: G87509A00...                                 | 55 |
| Gráfico N° 3. Representación de las curvas de calibrado (curva de calibración sencilla (CCS) y curva de calibración por adición de estándar (CCAЕ)). LOTE: G87509A00...                                 | 56 |
| Gráfico N° 4. Curva de calibración para el estudio del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales..... | 58 |
| Gráfico N° 5. Curva de calibración para cálculo de la desviación estándar de la señal del blanco para la determinación del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....              | 59 |

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura N° 1. Cromatograma ejemplo de los problemas presentados por la empresa. ....                 | 3  |
| Figura N° 2. Estructura química del ácido ascórbico. ....   | 11 |
| Figura N° 3. Oxidación y reducción del ácido <i>L</i> – ascórbico (AA).....                         | 11 |
| Figura N° 4. Batido nutricional de chocolate, vainilla y fresa.....                                 | 16 |
| Figura N° 5. Cromatograma característico de una muestra de análisis. ....                           | 20 |
| Figura N° 6. Cromatograma de dos bandas y parámetros para calcular eficiencia y resolución.....     | 25 |
| Figura N° 7. Los cinco módulos ineludibles de un cromatógrafo líquido.....                          | 26 |
| Figura N° 8. Cromatógrafo líquido de alta presión agilent technologies, serie 1200.....             | 26 |
| Figura N° 9. Extracción de la muestra en el sistema de inyección.....                               | 28 |
| Figura N° 10. Diagrama de la metodología experimental aplicada.....                                 | 37 |
| Figura N° 11. Diagrama de la metodología de extracción optimizada.....                              | 48 |
| Figura N° 12. Espectro 3D del patrón de ácido ascórbico con pureza de 99,98 %.....                  | 50 |
| Figura N° 13. Espectro 3D de la muestra de análisis.....  | 50 |
| Figura N° 14. Espectro 3D de la solución de extracción.....   | 51 |
| Figura N° 15. Espectro 3D de la muestra. Representación de absorbancia versus longitud de onda..... | 51 |
| Figura N° 16. Isograma del patrón de ácido ascórbico.....   | 52 |
| Figura N° 17. Isograma de la muestra de análisis. Suplemento nutricional de vainilla. .             | 52 |

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| Abreviatura y/o símbolo | Descripción   |
|-------------------------|---|
| °C                      | Grados centígrados.   |
| μL                      | Microlitro.   |
| μm                      | Micrómetro.   |
| AA                      | Ácido ascórbico.  |
| CL                      | Cromatografía líquida.  |
| CV                      | Coefficiente de variación.  |
| DER                     | Desviación estándar relativa.   |
| DHA                     | Dehydroascorbic acid – Ácido dehidroascórbico.  |
| EDTA                    | Ácido etilendiaminotetraacético.  |
| F.E.                    | Fecha de elaboración.   |
| F.V.                    | Fecha de vencimiento.   |
| FDA                     | Food and Drug Administration – Agencia de Alimentos y Medicamentos.                                 |
| G                       | Gramos.   |
| HPLC                    | High Performance Liquid Chromatography – Cromatografía líquida de alta resolución.                  |
| IAA                     | D - isoascorbic acid - Ácido D – isoascórbico.  |
| IUPAC                   | International Union of Pure and Applied Chemistry - Unión Internacional de Química Pura y Aplicada. |
| L                       | Litros.   |
| LOQ                     | Limited of quantification – Límite de cuantificación.   |
| LOD                     | Limited of detection - Límite de detección.   |
| LL                      | Límite lineal.  |
| mAU                     | Una milésima de unidad de absorbancia.  |
| Mcg                     | Microgramos.  |
| Mg                      | Miligramos.   |
| Min                     | Minutos.  |
| mL                      | Mililitros.   |
| Mm                      | Milímetros.   |
| MPA                     | Metaphosphoric acid – Ácido metafosfórico.  |
| Nm                      | Nanómetros.   |
| PCA                     | Perchloric acid – Ácido perclórico.   |
| pH                      | Potencial de hidrógeno.   |
| RP                      | Reversed phase – Fase reversa.  |
| TCA                     | Trichloroacetic acid – Ácido tricloroacético.   |
| t <sub>M</sub>          | Tiempo muerto.  |
| t <sub>R</sub>          | Tiempo de retención.  |
| UI                      | Unidades internacionales.   |
| USP                     | United States Pharmacopeia – Farmacopea de los Estados Unidos.                                      |
| UV                      | Ultravioleta – visible.   |

## GLOSARIO

**Batido:** Bebida elaborada a base de proteína de soya y suero de leche, mejor conocido como suplemento nutricional.

**Bin:** Mezclador que se utiliza para realizar mezclas uniformes y fluidas, bajo un sistema de mezclado convencional rotatorio fijo.

**Conservante:** Sustancias naturales o artificiales usadas para la preservación de los alimentos.

**Control de Calidad:** Ocupación de todos los mecanismos, acciones y herramientas realizadas para detectar la presencia de errores. El control de calidad asegura que los productos cumplan con los requisitos mínimos de calidad.

**Densidad aparente:** Relación entre el volumen y el peso seco de una sustancia sin compactarse, incluyendo huecos y poros que contenga.

**Especificaciones:** Conjunto explícito de requisitos que debe cumplir un determinado producto.

**Lote:** Grupo de manufacturas elaboradas específicamente sin solución de continuidad.

**Materia Prima:** Materia artificial o extraída de la naturaleza que se transforma industrialmente para la fabricación de un producto.

**Propiedades organolépticas:** Descripciones de las características físicas de un producto según las pueda percibir los sentidos; sabor, textura, olor, color.

**UI:** Unidad de medida estándar para las vitaminas individuales. Por ejemplo; Vitamina A; 0,00033 mg de retinol. Vitamina D; 0,000025 mg de ergosterol. Vitamina E; 0,67 mg de tocoferol.

## RESUMEN

El ácido ascórbico como vitamina hidrosoluble poco estable, es utilizado por la industria farmacéutica y alimentaria como marcador de referencia para establecer mecanismos de estabilidad de los productos y con ello realizar análisis de control de calidad bajo métodos analíticos que incluyen parámetros de exactitud, precisión y repetibilidad. Particularmente, el análisis de ácido ascórbico en los suplementos nutricionales producidos por Laboratorios VALMOR, C.A, presentaba problemas en cuanto al método de cuantificación, por lo que fue necesario reevaluar la metodología analítica a modo de proporcionar garantía de calidad producto fabricado. Por ello, en el presente Proyecto de Investigación se presenta el desarrollo y validación de un método por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de *ácido ascórbico* en una mezcla compleja hecha a base de proteína de soya y suero de leche. Este objetivo se alcanzó utilizando como medio de extracción una mezcla de ácidos conformados por; ácido *o*-fosfórico, ácido acético glacial y EDTA a pH 2,5; una fase móvil de fosfato monobásico de potasio a pH 3,0, y una columna cromatográfica C<sub>18</sub>, 5µm - (250 x 4,6) mm con un sistema de detección UV a 245 nm. El método de análisis fue selectivo para el ácido ascórbico a la longitud de onda de estudio, encontrando como límites de detección y de cuantificación: LOD =  $1,50 \times 10^{-3}$  mg/mL y LOQ =  $1,65 \times 10^{-3}$  mg/mL respectivamente. Asimismo, la metodología empleada presentó linealidad en un intervalo de  $(1,65 - 12,0) \times 10^{-3}$  mg/mL, además de precisión, repetibilidad y exactitud con porcentajes de recuperación del 95 %. Es importante mencionar que el método de análisis desarrollado permitió la evaluación del cumplimiento con las especificaciones a diferentes lotes producidos por la empresa, lo que dio garantía de calidad del producto fabricado.

**Palabras claves:** Ácido ascórbico, cromatografía líquida, evaluación de las especificaciones, método analítico, validación.

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUCCIÓN

La separación de una especie de interés de posibles interferencias resulta una etapa de vital importancia en los procedimientos analíticos antes de llevar a cabo la fase de medición y evaluación de resultados [Laitinen y Harris, 1982]. Sin embargo, la mayoría de los métodos de análisis químico son en general selectivos para unas pocas especies, pero muy pocos métodos son específicos. Hasta mediados del siglo XX, las separaciones analíticas se llevaron a cabo a través de métodos clásicos tales como; precipitación, destilación y extracción [Pickering, 1980], pero hoy en día y con los diversos avances tecnológicos a nivel mundial, las separaciones para análisis químico se realizan mediante técnicas como la cromatografía, en especial cuando las muestras están formadas por varios analitos y resultan ser complejas.

La cromatografía, es una potente técnica de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Esta técnica fue descubierta por el botánico ruso Mikhail Tswett, al conseguir la separación de pigmentos vegetales en solución de éter de petróleo, utilizando adsorbentes sólidos como el carbonato de calcio, dispuesto en un tubo de cristal vertical [Voet *et al.*, 2007; Ebbing y Gammon, 2010], observando la separación de los pigmentos vegetales en diversos colores. De allí radica su nombre, que; etimológicamente significa “**escritura en color**”, proveniente del griego *chroma* que significa color y *graphein* que significa escribir [Voet *et al.*, 2007].

Actualmente, existen diversas variedades de técnicas cromatográficas en las cuales todas trabajan bajo un principio similar, en este caso; la muestra de análisis se disuelve en una fase móvil (gas o líquido) y se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o superficie sólida [McMurry, 2008]. Dentro del conjunto de técnicas cromatográficas, la cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más utilizada, la razón de esto es; alta sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para automatización, capacidad para separar especies no volátiles y termolábiles, además de amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria química [Skoog *et al.*, 2008]. Esta importancia radica en la determinación de la concentración real de un analito en un determinado producto,

pudiendo evaluar el cumplimiento de las especificaciones para efectos de control de calidad. Un ejemplo de ello es el análisis de *ácido ascórbico* en los suplementos nutricionales producidos por Laboratorios VALMOR, C.A, en el estado Mérida, hechos a base de proteína de soya y suero de leche.

El ácido ascórbico (AA) también conocido como vitamina C, funciona principalmente en los productos alimenticios como marcador de referencia, ya que, al tratarse de una vitamina poco estable, su variación de concentración resulta relevante para establecer mecanismos que afectan su estabilidad y por ende el tiempo de vida útil del producto. Además de ello, la vitamina C es la más sensible de las vitaminas hidrosolubles, siendo lábil en presencia de humedad y oxígeno, pH, agentes oxidantes, temperatura y presencia de iones metálicos como el cobre y el hierro [King y de Pablo, 1987], por ende su caracterización resulta un reto de análisis químico, no por los métodos de determinación sino debido a los procedimientos de extracción y la poca estabilidad de la especie de interés.

Particularmente, el método de determinación de AA estipulado por Laboratorios VALMOR, C.A presentaba problemas de precisión y repetibilidad, además de desgaste de los equipos en general, sobre todo las columnas cromatográficas. De allí, la necesidad de reevaluar la metodología y plantear un método alternativo que permita cuantificar el ácido ascórbico (AA), utilizando menor cantidad de reactivos y bajo un método que incluya parámetros de exactitud, precisión y repetibilidad, implicando una validación analítica y estableciendo así una evidencia de que el procedimiento desarrollado conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos por la empresa.

## 1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el punto de vista de los análisis o métodos analíticos desarrollados por las industrias, es necesaria la estipulación de especificaciones que aseguren la calidad de los productos fabricados bajo parámetros de exactitud, precisión y repetibilidad de acuerdo a las características de cada producto y sus principios activos. Particularmente, Laboratorios VALMOR, C.A. como industria farmacéutica nacional figura como una empresa altamente competitiva con una gran responsabilidad social en la elaboración de productos de altísima calidad. Actualmente, dicha empresa emprendió un acuerdo de comercialización de productos de tipo alimenticios en los que se incluye un suplemento nutricional que contiene diversos componentes de interés dietético, cuyo análisis de control de calidad se efectúa en base a la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mediante la determinación de ácido ascórbico como marcador de referencia, estableciendo así mecanismos que afectan la estabilidad del producto. A pesar de que existe una metodología analítica para la determinación de AA en el suplemento, la misma no se adecua a las condiciones de equipos y reactivos dados por el Laboratorio de Calidad, siendo necesario adaptar otros métodos que han presentado problemas de repetibilidad y escasa estabilidad de la línea base en los análisis (figura N° 1), producto de los pH tan bajos utilizados; comprometiendo así la capacidad de la empresa de garantizar los atributos de calidad del producto. Es por ello que se ve la necesidad de reevaluar la metodología, y diseñar un método repetible y confiable, ajustado a las condiciones infraestructurales, permitiendo una mejora en la certificación de calidad del suplemento nutricional.

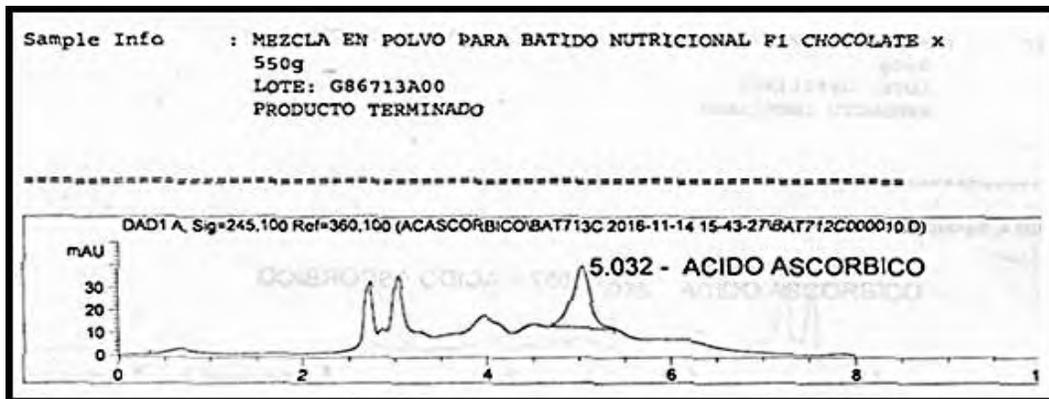


Figura N° 1. Cromatograma ejemplo de los problemas observados por la Empresa.

### 1.3 HIPÓTESIS

La modificación selectiva del pretratamiento de las muestras de análisis permitirá cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) el ácido ascórbico presente en los suplementos nutricionales producidos por Laboratorios VALMOR, C.A. bajo parámetros de exactitud, precisión y repetibilidad, permitiendo además el rendimiento de la columna cromatográfica y la obtención de cromatogramas con mayor estabilidad de la línea base, al utilizar pH controlados de todas las soluciones que atraviesan el sistema cromatográfico (fase móvil y solución de extracción).

### 1.4 OBJETIVOS

#### 1.4.1 Objetivo general.

- Determinar ácido ascórbico en un suplemento nutricional empleando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV – arreglo de diodos.

#### 1.4.2 Objetivos específicos.

- Desarrollar un método analítico para la determinación y cuantificación de ácido ascórbico en mezclas complejas a base de proteínas.
- Ajustar el método optimizado a las condiciones e infraestructuras disponibles en el Laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios VALMOR, C.A.
- Elaborar una metodología para la extracción e identificación del ácido ascórbico mediante una preparación sencilla de la muestra de análisis.
- Realizar ensayos de variación del pH de la fase móvil y del medio de extracción que alarguen el tiempo de vida útil de la columna de separación.
- Determinar las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de la vitamina C en la muestra alimenticia.
- Evaluar la metodología analítica bajo parámetros de selectividad, linealidad, exactitud, precisión y repetibilidad.

## 1.5 ANTECEDENTES

La aplicación de técnicas instrumentales como la cromatografía líquida representa una herramienta fundamental para el análisis de diversos tipos de muestras en industrias químicas como la farmacéutica y alimentaria. Particularmente, el análisis de ácido ascórbico constituye un tema de gran interés al que los investigadores de diversas Universidades e Instituciones Internacionales han dedicado un gran esfuerzo. Aunque son muchos los estudios realizados en base a la determinación de AA por HPLC, pocos tienen relación con la determinación del mismo en suplementos nutricionales o matrices similares a la estudiada en el presente trabajo de investigación.

Sin embargo, el método establecido por Laboratorios VALMOR, C.A [Moronta, 2016] estipula la determinación de AA en suplementos nutricionales hechos a base de proteína de soya y suero de leche (producto de interés) bajo un análisis químico que implica un medio de extracción de ácido *m*-fosfórico (MPA) al 5 %, con una fase móvil de ácido *o*-fosfórico al 0,02 %. En este método, el constituyente cromatográfico de mayor importancia lo representa la columna de separación de tipo Luna C<sub>18</sub> 5 µm, (250 x 4,6) mm, con un sistema de detección UV a 245 nm, una velocidad de flujo de 0,5 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL. El tiempo de corrida para el análisis es de 12 min, con un tiempo de retención alrededor de 6 min por parte de la vitamina C.

Es importante hacer énfasis en que la mayoría de las extracciones de AA se realizan con ácido *m*-fosfórico, tricloroacético, o ácido oxálico, bien sea solos o en combinación con otros ácidos o alcoholes de cadena corta como metanol o etanol. Adicionalmente, la oxidación inducida por cationes como hierro o cobre se puede evitar utilizando antioxidantes y agentes quelantes metálicos como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en la solución de extracción. Otra protección adicional del AA implica la purga de las soluciones con gas inerte para reducir la exposición al oxígeno disuelto en la matriz, realizar la extracción a baja temperatura y reducir la exposición de las muestras a la luz blanca [Nollet, 2000]. Además de ello, la cromatografía en fase reversa con columnas C<sub>18</sub> es la más empleada actualmente para dicho análisis, con detección UV o electroquímica con excelente sensibilidad y selectiva

al analito. Los contenidos de vitamina C se expresan comúnmente en miligramos (mg) [Nollet, 2009].

Como se dijo anteriormente, los trabajos e investigaciones encontrados en la literatura no se asemejan a la muestra o matriz de interés. Aun así, todos poseen relación con el presente estudio, ya que todas persiguen lo mismo; determinar ácido ascórbico mediante la técnica de cromatografía líquida en fase reversa con sistema de detección de UV.

Particularmente, en la década de los 90 investigadores como Rácz y colaboradores [Rácz *et al.*, 1990] determinaron AA en frutas y vegetales, específicamente en frambuesa congelada. El fruto de interés se desintegró en un mezclador y se adicionó cierta cantidad conocida del mismo a un matraz volumétrico de 100 mL al cual se le agregó el eluyente, que estaba constituido por una mezcla de metanol/agua/ácido acético glacial en proporción (30:69:1) y que contenía además 0,01 g/mL de cloruro de sodio (NaCl). Para dicho análisis el volumen de inyección de la muestra al sistema cromatográfico fue de 20  $\mu$ L, utilizando una columna de separación C<sub>18</sub>. La detección de AA se realizó a 230 nm y el flujo de fase móvil fue de 1mL/min a 20 °C. Este método fue rápido, fiable y no necesitó de químicos especiales o difíciles de conseguir. Además de ello, los resultados del estudio arrojaron valores del contenido de vitamina C en la frambuesa de 26,94 mg/g con una desviación estándar relativa de 0,02 % y un porcentaje relativo de error de 0,08 %.

Otro estudio en frutas frescas y vegetales fue realizado por Watada, A.E [Watada, 1982], quién utilizó como medio de extracción para la determinación de AA el MPA al 6 %. La fase estacionaria en este estudio estuvo constituida por una columna C<sub>18</sub> (8 mm x 10 cm) en un módulo de compresión radial Waters, con una fase móvil compuesta por 1,5 % de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 3,0. El flujo de fase móvil fue de 4,0 mL/min, y la longitud de onda de detección de 254 nm, con un tiempo de retención del analito de 1,98 min.

Por otro lado, investigadores como Grindberg y Willians [Gindberg y Williams, 2010], evaluaron el contenido de vitamina C en brócoli, pimentón rojo, naranjas y un

suplemento utilizando 250 µg/mL de hidrocloreuro de *tris*(2-carboxietil)-fosfina (TCEP – HCl) y una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 1 %. La fase móvil estuvo dada por; 1,6 g de decilamina, 80 mL de acetonitrilo, 100 mL de acetato de sodio (0,25 M) con 820 mL de agua ultra pura, ajustando el pH a 5,4 con ácido *o*-fosfórico concentrado y adicionando además 50 mL de la solución de TCEP–HCl. Las muestras de análisis fueron trituradas, y 10 g de estas se agregaron en balones de 100 mL con 40 mL de TCEP–HCl y aforando las mismas con TCA (1 %). Es importante mencionar que en dicho estudio los autores utilizaron el TCEP–HCl como agente reductor que evita la oxidación de la vitamina C, y el TCA para extraer el AA. Otras condiciones cromatográficas a tomar en cuenta son el flujo de la fase móvil y la longitud de onda de detección los cuales fueron de 1 mL/min y 265 nm respectivamente. Los análisis bajo este método fueron repetibles en las diversas muestras.

Shafqat y colaboradores [Shafqat *et al.*, 2012], estudiaron el contenido de AA en jugos locales de Pakistán bajo un método rápido y simple el cual fue preciso, repetible y consistente con porcentajes de recuperación entre (94 – 101) %. Al igual que en otros trabajos de investigación, los autores de este proyecto trataron la muestra de interés con MPA al 3 %, y una fase móvil constituida por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (20 mM). Respecto a las condiciones cromatográficas, se utilizó una fase estacionaria dispuesta por una columna C<sub>18</sub> 5 µm, (250 x 4,6) mm, bajo una detección UV a 240 nm y un tiempo de retención de (1,63 – 1,65) min del analito. Los resultados para esta investigación arrojaron curvas de calibración de estándar lineales bajo un rango de (0,1 – 2,5) mg/mL, con un límite de detección (LOD) de 0,05 mg/mL y un límite de cuantificación (LOQ) de 0,1 mg/mL.

Otros autores como Fatariah y colaboradores [Fatariah *et al.*, 2015] además de Correa y colaboradores [Correa *et al.*, 2011] determinaron vitamina C en frutos silvestres como *Benincasa hispida* y “camu camu” *Myrciaria dubia* utilizando MPA al 3 % y 4,5 % respectivamente. En cuanto a las condiciones cromatográficas, ambos trabajos de investigación muestran un flujo de fase móvil de 0,5 mL/min. Sin embargo, las fases móviles utilizadas por los autores al igual que la longitud de onda de detección varían en gran magnitud, pues Fatariah y colaboradores utilizaron fosfato dibásico de sodio detectando el analito a 230 nm mientras que Correa y colaboradores realizaron las

corridas con agua ultra pura acidificada con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a pH 2,2 y un sistema de detección a 245 nm. Se debe mencionar que las columnas cromatográficas de separación en ambos proyectos fueron de tipo  $C_{18}$  con dimensiones de 5  $\mu m$ , (125 x 4) mm y 5  $\mu m$ , (250 x 4) mm para cada caso. Particularmente, en el trabajo expuesto por Fatariah y colaboradores en 2015, compararon el contenido de AA en el extracto de fruto *Benincasa hispida* con tres extractantes diferentes; ácido *m*-fosfórico (3 %), ácido cítrico (3 %) y agua destilada, demostrando que la mejor extracción correspondió al ácido *m*-fosfórico, seguido de agua destilada y finalmente ácido cítrico. En dicho caso, los autores estudiaron la linealidad del método con MPA encontrando una curva de calibración lineal en un rango de (1,0–16,0)  $\mu g/mL$  con un LOD de 0,24  $\mu g/mL$  y un LOQ próximo a 0,8  $\mu g/mL$ . Por otro lado, el porcentaje promedio de recuperación fue de 93,52 % con un tiempo de corrida de 6 min, bajo un tiempo de retención de la especie de interés de 2,60 min.

Por su parte, Ferin y colaboradores [Ferin *et al.*, 2013], también estudiaron la estabilidad del ácido ascórbico mediante tres métodos de extracción que implicó; ácido *m*-fosfórico (MPA), ácido perclórico (PCA) y ácido tricloroacético (TCA) con una fase móvil de buffer de fosfato a pH 2,4. En este estudio, además de determinar AA, se cuantificó ácido úrico en plasma humano, con resultados que mostraron una mayor estabilidad del AA con MPA. Sin embargo, los autores indican que los otros dos ácidos también son representativos para la extracción. Bajo este método, ambos antioxidantes fueron cuantificados con buena repetibilidad y resultados de excelente linealidad con un coeficiente de correlación  $R^2 > 0,999$ .

Si bien es cierto que la mayoría de trabajos de investigación implican la determinación de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción el ácido *m*-fosfórico, existen otros autores que han determinado la vitamina C por HPLC con otros extractantes. Tal es el caso de Zuo [Zuo *et al.*, 2015], quienes determinaron creatinina, ácido úrico y ácido ascórbico en leche bovina y jugos de naranja. Este método estuvo basado en utilizar como eluyente ácido acético al 3 % (v/v), una fase móvil de acetoniitrilo/ buffer fosfato de sodio a pH 4,75 y una fase estacionaria con columna  $C_{18}$  5  $\mu m$ , (7,5 x 4,6) mm. Dentro de los parámetros cromatográficos, la

detección se realizó a 205 nm con un flujo de fase móvil de 1,2 mL/min. Dicha determinación obtuvo buena linealidad y sensibilidad, por lo que los autores proponen utilizar este método para el análisis de otros tipos de alimentos.

Investigadores como Brause y colaboradores [Brause *et al.*, 2003], realizaron un estudio interlaboratorio para evaluar por HPLC el contenido total de AA en alimentos a niveles de (5–60) mg/100 g de alimento. En esta investigación los autores hicieron hincapié en los jugos de fruta, aunque los alimentos también se incluyeron en el estudio. Luego de la disolución en agua de la muestra, el ácido dehidroascórbico (DHA) endógeno se convirtió en ácido ascórbico por reducción en la precolumna con ditiotreitól a pH neutro. El ascorbato total se determinó mediante cromatografía líquida en fase reversa con columna C<sub>18</sub> y un eluyente de fosfato a pH 2,5 incorporando ditiotreitól para mantener la vitamina C en forma reducida. La detección UV se efectuó a 254 nm. En dicho análisis se produjo una desviación estándar relativa de (5,80–14,66) % con lo cual los autores concluyeron que este método es adecuado para el uso rutinario en productos de frutas y alimentos que contienen alrededor de 5 mg/100 g de alimento de vitamina C.

Finalmente, la búsqueda de fuentes naturales de AA también reviste de gran interés por las características antioxidantes que tiene la vitamina de estudio. Así, investigadores como Gutiérrez y colaboradores [Gutiérrez *et al.*, 2007] realizaron estudios en los frutos silvestres de los Andes Suramericanos tales como la “uchuva” (*Physalis peruviana* L.), que registra contenidos de 20 a 32 mg de AA por cada 100 g de pulpa. El objetivo de este estudio fue encontrar las condiciones óptimas para la extracción, identificación y cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución del ácido ascórbico presente en la uchuva. Para ello, utilizaron como medio de extracción ácido *o*-fosfórico (0,05 N) del cual obtuvieron porcentajes de recuperación entre el (92,36–100,4) %. Las condiciones de operación más adecuadas para la cuantificación fueron; fase móvil: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 1 % pH 2,7. Fase estacionaria: C<sub>18</sub> 5 μm, (4,0 x 250) mm. Longitud de máxima absorción: 265 nm y un flujo de fase de 0,9 mL/min. La metodología de cuantificación presentó linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad a un nivel de confianza del 95 %.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### **2.1 ÁCIDO ASCÓRBICO**

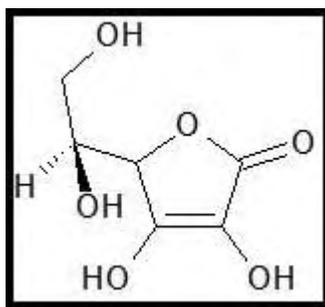
El ácido ascórbico, también conocido como vitamina C, es una vitamina hidrosoluble constituida por seis átomos de carbono, siendo sin duda la más conocida de todas las vitaminas ya que; fue la primera en descubrirse en 1928 por Albert Szent-Györgyi, además de ser caracterizada estructuralmente y sintetizada en el laboratorio en 1933 [McMurry, 2008; Hacisevki, 2009]. Su nombre procede del prefijo *a* – que significa “no” y de la palabra latina *scorbuticus* que significa escorbuto, una enfermedad causada por la deficiencia de vitamina C, y vista por primera vez entre los marineros de exploraciones de los siglos XVI a XVII [Montaño, 2011], en quienes aparecía hemorragia gingival, inflamación articular, manchas en la piel y debilidad muscular. Esta enfermedad también se pronunció en el antiguo Egipto, Grecia y Roma, y sobre todo en el norte de Europa durante los inviernos, cuando los frutos y hortalizas frescas eran difíciles de conseguir.

Hoy en día, el déficit de vitamina C constituye un fenómeno poco habitual, ya que solo basta cumplir ciertos hábitos alimenticios para asegurar las necesidades diarias de dicho micronutriente, siendo necesario consumir alrededor de 75 mg para la mujer y 90 mg para el hombre [National Institutes of Health, 2016]. En la actualidad, se sintetizan más de 200 millones de libras de vitamina C al año en todo el mundo, bajo distintas presentaciones, más que la cantidad total de las otras vitaminas combinadas [McMurry, 2008].

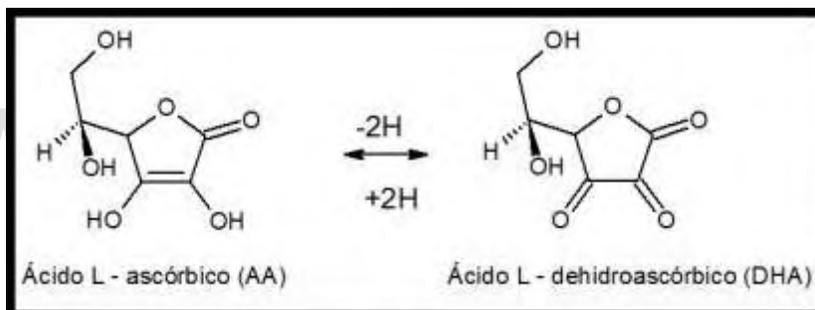
##### **2.1.1 Estructura química**

El ácido ascórbico es la forma enólica de una alfa cetolactona, cuya estructura molecular (figura N° 2) contiene dos átomos de hidrógeno enólicos ionizables que le confieren su carácter ácido y reductor [Arakelian, *et al.*, 2010]. Este compuesto es termolábil y se oxida con facilidad pudiéndose presentar en dos formas químicas interconvertibles; ácido ascórbico (AA) en su forma reducida, y ácido dehidroascórbico (DHA) en su forma oxidada (figura N° 3), siendo ambas formas biológicamente

funcionales que se mantienen en equilibrio fisiológico. El proceso oxidativo de AA a DHA se lleva a cabo por la transferencia de dos electrones, lo que implica una degradación en los que influyen números factores como; pH alcalino, presencia de oxígeno, enzimas y presencia de iones metálicos pesados como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ , y  $\text{Fe}^{+3}$  [Serra y Cafaro, 2007].



**Figura N° 2.** Estructura química del ácido ascórbico.



**Figura N° 3.** Oxidación y reducción del ácido *L*-ascórbico (AA).

La forma natural de la vitamina C es el isómero *L*, que posee diversas propiedades nutricionales significativas. Sin embargo, también se conoce el isómero *D* del ácido ascórbico, conocido como ácido *D*-isoascórbico (IAA), que tiene alrededor del 10 % de la actividad del isómero *L*, pero sin fines vitamínicos. Ambos isómeros difieren en la configuración del carbono 5 [Serra y Cafaro, 2007]. De manera general, el IAA es utilizado en la industria alimentaria ya que el mismo resulta ser efectivo como antioxidante y no es tóxico, aunque su actividad biológica resulta menor al compararse con AA. Además de ello, el IAA se ha utilizado ampliamente como estándar interno en una serie de métodos analíticos cromatográficos para la determinación de AA [De Leenheer *et al.*, 1992].

### 2.1.2 Propiedades fisicoquímicas

- **Nombre IUPAC:** (R)-3,4-dihidroxi-5-((S)-1,2-dihidroxi-etil)furano-2(5H)ona.
- **Características:** Polvo cristalino de color blanco, sin olor particular.
- **Fórmula molecular:** C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>
- **Peso molecular:** 176,12 g/mol.
- **Punto de fusión:** (190–192) °C, con descomposición.
- **Densidad:** 1,65 g/mol.
- **Índice de refracción:** 1,65 a 25 °C.
- **Solubilidad:** Soluble en agua (0,3 g/mL) y etanol pero no en algunos solventes orgánicos como el éter etílico, benceno, cloroformo y éter de petróleo [Lide, 2006 – 2007].

### 2.1.3 Funciones de la vitamina C

Actualmente, no se conoce con precisión el cometido bioquímico del ácido ascórbico, sin embargo se sabe de su importancia en numerosos procesos vitales. Su papel biológico principal es el de actuar como cofactor en diversas reacciones enzimáticas que dan lugar en el organismo. Así, el AA actúa como coenzima de las hidroxilasas de prolina y lisina, encargadas de hidroxilarse en el protocógeno [De Leenheer *et al.*, 1992] y con ello dar paso a la síntesis de las fibrillas del mismo (colágeno), necesario para la formación y mantenimiento del tejido conjuntivo normal del organismo, como los cartílagos, tendones y huesos [Gutiérrez, 2000]; también interviene en la síntesis de lípidos, proteínas, norepinefrina, serotonina, L-carnitina, y en el metabolismo de tirosina, histamina y fenilalanina [Serra *et al.*, 2006].

Intercede en el metabolismo de algunos aminoácidos, favorece la absorción del hierro al convertirlo a su forma ferrosa, y activa al ácido fólico a su forma vitamínica. Por otro lado, protege la vitamina A, vitamina E y algunas vitaminas B de la oxidación, participa en la formación de determinadas hormonas y neurotransmisores como la adrenalina, que son secretadas durante situaciones de estrés, como el ejercicio [Melvin, 2002].

#### 2.1.4 Fuentes de ácido ascórbico

Las principales fuentes naturales de vitamina C incluyen en general frutas, hortalizas y diversos tipos de hojas. Se encuentra en mayor magnitud en cítricos como las naranjas, limones y toronja. En vegetales de hojas crudas como la lechuga y el repollo, además de tomates, fresas, melón, pimientos y espinaca. Las hortalizas de raíz y las papas contienen cantidades pequeñas pero útiles para la ingesta del hombre. El maíz tierno, así como los cereales germinados y las legumbres también aportan ácido ascórbico [Hernández y Sastre, 1999; Thomas, 2016]. Algunos productos animales como la carne, pescado, leche y huevos también tienen cantidades discretas de vitamina C; sin embargo, como el calor la destruye con facilidad; la cocción prolongada de estos alimentos puede destruir cantidad importante de la vitamina que contenga [Melvin, 2002].

Por otro lado, diversos tipos de industrias utilizan ampliamente el ácido ascórbico potencializando sus propiedades. Así; la industria cosmética aprovecha el poder antioxidante que posee para combatir la oxidación y generación de radicales libres causante del envejecimiento prematuro. La industria farmacéutica, por su parte, se ha dado a la tarea de producir diversos medicamentos que contienen vitamina C para el combate y prevención de algunas enfermedades. Mientras que en la industria alimentaria, el ácido ascórbico es utilizado como aditivo, siendo adicionado no por su valor nutricional como vitamina sino por sus propiedades antioxidantes como conservante, de manera que se utiliza para preservar determinados alimentos de la degradación bacteriana y microbiana. Sin embargo, el uso de AA como aditivo alimentario está totalmente regulado y se realiza en dosis mínimas e inocuas.

La vitamina presente en los suplementos y/o medicamentos se encuentra en forma de ácido ascórbico, pero algunos casos contienen otras formas como; ascorbato de sodio, ascorbato de calcio, otros tipos de ascorbatos minerales y ácido ascórbico con bioflavonoides. Diversos estudios científicos no han demostrado que ninguna forma de vitamina C sea más efectiva que otra [Damodaran *et al.*, 2007].

## 2.2 SUPLEMENTOS NUTRICIONALES

Durante los últimos años la percepción que la industria y el consumidor tienen de los alimentos ha sido modificada sustancialmente. Particularmente, el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido a la industria alimentaria la fabricación de productos que aportan necesidades energéticas y nutricionales básicas, incluyendo beneficios fisiológicos a partir de ciertos componentes químicos que tienen los alimentos [Gómez, 2010], y que hoy en día se aprovechan como suplementos nutricionales. La Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés “Food and Drug Administration”) de los Estados Unidos [Astiasarán, 2003] definió en 1994 los suplementos nutricionales del siguiente modo;

*“Sustancias incorporadas a un alimento para incrementar la ingesta diaria en vitaminas, minerales, aminoácidos, etc. y prevista para ser tomado bajo la forma de píldoras, cápsulas, pastillas, o líquido, pero nunca como un alimento convencional o como un único producto alimenticio dentro de una comida.”*

Desde el punto de vista nutricional, los suplementos tienen el objetivo de aportar nutrientes de dos tipos: macronutrientes; que se requieren en mayor proporción como proteínas, carbohidratos y lípidos, y micronutrientes; que aunque se necesitan en menor cantidad son fundamentales para el organismo por intervenir en funciones vitales, en este caso se encuentran; las vitaminas, minerales, ácidos grasos, y aminoácidos [Hernández, 2004]. De este modo, los suplementos tienen ciertos beneficios a tomar en cuenta, según las características o contenido de los mismos. Algunos de ellos son capaces de asegurar la ingesta de sustancias vitales que el cuerpo necesita para funcionar y otros incluso ayudan a reducir el riesgo de enfermedades, aun así, estos no deben sustituir por completo las comidas que son necesarias para una dieta saludable, y aunque pueden ser beneficiosos para la salud, también implican ciertos riesgos [U.S Food & Drug, 2016], ya que muchos de ellos contienen ingredientes activos que tienen fuertes efectos biológicos en el cuerpo, lo que los hace inseguros en algunas situaciones y afectar o complicar la salud. Un ejemplo de ello es el ácido ascórbico como conservante presente en la mayoría de suplementos, que puede causar una absorción excesiva de hierro conduciendo a una hemocromatosis, o provocar litiasis renales, es decir; aparición

de piedras en los riñones. Por ende, el consumo excesivo de suplementos puede implicar alteraciones en la absorción intestinal o provocar interferencias con la absorción de otros nutrientes [Astiasarán, 2003].

Como se mencionó; los suplementos contienen un conjunto de nutrientes entre los cuales cabe destacar las vitaminas. Estas son sustancias orgánicas biológicamente activas que contienen carbono, hidrógeno y en algunos casos, oxígeno, nitrógeno y azufre. Estas son presintetizadas por las plantas, pero los animales y los humanos carecen de las enzimas necesarias para producirlas, por esta razón son ingeridas a través de los alimentos y son necesarias en cantidades pequeñas para el desarrollo normal y el mantenimiento de la integridad física del ser humano [Serra *et al.*, 2006], por ende la ausencia de las mismas puede causar determinados síndromes de deficiencia específica.

En general, las vitaminas se dividen clásicamente en dos grupos de acuerdo a su solubilidad en grasas o en agua [García, 2002].

**Tabla N° 1.** Clasificación de las vitaminas en función de su solubilidad.

| <b>HIDROSOLUBLES</b>                   | <b>LIPOSOLUBLES</b>     |
|--|-------------------------|
| Ácido ascórbico (vitamina C)           | Calciferol (vitamina D) |
| Ácido fólico                           | Tocoferol (vitamina E)  |
| Ácido pantoténico                      | Retinol (vitamina A)    |
| Biotina                                | Vitamina K              |
| Cobalamina (vitamina B <sub>12</sub> ) |                         |
| Niacina                                |                         |
| Piridoxina (vitamina B <sub>6</sub> )  |                         |
| Tiamina (vitamina B <sub>1</sub> )     |                         |
| Riboflavina (vitamina B <sub>2</sub> ) |                         |

Las vitaminas resultan de vital interés para el desarrollo de este Trabajo Especial de Grado ya que; la empresa venezolana Laboratorios VALMOR, C.A. firmó un acuerdo de comercialización para la fabricación de productos de tipo alimenticios en los que se incluye un suplemento nutricional a base de proteína de soya y suero de leche

(figura N° 4), cuyo control de calidad implica el análisis de una vitamina hidrosoluble conocida como **vitamina C (ácido ascórbico)**.



**Figura N° 4.** Batido nutricional de chocolate, vainilla y fresa.

### 2.2.1 Características del producto

El aspecto del suplemento nutricional producido por la empresa Laboratorios VALMOR, C.A. es en polvo, y sus especificaciones se resumen en la tabla N° 2, teniendo en cuenta que el mismo deriva de una presentación en cuatro sabores diferentes; chocolate, fresa, galleta y crema además de vainilla.

**Tabla N° 2.** Características fisicoquímicas del suplemento nutricional.

| Presentación                  | Especificaciones              |             |   |                 |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------|---|-----------------|
|                               | Chocolate                     | Fresa       | Galleta y crema                         | Vainilla        |
| Aspecto                       | Polvo fino                    |             |   |                 |
| Olor                          | Chocolate                     | Fresa       | Crema                                   | Vainilla        |
| Sabor                         | Chocolate                     | Fresa       | Crema con galleta                       | Vainilla        |
| Color                         | Marrón                        | Rosa pálido | Crema con migas de galleta de chocolate | Amarillo pálido |
| Componente activo de análisis | Ácido ascórbico (vitamina C). |             |   |                 |
| Cantidad declarada            | 10 mg / 25 g de batido.       |             |   |                 |

### 2.2.2 Información nutricional

La mezcla en polvo para batido nutricional fórmula 1 (figura N° 4) contiene la siguiente información nutricional en base a 25 g de producto por cada 240 mL de agua.

**Tabla N° 3.** Información nutricional de la mezcla en polvo fabricado por Laboratorios VALMOR, C.A.

| <b>Nutrición</b>         | <b>Cantidad aportada</b> |
|--------------------------|--------------------------|
| Vitamina A               | 661UI                    |
| Tiamina                  | 0,22 mg                  |
| Niacinamida              | 3,7 mg                   |
| Ácido pantoténico        | 1 mg                     |
| Vitamina B <sub>6</sub>  | 0,67 mg                  |
| Biotina                  | 8 mcg                    |
| Ácido fólico             | 76 mcg                   |
| Vitamina B <sub>12</sub> | 0,41 mcg                 |
| <b>Vitamina C</b>        | <b>10 mg</b>             |
| Vitamina D               | 33 UI                    |
| Selenio                  | 18 mcg                   |
| Vitamina E               | 3,4 UI                   |
| Calcio                   | 94 mg                    |
| Cobre                    | 457 mcg                  |
| Fósforo                  | 145 mg                   |
| Hierro                   | 9 mg                     |
| Magnesio                 | 127 mg                   |
| Potasio                  | 289 mg                   |
| Zinc                     | 2,3 mg                   |
| Yodo                     | 49 mg                    |
| Manganeso                | 0,33 mg                  |

### 2.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

En la industria farmacéutica y alimentaria, la  *cromatografía líquida de alta resolución* (HPLC, por sus siglas en inglés “High Performance Liquid Chromatography”) es una de las técnicas más aplicadas para el análisis químico de sustancias térmicamente lábiles o moléculas de gran tamaño presentes en mezclas complejas debido a su alta sensibilidad y adecuación para realizar determinaciones cuantitativas exactas [Skoog *et al.*, 2008]. Esta técnica consiste en separar sustancias disueltas en una mezcla por adsorción selectiva de los constituyentes de la misma, siendo una variante de la técnica en columna simple, basada en el descubrimiento de que

las separaciones cromatográficas mejoran si la fase estacionaria está constituida por partículas esféricas de tamaño uniforme y muy pequeñas. Dicho método, requiere de bombas de alta presión para hacer pasar el disolvente a través de una columna estrechamente empaquetada, y se utilizan detectores electrónicos para monitorear la aparición del material que eluye por la misma [McMurry, 2008].

### 2.3.1 Descripción general y conceptos básicos

La cromatografía es una técnica que permite separar, identificar y cuantificar sustancias o componentes de una mezcla bajo dependencia de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases no miscibles que se conocen con el nombre de fase estacionaria y fase móvil. La fase estacionaria es un lecho fijo de gran área superficial que puede ser un sólido poroso o finamente dividido que permite la adsorción o desorción de los solutos con frecuencia. Mientras que la fase móvil es un líquido que se mueve a través de la fase estacionaria, y puede ser un líquido puro o una mezcla de soluciones [Gennaro, 2003].

En todas las separaciones cromatográficas, la fase móvil transporta la muestra y se hace pasar a lo largo de la capa o columna que contiene la fase estacionaria, encontrando que; a medida que la fase móvil fluye por la fase estacionaria, los solutos se distribuyen entre ambas fases. Aquellos componentes fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de fase móvil, por el contrario; los componentes menos afines se mueven más rápidamente a través de la fase estacionaria. Por ende, el tiempo de residencia de la molécula en la fase estacionaria depende de las fuerzas de interacción entre las fases y el analito [Bromatología, 2015].

En función del mecanismo de separación y de la naturaleza de la fase estacionaria, es posible clasificar la cromatografía líquida de cuatro maneras diferentes [Skoog *et al.*, 2008];

- **Cromatografía de adsorción:** Es la forma clásica de CL que introdujo Tswett a principios del siglo XX. Anteriormente fue utilizada para separar especies no polares, isómeros estructurales y grupos de compuestos como los hidrocarburos alifáticos, pero debido a problemas de reproducibilidad, esta se reemplazó por la cromatografía en fase

normal. La fase estacionaria es un adsorbente que permite que las separaciones ocurran por repetidas etapas de adsorción–desorción, y están formadas por sílice o alúmina finamente dividida.

- **Cromatografía de reparto:** La separación se basa en un reparto del soluto entre las dos fase inmiscibles (fase móvil y fase estacionaria). En cromatografía de reparto, los soportes están preparados con sílice rígida, cuyas superficies son mecánicamente resistentes, porosas y uniformes, con diámetros de 1,5 a 10  $\mu\text{m}$ .

- **Cromatografía de intercambio iónico:** Esta técnica se refiere a los métodos modernos y eficientes para separar iones en columnas con relativa capacidad de intercambio catiónico y aniónico. La fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente iones de signo contrario que circulan en la fase móvil.

- **Cromatografía de exclusión por tamaño:** Esta técnica se aplica en particular a especies de elevada masa molecular. La fase estacionaria es un material poroso de tamaño controlado que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño.

El mecanismo de retención en los dos primeros casos es similar, variando únicamente el tipo de interacción que ocurre en la fase estacionaria dependiendo de la polaridad. Así, se puede tener una clasificación adicional de las técnicas cromatográficas;

- **Cromatografía en fase normal:** Cuya fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones que se producen con el analito son específicas. En este tipo de cromatografía el componente menos polar se eluye primero, y la fase estacionaria es un sólido adsorbente (sílice o alúmina), o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad (ciano, amino, entre otros).

- **Cromatografía en fase reversa:** La naturaleza de la fase estacionaria es apolar, y posee cadenas hidrocarbonadas o grupos fenilos unidos. Particularmente, en este tipo de

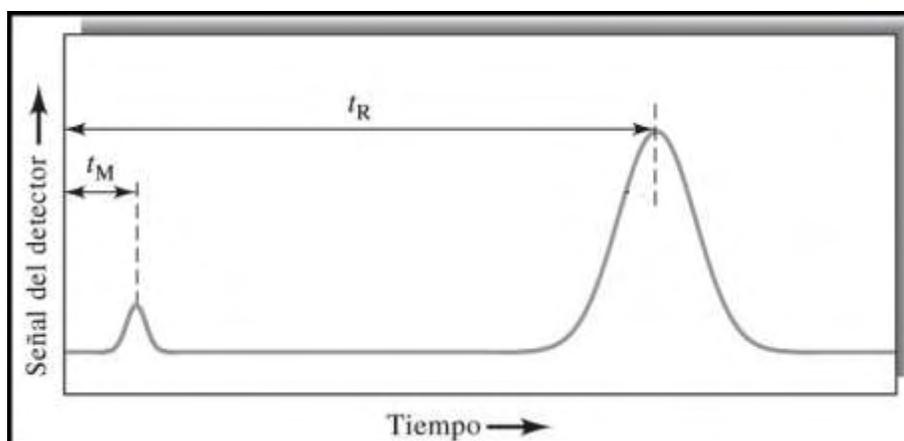
cromatografía los componentes más polares aparecen primero en el cromatograma y un aumento de la polaridad de la fase móvil incrementa el tiempo de elución. En general, la cromatografía en fase reversa aplica a especies polares pero no iónicas.

### 2.3.2 Cromatograma

Considerando la separación de una sustancia en una columna mediante el transporte de la especie de interés por adición sucesiva de la fase móvil sobre la fase estacionaria, y disponiendo de un dispositivo al final de la columna que responda a los cambios de composición de la fase móvil o concentración del soluto, es posible registrar un **cromatograma** [Gómez *et al.*, 2009].

Un cromatograma, es un gráfico que representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución (figura N° 6). El detector registra en forma de curvas gaussianas (forma de campana) los componentes eluidos, bajo señales que se denominan picos y que dan información cualitativa y cuantitativa del analito en cuestión, y cuya línea base representa la señal del detector en ausencia de compuestos eluidos.

Cualitativamente, el tiempo de retención,  $t_R$ , es siempre constante bajo condiciones cromatográficas idénticas, lo que implica la identificación de un pico o analito por comparación de tiempos con un patrón. De manera cuantitativa, el área de un pico es proporcional a la cantidad de muestra inyectada o introducida al sistema, por lo que es posible conocer exactamente la concentración de las especies bajo integración del área de la señal [Skoog *et al.*, 1997].



**Figura N° 5.** Cromatograma característico de una muestra de análisis.

### 2.3.3 Tiempo de retención ( $t_R$ )

Teniendo en cuenta que la *retención* en cromatografía es la capacidad que tiene la fase estacionaria de retener la sustancia de interés; es posible definir el *tiempo de retención* ( $t_R$ ) como el tiempo que tarda el analito en atravesar la columna hasta llegar al detector una vez inyectada la muestra al sistema, alcanzando así el máximo de señal [CSIC, 2010], como se muestra en la figura N° 6.

El tiempo de retención, es sin duda el parámetro más sencillo de medir, este se expresa en unidades de tiempo y depende directamente del flujo de la fase móvil y la interacción del compuesto sobre la fase estacionaria. Mientras mayor es el flujo del diluyente más corto es el tiempo de retención, y a mayor retención en la fase estacionaria más largo es el tiempo que tarda en detectarse el analito.

### 2.3.4 Tiempo muerto ( $t_M$ )

En la figura N° 6, se aprecia un pico que representa una especie que no se retiene en la columna por interacción con la fase estacionaria, pero que alcanza al detector poco tiempo después de inyectar la muestra al sistema. En términos generales, el *tiempo muerto*,  $t_M$ , se conoce como el tiempo que tarda la especie no retenida en alcanzar el detector [Lia, 2008].

### 2.3.5 Factor de capacidad

En un sistema cromatográfico, el factor de capacidad ( $k'$ ) permite describir las velocidades de migración de los analitos en la columna de separación y se define como;

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1)$$

$k'$ : factor de capacidad (adimensional)

$t'_R$ : tiempo de retención ajustado (min).

Mientras mayor es el factor de capacidad menor es la velocidad de migración de los solutos en la misma [Valcárcel y Gómez, 1988], por el contrario; si  $k'$  es muy pequeño, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar los  $t_R$  con exactitud. Este

factor además, permite relacionar los volúmenes o tiempos de retención de un componente respecto a la fase móvil, matemáticamente esto es;

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_{FM}} \quad (2)$$

$K_A$ : Constante de distribución

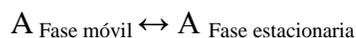
$V_S$ : Volumen de fase estacionaria

$V_{FM}$ : Volumen de fase móvil.

Sin embargo, en términos experimentales este parámetro es tomado a partir del cromatograma en función de la ecuación 1 donde  $t'_R$  es el *tiempo de retención ajustado*, que se define como el tiempo de permanencia de un analito en la fase estacionaria bajo la resta de  $t_R$  y  $t_M$  [CSIC, 2010].

### 2.3.6 Constante de distribución

La transferencia de un analito durante su desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico depende de la afinidad que este tiene con las fases inmiscibles (estacionaria y móvil) [Bromatología, 2015]. Por ende, para una especie A se cumple;



Este equilibrio es dinámico, y mide la distribución del analito entre la fase estacionaria y móvil bajo un término conocido como *constante de distribución* ( $K$ ), definida matemáticamente como;

$$K = \frac{[A]_S}{[A]_M} \quad (3)$$

Siendo  $[A]_S$  la concentración molar del analito en la fase estacionaria y  $[A]_M$  la concentración molar de analito en la fase móvil.

### 2.3.7 Eficiencia en cromatografía

Evidencias anteriores demuestran que: los picos cromatográficos son representaciones de curvas semejantes a una campana de Gauss, la cual se explica del siguiente modo; durante el desplazamiento por el interior de una columna

cromatografica, una partícula individual de analito experimenta miles de transferencias entre la fase móvil y estacionaria. El tiempo de residencia en una fase dada es irregular, lo que implica que el tiempo de permanencia de la partícula dentro de la columna también es anómalo, ya que algunas partículas se desplazan rápidamente por su permanencia mayor en la fase móvil, mientras que otras lo hacen con mayor lentitud como consecuencia de la interacción con la fase estacionaria [González, 2012].

Como los procesos ya mencionados transcurren de forma aleatoria, se obtiene una dispersión de los tiempos de residencia en la columna alrededor de un valor medio, originándose un pico gaussiano [Simpson, 1976].

En cromatografía, el objetivo es la obtención de picos estrechos y sobre todo simétricos, por ende; el término **eficiencia** se utiliza para describir el ensanchamiento de las bandas de los solutos en su movimiento a través de la columna. Para realizar una separación cromatográfica óptima, debe evitarse el ensanchamiento de las bandas, en efecto, cuanto más anchos sean los picos, menor número de ellos pueden ser resueltos en un espacio dado, es decir, cuanto más agudos sean los picos que emergen de la columna mejor estará actuando esta [CSIC, 2010]. La anchura de una banda, depende de las características de la columna, además de factores como velocidad de la fase móvil.

La eficiencia, por otro lado se define en base a dos términos afines (medida cuantitativa) que derivan de la *teoría de platos teóricos*; basada en considerar que la columna cromatográfica está constituida por numerosas, pero discretas, capas estrechas denominadas platos. Así, en cada plato teórico se establece un equilibrio del analito entre las dos fases, y el desplazamiento de este a través de la columna, es decir, hay una transferencia de la fase móvil desde un plato al siguiente. De allí derivan entonces los dos términos que definen la eficiencia de la columna [Simpson, 1976]; la *altura del plato* H y el *número de platos* N, descritos por la ecuación;

$$N = \frac{L}{H} \quad (4)$$

siendo L, la longitud en centímetros del relleno de la columna. De este modo, la eficiencia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos y

cuanto menor es la altura del mismo. Experimentalmente, dicha evaluación se puede realizar a partir de la siguiente ecuación;

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (5)$$

W; anchura del pico a considerar.

Es importante mencionar que el número de platos depende de la calidad de la columna, la uniformidad de la fase estacionaria, la calidad del empaque, las dimensiones de la columna, así como las condiciones de operación (velocidad de flujo, temperatura de la fase móvil, entre otros).

### 2.3.8 Separación y resolución de la columna

Hasta el momento se ha considerado solo el caso de que exista una única banda proveniente de un analito, sin embargo; el principio de la cromatografía es separar mezclas de varios componentes, siendo sumamente importante considerar la separación de varias bandas o picos. Así, la *resolución* ( $R_S$ ) de la columna constituye una medida cuantitativa de la capacidad de separar las sustancias de interés.

La separación entre dos bandas cromatográficas (figura N° 7) debe estudiarse en función de dos parámetros, la *retención relativa* ( $\alpha$ ), que se define como el cociente entre los tiempos de retención corregidos de las dos bandas:

$$\alpha = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}} = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (6)$$

y la *resolución* ( $R_S$ ), que es el cociente de la distancia entre los centros de las dos bandas y el valor medio de la anchura de los mismos:

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (7)$$

Por ende, una separación total de dos bandas o analitos requerirá de valores elevados de  $\alpha$  y  $R_S$ . Para  $R_S$  estos se consiguen con la eficiencia de la columna, mientras

que el valor de  $\alpha$  es constante para cada sistema cromatográfico y solamente podrá variarse alterando la fase estacionaria o móvil.

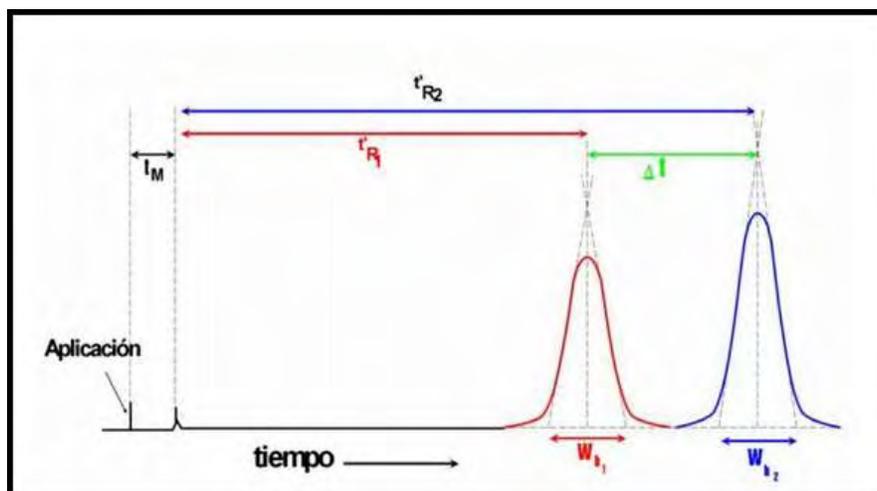


Figura N° 6. Cromatograma de dos bandas y parámetros para calcular eficiencia y resolución.

### 2.3.9 Ventajas y desventajas de la cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución se utiliza en casi todas las ramas de la ciencia para la separación e identificación de compuestos en diversos tipos de muestras o matrices. Aunque resulta ser de una técnica poderosa para el análisis químico tiene ciertas ventajas y desventajas asociadas, entre las que destacan;

Tabla N° 4. Ventajas y desventajas de la técnica de cromatografía líquida.

| Ventajas   | Desventajas                              |
|--|--|
| Alta resolución y automatización                       | Alto costo                               |
| Eficiencia y reproducibilidad                          | La muestra debe ser soluble              |
| Análisis rápidos, analíticos y preparativos            | Requiere uso de patrones certificados    |
| Resultados cuantitativos y límites de detección buenos | Difícil resolución en muestras complejas |

## 2.4 INSTRUMENTACIÓN

El equipo necesario para llevar a cabo un análisis por HPLC implica un cromatógrafo líquido de alta presión constituido por cinco módulos integrados (figura N° 8) en los que se encuentra; una bomba, un inyector, una columna cromatográfica, un detector y un sistema de registro de datos.

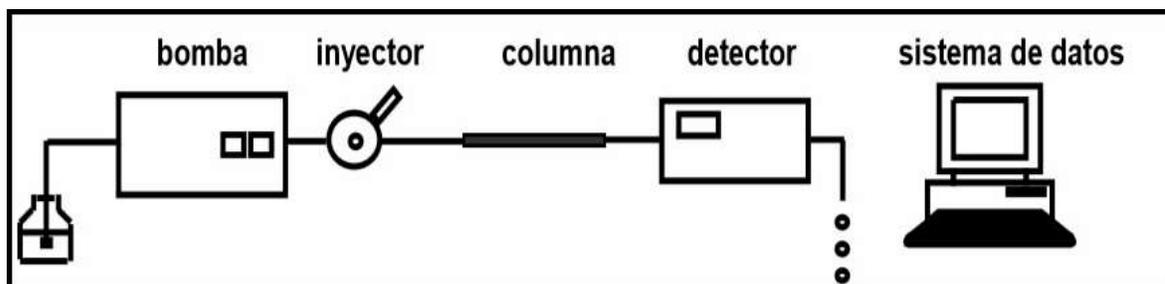


Figura N° 7. Los cinco módulos ineludibles de un cromatógrafo líquido.

En Laboratorios VALMOR, C.A se dispone de equipos Agilent Technologies de la serie 1200 y 1260 cuyos módulos y características se describen a continuación, teniendo en cuenta que el equipo utilizado para el trabajo de investigación es el de la serie 1200 (figura N° 9).

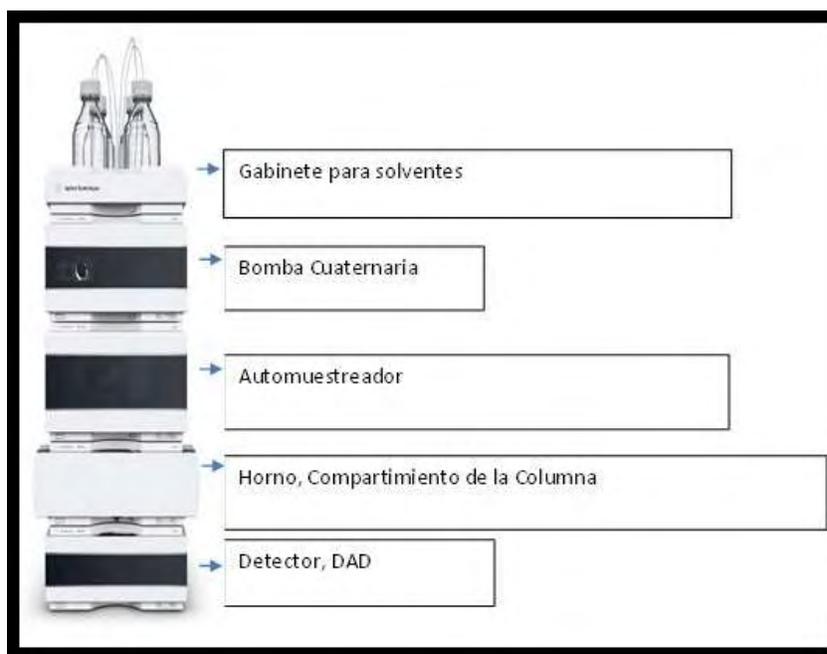


Figura N° 8. Cromatógrafo líquido de alta presión Agilent Technologies, serie 1200.

### 2.4.1 Bomba

En un sistema cromatográfico, la bomba es quien permite forzar el paso de la fase móvil a través del sistema de alta presión. Los sistemas modernos cuentan con varias bombas reguladoras controladas por un computador cuya ventaja radica en la variación de la relación entre los componentes de la fase móvil.

Los equipos Agilent, en primera instancia cuentan con un gabinete para la disposición de solventes, constituido por cuatro líneas, cuya ventaja radica en la integración de una bomba cuaternaria en el primer módulo del sistema cromatográfico que permite mezclar los solventes en una proporción adecuada para generar la fase móvil y regular el flujo del sistema de forma isocrática o mediante gradiente. Por otro lado, también dispone de una válvula que permite redirigir el flujo de disolvente desde la bomba a través de la salida de la válvula sin pasar por la columna o la válvula de inyección, permitiendo realizar la purga del equipo, y asegurando que durante el análisis no interfieran elementos como burbujas de aire o solvente de un análisis previo. Es importante mencionar que los requisitos más importantes de una bomba para HPLC son los intervalos de flujo y presiones que debe manejar para su rendimiento. Particularmente, la bomba previamente descrita posee presiones de rango operativo de 0 a 400 bares [Agilent Technologies, 2008].

### 2.4.2 Inyector (Automuestreador)

Muchas veces el factor limitante en la precisión de mediciones cromatográficas es la reproducibilidad con que se pueden introducir las muestras al sistema. La muestra se inyecta en la fase móvil manualmente a través de una jeringa o automáticamente con el uso de inyectorios automáticos.

Así, el segundo módulo del sistema cromatográfico lo conforma el *automuestreador*, donde se encuentra el carrito de muestras que son tomadas por un brazo mecánico, y el *inyector*, encargado de añadir la muestra en análisis al sistema a través de la fase móvil. Antes de la inyección y durante la estabilización del análisis, la *válvula de inyección* permite que el solvente o fase móvil sea pasado a través de todo el sistema de inyección, el loop y la aguja, evitando acumulación de muestra. Al comenzar

la secuencia de muestreo, la válvula cambia de posición y dirige el flujo directo hacia la columna, mientras la muestra es tomada por el brazo mecánico y colocado en el asiento. La aguja desciende y el dispositivo de medida extrae el volumen de muestra necesario que luego es colocado en el "loop". Posteriormente, el vial es retirado y la válvula de inyección cambia a su posición inicial ingresando la muestra al sistema y haciéndola pasar hacia la columna [Agilent Technologies, 2008].

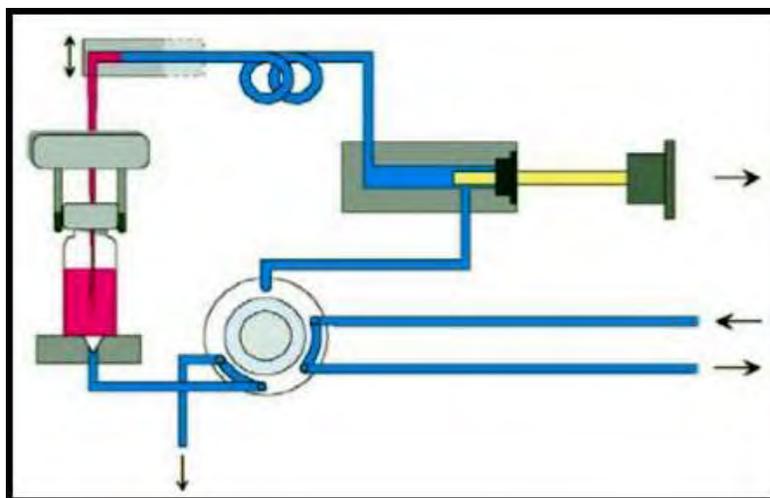


Figura N° 9. Extracción de la muestra en el sistema de inyección.

### 2.4.3 Compartimiento de la columna

Los compartimientos termostatzados de la columna son compartimientos a los cuales se puede aplicar una temperatura controlada, que se utilizan para calentar y refrigerar la columna de separación. De este modo, el disolvente que entra en el compartimiento se calienta o enfría según una temperatura configurable. El compartimiento del cromatógrafo de la serie 1200 tiene especificaciones de rendimiento de hasta 10 °C por debajo de la temperatura ambiente, hasta 80 °C con flujo de 5 mL/min y 100 °C a flujo de 2,5 mL/min [Agilent Technologies, 2008].

### 2.4.4 Columna de separación

Dentro de un sistema cromatográfico, la columna resulta ser el corazón del mismo, ya que es ahí donde tiene lugar la separación de la muestra de análisis.

Las columnas más utilizadas en cromatografía son las de relleno, que consisten de un tubo de acero, relleno de una fase estacionaria de acuerdo al tipo de separación que se pretende llevar a cabo, y está constituida por gel de sílice poroso u otro soporte cuya superficie se ha modificado químicamente y cuya polaridad depende de los grupos funcionales unidos, que varían desde el octadecilsilano (alcano C<sub>18</sub>) relativamente no polar, hasta grupos nitrilos muy polares. Además del relleno de la columna existen otras características que influyen sobre la capacidad de separación de la misma y que se describen a continuación;

- **Diámetro interno:** En HPLC, este es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna, influenciando también la sensibilidad. La elección del diámetro interno de la columna se realiza en función de la cantidad de muestra a separar, pues para separaciones de escala analítica se suelen usar columnas de diámetros pequeños (1 a 6 mm), mientras que los trabajos a escala preparativa superan los 10 mm, cuyo inconveniente es el elevado consumo de disolventes, debido a la necesidad de flujos elevados para conseguir velocidades lineales de eluyente. Las columnas analíticas de más amplio uso suelen tener 4,6 mm de diámetro interno.

- **Longitud:** Evidencias anteriores indican que los procesos cromatográficos se rigen por parámetros en los que se incluye la eficiencia de la columna, que depende entre otros factores de la longitud, encontrando que mientras mayor sea la longitud de la columna, mayor eficiencia se obtendrá de la misma.

- **Conexiones:** En los extremos de la columna se colocan los sistemas de conexión que permiten unir la columna al detector y a su vez al sistema de inyección y bombeo de eluyentes. Estas conexiones deben permitir el paso de secciones anchas de tubo a capilares, además de que deben ser fácilmente montables y desmontables.

Por otro lado, y como cierre del tubo que contiene el relleno se colocan las llamadas fritadas, que son mallas con un tamaño de poro inferior al diámetro de la partícula de relleno, dejando pasar el eluyente y evitando que el relleno se salga de la columna.

- **Relleno:** Todas las separaciones cromatográficas tienen lugar sobre la fase estacionaria, que está constituida generalmente por partículas de materiales rígidos o

semirígidos. En la mayoría de los rellenos de columna para HPLC, se utiliza sílice que cumple ciertas funciones principales, ya que; los grupos activos de la sílice permiten la separación, además de la selección de moléculas en función del tamaño. Este tipo de relleno posee gran resistencia mecánica, que permite mayor resistencia a presiones de trabajo. Posee amplia gama de formas, tamaño y diámetro de poro lo que hace posible tener una extensa capacidad de separación y de posibilidades de ligar químicamente moléculas a su superficie.

- **Tamaño de partícula:** El tamaño de partícula es un factor importante en la calidad y eficiencia de la columna encontrando que; a diámetros pequeños la altura equivalente del plato teórico será menor y por tanto se dará una mayor eficiencia del sistema. Hoy en día los tamaños de partículas de mayor uso están comprendidos entre (3–10)  $\mu\text{m}$  de diámetro, aunque en la gran mayoría de los casos, los análisis se realizan con rellenos de 10  $\mu\text{m}$  o 5  $\mu\text{m}$ .

En el caso de HPLC existe una variedad muy amplia de columnas disponibles en el mercado, las cuales pueden ser de diferentes fases estacionarias y diferentes dimensiones. Para el estudio de ácido ascórbico en el suplemento nutricional se dispone de una columna de la casa comercial Waters, SunFire - Luna C<sub>18</sub> - 5 $\mu\text{m}$  (4,6 x 250) mm cuyas características [Waters, 2010] más importantes se tabulan a continuación

**Tabla N° 5.** Características de la columna cromatográfica utilizada.

| Química                | C <sub>18</sub>  |
|------------------------|--|
| N° de clase USP        | L1 (Octadecilsilano unido químicamente a micropartículas de sílice o cerámica porosas o no porosas.) |
| Forma de partícula     | Esférica   |
| Tamaño de partícula    | 5 $\mu\text{m}$  |
| Tamaño de poro         | 100 Å  |
| Superficie de área     | 340 m <sup>2</sup> /g  |
| Rango de pH            | 2 – 8  |
| Límites de temperatura | Bajo pH = 50 °C<br>Alto pH = 40 °C   |

### 2.4.5 Detector

Teniendo en cuenta que; la separación de los componentes de una muestra de análisis se realiza dentro de la columna, es necesario incluir un sistema que permita detectar los analitos eluidos y con ello realizar la caracterización. Los *detectores* son los dispositivos que permiten la detección de las especies de interés a medida que eluyen, y en general están constituidos por una celda de detección colocada a la salida de la columna, dentro de la cual se mide la característica física que permite manifestar la presencia de la especie de interés [Agilent Technologies, 2006].

Para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales, el detector utilizado es de tipo UV a longitud de onda variable, cuyo diseño permite obtener máximos de rendimientos ópticos, ya que su sistema está conformado por una fuente de radiación continua de una lámpara de descarga de arco de deuterio que emite luz en un rango de longitud de onda de (190–600) nm. El haz procedente de la *lámpara* atraviesa un *lente*, un *filtro*, una *rendija de entrada*, un *espejo esférico* (M1), un *difractor*, un segundo *espejo esférico* (M2), un *divisor del haz* y finalmente la *celda de flujo* para llegar al *diodo* de la muestra [Agilent Technologies, 2006].

La absorción UV tiene lugar en la celda de flujo según la muestra; la intensidad de luz emitida se convierte en señal eléctrica mediante un fotodiodo. Parte de la luz se dirige al fotodiodo de referencia mediante un divisor del haz para obtener una señal de referencia y compensar la fluctuación de intensidad de fuente de luz.

### 2.4.6 Dispositivo de recolección de datos

El *registrador* de datos es un dispositivo que permite recibir y mostrar la señal del detector digitalizada. Estos pueden ser simples registradores o computadoras que almacenan todos los datos digitales para el procesamiento de los mismos.

Particularmente, las computadoras cuentan con programas especiales de procesamiento de datos cromatográficos. En Laboratorios VALMOR, C.A y en especial el equipo Agilent Technologies de la serie 1200 dispone del software ChemStation compatible con IBM con un sistema operativo Microsoft® Windows XP Professional, incluyendo en general; adquisición de datos, control instrumental, análisis de datos

(integración y cuantificación), automatización y personalización para un instrumento analítico [Agilent ChemStation, 2009].

Durante la adquisición de datos, todas las señales adquiridas por el instrumento se convierten de señales analógicas a señales digitales en el detector, la señal digital se transmite directamente al software (electrónicamente) y se guarda en un fichero de datos. Por otro lado, la capacidad de control instrumental de ChemStation es posible mediante diagramas gráficos del sistema, siempre y cuando los instrumentos analíticos lo admitan, permitiendo controlar el estado de los mismos. A partir del software cada componente está representado por un icono mostrando el estado actual con un código de color.

El software también permite un análisis de datos en base a una integración y cuantificación de picos. En general, la integración busca los picos en una señal y calcula su tamaño. Cuando se integra una señal, el software identifica el inicio y final para cada pico y los marca con señalización vertical, encuentra el máximo de cada uno (tiempo de retención), construye la línea base y calcula el área, la altura y anchura de cada uno de ellos. Todo este proceso se controla por medio de parámetros denominados “eventos de integración”. Una vez identificados e integrados los picos, se realiza la cuantificación, bajo el área o altura de la señal de interés para determinar la concentración del analito. ChemStation incluye varios pasos para el análisis cuantitativo bajo condiciones cromatográficas idénticas;

- Conocimiento del analito de interés.
- Establecimiento de un método de análisis de muestras que contengan el analito.
- Análisis de patrones que contengan concentraciones conocidas del analito para obtener la respuesta debida a dicha concentración.
- Análisis de la muestra que contiene concentración desconocida del analito.
- Comparación de la respuesta del patrón con la respuesta de la muestra de análisis.

Los cálculos de cuantificación utilizan factores de corrección tales como; el multiplicador y factor de dilución. Estos factores se utilizan en los procedimientos de

calibración para compensar las variaciones de la respuesta del detector a distintos componentes de muestra, concentraciones, diluciones de muestra, cantidades de muestra y para convertir unidades. Así, el multiplicador se utiliza en cada fórmula de cálculo para multiplicar el resultado de cada componente, y sobre todo para convertir unidades en cantidades expresadas. Mientras que el factor de dilución es un número por el que se multiplican todos los resultados calculados y permite cambiar la escala de los resultados o corregir los cambios de una composición de muestra durante el trabajo previo de análisis.

Otro factor importante a considerar es la calibración realizada por ChemStation. La calibración es el proceso de determinar los factores de respuesta que se utilizan para calcular las concentraciones absolutas de componentes mediante la inyección de patrones de referencia especialmente preparados. Una curva de calibración es una representación gráfica de los datos de cantidad y respuesta de un compuesto obtenidas de una o varias muestras de calibración. Generalmente, se inyecta una porción de alícuota de un patrón, se obtiene una señal y la respuesta se determina calculando el área o la altura del pico. Este tipo de calibración se denomina calibración de un único nivel, en las que se asume una respuesta lineal del detector sobre el rango de trabajo de concentraciones para la muestra de interés. La desventaja de este tipo de calibración es que se asume que la respuesta del detector a la muestra es lineal y pasa a través del origen en un gráfico de concentración frente a la respuesta, cosa que puede conducir a resultados imprecisos ya que no siempre se cumple eso.

## **2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANÁLITICOS**

Los métodos usados en un laboratorio de análisis químico deben ser evaluados y sometidos a diversas pruebas que aseguren la obtención de resultados válidos y coherentes [UNODC, 2010]. De este modo, la validación de un método es el establecimiento de la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos [Ortega y Cortés, 2001].

Su importancia radica en el aseguramiento de que el producto elaborado cumple de forma consistente y repetitiva con las especificaciones y atributos de calidad, cumpliendo así los objetivos de productividad establecidos y disminuyendo el costo de los procesos [Capacha y Llanos, 2007].

### **2.5.1 Parámetros de validación de métodos analíticos**

Los parámetros analíticos considerados en una validación son en general; selectividad, límite de detección y límite de cuantificación, intervalo lineal o rango, precisión y exactitud.

#### **2.5.1.1 Selectividad**

En el estudio de matrices complejas, es necesario asegurar la eliminación de interferentes antes de llevar a cabo un estudio por técnicas como la de cromatografía de líquidos. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC, en 2001 definió la *selectividad* como; la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar [Rodríguez *et al.*, 2012], es decir, es la propiedad de un método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencias de otros componentes en la matriz de la señal.

Al máximo de selectividad se denomina *especificidad*, así; un método es específico cuando la señal medida solo proviene del analito de interés. La selectividad de un método debe ser determinado antes de iniciar el estudio de cualquier otro parámetro de validación, debido a que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por la especie de interés [Quattrocchi *et al.*, 1992].

#### **2.5.1.2 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)**

El *límite de cuantificación* (LOQ) de un método de análisis químico se define como la mínima cantidad de analito presente en una muestra que se puede cuantificar bajo condiciones experimentales de precisión y exactitud. Mientras que, el *límite de detección* (LOD) es la mínima cantidad de analito en la muestra que se puede detectar aunque no

necesariamente cuantificar bajo las condiciones experimentales ya mencionadas. Matemáticamente, el LOD y LOQ se calculan como;

$$\text{LOD} = \frac{3\sigma_b}{m} \quad (8) \quad \text{LOQ} = \frac{10\sigma_b}{m} \quad (9)$$

Siendo  $\sigma_b$  la desviación estándar de la señal del blanco y “m” la pendiente de la curva de calibración. Generalmente, en método de análisis por HPLC la señal del blanco no siempre es cuantificable y no se realiza corrección frente a un blanco, por ende los términos matemáticos previamente descritos no son del todo recomendables para la determinación de los límites de interés. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta la señal media obtenida del análisis correspondiente, es decir, el ruido de fondo o *background* del sistema ( $Y_b$ ), incluyendo también el número de réplicas (n) en que se realizan las distintas medidas [Ortega y Cortés, 2001], en consecuencia, la expresión final para el cálculo de LOD y LOQ es;

$$\text{LOD y LOQ} = \frac{Y_b + (K \times s_b)}{m \times \sqrt{n}} \quad (10)$$

### 2.5.1.3 Intervalo lineal

El *intervalo lineal* de un método analítico señala el intervalo útil de trabajo, que va desde el límite de cuantificación (LC) hasta el límite de respuesta lineal (LL), es decir, hasta el punto en que la curva de calibración se desvía de la linealidad debido a que la concentración de analito no presenta comportamiento lineal respecto a la señal de interés. También se puede definir como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado una correcta precisión, exactitud y linealidad del método [Capacha y Llanos, 2007].

### 2.5.1.4 Precisión

La *precisión* expresa el grado de concordancia o grado de dispersión entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea bajo condiciones ya establecidas. Matemáticamente, se expresa como la desviación estándar,  $\sigma$ , estimada analíticamente como la desviación estándar relativa (%DER) o coeficiente

de variación (CV). De este modo, la precisión puede considerarse a tres niveles; repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad [Quattrocchi *et al.*, 1992].

La *repetibilidad*, estudia la variabilidad del método efectuándose una serie de análisis sobre la misma muestra en las mismas condiciones operativas (analista, equipos, reactivos) en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. La *precisión intermedia*, por su parte, estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero en condiciones operativas diferentes (analista, equipos, días) y en un mismo laboratorio. Finalmente, la *reproducibilidad* estudia la variabilidad del método bajo condiciones operativas diferentes y en distintos laboratorios [Ortega y Cortés, 2001].

#### 2.5.1.5 Exactitud

La *exactitud* de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido de manera experimental y el valor aceptado convencionalmente o declarado como valor de referencia. Matemáticamente, suele expresarse de diferentes modos, pero el más utilizado es, sin duda alguna, la recuperación o porcentaje de recuperación [Quattrocchi *et al.*, 1992], expresado como;

$$\% \text{ recuperación} = \frac{\text{rendimiento experimental}}{\text{rendimiento teórico}} \times 100 \% \quad (11)$$

### CAPÍTULO 3

#### METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología propuesta de análisis fue desarrollada en cuatro etapas: a) evaluación del medio de extracción más adecuado para la determinación de ácido ascórbico en los suplementos nutricionales utilizando un fase móvil de fosfato monobásico de potasio (buffer a pH 3,0) con una columna Waters, SunFire C<sub>18</sub>, 5 µm (250 x 4,6) mm; b) estudio de los parámetros cromatográficos óptimos para la cuantificación de la vitamina C; c) evaluación en base a un sabor (vainilla) mediante pruebas de selectividad, linealidad, precisión y exactitud; y d) aplicación de la metodología desarrollada a diferentes lotes producidos por la empresa para evaluar el cumplimiento con las especificaciones.

En la figura N° 11 se muestra un diagrama de la metodología experimental seguida en el Trabajo de Investigación.



Figura N° 10. Diagrama de la metodología experimental aplicada.

### 3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

#### 3.1.1 Materiales

- Acrodiscos (Millipore Millex – HV. Hydrophilic PVDF 0,45 µm).
- Agitadores magnéticos.
- Balones volumétricos ámbar: (25, 100 y 250) mL.
- Botellones para solventes de HPLC.
- Embudos.
- Espátulas (metálicas y plásticas).

- Goteros.
- Gradilla.
- Inyectadoras de plástico.
- Recipientes volumétricos de plástico: (1 y 2) L.
- Micropipeta.
- Papel de filtro (MF<sup>Tm</sup> – MEMBRANE FILTERS 0,45 µm HA).
- Pesa sustancia.
- Pipetas volumétricas: (10, 5 y 2) mL.
- Tubos de centrifuga.
- Viales ámbar (2 mL).

### 3.1.2 Reactivos

Las especificaciones de todos los reactivos utilizados en la metodología analítica desarrollada, incluyendo el patrón de trabajo se presentan a continuación:

**Tabla N° 6.** Especificaciones de los reactivos empleados en el método de análisis desarrollado.

| Reactivo                             | Fórmula molecular   | Peso molecular (g/mol) | Pureza  | Proveedor                  | F.E.     | F.V.     |
|--------------------------------------|---|------------------------|---------|----------------------------|----------|----------|
| <b>Ácido acético glacial</b>         | CH <sub>3</sub> COOH  | 60,05                  | 99,0 %  | Merck                      | 18/02/15 | 28/02/20 |
| <b>Ácido ascórbico</b>               | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>                  | 176,124                | 99,98 % | Estándar de referencia USP | ---      | 29/10/18 |
| <b>Ácido o-fosfórico</b>             | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                                | 97,99                  | 85,0 %  | Riedel-de Haën             | 03/08/07 | 17/09/18 |
| <b>EDTA (0,1 M)</b>                  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> | 292,24                 | ---     | ---                        | 21/02/17 | 21/08/17 |
| <b>Fosfato monobásico de potasio</b> | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                               | 136,08                 | 99,9 %  | Merck                      | 20/02/14 | 28/02/19 |

### 3.1.3 Equipos

- Agitador Magnético: LABLINE 1278.
- Balanza Analítica: OHAUS PIONNER PA – 214.
- Baño Ultrasónico: BME Solution 4828.
- Bomba de vacío: FELISA FE – 1500.
- Campana de extracción: LABCONCO 72.
- Centrífuga: HERMLE LABNET Z 206 A.
- Columna cromatográfica: Waters, SunFire - Luna C<sub>18</sub>, 5 µm (250 x 4,6) mm.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Presión, Agilent Technologies con módulo de Inyector Automático de Líquidos (ALS), serial DEAAC17070, modelo serie 1260.
- pH-metro: ORION SA – 520.

### 3.2 SELECCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN SUPLEMENTOS NUTRICIONALES

Teniendo en cuenta que los procedimientos de extracción de la vitamina C se rigen por la necesidad de prevenir la degradación y pérdida de actividad vitamínica [De Leenheer *et al.*, 1992], es necesario utilizar ácidos, capaces de proteger el AA de la oxidación y la hidrólisis, precipitando a la vez las proteínas asociadas que contenga el alimento [Ball, 2005].

De este modo, la extracción del ácido ascórbico en la muestra de análisis, se realizó utilizando diferentes metodologías conformadas por ácidos disponibles en Laboratorios VALMOR, C.A tales como; oxálico, tricloroacético, perclórico, trifluoroacético, acético, *o*-fosfórico, además de mezclas de sales de fosfatos , y mediante un análisis de ensayo y error, hasta la obtención de un pico definido, simétrico y con estabilidad de la línea base para la integración y cuantificación del analito de interés, todo ello utilizando una fase móvil constituida por un buffer de fosfato monobásico de potasio a pH controlado (pH = 3,0), y una columna cromatográfica C<sub>18</sub>, 5 µm - (250 x 4,6) mm.

### 3.3 SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

Los estudios de selectividad se basan en la obtención de información de impurezas, productos de degradación y excipientes potencialmente presentes en la muestra, siendo necesario inyectar cada uno de ellos al sistema cromatográfico bajo las condiciones previamente establecidas. Como la muestra de interés consta de aproximadamente 35 ingredientes, es difícil realizar un estudio de selectividad debido a la escasa disposición de patrones y materia prima utilizadas en la fabricación del producto de análisis.

Sin embargo, los cromatógrafos líquidos disponibles en Laboratorios VALMOR, C.A cuentan con detectores de arreglo de diodos que representan una ventaja para este tipo de análisis, ya que poseen, un sistema *multiplex*, que puede medir la señal del analito no solo a una longitud de onda discreta, sino en el espectro de absorbancia completo en tiempo real, de modo que a las dimensiones habituales de tiempo y absorbancia, se adiciona una tercera, la longitud de onda, permitiendo apreciar detalles que escapan a detectores convencionales [Quattrocchi *et al.*, 1992]. En este sistema 3D (3D Plot) es posible apreciar la representación en el eje “x” del tiempo, el eje “y” la longitud de onda y el eje “z” la absorbancia.

Desde el punto de vista experimental, la selectividad del método desarrollado se estudió inyectando al sistema un patrón, una muestra y la solución de extracción utilizada, y realizando un análisis tridimensional de cada uno de los cromatogramas.

### 3.4 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Para la selección de las condiciones cromatográficas, se tomaron en cuenta las condiciones previamente establecidas por la Empresa en cuanto al tiempo de retención del analito, modificando el parámetro de velocidad de flujo. También se incrementó el volumen de inyección de la muestra de análisis, a modo de generar un área más representativa para la cuantificación.

### 3.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En Laboratorios VALMOR, C.A., la validación de métodos analíticos se realiza en base a tres lotes vigentes y consecutivos del producto de análisis. Como la muestra de análisis deriva de una presentación de cuatros sabores; chocolate, fresa, galleta y crema, además de vainilla, la validación debería efectuarse para cada uno de ellos. Sin embargo, por cuestiones de producción la validación del método se realizó en base a un solo sabor, en este caso vainilla, cuyos lotes de análisis fueron: G87508A00, G87509A00 y G87510A00.

#### 3.5.1 Curva de calibración sencilla

Para la construcción de la curva de calibración sencilla, se preparó un patrón para cada lote de análisis pesando aproximadamente 10,0 mg de ácido ascórbico (patrón USP) al 99,98 % y llevando a un volumen de 25 mL. Posteriormente, se tomaron alícuotas de (0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 2,5 – 3,0 – 3,5) mL y cada una de ellas se diluyó hasta un volumen final de 100 mL. Finalmente, cada solución se inyectó en el sistema cromatográfico bajo las condiciones previamente establecidas, a modo de medir el área generada por cada solución patrón.

**Tabla N° 7.** Concentración final para cada punto de la construcción de la curva de calibración sencilla.

| Concentración de ácido ascórbico (patrón USP) (mg/mL) | Volumen de alícuota (mL) | Volumen de dilución (mL) | Concentración final ( $\times 10^{-3}$ mg/mL) |
|---|--------------------------|--------------------------|---|
| 0,4   | 0,5                      | 100                      | 2,0   |
|   | 1,0                      |                          | 4,0   |
|   | 1,5                      |                          | 6,0   |
|   | 2,0                      |                          | 8,0   |
|   | 2,5                      |                          | 10,0  |
|   | 3,0                      |                          | 12,0  |
|   | 3,5                      |                          | 14,0  |

### 3.5.2 Curva de adición de estándar

La construcción de la curva de adición de estándar se realizó pesando 5g de muestra para cada lote y diluyendo a un volumen de 250 mL con solución de extracción (ácido *o*-fosfórico, ácido acético, EDTA 0,1M). Cada una de ellas se centrifugó y se tomaron 5 mL que se llevaron a un volumen de 100 mL. Posteriormente, se preparó un patrón de ácido ascórbico pesando 10 mg y disolviendo en un volumen de 25 mL; de esta solución se tomaron alícuotas de (0,4 - 0,9 - 1,4 - 1,9 - 2,4 - 2,9 - 3,4) mL, y se adicionaron al balón de 100 mL donde se disponía de la pequeña alícuota de muestra, para así aforar e inyectar al sistema cromatográfico.

**Tabla N° 8.** Concentración final para cada punto de la construcción de la curva de calibración de adición de estándar.

| Concentración de ácido ascórbico (patrón USP) (mg/mL) | Volumen de alícuota (mL) | Concentración de patrón diluida ( $\times 10^{-3}$ mg/mL) | Concentración de muestra ( $\times 10^{-4}$ mg/mL) | Volumen de muestra final (mL) | Concentración final ( $\times 10^{-3}$ mg/mL) |
|---|--------------------------|---|--|-------------------------------|---|
|   | 0,4                      | 1,6   |  |                               | 2,0   |
|   | 0,9                      | 3,6   |  |                               | 4,0   |
|   | 1,4                      | 5,6   |  |                               | 6,0   |
| 0,4   | 1,9                      | 7,6   | 4,0  | 100                           | 8,0   |
|   | 2,4                      | 9,6   |  |                               | 10,0  |
|   | 2,9                      | 11,6  |  |                               | 12,0  |
|   | 3,4                      | 13,6  |  |                               | 14,0  |

### 3.5.3 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

La determinación del LOD y el LOQ se realizó bajo el método basado en la extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero, que experimentalmente consiste en analizar muestras con concentraciones conocidas próximas al límite de cuantificación. En este caso; se analizaron cinco muestras a concentraciones de (0,40 - 0,80 - 1,60 - 2,4 y 3,2)  $\times 10^{-3}$  mg/mL para cada lote, y así graficar la respuesta del instrumento frente a la concentración, cuya intersección con el eje “y” corresponde teóricamente al valor de la respuesta a concentración cero del analito, obteniendo como señal de ruido ( $Y_b$ ) el término independiente. Por otro lado, la desviación estándar de la

señal proporcionada por el ruido se determina mediante la construcción de una recta tomando como eje de las ordenadas las desviaciones estándar de la señal analítica (área), y como eje de las abscisas las concentraciones en estudio, encontrando como corte la desviación estándar del blanco ( $s_b$ ). Una vez calculado el valor medio de la señal del ruido por extrapolación y la desviación estándar de dicha señal, se calculan los límites teóricos de detección y cuantificación en base a la ecuación 10.

#### **3.5.4 Intervalo lineal**

El intervalo lineal del método se estudió teniendo en cuenta que intervalo útil de trabajo va desde el LOQ hasta el LL dado por la curva de adición de estándar.

#### **3.5.5 Precisión**

La precisión del método desarrollado para la determinación de ácido ascórbico, se estudió en base al nivel de repetibilidad y precisión intermedia, bajo el análisis de los tres lotes de estudio, considerando un único analista y equipo (cromatógrafo líquido de alta resolución - Agilent Technologies serie 1200). Los análisis fueron realizados durante tres días; los dos primeros consecutivos y el último al cuarto día.

Es importante mencionar que el análisis de cada lote se realiza preparando tres muestras y un patrón. El patrón es inyectado cinco veces el sistema cromatográfico, mientras que cada muestra se inyecta por triplicado.

#### **3.5.6 Exactitud o porcentaje de recuperación**

Experimentalmente, el porcentaje de recuperación se determinó utilizando el método de adición de patrón. De este modo, cada muestra de análisis se dopó con concentraciones conocidas de patrón de ácido ascórbico (USP, 99,98 %), en este caso (0,5 – 1,0 - 1,5) mg, para posteriormente aplicar la metodología de extracción desarrollada y determinar la concentración neta del analito de interés, y con ello el porcentaje de recuperación mediante una interpolación a partir de las concentraciones de estudio con cada una de las rectas de calibrado.

### 3.6 EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO CON LAS ESPECIFICACIONES

Los análisis para evaluar el cumplimiento con las especificaciones se realizaron de manera directa con patrones de concentración conocida, determinando el contenido de vitamina C por porción bajo la siguiente fórmula;

$$\text{Vitamina C (mg/Porción)} = \frac{\text{AM} \times \text{PE}_{(\text{mg})} \times \text{PU} \times \text{FD}_{(\text{mL})} \times \text{TP}_{(\text{g/Porción})}}{\text{AE} \times \text{PM}_{(\text{g})}} \quad (12)$$

AM = Área de muestra

PE = Peso del estándar (mg)

PU = Pureza del estándar de referencia (0,9998)

AE = Área del estándar

PM = Peso de la muestra

FD = Factor de dilución (0,05)

TP = Tamaño de la porción (25 g)

#### 3.6.1 Análisis adicionales de control de calidad

Los análisis adicionales para dar certificación del producto fabricado son la determinación de la densidad aparente y el porcentaje de humedad por pérdida por secado.

La densidad aparente se calcula mediante la determinación del peso del suplemento seco en un volumen de 250 mL sin compactarse. Mientras que el porcentaje de humedad se determina pesando una pequeña cantidad de muestra, que luego se introduce a la estufa para posteriormente pesar, y determinar la diferencia en masas.

## **CAPÍTULO 4**

### **ANÁLISIS DE RESULTADOS**

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos en las diversas experiencias realizadas, así como la discusión de cada uno de ellos.

#### **4.1 SELECCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN SUPLEMENTOS NUTRICIONALES**

En el presente trabajo de investigación se desarrolló un método utilizando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de ácido ascórbico (AA) en suplementos nutricionales, de los cuales no existe una metodología normalizada reportada en la bibliografía.

Evidencias anteriores explican qué; las metodologías de extracción más adecuadas para la determinación de AA por HPLC implican la utilización de ácidos, capaces de proteger el analito de interés de la oxidación y la hidrólisis, mientras que precipitan las proteínas asociadas al alimento [Ball, 2005].

Así, la selección del método de análisis se realizó mediante la modificación del medio de extracción utilizando diferentes metodologías conformadas por ácidos disponibles en el Laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios VALMOR, C.A, tales como; oxálico, tricloroacético, perclórico, trifluoroacético, acético, *o*-fosfórico, además de mezclas de sales de fosfatos, utilizando como fase móvil un buffer de fosfato monobásico de potasio a pH 3,0 con una columna Waters- SunFire, Luna C<sub>18</sub>, 5 µm (250 x 4,6) mm, cuyo rango de pH es de (2–8), por ende cada procedimiento de extracción se realizó a pH controlado (pH = 3,0) a modo de no afectar la misma, ya qué; a pH < 2, la sílice de la columna se disuelve, mientras a pH > 8 la misma se puede hidrolizar.

Los resultados más importantes se tabulan a continuación;

**Tabla N° 9.** Metodologías de extracción utilizadas para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales.

| Solución de extracción   | pH de la solución de extracción | Resultado  |
|--|---------------------------------|--|
| Ácido oxálico.   | 3,00                            | Pico definido, pero poca estabilidad de la línea base.   |
| Ácido oxálico + metanol (98 : 2).  | 3,00                            | Pico de interés poco simétrico y ancho.  |
| Fosfato dibásico de sodio + fosfato monobásico de potasio.                                     | 2,50                            | No hubo extracción del ácido ascórbico.  |
| Ácido acético.   | 3,00                            | Poca resolución del cromatograma.  |
| Fosfato dibásico de sodio + fosfato monobásico de potasio + ácido tricloroacético              | 2,50                            | No hay resolución en el cromatograma.  |
| Fosfato dibásico de sodio + fosfato monobásico de potasio + ácido perclórico en ácido acético. | 2,50                            | Pico adyacente al pico de interés, hay buena integración del analito. Sin embargo, el método no fue repetible. |
| Ácido oxálico + ácido trifluoroacético.  | 3,00                            | Buena integración y pico definido pero ancho y con factor de cola.   |
| Ácido oxálico + acetonitrilo   | 3,30                            | Pico de ácido ascórbico con cola en ambos lados.   |
| Ácido <i>o</i> -fosfórico + ácido acético glacial + EDTA (0,1M)                                | 2,50                            | Excelente resolución del cromatograma, pico de interés definido sin picos que interfieran.                     |

**Nota:** Cromatogramas mostrados en el apéndice.

Cada una de los métodos previamente descritos, fueron tomadas de la literatura. Así, por ejemplo; la prueba realizada con ácido oxálico [De Leenheer *et al.*, 1992], muestra un pico definido pero poca estabilidad de la línea base, además de un pico adyacente próximo a los 4 minutos, generado por la solución de extracción. Asimismo, como muchas extracciones de AA se realizan con ácidos en combinación con alcoholes de cadena corta como metanol [Nollet, 2000], se optó por realizar la extracción con ácido oxálico más metanol en proporción (98:2), observando un ensanchamiento de la banda,

que ocurre, en parte, gracias a los múltiples caminos que las moléculas pueden tomar a través de la columna rellena.

Otra metodología de extracción, dada por la Farmacopea de los Estados Unidos, explica que la determinación de AA por HPLC, implican un medio extractante de fosfato dibásico de sodio más fosfato monobásico de potasio acidificado con ácido *o*-fosfórico a pH 2,5 [USP 37, 2014]. Sin embargo, con este método no hubo extracción del analito de interés. Lo mismo ocurrió utilizando como extractante ácido acético, teniendo en cuenta que este ácido permite eluir material proteico [Majors, 2003].

Como el producto está hecho a base de proteínas fue necesario aplicar una metodología que permitiera precipitar las mismas. De este modo, se aplicó la metodología dada por la Farmacopea sustituyendo el ácido *o*-fosfórico por ácido tricloroacético en el que tampoco hubo extracción del AA. De igual forma, se suplantó este último (TCA) por ácido perclórico en ácido acético para acidificar el medio, observando en el cromatograma un pico adyacente al pico de interés, producto de la solución de extracción, particularmente del ácido perclórico/ácido acético. Aunque se intentó resolver el pico adyacente variando fase móvil y velocidad de flujo, el método no fue repetible, al generar consistentemente el mismo resultado.

En el caso de la metodología en la que se utilizó ácido trifluoroacético más ácido oxálico, se encontró un pico de AA ancho y con factor de cola (“*tailing peak*”), como consecuencia de varios factores, tales como presencia de sitios activos en la fase estacionaria o taponamiento parcial de los cabezales de la columna, resultando así la banda poco simétrica y ancha. Mientras que, en la extracción con ácido oxálico más acetonitrilo, también se observó un *tailing peak*. Es importante mencionar que este método ocasionó obstrucción de la columna cromatográfica, encontrando un sólido blando en los extremos de la misma, específicamente en las fritadas.

Finalmente, se utilizó una metodología que incluía la utilización de ácido acético a modo de eluir las proteínas asociadas al suplemento nutricional y EDTA, ya que el producto de análisis contiene hierro (9 mg por cada 25 g de batido), que puede oxidar

con facilidad el AA presente. En este caso se utilizó como extractante principal el ácido *o*-fosfórico encontrando excelentes resultados en el cromatograma.

Al comparar los resultados cromatográficos del método estipulado por la empresa, respecto al desarrollado en el presente trabajo de investigación, es posible observar un aumento en la estabilidad de la línea base, producto del control de los pH de todos los componentes introducidos al sistema cromatográfico (solución de extracción y fase móvil), afectando en menor magnitud la columna de separación y mejorando además el análisis cuantitativo de la especie de interés para efectos de control de calidad. Es importante mencionar que, aunque no se reflejan resultados del método estipulado por la empresa, los pH de la fase móvil y solución de extracción eran menores a 2,0 lo que afecta considerablemente la columna cromatográfica, cuyo rango de pH es de (2 – 8).

#### 4.1.1 Esquema de extracción para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales

Una vez desarrollado el método de análisis se procedió a realizar un esquema adaptable a los analistas, y de este modo de normalizar el método en la empresa.

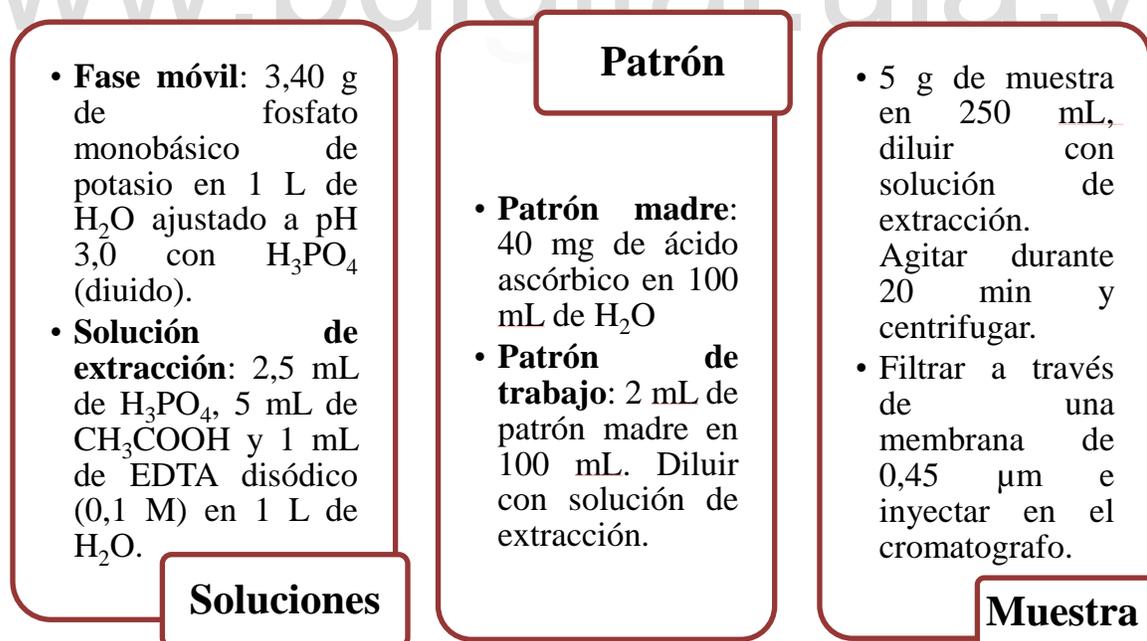


Figura N° 11. Diagrama de la metodología de extracción optimizada.

## **4.2 SELECTIVIDAD DEL MÉTODO**

Un gráfico típico del detector de ordenamiento de fotodiodos es el topograma o espectro 3D, en el cual se representa de forma tridimensional los parámetros de tiempo, longitud de onda y absorbancia. Esta representación proporciona una imagen visual muy elegante, aunque su análisis resulta complejo. Estos espectros pueden ser ampliados o reducidos a voluntad, además de que puede ser rotado en cualquiera de sus ejes para facilitar la visualización de bandas ocultas por otras bandas mayores en la señal de interés, permitiendo de este modo un estudio de la selectividad del método para ácido ascórbico.

Al comparar el espectro 3D del patrón de ácido ascórbico con una pureza de 99,98 % (figura N° 13) con el espectro de la muestra de interés (figura N° 14), es posible observar la presencia de ciertas señales en la muestra, con tiempos de retención próximos a (2,8; 3,4; 4,0; 5,2 y 7,0) minutos que no se observan en el espectro del patrón, exceptuando la señal dada a los 7 minutos que se genera por la solución de extracción (figura N° 15), la cual se atribuye al ácido acético capaz de absorber en la región ultravioleta.

A pesar de encontrar diferentes bandas en el espectro 3D de la muestra, estos no generan interferencia con la señal de interés del ácido ascórbico, cuyo pico tiene una alta pureza ya que no hay señal que solape el mismo en la longitud de onda de estudio. Teniendo en cuenta que el eje “y” representa la longitud de onda, se aprecia la máxima absorción en 245 nm (figura N° 16).

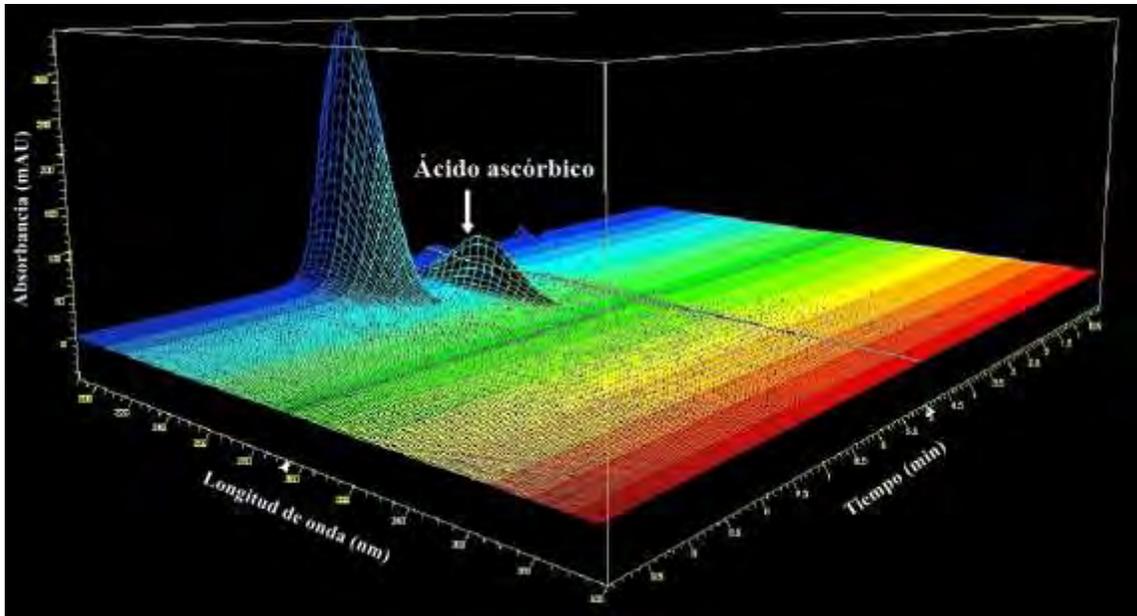


Figura N° 12. Espectro 3D del patrón de ácido ascórbico con pureza de 99,98 %.

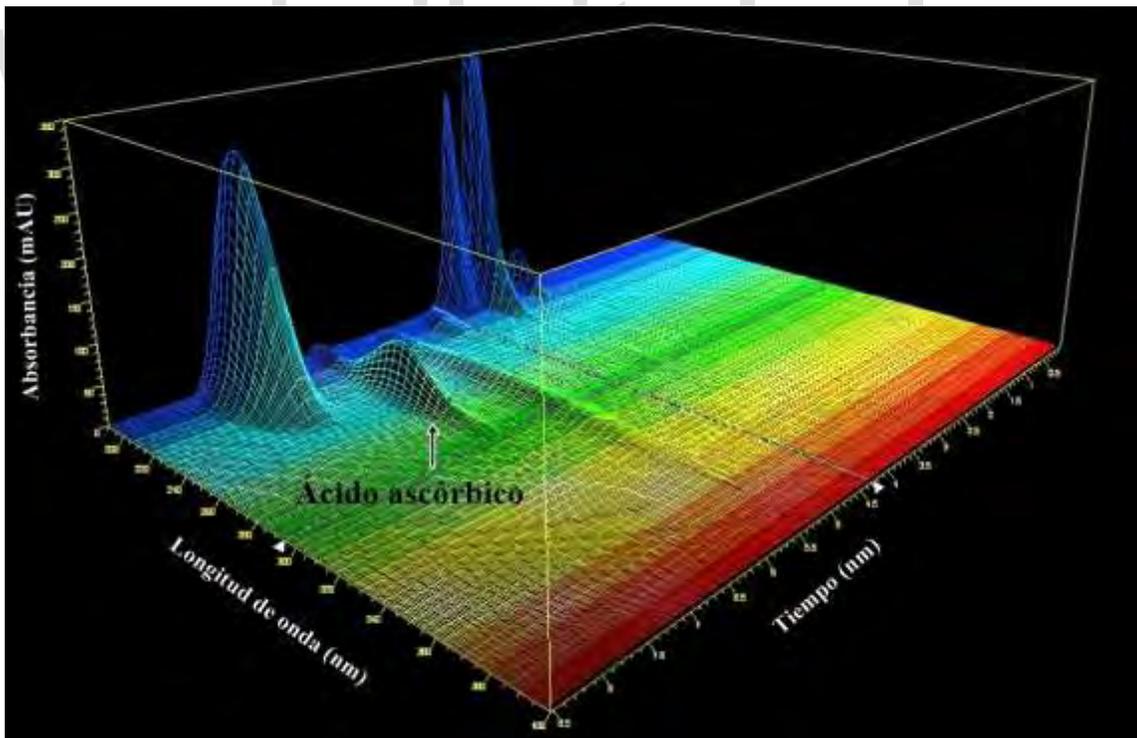


Figura N° 13. Espectro 3D de la muestra de análisis.

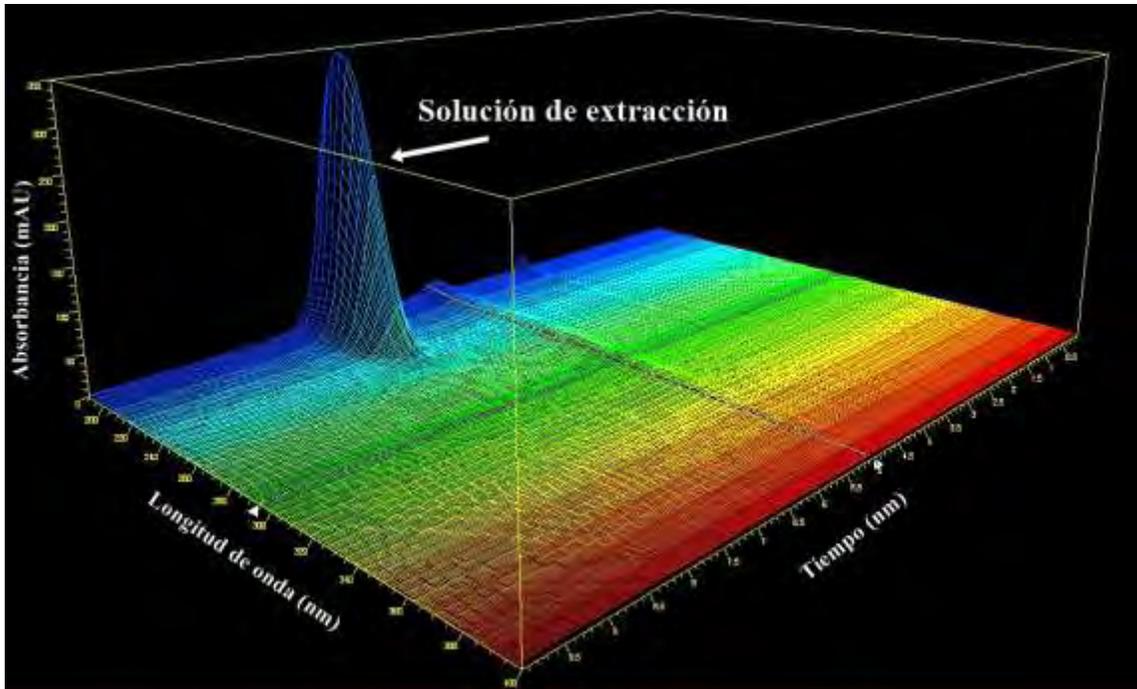


Figura N° 14. Espectro 3D de la solución de extracción.

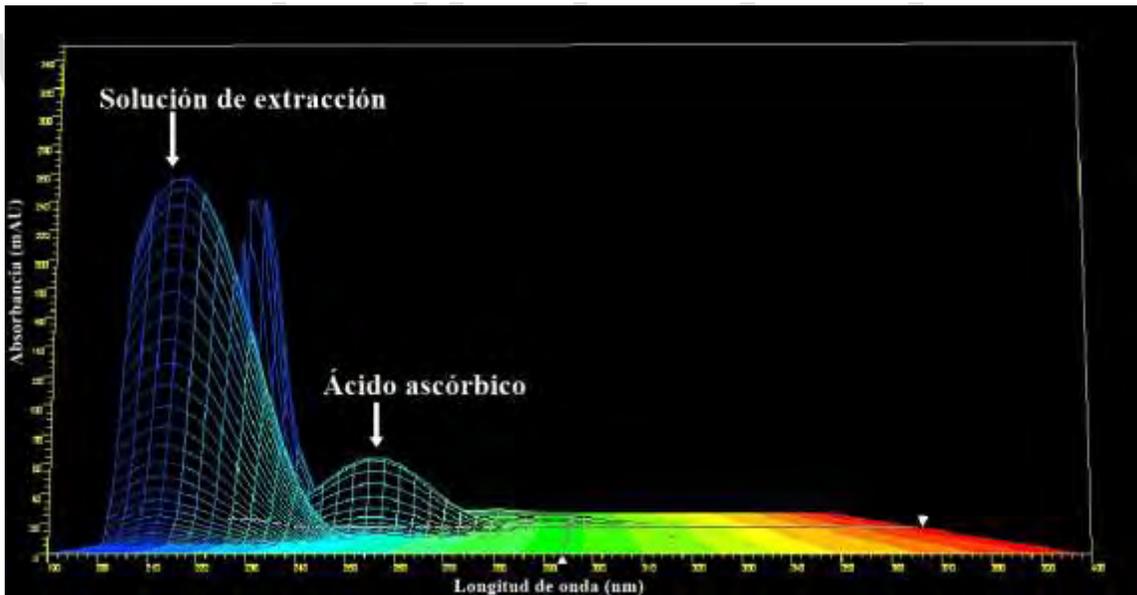


Figura N° 15. Espectro 3D de la muestra. Representación de absorbancia *versus* longitud de onda.

Evidencias anteriores se comprueban mediante un análisis de los isogramas dados por el IsoPlot, mostrados en la figura N° 17 y figura N° 18, teniendo en cuenta que las regiones en rojo son las de mayor intensidad, demostrando así que, a la longitud de onda

de estudio no hay señales que interfieran con la de interés. Concluyendo que el método es selectivo para ácido ascórbico, ya que genera una respuesta proporcionada únicamente por el analito en cuestión a 245 nm.

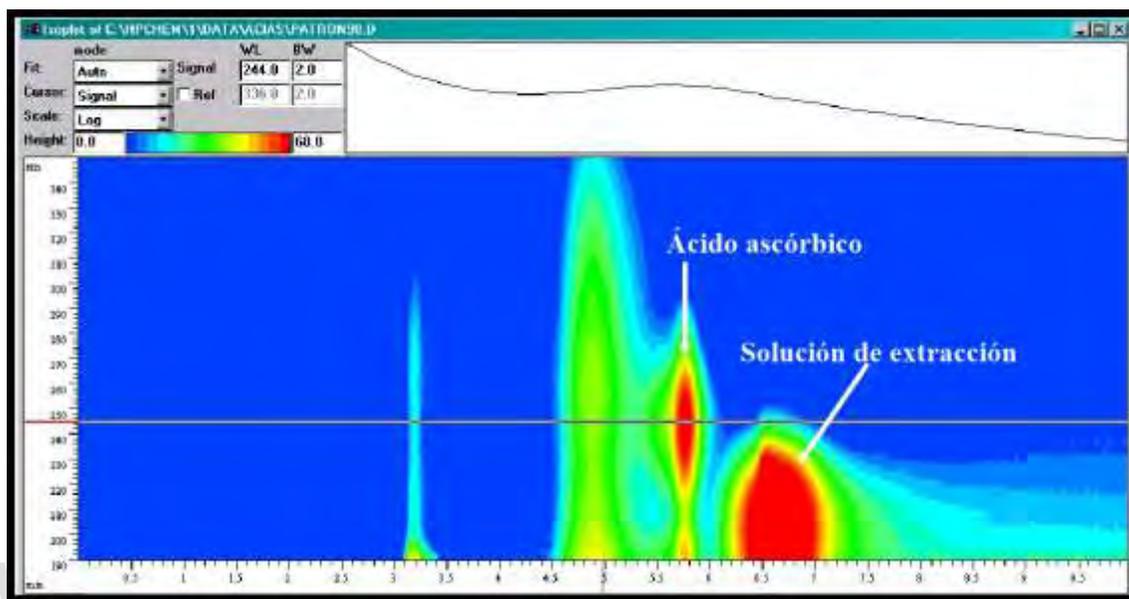


Figura N° 16. Isograma del patrón de ácido ascórbico.

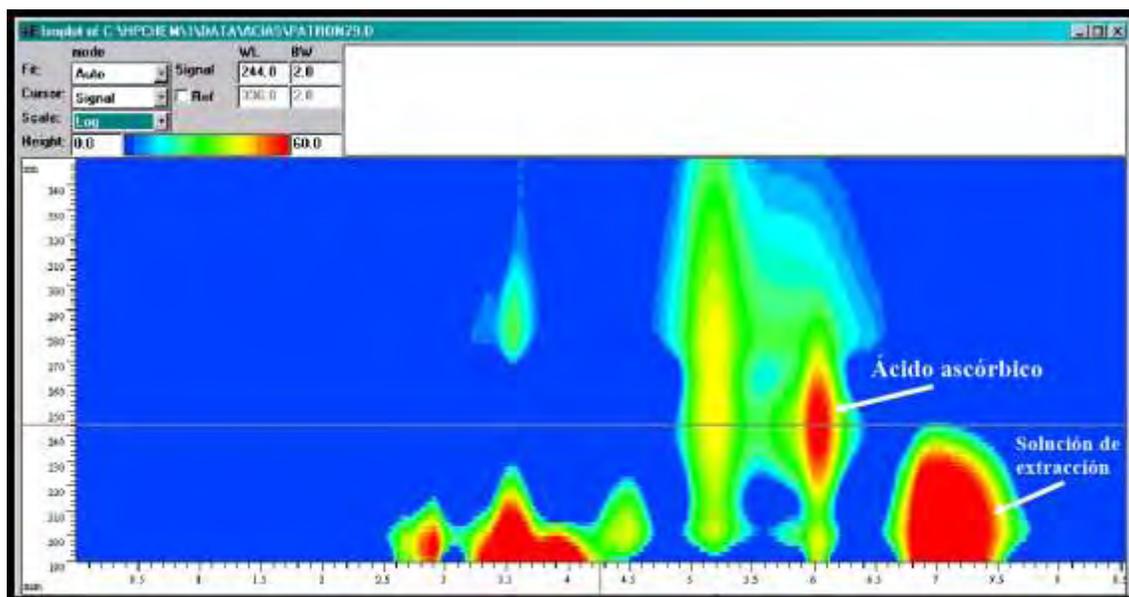


Figura N° 17. Isograma de la muestra de análisis. Suplemento nutricional de vainilla.

### 4.3 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Los resultados más óptimos para la cuantificación de ácido ascórbico se muestran en la tabla N° 10. Respecto al método de análisis proporcionado por la empresa, es posible observar una modificación del volumen de inyección, fase móvil, velocidad de flujo, temperatura y tiempo de análisis.

El volumen de inyección aumentó de 10  $\mu\text{L}$  a 50  $\mu\text{L}$ , a modo de generar áreas que permitieran una mejor cuantificación del analito, con mayor sensibilidad. Por otro lado, la fase móvil fue modificada de ácido *o*-fosfórico (0,02 %) a un buffer de fosfato a pH 3,0, ya que la experiencia indicaba que dicha fase móvil era una de las que generaba mayor estabilidad de la línea base en diferentes métodos ya desarrollados, además de que los buffers tienen mayor estabilidad en el tiempo, pudiendo realizar análisis por uno o dos días, sin volatilización del mismo. La velocidad de flujo se modificó a modo de obtener la señal de interés en un intervalo de tiempo entre (6–7) minutos, tal y como indicaba el método anterior. Por otro lado, la temperatura se modificó a conveniencia, teniendo en cuenta que el producto aumenta su solubilidad con la variación de la misma, por ende se optó por utilizar una temperatura por encima de la temperatura ambiente que no degradará el ácido ascórbico, ya que el mismo es termolábil. Finalmente, el tiempo de análisis que era de 12 minutos, se redujo a 8 minutos a modo de hacer un análisis más corto y factible para la empresa.

**Tabla N° 10.** Parámetros cromatográficos óptimos para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales.

| Parámetro cromatográfico                       |   |
|--|---|
| <b>Volumen de inyección</b>                    | 50 $\mu\text{L}$                        |
| <b>Fase móvil</b>                              | Régimen isocrático. 100 % buffer (25mM) |
| <b>Velocidad de flujo</b>                      | 0,8 mL/min                              |
| <b>Presión</b>                                 | 130 bar                                 |
| <b>Temperatura</b>                             | 30 °C                                   |
| <b>Longitud de onda</b>                        | 245 nm                                  |
| <b>Tiempo de análisis</b>                      | 8 minutos                               |
| <b>Tiempo de retención del ácido ascórbico</b> | (6 – 7) minutos                         |

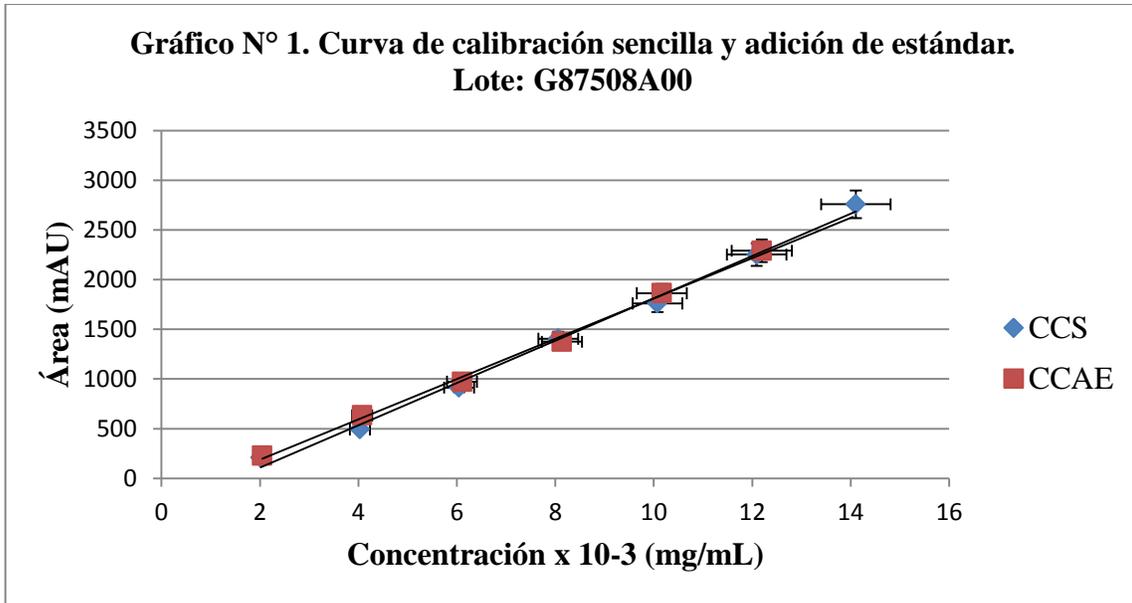
#### 4.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una vez establecidos todos los parámetros del método analítico se realizaron diferentes pruebas exigidas para su evaluación, es decir; su validación en base a los lotes G87508A00, G87509A00 y G87510A00, cuyo sabor es vainilla.

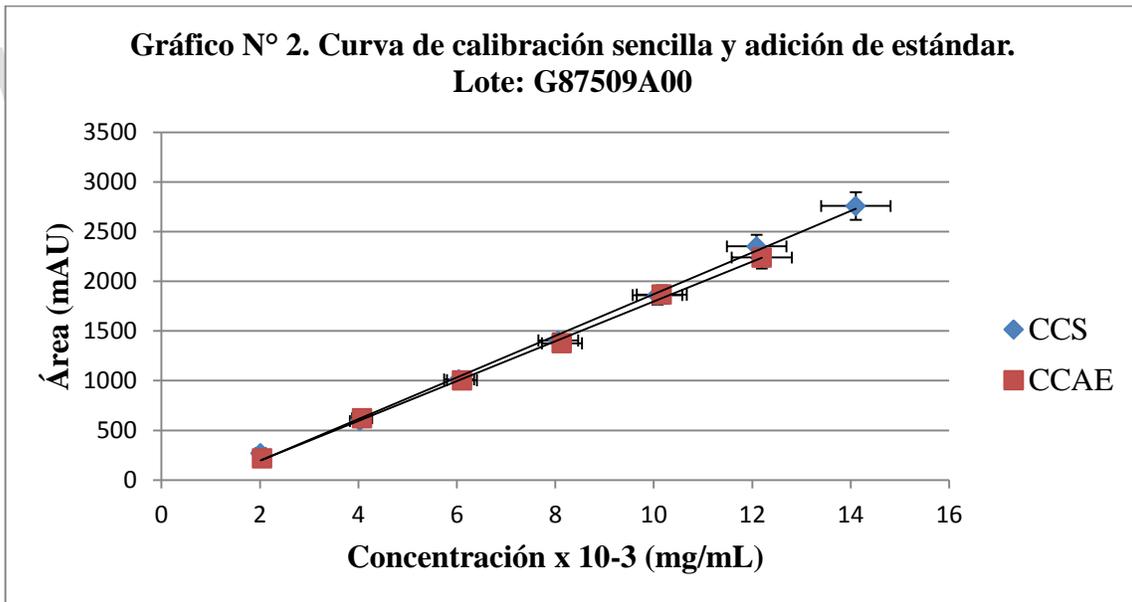
##### 4.4.1 Curva de calibración sencilla y curva de calibración de adición de estándar

Desde el punto de vista analítico, una curva de calibración permite la verificación de la respuesta instrumental dentro de un cierto nivel de sensibilidad. El uso de curvas de calibrado a partir de una serie de patrones preparados bajo las mismas condiciones es posiblemente, el método más utilizado para determinar la cantidad o concentración de una especie de interés en una muestra desconocida [Hernández y Gonzáles, 2002]. El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se basa en la comparación del área del analito en la muestra de interés, con el área generada por el patrón a concentración conocida.

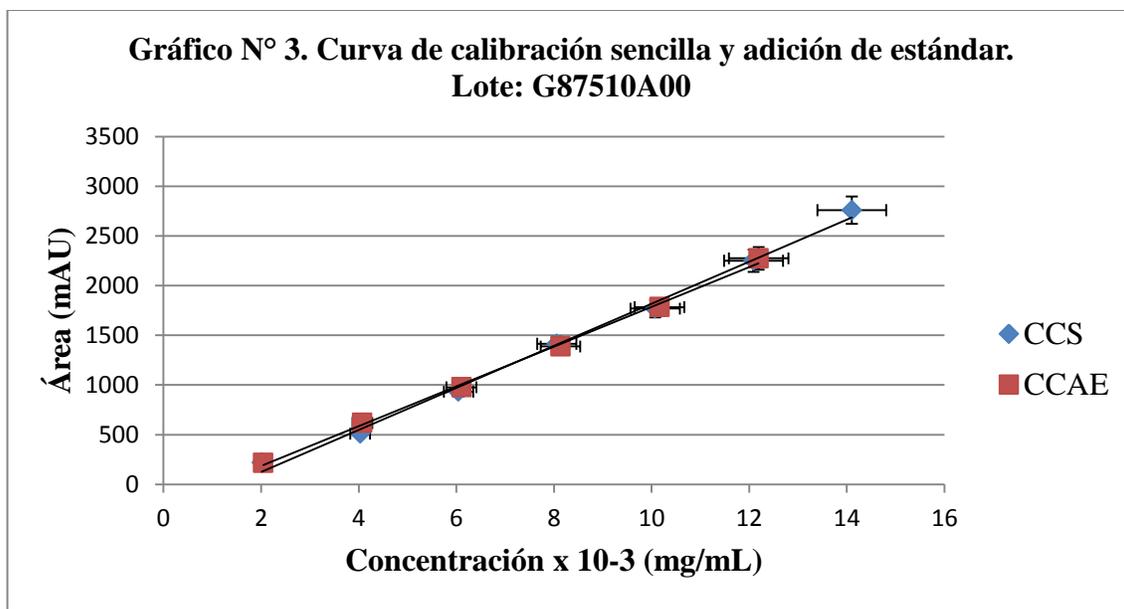
Particularmente, la construcción de la curva de calibración sencilla se realizó mediante la preparación de soluciones patrones a diferentes concentraciones, tal y como se explicó en el capítulo anterior. Por otro lado, teniendo en cuenta que la muestra en cuestión resulta de una matriz compleja es difícil preparar estándares que reproduzcan la composición de la misma. Por ello, es imposible compensar un blanco distinto de cero así que para minimizar los efectos de matriz se utilizó el método de adición de estándar. Este método se basa en la adición de un volumen fijo de muestra a soluciones estándar de distinta concentración hasta un volumen final constante, para determinar la señal analítica en cuestión, así como también para la muestra preparada de la misma forma en ausencia de estándar añadido. La señal de cada solución es afectada de manera similar por los efectos de la matriz [Sánchez, 2006]. Esta curva también se construyó a las mismas concentraciones de la curva de calibración sencilla (tabla N° 8). Las gráficas de ambas curvas se muestran a continuación para cada lote.



**Gráfico N° 1.** Representación de las curvas de calibrado (curva de calibración sencilla (CCS) y curva de calibración por adición de estándar (CCAE)). Lote: G87508A00.



**Gráfico N° 2.** Representación de las curvas de calibrado (curva de calibración sencilla (CCS) y curva de calibración por adición de estándar (CCAE)). Lote: G87509A00.



**Gráfico N° 3.** Representación de las curvas de calibrado (curva de calibración sencilla (CCS) y curva de calibración por adición de estándar (CCAE)). Lote: G87509A00.

En los gráficos N° 1, N° 2 y N° 3 se observan las curvas de calibración sencilla y curvas de adición de estándar para los tres lotes de análisis para la determinación de ácido ascórbico en los suplementos nutricionales, en las cuales se observa un comportamiento lineal. Sin embargo, las curvas de calibración por adición de estándar muestran comportamiento lineal hasta una concentración de  $12,0 \times 10^{-3}$  mg/mL, por ende esta última curva se construyó con 6 puntos, descartando el último de ellos debido a la pérdida de linealidad del sistema.

**Tabla N° 11.** Resultados obtenidos de la curva de calibración sencilla y curva de adición de estándar para la determinación de ácido ascórbico en los diferentes lotes de análisis.

| Lote                      | Curva de calibración sencilla |                | Curva de adición de estándar |                |
|---------------------------|-------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|
|                           | Ecuación                      | R <sup>2</sup> | Ecuación                     | R <sup>2</sup> |
| G87508A00                 | $y = 212872x$                 | 0,9952         | $y = 202707x$                | 0,9970         |
| G87509A00                 | $y = 209675x$                 | 0,9973         | $y = 200050x$                | 0,9986         |
| G87510A00                 | $y = 211500x$                 | 0,9957         | $y = 199942x$                | 0,9980         |
| Promedio                  | $y = 211349x$                 | 0,9961         | $y = 200899x$                | 0,9979         |
| % DER                     | 0,76                          | 0,11           | 0,78                         | 0,08           |
| Prueba t entre pendientes | 8,07                          |                |                              |                |

La tabla N° 11 presenta los valores correspondientes a la ecuación de la recta promedio para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales sabor a vainilla, así como el  $R^2$  promedio y la prueba de  $t$  de Student realizada entre las pendientes de la curva de calibración sencilla y adición de estándar, a modo de comparar estadísticamente ambas, y estudiar las diferencias significativas entre las rectas.

Es importante mencionar que antes de aplicar la prueba  $t$  de Student, se realizó un análisis de varianza ( $F$ ) a un nivel de confianza del 95 %, para evaluar las diferencias entre las desviaciones estándar de las medidas, y considerar la ecuación para la determinación del valor de  $t$ . En el análisis de varianza se encontró un valor de  $F_{\text{calculado}} = 1,02$  y un valor tabulado para  $(n - 1)$  grados de libertad igual a  $F_{\text{tabulado}} = 19,00$ . Como  $F_{\text{tabulado}}$  es mayor que  $F_{\text{calculado}}$  ( $F_{\text{tabulado}} > F_{\text{calculado}}$ ) no existen diferencias significativas entre las varianzas de las curvas de calibración realizadas (sencilla y adición de estándar). De este modo, se procedió a realizar la prueba  $t$  de Student encontrando un valor calculado de 8,07. Este valor es menor que el tabulado para un nivel de confianza del 99 % correspondiente a 9,93. Como  $t_{\text{tabulado}} > t_{\text{calculado}}$  no hay diferencias estadísticas significativas entre ambas pendientes a ese nivel de confianza, por ende la determinación cuantitativa del analito en cuestión puede hacerse por cualquiera de las curvas, en el intervalo de  $(2,0 - 12,0) \times 10^{-3}$  mg/mL.

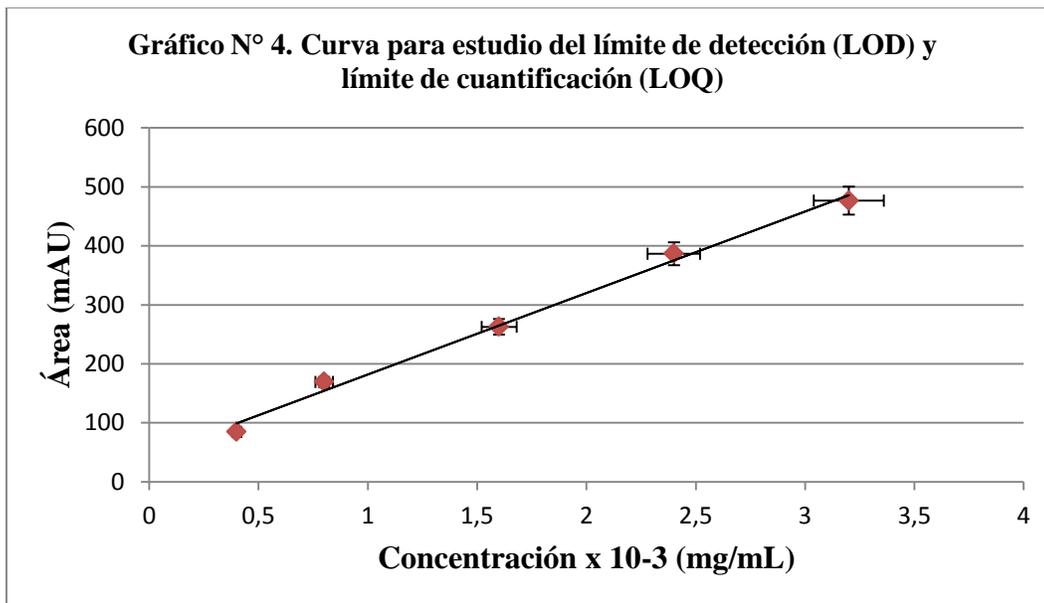
#### 4.4.2 Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Para el análisis de LOD y LOQ se prepararon cinco muestras para cada lote representando el área promedio para cada concentración, en este caso (0,4; 0,8; 1,6; 2,4 y 3,2)  $\times 10^{-3}$  mg/mL, obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla N° 12.** Resultados obtenidos para la curva de calibración para el estudio de los límites de detección y cuantificación en el método desarrollado.

| Concentración<br>( $\times 10^{-3}$ mg/mL) | 0,40   | 0,80   | 1,60   | 2,40   | 3,20   |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| Área promedio<br>(mAU)                     | 84,66  | 169,32 | 262,75 | 386,60 | 476,60 |
| Desviación<br>estándar                     | 1,22   | 2,46   | 3,74   | 5,52   | 6,72   |
| % DER                                      | 1,45 % | 1,45 % | 1,42 % | 1,43 % | 1,41 % |

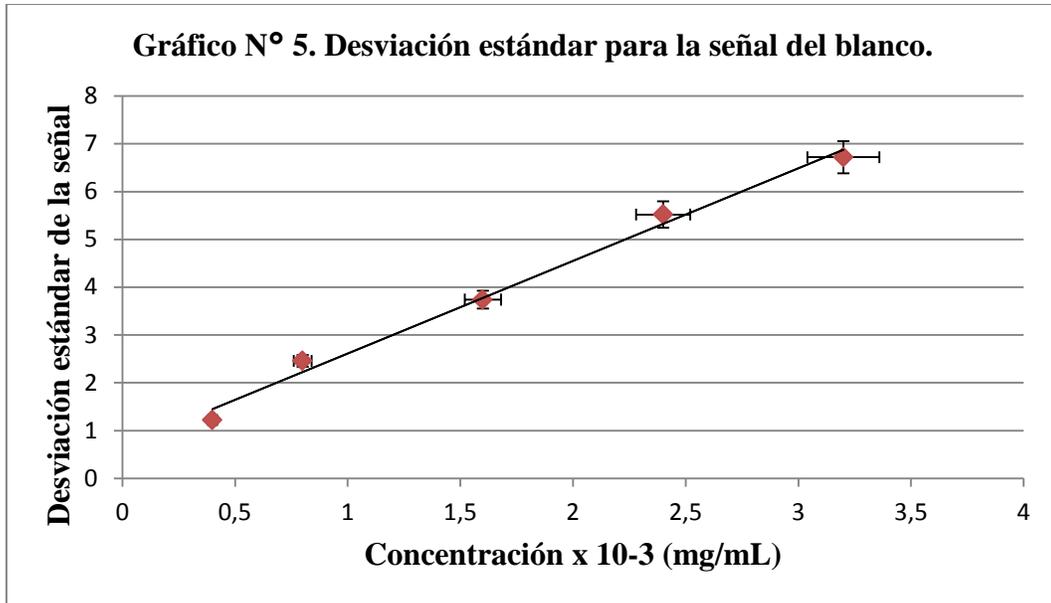
Graficando el área promedio *versus* la concentración se obtiene la siguiente gráfica;



**Gráfico N° 4.** Curva de calibración para el estudio del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método para la determinación de ácido ascórbico en suplementos nutricionales.

Cuya recta es igual a  $y = 13803x + 44,089$ , con un  $R^2$  igual a 0,9935, encontrando como corte la señal de ruido, es decir;  $Y_b = 44,089$ .

Para el cálculo de la desviación estándar de la señal proporcionada por el ruido se construyó la recta tomando como eje de las ordenadas las desviaciones estándar de la señal analítica, y como eje de las abscisas las concentraciones en estudio. Así, la gráfica se presenta como:



**Gráfico N° 5.** Curva de calibración para cálculo de la desviación estándar de la señal del blanco para la determinación del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

La recta es igual a  $y = 193,66x + 0,6785$  con un  $R^2$  igual a 0,9914. Así, la desviación estándar del blanco es igual a  $s_b = 0,6785$ .

Luego de calculado el valor medio de la señal del ruido por extrapolación y la desviación estándar de dicha señal, se calculan los límites teóricos de detección y cuantificación utilizando la ecuación (10) y, teniendo en cuenta que para cada lote cada medida se realizó 5 veces.

**Tabla N° 13.** Límite de detección y límite de cuantificación del método de análisis desarrollado.

| Límite de detección (LOD)   | Límite de cuantificación (LOQ) |
|-----------------------------|--------------------------------|
| $1,50 \times 10^{-3}$ mg/mL | $1,65 \times 10^{-3}$ mg/mL    |

#### 4.4.3 Intervalo lineal

Como se dijo previamente, la curva de calibración de estándar es lineal hasta una concentración de  $12,0 \times 10^{-3}$  mg/mL, y como el límite de cuantificación es próximo a  $1,65 \times 10^{-3}$  mg/mL, el intervalo lineal de trabajo para el método analítico desarrollado es  $(1,65 - 12,0) \times 10^{-3}$  mg/mL.

**Tabla N° 14.** Intervalo lineal o intervalo útil de trabajo en el método desarrollado.

| Intervalo lineal | $(1,65 - 12,0) \times 10^{-3}$ mg/mL |
|------------------|--------------------------------------|
|------------------|--------------------------------------|

#### 4.4.4 Precisión

Con el objeto de estudiar el grado de dispersión entre una serie de medidas del método, se analizaron los tres lotes de estudio, durante tres días, los dos primeros consecutivos y el último al cuarto día. Las siguientes tablas muestran los valores de concentración promedio, y desviación estándar relativa para cada análisis.

**Tabla N° 15.** Primer análisis de precisión de los lotes de estudio.

| Lote      | mg/porción de AA | Promedio<br>(mg/porción de AA) | % DER |
|-----------|------------------|--------------------------------|-------|
| G87508A00 | $10,15 \pm 0,25$ | 10,14                          | 0,30  |
|           | $10,11 \pm 0,03$ |                                |       |
|           | $10,17 \pm 0,26$ |                                |       |
| G87509A00 | $10,30 \pm 0,12$ | 10,31                          | 0,31  |
|           | $10,35 \pm 0,52$ |                                |       |
|           | $10,29 \pm 1,10$ |                                |       |
| G87510A00 | $10,28 \pm 0,94$ | 10,32                          | 0,31  |
|           | $10,33 \pm 0,48$ |                                |       |
|           | $10,34 \pm 0,28$ |                                |       |

**Tabla N° 16.** Segundo análisis de precisión de los lotes de estudio.

| <b>Lote</b> | <b>mg/porción de AA</b> | <b>Promedio<br/>(mg/porción de AA)</b> | <b>% DER</b> |
|-------------|-------------------------|--|--------------|
| G87508A00   | 10,08 ± 0,56            | 10,07                                  | 0,06         |
|             | 10,07 ± 0,48            |  |              |
|             | 10,07 ± 0,59            |  |              |
| G87509A00   | 10,28 ± 0,61            | 10,24                                  | 0,35         |
|             | 10,21 ± 0,76            |  |              |
|             | 10,23 ± 0,33            |  |              |
| G87510A00   | 10,31 ± 0,70            | 10,30                                  | 0,10         |
|             | 10,30 ± 0,26            |  |              |
|             | 10,29 ± 1,56            |  |              |

**Tabla N° 17.** Tercer análisis de precisión de los lotes de estudio.

| <b>Lote</b> | <b>mg/porción de AA</b> | <b>Promedio<br/>(mg/porción de AA)</b> | <b>% DER</b> |
|-------------|-------------------------|--|--------------|
| G87508A00   | 10,06 ± 0,35            | 10,07                                  | 0,11         |
|             | 10,08 ± 0,31            |  |              |
|             | 10,06 ± 0,61            |  |              |
| G87509A00   | 10,34 ± 0,78            | 10,29                                  | 0,46         |
|             | 10,27 ± 0,93            |  |              |
|             | 10,25 ± 0,31            |  |              |
| G87510A00   | 10,35 ± 0,16            | 10,37                                  | 0,42         |
|             | 10,34 ± 0,11            |  |              |
|             | 10,42 ± 0,93            |  |              |

**Tabla N° 18.** Precisión de los lotes de análisis del suplemento nutricional sabor a vainilla.

| Lote      | mg/porción de AA | Promedio | % DER |
|-----------|------------------|----------|-------|
| G87508A00 | 10,14 ± 0,30     | 10,09    | 0,40  |
|           | 10,07 ± 0,06     |          |       |
|           | 10,07 ± 0,11     |          |       |
| G87509A00 | 10,31 ± 0,31     | 10,28    | 0,35  |
|           | 10,24 ± 0,35     |          |       |
|           | 10,29 ± 0,46     |          |       |
| G87510A00 | 10,32 ± 0,31     | 10,33    | 0,35  |
|           | 10,30 ± 0,10     |          |       |
|           | 10,37 ± 0,42     |          |       |

La precisión intermedia se estudió en base al análisis N° 1 y análisis N° 3, variando únicamente los días de análisis, ya que solo se disponía de un equipo para el análisis de ácido ascórbico, al igual que un solo analista. Los resultados se tabulan a continuación;

**Tabla N° 19.** Análisis de precisión intermedia.

| Lote                     | Análisis N° 1           |                          | Análisis N° 3           |                          |
|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                          | Muestra<br>(mg/porción) | Promedio<br>(mg/porción) | Muestra<br>(mg/porción) | Promedio<br>(mg/porción) |
| G87508A00                | 10,15 ± 0,25            | 10,26 ± 0,88             | 10,06 ± 0,35            | 10,24 ± 1,36             |
|                          | 10,11 ± 0,03            |                          | 10,08 ± 0,31            |                          |
|                          | 10,17 ± 0,26            |                          | 10,06 ± 0,61            |                          |
| G87509A00                | 10,30 ± 0,12            | 10,26 ± 0,88             | 10,34 ± 0,78            | 10,24 ± 1,36             |
|                          | 10,35 ± 0,52            |                          | 10,27 ± 0,93            |                          |
|                          | 10,29 ± 1,10            |                          | 10,25 ± 0,31            |                          |
| G87510A00                | 10,28 ± 0,94            | 10,26 ± 0,88             | 10,35 ± 0,16            | 10,24 ± 1,36             |
|                          | 10,33 ± 0,48            |                          | 10,34 ± 0,11            |                          |
|                          | 10,34 ± 0,28            |                          | 10,42 ± 0,93            |                          |
| Promedio<br>(mg/porción) | <b>10,25 ± 1,12</b>     |                          |                         |                          |

La repetibilidad se analizó a partir del análisis N° 1 y análisis N° 2, bajo las mismas condiciones operativas de analista, equipos, y reactivos, en el mismo laboratorio, y en un periodo de tiempo corto.

**Tabla N° 20.** Análisis de repetibilidad.

| Lote                  | Análisis N° 1        |                       | Análisis N° 2        |                       |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
|                       | Muestra (mg/porción) | Promedio (mg/porción) | Muestra (mg/porción) | Promedio (mg/porción) |
| G87508A00             | 10,15 ± 0,25         |                       | 10,08 ± 0,56         |                       |
|                       | 10,11 ± 0,03         |                       | 10,07 ± 0,48         |                       |
|                       | 10,17 ± 0,26         |                       | 10,07 ± 0,59         |                       |
| G87509A00             | 10,30 ± 0,12         |                       | 10,28 ± 0,61         |                       |
|                       | 10,35 ± 0,52         | 10,26 ± 0,88          | 10,21 ± 0,76         | 10,20 ± 1,01          |
|                       | 10,29 ± 1,10         |                       | 10,23 ± 0,33         |                       |
| G87510A00             | 10,28 ± 0,94         |                       | 10,31 ± 0,70         |                       |
|                       | 10,33 ± 0,48         |                       | 10,30 ± 0,26         |                       |
|                       | 10,34 ± 0,28         |                       | 10,29 ± 1,56         |                       |
| Promedio (mg/porción) |                      | 10,23 ± 0,96          |                      |                       |

Finalmente, se muestran los resultados de la precisión en cuanto al sistema instrumental, mediante la determinación del promedio y el porcentaje de desviación estándar relativa de cada uno de los resultados dados por los tres análisis realizados.

**Tabla N° 21.** Precisión del sistema instrumental para la determinación de vitamina C en suplementos nutricionales.

| <b>Análisis</b>          | <b>Lote</b>  | <b>mg/porción de AA</b> |
|--------------------------|--------------|-------------------------|
| 1                        | G87508A00    | 10,15 ± 0,25            |
|                          |              | 10,11 ± 0,03            |
|                          |              | 10,17 ± 0,26            |
|                          | G87509A00    | 10,30 ± 0,12            |
|                          |              | 10,35 ± 0,52            |
|                          |              | 10,29 ± 1,10            |
|                          | G87510A00    | 10,28 ± 0,94            |
|                          |              | 10,33 ± 0,48            |
|                          |              | 10,34 ± 0,28            |
| 2                        | G87508A00    | 10,08 ± 0,56            |
|                          |              | 10,07 ± 0,48            |
|                          |              | 10,07 ± 0,59            |
|                          | G87509A00    | 10,28 ± 0,61            |
|                          |              | 10,21 ± 0,76            |
|                          |              | 10,23 ± 0,33            |
|                          | G87510A00    | 10,31 ± 0,70            |
|                          |              | 10,30 ± 0,26            |
|                          |              | 10,29 ± 1,56            |
| 3                        | G87508A00    | 10,06 ± 0,35            |
|                          |              | 10,08 ± 0,31            |
|                          |              | 10,06 ± 0,61            |
|                          | G87509A00    | 10,34 ± 0,78            |
|                          |              | 10,27 ± 0,93            |
|                          |              | 10,25 ± 0,31            |
|                          | G87510A00    | 10,35 ± 0,16            |
|                          |              | 10,34 ± 0,11            |
|                          |              | 10,42 ± 0,93            |
| Promedio<br>(mg/porción) | 10,23 ± 1,08 |                         |

La *precisión* estudia la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, sin tomar en cuenta su proximidad al valor real. Como se mostró en las tablas anteriores, la precisión se determina como el cálculo del porcentaje de la desviación estándar relativa (% DER) y se expresa dando el valor medio obtenido junto con el más – menos de la variabilidad de los resultados. En términos generales, el método de análisis proporcionó una precisión intermedia de  $(10,25 \pm 1,12)$  mg/porción de AA, con una repetibilidad de  $(10,23 \pm 0,96)$  mg/porción de AA, mientras que la precisión del sistema instrumental fue de  $(10,23 \pm 1,08)$  mg/porción.

Teniendo en cuenta los % DER obtenidos en el análisis, es necesario establecer los criterios de aceptación viables para el método. Así, la USP indica en general un % DER no mayor al 2 % inyectando cinco veces una solución estándar al sistema (para productos farmacéuticos), aunque en condiciones apropiadas se pueden obtener valores incluso menores al 1 % [Quattrocchi *et al.*, 1992].

Existen tablas que relacionan el % DER máximo aceptable para un método analítico, en función de los límites de aceptación. Así, para un límite de aceptación entre (90 – 110) % el % DER deberá ser menor al 6,7 % para un método de tres repeticiones [Quattrocchi *et al.*, 1992].

Por otro lado, la magnitud porcentual o la masa relativa de analito y la complejidad de la matriz resulta también de gran importancia, resultando que para muestras alimenticias un % DER apropiado puede ir de 5 % a 10 %, incluso mayor. Por ende, el método desarrollado resulta preciso y repetible, satisfaciendo ampliamente los valores esperados bibliográficamente.

Es importante mencionar que el parámetro de reproducibilidad no es de obligado cumplimiento y debe realizarse únicamente en aquellos casos en que se desee transferir el método a otros laboratorios o incluirlo en guías oficiales [Ortega y Cortés, 2001].

#### 4.4.5 Exactitud o porcentaje de recuperación

La tabla N° 22 presenta los resultados por triplicado de una muestra enriquecida con patrón de ácido ascórbico, las cuales fueron sometidas al proceso de extracción previamente desarrollado para determinar el porcentaje de recuperación.

**Tabla N° 22.** Adición de patrón a los lotes de análisis para el estudio del porcentaje de recuperación.

| Lote      | Respuesta      |                |                |                |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|           | X              | x + 0,5 mg     | x + 1,0 mg     | x + 1,5 mg     |
| G87508A00 | 1398,44        | 1505,75        | 1916,08        | 2328,70        |
|           | 1398,44        | 1507,03        | 1912,03        | 2371,02        |
|           | 1403,88        | 1510,47        | 1911,32        | 2330,03        |
| Promedios | <b>1400,25</b> | <b>1507,75</b> | <b>1913,14</b> | <b>2343,25</b> |
| % DER     | <b>0,22 %</b>  | <b>0,16 %</b>  | <b>0,13 %</b>  | <b>1,03 %</b>  |
| G87509A00 | 1440,05        | 1630,53        | 2030,28        | 2434,34        |
|           | 1438,42        | 1627,89        | 2034,56        | 2440,56        |
|           | 1445,38        | 1644,72        | 2044,28        | 2439,27        |
| Promedios | <b>1441,28</b> | <b>1634,38</b> | <b>2036,37</b> | <b>2438,06</b> |
| % DER     | <b>0,25 %</b>  | <b>0,55 %</b>  | <b>0,35 %</b>  | <b>0,14 %</b>  |
| G87510A00 | 1395,84        | 1525,77        | 1940,28        | 2370,17        |
|           | 1402,74        | 1530,63        | 1938,49        | 2375,21        |
|           | 1398,46        | 1517,23        | 1937,28        | 2364,57        |
| Promedios | <b>1399,01</b> | <b>1524,54</b> | <b>1938,68</b> | <b>2369,98</b> |
| % DER     | <b>0,25 %</b>  | <b>0,45 %</b>  | <b>0,08 %</b>  | <b>0,22 %</b>  |

**Tabla N° 23.** Porcentaje de recuperación para las muestras de análisis en el método.

| <b>Lote</b>                                  |                                    | G87508A00               |                       |                 |               |
|--|------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|---------------|
| <b>Ecuación de la recta</b>                  |                                    | $y = 212872 x - 317,32$ |                       |                 |               |
| <b>Concentración (mg)</b>                    | <b>Respuesta experimental neta</b> | <b>Interpolación</b>    | <b>% Recuperación</b> | <b>Promedio</b> | <b>% DER</b>  |
| 0,5  | 107,50                             | 113,75                  | 94,51 %               |                 |               |
| 1,0  | 512,89                             | 544,81                  | 94,14 %               | <b>95,09 %</b>  | <b>1,41 %</b> |
| 1,5  | 943,00                             | 975,87                  | 96,63 %               |                 |               |
| <b>Lote</b>                                  |                                    | G87509A00               |                       |                 |               |
| <b>Ecuación de la recta</b>                  |                                    | $y = 209675 x - 225,85$ |                       |                 |               |
| <b>Concentración (mg)</b>                    | <b>Respuesta experimental neta</b> | <b>Interpolación</b>    | <b>% Recuperación</b> | <b>Promedio</b> | <b>% DER</b>  |
| 0,5  | 193,10                             | 198,74                  | 97,16 %               |                 |               |
| 1,0  | 595,09                             | 623,33                  | 95,47 %               | <b>95,92 %</b>  | <b>1,14 %</b> |
| 1,5  | 996,78                             | 1047,93                 | 95,12 %               |                 |               |
| <b>Lote</b>                                  |                                    | G87510A00               |                       |                 |               |
| <b>Ecuación de la recta</b>                  |                                    | $y = 211500 x - 297,13$ |                       |                 |               |
| <b>Concentración (mg)</b>                    | <b>Respuesta experimental neta</b> | <b>Interpolación</b>    | <b>% Recuperación</b> | <b>Promedio</b> | <b>% DER</b>  |
| 0,5  | 125,53                             | 131,16                  | 95,71 %               |                 |               |
| 1,0  | 539,67                             | 559,45                  | 96,46 %               | <b>96,82 %</b>  | <b>1,38 %</b> |
| 1,5  | 970,97                             | 987,73                  | 98,30 %               |                 |               |
| <b>Porcentaje de recuperación del método</b> |                                    | <b>95,94 % ± 0,90 %</b> |                       |                 |               |

La exactitud nos indica si los resultados que se obtienen con un método analítico están próximos al valor establecido convencionalmente. Para la determinación de ácido ascórbico la exactitud fue determinada a partir del porcentaje de recuperación mediante el método de adición de patrón, obteniendo un porcentaje de recuperación promedio para los tres lotes de estudio de  $(95,94 \pm 0,90) \%$ .

Es importante mencionar que no siempre se obtienen valores de recuperación cercanos al 100 %, ya que esto depende de la matriz de la muestra, la efectividad del método de preparación y extracción además de la concentración de analito.

Los porcentajes de recuperación para los tres lotes de análisis fueron obtenidos por defecto, y no por exceso. Cuando existe una desviación de la exactitud por encima de 100 % es posible atribuir el mismo a la presencia de interferencias y la selectividad del método, atribuyendo resultados superiores al esperado. Por otro lado, cuando se tienen resultados por defecto en general se dan cuando la matriz de la muestra es compleja y la extracción del analito requiere varios pasos [Ortega y Cortés, 2001]. Estas evidencias demuestran que, los porcentajes atribuidos a la determinación de AA en los suplementos nutricionales tienen gran concordancia, debido a que la extracción se realiza es una sola etapa, además de que el método es selectivo para la especie de interés.

#### **4.5 EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO CON LAS ESPECIFICACIONES**

Una vez evaluado el método de análisis químico y redactado el procedimiento para la determinación de vitamina C, se procedió a determinar la concentración de ácido ascórbico en los diferentes lotes producidos por la empresa, a modo de evaluar el cumplimiento con las especificaciones, y realizar además un análisis de variabilidad del producto.

Hay que mencionar que el producto declara 10 mg de ácido ascórbico por cada 25 g de batido (porción). Sin embargo, para efectos de control de calidad se establece que los límites para dar certificación del producto están entre (9 – 15) mg de AA por porción. Los resultados se presentan a continuación.

**Tabla N° 24.** Evaluación del cumplimiento con las especificaciones del contenido de ácido ascórbico en los diferentes lotes de producción del suplemento nutricional.

| Sabor     | Lote        | Concentración de AA (mg/Porción) |
|-----------|-------------|----------------------------------|
| Vainilla  | G87508A00   | 10,01 ± 0,85                     |
|           | G87509A00   | 10,18 ± 1,85                     |
|           | G87510A00   | 10,36 ± 1,95                     |
|           | G87511A00   | 10,49 ± 1,83                     |
|           | G87514A00   | 9,27 ± 1,96                      |
|           | G87515A00   | 9,18 ± 0,95                      |
|           | G87516A00   | 9,20 ± 1,76                      |
|           | G87517A00   | 10,72 ± 0,95                     |
|           | G87518A00   | 10,05 ± 3,96                     |
|           | G87522A00   | 10,86 ± 5,02                     |
| Chocolate | G87551A00   | 9,94 ± 5,30                      |
|           | G87552A00   | 9,95 ± 1,54                      |
|           | G87556A00   | 10,27 ± 1,14                     |
|           | G87557A00   | 12,61 ± 1,40                     |
|           | G87558A00   | 10,63 ± 1,81                     |
|           | G87559A00   | 10,68 ± 2,20                     |
|           | G87560A00   | 10,56 ± 0,50                     |
|           | G87563A00   | 10,92 ± 1,70                     |
| G87564A00 | 9,96 ± 3,17 |                                  |

Los 19 lotes de análisis cumplieron satisfactoriamente con las especificaciones, cuyo rango es de (9 – 15) mg de AA/porción. Por otro lado, es necesario hacer énfasis en los porcentajes de la desviación estándar relativa (% DER), cuyo máximo valor entre los 19 lotes fue de 5,30 %, que de acuerdo con los límites de aceptación dados por la USP para un nivel de confianza entre (90–110) % para tres repeticiones es de 6,71 % [Ortega y Cortés, 2001], aunque para muestras alimenticias dicho porcentaje se puede establecer entre (5–10) %. Con estas evidencias es posible decir que el método no solo cumple con las especificaciones requeridas, sino que además cumple con la adecuabilidad del

sistema para tres inyecciones en cada lote de análisis. Además, se debe mencionar que a pesar de que la validación se realizó únicamente para el sabor vainilla, el método se extendió para análisis de control de calidad de otros sabores, tal como chocolate, y se realizaron además pruebas para galleta y crema (ver anexos), cumpliendo con las expectativas de análisis al poder evaluar el cumplimiento con las especificaciones de los distintos sabores en los que varía la presentación del producto de interés.

Por otro lado, aunque no se realizó con exhaustividad análisis de eficiencia del método implementado respecto al método proporcionado por la empresa, se debe mencionar que la metodología implementada resultó eficiente de acuerdo al número de muestras analizadas (19 lotes), respecto al método anterior.

#### **4.5.1 Análisis adicionales de control de calidad del suplemento nutricional**

El producto de análisis no solo implica la determinación de ácido ascórbico por la técnica de cromatografía líquida para dar certificado de calidad del mismo, sino que además es necesario evaluar la densidad aparente del producto y el porcentaje de humedad por pérdida por secado, el cual debe ser menor al 5 %. Los resultados se tabulan en la tabla N° 25.

Mediante la evaluación del porcentaje de humedad que debe ser menor al 5 %, y la densidad aparente es posible ver un cumplimiento con los requisitos mínimos necesarios del producto de análisis para su certificación de calidad.

**Tabla N° 25.** Evaluación del cumplimiento con las especificaciones de densidad aparente y porcentaje de humedad en los diferentes lotes de producción.

| Sabor     | Lote      | Densidad aparente (g/mL) | Porcentaje de humedad (%) |
|-----------|-----------|--------------------------|---------------------------|
| Vainilla  | G87508A00 | 0,560                    | 1,99                      |
|           | G87509A00 | 0,604                    | 1,72                      |
|           | G87510A00 | 0,588                    | 2,35                      |
|           | G87511A00 | 0,592                    | 1,93                      |
|           | G87514A00 | 0,576                    | 2,17                      |
|           | G87515A00 | 0,588                    | 2,28                      |
|           | G87516A00 | 0,580                    | 2,45                      |
|           | G87517A00 | 0,576                    | 3,01                      |
|           | G87518A00 | 0,576                    | 3,87                      |
|           | G87522A00 | 0,584                    | 3,29                      |
| Chocolate | G87551A00 | 0,528                    | 3,31                      |
|           | G87552A00 | 0,540                    | 2,95                      |
|           | G87556A00 | 0,524                    | 3,34                      |
|           | G87557A00 | 0,525                    | 2,67                      |
|           | G87558A00 | 0,540                    | 3,06                      |
|           | G87559A00 | 0,532                    | 3,06                      |
|           | G87560A00 | 0,528                    | 3,38                      |
|           | G87563A00 | 0,544                    | 4,33                      |
| G87564A00 | 0,536     | 3,82                     |                           |

## CONCLUSIONES

- Se desarrolló e implementó un método analítico para la determinación de ácido ascórbico (vitamina C) en suplementos nutricionales a base de proteínas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- La metodología de extracción implicó un medio de extracción de ácido *o*-fosfórico para extraer el ácido ascórbico presente, ácido acético glacial para eluir las proteínas asociadas al suplemento y EDTA (0,1 M) con la finalidad de acomplejar parte del hierro presente en el suplemento que oxida con facilidad el analito de interés.
- El método desarrollado es selectivo a 245 nm, ya que no se genera interferencia por la matriz a la longitud de onda de estudio.
- El límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) teórico fue de  $1,50 \times 10^{-3}$  mg/mL y  $1,65 \times 10^{-3}$  mg/mL respectivamente para la especie de interés.
- El intervalo lineal para el método desarrollado es de  $(1,65 - 12,0) \times 10^{-3}$  mg/mL de ácido ascórbico.
- Desde el punto de vista instrumental el método es preciso, ya que el grado de concordancia entre las diferentes medidas no supera para 19 lotes de análisis un valor de desviación estándar relativa de 5,30 %. Teniendo como valor de referencia un 10,0 % de desviación estándar relativa debido a la complejidad de la muestra.
- Para tres lotes de análisis el porcentaje de recuperación fue de  $(95,94 \pm 0,90)$  %, siendo exacta la metodología, con alto grado de concordancia, ya que la extracción se realiza en una sola etapa.
- Los diferentes lotes producidos por Laboratorios VALMOR, C.A cumplieron ampliamente con las especificaciones, cuyo rango estipulado es de (9 – 15) mg de AA/porción.
- Aunque la metodología analítica se validó para el suplemento sabor a vainilla, la misma se extendió al sabor de chocolate, cumpliendo de igual forma con los requisitos mínimos de calidad exigidos para dar certificación de calidad del producto.

### **RECOMENDACIONES**

- Realizar luego de cada determinación analítica un lavado que incluya una solución de ácido acético glacial a pH controlado ( $\text{pH} \approx 3,0$ ) para eluir las proteínas que pudieran quedar retenidas dentro de la columna cromatográfica. Y, posteriormente aplicar el lavado convencional que incluye en primera instancia un lavado con agua, y finalmente el lavado exigido por la columna cromatográfica, en este caso utilizando una mezcla de agua : acetonitrilo en proporción (65:35).
- Extender la validación del método desarrollado a los sabores; chocolate, fresa y galleta y crema.
- Realizar estudios rigurosos del rendimiento de la columna cromatográfica mediante la determinación de la eficiencia de la misma, implicando el estudio de la disminución del número de platos cada tres lotes de análisis.
- Realizar estudios rigurosos de estabilidad de ácido ascórbico en el suplemento nutricional utilizando la solución de extracción previamente establecida para el análisis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agilent ChemStation. (2009) “**Familiarización con ChemStation**” Manual de usuario. N° Referencia 62070 – 95126.
2. Agilent Technologies (2008) “**Bomba cuaternaria Agilent serie 1200**” Manual de usuario. N° de referencia; G1311 – 95011.
3. Agilent Technologies. (2006) “**Agilent serie 1200 detector de longitud de onda variable G1314B/G1314C (SL)**” Manual de usuario. N° de referencia: G1314 – 95010.
4. Agilent Technologies. (2008) “**Compartimiento termostatzado de columna Agilent serie 1200, G1316A / G1316B / G1316C**” Manual de usuario. N° de referencia: G1316 – 95011.
5. Agilent Technologies. (2008) “**Inyectores automáticos, preparativos y estándar Agilent serie 1200**” Manual de usuario. N° de referencia; G1329 – 95012.
6. Arakelian, C.; Bazán, N.; Minckas, N. (2010). “**Metabolismo. Capítulo 8: VITAMINAS**”.  
<https://nutriunsam.files.wordpress.com/2010/09/capitulo-8-vitaminas-2010.pdf>. Recuperado: 10 de enero de 2017.
7. Astiasarán, I. (2003). “**Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria**” Ediciones Díaz de Santos. Madrid-España. 48 pp.
8. Ball, G.F.M. (2005) “**Vitamins in Food: Analysis, Bioavailability and Stability**” CRC Press. Estados Unidos. 332 – 333 pp.
9. Brause, A.; Woollard, D.; Indyk, H. (2003) “**Determination of Total Vitamin C in Fruit Juices and Related Products by Liquid Chromatography: Interlaboratory Study**”. *Food Composition and Additives Journal of AOAC International*, 86: 367 – 374.
10. Bromatología. (2015) “**Capítulo V. Introducción a las Separaciones Cromatograficas**”  
[http://campus.fca.uncu.edu.ar/pluginfile.php/24568/mod\\_resource/content/1/Cap%205%20Cromatograf%C3%ADa%20Introducci%C3%B3n-Gas-HPLC%202015.pdf](http://campus.fca.uncu.edu.ar/pluginfile.php/24568/mod_resource/content/1/Cap%205%20Cromatograf%C3%ADa%20Introducci%C3%B3n-Gas-HPLC%202015.pdf). Recuperado: 13 de enero de 2017.
11. Capacha, H.P.; Llanos, G.P. (2007) “**Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de dexametasona y clotrimazol en crema, por HPLC y análisis de productos comercializados en el Perú**” Tesis de Pregrado – Universidad Nacional de San Marcos. 3 – 26 pp.  
Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (2010). “**Conceptos Fundamentales de Cromatografía**”  
[http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/principios\\_de\\_cromatografia.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf).

12. Correa, S.I.; Bravo, Z.L.; Sotero, S.V.; Oliva, C.C. (2011) **“Contenido de vitamina C en frutas de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú”**. *Scintia Agropecuaria*, 2: 123 – 130.
13. Damodaran, S.; Parkin, K.; Fennema, O. (2007) **“Fennema’s Food Chemistry”** 4<sup>a</sup> Edition. Editorial CRC Press. Estados Unidos. 535 – 536 pp.
14. De Leenheer, A.; Lambert, W.E.; Nelis, H.J. (1992) **“Modern Chromatographic Analysis of Vitamins”** Second Edition. Marcel Dekker, Inc. New York: 235 – 255 pp.
15. Ebbing, D.D.; Gammon, S.D. (2010) **“Química General”** Editorial Cengage Learning. México, DF. 14 pp.
16. Fatariah, Z.; Tengku, Z.; Wan, R. (2015) **“Ascorbic acid quantification in *Benincasa hispida* fruit extracted using different solvents”** *International Food Research Journal*, 22: 208 – 212.
17. Ferin, R.; Pavão, M.L.; Baptista, J. (2013) **“Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acid in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV”**. *Clinical Biochemistry*, CLB – 08275.
18. García, A. (2002) **“Dietética y nutrición. Las Vitaminas”**. <http://www.educaguia.com/Apuntesde/nutricion/VITAMINAS/VITAMINASI.pdf>  
f. Recuperado: 09 de enero de 2017.
19. Gennaro, A. (2003) **“Remington: Farmacia”** Vol. 1. Ediciones Médica Panamericana. Montevideo. 686 pp.
20. Gindberg, T.; Williams, K. (2010) **“Vitamin C quantification using reversed-phase ion-pairing HPLC”** *Concordia College Journal of Analytical Chemistry I*,: 19 – 23.
21. Gómez, R.M. (2010) **“Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales”**. Tesis Doctoral – Universidad de Granada. 23 – 31 pp.
22. Gómez, R.S; Sierra, A.I; Pérez, Q.D. (2009) **“Análisis Instrumental”** Netbiblio. España: 140 – 143 pp.
23. González, C. (2012) **“Introducción a los métodos cromatográficos”**  
[http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course\\_files/Tema\\_10.pdf](http://ocw.usal.es/ciencias-experimentales/analisis-aplicado-a-la-ingenieria-quimica/contenidos/course_files/Tema_10.pdf). Recuperado: 16 de enero de 2017.
24. Gutiérrez, J.B. (2000) **“Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos”** 2<sup>a</sup> Edición. Editorial Ediciones Díaz de Santos. Madrid: 172 pp.
25. Gutiérrez, T.M.; Hoyos, O; Páez, M. (2007) **“Determinación del contenido de ácido ascórbico en Uchuva (*Physalis peruviana* L.) por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)”**. Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol 5 N°1. 70 – 79.

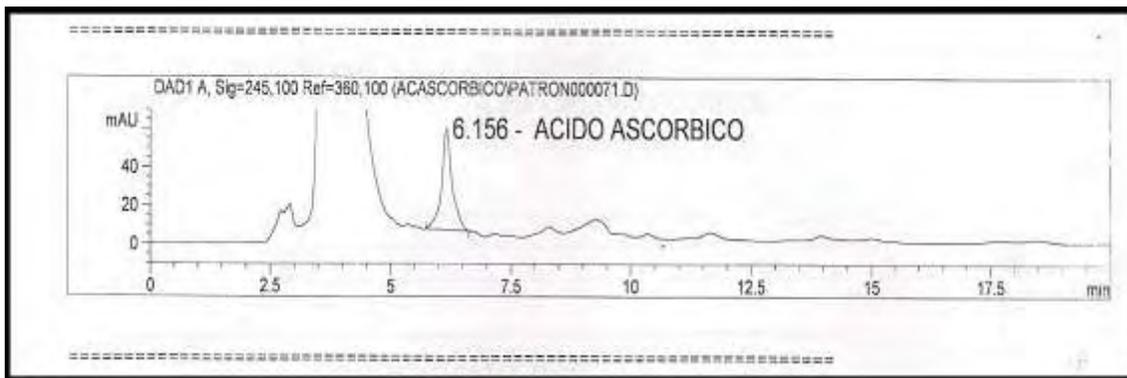
26. Hacisevki, A. (2009) “**An overview of ascorbic acid biochemistry**” Universidad de Gazi, Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica. Ankara Ecz. Fak. Derg, 38 (3) 233 – 255.
27. Hernández R.M; Sastre G.A. (1999) “**Tratado de nutrición**” Ediciones Díaz de Santos. Madrid-España: 153 pp.
28. Hernández, AA. (2004) “**Desarrollo de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de ácido fólico en cereales enriquecidos**”. Tesis de Maestría - Universidad Autónoma de Nuevo León, España: 1 – 2 p
29. Hernández, H.L.; Gonzáles, P.C. (2002) “**Introducción al Análisis Instrumental**” Editorial Ariel, S.A. Barcelona. 21 pp.
30. King, J.; de Pablo, S. (1987) “**Estabilidad de las vitaminas. Pérdida de vitaminas durante el procesamiento de los alimentos**”. *Rev. Chil. Nutr.*, 15: 143-152.
31. Laitinen, H.A.; Harris, W.E. (1982) “**Análisis químico: texto avanzado y de referencia**” Editorial Reverté. Barcelona. 435 pp.
32. Lia. (2008) “**Guía de Cromatografía**” Universidad Central de Venezuela-Facultad de Ciencias. <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>. Recuperado: 16 de enero de 2017.
33. Lide, D. (Ed.) (2006 – 2007). “**Handbook of Chemistry and Physics**” 87<sup>TH</sup> Edición. Editorial Advisory Board. Estado Unidos: (3) – 28 pp.
34. Majors, R.E. (2003). “**The Cleaning and Regeneration of Reversed – Phase HPLC Columns**” Column Watch, Agilent Technologies. LC•CG Europe. 1 – 6 pp
35. McMurry, J. (2008). “**Química Orgánica**” 7ª Edición. Editorial Cengage Learning. México DF. 772-773 pp.
36. Melvin H.W. (2002) “**Nutrición para la salud la condición física y el deporte (Bicolor)**”. Editorial Paidotribo. España. 225 pp.
37. Montaña, A.M.F. (2011) “**Determinación, cuantificación y comparación de la concentración de vitamina C en naranja (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus aurantifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*) por HPLC**”. Tesis de Pregrado – Pontifica Universidad Católica del Ecuador. 4 – 17 pp.
38. Moronta, Y. (2016). “**Determinación de Vitamina C (Ácido Ascórbico) por HPLC**”. Referencia N° QAG108.
39. National Institutes of Health. (2016) “**Vitamina C**”. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminC-DatosEnEspanol/>. Recuperado: 10 de enero de 2017.
40. Nollet, L.M.L. (2000). “**Food Analysis by HPLC**”. Segunda Edición. Editorial CRC Press. New York: 407 – 408 pp.

41. Nollet, L.M.L. (2009). “**Handbook of Muscle Food Analysis**” Editorial CRC Press. New York. 432 – 433 pp.
42. Ortega, A, L; Cortés, L, R. (2001) “**Validación de Métodos Analíticos**” AEFI, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Madrid. 11-105 pp.
43. Pickering, W.F. (1980) “**Química analítica moderna**” Editorial Reverté. Barcelona. 612 pp.
44. Quattrocchi, O.A.; Abalaira, S.A.; Laba, R.F. (1992) “**Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica**” Buenos Aires. 267-327 pp.
45. Rácz, E.; Parlagh, K.; Kecskés, T. (1990) “**HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF ASCORBIC ACID IN FRUITS AND VEGETABLES**” Universidad Técnica de Budapest, (H) – 1521, Budapest: 23 – 30 pp.
46. Rodríguez, S.C.; Pellerano, R.G.; Romero, C.H. (2012). “**Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata***” *Tumbagoa*, 7: 55-71.
47. Sánchez P, M.A. (2006) “**Métodos de Calibrado**” Universidad de Los Andes. Facultad de Ciencias – Departamento de Química. 2 – 18pp
48. Serra, H.M; Cafaro, T.A. (2007) “**Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo**”. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, V 41: 4.
49. Serra, L. Aranceta, J, Matáx, F.J. (2006) “**Nutrición y salud pública: métodos, bases científicas y aplicaciones**” Editorial Elsevier, Madrid: 16 pp.
50. Shafqat, U.; Arshad, H.; Ali, J.; Ullah, A. (2012). “**A Simple and Rapid HPLC Method for Analysis of Vitamin-C in Local Packed Juices of Pakistan**”. *Middle – East Journal of Scientific Research*, 12: 1085 – 1091.
51. Simpson, C.F. (1976) “**Practical High Performance Liquid Chromatography**”. Editorial Heyden. Londres. 235 – 255 pp.
52. Skoog D, A; West, D.M; James H, F. (1997) “**Fundamentos de química analítica**”. Editorial Thomson. México.: 664 – 667 pp.
53. Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. (2008) “**Principios de análisis instrumental**” Sexta Edición. Editorial Cengage Learning. México: 762 – 784p y 816 – 851 pp.
54. Thomas, L. (2016) “**Fuentes de la Vitamina C**”. [http://www.news-medical.net/health/Sources-of-Vitamin-C-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Sources-of-Vitamin-C-(Spanish).aspx). Recuperado: 17 de enero de 2017.
55. U.S FOOD & DRUG. Administration. (2016). “**Suplementos Alimenticios – Lo que usted necesita saber**”. <http://www.fda.gov/food/dietarysupplements/usingdietarysupplements/ucm210723.htm>. Recuperado: 21 de octubre de 2017.

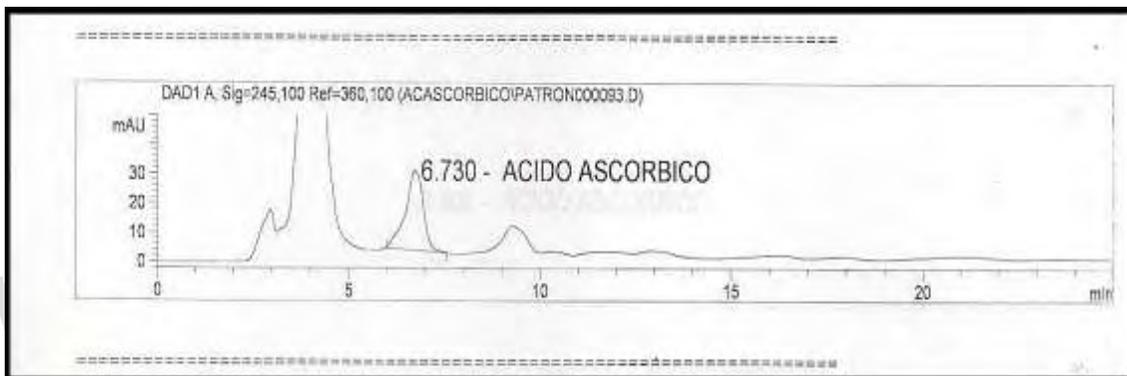
56. UNODC, Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. (2010) **“Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos”** Naciones Unidas. New York. 5 pp
57. USP 37. (2014) **“Farmacopea de los Estados Unidos de America”** Formulario Nacional. NF 32. Volumen 2. The United States Pharmacopeial Convention. Estados Unidos de America. 2203 – 2204 pp.
58. Valcárcel, M.; Gómez, A. (1988) **“Técnicas analíticas de separación”**. Editorial Reverté. España: 348 – 350 pp.
59. Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. (2007) **“Fundamentos de Bioquímica”**. Editorial Médica Panamericana. Montevideo. 102 pp.
60. Watada, A.E. (1982) **“A High – performance Liquid Chromatography Method for Determining Ascorbic Acid Content of Fresh Fruits and Vegetables”** *HortScience*, 17: 334 – 335.
61. Waters. (2010) **“SunFire Columns”** Care and Use Manual. N° Referencia: 715000891.
62. Zuo, R.; Zhou, S.; Zuo, Y.; Deng, Y. (2015) **“Determination of Creatinine, Uric and Ascorbic Acid in Bovine Milk and Orange Juice by Hydrophilic Interaction HPLC”**. *Food Chemistry*.: FOCH 17241.

www.bdigital.ula.ve

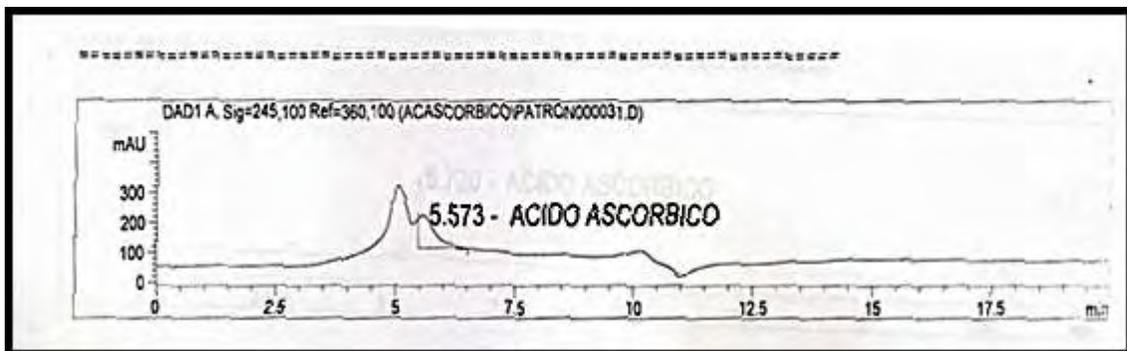
APÉNDICE



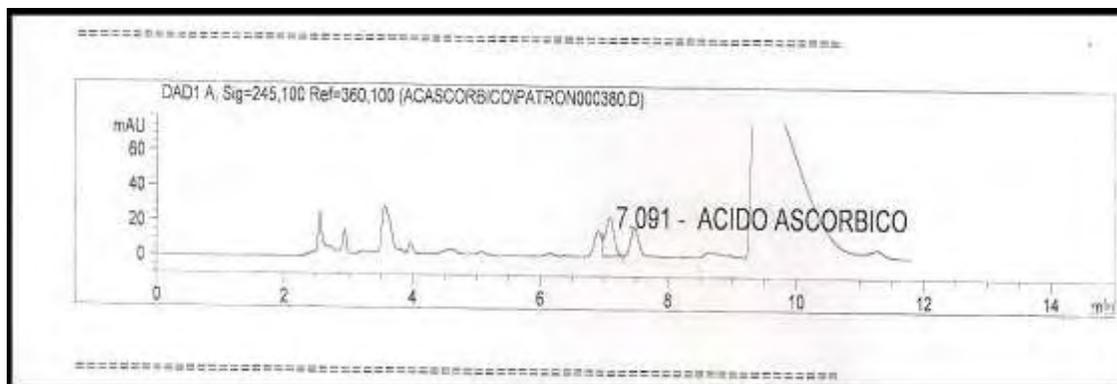
**Figura N° 18.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción ácido oxálico.



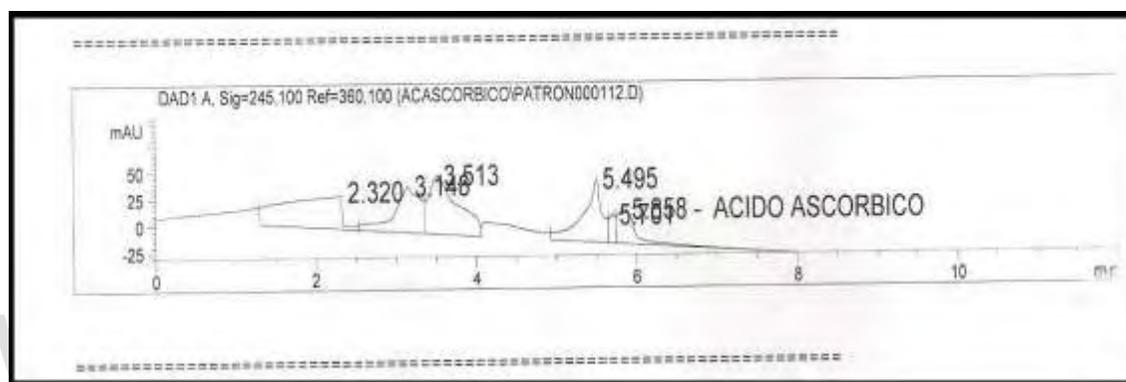
**Figura N° 19.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción ácido oxálico más metanol.



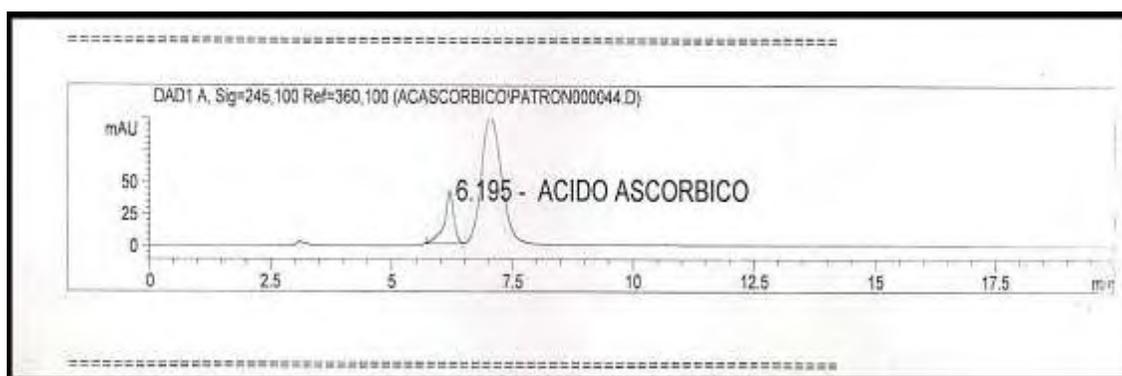
**Figura N° 20.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción fosfato dibásico de potasio más fosfato monobásico de potasio.



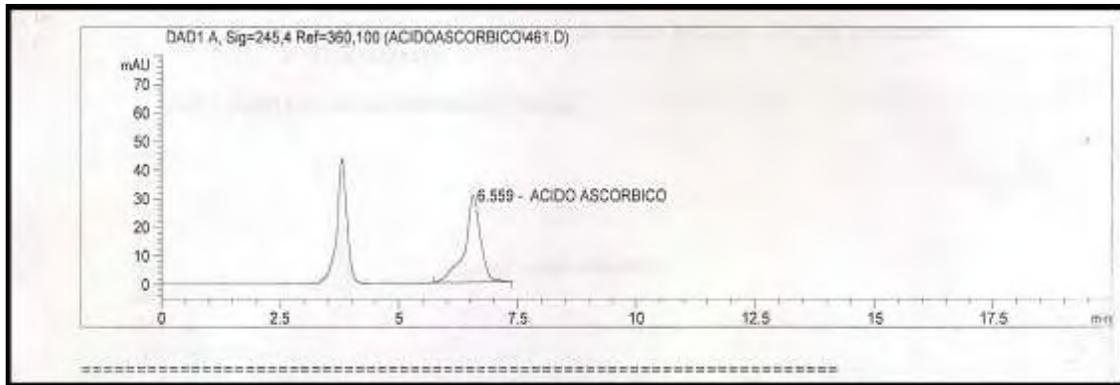
**Figura N° 21.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción ácido acético.



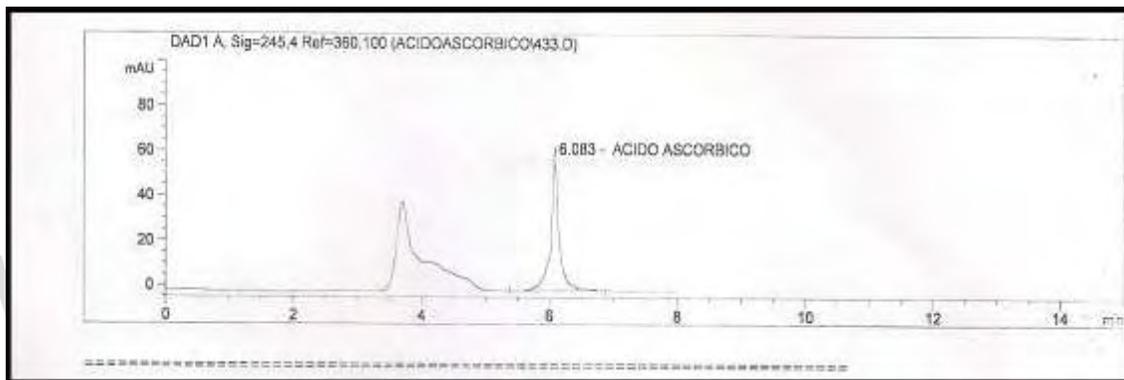
**Figura N° 22.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio más ácido tricloroacético.



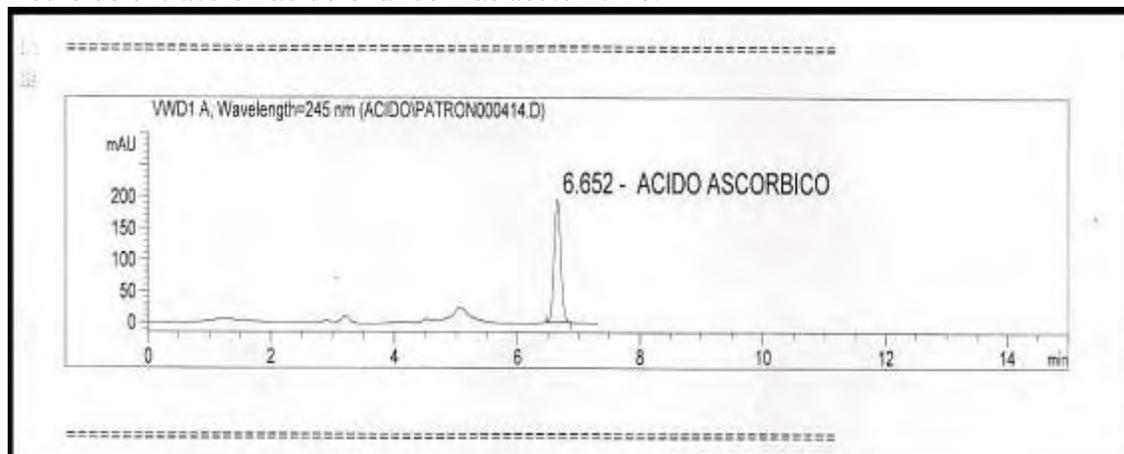
**Figura N° 23.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico de potasio más ácido perclórico en ácido acético.



**Figura N° 24.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción ácido oxálico más ácido trifluoroacético.



**Figura N° 25.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción ácido oxálico más acetonitrilo.



**Figura N° 26.** Cromatograma de la extracción de ácido ascórbico utilizando como medio de extracción ácido ortofosfórico, ácido acético glacial más EDTA (0,1M).

**Cuadro N° 1.** Valores de la *t* de Student.

| <b>Grados de libertad<br/>(n - 1)</b> | <b>95 % de probabilidad</b> | <b>99 % de probabilidad</b> |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1                                     | 12,71                       | 63,66                       |
| 2                                     | 4,30                        | 9,93                        |
| 3                                     | 3,18                        | 5,84                        |
| 4                                     | 2,78                        | 4,60                        |
| 5                                     | 2,57                        | 4,03                        |
| 6                                     | 2,45                        | 3,71                        |
| 7                                     | 2,37                        | 3,50                        |
| 8                                     | 2,31                        | 3,36                        |
| 9                                     | 2,26                        | 3,25                        |
| 10                                    | 2,23                        | 3,17                        |
| 11                                    | 2,20                        | 3,11                        |
| 12                                    | 2,18                        | 3,06                        |
| 13                                    | 2,16                        | 3,01                        |
| 14                                    | 2,15                        | 2,98                        |
| 15                                    | 2,13                        | 2,95                        |
| 16                                    | 2,12                        | 2,92                        |
| 17                                    | 2,11                        | 2,90                        |
| 18                                    | 2,10                        | 2,88                        |
| 19                                    | 2,09                        | 2,86                        |
| 20                                    | 2,09                        | 2,85                        |
| 30                                    | 2,04                        | 2,75                        |
| 40                                    | 2,02                        | 2,70                        |
| ∞                                     | 1,96                        | 2,58                        |

**Cuadro N° 2.** Valores de F para un nivel de 95 % de probabilidad.

| <b>(n - 1)<br/>para<br/>el<br/>menor<br/>valor<br/>de s<sup>2</sup></b> | <b>(n - 1) para el mayor valor de s<sup>2</sup></b> |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|   | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
| 1   | 161   | 200   | 216   | 225   | 230   | 234   | 237   | 239   | 241   | 242   |
| 2   | 18,51   | 19,00 | 19,16 | 19,25 | 19,30 | 19,33 | 19,36 | 19,37 | 19,38 | 19,39 |
| 3   | 10,13   | 9,55  | 9,28  | 9,12  | 9,01  | 8,94  | 8,88  | 8,84  | 8,81  | 8,78  |
| 4   | 7,71  | 6,94  | 6,59  | 6,39  | 6,26  | 6,16  | 6,09  | 6,04  | 6,00  | 5,96  |
| 5   | 6,61  | 5,79  | 5,41  | 5,19  | 5,05  | 4,95  | 4,88  | 4,82  | 4,78  | 4,74  |
| 6   | 5,99  | 5,14  | 4,76  | 4,53  | 4,39  | 4,28  | 4,21  | 4,15  | 4,10  | 4,06  |
| 7   | 5,59  | 4,74  | 4,35  | 4,12  | 3,97  | 3,87  | 3,79  | 3,73  | 3,68  | 3,63  |
| 8   | 5,32  | 4,46  | 4,07  | 3,84  | 3,69  | 3,58  | 3,50  | 3,44  | 3,39  | 3,34  |
| 9   | 5,12  | 4,26  | 3,86  | 3,63  | 3,48  | 3,37  | 3,29  | 3,23  | 3,18  | 3,13  |
| 10  | 4,96  | 4,10  | 3,71  | 3,48  | 3,33  | 3,22  | 3,14  | 3,07  | 3,02  | 2,97  |

ANEXOS

**ANÁLISIS DE CONTROL DE CALIDAD.**

MEZCLA EN POLVO PARA BATIDO NUTRICIONAL FÓRMULA 1 GALLETA Y  
CREMA x 550g.

LOTE: G86692A00

PRODUCTO TERMINADO.

Secuencia de un patrón (5 inyecciones) y una muestra (3 inyecciones).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\BAT656A00000001.D  
 Sample Name: PATRON

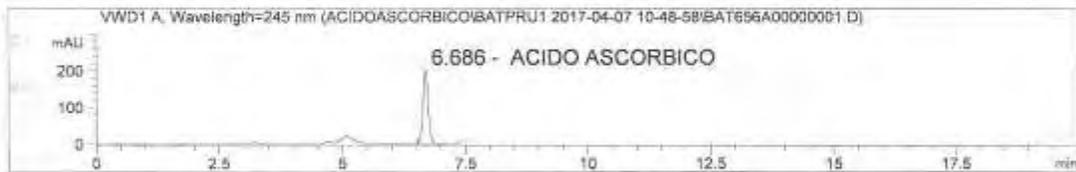
```

=====
Acq. Operator   : MARIA ANDREINA PERNIA          Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                   Location  : Vial 1
Injection Date  : 4/7/2017 10:49:15 AM         Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\
                ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 4/7/2017 10:48:57 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 6/26/2017 9:56:10 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
                (modified after loading)
Method Info     : COLUMNNA LUNA C-18 5µ 250 x 4,6mm, FLUJO:0.8mL/min, TEMPERATURA:25
                GRADOS CENTIGRADOS, LONGITUD DE ONDA:245nm, PRESION: 136 Bar VOLUMEN
                DE INYECCION:50µL, , CROMATOGRAFO AGILENT 1260 N° 07
                FASE MOVIL : BUFFER FOSFATO (100%)

Sample Info     : DETERMINACION DE ACIDO ASCORBICO
                ESTANDAR DE REFERENCIA: ACIDO ASCORBICO
                LOTE FABRICANTE: DY0261511454
                FECHA DE VENCIMIENTO: 29/10/2018
                PUREZA: 99,98%
    
```





External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 6/26/2017 9:56:10 AM
Multiplier:      : 1.0000
Dilution:        : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: WWD1 A, Wavelength=245 nm

| RetTime<br>(min) | Type | Area<br>[mAU*s] | Amt/Area   | Amount<br>mg/Portion | Grp | Name            |
|------------------|------|-----------------|------------|----------------------|-----|-----------------|
| 6.686            | RR   | 1475.14966      | 2.73193e-2 | 40.30000             |     | ACIDO ASCORBICO |

Totals : 40.30000

\*\*\* End of Report \*\*\*

Instrument 1 6/26/2017 10:07:03 AM MARIA ANDREINA PERNIA

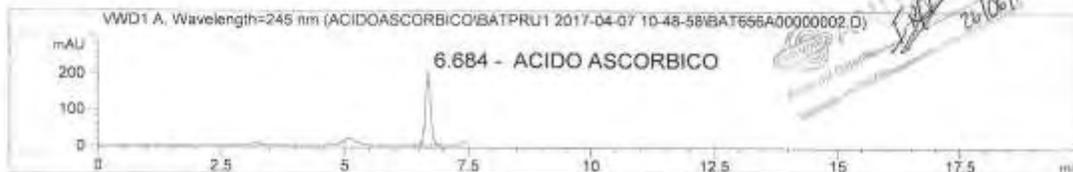
Page 1 of 1

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\BAT656A00000002.D  
 Sample Name: PATRON

```

=====
Acq. Operator   : MARIA ANDREINA PERNIA           Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                    Location  : Vial 1
Injection Date  : 4/7/2017 11:02:07 AM           Inj       :    2
                                                Inj Volume: 50.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\
                ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 4/7/2017 10:48:57 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 6/26/2017 9:56:10 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
                (modified after loading)
Method Info     : COLUMNNA LUNA C-18 Su 250 x 4,6mm, FLUJO:0.8mL/min. TEMPERATURA:25
                GRADOS CENTIGRADOS, LONGITUD DE ONDA:245nm, PRESION: 136 Bar VOLUMEN
                DE INYECCION:50uL, , CROMATOGRAFO AGILENT 1260 N° 07
                FASE MOVIL : BUFFER FOSFATO (100%)

Sample Info     : DETERMINACION DE ACIDO ASCORBICO
                ESTANDAR DE REFERENCIA: ACIDO ASCORBICO
                LOTE FABRICANTE: DY0261511454
                FECHA DE VENCIMIENTO: 29/10/2018
                PUREZA: 99,98%
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 6/26/2017 9:56:10 AM
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area   | Amount mg/Portion | Grp | Name            |
|---------------|------|--------------|------------|-------------------|-----|-----------------|
| 6.684         | BB   | 1475.83313   | 2.73193e-2 | 40.31867          |     | ACIDO ASCORBICO |
| Totals :      |      |              |            | 40.31867          |     |                 |

\*\*\* End of Report \*\*\*

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10:48-58\BAT656A00000003.D  
 Sample Name: PATRON

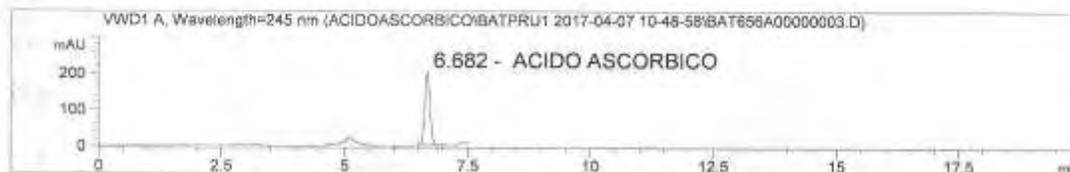
```

=====
Acq. Operator   : MARIA ANDREINA PERNIA                Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                        Location  : Vial 1
Injection Date  : 4/7/2017 11:12:52 AM                 Inj       :    3
                                                Inj Volume : 50.0 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10:48-58\
                  ACIDOASCORBICO.M
Last changed   : 4/7/2017 10:48:57 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACIDOASCORBICO.M
Last changed   : 6/26/2017 9:56:10 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
                  (modified after loading)
Method Info    : COLUMNNA LUNA C-18 Su 250 x 4,6mm, FLUJO:0.8µL/min. TEMPERATURA:25
                  GRADOS CENTIGRADOS, LONGITUD DE ONDA:245nm, PRESION: 136 Bar VOLUMEN
                  DE INYECCION:50µL, , CROMATOGRAPHO AGILENT 1260 N° 07
                  FASE MOVIL : BUFFER FOSFATO (100%)

Sample Info    : DETERMINACION DE ACIDO ASCORBICO
                  ESTANDAR DE REFERENCIA: ACIDO ASCORBICO
                  LOTE FABRICANTE: DY0261511454
                  FECHA DE VENCIMIENTO: 29/10/2018
                  PUREZA: 99,98%
    
```

ANULADO  
 26/06/17



External Standard Report

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 6/26/2017 9:56:10 AM
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area   | Amount mg/Porcion | Grp | Name            |
|---------------|------|--------------|------------|-------------------|-----|-----------------|
| 6.682         | BB   | 1471.20313   | 2.73193e-2 | 40.19218          |     | ACIDO ASCORBICO |

Totals : 40.19218

\*\*\* End of Report \*\*\*

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRUI 2017-04-07 10-48-58\BAT656A00000004.D  
 Sample Name: PATRON

```

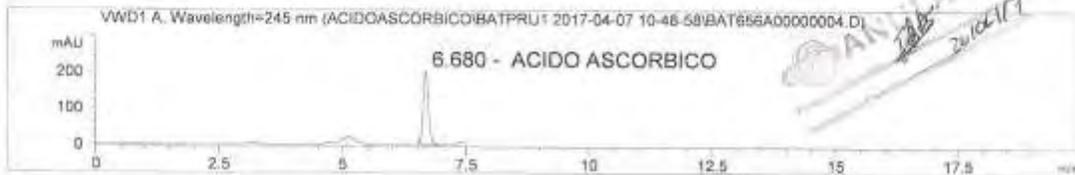
=====
Acq. Operator   : MARIA ANDREINA PERNIA      Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1               Location  : Vial 1
Injection Date  : 4/7/2017 11:23:36 AM      Inj       :    4
                                                Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRUI 2017-04-07 10-48-58\
                  ACIDOASCORBICO.M

Last changed    : 4/7/2017 10:48:57 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 6/26/2017 9:56:10 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
                  (modified after loading)

Method Info     : COLUMNNA LUNA C-18 5µ 250 x 4,6mm, FLOJO:0.8mL/min. TEMPERATURA:25
                  GRADOS CENTIGRADOS, LONGITUD DE ONDA:245nm, PRESION: 136 Bar VOLUMEN
                  DE INYECCION:50uL, , CROMATOGRAFO AGILENT 1260 N° 07
                  FASE MOVIL : BUFFER FOSFATO (100%)

Sample Info     : DETERMINACION DE ACIDO ASCORBICO
                  ESTANDAR DE REFERENCIA: ACIDO ASCORBICO
                  LOTE FABRICANTE: DY0261911454
                  FECHA DE VENCIMIENTO: 29/10/2018
                  PUREZA: 99,98%
    
```



External Standard Report

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 6/26/2017 9:56:10 AM
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area   | Amount mg/Portion | Grp | Name            |
|---------------|------|--------------|------------|-------------------|-----|-----------------|
| 6.680         | BB   | 1468.87415   | 2.73193e-2 | 40.12856          |     | ACIDO ASCORBICO |

Totals : 40.12856

\*\*\* End of Report \*\*\*

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\BAT656A00000005.D  
 Sample Name: PATRON

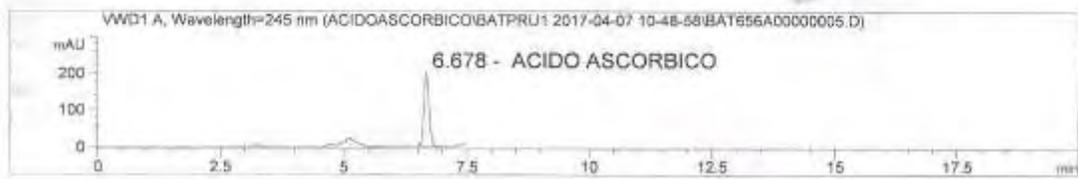
```

=====
Acq. Operator   : MARIA ANDREINA PERNIA             Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                      Location  : Vial 1
Injection Date  : 4/7/2017 11:34:22 AM              Inj       :    5
                                                    Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\
                  ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 4/7/2017 10:48:57 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 6/26/2017 9:56:10 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
                  (modified after loading)
Method Info     : COLUMNNA LUNA C-18 5µ 250 x 4,6mm, FLUJO:0.8mL/min, TEMPERATURA:25
                  GRADOS CENTIGRADOS, LONGITUD DE ONDA:245nm, PRESION: 136 Bar VOLUMEN
                  DE INYECCION:50µL, , CROMATOGRAMO AGILENT 1260 N° 07
                  FASE MOVIL = BUFFER FOSFATO (100%)

Sample Info     : DETERMINACION DE ACIDO ASCORBICO
                  ESTANDAR DE REFERENCIA: ACIDO ASCORBICO
                  LOTE FABRICANTE: DY0261511454
                  FECHA DE VENCIMIENTO: 29/10/2018
                  PUREZA: 99,98%
    
```


 ANULADO  
 26/06/17



External Standard Report

```

Sorted By       :      Signal
Calib. Data Modified :      6/26/2017 9:56:10 AM
Multiplier:     :      1.0000
Dilution:       :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area   | Amount mg/Portion | Grp | Name            |
|---------------|------|--------------|------------|-------------------|-----|-----------------|
| 6.678         | BB   | 1465.72473   | 2.73193e-2 | 40.06984          |     | ACIDO ASCORBICO |

Totals : 40.06984

\*\*\* End of Report \*\*\*

Instrument 1 6/26/2017 10:07:28 AM MARIA ANDREINA PERNIA

Page 1 of 1

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\BAT656A00000006.D  
 Sample Name: MUESTRA 1

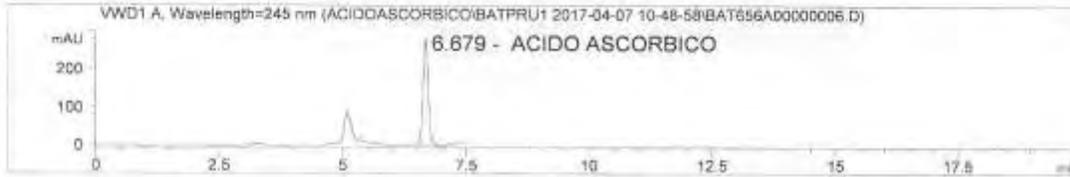
```

=====
Acq. Operator   : MARIA ANDREINA PERNIA          Seq. Line : 2
Acq. Instrument : Instrument 1                   Location  : Vial 2
Injection Date  : 4/7/2017 11:45:14 AM           Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\
                ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 4/7/2017 10:48:57 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 6/26/2017 9:56:10 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
                (modified after loading)
Method Info     : COLUMNA LUNA C-18 Su 250 x 4,6mm, FLUJO:0.8mL/min. TEMPERATURA:25
                GRADOS CENTIGRADOS, LONGITUD DE ONDA:245nm, PRESION: 136 Bar VOLUMEN
                DE INYECCION:50µL, , CROMATOGRAFO AGILENT 1260 N° 07
                FASE MÓVIL : BUFFER FOSFATO (100%)

Sample Info     : MEZCLA EN POLVO PARA BATIDO NUTRICIONAL FORMULA 1 GALLE
                TA Y CREMA x 550g
                LOTE: G86692A00
                PRODUCTO TERMINADO
  
```

ANULADO  
 2/16/17



External Standard Report

```

Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : 6/26/2017 9:56:10 AM
Multiplier          : 0.1808
Dilution            : 1.2500
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area   | Amount mg/Porcion | Grp | Name            |
|---------------|------|--------------|------------|-------------------|-----|-----------------|
| 6.679         | BB   | 2026.01758   | 2.73193e-2 | 12.51206          |     | ACIDO ASCORBICO |

```
Totals :                               12.51206
```

\*\*\* End of Report \*\*\*

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\BAT656A00000007.D  
Sample Name: MUESTRA 1

=====

Acq. Operator : MARIA ANDREINA PERNIA                     Seq. Line : 2  
 Acq. Instrument : Instrument 1                            Location : Vial 2  
 Injection Date : 4/7/2017 11:56:06 AM                   Inj : 2  
   Inj Volume : 50.0 µl

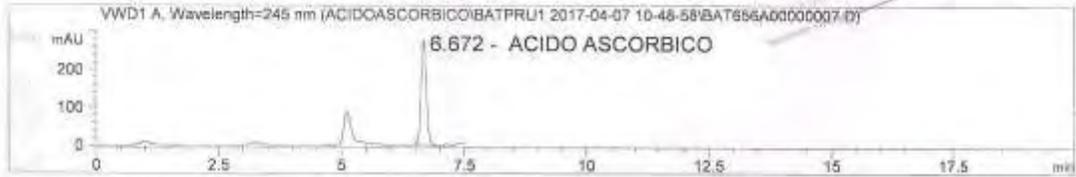
Acq. Method : C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\  
 ACIDOASCORBICO.M

Last changed : 4/7/2017 10:48:57 AM by MARIA ANDREINA PERNIA  
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACIDOASCORBICO.M  
 Last changed : 6/26/2017 9:56:10 AM by MARIA ANDREINA PERNIA  
 (modified after loading)

Method Info : COLUMNNA LUNA C-18 5µ 250 x 4,6mm, FLUJO:0.8mL/min. TEMPERATURA:25  
 GRADOS CENTIGRADOS, LONGITUD DE ONDA:245nm, PRESION: 136 Bar VOLUMEN  
 DE INYECCION:50µL, CROMATOGRAFO AGILENT 1260 N° 07  
 FASE MOVIL : BUFFER FOSFATO (100%)

Sample Info : MEZCLA EN POLVO PARA BATIDO NUTRICIONAL FORMULA 1 GALLE  
 TA Y CREMA x 550g  
 LOTE: G86692A00  
 PRODUCTO TERMINADO

=====



External Standard Report

Sorted By : Signal  
 Calib: Data Modified : 6/26/2017 9:56:10 AM  
 Multiplier: : 0.1808  
 Dilution: : 1.2500  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area   | Amount mg/Porcion | Grp Name        |
|---------------|------|--------------|------------|-------------------|-----------------|
| 6.672         | BB   | 2033.44702   | 2.73193e-2 | 12.55794          | ACIDO ASCORBICO |

Totals :                                     12.55794

\*\*\* End of Report \*\*\*

Data File C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\BAT656A00000008.D  
Sample Name: MUESTRA 1

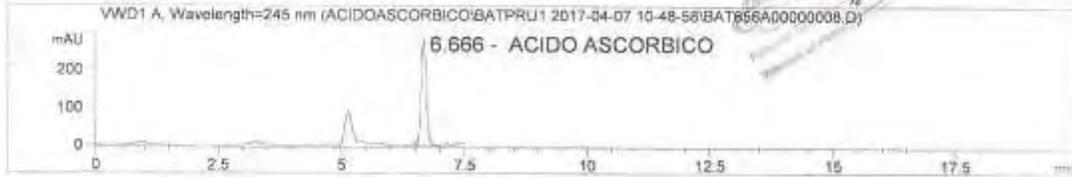
```

=====
Acq. Operator   : MARIA ANDREINA PERNIA           Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1                      Location  : Vial 2
Injection Date  : 4/7/2017 12:06:59 PM             Inj       :    3
                                           Inj Volume: 50.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\ACIDOASCORBICO\BATPRU1 2017-04-07 10-48-58\
                  ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 4/7/2017 10:48:57 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ACIDOASCORBICO.M
Last changed    : 6/26/2017 9:56:10 AM by MARIA ANDREINA PERNIA
                  (modified after loading)
Method Info     : COLUMN LUNA C-18 5µ 250 x 4,6mm, FLUJO:0.8ml/min. TEMPERATURA:25
                  GRADOS CENTIGRADOS, LONGITUD DE ONDA:245nm, PRESION: 136 Bar VOLUMEN
                  DE INYECCION:50µL, CROMATOGRAFO AGILENT 1260 N° 07
                  FASE MOVIL : BUFFER FOSFATO (100%)

Sample Info     : MEZCLA EN POLVO PARA BATIDO NUTRICIONAL FORMULA 1 GALLE
                  TA Y CREMA x 550g
                  LOTE: G86692A00
                  PRODUCTO TERMINADO
=====

```



External Standard Report

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : 6/26/2017 9:56:10 AM
Multiplier     : 0.1808
Dilution       : 1.2500
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=245 nm

| RetTime [min] | Type | Area [mAU*s] | Amt/Area   | Amount [mg/Porcion] | Grp | Name            |
|---------------|------|--------------|------------|---------------------|-----|-----------------|
| 6.666         | BB   | 2043.93530   | 2.73193e-2 | 12.62271            |     | ACIDO ASCORBICO |

```

Totals :                               12.62271

```

\*\*\* End of Report \*\*\*