



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN PARA VALORACIÓN
DE VITAMINA C EN JUGOS CITRICOS MEDIANTE HPLC PARA LA
FACULTAD DE CIENCIAS-ESPOCH.”

TRABAJO DE TITULACIÓN:

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

QUÍMICO

AUTOR: ALAN NIKOLAIV BALSECA GRANDA

DIRECTOR: PhD. CARLOS PILAMUNGA CAPUS

RIOBAMBA - ECUADOR

2019

2019, Alan Nikolaiv Balseca Granda

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo de Proyecto de Investigación, **DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE VALIDACIÓN PARA VALORACIÓN DE VITAMINA C EN JUGOS CITRICOS MEDIANTE HPLC PARA LA FACULTAD DE CIENCIAS-ESPOCH**, realizado por el señor: **ALAN NIKOLAIV BALSECA GRANDA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación. El mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Robert Cazar PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2019-10-23
Dr. Carlos Pilamunga Capus DIRECTOR		2019-10-23
Dra. Yolanda Díaz MIEMBRO DE TRIBUNAL		2019-10-23

Riobamba, 15 de junio del 2019

Yo, ALAN NIKOLAIV BALSECA GRANDA, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Alan Nikolaiv Balseca Granda

CI: 060488600-2

DEDICATORIA

A mis padres que fueron pilares fundamentales en mi proceso de aprendizaje, a mis maestros que aportaron con sus enseñanzas y experiencias para mis metas a futuro

AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento a los profesores de la Facultad de Ciencias por brindarme la sabiduría necesaria para completar mi profesión.

A mis padres y abuelos por su incesante aliento para seguir adelante.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xivv
SUMMARY.....	xv

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Identificación del problema	3
1.3. Justificación del problema	4
1.4. Objetivos de la Investigación	4
1.4.1. Objetivo General	4
1.4.2. Objetivos Específicos.....	5
1.5. Antecedentes de la Investigación.....	5
1.6. Validación	6
1.7. Desarrollo de los parámetros de Validación	7
1.8. Vitamina C	9
1.9. Hipótesis y variables	9
1.9.1. Hipótesis General.....	9
1.10. Identificación de Variables	10
1.10.1. Variable Dependiente.....	10
1.10.2. Variable Independiente	10

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO.....	11
2.1. Método para la determinación de Vitamina C (Ácido L-Ascórbico).....	11
2.2. Materiales, equipos y reactivos	12
2.2.1. Materiales.....	12
2.2.2. Equipos.....	12

2.2.3.	Reactivos.....	13
2.3.	Metodología.....	13
2.4.	Preparación de Soluciones.....	13
2.4.1.	Preparación de fase móvil (H ₃ PO ₄ a 0.05 M).....	13
2.4.2.	Preparación de la Solución Madre.....	13
2.4.3.	Preparación de los Puntos de Estándar.....	14
2.5.	Preparación de la muestra y los fortificados.....	14
2.6.	Condiciones del equipo e interpretación del cromatograma.....	15
2.6.1.	HPLC.....	15
2.6.2.	Cromatograma.....	15
2.6.3.	Interpretación del Cromatograma.....	15
2.7.	Validación del método.....	16
2.8.	Parámetros de Validación.....	17
2.8.1.	Linealidad.....	17
2.8.2.	Límite de Detección.....	20
2.8.3.	Límite de Cuantificación.....	20
2.8.4.	Precisión.....	21
2.8.5.	Repetibilidad.....	23
2.8.6.	Reproducibilidad.....	23
2.9.	Estadístico.....	24
2.10.	Exactitud del método.....	24
2.11.	Incertidumbre.....	25

CAPITULO VI

3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	29
3.1.	Linealidad.....	29
3.2.	Límite de detección (LD).....	35
3.3.	Límite de cuantificación (LC).....	36
3.4.	Rango de trabajo validado.....	36
3.5.	Precisión.....	36
3.6.	Análisis de varianza.....	39
3.7.	Exactitud del método.....	42
3.8.	Incertidumbre.....	45

3.8.1. Identificación	46
3.8.2. Cuantificación	46
3.8.3. Combinación	47
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Puntos de medición de fortificados para validación	15
Tabla 2-2: Puntos de medición para 6 niveles de estándares	15
Tabla 3-2. Modelo de estimación lineal	16
Tabla 4-2. Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para estándares.....	19
Tabla 5-2. Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para fortificados	19
Tabla 6-2. Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para muestras	19
Tabla 7-2. Modelo de análisis de varianza	20
Tabla 1-3. Datos de curvas de calibración por triplicado en cinco días del experimento..	26
Tabla 2-3. Estimación lineal global.....	30
Tabla 3-3. Límites de aceptación de criterio para cada punto de estándar.....	30
Tabla 4-3. Concentración de fortificados de Ácido L-Ascórbico por nivel en los cinco días.....	32
Tabla 5-3. Resumen de promedio, coeficientes y desviaciones estándar para reproducibilidad y repetibilidad para fortificados.....	34
Tabla 6-3. Concentración de Ácido L-Ascórbico en tres muestras por nivel en los cinco días.....	34
Tabla 7-3. Resumen de promedio, coeficientes y desviaciones estándar para reproducibilidad y repetibilidad para muestras.....	34
Tabla 8-3. Análisis de Varianza ANOVA. Primer fortificado.....	34
Tabla 9-3. Análisis de Varianza ANOVA. Segundo fortificado.....	34
Tabla 10-3. Análisis de Varianza ANOVA. Tercer fortificado.....	35
Tabla 11-3. Comparación de valores F calculados y F críticos para fortificados.....	35
Tabla 12-3. Análisis de varianza ANOVA. Muestra 1.....	35
Tabla 13-3. Análisis de varianza ANOVA. Muestra 2.....	35
Tabla 14-3. Análisis de varianza ANOVA. Muestra 3.....	36
Tabla 15-3. Comparación de valores F calculados y F críticos para muestras.....	36
Tabla 16-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del primer día.....	36
Tabla 17-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del segundo día.....	37
Tabla 18-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del tercer día.....	37

Tabla 19-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del cuarto día.....	38
Tabla 20-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del quinto día.....	38
Tabla 21-3. Incertidumbres ocupadas durante la validación.....	39
Tabla 22-3. Incertidumbre del material volumétrico utilizado en la validación.....	40
Tabla 23-3. Incertidumbre combinada de los puntos de estándar.....	41
Tabla 24-3. Incertidumbre típica combinada de puntos de estándar en concentración de muestra.	
Tabla 25-3. Cálculo de incertidumbre combinada para punto fortificado.....	41
Tabla 26-3. Incertidumbre expandida del método para puntos de fortificado y porcentaje de incertidumbre.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-2. Etapas para el cálculo de incertidumbre.....	22
Figura 2-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 1.....	27
Figura 2-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 2.....	27
Figura 3-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 3.....	28
Figura 4-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 4.....	28
Figura 5-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 5.....	29
Figura 6-3. Calibración Ácido L-Ascórbico GLOBAL.....	29

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A CROMATOGRAMAS DE ESTÁNDARES

ANEXO B CERTIFICADOS DE CALIBRACIÓN

ANEXO C CERTIFICADO DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO

ANEXO D MÉTODO DESARROLLADO PARA EL LABORATORIO DE CIENCIAS

ANEXO E FOTOS

RESUMEN

La validación de un método analítico es la clave para el desarrollo de ensayos confiables y reproducibles dentro del área de la Química, para lograr desarrollar la validación se utilizó el Método IFU No. 17a, 2005, siendo reajustada para trabajar dentro del laboratorio en condiciones estables para vitamina C conocido como ácido L-ascórbico. El método desarrollado por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) tiene una respuesta lineal con un coeficiente de correlación de $r= 0.995$ para cada una de las curvas de calibración. El límite de detección es igual a 1.0221 mg/L y el límite de cuantificación igual a 5 mg/L. El rango de trabajo determinado para la curva se encuentra desde 5 hasta 25 ppm para la concentración de Vitamina C (Acido L Ascórbico). El rango de validación en fortificado empleado consiste de 15, 20 y 25 ppm para la concentración de Vitamina C en dilución con fase móvil. El coeficiente de variación para cada fortificado fue menor al 2% para reproducibilidad y repetibilidad. El % de recuperación establecido desde 90 hasta 110% para cada uno de los niveles de fortificado. La incertidumbre combinada y expandida del método para los niveles de concentración utilizados es menor al 8%. El criterio de aceptación empleado para la incertidumbre fue menor al 30%, dando el valor anterior de incertidumbre como aceptable y de esta manera se cumple el objetivo de validación.

Palabras claves: QUIMICA, VITAMINA C, ÁCIDO L ASCÓRBICO, CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC), MÉTODO ANALÍTICO, ANÁLISIS CUANTITATIVO, PARÁMETROS DE VALIDACIÓN



SUMMARY

The validation of an analytical method is the key to the development of reliable and reproducible tests within the area of Chemistry, to achieve the validation method IFU # 17a, 2005 was used, being readjusted to work within the laboratory in stable conditions for vitamin C known as L-ascorbic acid. The method developed by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) has a linear response with a correlation coefficient of $r = 0.995$ for each of the calibration curves. The detection limit is equal to 1.0221 mg / L and the quantification limit equal to 5 mg / L. The determined working range for the curve is from 5 to 25 ppm for the concentration of Vitamin C (Ascorbic Acid L). The fortification validation range used consists of 15, 20 and 25 ppm for the concentration of Vitamin C in dilution with mobile phase. The coefficient of variation for each fortified was less than 2% for reproducibility and repeatability. The % recovery established from 90 to 110% for each of the fortified levels. The combined and expanded uncertainty of the method for the concentration levels used is less than 8%. The acceptance criterion used for the uncertainty was less than 30%, giving the previous value of uncertainty as acceptable and in this way the validation objective is met.

Keywords: CHEMISTRY, VITAMIN C, ASCORBIC ACID, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC), ANALYTICAL METHOD, QUANTITATIVE ANALYSIS, VALIDATION PARAMETERS



INTRODUCCIÓN

La validación de métodos analíticos, juntos con otro tipo de actividades ha trabajado en el aseguramiento de la calidad, y permite otorgar confianza y viabilidad a resultados obtenidos de análisis que se realizan dentro de un laboratorio o universidad. El desarrollo de estos métodos implica contener metodologías que contenga las especificaciones de normativas a nivel mundial. Debido a esto la Facultad de Ciencias y a su vez el laboratorio de investigación pretende tomar en consideración normativas nacionales como internacionales para el desarrollo de métodos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

La validación de un método es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.(ICONTEC, 2005, p. 5), es por ello que dentro de la Facultad de Ciencias-ESPOCH se pretende desarrollar dichas metodologías para un mejor entendimiento de sus estudiantes hacia el futuro.

La cromatografía separa en forma de elución el o los analitos, impulsando dentro de una columna por medio de una fase móvil hacia un detector (SWADESH, 1998, p. 22). La técnica de cromatografía líquida se emplea con más frecuencia para determinar Vitamina C, esto debido a la baja estabilidad. (BARBANY, J: CASIMIRO, 2004, p. 1–3).

La vitamina C (Ácido L-Ascórbico) es una sustancia blanca cristalina, soluble en agua que tiende a oxidarse con facilidad.(FAO, 2002). Es un tipo de vitamina termolábil, a la cual la luz no la afecta pero el exceso de calor la descompone hasta destruirla. También es un tipo de vitamina que el cuerpo no puede producirla y se debe consumir dentro de la dieta, ya sea por frutas o suplementos vitamínicos.(BARBANY, J: CASIMIRO, 2004, p. 3). Se la puede encontrar la mayoría de frutas, hortalizas y diversos tipos de hojas, el consumo de una naranja al día sería la forma más fácil de mantener los niveles de vitamina C estables dentro del cuerpo.

Las vitaminas en general son indispensables en los procesos metabólicos, porque de estos empieza la nutrición para el organismo de un ser vivo. El déficit de Vitamina C dentro del organismo puede llegar a ocasionar el escorbuto, aunque esta no es una enfermedad

predominante su tratamiento es complicado, es por ello que se necesita la ingesta diaria de al menos 25 mg para mantener los niveles estables. (FAO, 2002, p. 66)

La detección de Vitamina C se logra a través de una longitud de onda baja dentro del rango del ultra/violeta, y manteniendo a temperatura ambiente el detector. Se debe tener el mayor cuidado posible al momento de obtener los picos y áreas para este compuesto, por su rápida degradación a exceso de temperatura se debe controlar la solución madre y de igual forma los puntos de estándar, permitiendo que los resultados se mantengan confiables y reproducibles para la validación.

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo fundamental validar un método que permite la determinación de Vitamina C (Ácido L-Ascórbico) en jugos cítricos de naranja, limón y mandarina en el laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias-ESPOCH. Para ello se desarrollaron los siguientes parámetros: linealidad, precisión, exactitud, robustez, límite de detección, límite de cuantificación y cálculo de incertidumbres.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Planteamiento del problema

La falta de nuevas prácticas de laboratorio para determinar la concentración de vitaminas hidrosolubles (Vitamina C y Complejo B) de manera confiable, introdujo a la Facultad de Ciencias-ESPOCH en la búsqueda dentro sus laboratorios de nuevas alternativas para obtener resultados confiables en laboratorios certificados, logrando desarrollar metodologías validadas dentro del campo de interés investigativo mediante trabajos de titulación, donde los estudiantes aplican todos los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera.

1.2. Identificación del problema

El Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN), en su Reglamento Sustitutivo de Elaboración de jugos cítricos, y según la norma ISO 9001, donde adopta los parámetros que rigen un sistema de calidad, especificando los requisitos necesarios para cumplir cada uno de ellos, declara que este reglamento debe ser de cumplimiento obligatorio para la elaboración de insumos cítricos, cumpliendo en la fabricación, almacenamiento como producto terminado, y una concentración mínima de Vitamina C en su contenido.

La Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en cumplimiento de sus funciones para replicar técnicas de laboratorio e impartir conocimiento a sus estudiantes debe tener validados los parámetros como requisito fundamental de calidad para poder replicarlas con éxito, dentro de los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad posibles.

Para lograr cuantificar un activo de una determinada formulación que ha sido elaborado por una empresa o a su vez de forma artesanal, es necesario la utilización de métodos

analíticos que satisfagan los requisitos establecidos, en este caso por las normas CODEX STAN 247-2005, donde especifica las normas generales para zumos (jugos), néctares de frutas y los distintos métodos para realizar los ensayos, que proporcionen resultados válidos, para ello estos métodos usados deben ser normalizados, es decir, los que están establecidos por organismos reconocidos, o a su vez desarrollando métodos nuevos por los laboratorios o métodos normalizados que fueron cambiados para lograr cumplir los requisitos de validación.

1.3. Justificación del problema

La Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo al no contar con personal dedicado netamente en validaciones, y no poseer técnicas de laboratorio donde sus parámetros de validación sean normalizados, se ha visto en la necesidad de plantear a los estudiantes que realicen estos procesos, tomando en cuenta para el proceso de validación que necesitan mucho tiempo para desarrollarlos.

Mediante la determinación de parámetros de validación se deberá contar con la documentación y evidencia objetiva necesaria para que un método o una técnica cumplan con los requisitos para una aplicación específica, así como la determinación de las fuentes de variabilidad y de incertidumbre que pueden afectar a su realización.

La determinación de parámetros de validación de un método analítico principalmente se enfoca en controlar el funcionamiento combinado de dicho método en conjunto con el equipo y los procedimientos de análisis, siendo necesario tener equipos calificados, calibrados y de la misma forma el personal encargado en desarrollar la técnica debe justificar estar capacitado para realizar los procedimientos necesarios, y al final obtener resultados fiables y tomar decisiones correctas del proceso.

1.4. Objetivos de la Investigación

1.4.1. *Objetivo General*

- Determinar los parámetros de validación para valoración de vitamina C de jugos cítricos mediante HPLC.

1.4.2. *Objetivos Específicos*

- Analizar por estadísticos si existe el cumplimiento de las especificaciones en base a la norma CODEX STAN 247-2005 tanto en el método como para el jugo cítrico.
- Comparar los resultados obtenidos con una muestra estándar o patrón para obtener mayor confianza del método.
- Establecer un protocolo de validación del método analítico para determinar la concentración presente de Vitamina C en el jugo cítrico por HPLC.

1.5. *Antecedentes de la Investigación*

La validación de métodos analíticos, han trabajado en el aseguramiento de la calidad, utilizando en conjunto métodos químicos y estadísticos permitiendo otorgar confianza y viabilidad a resultados obtenidos en diferentes análisis.

Estudios realizados en Cuba en el año 1999 sobre validaciones de vitaminas hidrosolubles presentan resultados excelentes por HPLC, controlando la estabilidad de cada uno de los parámetros a validar. El método utilizado obtuvo resultados satisfactorios y se comprobó la validez del método analítico para 3 tipos de vitaminas (PASTEELNICK, 2006, p. 23).

En otras investigaciones posteriores en el año 2006 se validó un método analítico para determinar 3 vitaminas (A, C y D en un suplemento alimenticio, utilizando HPLC y una columna RP-18 de 25 cm, realizando un cambio a la técnica establecida, colocado un detector de UV-Visible, gracias a ello establecieron la mejor longitud de onda para cada vitamina, desarrollando con confianza cada uno los parámetros de validación, entre ellos linealidad, exactitud, precisión, selectividad, límites de detección. (MARCEL, 1989, p. 11).

En empresas de alimentos y farmacéuticas se ha realizado varios estudios de validaciones analíticas, cada uno de ellos cuenta con métodos validados o métodos a los cuales se agregaron nuevos pasos o nuevos equipos para mejorar su funcionabilidad. En 2008 en una empresa Farmacéutica de Estados Unidos se validó un método analítico, mucho más sencillo y rentable que permitía controlar la calidad de cualquier producto con presencia

de vitaminas del complejo B. Utilizando espectrometría ultravioleta, teniendo resultados precisos y exactos en el intervalo de concentraciones validadas (SOUCCAR, 2001, p. 176).

El desarrollo de métodos analíticos validados dentro del país, en la Universidad Central del Ecuador, se estudió en el año 2015 un tipo de harina fortificada con vitamina B1 por HPLC, donde la técnica garantizar la seguridad y calidad de los resultados, se realizó el estudio porque la deficiencia de tiamina (Vitamina B₁) dentro del organismo presenta problemas adversos para la salud, es por ello que al asegurar cada uno de los parámetros se obtuvo un minucioso estudio donde se cumplió con una mayoría del 90% de los objetivos establecidos. (GONZALES, 2006, p. 59)

Departamentos de control de Calidad en la Ciudad de México, emprendieron un trabajo de validación el cual les tomo 6 meses, utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y un detector ultravioleta, con el fin de obtener un protocolo de validación propio de la Institución y el laboratorio, el estudio fue sobre Losartán potásico, los resultados obtenidos mediante esta técnica fueron ampliamente satisfactorios porque la muestra y el patrón utilizado fueron aptos para tener conclusiones ideales para el trabajo (PEÑA, 1997, p. 121).

Dentro de la Facultad de Ciencias-ESPOCH, existen algunos estudios acerca de validaciones pero ninguno es acerca de vitaminas en alimentos, están dirigidos hacia productos farmacéuticos como RETINOL o SULFAMETOXAZOL, en los cuales se utilizó un método similar para validar la concentración de los productos por medio de HPLC, donde se obtuvieron parámetros con altos estándares de calidad, se utilizaron varios estadísticos para poder determinar las concentraciones de los analitos en los productos farmacéuticos y sus distintos estudios contribuyeron al crecimiento de las áreas de cromatografía en distintas empresas (SUAREZ, 2015, p. 89).

1.6. Validación

La Validación se fundamenta en documentar, especificar, implementar y aprobar un proceso, en el cual se verifica que los resultados proporcionados por un determinado método son confiables, para poder comprobar estos datos se deben realizar análisis

estadísticos con los que se comprueba si el método cumple con sus especificaciones y fines esperados. De acuerdo a las normas que rigen la calidad para distintos métodos, se podrían tener varios resultados al igual que varios objetivos a buscar al final del proceso. La definición analítica más empleada, explica que la principal evidencia es la generación de trazabilidad documental para que procedimiento analítico obtenga resultados viables en un tiempo determinado, y se encuentre cumpliendo con las especificaciones deseadas para mantener la calidad del método. (BARAHONA, 2011, p. 47)

Para realizar una validación se debe tener en claro el propósito o finalidad por el que se desea realizar este procedimiento y de este propósito es donde se verificaría el cumplimiento del método para replicarlo a futuro. Al realizar los distintos análisis para validar el método se tendrán resultados para inferir sobre los objetivos planteados. Validar una metodología analítica engloba un conjunto de actividades que aseguran la veracidad de los datos y la calidad de los mismos, lo que le permite al método, analista y laboratorio donde se desarrolló una confianza para trabajos posteriores.

1.7. Desarrollo de los parámetros de Validación

Los parámetros son fundamentales en el desempeño de la validación de un método analítico, porque indica la calidad que contiene el mismo mediante las características o cuantificaciones del método.

El análisis debe contener varios ensayos, así como también el número de análisis que se van a realizar especificados en el protocolo de validación.

Los parámetros de validación son los siguientes:

- Selectividad
- Linealidad
- Precisión
- Exactitud

- Límite de detección y cuantificación
- Robustez
- Incertidumbre

Selectividad. Determina el grado en el que un método cuantifica al analito en presencia de interferencias, y que la señal en la etapa de medición es solo del analito de interés y no de ningún otro agente que puede causar interferencias. La selectividad dependerá de la efectividad de la etapa de medición. (BIEVRE et al., 2005, p. 55)

Linealidad. Determina la capacidad del método analítico empleado para generar una respuesta proporcional a la cantidad de analito que se determinara en la muestra y la concentración de la misma dentro de un rango establecido. También establece como criterio de aceptación el coeficiente de correlación, indicando el grado de relación que tiene la variable X de la concentración y la variable Y que corresponde al factor respuesta del equipo. (MAROTO Y RUIZ, 2000, p. 12)

Precisión. Determina el grado de dispersión entre una serie de medidas desde la muestra dentro de las condiciones prescritas, es decir mide la capacidad de un método para dar resultados proximales entre cada medida. (COY, 1999, p. 23)

Exactitud. Determina el grado de concordancia o proximidad entre el resultado del método y el valor de referencia. (GIBBONS, 2003, p. 12)

Límite de Detección. Determina la concentración más pequeña del analito que puede ser obtenida por el método en condiciones confiables, cuando se realicen mediciones en trazas del analito, pero esto puede llevar a errores de precisión y exactitud. (ZHAO, 2006, p. 14)

Robustez. Determina la fiabilidad o estabilidad del método en condiciones normales, definida también como la capacidad de un método analítico para no ser alterado por variaciones intencionales de los parámetros en la técnica. Para poder determinar este parámetro se deben establecer las condiciones en las que se replicarán los ensayos. (HIBBERT, 2005, p. 106)

Incertidumbre. Determina los efectos reconocidos que pueden intervenir en los resultados. (GONZALES, 2006, p. 11)

1.8. Vitamina C

La vitamina C, conocida como ácido L-ascórbico, es un nutriente hidrosoluble que se encuentra en ciertos alimentos. En el cuerpo actúa como antioxidante, al ayudar a proteger las células contra los daños causados por los radicales libres. A su vez estos son compuestos que se forman cuando el cuerpo convierte los alimentos que consumimos en energía. Las personas también están expuestas a los radicales libres presentes en el ambiente por el humo del cigarrillo, la contaminación del aire y la radiación solar ultravioleta.

Las vitaminas en general son indispensables en los procesos metabólicos, porque de estos empieza la nutrición para el organismo de un ser vivo. El déficit de Vitamina C dentro del organismo puede llegar a ocasionar el escorbuto, aunque esta no es una enfermedad predominante, su tratamiento es complicado, es por ello que se necesita la ingesta diaria de al menos 25 mg para mantener los niveles estables. (IFU No. 17a, 2005, p. 7)

El Ácido L-Ascórbico es necesario para mantener estable el colágeno dentro del organismo, también es indispensable para mantener una piel gruesa y saludable, esto debido que su ausencia podría ocasionar fragilidad en los tejidos. (FAO, 2002, p. 25). Su necesidad en la dieta diaria no es indispensable pero si necesario, porque el organismo no puede sintetizarlo por si solo y debe consumirse de suplementos vitamínicos o frutas. (BARBANY, J: CASIMIRO, 2004, p. 3)

1.9. Hipótesis y variables

1.9.1. *Hipótesis General*

- El estudio mediante HPLC demuestra que los parámetros de validación permiten valorar Vitamina C en jugos cítricos, comprobando que el método es reproducible y puede ser utilizado dentro de la Facultad de Ciencias-ESPOCH.

1.10. Identificación de Variables

1.10.1. *Variable Dependiente*

- Determinación de parámetros de validación en jugos cítricos en la Facultad de Ciencias-ESPOCH

1.10.2. *Variable Independiente*

- Valoración de Vitamina C mediante HPLC

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Método para la determinación de Vitamina C (Ácido L-Ascórbico).

La cromatografía como tal es un método muy efectivo utilizado para determinar y cuantificar Vitamina C en diversas matrices, estas pueden ser sueros, jugos, zumos, o matrices sólidas donde se encuentre presente. A parte de ello a nivel de laboratorio e industrias la cromatografía es una de las más empleadas por su afinidad para realizar análisis de moléculas de alto y bajo peso molecular, pero por sobre todo lograr mantener las condiciones estables para no degradar la molécula en el procedimiento de análisis.

Los métodos utilizados en la actualidad para determinar Vitamina C, han sufrido cambios debido a la inestabilidad por ser termolábil, pero también por sus dos presentaciones naturales que son ácido L-Ascórbico y ácido Deshidroascórbico, como es bien conocido la Vitamina C es la suma de estas dos presentaciones, porque si solo analizamos una de ellas se estaría determinando la concentración parcial conllevando a errores de cálculos de concentración finales. (GIARAUD, 2004, p. 73).

El uso de un HPLC en conjunto con un detector UV/VISIBLE permite desarrollar toda clase de métodos para detección de distintas moléculas de alto y bajo peso molecular, la clave de usar este tipo de detector es la diferencia entre la absorbancia de la luz por el analito y el solvente. Esto debido a que cada grupo funcional que contiene la molécula absorbe de forma fuerte o débil la luz incidente sobre él, los que absorben mucho más fuerte son los compuestos aromáticos, carbonílicos, entre ellos aldehídos esterés, cetonas y los muy débiles son azúcares alcoholes e hidrocarburos saturados. (SWADESH, 1998, p.14-15). Es por ello que se deben usar solventes para fase móvil que no interfieran con el analito y que su longitud de onda incidente sea distinta al mismo.

La cuantificación de Vitamina C por HPLC unido a un detector UV/VISIBLE le permite al método poder ser replicado con facilidad en cualquier laboratorio o universidad que cuente con un equipo de estas características. Obteniendo la cantidad de datos suficientes

y procesables para lograr validar el método. En una validación se debe demostrar estabilidad en la preparación de muestras en un tiempo determinado, y también el equipo debe arrojar datos confiables en los días que se realice el proceso, la necesidad de equipos, material de vidrio calibrado y estándares certificados es indispensable para el proceso. (HIBBERT, 2005, p. 6).

El método a validar consiste en el análisis de Vitamina C, utilizando ácido ortofosfórico diluido para lograr convertir el ácido Deshidroascórbico en ácido L-ascórbico y determinar la concentración total en una sola molécula. De esta manera no se llevaría a errores en cálculos futuros. (GIARAUD, 2004, p. 49).

2.2. Materiales, equipos y reactivos

2.2.1. *Materiales*

- Columna para HPLC C18 (15 x 4.6) mm 5 μ m
- Pipetas automáticas de 1 y 10 ml TOPSCIEN
- Viales para HPLC
- Filtros de jeringa PTFE de 0.45 μ m de 13 mm
- Balones de aforo de 25, 100, 500, 1000 ml
- Pipetas Pasteur de 6 mm
- Membranas de filtración PVDF DE 0.45 μ m

2.2.2. *Equipos*

- HPLC (SHIMADZU, USA FCV LC-10Ai)
- Software PEAK SIMPLE CHROMATOGRAPHY DATA SYSTEM (SRI MODEL 203)

- Detector UV/VISIBLE (SHIMADZU SPD-10 AVi)
- Baño María Ultrasonido Sonificador FC-L. INV-012.
- Bomba de vacío BOECO R-400 – FC-L INV-011

2.2.3. Reactivos

- Ácido Ortofosfórico (63%: GA)
- Estándar Certificado de Ácido L-Ascórbico (SIGMA ALDRICH, LOT # LRAB3631)
- Agua Grado II

2.3. Metodología

La metodología ocupada para desarrollar la validación fue el Método IFU N. 17, ajustado a las condiciones del HPLC actual, modificando la fase móvil. Esto debido a que se debe cambiar la fracción de Ácido Deshidroascórbico en Acido L-Ascórbico.

2.4. Preparación de Soluciones

2.4.1. Preparación de fase móvil (H_3PO_4 a 0.05 M)

La solución de fase móvil ocupada se preparó partiendo del ácido ortofosfórico al 63%, donde se tomaron 3.7 ml y se aforo hasta un litro en un balón de aforo de 1000 ml con agua bidestilada, o agua grado II, después se filtró por medio de una membrana PVDF de 0.45 μ m, se colocó en el recipiente destinado a contener la fase móvil, Se colocó al ultrasonido durante 15 minutos para desgasificar.

2.4.2. Preparación de la Solución Madre

En la balanza analítica, se pesó 0.0050 gramos de estándar de Ácido L-Ascórbico, se diluyo y aforó con fase móvil en un balón de 100 ml, para obtener una solución madre de

50 ppm, se colocó también papel aluminio para salvaguardar la solución. La Vitamina C al ser termolábil debe mantenerse en un ambiente estable sin altas variaciones de temperatura y dicha solución no puede usarse más de 4 horas después de su preparación.

2.4.3. Preparación de los Puntos de Estándar

A partir de la solución madre de 50 ppm, se tomaron 6 alícuotas de distintos volúmenes, 2.5, 3.5, 4.5, 6, 7.5, 12.5 ml, se aforo con fase móvil en balones de 25 ml, obteniendo puntos de estándar de 5, 7, 9, 12, 15 y 25 ppm respectivamente. Después de preparados fueron inyectados en el HPLC. Las soluciones estándar tienen el mismo tiempo de duración que la solución madre.

2.5. Preparación de la muestra y los fortificados

Se establecieron códigos para cada una de las muestras utilizadas para la validación, en este caso para 3 niveles de fortificados distintos y 3 tipos de muestras de jugos cítricos.

Las muestras fortificadas se realizaron partiendo de la solución madre, calculando la concentración de fortificado a añadir en una matriz la cual no contiene el analito, en este caso se utilizó un jugo de uva, se exprimieron de 10 a 20 ml aproximadamente, se tomó 10 ml del jugo de uva y utilizando la pipeta automática se fortificó con volúmenes de 1, 2, 5 ml de solución madre de ácido L-ascórbico, se aforó con fase móvil en un balón de 100 ml, para obtener la concentración de 5, 10 y 25 ppm respectivamente. Después se realizó el cálculo final a una conversión utilizando la dilución ocupada para obtener la concentración final de la muestra fortificada.

Después de obtener excelente resultados en los puntos de estándar y fortificados, se trabajó con tres tipos distintos de frutas cítricas, naranja, mandarina, limón, a cada fruta se exprimió de 10 a 15 ml de jugo, con una pipeta automática se tomó 10 ml de jugo cítrico y se llevó hasta 100 ml de fase móvil, haciendo el uso de la relación 1 en 10, después esta relación sería tomada para la conversión final y expresar los resultados en concentración de (mg/Kg).

2.6. Condiciones del equipo e interpretación del cromatograma.

2.6.1. HPLC

Las condiciones para trabajar dentro del equipo fue usar una columna C 18 debido a la afinidad de la molécula y la estabilidad de la fase móvil, se trabajó con una temperatura del horno de columna a 30 °C. Antes de iniciar el protocolo de validación se limpió la columna y el equipo durante toda la noche con una solución de fase móvil de Acetonitrilo/agua: 50/50. Para eliminar impurezas contenidas dentro del equipo y limpiar la columna. El flujo de fase móvil utilizado fue de a 1 ml/min, y el tiempo de corrida del cromatograma a 10 minutos, con esto se trabaja los 10 volúmenes que debe existir de limpieza entre inyecciones. El detector UV/VISIBLE se ajustó a una longitud de onda de 254 nm. Dentro del autosampler, se colocó un volumen de inyección de 20 µl, con un tiempo de limpieza de la aguja de inyección de 3 minutos.

2.6.2. Cromatograma

El equipo HPLC SHIMADZU, se encuentra conectado a un SWITCH CROMATOGRÁFICO, el cual permite enlazarse al Software, en el cual se obtienen los Cromatogramas, en el cual se muestra la corrida en curso en tiempo real y guardándose automáticamente los Cromatogramas. Se debe crear un método nuevo para el Software, de esta forma se facilita el trabajo entre días, en donde se ajusta tiempo final del cromatograma, tiempo de retención del analito, nombre del archivo y los parámetros de integración a ocupar. Para obtener resultados confiables del método, se verificó que el equipo tenga una línea base estable. Después de ello se inyectaron las muestras para empezar con la validación.

2.6.3. Interpretación del Cromatograma

El SWITCH CROMATOGRÁFICO permite integrar los valores obtenidos en el detector expresados en áreas, las cuales por medio de las curvas de calibración preparadas anteriormente se obtiene por regresión lineal los parámetros necesarios para calcular concentraciones de muestras ciegas, siendo las frutas ocupadas durante la validación y a su vez permite encontrar concentraciones de muestras con concentración

conocida en el caso de los fortificados. Dando como resultado final la concentración de ácido L-Ascórbico en mg/L de solución.

Tabla 1-2: Puntos de medición de fortificados para validación

Tratamiento	Código	Repeticiones	Días	Tamaño de Unidad Experimental (TUE)	(TUE) TOTAL
5 ppm	T1	3	5	2 ml	30 ml
10 ppm	T2	3	5	2 ml	30 ml
25 ppm	T3	3	5	2 ml	30 ml
				TOTAL	90 ml

Realizado por: Alan Balseca, 2019

2.7. Validación del método

La validación se realizó para una matriz de alimentos, en este caso jugos cítricos, se estableció para el experimento un diseño de mínimos cuadrados de un solo factor, con tres niveles de concentración con fortificados, siendo el nivel de 5 ppm el más bajo, 10 ppm el medio y 25 ppm el más alto en concentración para muestras.

Tabla 2-2: Puntos de medición para 6 niveles de estándares

Tratamiento	Código	Repeticiones	Días	Tamaño de Unidad Experimental (TUE)	(TUE) TOTAL
5 ppm	C1	5	5	2 ml	50 ml
7 ppm	C2	5	5	2 ml	50 ml
9 ppm	C3	5	5	2 ml	50 ml
12 ppm	C4	5	5	2 ml	50 ml
15 ppm	C5	5	5	2 ml	50 ml
25 ppm	C6	5	5	2 ml	50 ml
				TOTAL	300 ml

Realizado por: Alan Balseca. 2019

2.8. Parámetros de Validación

Los parámetros evaluados para el método fueron: linealidad, límite de cuantificación, límite de detección, reproducibilidad, precisión, incertidumbre.

2.8.1. Linealidad

Se corrieron 3 curvas de calibración por día, se determinó la ecuación de la recta obteniendo los valores de intercepto, pendiente y el coeficiente de correlación lineal de las variables, dando como criterio de aceptación si el valor es igual o mayor a $r \geq 0,995$ para cada día y un valor igual o mayor a $r \geq 0,99$ para una curva global.. La ecuación empleada para la estimación lineal del método fue la siguiente.

$$y = a + bx$$

Ec. 1

Donde:

y= Factor respuesta del equipo en áreas

x= Concentración (ppm) del estándar de Acido L-Ascórbico

b= Pendiente

a= Intercepto

Se prepararon 6 puntos de estándar de Vitamina C y analizados por HPLC, usando la ecuación de la recta se obtuvo la concentración a la función respuesta preparada para cada nivel de estándar. Dentro del Anexo A se muestran los cromatogramas obtenidos de las curvas. Los valores se utilizaron para graficar la curva de calibración realizada por triplicado durante 5 días en condiciones de reproducibilidad y repetibilidad.

Tabla 3-2. Modelo de estimación lineal

x	y= Lecturas obtenidas, factor respuesta del equipo				
Nivel de concentración (mg/L)	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
C1	Valores de los pares (X, Y) obtenido cada uno por triplicado en cada día para realizar la curva de calibración				
C2					
C3					
C4					
C5					
C6					

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Para demostrar que cumplen las curvas de calibración la estimación lineal de acuerdo a la Ec. 1, se calcularon los valores de intercepto, pendiente, coeficiente de correlación dando el resultado superior a 0.995 en cada uno de los días y una curva de calibración global con un coeficiente de correlación superior a 0.995.

Para complementar la aceptación de los datos anteriores, se utilizó el método de mínimos cuadrados, buscando confirmar que los datos obtenidos entre los puntos experimentales y las curvas de calibración sean mínimas. (MILLER Y BIEVRE., 2005, p. 82). Obteniendo ecuaciones para los valores de pendiente Ec.2, intercepto Ec.3, coeficiente de correlación Ec.4, desviaciones estándar de los coeficientes Ec.5, Ec.6, y error tipo en la estimación lineal Ec.7.

$$b = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}$$

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n y_i - b \sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Ec. 2}$$

Ec. 3

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Ec. 4

$$S_b = \frac{S_{yx}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

Ec. 5

$$S_a = S_b \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$$

Ec. 6

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 2}}$$

Ec. 7

Donde:

X= Concentración (mg/L)

Y= Función respuesta del equipo

\bar{x} = Media de concentraciones

\bar{y} = Media de función respuesta

n = Número de datos

2.8.2. Límite de Detección

Para la obtención del límite de detección se realizó la lectura de 3 blancos de método, es decir fase móvil, se debe expresar los datos en concentración de Ácido L-Ascórbico, y a parte se debe calcular el resultado de y en áreas. Para ellos los datos son sometidos a regresión lineal. Estos datos deben ser expresados al 95% de confianza.

$$y_B = a + 3S_{yx}$$

Ec. 8

$$y_B = a + b(x_B)$$

Ec. 9

Donde:

a = Intercepto

y_B = Factor respuesta del blanco en áreas

b = Pendiente

x_B = Concentración (mg/L) del límite de detección de la muestra

2.8.3. Límite de Cuantificación

Se obtuvo por regresión lineal a un 95 % de confianza, despejando del valor de la concentración.

$$y_B = a + 10S_{yx}$$

Ec. 10

$$y_B = a + b(x_B)$$

Ec. 11

$$(x_B) = \frac{y_B - a}{b}$$

Ec.12

Donde:

a = Intercepto

y_B = Factor respuesta del blanco en áreas

b = Pendiente

x_B = Concentración (mg/L) del límite de detección de la muestra

2.8.4. Precisión

La precisión del método fue determinada en condiciones de reproducibilidad y repetibilidad entre días y los resultados obtenidos de curvas de calibración, fortificados y muestras se realizó análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las concentraciones.

Tabla 4-2. Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para estándares.

Estándares (mg/L)	DIA		
	1	2	3
Observaciones			
1	L11	L23	L35
2	L12	L24	L36
3	L13	L25	L37
4	L14	L26	L38
5	L15	L27	L39
6	L16	L28	L40

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 5-2. Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para fortificados.

Fortificados (mg/L)	DIA		
Observaciones	1	2	3
1	L17	L29	L41
2	L18	L30	L42
3	L19	L31	L43

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 6-2. Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para muestras.

Muestras (mg/L)	DIA		
Observaciones	1	2	3
1	L20	L32	L44
2	L21	L33	L45
3	L22	L34	L46

Realizado por: Alan Balseca, 2019.

Se comparó el valor F obtenido de la tabla ANOVA con el experimental de las mediciones. También se determinó el coeficiente de variación siendo este menor al 8% en los niveles de fortificados.

Tabla 7-2. Modelo de análisis de varianza

Origen de la Varianza	Grados de libertad	Suma de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias
Entre grupos	$Gl_B = p - 1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^p p(\bar{L}_i - \bar{L})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{p}$
Dentro del grupo	$Gl_w = L - p$	$SDC_w = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^p (L_o - \bar{L}_i)^2$	$DCM_w = \frac{SDC_w}{L}$
TOTAL	$Gl_T = Gl_B + Gl_w$	$SDC_T = SDC_B + SDC_w$	$DCM_T = \frac{SDC_T}{Gl_T}$

Realizado por: Alan Balseca

Donde:

Gl= Grados de libertad

p= Numero de repeticiones

L= Numero de lecturas por día

SDC= Suma de diferencias cuadráticas

DCM= Diferencias cuadráticas medias

2.8.5. Repetibilidad

Las repeticiones se realizaron 3 veces al día intercambiando entre repeticiones los técnicos, esto para asegurar la validez del método. Se calculó la desviación estándar por repetibilidad, y el coeficiente de variación, para puntos de estándar, fortificados y muestras

$$S_r = \sqrt{DCM_w}$$

Ec.13

$$\%CVr = \frac{S_r}{\bar{X}}$$

Ec. 14

Donde:

DCM_B= Diferencias cuadráticas medias entre grupos

DCM_w = Diferencias cuadráticas medias dentro de grupo

X = Promedio de los datos

p= Número de repeticiones

2.8.6. Reproducibilidad

Cada uno de los datos obtenidos por cada nivel de estándar, fortificados y muestras fueron analizados y se calculó para cada uno la desviación estándar por reproducibilidad y el coeficiente de variación. Para ello también se calculó la desviación estándar del intercepto.

$$V_L = S_L = \frac{DCM_B - DCM_w}{p}$$

Ec. 15

$$S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2}$$

Ec. 16

$$\%CVR = \frac{S_R}{X} \times 100$$

Ec. 17

Donde:

S_L = Desviación estándar del intercepto

S_R = Desviación estándar por reproducibilidad

p = Número de repeticiones

2.9. Estadístico

Para determinar si los datos obtenidos durante la validación son correctos, precisos y confiables, se realizó utilizando una hoja de cálculo Excel conectada entre sí para lograr obtener resultados entre todos los días de la validación. También se aplicó pruebas de significancia F-Fisher para comprobar que no existe diferencia significativa entre los datos obtenidos.

Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA), donde se compara las diferencias que existen entre cada uno de los grupos de datos.

2.10. Exactitud del método

Para obtener la exactitud se utilizaron fortificados calculados a diferentes concentraciones conocidas y se determinó el porcentaje de recuperación que estos tenían de acuerdo al área obtenido en el cromatograma y aplicado a la curva de calibración. Según el Método IFU No. 17 el rango es aceptable desde 85% hasta 110%, indicando que la exactitud no sobrepase los rangos establecidos. Para ello se utilizó el estándar certificado de Ácido L-Ascórbico.

$$\% R = \frac{X_{\text{obtenida}}}{X_{\text{Teórico}}} * 100$$

Ec. 18

2.11. Incertidumbre

Para obtener la incertidumbre de cada una de los resultados obtenidos, se basa en identificar, cuantificar y combinar todas las fuentes posibles de incertidumbre del método. (RIU et al., 2000, p. 10)

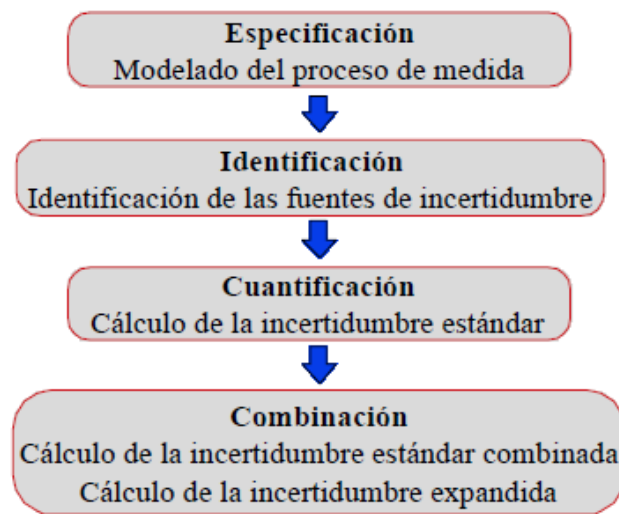


Figura 1-2. Etapas para el cálculo de incertidumbre

Fuente: (MAROTO, 2002, p. 2)

Los componentes de incertidumbre se expresaron como incertidumbre estándar, si la incertidumbre es experimental, se obtuvo la incertidumbre estándar calculando la desviación estándar del número de repeticiones. Al tener material de referencia certificado, la incertidumbre estándar se obtuvo de dividir para $\sqrt{3}$ el valor que ofrece el fabricante del reactivo.

Al obtener todas las fuentes de incertidumbre y sus cálculos, se combinaron de acuerdo a la ley de propagación de errores. Obteniendo así la incertidumbre estándar combinada (u) y como último calcular la incertidumbre expandida (U) del método. Para ello se debe multiplicar la incertidumbre estándar con el factor de cobertura k , en esta caso es igual a 2 al tratarse de un 95% de probabilidad.

2.12. Incertidumbre estándar por reproducibilidad

$$\mu_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$$

Ec. 19

Donde:

S_R = Desviación estándar por reproducibilidad

Incertidumbre estándar por repetibilidad

$$\mu_r = \frac{S_r}{\sqrt{n}}$$

Ec. 20

S_r = Desviación estándar por repetibilidad

n = Número de datos

2.13. Incertidumbre estándar a partir de certificados de calibración

$$\mu = \frac{U}{k}$$

Ec. 21

Donde:

U = Incertidumbre expandida

k = Factor de cobertura

2.14. Incertidumbre estándar a partir de tolerancia del material volumétrico

$$u(V_f) = \sqrt{u(V_{cal})^2 + u(V_{temp})^2 + u(V_{rep})^2}$$

Ec. 22

$$u(V_{cal}) = \frac{U(V_{cal})}{k}$$

Ec. 23

$$u(V_{temp}) = \frac{U(V_{temp})}{k}$$

Ec. 24

$$u(V_{rep}) = \frac{U(V_{rep})}{k}$$

Ec. 25

Donde:

$u(V_{cal})$ = Incertidumbre del valor de calibración

$u(V_{rep})$ = Incertidumbre del valor de repeticiones

$u(V_{temp})$ = Incertidumbre del valor de temperatura

k = Factor de cobertura

2.15. Incertidumbre estándar a partir del peso de balanza analítica

$$uP(Muestra) = \sqrt{(uCal)^2 + (uRe s)^2}$$

Ec. 26

$$uCal = \frac{UCal}{k}$$

Ec. 27

$$uRe s = \frac{URe s}{\sqrt{3}}$$

Ec. 28

Donde:

$uCal$ = Incertidumbre de calibración de balanza

$uRe s$ = Incertidumbre de resolución

2.16. Incertidumbre combinada

$$u_{conc}(y) = y \sqrt{\sum \left(\frac{\mu_p}{p}\right)^2}$$

Ec. 29

Donde:

$\frac{\mu_p}{p}$ = Incertidumbre estándar de cada una de las variables involucradas

y = Concentración de la variable.

Incertidumbre expandida

$$U = k * \mu_c(y)$$

Ec. 30

Donde:

$\mu_c(y)$ = Incertidumbre combinada

k = Factor de cobertura

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los datos obtenidos durante la validación por medio de análisis estadístico, utilizando una hoja de cálculo Excel combinada y enlazada entre sí para uno de los valores, se obtuvo el análisis de datos, los cuales se tabularon e interpretaron para beneficio del laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias-ESPOCH. Los parámetros comparados de repetibilidad y reproducibilidad fueron obtenidos realizando 3 réplicas diarias durante cinco días.

3.1. Linealidad

La concentración de Ácido L-Ascórbico fue determinada por curvas de calibración, realizada por tres veces en cinco días diferentes en condiciones de reproducibilidad y repetibilidad. En las gráficas de cada curva de calibración obtenida por día en el eje de las abscisas se encuentra la concentración en mg/L de Ácido L-Ascórbico y en dentro del eje de las ordenadas se encuentra el factor respuesta del equipo en áreas expresada por cada punto de estándar por triplicado.

Tabla 1-3. Datos de curvas de calibración por triplicado en cinco días del experimento

Eje X	Eje Y (ÁREAS u ²)				
CONC. mg/L	PRIMER DIA	SEGUNDO DIA	TERCER DIA	CUARTO DIA	QUINTO DIA
5	1230,36	1248,39	1253,50	1246,66	1256,11
	1242,94	1259,03	1279,44	1241,01	1250,62
	1260,05	1247,19	1280,79	1253,30	1238,05
7	1920,61	1922,74	1936,44	1927,11	1947,65
	1913,42	1910,63	1906,93	1924,00	1932,62
	1903,42	1911,88	1916,88	1917,88	1925,96
9	2453,33	2465,31	2483,98	2493,52	2504,51
	2473,62	2488,23	2464,87	2483,11	2494,71

	2463,52	2495,61	2493,21	2463,02	2505,03
12	3283,33	3272,69	3303,35	3293,57	3304,11
	3250,29	3285,04	3293,32	3283,47	3284,21
	3253,11	3295,66	3263,14	3303,06	3284,54
15	4293,21	4296,03	4300,34	4292,01	4303,17
	4286,38	4295,13	4303,53	4298,15	4283,98
	4283,98	4297,58	4313,98	4293,43	4275,93
25	7313,51	7302,75	7294,96	7284,86	7296,52
	7303,62	7314,30	7284,49	7314,02	7305,36
	7343,89	7323,92	7275,48	7304,87	7316,80

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Las gráficas de las curvas de calibración con la ecuación de la recta, obtenida por regresión lineal y el coeficiente de correlación se muestran a continuación.

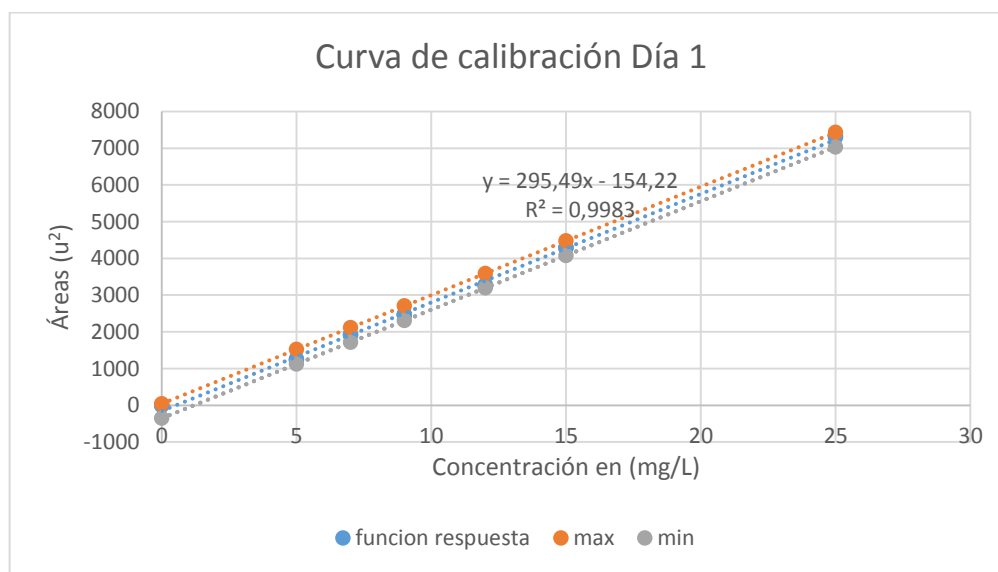


Gráfico 1-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 1

Elaborado por: Alan Balseca, 2019

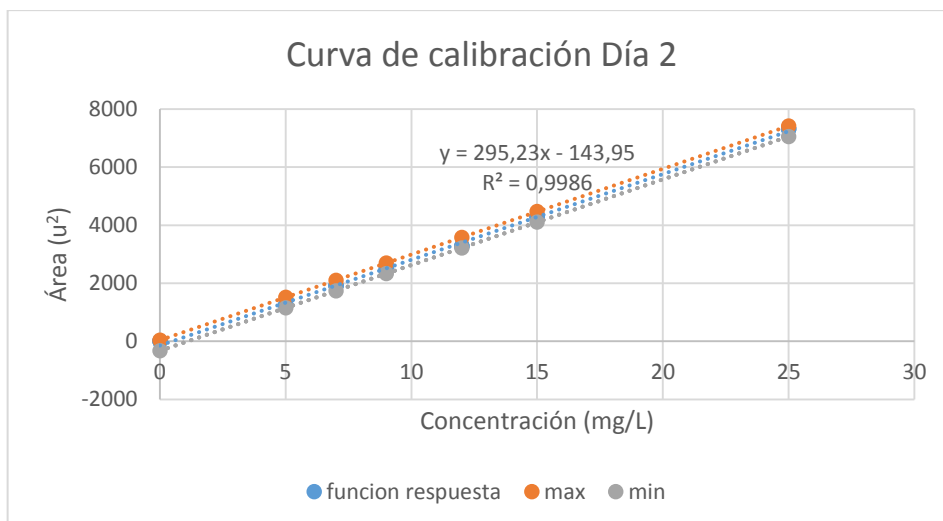


Figura 2-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 2

Elaborado por: Alan Balseca, 2019

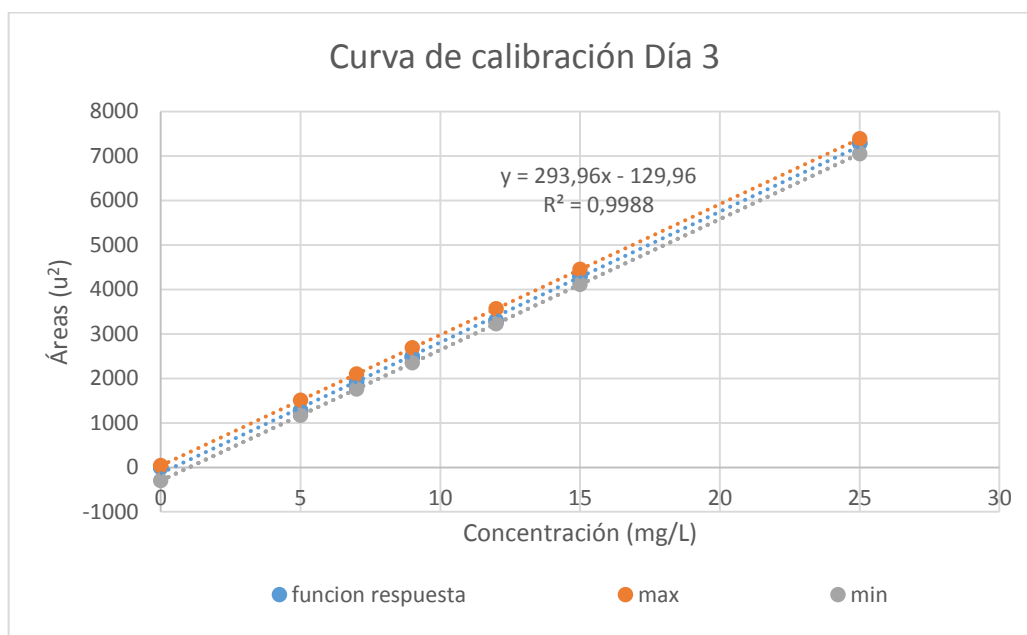


Figura 3-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 3

Elaborado por: Alan Balseca, 2019

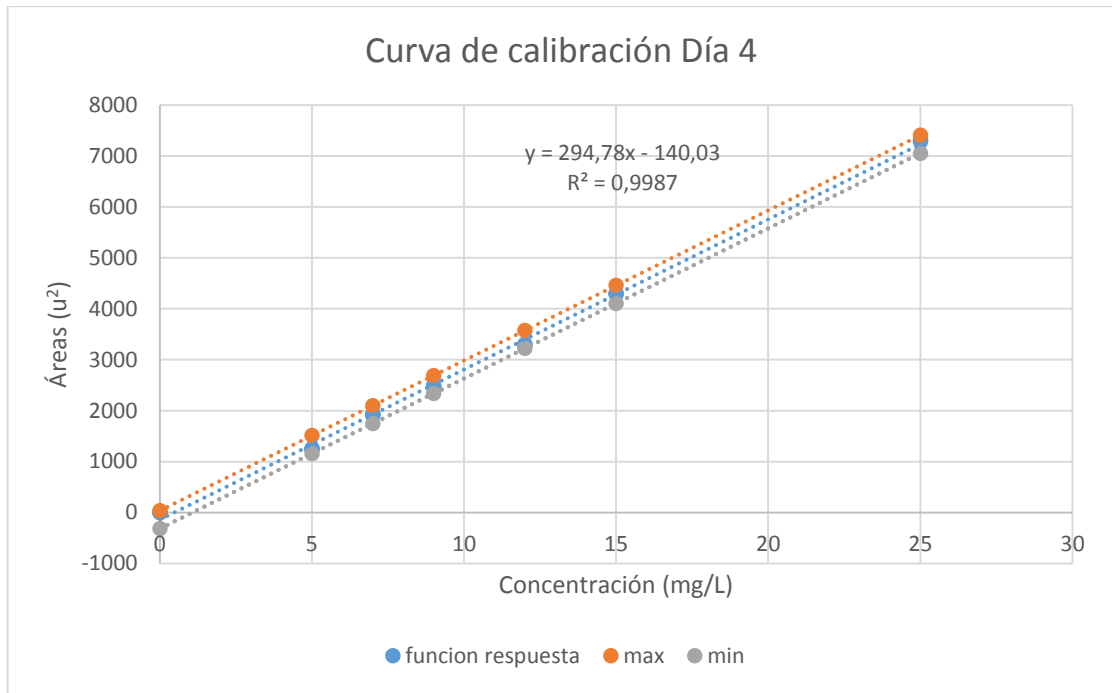


Figura 4-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 4

Elaborado por: Alan Balseca, 2019

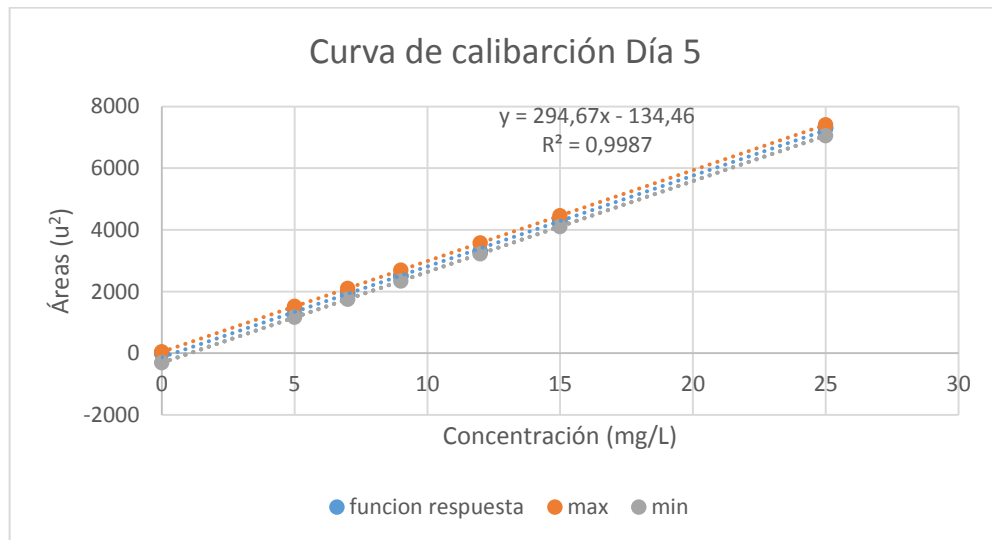


Figura 5-3. Calibración Ácido L-Ascórbico Día 5

Elaborado por: Alan Balseca, 2019

De acuerdo al método (IFU No. 17a, 2005, p. 14), el coeficiente de correlación debe ser mayor a $r=0.995$, y las cinco curvas de calibración cumplen este criterio, es decir que cumplen con las condiciones de reproducibilidad, y se ajustan al criterio de regresión lineal, por lo tanto son válidas para determinar la concentración de ácido L-Ascórbico en muestras fortificadas y en jugos cítricos.

Adicional se realizó la regresión lineal global combinando las cinco curvas de calibración y obteniendo una ecuación de la recta para todos los días, con la cual se realizó el cálculo final de concentración. También se establecieron los valores de pendiente, intercepto, coeficiente de correlación, desviación estándar del intercepto y desviación estándar de y en x.

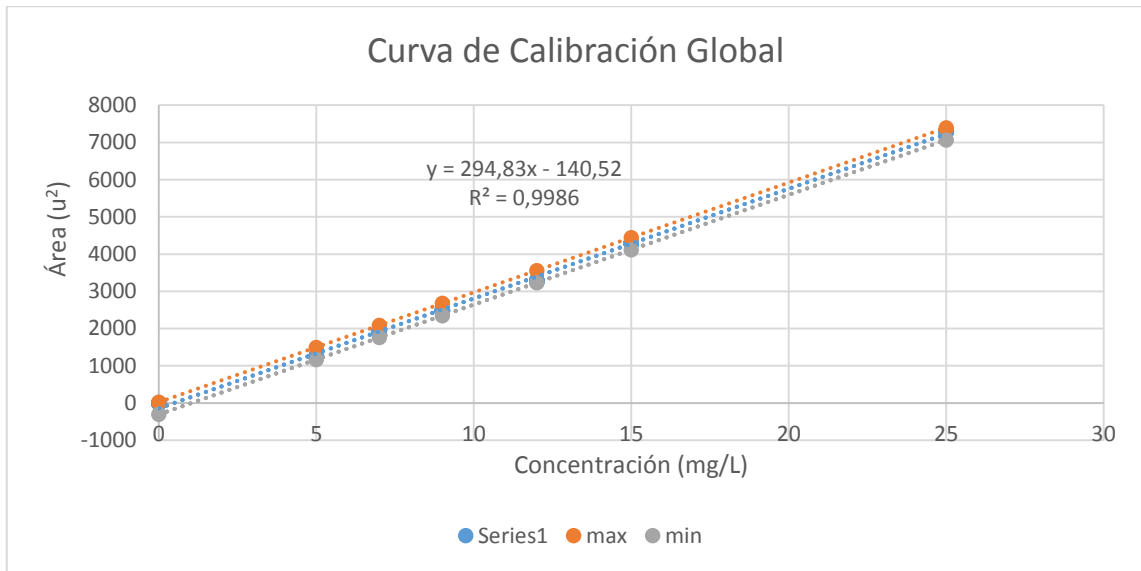


Figura 6-3. Calibración Ácido L-Ascórbico GLOBAL

Elaborado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 2-3. Estimación lineal global

Estimación lineal	Valores
b	293,83
a	-140.52
r	0,9985
Sb	1,0879
Sa	13,9389
Syx	295.645

Realizado por: Alan Balseca. 2019

Se calcularon los límites de confianza, máximos y mínimos que deben cumplir cada una de las curvas de calibración para cada punto de calibración por medio de la estimación lineal, con esto se asegura el cumplimiento del criterio de calidad para curvas futuras.

Para ello obtenemos el valor *crítico* de las tablas en un $\alpha = 0.05$ para grados de libertad es igual a 1.983. La ecuación a ocupar para el cálculo de límite superior e inferior es el siguiente:

$$LS = b + t_{crit} * S_{yx}$$

Ec. 31

$$LI = b - t_{crit} * S_{yx}$$

Ec. 32

Se aplicó también el cálculo expresado a cada uno de los puntos del estándar con la fórmula:

$$L_{Superior} = b + P.St * LS$$

Ec. 33

$$L_{Inferior} = b + P.St * LI$$

Ec. 34

Tabla 3-3. Límites de aceptación de criterio para cada punto de estándar.

P. St (mg/L)	Limite Superior	Límite Inferior
0	24,03	-305,08
5	1498,16	1169,06
7	2087,81	1758,71
9	2677,47	2348,37
12	3561,95	3232,85
15	4446,43	4117,33
25	7394,70	7065,59

Realizado por: Alan Balseca, 2019

3.2. Límite de detección (LD)

Los resultados del límite de detección deben reportarse a nivel de puntos de calibración y realizar la conversión a concentración en muestra. Al no contar con información en áreas suficientes para cuantificar con la formula estándar conocida, y se obtuvo a partir de estimación lineal. Para ello se debieron realizar los siguientes cálculos:

Conociendo la ecuación de la recta global es: $y = 294.83x - 140.5243$ y el valor de S_{yx} es 270.039

$$y_B = a + 3S_{yx}$$

$$y_B = -140.5243 + 3(295.645)$$

$$y_B = 759.121u^2$$

Al obtener el área del blanco por regresión lineal, por medio de la ecuación de la recta se calculó la concentración en mg/L de ácido L-Ascórbico el límite de detección.

$$y_B = a + b(x_B)$$

$$x_B = \frac{y_B - a}{b}$$

$$x_B = \frac{759.12 - (-140.5243)}{295.645}$$

$$x_B = 1.02211 \frac{mg}{L} \text{ ÁcidoL - Ascórbico}$$

El (LD) es igual al valor de $1.02211 \frac{mg}{L} \text{ ÁcidoL - Ascórbico}$, siendo esta la concentración mínima a detectar por el HPLC en concentración de vitamina C para el método validado.

3.3. Límite de cuantificación (LC)

Para obtener el valor del límite de cuantificación se tomó el valor de 5 mg/L obtenido de la curva de calibración, esto debido a que es la concentración más baja cuantificable para obtener linealidad dentro del método de validación.

3.4. Rango de trabajo validado

El rango de trabajo validado fue realizado por medio de fortificados a una matriz diferente, en este caso un jugo de uva que tuvo el mismo principio del método para muestras, para ello se trabajó con un rango de 15 ppm hasta 25 ppm de Ácido L-Ascórbico, cada uno de ellos se trabajaron con 10 gramos de muestra de jugo de uva. El resultado obtenido dentro de la curva de calibración es expresado al final como concentración en muestra en (mg/Kg).

3.5. Precisión

Para lograr determinar si las repeticiones entre los cinco días que se efectuó la validación son confiables se realizaron lecturas de fortificados a 3 niveles de concentración, repetidos 3 veces por día y reproducibles en 5 días.

Tabla 4-3. Concentración de fortificados de Ácido L-Ascórbico por nivel en los cinco días.

Repeticiones	Concentración (mg/Kg)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
NIVEL 1	14,79	13,97	13,74	14,41	15,60
	14,44	14,10	14,27	14,91	15,53
	14,25	14,14	14,66	14,58	15,08
NIVEL 2	20,31	20,04	20,07	19,92	20,37
	20,91	20,55	19,98	19,15	20,10
	20,71	19,98	20,10	20,27	20,06
NIVEL 3	26,51	25,68	24,86	24,49	24,90
	25,93	25,58	24,46	24,18	25,21
	26,49	25,11	24,43	24,22	24,58

Realizado por: Alan Balseca, 2019.

Se obtuvo los datos de desviación estándar por repetibilidad, desviación estándar por reproducibilidad y coeficiente de variación de estos dos para parámetros utilizando las ecuaciones: (Ec. 13, Ec. 14, Ec. 15, Ec. 16 y Ec. 17), mencionadas en el capítulo anterior donde se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 5-3. Resumen de promedio, coeficientes y desviaciones estándar para reproducibilidad y repetibilidad para fortificados.

REPETICIONES	Promedio (X)	REPETIBILIDAD		Reproducibilidad	
		Desviación estándar (Sr)	Coficiente de Variación (%CVR)	Desviación estándar (SR)	Coficiente de Variación (%CVR)
1	14,932	0,305	2,040	0,276	1,850
2	20,415	0,296	1,448	0,249	1,220
3	25,298	0,359	1,417	0,329	1,302

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Los datos obtenidos dentro de la tabla 5-3, se obtuvieron del análisis de varianza ANOVA, detallado en el siguiente apartado (Análisis de Varianza).

De acuerdo a (Marcel, 1989, p.22), el valor expresado en porcentaje de los coeficientes de variación tanto de reproducibilidad como repetibilidad deben ser menor al 2% para cada uno de los fortificados, esto asegura la confiabilidad y validez de los resultados.

Al obtener los datos para la precisión del método de los fortificados, verificando que se encuentran dentro de los límites establecidos, se calculó también los coeficientes tanto en repetibilidad como en reproducibilidad para las tres muestra analizadas durante la validación, siendo naranja, mandarina y limón. Los datos obtenidos expresados en mg/Kg de cada muestra fueron:

Tabla 6-3. . Concentración de Ácido L-Ascórbico en tres muestras por nivel en los cinco días

MUESTRA	Concentración (mg/Kg)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
NARANJA	219,50	219,32	220,15	219,83	220,31
	219,14	221,57	220,15	220,00	220,10
	220,63	220,05	218,59	220,76	219,63
MANDARINA	155,56	160,25	157,03	157,03	154,92
	157,82	156,23	157,52	157,52	156,12
	157,95	157,51	156,04	156,04	154,20
LIMÓN	157,09	155,39	154,39	154,39	155,56
	154,75	155,47	156,86	156,86	156,64
	156,94	154,92	155,70	155,70	156,40

Realizado por: Alan Balseca, 2019.

De igual forma se calcularon los coeficientes respectivos para reproducibilidad y repetibilidad, para obtener confianza en los datos, los valores fueron los siguientes:

Tabla 7-3. Resumen de promedio, coeficientes y desviaciones estándar para reproducibilidad y repetibilidad para muestras.

MUESTRA	Promedio (X)	Repetibilidad		Reproducibilidad	
		Desviación estándar (Sr)	Coefficiente de Variación (% CVr)	Desviación estándar (SR)	Coefficiente de Variación (% CVR)
Naranja	219,982	1,760	0,800	1,466	0,666
Mandarina	156,783	2,844	1,814	2,553	1,628
Limón	155,803	2,274	1,460	1,904	1,222

Realizado por: Alan Balseca, 2019.

Los datos utilizados para calcular los distintos coeficientes para repetibilidad y reproducibilidad fueron obtenidos del análisis de varianza. Los coeficientes de variación

para los dos parámetros son menores al 2%, dando por válidos y asegurando la confianza de los mismos para ser expresados como concentración de muestra.

3.6. Análisis de varianza

Haciendo uso de la tabla 7-2, en el que se encuentran las fórmulas de análisis de varianza se determinaron los orígenes de la varianza, grados de libertad (GL), suma de diferencias cuadráticas (SDC) y diferencias cuadráticas medias (DCM), a más de ello se realizó un Test F-Fisher para determinar si no existe diferencias significativas entre grupos para cada uno de los niveles de fortificado y para cada una de las muestras analizadas. Los datos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 8-3. Análisis de Varianza ANOVA. Primer fortificado

Origen de la Varianza	GL	SDC	DCM	Test F	Valor Crítico F
Entre grupos (B)	4	0,173	0,043	0,47	19,247
Dentro del grupo (W)	2	0,186	0,093		
Total	6	0,358	0,136		

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 9-3. Análisis de Varianza ANOVA. Segundo fortificado

Origen de la Varianza	GL	SDC	DCM	Test F	Valor Crítico F
Entre grupos	4	0,046	0,043	0,13	19,247
Dentro del grupo	2	0,175	0,087		
Total	6	0,221	0,131		

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 10-3. Análisis de Varianza ANOVA. Tercer fortificado

Origen de la Varianza	GL	SDC	DCM	Test F	Valor Crítico F
Entre grupos	4	0,275	0,069	0,53	19,247
Dentro del grupo	2	0,257	0,129		
Total	6	0,532	0,197		

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 11-3. Comparación de valores F calculados y F críticos para fortificados.

NIVEL	Concentración del fortificado (mg/Kg)	Valor F calculado	Valor Crítico F	RESULTADO
1	15	0,47	19,247	No existen diferencias significativas entre los grupos para cada uno de los niveles de fortificado.
2	20	0,13		
3	25	0,53		

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Al obtener los resultados estadísticos del análisis de varianza de un solo factor (ANOVA), se determinó mediante la prueba de Fisher a un nivel de 95% de confianza que los fortificados utilizados a tres niveles distintos de concentración no existe una diferencia significativa entre los grupos de tratamientos, esto debido a que el valor de F calculado es menor al Valor F crítico. De esta manera el método cuenta con condiciones de reproducibilidad y repetibilidad.

Se realizó también un análisis de varianza para las tres muestras distintas utilizadas para la valoración de Ácido L-Ascórbico, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 12-3. Análisis de varianza ANOVA. Muestra 1.

Origen de la Varianza	GL	SDC	DCM	Test F	Valor Crítico F
Entre grupos	4	1,005	0,251	0,08	19,247
Dentro del grupo	2	6,195	3,097		
Total	6	7,200	3,349		

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 13-3. Análisis de varianza ANOVA. Muestra 2.

Origen de la Varianza	GL	SDC	DCM	Test F	Valor Crítico F
Entre grupos	4	13,495	3,374	0,42	19,247
Dentro del grupo	2	16,175	8,088		
Total	6	29,671	11,462		

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 14-3. Análisis de varianza ANOVA. Muestra 3.

Origen de la Varianza	GL	SDC	DCM	Test F	Valor Crítico F
Entre grupos	4	2,120	0,530	0,10	19,247
Dentro del grupo	2	10,343	5,172		
Total	6	12,463	5,701		

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 15-3. Comparación de valores F calculados y F críticos para muestras.

Muestras	Valor F calculado	Valor Crítico F	RESULTADO
NARANJA	0,08	19,247	No existen diferencias significativas entre los grupos para cada uno de los niveles de fortificado.
MANDARINA	0,42		
LIMÓN	0,1		

Realizado por: Alan Balseca, 2019.

Al realizar el análisis de varianza para un solo factor (ANOVA), y calcular el valor de F tanto en muestras como el valor F crítico, a un nivel de confianza del 95% se determinó que no existen diferencias significativas entre los grupos de cada una de las muestras, cumpliendo con las condiciones de repetibilidad y reproducibilidad en los cinco días.

3.7. Exactitud del método

La exactitud del método fue determinada de acuerdo al % de recuperación obtenidos en los fortificados a concentraciones conocidas, partiendo de la solución madre para preparar cada uno de ellos. Para obtener el resultado final en concentración de mg/Kg como muestra se relación un cálculo final y de esa forma se expresó el resultado.

Tabla 16-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del primer día

FORTIFICADOS DÍA 1						CONCENTRACIÓN			RECUPERACIÓN		
Concentración conocida mg/Kg como muestra	Concentración obtenida de la CURVA (mg/L)	Factor de conversión	Aforo/ Muestra	C (mg/Kg) LEIDO	% R	X	s	CV%	X	s	CV%
15	1,515	1000	0,01	15,15	101,03	14,860	0,271	1,827	99,065	1,810	1,827
15	1,481	1000	0,01	14,81	98,71						
15	1,462	1000	0,01	14,62	97,46						
20	2,061	1000	0,01	20,61	103,04	20,514	0,126	0,613	102,572	0,628	0,613
20	2,056	1000	0,01	20,56	102,82						

20	2,037	1000	0,01	20,37	101,86						
25	2,546	1000	0,01	25,46	101,84						
25	2,557	1000	0,01	25,57	102,26	25,490	0,066	0,258	101,959	0,263	0,258
25	2,544	1000	0,01	25,44	101,77						

Realizado por: Alan Balseca, 2019.

Tabla 17-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del segundo día

Concentración conocida mg/Kg como muestra	Concentración obtenida de la CURVA (mg/L)	Factor de conversión	Aforo/Muestra	C (mg/Kg) LEIDO	% R	X	s	CV%	X	s	CV%
15	1,457	1000	0,01	14,57	97,15						
15	1,481	1000	0,01	14,81	98,73	14,766	0,175	1,187	98,438	1,168	1,187
15	1,491	1000	0,01	14,91	99,43						
20	2,038	1000	0,01	20,38	101,89						
20	2,088	1000	0,01	20,88	104,41	20,527	0,310	1,510	102,633	1,550	1,510
20	2,032	1000	0,01	20,32	101,59						
25	2,531	1000	0,01	25,31	101,25						
25	2,556	1000	0,01	25,56	102,24	25,432	0,124	0,488	101,728	0,496	0,488
25	2,542	1000	0,01	25,42	101,69						

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 18-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del tercer día

FORTIFICADOS DÍA 3						CONCENTRACIÓN			RECUPERACIÓN		
Concentración conocida mg/Kg como muestra	Concentración obtenida de la CURVA (mg/L)	Factor de conversión	Aforo/Muestra	C (mg/Kg) LEIDO	% R	X	s	CV%	X	s	CV%
15	1,478	1000	0,01	14,78	98,56	14,815	0,196	1,322	98,767	1,306	1,322
15	1,464	1000	0,01	14,64	97,58						
15	1,502	1000	0,01	15,02	100,17						
20	2,041	1000	0,01	20,41	102,06	20,391	0,066	0,324	101,953	0,330	0,324
20	2,032	1000	0,01	20,32	101,58						
20	2,044	1000	0,01	20,44	102,21						
25	2,513	1000	0,01	25,13	100,52	25,190	0,062	0,248	100,761	0,250	0,248
25	2,525	1000	0,01	25,25	101,02						
25	2,519	1000	0,01	25,19	100,75						

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 19-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del cuarto día

FORTIFICADOS DÍA 4						CONCENTRACIÓN			RECUPERACIÓN		
Concentración conocida mg/Kg como muestra	Concentración obtenida de la CURVA (mg/L)	Factor de conversión	Aforo/Muestra	C (mg/Kg) LEIDO	% R	X	s	CV%	X	s	CV%
15	1,477	1000	0,01	14,77	98,49	14,996	0,254	1,695	99,972	1,695	1,695
15	1,527	1000	0,01	15,27	101,82						
15	1,494	1000	0,01	14,94	99,61						
20	2,026	1000	0,01	20,26	101,32	20,120	0,572	2,843	100,599	2,860	2,843
20	1,949	1000	0,01	19,49	97,45						
20	2,061	1000	0,01	20,61	103,03						
25	2,515	1000	0,01	25,15	100,61	25,163	0,089	0,356	100,652	0,358	0,356
25	2,508	1000	0,01	25,08	100,32						
25	2,526	1000	0,01	25,26	101,03						

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Tabla 20-3. Datos de conversión de concentración de muestra y porcentaje de recuperación del quinto día.

FORTIFICADOS DÍA 5						CONCENTRACIÓN			RECUPERACIÓN		
Concentración conocida mg/Kg como muestra	Concentración obtenida de la CURVA (mg/L)	Factor de conversión	Aforo/ Muestra	C (mg/Kg) LEIDO	% R	X	s	CV%	X	s	CV%
15	1,511	1000	0,01	15,11	100,74	15,245	0,175	1,148	101,636	1,167	1,148
15	1,518	1000	0,01	15,18	101,21						
15	1,544	1000	0,01	15,44	102,96						
20	2,071	1000	0,01	20,71	103,54	20,514	0,170	0,826	102,571	0,848	0,826
20	2,044	1000	0,01	20,44	102,19						
20	2,040	1000	0,01	20,40	101,98						
25	2,522	1000	0,01	25,22	100,86	25,215	0,311	1,235	100,858	1,245	1,235
25	2,553	1000	0,01	25,53	102,10						
25	2,490	1000	0,01	24,90	99,61						

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Según el Método (IFU No. 17a, 2005, p.22), el rango aceptable del % de recuperación del método es desde el 90 al 110 %, y el intervalo validado dentro del método tiene una recuperación desde el 95 al 105% para cada uno de las concentraciones de fortificado, este rango es aceptable para la concentración recuperada de Ácido L-Ascórbico, por lo tanto es exacto para el método y para los intereses del laboratorio.

3.8. Incertidumbre

Se determinó las distintas incertidumbres que afectan al método, se consideró un factor de cobertura de ($k=2$), esto para trabajar a todas las muestras y fortificados con un nivel de confianza del 95%, a más de ello se calculó la incertidumbre estándar combinada (u) y expandida (U).

Las etapas utilizadas para la estimación de la incertidumbre del método fueron:

3.8.1. Identificación

Las fuentes de incertidumbre identificadas, están unidas a la calibración instrumental de los equipos, pureza de reactivos, errores aleatorios cometidos entre los analista que validaron el método, calibración del material de vidrio, calibración de las pipetas automáticas.

3.8.2. Cuantificación

En esta etapa se expresaron las fuentes de incertidumbre en unidades correspondientes a cada instrumento, material de vidrio, certificados de calibración. Estas fuentes de incertidumbre estaban asociadas también a la forma del experimento, es decir al número de réplicas realizadas y se expresó utilizando información conocida de los certificados. De acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 21-3. Incertidumbres ocupadas durante la validación.

Equipo o material de vidrio	TIPO DE INCERTIDUMBRE	VALOR DEL CERTIFICADO	INCERTIDUMBRE
Balón de Aforo de 25 ml	Desviación estándar de tolerancia	0,011	0,000030 ml
Balón de Aforo de 100 ml	Desviación estándar de tolerancia	0,011	0,000030 ml
Balón de Aforo de 1000 ml	Desviación estándar de tolerancia	0,12	0,005 ml
Pipeta automática de 1 ml	Desviación estándar de tolerancia	0,00056	0,00064 ml
Pipeta automática de 10 ml	Calibración	0,0098	0,0010 ml
Balanza	Calibración	0,0020 g	0,00029 g
Ácido L-Ascórbico	Pureza	99,80%	0,06

Realizado por: Alan Balseca, 2019

3.8.3. Combinación

Después de haber determinado los tipos de incertidumbres, se calcularon cada una de las fuentes y se combinaron siguiendo la ley de propagación de errores, obteniendo la incertidumbre combinada (u) y la incertidumbre expandida (U). Para ello se realizaron los siguientes cálculos:

3.9. Incertidumbre típica combinada del material volumétrico

Para obtener las incertidumbres del material volumétrico se utilizaron las ecuaciones Ec. 22, Ec. 23, Ec. 24, Ec. 25 las cuales se encuentran en el capítulo 2. Con ello se encontraron las incertidumbres en volumen que tendría la preparación de las soluciones.

Tabla 22-3. Incertidumbre del material volumétrico utilizado en la validación

Equipo o material de vidrio	k	$u(V_{cal})$	$u(V_{temp})$	$u(V_{rep})$	$u(V_f)$, (ml=
Balón de Aforo de 25 ml	2	0,00550000	0,00032552	0,00002500	0,01951335
Balón de Aforo de 100 ml	2	0,00003025	0,00520833	0,00000400	0,07240569
Balón de Aforo de 1000 ml	2	0,05500000	0,00520833	0,00000400	0,09123000
Pipeta automática de 1 ml	2	0,00028000	0,00000208	0,00000400	0,00248228
Pipeta automática de 10 ml	2	0,00980000	0,00001302	0,00000400	0,01100000

Realizado por: Alan Balseca, 2019

3.10. Incertidumbre típica combinada de masa

Para obtener la incertidumbre típica combinada de masa se calculó utilizando las ecuaciones Ec. 26, Ec. 27 y Ec. 28, utilizando los valores obtenidos de la balanza analítica calibrada:

$$uP(Muestra) = \sqrt{(u_{Cal})^2 + (u_{Res})^2}$$

$$uP(Muestra) = \sqrt{8.41 \times 10^{-8} + 3.33 \times 10^{-9}} = 2.96 \times 10^{-4} \text{ g}$$

3.11. Incertidumbre típica combinada a partir de los puntos de estándar

Para obtener la incertidumbre combinada de los puntos de estándar, se calculó la incertidumbre de la resolución del equipo y el factor respuesta del mismo. Obteniendo los siguientes datos:

$$u_{combinada} = \sqrt{(u_{FR})^2 + (u_{Res})^2 + (u_{pp})^2}$$

Ec.35

$$u_{FR} = \frac{b/S_{yx}}{\sqrt{n+2}}$$

Ec. 36

Tabla 23-3. Incertidumbre combinada de los puntos de estándar.

Tipos de u	Punto de calibración					
	5	7	9	12	15	25
μ_{pp}	0,006109	0,007409	0,008625	0,012103	0,013994	0,023343
μ_{FR}	0,097320	0,097320	0,097320	0,097320	0,097320	0,097320
$\mu(\text{resol})$	0,002887	0,002887	0,002887	0,002887	0,002887	0,002887
$\mu_{combinada}$	0,097554	0,097644	0,097744	0,098112	0,098363	0,100122
% u	1,951082	1,394916	1,086044	0,817601	0,655755	0,400488

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Al final la incertidumbre combinada se expresa en concentración de muestra en (mg/Kg).

Tabla 24-3. Incertidumbre típica combinada de puntos de estándar en concentración de muestra.

P. Estándar	Concentración (mg/L)	u(Combinada)	Conversión	Concentración (mg/Kg)
1	5	0,097554	10	0,97554
2	7	0,097644	10	0,97644
3	9	0,97744	10	9,7744
4	12	0,98112	10	9,8112
5	15	0,98363	10	9,8363
6	25	0,100122	10	1,00122

Realizado por: Alan Balseca, 2019

3.12. Incertidumbre combinada del método para cada punto fortificado

$$u_{conc}(y) = y \sqrt{\sum \left(\frac{\mu_p}{p}\right)^2}$$

$$u_{conc}(y) = 10 \sqrt{\left(\frac{0.001}{1}\right)^2 + \left(\frac{0.0003}{10}\right)^2 + \left(\frac{0.00550}{100}\right)^2 + \left(\frac{0.003695}{15}\right)^2 + \left(\frac{0.072723}{15}\right)^2 + (0.0048)^2}$$

$$u_{conc}(y) = 0.075608167$$

Tabla 25-3. Cálculo de incertidumbre combinada para punto fortificado.

Nivel	Concentración (mg/Kg)	<i>u</i> <i>Combinada</i>	Conversión	<i>u</i> <i>Combinada</i> (mg/Kg)
1	15	0.075,608	10	0.75608
2	20	0.061,933	10	0.61933
3	25	0.942,574	10	9.42574

Realizado por: Alan Balseca, 2019

3.13. Incertidumbre expandida del método

$$U = k * \mu_c(y)$$

$$\%U = \frac{U_{Expandida}}{P.Fortificado(mg / Kg)} * 100$$

Tabla 26-3. Incertidumbre expandida del método para puntos de fortificado y porcentaje de incertidumbre

Nivel	Concentración (mg/Kg)	<i>u</i> <i>Combinada</i>	<i>k</i>	<i>u</i> <i>Expandida</i>	%U
1	15	0.075608	2	0.151216	1,008
2	20	0.061933	2	0.123866	0,619
3	25	0.942574	2	1.885149	7,541

Realizado por: Alan Balseca, 2019

Según el SAE, para cumplir con todos los criterios correspondientes para una validación el % de incertidumbre expandida del método para el nivel más bajo del fortificado de

forma inmediata y para los puntos siguientes fortificados validados debe ser $\leq 30\%$, de este modo se comprueba que el método cumple con sus parámetros de validación.

CONCLUSIONES

- Se determinó Vitamina C como (Ácido L-Ascórbico) en una sola matriz de jugos cítricos, utilizando como método de partida el (IFU No. 17a, 2005, pp. 15–22),

realizando cambios en la forma de preparación de muestras. Esta técnica se realizó utilizando un Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC), en el cual se efectuaron, evaluaron y ajustaron las condiciones para las curvas de calibración, fortificados y muestras.

- Se realizaron quince curvas de calibración distribuidas en tres replicas durante cinco días, en donde cada una de ellas tuvo un coeficiente de correlación superior a $r=0.995$ permitiendo cuantificar concentraciones en fortificados y valorar concentraciones en tres jugos cítricos distintos, el rango validado para el método es desde 15 hasta 25 mg/Kg de muestra.
- Se calcularon los límites de detección y cuantificación, el primero se lo obtuvo por regresión lineal de la curva de calibración global con un valor de 1.0221 mg/Kg, y el segundo límite se obtuvo desde el primer punto de estándar para la curva de calibración, con el valor igual a 5 mg/L.
- La exactitud definida por el porcentaje de recuperación en muestras fortificadas fue del 95 al 105%, el cual se encuentra en el rango establecido por el método (IFU No. 17a, 2005, p. 18) que es del 90 al 110% de recuperación. La precisión para el método tanto para repetibilidad y reproducibilidad se obtuvo con un coeficiente de variación menor al 2% para cada parámetro.
- Se determinó la incertidumbre combinada del método para el fortificado con menor concentración con un valor de 0.075608 mg/Kg de muestra y la incertidumbre expandida con un valor de 0.15121 mg/Kg de muestra y la incertidumbre obtenida en el método fue de 1.008 %, cumpliendo con el criterio y el objetivo planteado.
- Se valoró el contenido de Vitamina C (ácido L-Ascórbico) en tres muestras distintas de jugos cítricos, naranja, mandarina y limón, obteniendo concentraciones de $219.98 \pm 0.7171 \text{ mg/Kg}$, $156.78 \pm 1.4557 \text{ mg/Kg}$, $155.80 \pm 0.9435 \text{ mg/Kg}$ respectivamente para cada uno de las muestra.
- Una vez validado el método y utilizado para la valoración de Vitamina C (Ácido L-Ascórbico) en muestras cítricas, por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), el procedimiento queda para el exclusivo uso del laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias-ESPOCH y puede ser replicado a beneficio del laboratorio.

RECOMENDACIONES

- Se debe tomar en consideración crear cartas de control en la cual se coloquen los límites establecidos al 95% de confiabilidad de los valores de pendiente e intercepto, para permitir expresar resultados confiables en curvas de calibración realizadas a futuro.
- Se recomienda realizar una limpieza de columna exhaustiva antes de utilizar el equipo, debido a que el analito es muy susceptible a pérdidas por cualquier motivo y los reactivos utilizados para valorar dicho analito deben ser grado analítico o superior para no conllevar a errores en la preparación de soluciones.
- Se deben comprar estándares analíticos certificados, para todos los beneficios pertinentes al laboratorio y a los fines con los que desee trabajar.

BIBLIOGRAFÍA

- BARAHONA. (2011). *Cuaderno de prácticas de farmacología y expresión de parámetro de validación*. Universidad de Barcelona. pp. 47
- BARBANY, J; CASIMIRO, C. (2004). SUPLEMENTACIÓN EN VITAMINA C Y RENDIMIENTO DEPORTIVO. *Archivos de medicina y deporte. Campus Bellvitge. Feixa Llarga s/n* p. 08907 pp. 1–3.
- BIEVRE, P., Bottger, D., Eastwood, C., Hlavay, J., Miller, J., & Lauwaars, M. (2005). *Guía de laboratorio para la Validación de Métodos y temas relacionados*. In *Eurachem*. Centro Nacional de Metrología de México. pp. 55
- COY, A. G. (1999). Protocolo Estandarización de métodos Analíticos. *Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales*, pp. 23.
- FAO. (2002). *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. pp. 25
- GIARAUD, L. (2004). Determinación de vitamina C total por cromatografía líquida de alta resolución “HPLC”. *Tecnología en Marcha*, 17-4. pp. 73
- GIBBONS, Sean D., & Chakraborti, S. (2003). One-Sample and Paired-Sample Procedures BT - Nonparametric Statistical Inference, 4th ed. In *Nonparametric Statistical Inference, 4th ed.* GONZALES. (2006). *Aplicación de cálculo de incertidumbre combinada a la validación*. pp. 12
- GUM. (2008). Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (1995 with minor correction). Normas ISO. pp. 11
- GUTIERREZ, T., HOYOS, O., & PÁEZ, M. (2007). Determinación del contenido de Ácido Ascórbico en UCHUVA (*Physalis peruviana l.*), por cromatografía líquida de alta resolución. Tesis doctoral inédita. Universidad de la Rioja. pp. 02
- HIBBERT, D. B. (2005). Method validation of modern analytical techniques. *Validation in Chemical Measurement*. Springer Link. Estados Unidos. pp 106.
- ICONTEC, N. I. (2005). ISO,17025 validación de métodos. *Iso*. pp. 5

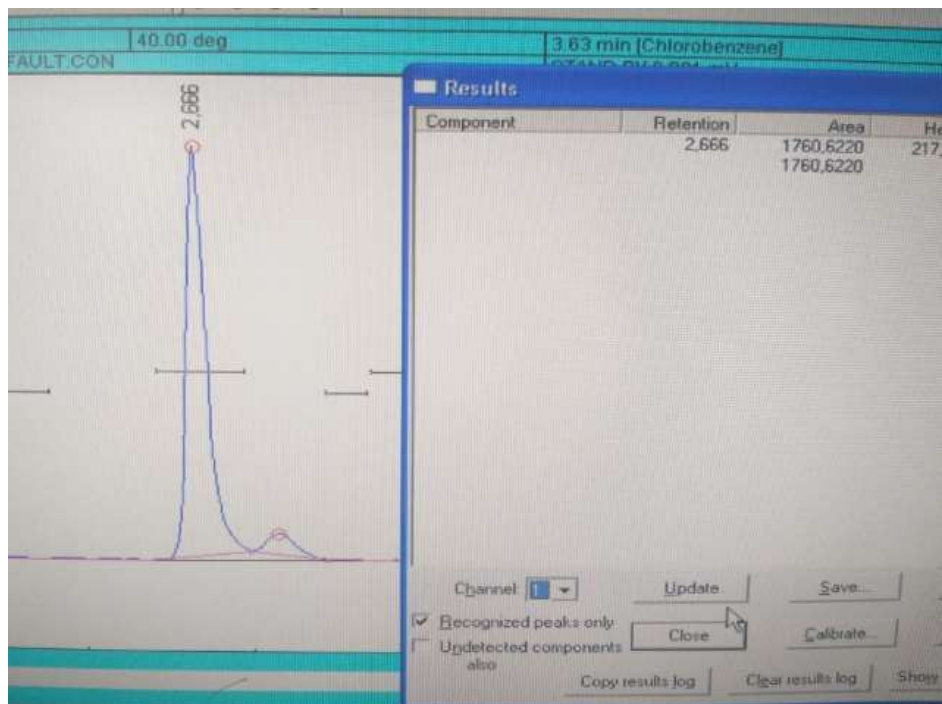
- IFU No. 17a. (2005). Valoración de ácido L-Ascórbico por HPLC en insumos cítricos.en secuencia 17a, 5, 17, 20, 21, 22, 25. Suecia. pp. 1-3.
- MARCEL, D. (1989). Validacion de Metodos Analiticos. *Nonparametric Statistical Inference*. Madison Avenue. New York. pp. 11.
- MAROTO, A., BOUE, R., RIU, J, & RIUS, F. (2002). Estrategias para el cálculo de la Incertidumbre. *Tecnicas De Laboratorio*. Universidad Rovira. i Virgili. España. pp 12.
- MILLER, J. (2008). Estadística para química analítica. Inglaterra: AddisonWesley Iberoamerica. Muñoz, M. F. *Validación de Métodos de ensayo para el análisis de parámetros físico-químicos en aguas limpias y residuales en el laboratorio de medio ambiente*. Isabel Capela. España. pp 82.
- PAPPA, H. (2013). Validación y verificación de procedimientos analíticos. *Pharmacopeya Convention*. New York. pp.12
- PASTEELNICK. (2006). Methods of Validation. *Text and methdology*. Current step 4 version. New Jersey. pp. 23
- PEÑA. (1997). La situacion alimentaria y nutricional. *Propuesta de un indice social alimentario*. pp. 121.
- RIU, J., BOQUE, R., MAROT, A., & RIUS, F. X. (2000). Exactitud y trazabilidad. *Técnicas de Laboratorio*. Universitat Rovira i Virgili. España. pp.12
- SKOOG, D., HOLLER, J., & NIEMAN, T. (2001). Principios de Análisis Instrumental (Quinta ed.). Madrid: Interamericana de España. pp. 1-5.
- SOUCCAR. (2001). La revolucion de las vitaminas. *Editorial Paidotribo*. España. pp 176.
- SUAREZ. (2015). Validacion de metodo analitico de valoracion de sulfametoxazol. *Escuela Superior Politecnica de Chimborazo*. Ecuador. pp. 89
- SWADESH, J. K. (1998). HPLC Practical and Industrial Applications. In *Instrumentation Science & Technology*. Analytical Chemistry series. United States of America. pp.

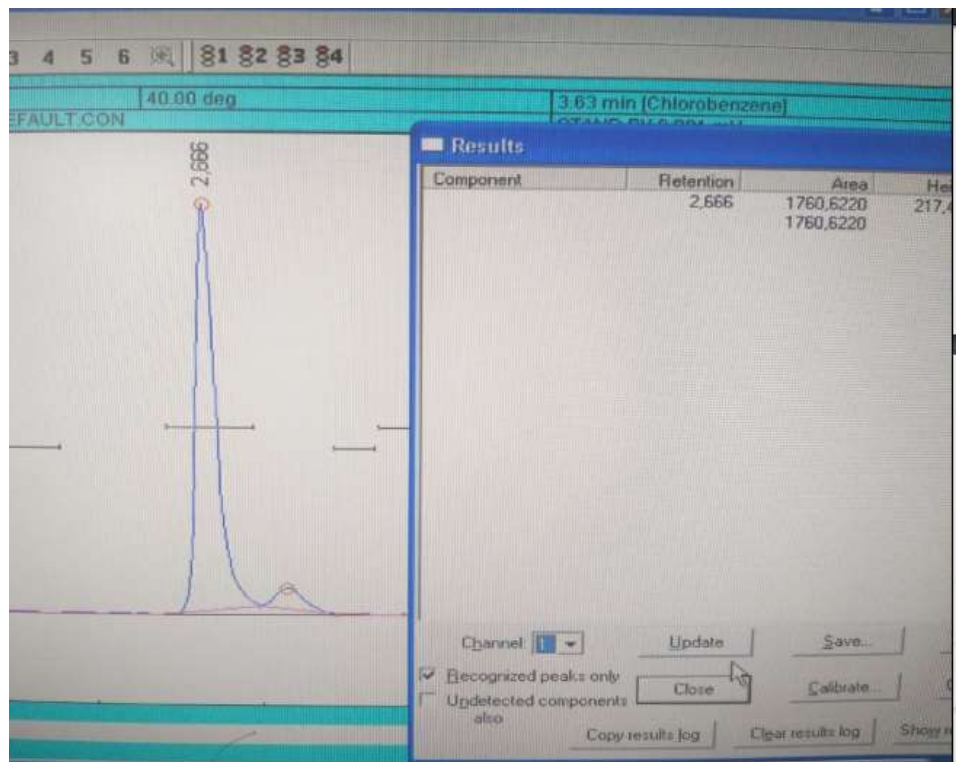
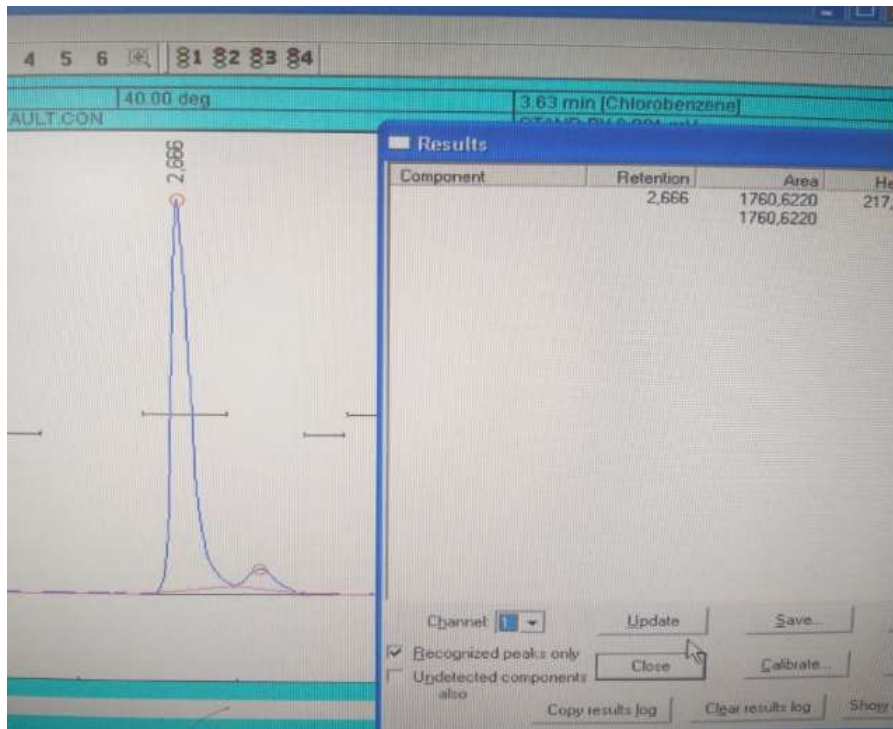
17-15, 22.

ZHAO. (2006). Method Validation & Uncertainty Report Determination of Ochratoxin A in Cereals and Pasta using Immunoaffinity Column Clean Up and HPLC with Fluorescence Detection. *Food Laboratories Division Ontario and Nunavut Region*. United States of America. pp. 14.

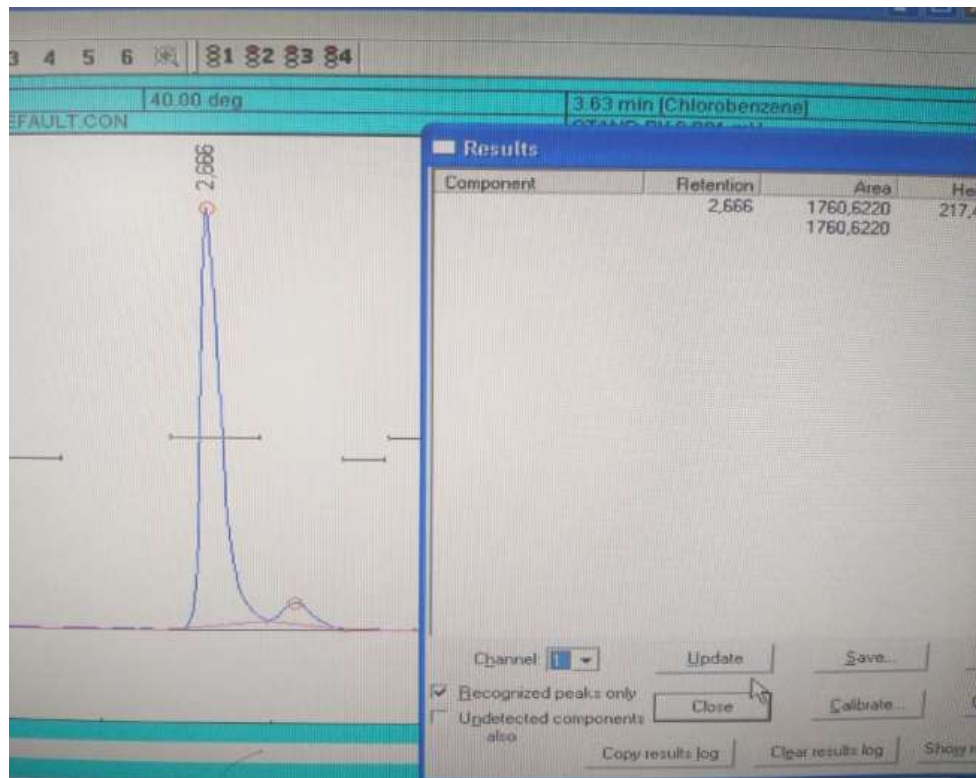
ANEXOS

ANEXO A. CROMATOGRAMAS DE ESTÁNDARES

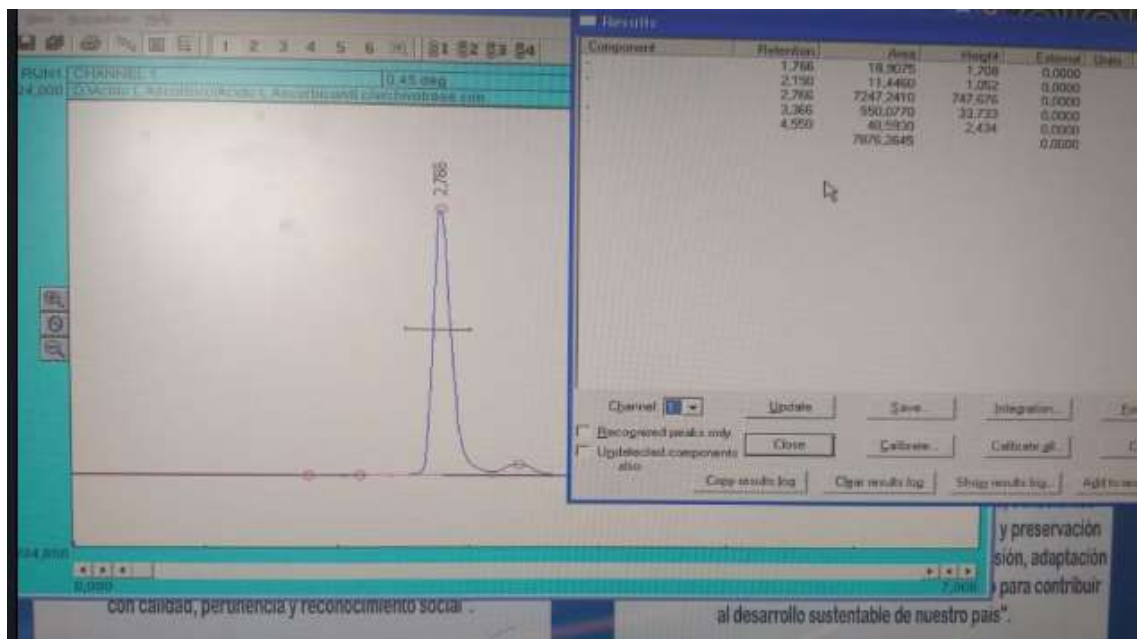




CROMATOGRAMA DE FORTIFICADOS



CROMATOGRAMA DE MUESTRAS



ANEXO B. CERTIFICADOS DE CALIBRACIÓN

PIPETA AUTOMÁTICA DE 1 ml

MÉTODO:	GRAVIMÉTRICO
PROCEDIMIENTO:	PEC.EL.25
LUGAR DE CALIBRACIÓN:	LAB. DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA (°C):	22,9
HUMEDAD RELATIVA MEDIA (%HR):	44,3
PRESIÓN ATMOSFÉRICA MEDIA (hPa):	1010

Set Point µl	Lectura µl	Error µl	Incertidumbre µl	Factor de Cobertura k
100	102,022	2,022	0,56	2,11
500	501,761	1,761	0,55	2,11
1000	1003,391	3,391	0,59	2,11

Temperatura de Referencia (°C): 20,0 Nota: Promedio de 10 mediciones

OBSERVACIONES


La estimación de la incertidumbre expandida se realizó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Guide to the expression of uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad en el laboratorio Elicrom Calibración. El presente certificado se refiere solamente al equipo arriba descrito al momento de la calibración. La temperatura del líquido de referencia que se empleó durante la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia.

CALIBRACIÓN REALIZADA POR: Ronald Arias

FECHA CALIBRACIÓN: 2018-10-09

AUTORIZADO POR:
Ing. Sabino Pineda
GERENTE TÉCNICO

RECIBIDO



PEC.EL.25

LAB. DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)

MEDIA (°C): 23,4
HUMEDAD (%HR): 47,0
PRESION MEDIA (hPa): 1010

Test Point ml	Lectura ml	Error ml	Incertidumbre ml	Factor de Cobertura k	Temperatura °C
0,5	0,489	-0,011	0,00064	2,15	24,0
2,5	2,496	-0,004	0,00084	2,11	24,0
5	5,001	0,001	0,0010	2,03	24,0

Temperatura (°C): 20,0

Nota: Promedio de 10 mediciones por cada punto

OBSERVACIONES

El presente certificado se refiere solamente al equipo arriba descrito al momento de la calibración. La temperatura reportada es la temperatura ambiente expandida se realizó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement uncertainty by means of Monte Carlo methods", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t (grado de libertad de cobertura de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación del fabricante. El presente certificado se refiere solamente al equipo arriba descrito al momento de la calibración. La temperatura reportada es la temperatura ambiente que se empleó durante la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia indicada en el certificado.

ELABORADO POR: Ronald Arias

FECHA: 2018-10-09

AUTORIZADO POR:

Ing. Sabino Pineda

RECIBIDO POR:




PIPETA DE 10 ml

CALIBRACIÓN DE BALANZA

TECNOESCALA		REGISTRO REG ECB 001 CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN DE BALANZAS		Fecha Elaboración: 03/08/2011 Fecha Última Modificación: 31/10/2014	
Rango Máximo					
Carga de Ensayo [g]	Lectura [g]	Desviación [g]			
200,00067	199,9995	0,0012	g		
Tolerancia Fabric.		-----	g		
*e.m.p (OIML)		0,0020	g		
			$\mu(m.p) [g] = 0,00011$		
INCERTIDUMBRE DE MEDICION.					
Incertidumbre Combinada	** μ_c =	0,00029	g		
Incertidumbre Expandida	***U=	0,00058	g		
			k = 2		
CONDICIONES AMBIENTALES					
PARAMETRO	MINIMO	MAXIMO			
Temperatura [°C]	19,4	19,6			
Humedad [%RH]	48,8	49,8			
TRAZABILIDAD DE LOS PATRONES UTILIZADOS DE PESO Y TEMPERATURA					
NOMBRE	MARCA	SERIE	CERTIFICADO NO.	FECHA CAL.	PROX. CAL.
JUEGO DE PESAS DE 1 mg A 500 g. CLASE OIML F1	HANJING	EQU-PES-025	PES-JLL-003-2018 PES-JLL-004-2018 TECNOESCALA	22-nov-18	feb-19
TERMOHIGROMETRO DIGITAL TRACABLE 1.1% A 30.5 50% RH 40.0°C A 75.0°C	COLE PARMER MODELO 9090-03	111376976 EQU-TER-001	LNM-11 2017900050D	29-may-17	may-19
OBSERVACIONES:					
Tipo de trabajo: MANTENIMIENTO					

CALIBRACIÓN DE BALON DE AFORO DE 25 ml

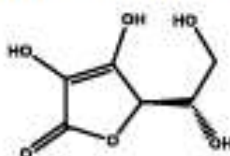
IDENTIFICACIÓN DEL EQUIPO					
PROBETA GRADUADA	CÓDIGO ASIGNADO:	NO APLICA			
LMS	RESOLUCIÓN / SUBDIVISIONES:	0.5			
CLASE A	UNIDAD DE MEDIDA:	ml			
NO ESPECIFICA	CAPACIDAD / RANGO:	(5 a 25) ml			
MV04-25.1	UBICACIÓN:	NO ESPECIFICA			
PATRONES UTILIZADOS					
NOMBRE	MARCA	MODELO	SERIE	FECHA CAL.	
BALANZA ANALITICA	SARTORIUS	CPA225D	26309088	02-may-18	
TERMOMETRO DIGITAL	ATM	ST-9215A	NO ESPECIFICA	01-sep-17	
BARÓMETRO DIGITAL	CONTROL COMPANY	1081	150322677	27-oct-17	
TERMOHIGROMETRO	CENTER	342	170500256	23-mar-18	
CALIBRACIÓN					
GRAVIMÉTRICO					
PEC.EL.25					
LAB. DE MASA Y VOLUMEN (ELICROM)					
CONDICIÓN:					
TEMPERATURA AMBIENTAL MEDIA (°C):	24.3				
HUMEDAD RELATIVA MEDIA (%HR):	45.9				
PRESIÓN BAROMÉTRICA MEDIA (hPa):	1008				
Set Point	Lectura	Error	Incertidumbre	Factor de Cobertura	Temperatura
ml	ml	ml	ml	k	°C
5	5.013	0.013	0.20	2.0	22.7
15	15.018	0.018	0.20	2.0	22.7
25	25.071	0.071	0.20	2.0	22.8
Temperatura de Referencia (°C): 20.0			Nota: Promedio de 10 mediciones por cada punto		
OBSERVACIONES					
<p>La incertidumbre expandida se realizó con base en el documento JCGM 100:2008 (GUM 1995 with minor corrections) "Evaluation of measurement uncertainty in measurement", multiplicando la incertidumbre típica combinada por el factor de cobertura k, que para una distribución t con una probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95,45%. Este certificado no podrá reproducirse excepto en su totalidad sin la aprobación de la autoridad de calibración. El presente certificado se refiere solamente al equipo arriba descrito al momento de la calibración. La temperatura reportada es la temperatura de referencia que se empleó durante la calibración. Los resultados han sido corregidos de acuerdo a la temperatura de referencia reportada.</p>					
ELABORADO POR:		Johanna Zevallos			
FECHA:		2018-07-04			
AUTORIZADO POR:					
RECIBIDO POR:					

Certificate of Analysis

ISO 17034
ANAB Cert# AR-1470

ISO/IEC 17025
ANAB Cert# AT-1467

ASCORBIC ACID CERTIFIED REFERENCE MATERIAL



CERTIFIED PURITY: 99.8%, $U_{\text{CRM}} = \pm 0.06\%$ $k = 2$
(Mass Balance/as is basis)

NOMINAL PACKAGE SIZE: 10g

CATALOG #: PHR1008

LOT #: LRAB3631

CERTIFICATE VERSION: LRAB3631.4

ISSUE DATE: 30 November 2018

Note: Certificates may be updated due to Pharmacopetal Lot changes or the availability of new data.

Check our website at: www.sigma-aldrich.com for the most current version.

CRM EXPIRATION: 31 December 2021 (Proper Storage and Handling Required).

RECEIPT DATE: _____

Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.

STORAGE: Store in a Refrigerator/Protect from Light, keep container tightly closed.
Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

CHEMICAL FORMULA: $C_6H_8O_6$

MW: 176.12

PHYSICAL DESCRIPTION: White powder in amber vial

CAS #: 50-81-7

HAZARDS: Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.

SIGMA-ALDRICH

INSTRUCTIONS FOR USE: Do not dry, use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material. This material is intended for Laboratory Use only. Not for drug, household or other uses.

TRACEABILITY ASSAY

Comparative assay demonstrates direct traceability to Pharmacopeial Standards

ASSAY vs. USP REFERENCE STANDARD (as is basis)

<u>ASSAY VALUE</u>	<u>vs. USP LOT</u>
99.7%	Y06390
	Labeled Content = 1.00 mg/mg

ASSAY vs. BP CRS (as is basis)

<u>ASSAY VALUE</u>	<u>vs. BP BATCH</u>
99.0%	3988
	Labeled Content = 100.0%

METHOD: HPLC (ref.: Ascorbic Acid Injection, Current Compendial Monographs)

Column: Phenomenex Gemini C-18, 4.6 x 250mm, 5µm

Mobile Phase: 2.04 g/L Monobasic potassium phosphate in Water (pH 3.0)

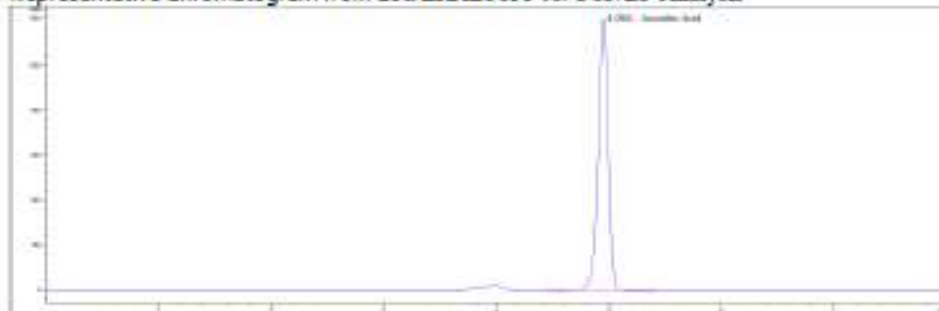
Flow Rate: 1.0 mL/min

Column Temperature: 30°C

Injection: 5 µL

Detector: 245nm

Representative Chromatogram from Lot: LRAB3631 vs. USP/BP Analysis



ASSAY vs. EP CRS (as is basis)

ASSAY VALUE	vs. EP BATCH
100.4%	4.1
	Labeled Content = None
	Assigned Content = 100.7%*

*The assigned content of the EP CRS was determined by assay against the USP Reference Standard and the BP CRS

METHOD: HPLC (ref.: Ascorbic Acid Injection, Current Compendial Monographs)

Column: Tosoh TSKgel SuperOligo PW, 6 x 150mm, 3µm
Mobile Phase: 7.8g/L NaH₂PO₄ + 6.1g/L KH₂PO₄ in Water (pH 2.5)
Flow Rate: 0.6mL/min
Column Temperature: 30°C
Injection: 4µL
Detector: 245nm

Representative Chromatogram from Lot: LRAB3631 Analysis



PURITY DETERMINATION BY MASS BALANCE

CHROMATOGRAPHIC IMPURITY ANALYSIS

METHOD: HPLC (ref.: Ascorbic Acid, Current Compendial Monographs)

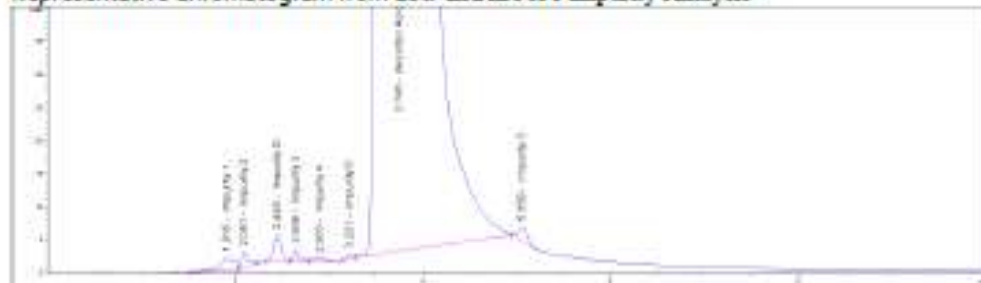
Column: Supelcosil NH₂, 4.6 x 150mm, 3µm
Mobile Phase: 6.8g/L KH₂PO₄ in H₂O, Acetonitrile (25:75)
Flow Rate: 1.0mL/min
Column Temperature: 45°C
Injection: 20µl
Detector: 210nm

Impurities Detected:

Impurity 1:	0.002%	Impurity 2:	0.003%
Impurity D:	0.17%	Impurity 3:	0.003%
Impurity 4:	0.0008%	Impurity 5:	0.0009%
Impurity C:	0.06%		

Total Impurities: 0.23%

Representative Chromatogram from Lot: LRAB3631 Impurity Analysis



RESIDUAL SOLVENTS

Method: GC-MS Headspace (ref.: Residual Solvents USP <467>)

Column: DB-1301

Carrier gas: He

Flow: 1.2mL/min

Split Ratio: 1:5

Injection/Temperature: 1µl/250°C

Temperature Program: 40°C for 20min, 10°C/min to 240°C, hold 20min

Solvents Detected: None

WATER DETERMINATION

Method: Karl Fisher titration

Mean of three measurements, Water Content = 0.006%

RESIDUE ANALYSIS

Method: Sulfated Ash

Sample Size: ~0.1g

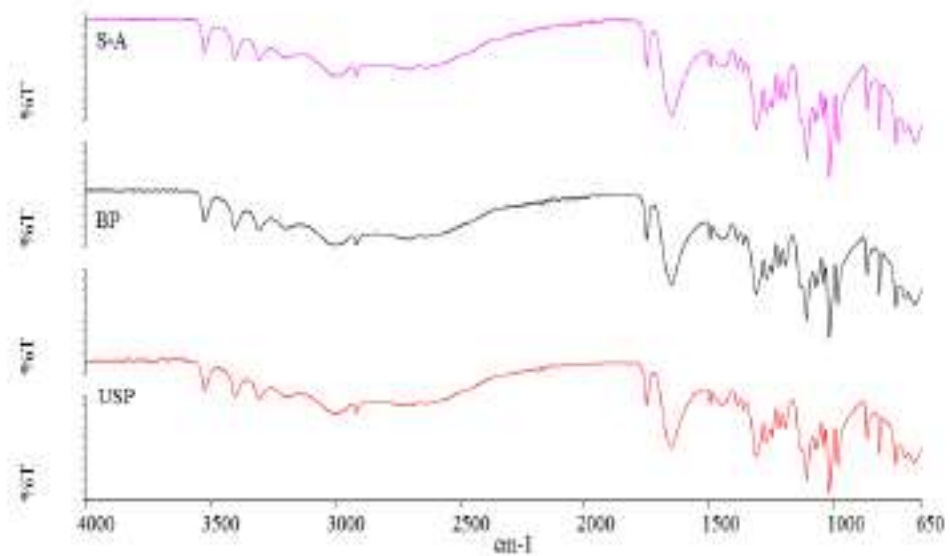
Mean of three measurements, Residue = 0%

CERTIFIED PURITY BY MASS BALANCE [100% - Impurities (normalized)]

99.8% $U_{\text{cert}} = \pm 0.06\%$, $k = 2$
(as is basis)

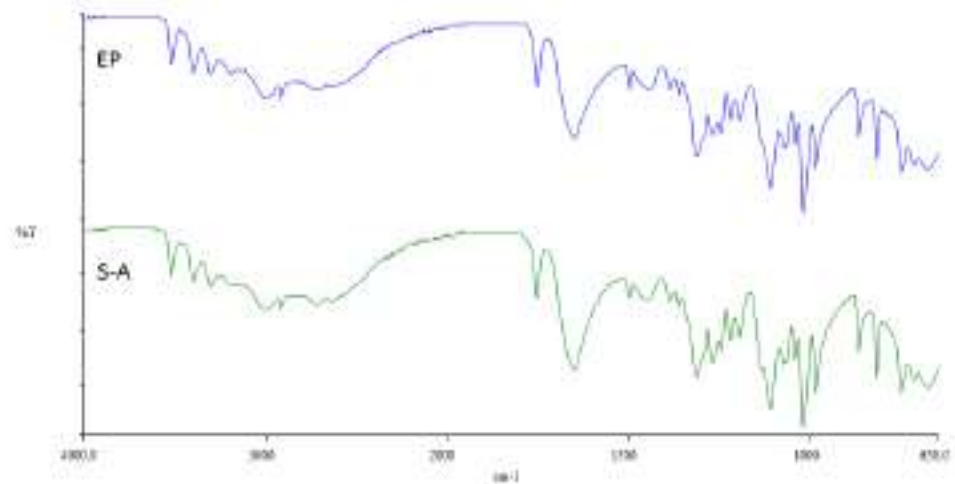
IDENTIFICATION TESTS

INFRARED SPECTROPHOTOMETRY (Comparative identification analysis demonstrates direct traceability to Pharmacopeial standards)



— Ascorbic Acid S-A Lot LRAB3631
 — Ascorbic Acid BP Batch 3988
 — Ascorbic Acid USP Lot Y06390

PERKIN ELMER SPECTRUM 100
 SAMPLING: UNIVERSAL ATR

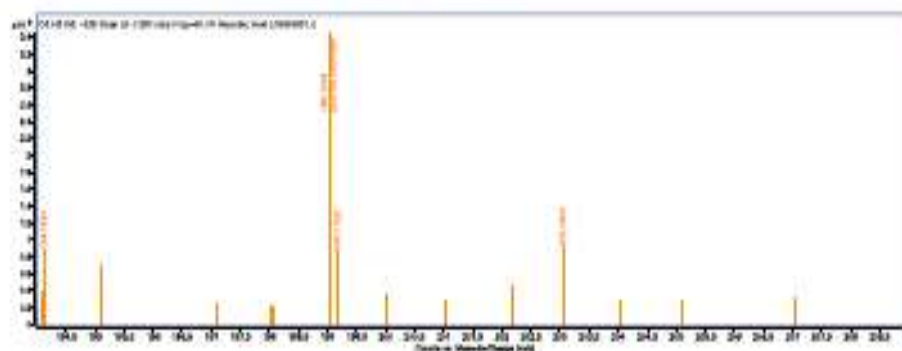


— Ascorbic Acid EP Batch 4.1
 — Ascorbic Acid S-A Lot LRAB3631

PERKIN ELMER SPECTRUM 100
 SAMPLING: UNIVERSAL ATR

MASS SPECTRUM

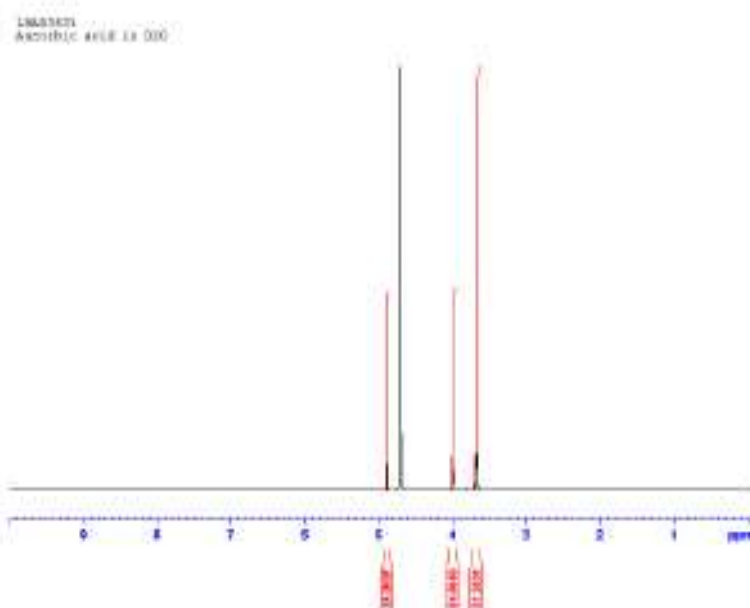
Method: HR-QTOF; 4.0 kV ESI+; temperature: 325 °C



Theoretical value: 199.0219 m/z

The signal of the MS spectrum is consistent with the theoretical value and its interpretation is consistent with the structural formula.

¹H NMR (Data provided by an external laboratory; not in scope of accreditation)



Consistent with structure

MELTING RANGE

Specification: 190-192°C, with decomposition (Literature)
Mettler Toledo FP900 Thermosystem with FP81 Measuring Cell
Mean of three measurements = 190 – 192°C

OPTICAL ROTATION

Specification: Between +20.5° and +21.5° (USP)
Perkin Elmer Polarimeter 343
Wavelength: 589nm
Concentration: 100mg/mL in Water
Cell Path: 100mm
Mean of three Measurements = +21.0°

HOMOGENEITY ASSESSMENT

Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Analytical Method: HPLC

Sample size: ~25 mg

UNCERTAINTY STATEMENT

Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty ($U_{95\%}$) corresponding to the 95% confidence interval. $U_{95\%}$ is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k , which is obtained from a t -distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies.

STABILITY ASSESSMENT

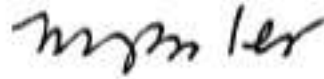
Significance of the stability assessment will be demonstrated if the analytical result of the study and the range of values represented by the Expanded Uncertainty do not overlap the result of the original assay and the range of its values represented by the Expanded Uncertainty. The method employed will usually be the same method used to characterize the assay value in the initial evaluation.

Long Term Stability Evaluation - An assessment, or re-test, versus a Compendial Reference Standard may be scheduled, within the 3 year anniversary date of a release of a Secondary Standard. The re-test interval will be determined on a case-by-case basis.

Short Term Stability Study - It is useful to assess stability under reasonably anticipated, short term transport conditions by simulating exposure of the product to humidity and temperature stress. This type of study is conducted under controlled conditions of elevated temperature and humidity.



QC Manager



Head Quality Assurance

APPENDIX

Original Release Date: 26 April 2017
Stability Test Date: 30 November 2018
Requalification Test Date: 30 November 2018

ANEXO D. MÉTODO DESARROLLADO PARA EL LABORATORIO DE CIENCIAS

FACULTAD: CIENCIAS
CARRERA: QUÍMICA

GUÍA DE LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

PRÁCTICA No. 01 Determinación de Vitamina C en jugos cítricos por HPLC

1. DATOS GENERALES:

NOMBRE: estudiante(s)

CODIGO(S): de estudiante(s)

.....

.....

GRUPO No.:

FECHA DE REALIZACIÓN:

FECHA DE ENTREGA:

06/07/2019

07/07/2019

2. OBJETIVO:

- Determinar el contenido de Vitamina C en ácido L-Ascórbico en una muestra de jugo cítrico.
- Calcular la concentración en ppm, por medio de una curva de calibración
- Preparar una solución madre, puntos de estándar para realizar la curva de calibración

3. INSTRUCCIONES

3.1. Sustancias y Reactivos:

- Ácido ortofosfórico
- Agua grado II
- Estándar de Ácido L-Ascórbico
- Metanol grado HPLC

3.2. Materiales y Equipos:

- HPLC SHIMADZU USA FCVLC-10A'
- Baño María Ultrasonido Sonificador FC-L. INV-012.
- Bomba de vacío BOECO R-400 – FC-L INV-011

- Balón de aforo de 25 ml, 100ml y1000 ml
- Balanza
- Pipeta automática de 10 ml
- Pipeta automática de 1 ml
- Espátula con cuchara
- Papel aluminio
- Viales para HPLC
- Filtros de jeringa PTFE 0.45 um y 13 mm
- Membrana PVDF de 0.45 um

3.3. Procedimiento:

Preparación de Fase Móvil (ácido ortofosfórico al 0.05 M.

La solución de fase móvil ocupada se preparó partiendo del ácido ortofosfórico al 63%, donde se debe 3.7 ml y se aforar hasta un litro en un balón de aforo de 1000 ml con agua bidestilada, o agua grado II, después filtrar por medio de una membrana PVDF de 0.45 µm, y colocar en el recipiente destinado a contener la fase móvil, Colocar al ultrasonido durante 15 minutos para desgasificar.

Preparación de solución madre 50 ppm

En la balanza analítica, se pesar 0.0050 gramos de estándar de Ácido L-Ascórbico, diluir y aforar con fase móvil en un balón de 100 ml, para obtener una solución madre de 50 ppm, se colocar papel aluminio para salvaguardar la solución para usarla de inmediato.

Preparación de puntos estándar

A partir de la solución estándar de 50 ppm, calcular por medio de la fórmula Ec.1 y en la tabla se encuentran los valores a tomar utilizando una pipeta automática de 10 ml para preparación cada punto.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Ec.1

Tabla 1. Preparación de puntos de estándar

Punto de Estándar (ppm)	Volumen de Aforo (ml)	Volumen a tomar de la solución madre (ml)
5	25	2.5
7	25	3.5
9	25	4.5
12	25	6

45	25	7.5
25	25	12.5

Preparación de fortificados

Utilizando la relación de la Ec. 1 a partir de la solución madre se debe obtener el valor de un punto de fortificado siendo 15, 20 o 25 ppm. Utilizando un jugo neutro (Sin contener el analito para el método). Se debe fortificar utilizando una pipeta automática en 5 ml de muestra de jugo neutro y aforar a en un balón de 100 ml con fase móvil.

Preparación de la muestra

- Exprimir 10 a 15 ml de jugo cítrico u obtener 15 ml del jugo cítrico procesado
- Eliminar pepas y contaminantes sólidos por filtración simple
- Medir el peso de 5 ml del jugo en una balanza analítica y obtener ese peso en gramos para cálculos futuros
- Aforar los 5 ml de jugo cítricos hasta 100 ml con fase móvil
- Encender el equipo HPLC
- Ajustar las condiciones del equipo:

- Volumen de inyección 20 uL

- Longitud de onda: 254 nm
- Temperatura del horno de columna: 30 C
- Flujo de fase móvil: 1 ml/min
- Tiempo dentro del autosampler 5 minutos
- Tiempo del cromatograma 7 minutos

- Esperar las condiciones del equipo HPLC se ajusten a lo programado
- Empezar a correr los puntos de estándar en orden creciente
- Correr el o los puntos fortificados utilizados
- Correr las muestras utilizadas para la práctica.

4. ACTIVIDADES POR DESARROLLAR:

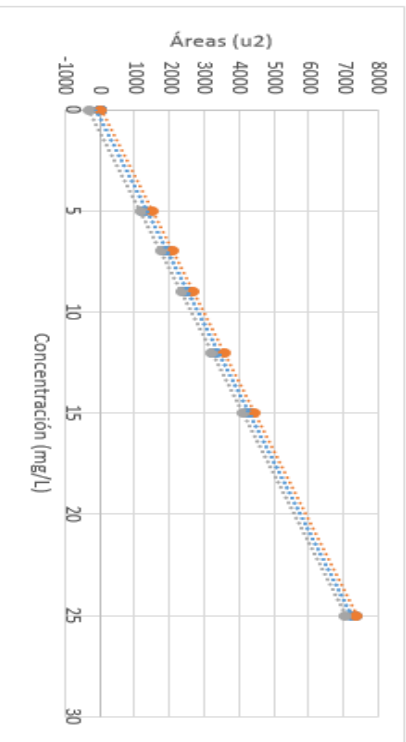
4.1. Datos Experimentales:

Tabla 4.1-1
Referente a Pérdida de Humedad

Estimación lineal	Valores
Pendiente
Intercepto
Coefficiente de correlación
Desviación estándar pendiente
Desviación estándar intercepto

Fuente (.....)

Gráfico. Regresión lineal



“SI EL VALOR DE R² (COEFICIENTE DE CORRELACIÓN ES MENOR A 0.995 LA CURVA DEBE REPETIRSE, DEBIDO A QUE NO CUMPLE CON UNO DE LOS PRINCIPALES OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA”.

4.2. Cálculo de concentración real de área de ppm de los puntos de estándar.

Concentración teórica	Área obtenida en el equipo	Datos obtenidos de la curva $x=y-a/b$	Unidades
			mg/L

- **Cálculo de concentración de fortificados y muestra de ppm (mg/L) y a muestra (mg/Kg).**

Al realizar la conversión desde área hasta mg/L se debe hacer un cambio final para expresar en muestra.

Ejemplo:

$$\frac{1mg}{L} \times \frac{0.1L}{10g} * \frac{1000g}{1Kg} = 10 \frac{mg}{Kg}$$

4.3. Cálculo de % de recuperación de los fortificados

$$\%R = \frac{Concentración\ real}{Concentración\ teórica} \times 100$$

Para aceptar los valores del porcentaje de recuperación se debe encontrar entre el 90 al 110%, caso contrario se debe repetir el o los puntos de fortificado.

5. RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados a obtener son:

- Concentración teórica y real de los puntos de estándar
- Concentración teórica y real de los puntos de fortificado
- Concentración teórica de muestras
- Cálculo de estimación lineal

5.1. Referente a cromatografía

- Método IFU. No 17
- AOAC 832.1

5.2 Resultados de concentración de muestra

Tabla 5.2.1

EQUIPO	Unidades	RESULTADOS DE Vitamina C en muestras	
ÁREAS	U ²	Teórica	*****
		Real	*****

6. CONCLUSIONES

- Se determina la concentración

7. RECOMENDACIONES

- Utilizar los equipos de seguridad en el laboratorio: Mandil, Guantes,
- Mascarilla, Cofia, Gafas.
- Mantener el orden en el laboratorio
- No comer ni bebe en el laboratorio

- Llevar a cabo todas las ordenes y recomendaciones dada por el técnico
- docente responsable
- Revisar la técnica de la práctica con anticipación

.....
Ing. Raquel Coba
Técnica Docente.

ANEXO E. FOTOS



HPLC



PUNTOS DE CALIBRACIÓN



EQUIPO DE FILTRACIÓN



PREPARACIÓN DE MUESTRAS



ESTÁNDAR DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO