

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

“Validación de una Metodología para la Cuantificación Simultánea de Vitaminas
A y E en Margarinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución”



Informe de Tesis

Presentado por

Rodrigo Alejandro García López

Para optar al título de

Químico

Guatemala, Febrero de 2008

Índice

	página
I. Resumen	4
II. Introducción	5
III. Antecedentes	6
3.1. Validación de Métodos Analíticos	6
3.2. Parámetros en la Validación de Métodos Analíticos	6
3.1.1. Precisión	6
3.1.2. Exactitud	7
3.1.3. Linealidad	7
3.1.4. Límite de Cuantificación	8
3.1.5. Rango	8
3.1.6. Selectividad	8
3.1.7. Robustez	8
3.1.8. Estabilidad de Muestras en Solución	9
3.3. Matriz de la Margarina	9
3.4. Extracción de vitaminas en Margarina	9
3.5. Deficiencia de Vitaminas A y E en Guatemala	9
3.6. Fortificación de Margarina con Vitaminas A y E	11
IV. Justificación	12
V. Objetivos	13
VI. Hipótesis	14
VII. Materiales y Método	15
7.1. Universo de Trabajo	15
7.2. Recursos	15
7.2.1. Humanos	15
7.2.2. Institucionales	15
7.2.3. Materiales	16
7.2.4. Método	17
7.2.5. Interpretación de Resultados	22

VIII.	Resultados	24
IX.	Discusión de Resultados	29
X.	Conclusiones	32
XI.	Recomendaciones	33
XII.	Referencias	34

Anexos

I. Resumen

Debido a la inexistencia de una metodología oficial para la cuantificación de vitaminas en margarina se realizó la validación de la cuantificación de la vitamina A en margarina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, la validación se llevó a cabo siguiendo los lineamientos de la FDA (Federal Drug Association). Se determinó que la metodología en estudio es precisa: la repetibilidad obtenida para el análisis de una misma muestra fue 0.03% de desviación estándar relativa; es reproducible, las medias de análisis realizados entre diferentes analistas son estadísticamente iguales. Es exacta, presenta una media equivalente al 100% de recuperación con respecto a la concentración esperada de muestras preparadas con concentraciones conocidas de analito. Es lineal, presenta un coeficiente de regresión de 0.9993 de un rango válido entre 40 y 60 UI/g de muestra. El límite de cuantificación de la metodología es de 3.01UI/g de muestra, la metodología es selectiva a condiciones de hidrólisis, oxidación y alta temperatura, robusta a cambios de instrumentación y condiciones en la metodología y sus muestras permanecen estables por espacio de un día para su análisis luego de ser preparadas.

Además de validar la metodología, durante el proceso del presente trabajo se encontraron hallazgos interesantes, se determinó que la margarina al ser comercializada ya ha perdido las vitaminas con las cuáles fue fortificada, esta determinación abre las puertas a futuras investigaciones acerca de las vitaminas en alimentos.

II. Introducción

Las vitaminas son importantes nutrientes en la dieta de los seres humanos, se encuentran en pequeñas cantidades en varios alimentos. En países en vías de desarrollo varios alimentos son fortificados con ellas para suplir las deficiencias de vitaminas a causa de dietas pobres en este tipo de nutrientes. En Guatemala la margarina es fortificada con vitaminas A y E. El proceso de fortificación de un alimento básico debe implicar un estricto control de calidad ya que se encuentra en juego la nutrición de las personas que los ingieren, en Guatemala no se cuenta con una metodología oficial para llevar éste control. Con este trabajo se busca validar una metodología eficiente y válida para cuantificar vitaminas A y E en la margarina.

Las vitaminas en general presentan características particulares que hacen que su análisis sea por demás interesante, son sensibles a isomerización y degradación total si son sometidas a condiciones variables de pH, temperatura, oxidación y fotólisis. Es viable analizar vitaminas por Cromatografía de Alta Resolución ya que el procedimiento es llevado a cabo a temperatura ambiente, no necesita derivatización y se utilizan reactivos e instrumentación básica.

La validación de la cuantificación de de vitaminas en margarinas es un proceso que conlleva etapas previas: la extracción de los analitos y tratamiento de la muestra, luego de estas etapas la metodología de análisis será validada tomando en cuenta los criterios analíticos de precisión, exactitud, linealidad, límite de cuantificación, rango, selectividad, robustez y estabilidad de muestras en solución, todo este procedimiento se llevará a cabo con el fin de contar con un método confiable y preciso para el análisis de vitaminas en margarina que será de utilidad para Guatemala.

III. Antecedentes

3.1. Validación de Métodos Analíticos

Muchos procedimientos químicos, bioquímicos y biológicos son de tipo analítico y requieren de estándares apropiados de exactitud y confiabilidad; es por ello que cuando se desea emplear una metodología, se hace necesario validarla o compararla con un método estándar o de referencia. Para implementar definitivamente dicha metodología, se debe evaluar la claridad y perfección de la descripción del método analítico, determinar las necesidades para su implementación y realizar un análisis de los resultados obtenidos para verificar que este ha sido validado. La validez de un método analítico puede determinarse únicamente por medio de estudios de laboratorio. Pudiéndose definir la validez de un método como la demostración de que éste funciona adecuadamente para los fines que fue propuesto.(1)

A continuación se exponen los 8 criterios analíticos para validar un método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, estos criterios no son rígidos y cambian de acuerdo a las características del método a realizar. Los criterios analíticos a evaluar en el método fueron seleccionados según los requerimientos de la FDA para la técnica analítica de HPLC y de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, que se aplican a ésta técnica analítica.

3.2. Parámetros en la Validación de Métodos Analíticos

3.2.1. Precisión

Mide el grado de concordancia entre valores obtenidos al aplicar el método analítico en una o más muestras homogéneas de concentración conocida. Se establece en base a la repetibilidad y reproducibilidad.(1)

3.2.1.1. Repetibilidad:

Es el grado de variación que se obtiene cuando el método es aplicado por el mismo analista, para ello se analiza la muestra 10 veces, se calcula la media y la desviación estándar relativa.(1)

3.2.1.2. Reproducibilidad

Es el grado de variación que se obtiene cuando el método es aplicado por diferentes analistas, bajo diversas condiciones de análisis como por ejemplo variando el día del ensayo.(1)

3.2.2. Exactitud

Es el grado de concordancia entre el valor experimental obtenido por el método instrumental y el valor real o verdadero. Puede determinarse en base al porcentaje de recuperación del analito y a la relación lineal entre cantidad detectada y cantidad presente del analito.(1)

3.2.3. Linealidad

Es la propiedad del método para demostrar la relación entre la concentración del analito y la concentración medida instrumentalmente. La linealidad puede establecer una relación directamente proporcional de la concentración del analito en las muestras y se representa matemáticamente por medio de una ecuación. Usualmente puede expresarse en términos de la varianza alrededor de la pendiente de la ecuación de regresión de la respuesta instrumental, obtenida por el análisis de muestras con diferentes concentraciones del analito.(1)

3.2.4. Límite de Cuantificación

Es la cantidad mínima del analito que permite ser cuantificada por el método instrumental, cumpliendo con las exigencias de exactitud y precisión, se expresa en las unidades de medida del analito.(1)

3.2.5. Rango

Son las concentraciones para las cuáles es válida la aplicación de la metodología tomando en cuenta la exactitud y linealidad del método.(2)

3.2.6. Selectividad

Se define como la característica del método por la cuál los compuestos endógenos de la matriz u otros, no interfieren en la detección del analito deseado. En otras palabras la habilidad del método para medir con exactitud específicamente el analito en presencia de otros componentes que puedan estar presentes en la muestra. Puede expresarse como el grado de sesgo de los resultados de la prueba, obtenidos por el análisis de ésta en presencia de impureza, productos de degradación, compuestos químicos relacionados o elementos que conforman la matriz, al compararlos con los resultados obtenidos sin la adición de dichas sustancias.(1)

3.2.7. Robustez

Es el grado de reproducibilidad del método cuando se analiza la misma muestra bajo diversas condiciones, como serían diferentes laboratorios, analistas, instrumentos, lotes de reactivos, tiempo transcurrido entre los ensayos, cambios de temperatura y ambiente. Puede decirse que un método es robusto cuando las variables operacionales y ambientales del análisis no afectan los resultados.

Para la determinación de la robustez de un método se realizan ensayos colaborativos con varios laboratorios, aplicándose diseños experimentales adecuados a las fuentes de variación a las que se somete el método.(1)

3.2.8. Estabilidad de Muestras en Solución

La estabilidad de las muestras en solución nos indican cuanto tiempo disponemos luego de preparar nuestras muestras para analizarlas antes que las concentraciones de éstas varíen y arrojen resultados erróneos.(2)

3.3. Matriz de la Margarina

La matriz de la muestra a analizar contiene leche, agua, aceite vegetal, emulgentes (mono o di-estearatos), saborizantes, preservantes, sal común al 3% del peso, funde entre 26 a 32°C y tiene un comportamiento fusible a determinada temperatura.(8)

3.4. Extracción de Vitaminas en margarina

La muestra es digerida con una solución de Hidróxido de Potasio etanólico, y las vitaminas A y E son extraídas con Hexano utilizando una columna Extrelut® NT20. Se agrega una solución de pirogallol para prevenir la destrucción de las vitaminas luego de la evaporación, el residuo es disuelto en Hexano para su posterior análisis por HPLC.(3)

3.5. Deficiencia de Vitamina A y E en Guatemala

Estudios recientes revelan que 15% o más de los niños en edad preescolar están afectados por una carencia subclínica de vitamina A en el Ecuador, México y la República Dominicana, y que la carencia subclínica persiste en los niños menores de 3 años en Colombia, Guatemala, Honduras y el Perú.(9)

La carencia de vitamina A es la causa más importante de ceguera infantil en los países en desarrollo y, en niveles subclínicos, contribuye considerablemente a la morbilidad y mortalidad elevadas causadas por infecciones infantiles comunes. (9) A causa de la carencia de vitamina A, en la piel se producen cambios que se manifiestan por la atrofia de las glándulas sebáceas e hiperqueratinización del epitelio. La piel se pone seca y rugosa. Se tienen pruebas de que la deficiencia de vitamina A afecta negativamente la utilización de proteínas dietéticas.(10)

La deficiencia de vitamina A ha sido considerada como un problema de salud pública en Centroamérica. En 1965 se llevó a cabo una evaluación nutricional por INCAP/OIR. La que mostró que entre 76 y 95% de la población rural de Centroamérica y Panamá, ingería menos del 75% de las recomendaciones dietéticas diarias de vitamina A y entre 66 y 88% de la población no llenaba dicha recomendación. Se demostró que el 26% de entre 1 y 4 años de edad, presentan niveles séricos menores o iguales a 20 µg. diarios. En 1975 se desarrolló una encuesta en niños preescolares de doce comunidades de Guatemala, la cual indicó que un 21.5% de ellos presentaban séricos bajos de vitamina A, debido a la fortificación del azúcar, la prevalencia de los niveles séricos bajos de retinol, disminuyó.(11)

La deficiencia en vitamina E se caracteriza generalmente por trastornos neurológicos debidos a una mala conducción de los impulsos nerviosos. Esta vitamina es muy importante en los procesos de absorción del tracto gastrointestinal.(8) En Guatemala no se han hecho estudios que indiquen la carencia de vitamina E en la población.

3.6. Fortificación de Margarina con Vitaminas A y E

La fortificación de los alimentos con vitamina A y E es una estrategia básica para reducir la carencia de estas vitaminas en varios países, que está siendo adoptada en muchos otros. Actualmente, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Venezuela tienen en marcha programas de fortificación de los alimentos que incluyen la fortificación con vitamina A y E, en particular del azúcar y otros alimentos. Los países centroamericanos, que tienen experiencia más amplia con la fortificación de los alimentos, han logrado mejoras significativas en relación con la carencia de vitamina A y E. (9)

En Guatemala se fortifican las margarinas con vitaminas A, E y D. La única normada es la vitamina A para la cual se especifica una concentración de 15,000 a 50,000 UI/Kg. En cuanto a la vitamina E y D no existen regulaciones al respecto. (12) Guatemala no cuenta con análisis autorizados para la evaluación de vitaminas en margarina.

IV. Justificación

Guatemala es un país en el que muchas personas padecen de trastornos nutricionales debido a la calidad de la dieta que es ingerida, por esta razón el gobierno ha impuesto normas en los niveles de nutrientes de ciertos alimentos de consumo básico, entre los más importantes se encuentran las vitaminas.

Uno de los alimentos fortificado con vitaminas es la margarina, la cual debe de estar fortificada con vitamina A. En el país no existe una metodología reproducible para cuantificar vitaminas A y E en margarinas por lo que la metodología a validar en el presente proyecto será propuesta para ser utilizada como análisis rutinario en el control de calidad de la margarina producida y comercializada en Guatemala.

El análisis de margarina que se validará es una propuesta versátil ya que en un mismo análisis se realiza la cuantificación de vitamina A y E por lo que el costo y tiempo invertidos en el análisis son razonables teniendo en cuenta el beneficio obtenido. El equipo e insumos necesarios para su análisis son accesibles para un laboratorio de control de calidad y el personal se capacita en corto tiempo. El análisis al ser validado será de mucha utilidad a nivel nacional, en el sector público y privado.

V. Objetivos

5.1. General:

5.1.1 Validar una metodología para la cuantificación simultánea de vitaminas A y E en margarinas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

5.2. Específicos:

5.2.1 Determinar la precisión, exactitud, linealidad, límite de cuantificación, y rango de validez del método.

5.2.2 Determinar la selectividad del método.

5.2.3 Determinar la robustez del método.

5.2.4 Determinar la estabilidad de las muestras en solución del método.

VI. Hipótesis

No se postula una hipótesis debido a que el trabajo a realizar es la validación de un método, de no realizarse bajo los niveles de confianza establecidos el trabajo tendría poca relevancia.

VII. Materiales y Método

7.1. Universo de Trabajo: Dada la naturaleza del estudio no aplica definir población y muestra

7.2. Recursos:

7.2.1 Humanos:

7.2.1.1. Tesista: Br. Rodrigo García

7.2.1.2. Revisor: Licda. Silvio Coto

7.2.1.3. Asesor Externo: Lic. Jorge García

7.2.1.4. Personal de RGH, S.A.

7.2.2 Institucionales:

7.2.2.1 Empresa RGH, S.A.

7.2.2.2 Unidad de Análisis Instrumental, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2.2.3 Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2.3 Materiales:

7.2.3.1. Material y Equipo de Laboratorio:

- Cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom Clásico con detector UV Merck Hitachi LaChrom L-7400
- Microjeringa 50 µL
- Balanza Analítica
- Estufa con Agitación
- Columnas Extrelut NT-20
- Sistema de Evaporación con Nitrógeno
- Sistema de Agitación OxiTop
- Membranas de microfibra de vidrio
- Filtros descartables con membranas de microfibra de vidrio
- Jeringas de plástico
- Soportes de metal
- Agitadores magnéticos pequeños
- Macropipeteador
- Espátula de metal

7.2.3.2 Reactivos:

- Agua grado HPLC
- Agua destilada
- Hexano grado HPLC
- Isopropanol grado HPLC
- Solución etanólica de pirogalol al 2%
- Solución etanólica de Hidróxido de potasio al 10%
- Patrón de Vitamina A (Palmitato de retinol)
- Patrón de Vitamina E (dl- α Tofoferil acetato)

7.2.3.3. Cristalería

Cantidad	Cristalería	Capacidad	Material
2	Beaker	250 mL	vidrio
2	Beaker	500 mL	vidrio
1	Varilla de agitación		vidrio
4	Balón aforado clase A	100 mL	vidrio
1	Pipeta volumétrica clase A	10 mL	vidrio
4	Pipeta volumétrica clase A	20 mL	vidrio
2	Probeta	50 mL	vidrio
1	Probeta	25 mL	vidrio
10	Micropipeta	estándar	vidrio
5	Frasco ámbar boca ancha	250 mL	vidrio
5	Envase ámbar boca ancha	500 mL	vidrio

7.2.4. Método

7.2.4.1 Diseño de Investigación:

Con el fin de validar la metodología para la cuantificación de vitaminas A y E en margarinas se procederá a establecer las condiciones instrumentales a utilizar en el método, preparar los reactivos a utilizar, preparar la fase móvil requerida, preparar el saponificado, extraer las vitaminas de la muestra, determinar los analitos por HPLC, determinar la precisión, exactitud, linealidad, límite de cuantificación, rango, selectividad, robustez y estabilidad de muestras en solución, para luego analizar los resultados y determinar en que condiciones el método es válido.

7.2.4.2. Procedimiento

Establecer las condiciones instrumentales a utilizar en el método:

- Columna : LiChrosorb Si 60 10 μ m
- Fase Móvil: Hexano:Isopropanol; 99:1
- Volumen de Inyección: 50 μ L
- Detección, vitaminas A y E: 0-6 min.: 300 nm; 7-9 min.: 325 nm
- Flujo: 1.5mL/min.
- Temperatura: Ambiente

7.2.4.2.1. Preparación etanólica de KOH al 10% y 40%

Pesar 10g de Hidróxido de Potasio, disolver en 90 mL de etanol al 90% y aforar a 100mL luego de su completa disolución.

Pesar 40g de Hidróxido de Potasio, disolver en 90 mL de etanol al 90% y aforar a 100mL luego de su completa disolución.

7.2.4.2.2. Preparación de la solución etanólica de pirogallol al 2%.

Pesar 2g de pirogallol, disolver en 90mL de etanol al 90% y aforar a 100mL luego de su completa disolución.

7.2.4.2.3. Preparación de la fase móvil

Mezclar 495 mL de Hexano grado HPLC con 5mL de Isopropanol Omnisolv, degasificar la mezcla y guardarla en un recipiente ámbar con tapa de rosca.

7.2.4.2.4. Preparación de muestras de margarina

Preparar una solución estándar de margarina libre de vitaminas, disolver la margarina en caliente y agregarle vitamina A hasta llegar a una concentración de 50 UI/g. Agregar vitamina E hasta llegar a una concentración de 50 UI/g.

7.2.1.2.5. Preparación del Saponificado

Trabajar con luz amarilla. Medir 5g de margarina disuelta enriquecida y 5g de margarina libre de vitaminas, colocarlos en balones de 25 mL, agregar a cada balón 8mL de agua destilada, 4mL de pirogallol al 2% y 10 mL de KOH al 10%, introducir agitador magnético.

Colocar los balones en agitación durante 18 horas a 60 r.p.m., protegiendo con papel aluminio los balones de la luz.

7.2.1.2.6. Extracción de Vitaminas

Al finalizar el proceso de saponificado, aforar con agua destilada hasta 100mL agitar los balones y medir una alícuota del saponificado con pipeta volumétrica de 20mL, colocarlos en una columna Extrelut y dejar reposar durante 10 minutos, realizar la extracción con Hexano p.a. mediante la adición de 4 partes de 25mL cada una.

Evaporar con nitrógeno el solvente orgánico hasta obtener aproximadamente 10mL de extracto final. Agregar el extracto y aforar nuevamente a 25mL.

7.2.4.2.6 Determinación por HPLC

Filtrar las soluciones obtenidas con filtros desechables y almacenar el filtrado en tubos con tapa de rosca, previo a realizar las inyecciones verificar las condiciones instrumentales establecidas.

Acondicionar la columna a un flujo de 1mL./min. con Hexano grado HPLC por espacio de una hora.

7.2.4.3. Determinar la precisión del método.

- Determinar la repetibilidad de inyección de la técnica realizando 10 inyecciones.
- Determinar la repetibilidad del análisis realizando 10 mediciones de la muestra por un mismo analista. Determinar la desviación estándar relativa de las mediciones.
- Determinar la reproducibilidad del método realizando diez mediciones de un mismo analito en dos días diferentes por diferente analista. Evaluar mediante una prueba de t de student para determinar la correlación entre las mediciones de cada analista. Ho: $\mu_1 = \mu_2$.

7.2.4.4. Determinar la exactitud del método.

- Análisis de muestras patrón con concentraciones conocidas correspondientes al 80%, 100% y 120% del valor establecido de la concentración de vitamina A y E en margarina por duplicado.
- Determinar la relación entre la cantidad encontrada por el método y la cantidad de analito que es adicionada a un estándar conocido, en forma de porcentaje de recuperación. Evaluar mediante una prueba de t de student. Ho: $\mu = 100\%$ recuperación.

7.2.4.5. Determinar la linealidad del método.

- Determinar la linealidad, por medio del método de mínimos cuadrados evaluando la regresión lineal entre concentraciones y áreas de pico obtenidas en una curva de calibración, utilizando concentraciones con valores de +/-20% del valor establecido para la concentración de vitamina A y E en margarina.

7.2.4.6. Determinar el límite cuantificación del método.

- Determinar la concentración mínima de vitaminas A y E que pueden ser detectadas con exactitud y precisión, mediante el análisis de tres blancos de muestra y multiplicando la media de los resultados por 10.

7.2.4.7 Determinar el rango de validez del método.

- Determinar el rango de concentraciones para las cuáles es válida la aplicación de la metodología tomando en cuenta la exactitud y linealidad del método.

7.2.4.8. Determinar la Selectividad del método

- Llevar a cabo un análisis de las muestras sometidas a condiciones de fotólisis, oxidación, hidrólisis y temperatura con el fin de determinar si el método es selectivo para la vitamina A y E en presencia de sus principales interferentes.

Fotólisis: Exposición de la muestra a las condiciones de luz encontradas en el laboratorio en un período de 24 horas.

Oxidación: Exposición de la muestra a Peróxido de hidrógeno al 10% por espacio de 1 hora.

Hidrólisis: Exposición de la muestra a Ácido Clorhídrico 1N.

Temperatura: Exposición de la muestra a una temperatura mayor a 35 grados centígrados la cual es la máxima reportada para el territorio guatemalteco según el Instituto Nacional de Estadística.

7.2.4.9. Determinar la robustez del método.

Llevar a cabo 3 pruebas dobles, en cada uno se realizará la variación de uno de los siguientes aspectos: composición de la columna, largo de la columna y composición de la fase móvil.

Prueba # 1 Columnas con fase estacionaria de 5 μ m y 10 μ m

Prueba # 2 Columnas con 125 y 250 milímetros de largo.

Prueba # 3 Hexano: Isopropanol; relación 99:1 y 98:2

7.2.4.10. Determinar la estabilidad de las muestras en solución.

Determinar el tiempo en que una muestra con vitaminas A y E se mantiene estable para su análisis. Tres muestras serán guardadas en condiciones de ausencia de luz, un grupo por período de un día, otro grupo por espacio tres días y un último grupo por espacio de siete días para su posterior análisis. Evaluar si existe una relación lineal entre la concentración de analito el tiempo que transcurre antes de ser analizada, mediante el análisis de la regresión lineal entre las variables antes mencionadas.

7.2.5 Interpretación de Resultados

Los resultados obtenidos serán comparados con los estándares de calidad establecidos por la FDA para la validación de métodos analíticos por HPLC. Se establece que para la determinación de precisión, exactitud, límite de cuantificación, selectividad, robustez y estabilidad de muestras en solución no debe de existir una desviación estándar relativa entre las muestras analizadas mayor a 5% y que para la determinación de linealidad el coeficiente de regresión debe de ser mayor a 0.999, al obtener resultados con los estándares de calidad establecidos se procederá a declarar el método como válido.

VIII. Resultados

8.1. Precisión

8.1.1 Repetibilidad:

Número de Inyecciones	10
Media (Área de Pico)	2959560
Media (% Recuperación)	94.71
Desviación Estándar Relativa %	0.03

8.1.2 Reproducibilidad:

# Inyección	Analito	Área de Pico	Analista
17.1	Margarina Fortificada	3084249	A
17.2	Margarina Fortificada	2794851	A
17.3	Margarina Fortificada	2947042	A
17.4	Margarina Fortificada	3048954	A
17.5	Margarina Fortificada	2914985	A
17.6	Margarina Fortificada	2845698	A
17.7	Margarina Fortificada	2864871	A
17.8	Margarina Fortificada	3016587	A
17.9	Margarina Fortificada	2981145	A
17.10	Margarina Fortificada	3022358	A
	Promedio	2952074	
	Desv. Est.	90,467	
	Desv. Est. Relativa	0.03	

# Inyección	Analito	Área de Pico	Analista
18.1	Margarina Fortificada	3052489	B
18.2	Margarina Fortificada	2941865	B
18.3	Margarina Fortificada	3014533	B
18.4	Margarina Fortificada	2754571	B
18.5	Margarina Fortificada	2794834	B
18.6	Margarina Fortificada	2894158	B
18.7	Margarina Fortificada	3092486	B
18.8	Margarina Fortificada	2745981	B
18.9	Margarina Fortificada	2761418	B
18.10	Margarina Fortificada	2995415	B
	Promedio	2904775	
	Desv. Est.	126183	
	Desv. Est. Relativa	0.04	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Analista A	Analista B
	Área de Pico	Área de Pico
Media	2952074	2904775
Varianza	9093673239	1.7691E+10
Observaciones	10	10
Varianza agrupada	13392430578	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	0.913918059	
P(T<=t) una cola	0.186420081	
Valor crítico de t (una cola)	1.734063592	
P(T<=t) dos colas	0.372840162	
Valor crítico de t (dos colas)	2.100922037	

8.2. Exactitud

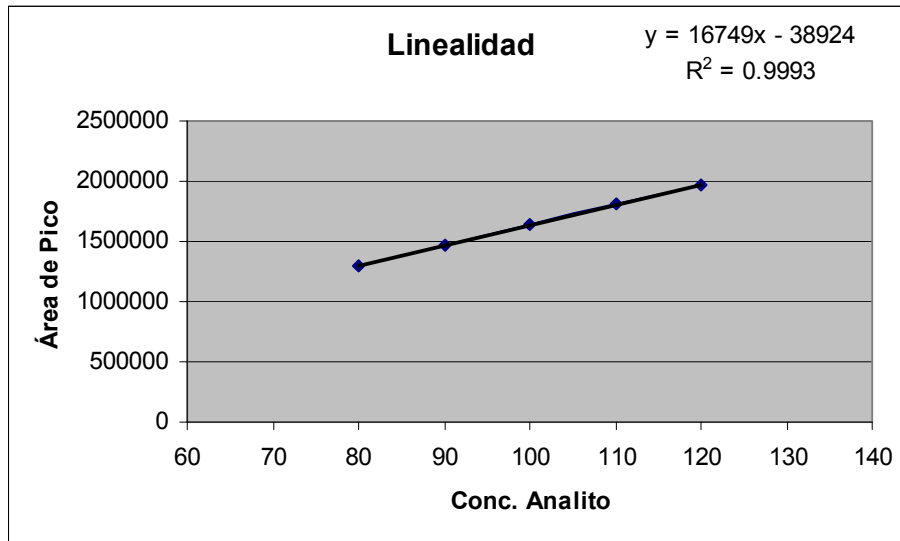
# Inyección	Analito	Area de Pico	% Recuperación	Concentración UI/g
21	Estándar	1644430	100	50.00*
22	Muestra 80 %	1299865	79.05	39.52
23	Muestra 80 %	1323991	80.51	40.26
24	Muestra 100 %	1658585	100.86	50.43
25	Muestra 100 %	1641254	99.81	49.90
26	Muestra 120 %	1977678	120.27	60.13
27	Muestra 120 %	1981465	120.50	60.25

* Concentración Establecida para vitamina A en Margarina (12)

Prueba de t	
Promedio	100.13
Desviacion Est	0.74
t	-0.41
t	0.41

8.3. Linealidad

# Inyección	Muestra	Área de pico	% Recuperación	Concentración UI/g
1	Muestra 80%	1298895	80	40.00
2	Muestra 90%	1463481	90	45.00
3	Muestra 100%	1644430	100	50.00
4	Muestra 110%	1809644	110	55.00
5	Muestra 120%	1963245	120	60.00



Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.999646279
Coefficiente de determinación R ²	0.999292683
R ² ajustado	0.999056911
Error típico	8135.40749
Observaciones	5

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>P</i>	<i>Valor crítico de P</i>
Regresión	1	2.80517E+11	2.80517E+11	4238.380619	7.9855E-06
Residuos	3	198554565.1	66184855.03		
Total	4	2.80715E+11			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
Intercepción	-38924	25982.4079	-1.49809056	0.2310427	-121611.618	43763.6181
Conc. Analito	16748.63	257.264174	65.1028465	7.9855E-06	15929.9006	17567.3594

8.4. Límite de Cuantificación

Muestra	Blanco
Inyecciones	3
Media (Área de Pico)	9911
Media (Concentración UI/g)	0.301
Límite de Cuantificación UI/g	3.01

8.5. Rango de Validez de la Metodología

40 – 60 UI de Vitamina A por gramo de margarina

8.5. Selectividad

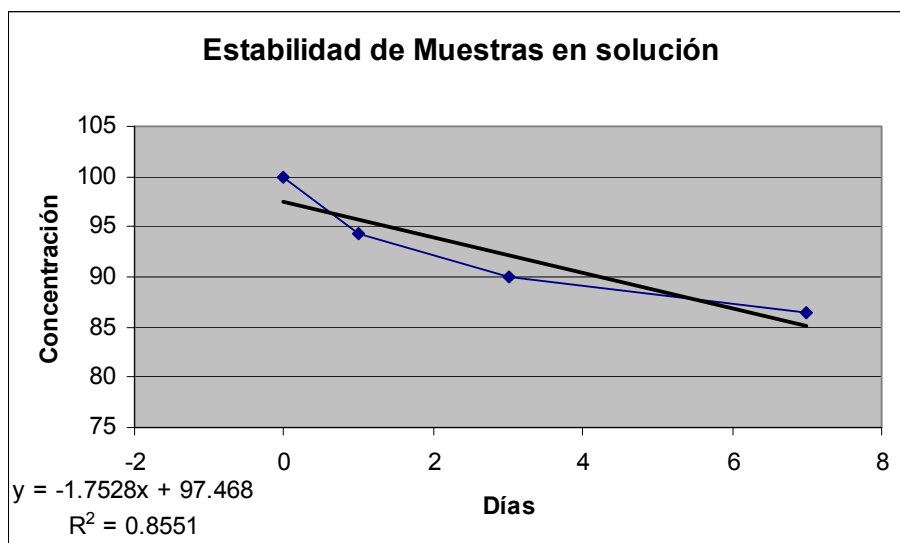
Analito	Area de Pico	Recuperación %
Muestra Margarina Enriquecida	4810088	100
M. Margarina + Fotólisis	4040385	84.00
M. Margarina + HCl 1N	3763390	78.24
M. Margarina + H ₂ O ₂ 3%	3406204	70.81
M. Margarina + 60°C	3752861	78.02

8.6. Robustez

Analito	Fase Estacionaria	Fase Móvil	Largo de Columna	Area de Pico	Tiempo de retención
Margarina Fortificada	10 μ m	99:1	250 mm	2802422	12.15 min
Margarina Fortificada	5 μ m	99:1	250 mm	2910076	13.68 min
Margarina Fortificada	10 μ m	98:2	250 mm	2965298	11.68 min
Margarina Fortificada	10 μ m	99:1	125 mm	2757014	6.99 min

8.7. Estabilidad de Muestras en Solución

Analito	Area de Pico(Media)	Area de Pico	Recuperación %
Margarina Fortificada	3028883	3028883	100
Estabilidad 1 Día	2855131	2844563	93.91
Estabilidad 1 Día		2865699	94.61
Estabilidad 3 Día	2724887	2727660	90.05
Estabilidad 3 Día		2722114	89.87
Estabilidad 7 Día	2616010	2612813	86.26
Estabilidad 7 Día		2619207	86.47



Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.924740303
Coefficiente de determinación R ²	0.855144628
R ² ajustado	0.782716942
Error típico	2.735139612
Observaciones	4

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	P	Valor crítico de P
Regresión	1	88.32709761	88.32709761	11.80687489	0.075259697
Residuos	2	14.96197739	7.480988696		
Total	3	103.289075			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción	97.4676522	1.959099911	49.75124118	0.000403765	89.03832559	105.8969788
Días	-1.7527826	0.510106168	-3.43611334	0.075259697	-3.9475923	0.442027087

IX. Discusión de Resultados

La margarina es fortificada con vitaminas A y E, en el proceso de comercialización estas vitaminas se degradan en su totalidad por lo cuál se fortificó la matriz antes de analizarla para validar la metodología para el Análisis de vitaminas A y E. Se determinó que la metodología empleada para el presente trabajo de investigación no aplica la cuantificación de vitamina E debido a que está no se logra saponificar debido al calentamiento al que es sometida la muestra, el cual elimina la vitamina E en la margarina. Se realizó por lo tanto la validación de una metodología para la cuantificación de vitamina A en margarina.

La cuantificación de vitamina A en margarina por medio de HPLC es un método preciso, al realizar 10 veces el mismo análisis se obtiene un resultado con una desviación estándar relativa de 0.03%, es además reproducible ya que al analizar una misma muestra 10 veces por diferente analista y realizar una prueba de t de student se obtuvo un valor de $P > 0.05$, con lo que se acepta $H_0: \mu_1 = \mu_2$, para las medias entre dos analistas.

Se determinó la exactitud de la metodología, al preparar muestras con valores cercanos (+/- 20%), del valor establecido de vitamina A en margarina se logra cuantificar el analito con una variación no mayor al 0.38% en el porcentaje de recuperación. Mediante una prueba de t de student se obtuvo un valor absoluto de t igual a $0.41 < 2.571$ por lo que no se rechaza $H_0: \mu = 100\%$ de recuperación y se concluye que el método es exacto. La linealidad del análisis está indicada por la regresión obtenida en una serie de muestras con concentraciones comprendidas entre 40 y 60 UI de vitamina A por gramo en el cuál en el análisis de varianza de la misma el valor crítico de P es < 0.05 que indica que la ecuación obtenida ($y = 16479x - 38924$), explica adecuadamente la relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito, el coeficiente de regresión obtenido fue 0.9993, mayor al límite establecido por la

FDA (0.999) para la linealidad en un método por HPLC, la exactitud y linealidad obtenida determinan un rango validado para la metodología en estudio de 40 a 60 UI de vitamina A por gramo de margarina. El límite de cuantificación del método se determinó analizando un blanco de margarina sin fortificar y midiendo el ruido del análisis para luego multiplicarlo por diez obteniendo un límite mínimo de cuantificación de 3.01 UI de vitamina A por gramo de margarina.

La selectividad del análisis se determinó evaluando las reacciones de la vitamina A al ser tratada con fotólisis, oxidación, hidrólisis ácida y termólisis, Esto se realizó con la finalidad de comprobar que ningún subproducto de reacción o descomposición del analito lo afecte y su concentración, se encontró una degradación de la muestra ente un 30 y 16% siendo afectado el analito mayormente al ser sometido a oxidación y en menor escala al ser sometido a fotólisis, no se encontraron subproductos que afecten la resolución del pico correspondiente al analito ni su tiempo de retención. (ver anexos, pág. 53)

La metodología es robusta a variaciones de sus componentes, se evaluó una muestra de margarina fortificada comparando variaciones en distintos aspectos de la metodología, se utilizó fase estacionaria de 5 μ m, fase móvil (Hexano Isopropanol 98:2) y un largo de columna de 125mm en pruebas individuales comparándolas con las condiciones estándar del método, obteniéndose en todas la pruebas picos con buena resolución y con un % de recuperación similar, se observan variaciones en el tiempo de retención, el más representativo al comparar las columnas de 250 y 125mm de largo ya que se obtuvieron tiempos de retención de 12.15 y 6.99 minutos. (ver anexos, pág. 58)

Se evaluó la estabilidad de las muestras en solución de margarina con vitamina A, la concentración del analito disminuyó aunque no de manera significativa, la pérdida de analito se hace cada vez más lenta al transcurrir más tiempo pero es continua. Se evaluó la relación entre el tiempo transcurrido

desde la preparación de las muestras hasta su análisis y su concentración mediante una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, en el análisis de varianza se obtuvo un valor de $P = 0.075 > 0.05$ lo que indica que la ecuación obtenida ($y = -1.17528x + 97468$) no explica la relación entre el tiempo transcurrido en analizar las muestras y la concentración detectada por el equipo.

Los resultados obtenidos determinan al método en estudio como un método preciso, exacto, selectivo y robusto por lo cuál es válido para la cuantificación de vitamina A en margarina, se debe de estar pendiente de los cuidados que la muestra requiere para no perder parte del analito debido a la poca estabilidad que presenta.

X. Conclusiones

- 10.1 La metodología analizada en el presente trabajo es válida para la cuantificación de vitamina A en margarina para un rango entre 40 a 60 UI de vitamina A por gramo de margarina.

- 10.2 La metodología para la cuantificación de vitamina A en margarina por HPLC es precisa ya que posee una desviación estándar relativa menos al 5% y posee una buena exactitud ya que existe una correlación entre el % de recuperación y la concentración de analito. El método presenta una relación lineal entre la concentración del analito y la respuesta analítica del equipo de medición.

- 10.3 La metodología para la cuantificación de vitamina A en margarina por HPLC es selectiva ya que los subproductos de la matriz y de los analitos en estudio no interfieren en la resolución del análisis, es además una metodología flexible y robusta a cambios en las condiciones de la misma.

XI. Recomendaciones

- 11.1 Realizar un estudio en el cuál se determine cuando se lleva a cabo la descomposición de las vitaminas A y E en la margarina.

- 11.2 Al llevar a cabo el análisis de vitamina A en margarina establecer condiciones de ausencia de luz y baja temperatura en todo momento para evitar la pérdida del analito.

XII. Referencias

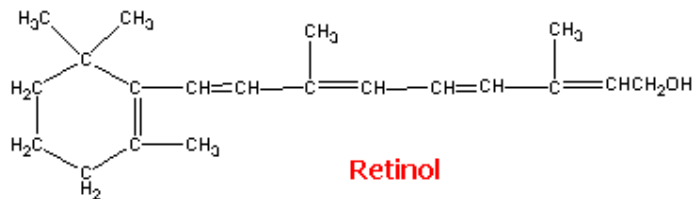
- 12.1. "Validación de Métodos Analíticos y Comparación de dos Métodos" Unidad de Informática, Facultad de Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 12.2. Reviewer Guidance, "Validation of Chromatographic Methods", CDER, EPA, USA, 1994.
- 12.3. Cunniff, Patricia., "Official Methods of Analysis", AOAC Internacional, 16th edition, Maryland, USA, 1998.
- 12.4. Robinson, Willard, "Food Chemicals Codex", National Academy Press, 3rd Edition, Washington D.C., USA, 1981.
- 12.5. Snyder, Glajch, Kirkland, "Practical HPLC Method Development", Wiley & Sons, New York, USA, 1981.
- 12.6. Skoog, West, Holler, Crouch, "Química Analítica" Editorial McGrawHill, México D.F., 2001.
- 12.7. Quattrocchi, de Andrizzi, Laba, "Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica" Editorial Merck, Buenos Aires, Argentina, 1990.
- 12.8. www.wikipedia.org, "Margarinas" 2006.
- 12.9. "La Salud en las Américas" Ed. 2002, vol. I. paho.org/Spanish/DD/PUB/
- 12.10. Zárate, Artemio, "Evaluación del Consumo de Azúcar Fortificada con Vitamina A en Tres Comunidades Rurales de la Republica de Guatemala", Tesis, Licenciado Nutricionista, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala, 1978.
- 12.11. Méndez Ana, "Contenido de Vitamina A en Preparaciones de Alimentos Vegetales de Mayor Consumo, en las Comunidades Beneficiarias del Instituto Benson", Tesis, Licenciado Nutricionista, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala, 1978.
- 12.12. Raunhardt. Bowley, "Mandatory Food Enrichment", Nutriview, 1996.

Anexo # 1

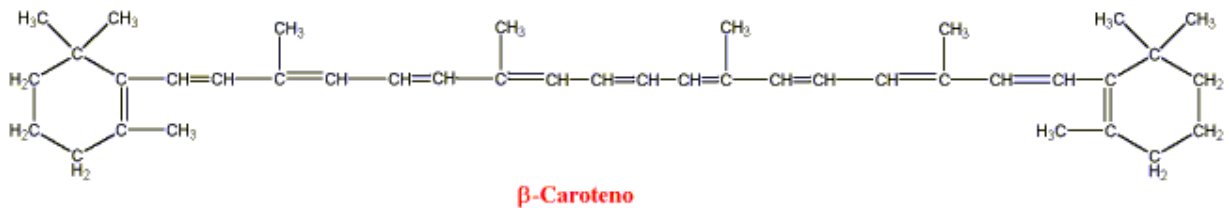
Vitamina A

Incluye tanto el retinol como el caroteno. Es esencial para la formación de las glicoproteínas del tejido mucoso y como transportador de los monosacáridos implicados; mantiene así el estado normal de los tejidos epiteliales húmedos que recubren la boca, los conductos respiratorios y los conductos urinarios. Así mismo es esencial para el crecimiento. El retinol es necesario para la visión en la oscuridad. Su deficiencia origina ceguera nocturna, xeroftalmia (sequedad de los conductos lacrimales), ulceración en córnea y detención del crecimiento.

Estructura de la vitamina A:



El contenido de vitamina A de los alimentos se expresa en equivalentes de retinol; 1 mg de retinol = 6 mg de betacaroteno.



- Las necesidades diarias por día son de 800-1000 mg de retinol / día.
- vitamina A en margarina: (850mg de retinol / 100 g de alimentos)

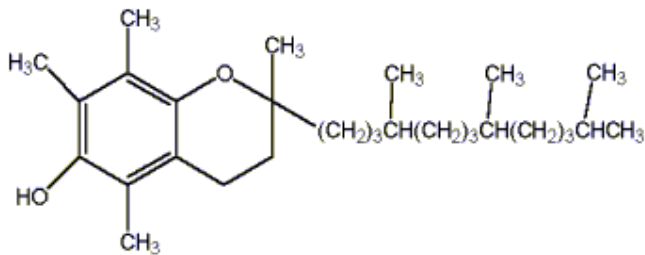
Anexo # 2

Vitamina E

La vitamina E, también llamada tocoferol, es un antioxidante, por lo que impide la oxidación de las membranas celulares y permite una buena nutrición y regeneración de los tejidos. Igualmente, se ha visto que es indispensable en la reproducción de algunos animales ya que su carencia origina esterilidad.

Es muy poco habitual su deficiencia mientras que un exceso puede originar trastornos metabólicos. Durante la cocción de los alimentos se destruye una buena parte de la vitamina E que esté presente. Por otra parte, el hierro que se ingiere en forma de suplementos puede interactuar con la vitamina E, destruyéndose entre ellos.

Estructura de la vitamina E:



Alfa tocoferol

- Las cantidades diarias recomendadas son 10 mg / día.
- vitamina E en margarina 8mg / 100 g de alimentos

Anexo 3

Cromatogramas

Determinación de Vitaminas en Margarina

# Inyección	Analito	Área de Pico Vitamina A	Área de Pico de Vitamina E
1	Estándar Vitaminas A y E	4988591	3355
2	Estandar Vitaminas A y E	4899711	1676
3	Margarina A	19332	no detectado
4	Margarina B	17601	no detectado
5	Margarina C	17024	no detectado

Inyección 1 - 2

D-7000 HSM Samples

Series: 1699

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 09/06/07 02:58 p.m.

Reported: 20/10/07 01:21 p.m.

Processed: 22/09/07 01:27 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1699\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1699

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: Estándar MERCK

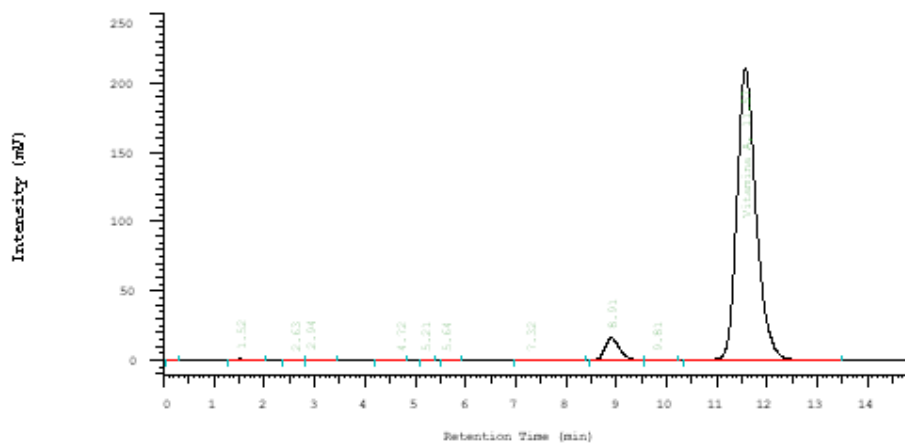
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 2

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 3 - 5

D-7000 HSM Samples

Series: 1699

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D- 7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 09/06/07 03:33 p.m.

Reported: 20/10/07 01:23 p.m.

Processed: 22/09/07 01:27 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1699\
Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1699

Application: Samples

Vial Number: 2

Sample Name: Margarina

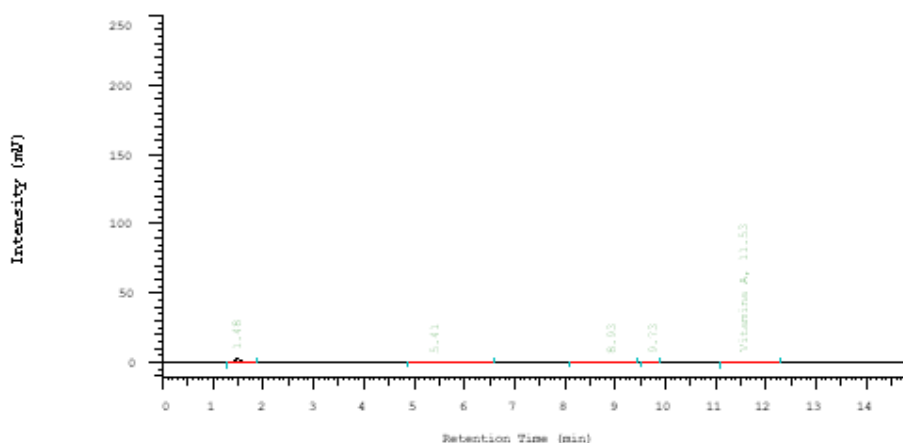
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 2

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Precisión

Repetibilidad:

# Inyección	Analito	Área de Pico	Concentración (%)
6	Estándar	3,124,846	100
7	Margarina Fortificada	2,881,192	92.2027
8	Margarina Fortificada	2,891,001	92.5166
9	Margarina Fortificada	3,038,428	97.2345
10	Margarina Fortificada	3,023,751	96.7648
11	Margarina Fortificada	3,044,878	97.4409
12	Margarina Fortificada	2,926,656	93.6576
13	Margarina Fortificada	3,044,406	97.4258
14	Margarina Fortificada	2,934,302	93.9023
15	Margarina Fortificada	2,908,904	93.0895
16	Margarina Fortificada	2,902,079	92.8711
	Promedio	2,959,560	94.7106
	Desviación Estandar	82,515	
	Desviación Estandar Relativa	0.03	

Inyección 6

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 16/06/07 05:00 p.m.

Reported: 20/10/07 12:17 p.m.

Processed: 15/09/07 11:03 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1703\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1703

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

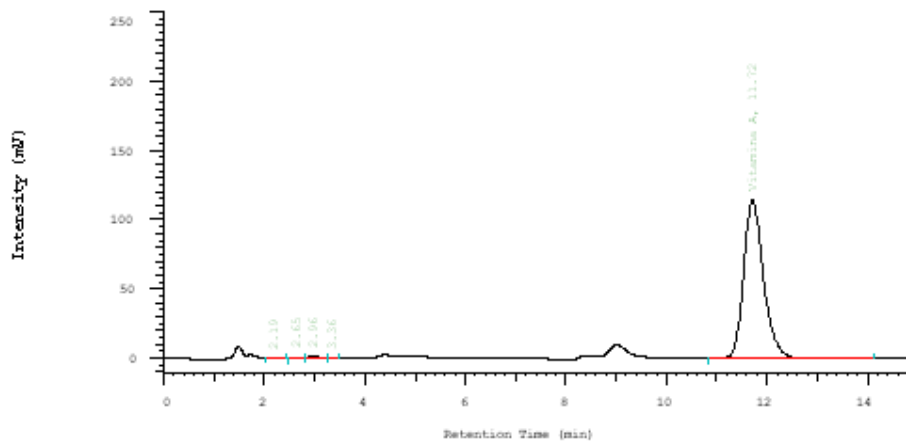
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 7-16

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 16/06/07 05:19 p.m.

Reported: 20/10/07 12:21 p.m.

Processed: 15/09/07 11:03 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1703\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1703

Application: Samples

Vial Number: 2

Sample Name: MARGARINA ENRIQUECIDA

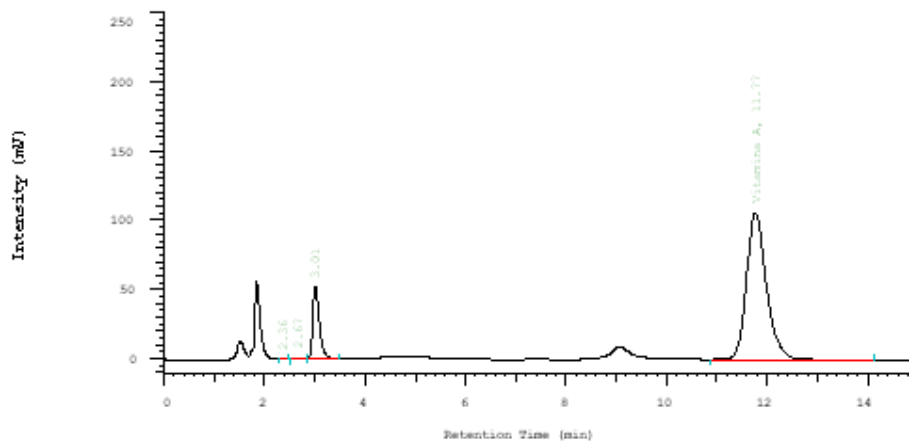
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 10

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Reproducibilidad:

# Inyección	Analito	Área de Pico (Media)	Analista
17.1 - 17.10	Margarina Fortificada	2952074	A
18.1 - 18.10	Margarina Fortificada	2904775	B

Inyección 17-18

D-7000 HSM Samples

Series: 1705

Report: modified

System: LiChroGraph

MUESTRA No.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 20/01/08 04:54 p.m.

Reported: 21/01/08 01:06 p.m.

Processed: 21/01/08 12:37 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1705\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LiChroGraph

Series:1705

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

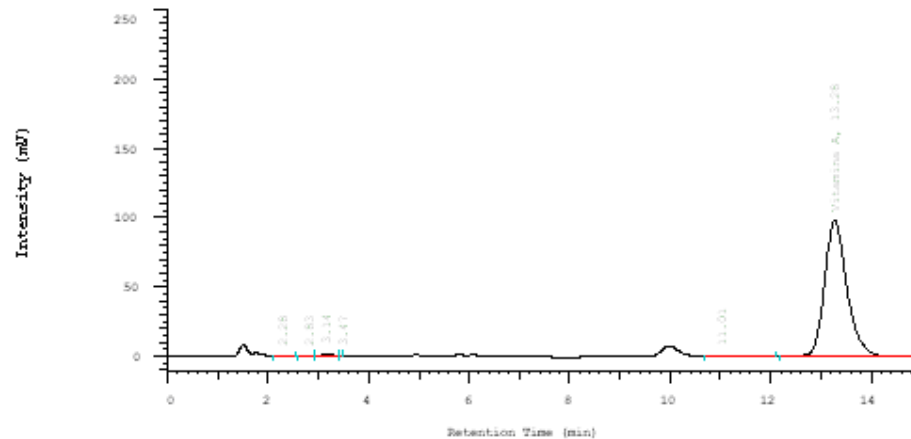
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 2

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Exactitud

# Inyección	Analito	Area de Pico	% Recuperación	Concentración UI/g
21	Estándar	1644430	100	50.00*
22	Muestra 80 %	1299865	79.05	39.52
23	Muestra 80 %	1323991	80.51	40.26
24	Muestra 100 %	1658585	100.86	50.43
25	Muestra 100 %	1641254	99.81	49.90
26	Muestra 120 %	1977678	120.27	60.13
27	Muestra 120 %	1981465	120.50	60.25

* Concentración Establecida para vitamina A en Margarina (12)

Inyección 21

D-7000 HSM: Samples

Series: 1727

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 30/06/07 02:51 p.m.

Reported: 20/10/07 12:40 p.m.

Processed: 15/09/07 11:53 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1727\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series: 1727

Application: Samples

Vial Number: 3

Sample Name: STANDARD003

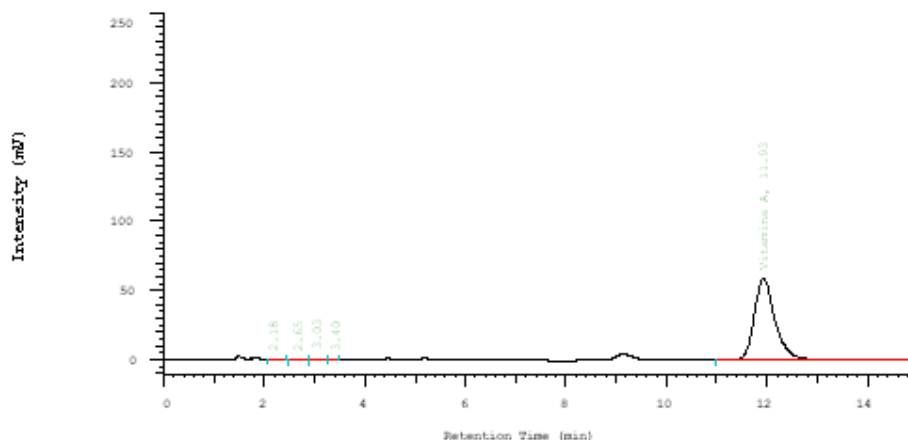
Vial Type: STD3

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 22-23

D-7000 HSM: Samples

Series: 1730

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D- 7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 30/06/07 04:37 p.m.

Reported: 20/10/07 12:50 p.m.

Processed: 15/09/07 12:04 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1730\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1730

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

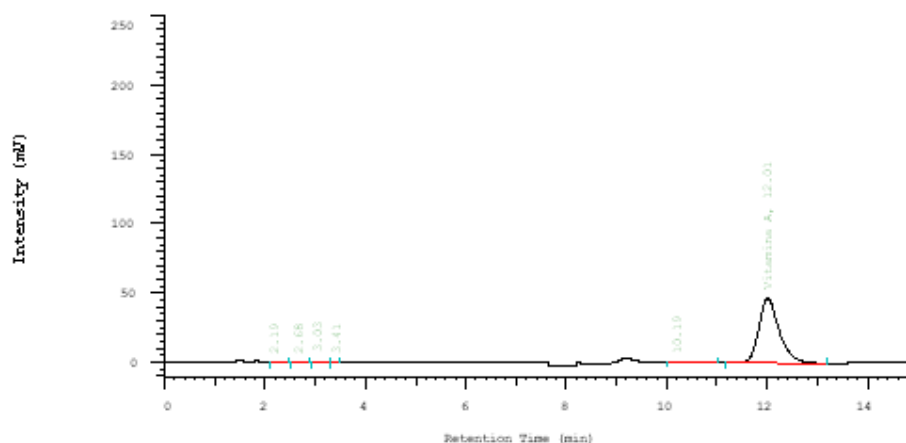
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 24-25

D-7000 HSM Samples

Series: 1727

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 30/06/07 03:42 p.m.

Reported: 20/10/07 12:44 p.m.

Processed: 15/09/07 11:53 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1727\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1727

Application: Samples

Vial Number: 6

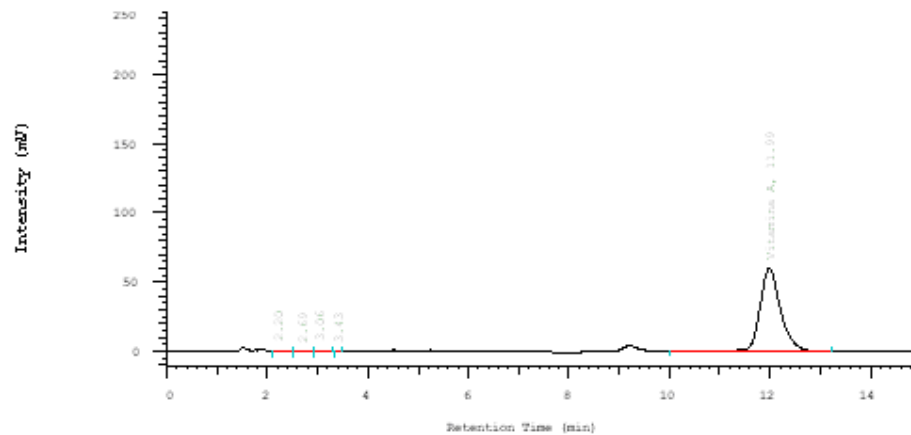
Sample Name: STANDARD001

Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 26 - 27

D-7000 HSM: Samples

Series: 1731

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D- 7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 30/06/07 04:53 p.m.

Reported: 20/10/07 12:52 p.m.

Processed: 15/09/07 12:04 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1731\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1731

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

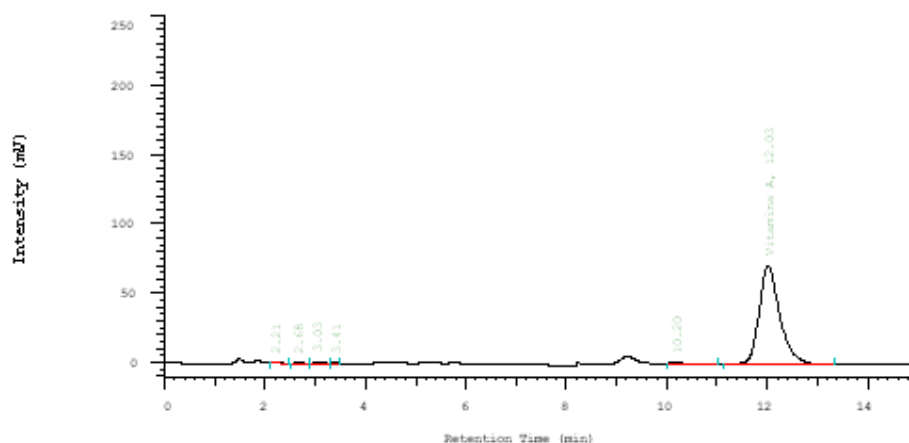
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Linealidad

# Inyección	Muestra	Área de pico	% Recuperación	Concentración UI/g
28	Muestra 80%	1298895	80	40.00
29	Muestra 90%	1463481	90	45.00
30	Muestra 100%	1644430	100	50.00
31	Muestra 110%	1809644	110	55.00
32	Muestra 120%	1963245	120	60.00

Inyección 28

D-7000 HSM Samples

Series: 1727

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 30/06/07 02:18 p.m.

Reported: 20/10/07 12:36 p.m.

Processed: 15/09/07 11:53 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1727\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series: 1727

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

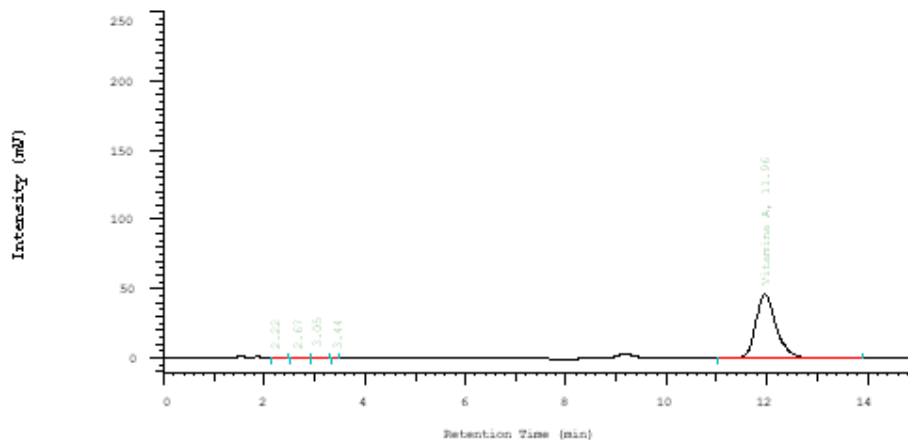
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 29

D-7000 HSM Samples

Series: 1727

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 30/06/07 02:35 p.m.

Reported: 20/10/07 12:39 p.m.

Processed: 15/09/07 11:53 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1727\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series: 1727

Application: Samples

Vial Number: 2

Sample Name: STANDARD002

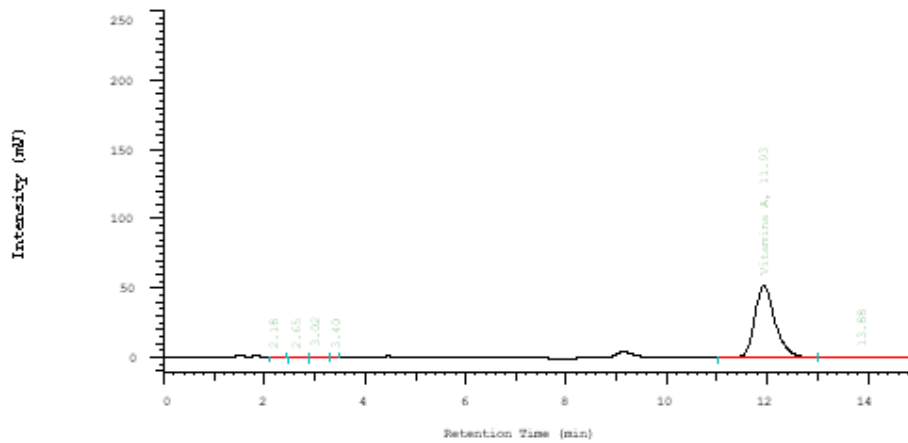
Vial Type: STD2

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 30

D-7000 HSM: Samples

Series: 1727

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 30/06/07 02:51 p.m.

Reported: 20/10/07 12:40 p.m.

Processed: 15/09/07 11:53 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1727\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series: 1727

Application: Samples

Vial Number: 3

Sample Name: STANDARD003

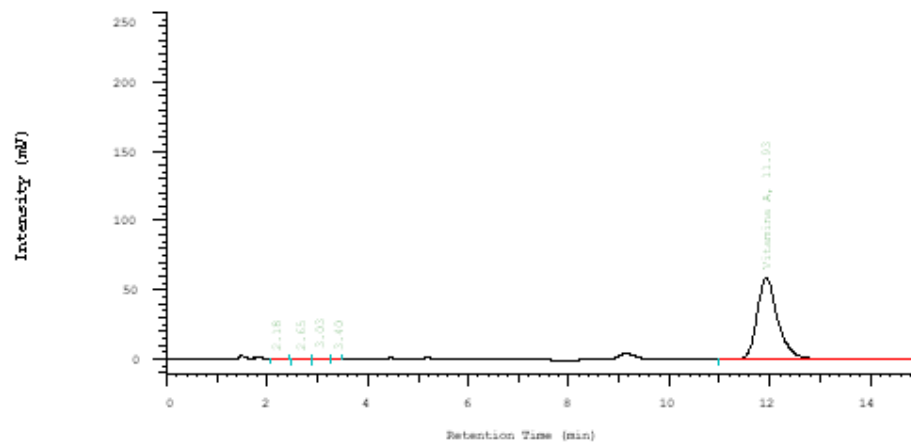
Vial Type: STD3

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 31

D-7000 HSM Samples

Series: 1727

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 30/06/07 03:07 p.m.

Reported: 20/10/07 12:41 p.m.

Processed: 15/09/07 11:53 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1727\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1727

Application: Samples

Vial Number: 4

Sample Name: STANDARD004

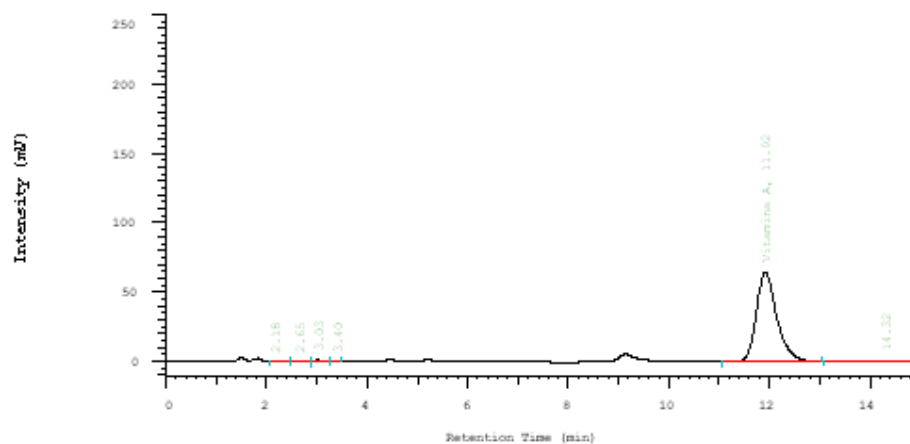
Vial Type: STD4

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 32

D-7000 HSM Samples

Series: 1727

Report modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 30/06/07 03:23 p.m.

Reported: 20/10/07 12:42 p.m.

Processed: 15/09/07 11:53 a.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1727\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series: 1727

Application: Samples

Vial Number: 5

Sample Name: STANDARD005

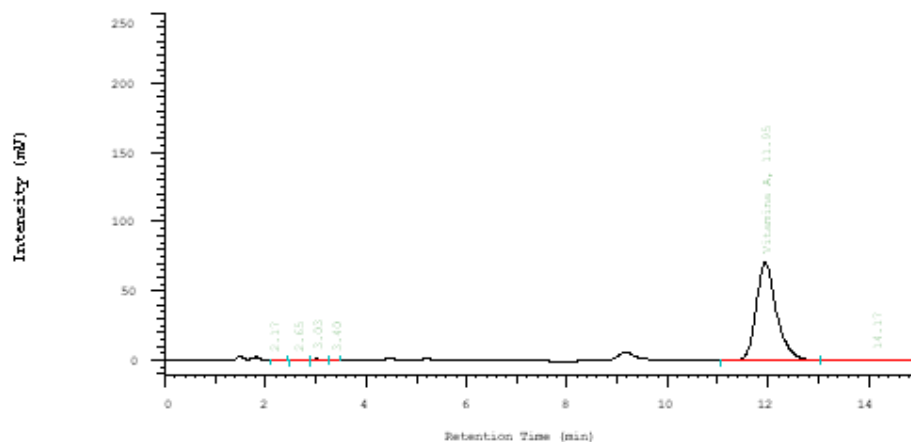
Vial Type: STD5

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Límite de Cuantificación

# Inyección	Analito	Área de Pico	Concentración %	Concentración UI/g
33	Blanco	9962	0.61	0.30
34	Blanco	9898	0.60	0.30
35	Blanco	9872	0.60	0.30
Media		9911	0.60	0.30
Media x 10		99110	6.03	3.01

Inyección 33 - 35

D-7000 HSM Samples

Series: 1701

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 16/06/07 04:24 p.m.

Reported: 20/10/07 12:55 p.m.

Processed: 22/09/07 01:14 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1701\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1701

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: Blanco

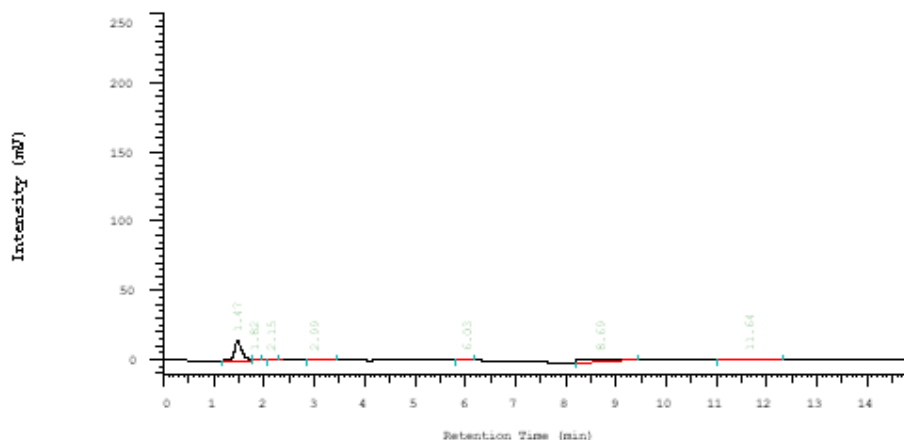
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Selectividad

# Inyección	Analito	Area de Pico	Concentración %
36	Muestra Margarina Enriquecida	4810088	100
37	Muestra + Fotólisis	4040385	84.00
38	Muestra + HCl 1N	3763390	78.24
39	Muestra + H2O2 3%	3406204	70.81
40	Muestra + 60°C	3752861	78.02

Inyección 36

D-7000 HSM Samples

Series: 1771

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 14/07/07 07:59 p.m.

Reported: 20/10/07 01:19 p.m.

Processed: 22/09/07 01:09 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1771\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1771

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

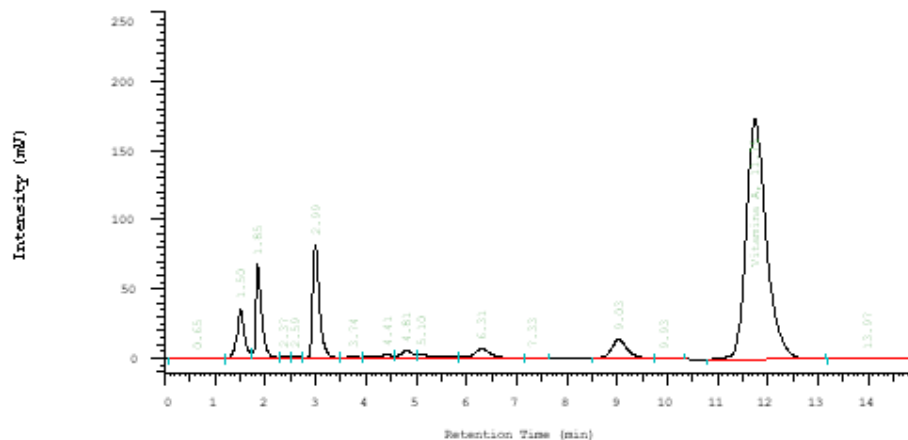
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 37

D-7000 HSM Samples

Series: 1775

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 15/07/07 06:32 p.m.

Reported: 20/10/07 01:16 p.m.

Processed: 22/09/07 01:03 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1765\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1765

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

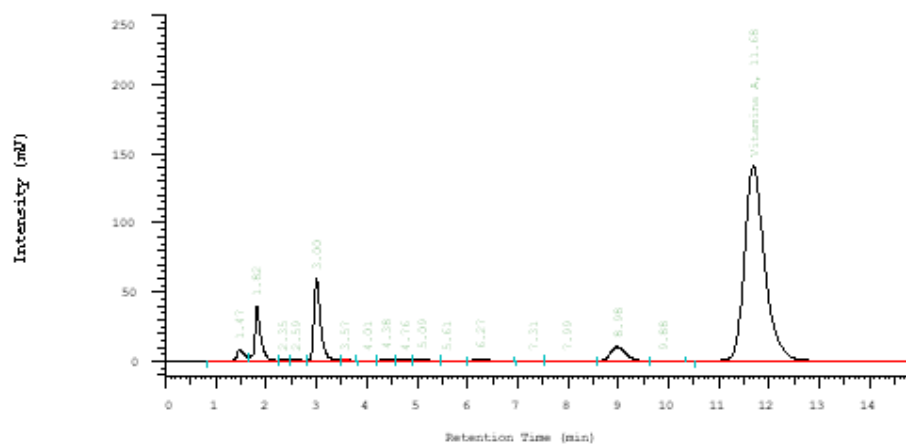
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 38

D-7000 HSM Samples

Series: 1767

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 14/07/07 07:04 p.m.

Reported: 20/10/07 01:17 p.m.

Processed: 22/09/07 01:06 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1767\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series: 1767

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

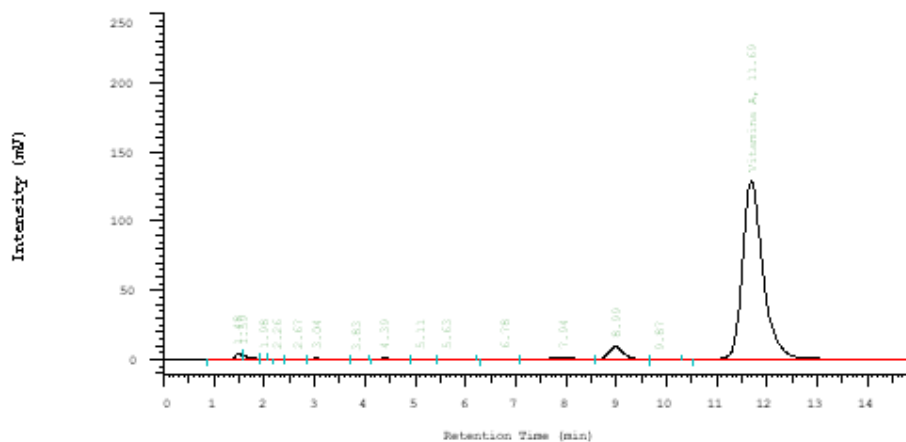
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 39

D-7000 HSM: Samples

Series: 1768

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 14/07/07 07:20 p.m.

Reported: 20/10/07 01:18 p.m.

Processed: 22/09/07 01:07 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1768\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1768

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

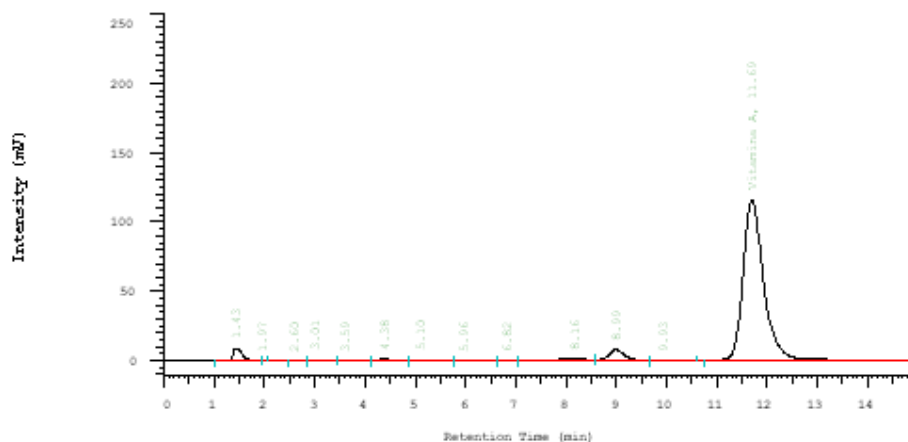
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 40

D-7000 HSM: Samples

Series: 1763

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 14/07/07 06:00 p.m.

Reported: 20/10/07 01:15 p.m.

Processed: 22/09/07 01:00 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1763\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1763

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

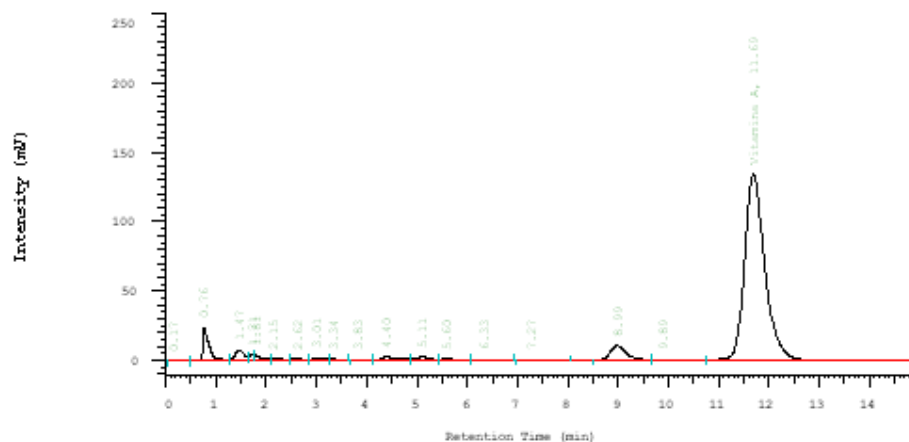
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Robustez

# Inyección	Fase Estacionaria	Fase Móvil	Largo de Columna	Area de Pico	Tiempo de retención
41	10 µm	99:1	250 mm	2824945	12.15 min
42	5 µm	99:1	250 mm	2910076	13.68 min
43	10 µm	98:2	250 mm	2965298	11.68 min
44	10 µm	99:1	125 mm	2757014	6.99 min

Inyección 41

D-7000 HSM Samples

Series: 1704

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 23/06/07 12:12 p.m.

Reported: 20/10/07 01:01 p.m.

Processed: 15/09/07 12:20 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1704\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series: 1704

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

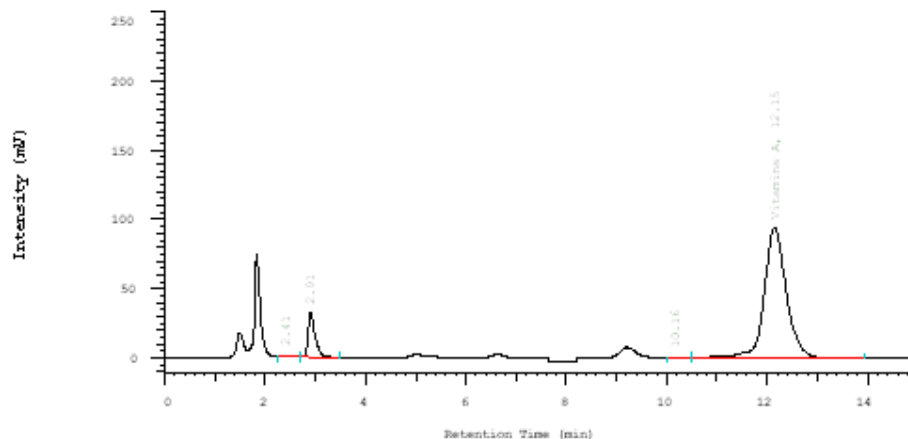
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 4 of 4

Volume: 10.0 µl

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 42

D-7000 HSM Samples

Series: 1713

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 23/06/07 08:15 p.m.

Reported: 20/10/07 12:32 p.m.

Processed: 22/09/07 12:56 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1713\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1713

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

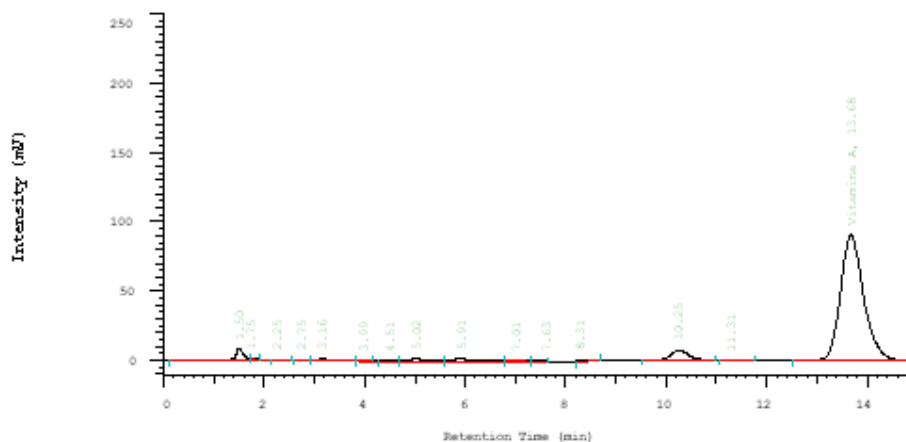
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 43

D-7000 HSM Samples

Series: 1714

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 23/06/07 04:41 p.m.

Reported: 20/10/07 12:57 p.m.

Processed: 25/08/07 12:32 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1702\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1702

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

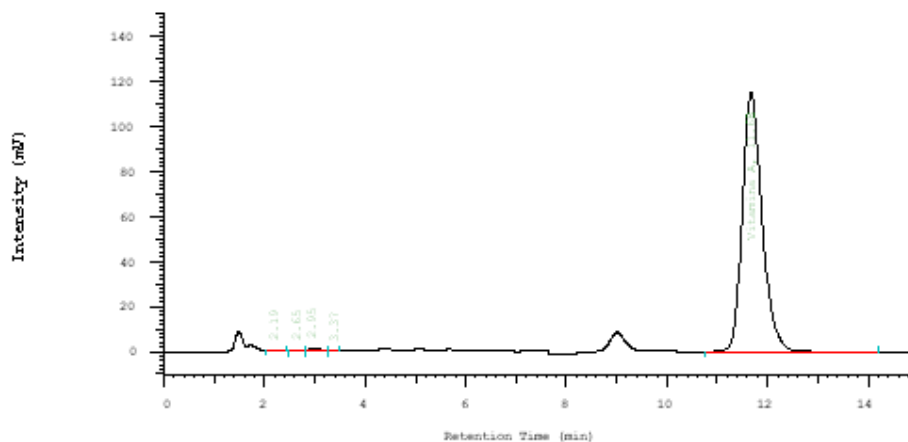
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 44

D-7000 HSM Samples

Series: 1717

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 23/06/07 09:40 p.m.

Reported: 20/10/07 12:35 p.m.

Processed: 22/09/07 12:50 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1717\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1717

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: STANDARD001

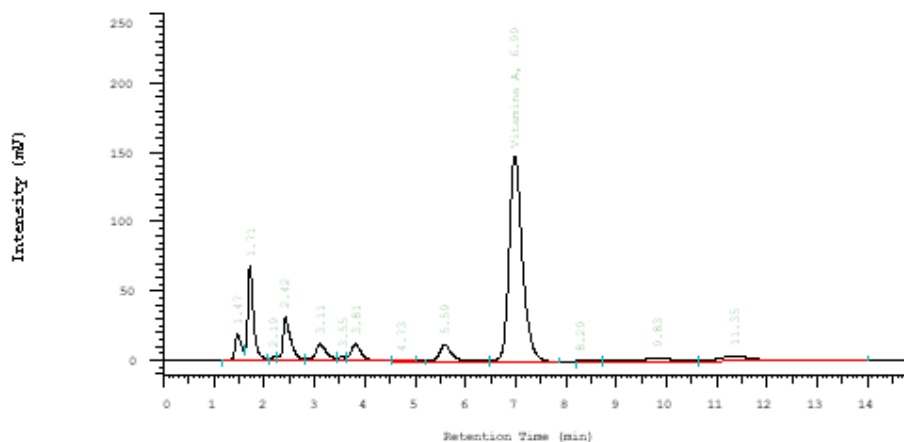
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 1

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Estabilidad de Muestras en Solución

# Inyección	Analito	Area de Pico	Concentración %
7-16	Margarina Fortificada	3028883	100
46	Estabilidad 1 Día	2844563	93.91
47	Estabilidad 1 Día	2865699	94.61
48	Estabilidad 3 Día	2727660	90.05
49	Estabilidad 3 Día	2722114	89.87
50	Estabilidad 7 Día	2612813	86.26
51	Estabilidad 7 Día	2619207	86.47

Inyección 46 - 47

D-7000 HSM Samples

Series: 1704

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 17/06/07 11:24 a.m.

Reported: 20/10/07 12:58 p.m.

Processed: 15/09/07 12:20 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1704\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series: 1704

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: Estabilidad

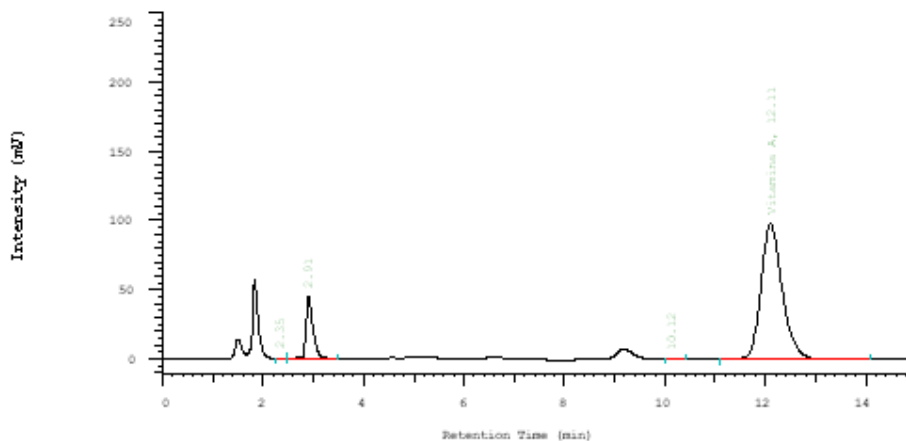
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 4

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 48 - 49

D-7000 HSM Samples

Series: 1705

Report: modified

System: LaChrom

MUESTRA No.**D-7000 HPLC System Manager Report**

Analyzed: 19/06/07 04:38 p.m.

Reported: 20/10/07 01:05 p.m.

Processed: 15/09/07 12:37 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1705\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1705

Application: Samples

Vial Number: 1

Sample Name: Estabilidad

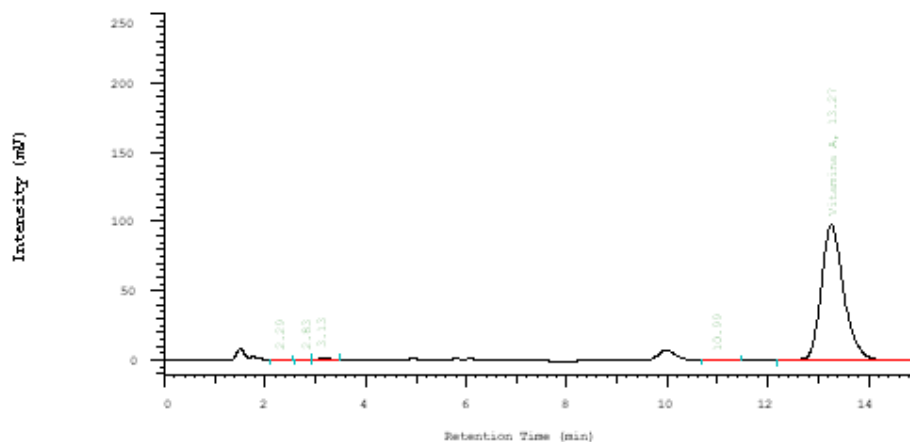
Vial Type: STD1

Injection from this vial: 1 of 2

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Inyección 50 - 51

D-7000 HSM Samples

Series: 1712

Report: modified

System: LaChrom

D-7000 HPLC System Manager Report

Analyzed: 23/06/07 07:41 p.m.

Reported: 20/10/07 01:12 p.m.

Processed: 15/09/07 12:43 p.m.

Data Path: C:\Win32App\HSM\samples\DATA\1712\

Processing Method: Vitamina A

System(acquisition): LaChrom

Series:1712

Application: Samples

Vial Number: 2

Sample Name: Estabilidad

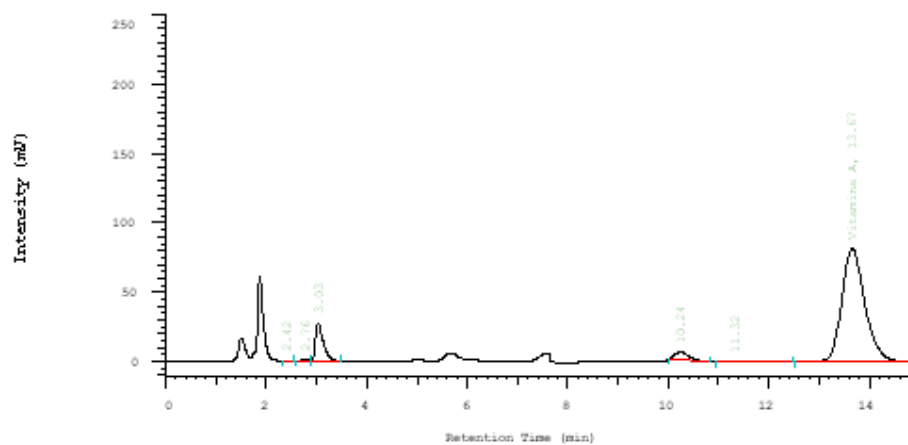
Vial Type: UNK

Injection from this vial: 1 of 2

Volume: 10.0 ul

Sample Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1



Acquisition Method: Vitamina A

Column Type:

Developed by:

Pump A Type: L-7100

Solvent A: Hexano

Solvent B: Isopropanol

Solvent C: Fase Movil

Solvent D: Isopropanol

Method Description:

Chrom Type: HPLC Channel : 1

Peak Quantitation: AREA

Calculation Method: EXT-STD

Br. Rodrigo Alejandro García

f) _____

Lic. Jorge Lionel García

f) _____