

**Cuantificación de Vitamina D₃ (colecalfiferol)
y D₂ (ergocalciferol) por Cromatografía
Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Daniel Francisco Bravo Cazar

Honduras
Diciembre, 2006

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Cuantificación de Vitamina D₃ (colecalfiferol) y D₂ (ergocalciferol) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniero Agroindustrial
en el Grado de Licenciatura

Presentado por:

Daniel Francisco Bravo Cazar

Honduras
Diciembre, 2006

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Daniel Francisco Bravo Cazar

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2006

**Cuantificación de Vitamina D₃ (colecalfiferol) y D₂ (ergocalciferol) por
Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Presentado por:

Daniel Francisco Bravo Cazar

Aprobado:

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios y Virgen Dolorosa.

A mis padres, Livio y Noemí por su apoyo a través de mis estudios.

A mis queridas hermanas Ana Lucía y Paulina Maribel.

A todos quienes creen en mí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por lo más grande, la vida y salud para toda mi familia.

A la Virgen Dolorosa por ser la guía con Dios padre y mi luz desde secundaria. “Ser más para servir mejor”.

A mi Padre, por ser parte de quién aprendí lo que soy, por su esfuerzo, sacrificio, honestidad, tenacidad, entrega, dedicación y lo más grande el amor en los momentos más difíciles. Por mis mejores 22 años de vida y por enseñarme que todo se puede con voluntad, perseverancia, trabajo y orden. Donde estés, TE AMO.

A mi amada Madre, por su apoyo incondicional, por ser la persona que me mantiene en pie de lucha, quien me alienta a mantener la cabeza en alto a pesar de los problemas y dificultades. Por sobreponer todo para la educación de nosotros tus hijos. Por demostrarme que con mano dura es posible ser un hombre de bien. Por tus oraciones diarias a Dios y en especial por haberme dado la vida.

A mis hermanas por ser mis amigas de vida. Por permitirme aprender de ustedes y en especial por ser lo que nuestros padres formaron en nosotros. Por su dedicación, ayuda, cariño y esas sonrisas que mucha falta me hicieron.

A mis abuelos Ernestina y Washington (Q.E.P.D) por sus consejos y sonrisas.

A Indira por su amistad. Por escuchar mis penas y melancolías con paciencia, por no dejarme decaer en la etapa final de nuestra carrera y en especial por sus consejos y ayuda. Te voy a extrañar.

A mis asesores Francisco Bueso y Luís Osorio por su ayuda en la elaboración de este proyecto.

A los integrantes del Laboratorio de Análisis de Alimentos y de manera especial a Victor Taleón por su ayuda, paciencia, consejos y tiempo para la elaboración de este proyecto.

A mis amigas, amigos Zamoranos y colegas de la Carrera de Agroindustria, por demostrar verdadera amistad que rompe fronteras. Éxitos en su vida familiar y profesional.

A la clase Némesis 05 y en especial a la clase Elite 06 por hacer de mi estadía en Zamorano satisfactoria y por esos momentos que no podré olvidar.

RESUMEN

Bravo, D. 2006. Cuantificación de Vitamina D₃ (colecalfiferol) y D₂ (ergocalciferol) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana “Zamorano”, Honduras. 65p.

La deficiencia de vitamina D causa osteoporosis en adultos y raquitismo en niños. Es así que los cereales de desayuno y algunos productos lácteos han sido fortificados para suplir las necesidades nutricionales. Este estudio implementó los métodos y validó las curvas estándares para cuantificación de vitamina D₃ y D₂ por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) basado en el método AOAC 982.29 y el estudio de Mistry y otros (2002). Se cuantificaron 6 niveles de dilución estándar de colecalfiferol y 5 de ergocalciferol con tres lecturas por cada nivel. El rango de concentración detectable que cubrió la curva de calibración de colecalfiferol fue de 3.15 a 4200 µg/100 g de muestra y para ergocalciferol fue de 37.8 a 4200 µg/100 g de muestra. El tiempo promedio de elución de la vitamina D₃ fue 9.84 ± 0.094 minutos (%CV=0.958). Para vitamina D₂ el tiempo promedio fue 9.17 ± 0.061 minutos (%CV=0.663). Se realizó un análisis de regresión lineal para evaluar el ajuste de cada curva de calibración, en el que se comparó la concentración de vitamina D₃ y D₂ [µg /mL de acetonitrilo] con el área de colecalfiferol y ergocalciferol registrados en los cromatogramas. Se obtuvo un $R^2=0.999$ para colecalfiferol asegurando el poder de predicción de la curva estándar con un coeficiente de correlación del 100% ($P<0.05$). El poder de predicción de la curva de ergocalciferol no fue bueno ya que el HPLC subestimó la concentración en todos los niveles estándares y de validación. Se obtuvo un $R^2=0.990$ siendo bajo considerando que debe ser ≥ 0.999 , sin embargo se obtuvo un coeficiente de correlación de 99.99% ($P<0.05$). Se recomienda repetir la curva estándar de ergocalciferol y validación siguiendo las condiciones de almacenamiento del estándar propuestas por el proveedor.

Palabras clave: calciferol, osteoporosis, exposición solar, calcitrol, ergosterol.

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

CONTENIDO

Portadilla.....		i
Autoría		ii
Página de firmas.....		iii
Dedicatoria.....		iv
Agradecimientos		v
Resumen.....		vi
Contenido.....		vii
Índice de Cuadros		ix
Índice de Figuras.....		x
Índice de Anexos		xi
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1	GENERALIDADES	2
2.2	VITAMINA D	2
2.3	MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA D	4
2.3.1	Método AOAC 975.42.....	4
2.3.2	Método AOAC 979.24.....	5
2.3.3	Método AOAC 980.26.....	5
2.3.4	Método AOAC 985.27.....	5
2.3.5	Método AOAC 981.17.....	5
2.3.6	Método AOAC 982.29.....	6
2.3.7	Método AOAC 2002.05.....	6
2.4	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1	UBICACIÓN	7
3.2	MATERIALES	7
3.3	EQUIPO.....	7
3.4	METODOLOGÍA	8
3.4.1	Diseño experimental	8
3.4.2	Método de Mistry.....	8
3.4.3	Desarrollo de curvas estándares de calibración de vitamina D ₃ y D ₂	8
3.4.3.1	Preparación de diluciones estándares de vitamina D ₃ y D ₂	8
3.4.3.2	Método cromatográfico y análisis.....	9
3.4.3.3	Obtención de modelos de regresión.....	10
3.4.4	Desarrollo de diluciones de vitamina D ₃ y D ₂	10

3.4.4.1	Preparación de diluciones de validación de vitamina D ₃	11
3.4.4.2	Preparación de diluciones de validación de vitamina D ₂	11
3.4.4.3	Métodos cromatográficos y análisis	12
3.4.4.4	Análisis estadístico	12
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1	DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE VITAMINA D ₃ ..	14
4.2	DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE VITAMINA D ₂ ..	18
5.	CONCLUSIONES	22
6.	RECOMENDACIONES	23
7.	BIBLIOGRAFÍA	24
8.	ANEXOS	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Fuentes dietéticas de vitamina D	3
2.	Requerimientos diarios de vitamina D.....	4
3.	Tiempo de retención y CV (%) de colecalciferol	14
4.	Áreas promedio y CV (%) de colecalciferol.....	15
5.	Tiempo de retención y CV (%) de validación de colecalciferol.....	17
6.	µg de colecalciferol/mL de ACN obtenidos del modelo de regresión.....	17
7.	Tiempo de retención y CV (%) de ergocalciferol.....	18
8.	Áreas promedio y CV (%) de ergocalciferol	19
9.	Tiempo de retención y CV (%) de validación de ergocalciferol	20
10.	µg de ergocalciferol/mL de ACN obtenidos del modelo de regresión.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Agrupación de cromatogramas detectables de colecalciferol en HPLC ...	15
2.	Curva estándar de colecalciferol.....	16
3.	Agrupación de cromatogramas detectables de ergocalciferol en HPLC ..	18
4.	Curva estándar de ergocalciferol	19

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Cromatograma del estándar de vitamina D ₃ de 42 µg/mL.....	27
2.	Cromatograma del estándar de vitamina D ₃ de 12.06 µg/mL.....	29
3.	Cromatograma del estándar de vitamina D ₃ de 10.08 µg/mL.....	31
4.	Cromatograma del estándar de vitamina D ₃ de 1.89 µg/mL.....	32
5.	Cromatograma del estándar de vitamina D ₃ de 0.378 µg/mL.....	34
6.	Cromatograma del estándar de vitamina D ₃ de 0.0315 µg/mL.....	36
7.	Cromatograma del estándar de vitamina D ₃ de 0.0252 µg/mL.....	38
8.	Cromatograma de validación de vitamina D ₃ de 33.6 µg/mL.....	40
9.	Cromatograma de validación de vitamina D ₃ de 2.1 µg/mL.....	42
10.	Cromatograma de validación de vitamina D ₃ de 1.05 µg/mL.....	44
11.	Cromatograma de validación de vitamina D ₃ de 0.063 µg/mL.....	46
12.	Cromatograma de validación de vitamina D ₃ de 0.0378 µg/mL.....	48
13.	Correlación de concentraciones reales y proyectadas de colecalciferol ...	50
14.	Prueba t de concentraciones reales y proyectadas de colecalciferol.....	51
15.	Correlación de concentraciones reales y proyectadas de ergocalciferol...	52
16.	Prueba t de concentraciones reales y proyectadas de ergocalciferol	53

1. INTRODUCCIÓN

Las vitaminas liposolubles A, D, E y K se agregan a margarinas, productos lácteos, cereales de desayuno y formulas infantiles para fortificarlos debido a la pérdida en proceso y para suplir los requerimientos diarios de vitaminas.

Es necesario realizar análisis cualitativos y cuantitativos para confirmar el cumplimiento de las regulaciones de etiquetas de alimentos propuestas por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés). De acuerdo a la FDA (2006) las vitaminas A y C deben ser declaradas obligatoriamente en las etiquetas nutricionales como porcentaje de valor diario. En el caso de la vitamina D esta debe ser reportada cuando el alimento ha sido fortificado.

La AOAC ha desarrollado métodos oficiales indirectos y directos para la determinación de vitamina D en alimentos y productos farmacéuticos. Todos estos métodos utilizan curvas estándares de calibración para permitir la detección de vitamina D por colorimetría y cromatografía líquida.

La cromatografía líquida ha sido adoptada y recomendada por la FDA para análisis de compuestos termolábiles, no volátiles y altamente polares, ésta detecta compuestos a temperatura ambiente, bloqueando el oxígeno y luz. La información espectral producida por los detectores ultravioleta y arreglo de diodos (DAD) permite obtener valores cualitativos y cuantitativos (Gratzfeld-Hüsgen y Shuster 1996).

El principio de cromatografía líquida consiste en pasar una muestra de solución extractora en fase móvil a través de una fase estacionaria, algunos compuestos tendrán resistencia a eluir debido a las interacciones químicas entre los componentes de la muestra y el material de la fase estacionaria. Es así que dependiendo de las características químicas de cada componente y la fase estacionaria se puede identificar y cuantificar el componente de la muestra original.

El objetivo del presente estudio fue implementar un método y validar curvas de calibración para cuantificar vitamina D₃ y D₂ mediante el uso de Cromatografía Líquida en el rango de 0.378 a 4200 µg de vitamina D/100 g de muestra. Las validaciones y curvas de calibración se realizaron con diluciones conocidas de estándares de vitamina D₃ y D₂. Este estudio excluyó la fase de extracción en alimentos por falta de logística

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES.

Antes del descubrimiento de las vitaminas, ciertos alimentos eran conocidos por curar enfermedades que hoy en día podemos reconocer como deficiencias de vitaminas. Los antiguos egipcios por ejemplo, trataron la ceguera nocturna (nictalopía) con aplicaciones tópicas de jugo extraído del hígado, fuente rica de vitamina A (Wardlaw 1999).

Las vitaminas son sustancias orgánicas necesarias en pequeñas cantidades que deben ser aportadas en la dieta de humanos porque no pueden ser sintetizados por el cuerpo. Una excepción es la vitamina D, la cual puede ser sintetizada por la piel en presencia de rayos ultravioleta de longitud de onda entre 290 y 315 nm; las vitaminas K, B₁, B₁₂ y ácido fólico son sintetizadas en pequeñas cantidades por la flora del tracto intestinal (Wardlaw 1999).

Según Tomashek y otros (2001), estudios recientes han demostrado el posible resurgimiento del raquitismo en niños de Estados Unidos e Inglaterra. En adultos la deficiencia de vitamina D causa osteoporosis (huesos frágiles) y osteomalacia (similar al raquitismo). La malnutrición y por consiguiente una falta potencial de vitamina D puede desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer, dolor crónico, debilidad, fatiga crónica, diabetes tipo 1, elevación de la presión arterial, depresión, desórdenes afectivos y enfermedades del corazón.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), es la técnica analítica más empleada en la actualidad para calificar y cuantificar compuestos químicos ya que ofrece grandes ventajas sobre otros métodos. Por ejemplo tiene la capacidad de analizar varias mezclas de compuestos o elementos en un gran rango de concentración (CPACT 2005).

2.2 VITAMINA D

La vitamina D o calciferol pertenece al grupo de las vitaminas liposolubles. Las moléculas precursoras o provitaminas están presentes en alimentos que contienen la 7-deshidrocolesterol presente en los tejidos animales y el ergosterol constituyente de los vegetales. Estas pasan a ser vitaminas cuando la piel se expone a los rayos solares convirtiendo así el 7-deshidrocolesterol en colecalciferol (vitamina D₃) y el ergosterol a vitamina D₂. El metabolismo es el que se encarga de producir las formas metabólicamente activas (Jakobsen y otros 2003).

En el hígado un grupo hidroxilo (-OH) es adherido al colecalciferol para formar 25-hidroxicolecalciferol. Este compuesto es transportado hacia los riñones donde otro grupo hidroxilo es ligado para formar 1,25-dihidroxicolecalciferol, una forma activa de vitamina D también conocida como calcitrol. Este compuesto en el intestino favorece la absorción de calcio y fosfato, beneficiando directamente a la mineralización de huesos y dientes (Wardlaw 1999).

Es necesario conocer las fuentes dietéticas de vitamina D (Cuadro 1), debido a que algunas personas no pueden generar formas activas de vitamina D con solo la exposición al sol.

Cuadro 1. Fuentes dietéticas de vitamina D.

Alimentos	UI vit D/ g de muestra	µg vitD/100 g de muestra
Multivitaminas o tabletas	1600	4000.00
Aceite de hígado de bacalao.	95.91	239.78
Sardinas, en lata con aceite.	5.04	12.60
Margarina, fortificada.	4.23	10.58
Salmón, cocido.	3.63	9.08
Caballa, cocido.	3.48	8.70
Atún, enlatado con aceite.	2.35	5.88
Yema de huevo.	1.07	2.68
Pudín.	0.44	1.10
Leche entera fortificada.	0.43	1.08
Queso suizo.	0.42	1.05
Hígado, carne de res cocida.	0.15	0.38

Fuente: IOM 2004

Actualmente, pocos son los alimentos que contienen cantidades significativas de vitamina D. Las fuentes más densas de vitamina D son los aceites de pescado, pescados grasos (por ejemplo: sardinas, bacalao, y salmón) y leches fortificadas. Sin embargo los huevos, mantequilla, hígado y pocas marcas de margarinas contienen vitamina D, grandes raciones deben ser ingeridas para obtener una cantidad apreciable de vitamina por ejemplo, se deben consumir diariamente 5 litros de leche entera, 2 Kg de hígado, 9 yemas de huevo, 10 Kg de ostras y 250 g de mantequilla para suplir las necesidades diarias de vitamina D; es por esto que no se consideran a estos alimentos como fuentes significativas (Wardlaw 1999).

Los requerimientos diarios de vitamina D (Cuadro 2), difieren por la edad y el riesgo en desarrollar deficiencias de vitamina D. Personas mayores a los 50 años tienen el

mayor riesgo, la habilidad de la piel de convertir vitamina D a su forma activa decrece con los años.

Cuadro 2. Requerimientos diarios de vitamina D.

Edad (años)	Hombres y mujeres (UI/día)
0 – 1	400
2 - 50	200 ^a
51 - 70	400
> 70	600

^aMujeres embarazadas o lactantes no necesitan fuentes extras de vitamina D.

Fuente: IOM 2004

Según Terán y Campbell (2006) el consumo prolongado en bebés puede causar retardo mental y físico, deficiencia renal y muerte. En mujeres embarazadas el exceso de vitamina D produce estrechamiento congénito de la aorta del feto y convulsiones en el recién nacido.

La vitamina D es a menudo expresada en Unidades Internacionales (UI), aunque se prefiere utilizar los miligramos (mg) de vitamina D, una UI de vitamina D es equivalente a 0.000025 mg y un microgramo (µg) equivale a 40 UI (Rowlett y UNC 2001). De acuerdo a Greenbaum (1973) la vitamina D₂ y D₃ tienen la misma actividad biológica.

2.3 MÉTODOS PARA CUANTIFICACIÓN DE VITAMINA D

Para la cuantificación de vitamina D en alimentos se han desarrollado métodos oficiales de análisis de la AOAC (Asociación de Analistas Químicos Oficiales), por sus siglas en inglés) desde el año de 1975.

2.3.1 Método AOAC 975.42

En 1975 se desarrolló el primer y único método oficial colorimétrico para cuantificación de vitamina D en: resinas de vitamina D conteniendo ≥ 200000000 UI/g, diluciones aceitosas conteniendo ≥ 100000 UI/g y leches en polvo, cápsulas, tabletas, dispersiones acuosas conteniendo ≥ 25000 UI/g. Para concentrados de vitamina D sin otras vitaminas el principio consiste en saponificar y extraer la preparación, el material insaponificable es tratado con anhídrido málico para remover los isómeros trans. Después del tratamiento con anhídrido málico la solución se reacciona con SbCl₃ y se determina colorimétricamente a 500 nm (AOAC 2005).

Para preparaciones multivitaminicas de vitamina D el principio consiste en saponificar y extraer de las preparaciones, el material insaponificable es sucesivamente cromatografiado sobre una preparación de fosfato-alumina para remover tocoferoles, carotenos y butilhidroxitolueno (BHT), si presenta. La solución purificada es tratada con

anhídrido málico para remover biológicamente los isómeros trans. La vitamina D es determinada colorimétricamente por la reacción de SbCl_3 a 550 nm (AOAC 2005).

2.3.2 Método AOAC 979.24

En 1979 se desarrolló el primer método oficial de cromatografía líquida para vitamina D en preparaciones vitamínicas. Aplicable a aceites conteniendo ≥ 100000 UI de colecalciferol o vitamina D_3/g ; resinas ≥ 20000000 UI colecalciferol/g; y dispersiones acuosas ≥ 25000 UI de colecalciferol/g. El principio consiste en saponificar y extraer en concentrados secos o dispersiones acuosas, ya que las resinas de vitamina D y diluciones de aceite son disueltas en solvente. La vitamina D y previtamina D son separadas de impurezas por cromatografía líquida. La concentración de previtamina D es calculada como vitamina D usando un factor de calibración. Se reporta vitamina D como la suma de vitamina D y previtamina D (AOAC 2005).

2.3.3 Método AOAC 980.26

En el año de 1980 se desarrolló el método oficial para de cromatografía líquida para preparaciones multivitamínicas en vitamina D conteniendo ≥ 200 UI de vitamina D/g. El principio consiste en saponificar y extraer de las preparaciones el material saponificable, posteriormente se añade el estándar interno (Δ^4 , 6-colestadienol). La vitamina D y los isómeros, incluyendo el estándar interno son separados en una fracción de sustancias que interfieren sobre la columna de limpieza LiChrosorb RP-8. La columna Partisil separa vitamina D, previtamina D y el estándar interno de las impurezas (AOAC 2005).

2.3.4 Método AOAC 985.27

El método oficial de cromatografía líquida AOAC 985.27 se estableció en el año de 1985 para concentrados de vitamina A y D, aplicable en aceites, leche en polvo y dispersiones acuosas de concentrados de vitamina D conteniendo ≥ 5000 UI de vitamina D/g. El principio de este método es que las porciones evaluadas de vitamina A y D en aceites son disueltas en la fase móvil. Los concentrados secos u dispersiones acuosas son tratados con enzimas disueltas en agua y posteriormente extraídos. La vitamina D y previtamina D son separados los esterés de vitamina A de las impurezas por cromatografía líquida (AOAC 2005).

2.3.5 Método AOAC 981.17

En el año de 1981 se estableció el método oficial de cromatografía líquida (AOAC 981.17) para vitamina D en leche en polvo y leche fortificada, este método es aplicable en leche fluida y en polvo conteniendo ≥ 1 UI de vitamina D/g.

El principio se fundamenta en la saponificación y extracción de las muestras. La vitamina D y sus isómeros son separados de las sustancias que interfieren con la columna de limpieza. Una segunda columna separa la vitamina D de impurezas. La vitamina D es corregida a resultado de previtamina D formada durante la saponificación (AOAC 2005).

2.3.6 Método AOAC 982.29

En el año de 1982 se estableció el método oficial de cromatografía líquida (AOAC 982.29) para vitamina D en mezcla de alimentos, premezclas y alimentos para animales, aplicable a todos los productos alimenticios conteniendo > 2 UI y < 200 UI de vitamina D/g. Para productos que contienen ≥ 200 UI de vitamina D/g, se debe usar el método 980.26. El principio inicial es saponificar y extraer, la parte insaponificable es removida por la columna de alumina la cual remueve tocoferoles y carotenos, si están presentes. La columna de limpieza de cromatografía líquida separa las sustancias que interfieren en la misma. Una segunda columna empacada con sílice separa la vitamina D de las impurezas (AOAC 2005).

2.3.7 Método AOAC 2002.05

El método más reciente de cromatografía líquida se estableció en el año de 2002 para vitamina D₃ (colecalfiferol) en alimentos seleccionados. Aplicable para la determinación de vitamina D₃ (0.4-12 μg / 100 g) en leche fortificada, formulas infantiles, margarina, aceites de cocina y aceites de pescado. Los materiales evaluados no deben contener niveles cuantificables de vitamina D₂. El principio de este método es que después de la adición de un estándar interno (vitamina D₂) y una hidrólisis básica, la vitamina D₃ es extraída con n-heptano. La fracción que contiene vitamina D₂/D₃ es separada por la fase normal de cromatografía líquida. Después de la evaporación y dilución en acetonitrilo-metanol, la vitamina D es determinada por fase reversa del cromatógrafo líquido con detector ultra violeta a 256 nm. La porción separada es analizada en paralelo para confirmar la ausencia de vitamina D₂ endógena (AOAC 2005).

2.4 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Según Wikimedia (2006) la cromatografía líquida es una técnica que permite separar físicamente y cuantificar los distintos componentes de una solución. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil denominada fase móvil que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido. Las sustancias que permanecen más tiempo libre en la fase móvil avanzan más rápidamente con el fluir de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y por tanto tardarán más en salir o fluir.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano, ubicado en el Valle del Yegüare, 32 Km al sureste de Tegucigalpa, departamento de Francisco Morazán, Honduras, C.A.

3.2 MATERIALES

1. Estándar de vitamina D₃ (colecalfiferol) 99% de pureza. Supelco
2. Estándar de vitamina D₂ (ergocalciferol) 98% de pureza. Supelco.
3. Acetonitrilo (ACN). 99.93% de pureza. Grado HPLC. Sigma Aldrich.
4. Metanol (MeOH). 99.93% de pureza. Grado HPLC. Sigma Aldrich.
5. Metanol (*MeOH*). Grado reactivo. Sigma Aldrich.
6. Filtros Millex[®]-HV13, Durapore[®] PVDF, 13 mm (0.45 µm) Sigma Aldrich.
7. Viales de 4 ml. Supelco.
8. Micro jeringas de 20 µL, graduación 1 µL. Hamilton.
9. Micropipeta: Finnpiptete[®]II Fisher 100-1000 µL. Fisherbrand. ¹
10. Micropipeta: Finnpiptete[®]II Fisher 2-20 µL. Fisherbrand. ²
11. Puntas volumétricas de 20 y 1000 µL. Fisherbrand.
12. Cristalería de laboratorio y papel aluminio.
13. Palillos de dientes.

3.3 EQUIPO

1. Balanza analítica OHAUS Adventurer No. AR2140.
2. Estación química para HPLC Agilent 1100.
3. Microdesgasificador al vacío Agilent 1100.
4. Bomba cuaternaria Agilent 1100.
5. Detector de arreglo de diodos Agilent 1100.
6. Válvula de inyección Rheodyne 7725i.

¹ (x) Abreviatura a usar para denominar a la micropipeta Fisherbrand de 100-1000 µL.

² (y) Abreviatura a usar para denominar a la micropipeta Fisherbrand de 2-20 µL.

7. Columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent (4.6 mm x 150 mm) 5 μm .
8. Inyector manual Agilent 1100.
9. Cámara fría.

3.4 METODOLOGÍA

El método implementado para cuantificar vitamina D₃ y D₂ fue adaptado del AOAC 982.29 y de valoración de la fortificación de quesos procesados con vitamina D₃ (Mistry y otros 2002).

3.4.1 Diseño experimental

Se evaluaron dos curvas de calibración para cuantificar vitamina D₃ y D₂ utilizando 8 niveles de solución estándar correspondientes a 42, 12.60, 10.08, 1.89, 0.378, 0.0315, 0.0252 y 0.00378 μg de vitamina D₃ y D₂/mL de ACN. Se hicieron tres lecturas por cada nivel para cada curva de calibración y se midió absorbancia a 254 nm expresada como área bajo el pico correspondiente al compuesto. El criterio de selección que se usó para determinar el mejor modelo de regresión fue el coeficiente de determinación ≥ 0.999 en Microsoft Office Excel 2003.

3.4.2 Método de Mistry

Por falta de logística para la extracción de vitamina D en alimentos en el Laboratorio de Análisis de Alimentos, se consideró la fase de extracción sólida realizado por Mistry y otros (2002) como base para simular que, los estándares de vitamina D₃ y D₂ actúan como el eluido seco del secado bajo nitrógeno antes de ser reconstituido.

3.4.3 Desarrollo de curvas estándares de calibración de vitamina D₃ y D₂

Para la formación de la curva estándar de vitamina D₃ y D₂ se prepararon diluciones de acetonitrilo con sus respectivos estándares de vitamina.

3.4.3.1 Preparación de las diluciones estándares de vitamina D₃ y D₂

Para la preparación de las diluciones estándares de vitamina D₃ y D₂ se usaron los mismos niveles de concentración, es decir, entre el rango de 0.00378 a 42 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para facilidad del lector se decidió usar el término vitamina D como sinónimo de vitamina D₃ y D₂ en ésta preparación.

- Toda la elaboración de las diluciones se realizó bajo condiciones de luz de seguridad roja, libre de corrientes de aire y a temperatura promedio de 20 °C.
- La cristalería fue previamente lavada con *MeOH* grado reactivo.

- Preparación de las diluciones:
 - (a) Se procedió a pesar 2.10 mg de estándar de vitamina D con un palillo de dientes en un balón volumétrico de 50 mL, posteriormente fue aforado con ACN al volumen antes mencionado, la concentración final fue de 42 μg de vitamina D/mL de ACN.
 - (b) Se transfirieron 15 mL de la solución (a) a un balón volumétrico de 50 mL, se aforó con ACN para tener una concentración final de 12.60 μg de vitamina D/mL ACN.
 - (c) Se trasladaron 8 mL de solución (b) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para tener una concentración final de 10.08 μg de vitamina D/mL ACN.
 - (d) Se transfirieron 1.5 mL con (x) de la solución (b) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para obtener una concentración final de 1.89 μg de vitamina D/mL ACN.
 - (e) Se trasladaron 1 mL con (x) de la solución (d) a un balón volumétrico de 5 mL, se aforó con ACN para obtener una concentración final de 0.378 μg de vitamina D/mL ACN.
 - (f) Se transfirieron 0.025 mL con (y) de la solución (b) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para obtener una concentración final de 0.0315 μg de vitamina D/mL ACN.
 - (g) Se trasladaron 0.02 mL con (y) de la solución (f) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para obtener una concentración final de 0.0252 μg de vitamina D/mL ACN.
 - (h) Se transfirieron 0.75 mL con (x) de solución (g) a un balón volumétrico de 5 mL, se aforó con ACN para obtener una concentración final de 0.00378 μg de vitamina D/mL ACN.
- Todos los balones volumétricos fueron forrados con papel aluminio y se rotularon de acuerdo al nivel de concentración
- Para cada balón volumétrico se asignó un vial, previamente forrado con papel aluminio y rotulado.
- De cada balón se extrajeron 4 mL de solución estándar con jeringas de inyección y se hicieron pasar por filtros de 0.45 μm (13 mm) para ser transferidos a sus respectivos viales.
- Las soluciones (a) y el grupo de viales correspondientes a cada vitamina se almacenaron a 4 °C por dos semanas.

3.4.3.2 Método cromatográfico y análisis

Las diluciones estándares de vitamina D₃ y D₂ se inyectaron en el HPLC para cuantificar colecalciferol y ergocalciferol; posteriormente el conjunto de cromatogramas por estándar de solución permitirá obtener la curva estándar de calibración con su respectivo modelo de regresión.

Se utilizó el HPLC Agilent modelo 1100 junto al software ChemStation. Se crearon los métodos de análisis en el software; VITD para vitamina D₃ y VITD2 para vitamina D₂, bajo las siguientes condiciones: se usó un inyector manual Agilent 1100 con una

válvula de inyección Rheodyne 7725i ajustada a un volumen de inyección de 20 μL ; se tomaron 20 μL de cada vial de solución estándar para ser inyectados en la válvula de inyección, se dejó un tiempo promedio de 5 segundos en posición abierta a la válvula para favorecer la mezcla con la fase móvil; se realizaron tres inyecciones por cada nivel de solución estándar. Se utilizó una columna analítica ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent (4.6 mm x 150 mm) 5 μm de tamaño de partícula con una tasa de flujo de 1.0 mL/min; la fase móvil usada fue metanol: acetonitrilo (70:30 vol/vol); se utilizó un detector de arreglo de diodos a 254 nm. La duración total del análisis cromatográfico fue 12 minutos. Los estándares utilizados en la formación de las curvas de regresión fueron de pureza 99% y 98%, vitamina D_3 y D_2 respectivamente. Estos permitieron obtener un pico de vitamina D_3 y D_2 único en los análisis. La temperatura ambiente promedio fue de 20 $^{\circ}\text{C}$. La presión promedio fue de 43 bar para vitamina D_3 y 40 bar para vitamina D_2 .

La cuantificación o análisis se determinó por las áreas bajo el pico de vitamina D_3 como un índice de concentración de vitamina D_3 a un tiempo promedio de elución (Mattila y otros 1992). Las diluciones estándares de 0.00378 a 42 μg de vitamina D_3 y D_2 /mL de ACN y el área registrada bajo el pico de vitamina D_3 y D_2 en unidades de mili absorbancia por segundo (mAU*s) permitió construir cada curva estándar de regresión lineal con su respectivo límite mínimo de detección para cada vitamina estándar de solución.

3.4.3.3 Obtención de modelos de regresión

Para obtener los modelos de regresión lineal de vitamina D_3 y D_2 se realizaron gráficas de tendencia correspondientes a cada estándar de vitamina. La variable dependiente fue el área promedio bajo el pico de cada nivel del cromatograma correspondiente al nivel de solución estándar. La variable independiente fue la concentración de vitamina D expresada como μg de vitamina D/mL de ACN.

Por ser curvas estándares de calibración se escogen modelos de regresión que tengan un coeficiente de determinación o $R^2 \geq 0.999$. Esto favorece el poder de predicción de las curvas para obtener valores precisos con respecto a muestras de alimentos a cuantificar.

3.4.4 Desarrollo de diluciones de validación de vitamina D_3 y D_2

Con el objetivo de verificar la precisión y exactitud de los modelos de regresión obtenidos de las curvas estándares de calibración se realizaron diluciones de validación. Éstas diluciones fueron analizadas y cuantificadas bajo las mismas condiciones cromatográficas que las diluciones estándares de calibración.

Las diluciones estándares de validación de vitamina D_3 y D_2 fueron establecidas dentro del rango de las curvas estándar de 0.00378 a 42 μg de vitamina D/mL de ACN. Esto para asegurar la linealidad del modelo de regresión de la curva de calibración estándar.

3.4.4.1 Preparación de las diluciones de validación de vitamina D₃

- Toda la elaboración de las diluciones se realizó bajo condiciones de luz de seguridad roja, libre de corrientes de aire y a temperatura promedio de 20 °C.
- La cristalería fue previamente lavada con *MeOH* grado reactivo.
- Preparación de las diluciones de validación.
 - (a) Se pesaron 2.1 mg de estándar de vitamina D₃ con un palillo de dientes en un balón volumétrico de 50 mL, posteriormente fue aforado con ACN al volumen antes mencionado, la concentración final fue de 42 µg de colecalciferol/mL de ACN. Esta solución fue empleada como solución madre, no de validación.
 - (b) Se transfirieron 4 mL de la solución (a) a un balón volumétrico de 5 mL, se aforó con ACN para tener una concentración final de 33.6 µg de colecalciferol/mL de ACN.
 - (c) Se trasladaron 0.5 mL de solución (a) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para tener una concentración final de 2.1 µg de colecalciferol/mL de ACN.
 - (d) Se trasladaron 5 mL de solución (c) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para tener una concentración final de 1.05 µg de colecalciferol/mL de ACN.
 - (e) Se transfirieron 0.3 mL de la solución (c) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para obtener una concentración final de 0.063 µg de colecalciferol/mL de ACN.
 - (f) Se trasladaron 3 mL de la solución (d) a un balón volumétrico de 5 mL, se aforó con ACN para obtener un concentración final de 0.0378 µg de colecalciferol/mL
- Todos los balones volumétricos fueron forrados con papel aluminio y se rotularon de acuerdo al nivel de concentración
- Para cada balón volumétrico se asignó un vial, previamente forrado con papel aluminio y rotulado.
- De cada balón se extrajeron 4 mL de solución estándar con jeringas de inyección y se hicieron pasar por filtros de 0.45 µm (13 mm) para ser transferidos a sus respectivos viales.
- Las diluciones (b), (c), (d), (e), (f) y el grupo de viales correspondientes a las diluciones de validación se almacenaron a 4 °C por dos semanas.

3.4.4.2 Preparación de las diluciones de validación de vitamina D₂

- Toda la elaboración de las diluciones se realizó bajo condiciones de luz de seguridad roja, libre de corrientes de aire y a temperatura promedio de 20 °C.
- La cristalería fue previamente lavada con *MeOH* grado reactivo.
- Preparación de las diluciones de validación.
 - (a) Se pesaron 2.1 mg de estándar de vitamina D₂ con un palillo de dientes en un balón volumétrico de 50 mL, posteriormente fue aforado con ACN al volumen antes mencionado, la concentración final fue de 42 µg de

colecalfiferol/mL de ACN. Esta solución fue empleada como solución madre, no de validación.

- (b) Se transfirieron 4 mL de la solución (a) a un balón volumétrico de 5 mL, se aforó con ACN para tener una concentración final de 33.6 μg de colecalfiferol/mL de ACN.
 - (c) Se trasladaron 0.5 mL de solución (a) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para tener una concentración final de 2.1 μg de ergocalciferol/mL de ACN.
 - (d) Se trasladaron 5 mL de solución (c) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para tener una concentración final de 1.05 μg de colecalfiferol/mL de ACN.
 - (e) Se transfirieron 2.5 mL de la solución (d) a un balón volumétrico de 5 mL, se aforó con ACN para obtener una concentración final de 0.525 μg de colecalfiferol/mL de ACN.
 - (f) Se trasladaron 0.2 mL de la solución (c) a un balón volumétrico de 10 mL, se aforó con ACN para obtener un concentración final de 0.42 μg de colecalfiferol/mL de ACN.
- Todos los balones volumétricos fueron forrados con papel aluminio y se rotularon de acuerdo al nivel de concentración
 - Para cada balón volumétrico se asignó un vial, previamente forrado con papel aluminio y rotulado.
 - De cada balón se extrajeron 4mL de solución estándar con jeringas de inyección y se hicieron pasar por filtros de 0.45 μm (13 mm) para ser transferidos a sus respectivos viales.
 - Las diluciones (b), (c), (d), (e), (f) y el grupo de viales correspondientes a las diluciones de validación se almacenaron a 4 °C por dos semanas.

3.4.4.3 Métodos cromatográficos y de análisis

Los métodos cromatográficos usados para las validaciones de vitamina D₃ y D₂ fueron los mismos métodos creados para las curvas estándares de calibración de cada vitamina.

Para la validación de la curva de calibración se hizo uso de las diluciones de validación de 33.6, 2.1, 1.05, 0.063 y 0.0378 μg de vitamina D₃/mL de ACN y el método “VITD” bajo las mismas condiciones iniciales de su creación.

Para la validación de la curva de calibración se hizo uso de las diluciones de validación de 33.6, 2.1, 1.05, 0.525 y 0.420 μg de vitamina D₂/mL de ACN y el método “VITD2” bajo las mismas condiciones iniciales de calibración.

3.4.4.4 Análisis estadístico

Se utilizó el programa Sistemas de Análisis Estadístico (SAS[®], por sus siglas en inglés) versión 9.1. Se evaluaron los resultados con un nivel de significancia de 5% (P < 0.05). Se realizó un análisis de correlación y prueba t para determinar la ausencia de

diferencias estadísticas entre las concentraciones de vitamina D₃ y D₂ reales versus las esperadas en los diferentes niveles de solución de validación mediante el uso de sus respectivos modelos de regresión.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE COLECALCIFEROL

En el Cuadro 3 se muestra que los coeficientes de variación [CV (%)] de los tiempos de retención respecto a cada nivel de solución estándar fueron <1%, por lo tanto se determinó que el HPLC Agilent 1100 fue preciso al identificar colecalciferol en cada cromatograma en el rango de concentración establecido en el estudio.

Al determinar la curva estándar de colecalciferol se identificó que el tiempo de retención varió de un nivel a otro en segundos, es así que el tiempo promedio de retención del estándar fue de 9.84 ± 0.094 minutos. Por lo tanto fue a este tiempo donde el colecalciferol fue identificado y cuantificado por el HPLC.

Cuadro 3. Tiempo de retención y CV(%) de colecalciferol.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de retención (min) ^a	Coficiente variación(%) ^b
42	9.71 ± 0.09	0.88
12.6	9.92 ± 0.02	0.15
10.08	9.93 ± 0.03	0.31
1.89	9.85 ± 0.05	0.51
0.378	9.88 ± 0.06	0.60
0.0315	9.80 ± 0.1	0.70

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de vitamina D₃

^b CV (%) del tiempo promedio de retención de cada nivel de dilución estándar de vitamina D₃

Se muestra en la Figura 1 una agrupación de 18 cromatogramas obtenidos con el software ChemStation Agilent 1100. Los cromatogramas mencionados corresponden a los niveles desde 0.0315 μg de colecalciferol/mL ACN a 42 μg de colecalciferol/mL ACN.

La desviación estándar nos indica que el tiempo de retención de los 18 niveles detectables varió en ± 5.66 segundos y el % coeficiente de variación de 0.959 nos muestra que nuestros tiempos no varían mucho de un nivel respecto a otro.

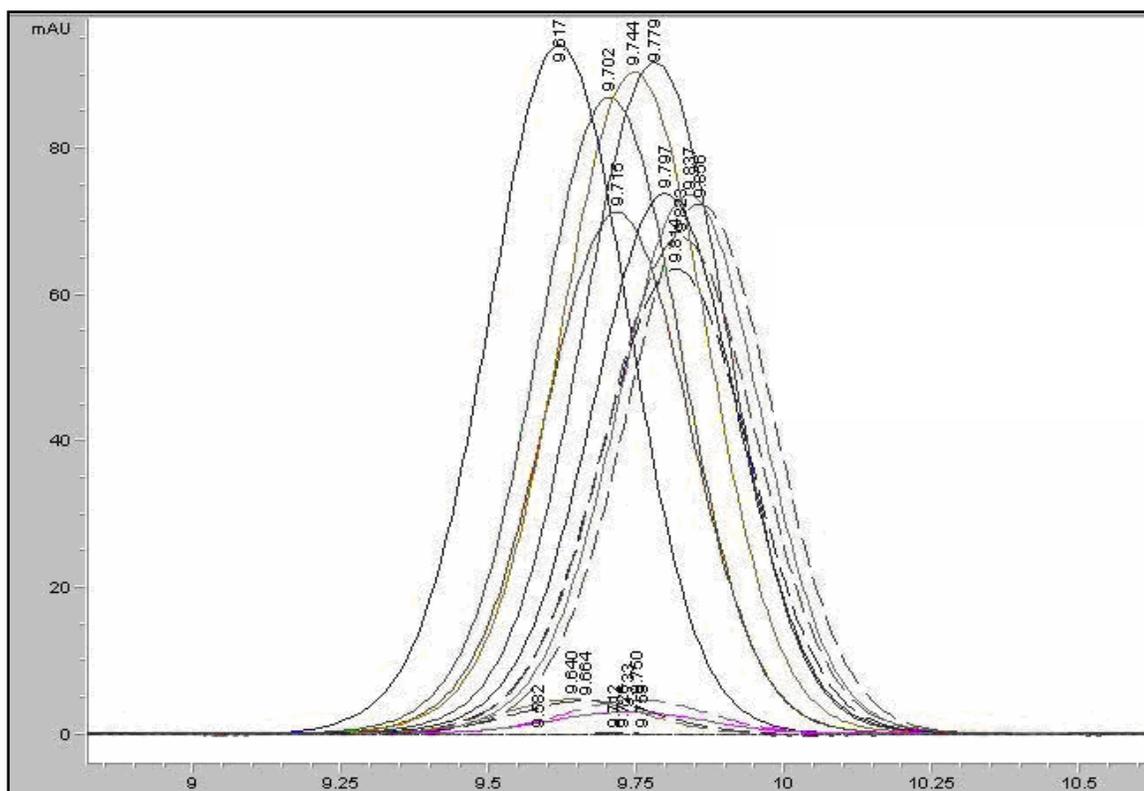


Figura 1. Agrupación de cromatogramas detectables de colecalciferol en HPLC.

En el Cuadro 4 se muestran las áreas promedio de colecalciferol respecto a cada nivel de solución estándar. Las áreas promedio obtenidas por el cromatógrafo líquido respecto a cada nivel de dilución estándar son precisas ya que se obtuvieron CV (%) menores a 6.36.

Se realizó un análisis de regresión lineal donde se encontró una relación directa ($P < 0.05$) entre la concentración de dilución estándar respecto a las áreas promedio obtenidas en el HPLC.

Cuadro 4. Áreas promedio y CV (%) de colecalciferol.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo ^a Retención (min)	Área promedio ^b (mAU*s)	Coefficiente de Variación (%)
42	9.71 ± 0.09	1697.12 ± 1.15	0.07
12.6	9.92 ± 0.02	492.41 ± 1.68	0.34
10.08	9.93 ± 0.03	396.51 ± 2.15	0.54
1.89	9.85 ± 0.05	83.10 ± 0.51	0.61
0.378	9.88 ± 0.06	20.41 ± 0.13	0.65
0.0315	9.80 ± 0.1	1.27 ± 0.08	6.36

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de vitamina D₃

^b Área promedio de tres lecturas por nivel de dilución estándar de vitamina D₃.

Se muestra en la Figura 2 la curva estándar para la cuantificación de vitamina D₃ que se obtuvo por regresión lineal. La variable dependiente muestra el área de colecalciferol reportada por cada cromatograma realizado. La variable independiente representa los µg de colecalciferol /mL de ACN.

Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9998, indicando una relación directa entre la concentración de vitamina D₃/mL ACN y su área de pico de colecalciferol registrado en el HPLC. (Anexos 1, 2, 3, 4, 5 y 6)

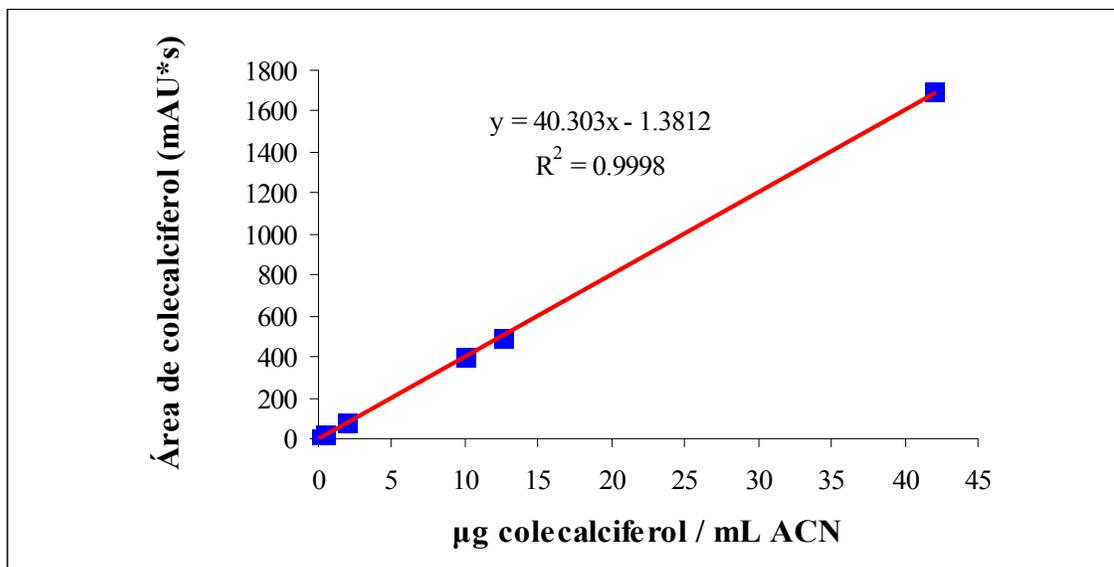


Figura 2. Curva estándar de colecalciferol.

La curva estándar permitirá cuantificar colecalciferol en el rango de 0.0315 a 42 µg/mL de ACN o desde 0.00315 a 4.2 mg de vitamina D₃/100 g de muestra. Por ejemplo, el atún enlatado con aceite tiene el nivel de colecalciferol mínimo detectable (0.0059 mg/100 g de muestra), la margarina fortificada tiene 0.0106 mg/100 g de muestra, el aceite de hígado de bacalao es uno de los alimentos con mayor cantidad de colecalciferol (0.2398 mg/100 g de muestra) sin dejar por fuera a las tabletas como suplementos alimenticios con 4 mg/100 g de muestra.

La solución con 0.0252 µg/mL de ACN o 0.00252 mg/100 g de muestra y los niveles inferiores subsiguientes no fueron detectados en el cromatógrafo líquido bajo la metodología implementada (Anexo 7). Por lo tanto, alimentos como la yema de huevo, leche entera fortificada, queso suizo, hígado o carne de res cocida no son detectables bajo las condiciones antes mencionadas.

Es de importancia que al analizar cualquier alimento sea necesario consultar la literatura para tener una idea de la cantidad de vitamina D que éste posee para poder definir si está dentro de la curva estándar de calibración.

En el Cuadro 5 se muestran los tiempos promedios de retención y coeficientes de variación (%) para cada nivel de dilución de validación.

Cuadro 5. Tiempo de retención y CV (%) de validación de colecalciferol.

Validación estándar (µg/mL)	Tiempo retención (min) ^a	CV (%) ^b
33.6	9.83 ± 0.03	0.31
2.1	9.68 ± 0.06	0.6
1.05	9.73 ± 0.01	0.06
0.063	9.72 ± 0.01	0.14
0.0378	9.76 ± 0.06	0.65

^a Tiempo promedio de retención de tres repeticiones por nivel de solución estándar

^b CV (%) correspondiente a los tiempos de elución por cada nivel de validación de colecalciferol.

Las diluciones de validación fueron identificadas como colecalciferol por el método “VITD” creado en el software ChemStation Agilent, éstas se reportaron como colecalciferol con áreas de 100%. Es importante conocer que, una solución de validación se reporta como colecalciferol si se ajusta al tiempo de retención promedio de la curva estándar. (Anexos 8, 9, 10, 11 y 12)

En el Cuadro 6 se muestra que al reemplazar el área promedio de colecalciferol de las diluciones de validación en el modelo de regresión de la curva estándar se obtuvieron concentraciones iniciales proyectadas, expresadas en µg de colecalciferol/mL de ACN.

Cuadro 6. µg de colecalciferol /mL de ACN obtenidos del modelo de regresión.

Concentración conocida (µg/mL)	Área promedio (mAU*s)	Concentración obtenida del modelo (µg/mL)
33.6	1360.87	33.8
2.10	84.13	2.12
1.05	42.09	1.08
0.063	2.63	0.0996
0.0378	1.56	0.0730

El análisis de correlación (Anexo 13) determinó que existe una asociación de correlación del 100% ($P < 0.05$) entre los valores de concentración conocidos versus proyectados obtenidos a partir del modelo de regresión de la curva estándar de colecalciferol. La prueba t (Anexo 14) determinó la ausencia de diferencias significativas entre los valores conocidos versus proyectados ($P|t| > 0.9947$). Por lo tanto la curva

estándar de calibración tiene un buen poder de predicción de colecalciferol en el rango detectable de estándar de dilución.

4.2 DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE ERGOCALCIFEROL.

El Cuadro 7 muestra que los coeficientes de variación [CV (%)] de los tiempos de retención respecto a cada nivel de solución estándar fueron <1%, por lo tanto se determinó que el HPLC Agilent 1100 fue preciso al identificar colecalciferol en cada cromatograma. Al determinar la curva estándar de colecalciferol se identificó que el tiempo de retención varió de un nivel a otro en segundos, es así que el tiempo promedio de retención del estándar fue de 9.17 ± 0.061 minutos. Por lo tanto fue a este tiempo donde el ergocalciferol fue identificado y cuantificado por el HPLC.

Cuadro 7. Tiempo de retención y CV (%) de ergocalciferol.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo retención (min) ^a	Coefficiente variación (%) ^b
42	9.14 ± 0.02	0.23
12.6	9.13 ± 0.04	0.46
10.08	9.24 ± 0.09	0.98
1.89	9.19 ± 0.04	0.44
0.378	9.17 ± 0.03	0.38

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de vitamina D₂

^b CV (%) del tiempo promedio de retención de cada nivel de dilución estándar de vitamina D₂

La Figura 3 muestra una agrupación de 15 cromatogramas generados por el software ChemStation Agilent 1100 (0.378 $\mu\text{g/mL}$ ACN – 42 $\mu\text{g/mL}$ ACN). La desviación estándar nos indica que el tiempo de retención varió en ± 3.65 segundos y el coeficiente de variación (%) de 0.663 nos muestra que nuestros datos no varían mucho uno del otro.

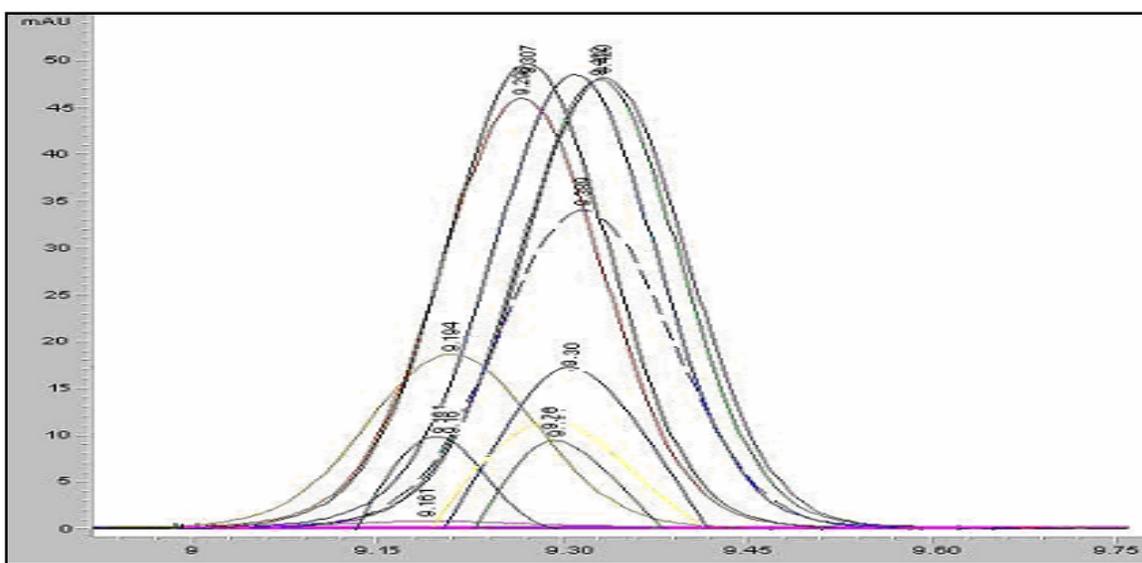


Figura 3. Agrupación de cromatogramas detectables de ergocalciferol en HPLC.

En el Cuadro 8 se muestran las áreas promedio de ergocalciferol y %CV respecto a cada nivel de solución estándar. Las áreas promedio obtenidas son precisas ya que se obtuvieron %CV < 0.62. Se realizó un análisis de regresión donde se encontró una relación directa ($P < 0.05$) entre la concentración de solución estándar respecto a las áreas promedio obtenidas en el HPLC

Cuadro 8. Áreas promedio y CV (%) de ergocalciferol.

Dilución estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo ^a retención (min)	Área promedio ^b (mAU*s)	Coefficiente Variación (%)
42	9.14 ± 0.02	962.34 ± 0.54	0.06
12.6	9.13 ± 0.04	365.18 ± 1.11	0.30
10.08	9.24 ± 0.09	292.32 ± 1.06	0.36
1.89	9.19 ± 0.04	47.69 ± 0.18	0.38
0.378	9.17 ± 0.03	7.38 ± 0.05	0.61

^a Tiempo promedio de retención de tres lecturas por nivel de dilución estándar de vitamina D₂

^b Área promedio de tres lecturas por nivel de dilución estándar de vitamina D₂.

La Figura 4 muestra la curva estándar para la cuantificación de vitamina D₂ que se obtuvo por regresión lineal. Al igual que la curva de calibración de colecalciferol la variable dependiente muestra el área de ergocalciferol reportada por cada cromatograma realizado y la variable independiente representa los μg de ergocalciferol /mL de ACN. Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.9906, indicando una relación directa entre la concentración de vitamina D₃/mL ACN y su área de pico de colecalciferol registrado en el HPLC. Este coeficiente de determinación no es suficiente para este tipo de compuesto de baja concentración en alimentos ya que debe ser ≥ 0.999

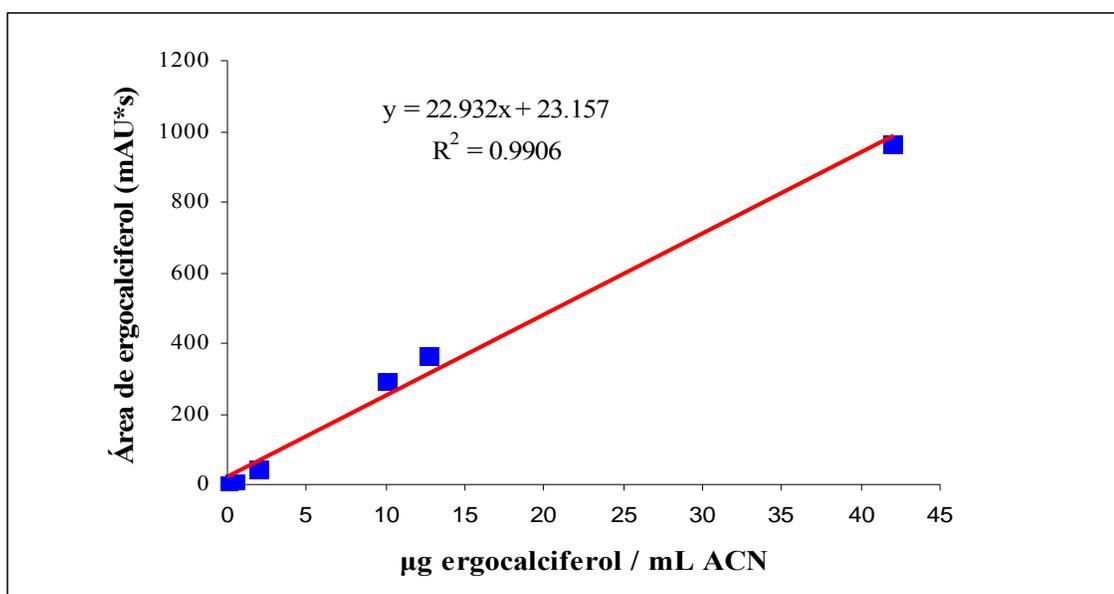


Figura 4. Curva estándar de ergocalciferol.

La curva estándar permitirá cuantificar ergocalciferol en el rango de 0.378 a 42 $\mu\text{g/mL}$ de ACN o desde 0.0378 a 4.2 mg de vitamina D₂/100 g de muestra. La solución con 0.0315 $\mu\text{g/mL}$ de ACN o 0.00315 mg/100 g de muestra no fue detectable con el detector de fluorescencia por la oxidación del estándar de ergocalciferol. Los niveles inferiores subsiguientes a la dilución antes mencionada no fueron detectados en el cromatógrafo líquido bajo la metodología implementada, aún cuando el detector DAD si podría cuantificar. Por lo tanto, al analizar cualquier alimento será necesario consultar bibliografía para tener una idea de la cantidad de ergocalciferol que éste posee para poder definir si está dentro de la curva estándar de calibración.

En el Cuadro 9 se muestran los tiempos promedios de retención y áreas promedio por cada nivel de solución de validación.

Cuadro 9. Tiempo de retención y CV (%) de validación de ergocalciferol.

Validación estándar ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de retención (min) ^a	CV (%) ^b
33.6	9.14 \pm 0.01	0.11
2.1	9.19 \pm 0.02	0.17
1.05	9.20 \pm 0.02	0.17
0.525	9.17 \pm 0.04	0.38
0.42	9.18 \pm 0.04	0.44

^a Tiempo promedio de retención de tres repeticiones por nivel de solución estándar.

^b CV (%) correspondiente a los tiempos de elución por cada nivel de validación de ergocalciferol.

Las diluciones de validación fueron identificadas como colecalciferol por el método “VITD2” creado en el software ChemStation Agilent, éstas se reportaron como ergocalciferol. Es de importancia conocer que, una solución de validación se reporta como ergocalciferol si se ajusta al tiempo de retención promedio de la curva estándar.

En el Cuadro 10 se muestra que al reemplazar el área promedio de ergocalciferol de las diluciones de validación en el modelo de regresión de la curva estándar se obtuvieron concentraciones iniciales proyectadas, expresadas en μg de ergocalciferol/mL de ACN. Estos valores obtenidos fueron subestimados en los cinco niveles de solución de validación.

Cuadro 10. μg de ergocalciferol /mL de ACN obtenidos del modelo de regresión.

Concentración Conocida ($\mu\text{g/mL}$)	Área promedio (mAU*s)	Concentración obtenida del modelo ($\mu\text{g/mL}$)
33.6	850.231	31.71
2.1	51.49	1.24
1.05	24.53	0.06
0.525	12.74	-0.45
0.42	9.28	-0.60

Estos valores subestimados se atribuyen a la oxidación de la vitamina estándar de ergocalciferol. El vial que contenía el estándar no fue almacenado bajo las indicaciones del proveedor el cual menciona que una vez abierto debe ser almacenado bajo nitrógeno y libre de corrientes de aire. Este no contaba con la cinta adhesiva de protección antes de su apertura así como en congelación.

A pesar de obtener los valores antes mencionados se determinó estadísticamente (Anexo 15) que existe una asociación de correlación del 99.99% ($P < 0.05$) entre los valores de concentración conocidos y los valores esperados o proyectados obtenidos a partir del modelo de regresión de la curva estándar de ergocalciferol. En el análisis de la prueba t (Anexo 16) no se encontraron diferencias significativas entre los valores conocidos versus proyectados ($P | t | > 0.9570$), se determinó que la preparación de diluciones estándar y de validación fueron llevadas a cabo manteniendo la linealidad de ergocalciferol oxidada.

5. CONCLUSIONES

El HPLC Agilent 1100 fue preciso y exacto al determinar la presencia de vitamina D₃ en muestras de dilución estándar.

La curva estándar de calibración cuantificó de manera exacta y precisa vitamina D₃ en el rango entre 3.15 a 4200 µg de colecalciferol/100 g de muestra.

La curva estándar de calibración no cuantificó de manera exacta vitamina D₂ en el rango entre 37.8 a 4200 µg de ergocalciferol/100 g de muestra, debido a valores subestimados por oxidación del estándar de vitamina.

6. RECOMENDACIONES

Realizar una nueva curva estándar de ergocalciferol siguiendo las condiciones de almacenamiento del estándar propuesto por el proveedor.

Establecer una nueva curva estándar de colecalciferol y ergocalciferol con precolumna C₁₈, ya que preservaría la vida útil de la columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 Agilent y a la vez el tiempo de retención en la columna se alargaría.

Usar un detector electroquímico en lugar de arreglo de diodos para poder detectar concentraciones más bajas que 0.00252 mg de vitamina D/100 g muestra.

Usar estándares de vitaminas líquidos en lugar de cristalinos, ya que elimina el proceso de pesado y reduce el error humano.

Realizar el proceso de extracción de colecalciferol en alimentos de origen animal propuesto por Mistry y otros (2002) y extraer ergocalciferol de alimentos de origen vegetal según el método AOAC 982.29.

7. BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 2005. Methods of determination of vitamins and other nutrients. In: Official Methods of Analysis Chemists of AOAC International. 18 ed. Maryland: AOAC international. p1-120.

[CPACT] Centre for Process Analytics and Control Technology. 2005. On-line High Performance Liquid Chromatography (HPLC) London. Disponible en: <http://www.cpact.com/Project7/project7sum.htm>. Accesado Julio 16, 2006.

[FDA] U.S. Food and Drug Administration. 2006. A Food Labeling Guide: Food Labeling CFR Referentes. CFR 21 101.9(c)(8)(ii)(A)-(B), & 101.9(c)(8)(iv)) Maryland. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/flg-5-2.html>. Accesado Julio 14, 2006.

Gratzfeld-Hüsgen A, Shuster R. 1996. HPLC for Food Analysis. 1 ed. Germany: Agilent Technologies innovating the Hewlett Packard way. 132 p.

Greenbaum S. 1973. Vitamin D: a review of its form, stability, availability, and action. Feedstuffs. J Food Sci 45 (16):32–33.

[IOM] Institute of Medicine of the National Academies. 2004. Dietary Reference Intakes: Vitamin. Washington, D.C.. Disponible en: <http://www.iom.edu/Object.File/Master/7/296/webtablevitamins.pdf> Accesado Julio 11, 2006.

Jakobsen J, Clausen I, Leth T, Ovesen L. 2004. A new method for the determination of vitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ in meat. Institute of Food Safety and Nutrition, Danish Administration. J Food Composition and Analysis 17(6):777-778.

Mattila P, Piironen V, Bäckman C, Asunmaa A, Uusi-Rauva E, Koivistoinen P. 1992. Determination of vitamin D₃ in egg yolk by high-performance liquid chromatography with diode array detection. J Food Composition and Analysis 5:281-290.

Mistry V, Upetri P, Warthesen J. 2002. Estimation and Fortification of Vitamin D₃ in Pasteurized Process Cheese. J Dairy Sci 85:3173-3181

Rowlett R, [UNC] University of North Carolina at Chapel Hill. How Many?. 2001. A Dictionary of Units of Measurement. North Carolina: Russ Rowlett. Disponible en: <http://www.unc.edu/~rowlett/units/dictI.html#iu>. Accesado Julio 02, 2006.

Terán J, Campbell J. 2006. Las vitaminas y minerales. Pichincha: Edufuturo. Disponible en: <http://www.edufuturo.com/educacion.php?c=1625>. Accesado Julio 11, 2006.

Tomashek K, Nesby S, Scanlon K, Cogswell M, Powell K, Parashar U, Mellinger-Birdsong A, Grummer-Strawn L, Dietz W. 2001. Nutricional rickets in Georgia. *Pediatrics* 107:E45.

Wardlaw G. 1999. Perspectives in Nutrition. In: Fat vitamins. 4 ed. New York: WCB McGraw-Hill. p 373-411.

Wikimedia Project. 2006. Wikipedia: High Performance Liquid Chromatography. Florida: Wikimedia Foundation. Disponible en: http://en.wikipedia.org/wiki/High_performance_liquid_chromatography. Accesado Agosto 19, 2006.

8. ANEXOS

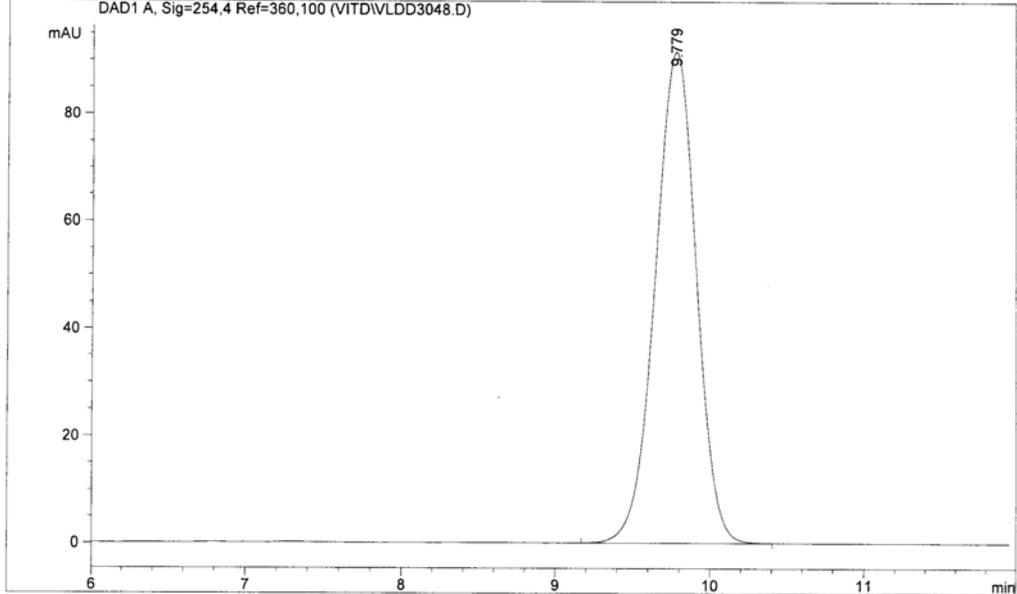
Anexo 1. Cromatograma del estándar de vitamina D₃ de 42 µg/mL.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3048.D

Sample Name: 42 ug/mL ACN R6

Validación colecalciferol 42 ug/mL ACN R6
20.6 Celcius. 39 bar.

```
=====
Injection Date : 17/10/2006 04:40:55 p.m.
Sample Name    : 42 ug/mL ACN R6                Location : Vial 1
Acq. Operator  : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 17/10/2006 03:11:30 p.m. by DBravo
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100 (VITD\VLDD3048.D)
=====
```



```
=====
External Standard Report
=====
```

```
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 le October le 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Anexo 2. Cromatograma del estándar de vitamina D₃ de 12.6 µg/mL.

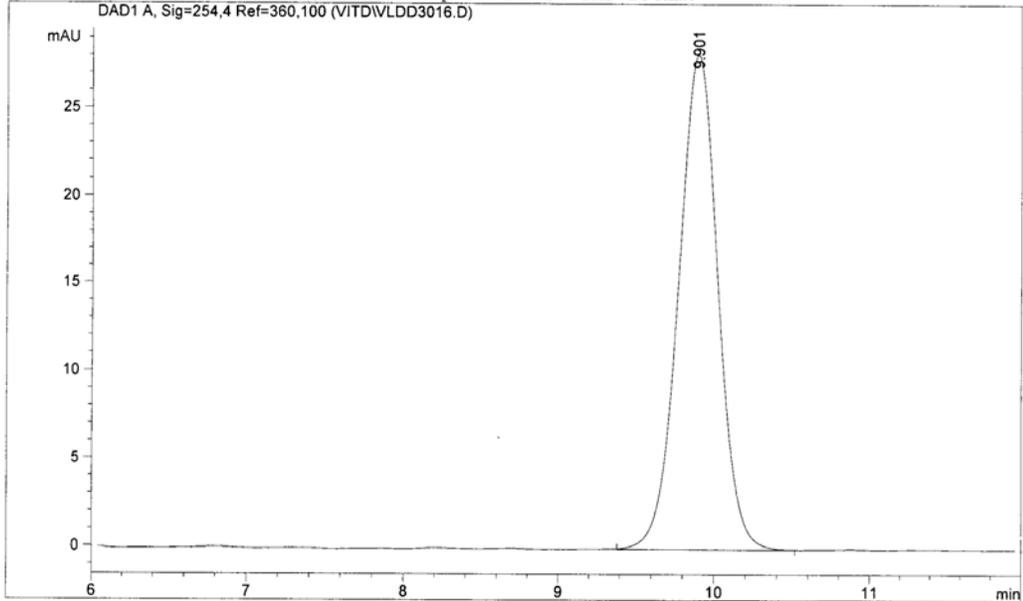
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3016.D

Sample Name: 12.6 ug/ML R3

Validación de colecalciferol 12.6 ug/ml ACN R3
19.6 Celcius. 49 bar.

```

=====
Injection Date   : 16/10/2006 06:12:37 p.m.
Sample Name     : 12.6 ug/ML R3                Location : Vial 1
Acq. Operator  : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 16/10/2006 05:10:18 p.m. by DBravo
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100 (VITDVLDD3016.D)
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 le October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
10.184	-	-	-	-	-	Colecalciferol

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	9.901	BP	0.2693	491.82336	100.0000	Colecalciferol
2	10.184		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 491.82336

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***

Anexo 3. Cromatograma del estándar de vitamina D₃ de 10.08 µg/mL.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3017.D

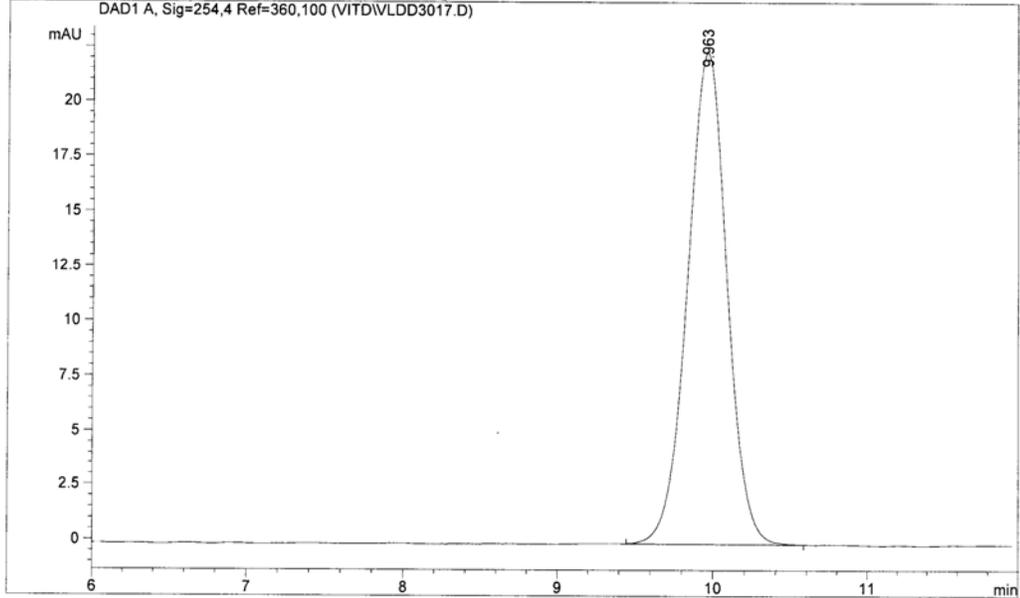
Sample Name: 10.8 ug/ML R1

Validación de colecalciferol 10.8 ug/ml ACN R1
19.6 Celcius. 48 bar.

```

=====
Injection Date : 16/10/2006 06:26:22 p.m.
Sample Name    : 10.8 ug/ML R1                Location : Vial 1
Acq. Operator  : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 16/10/2006 05:10:18 p.m. by DBravo
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100 (VITD\VLDD3017.D)

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount   :      20.00000 [ng/ul]   (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
9.963	BB	392.56451	7.65677e-1	300.57755		Colecalciferol

Anexo 4. Cromatograma del estándar de vitamina D₃ de 1.89 µg/mL.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3024.D

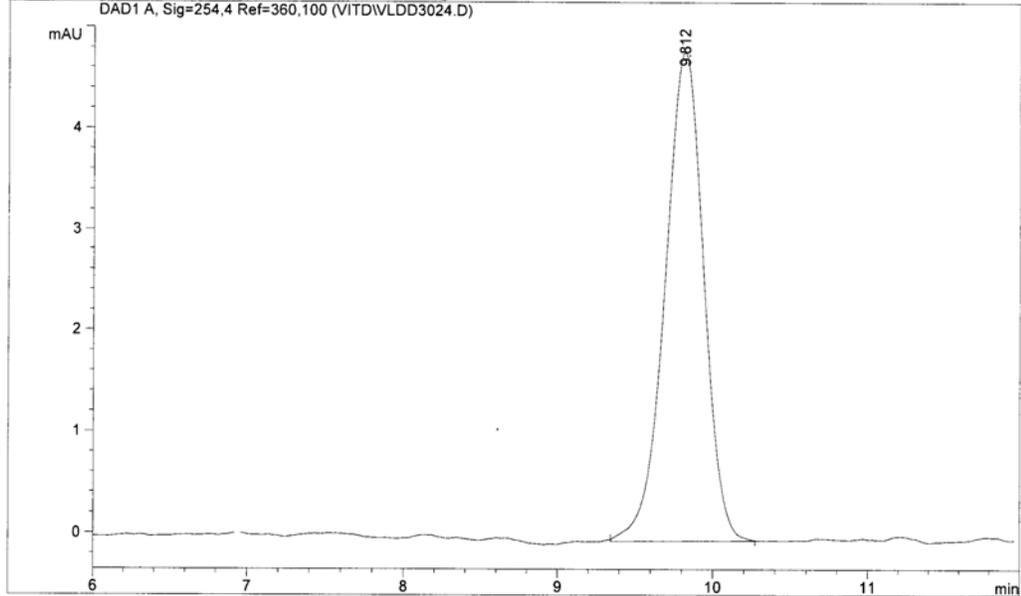
Sample Name: 1.89 ug/ML R1

Validación de colecalciferol 1.89 ug/ml ACN R1
19.5 Celcius. 46 bar.

```

=====
Injection Date   : 16/10/2006 08:11:40 p.m.
Sample Name     : 1.89 ug/ML R1                Location  : Vial 1
Acq. Operator   : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed    : 16/10/2006 05:10:18 p.m. by DBravo
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed    : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                  (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100 (VITDVLDD3024.D)

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount    : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
10.184	-	-	-	-	-	Colecalciferol

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Sample Amount : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	9.812	BB	0.2689	83.24539	100.0000	Colecalciferol
2	10.184		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 83.24539

Results obtained with enhanced integrator!
 1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
 *** End of Report ***

Anexo 5. Cromatograma del estándar de vitamina D₃ de 0.378 µg/mL.

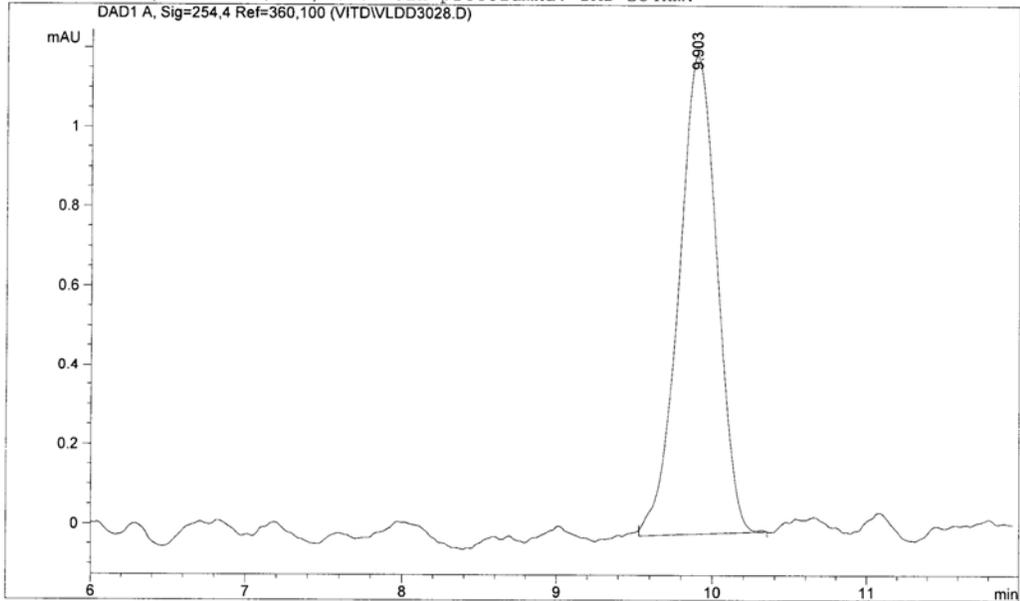
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3028.D

Sample Name: 0.378 ug/ML R1

Validación de colecalciferol 0.378 ug/ml ACN R1
19.6 Celcius. 47 bar.

```

=====
Injection Date : 16/10/2006 09:07:22 p.m.
Sample Name    : 0.378 ug/ML R1                Location : Vial 1
Acq. Operator  : DBravo
Acq. Instrument: Instrument 1
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 16/10/2006 05:10:18 p.m. by DBravo
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
=====
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 le October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
10.184	-	-	-	-	-	Colecalciferol

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	9.903	BP	0.2529	20.55804	100.0000	Colecalciferol
2	10.184		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 20.55804

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***
=====

Anexo 6. Cromatograma del estándar de vitamina D₃ de 0.0315 µg/mL.

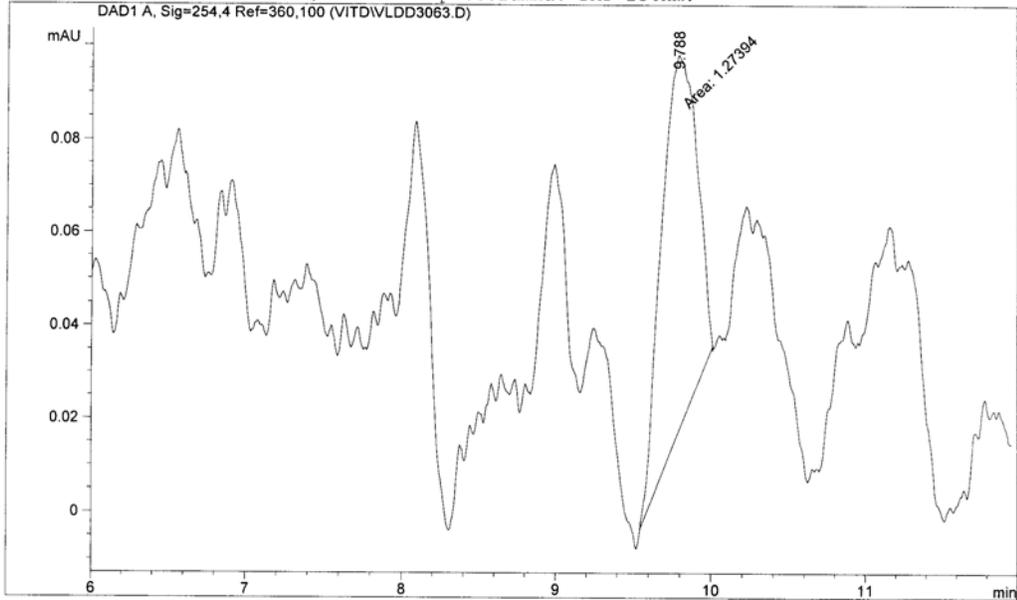
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3063.D

Sample Name: 0.0315ug/mLACNR2

Validación colecalciferol 0.0315ug/mL ACN R2
20.3 Celcius. 41 bar.

```

=====
Injection Date : 17/10/2006 08:26:42 p.m.
Sample Name   : 0.0315ug/mLACNR2           Location : Vial 1
Acq. Operator : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed  : 17/10/2006 07:06:11 p.m. by DBravo
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed  : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      20.00000 [ng/ul]   (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Anexo 7. Cromatograma del estándar de vitamina D₃ de 0.0252 µg/mL.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3073.D

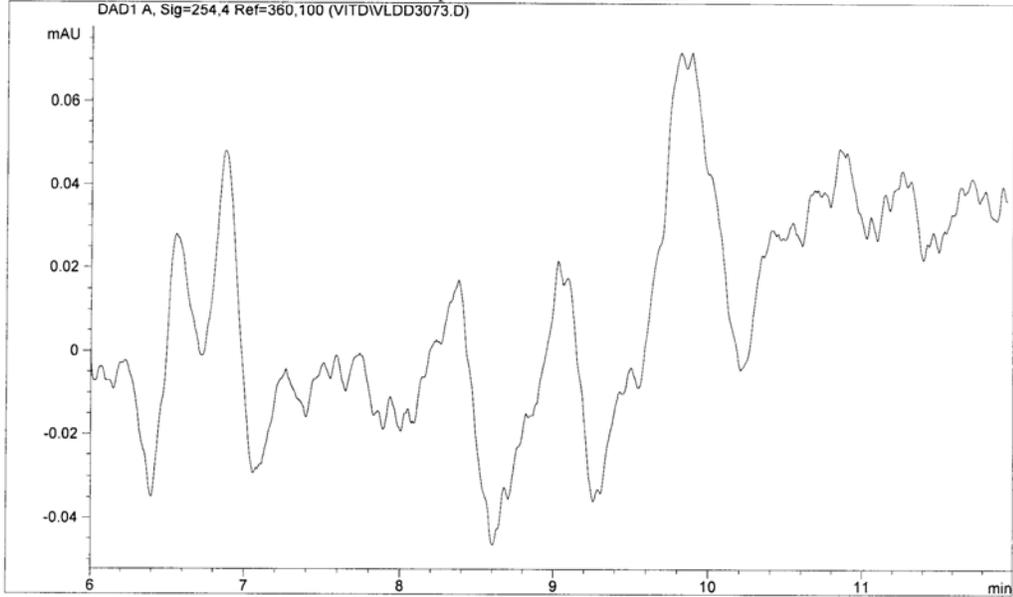
Sample Name: 0.025 ug/mLACNR3

Validación colecalciferol 0.0252 ug/mL ACN R3
20.4 Celcius. 40 bar.

```

=====
Injection Date   : 17/10/2006 11:33:02 p.m.
Sample Name     : 0.025 ug/mLACNR3           Location : Vial 1
Acq. Operator   : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed    : 17/10/2006 07:06:11 p.m. by DBravo
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed    : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                  (modified after loading)
  
```

Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount    : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

[min]	[mAU*s]	[ng/ul]
10.184	-	-

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	10.184		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***

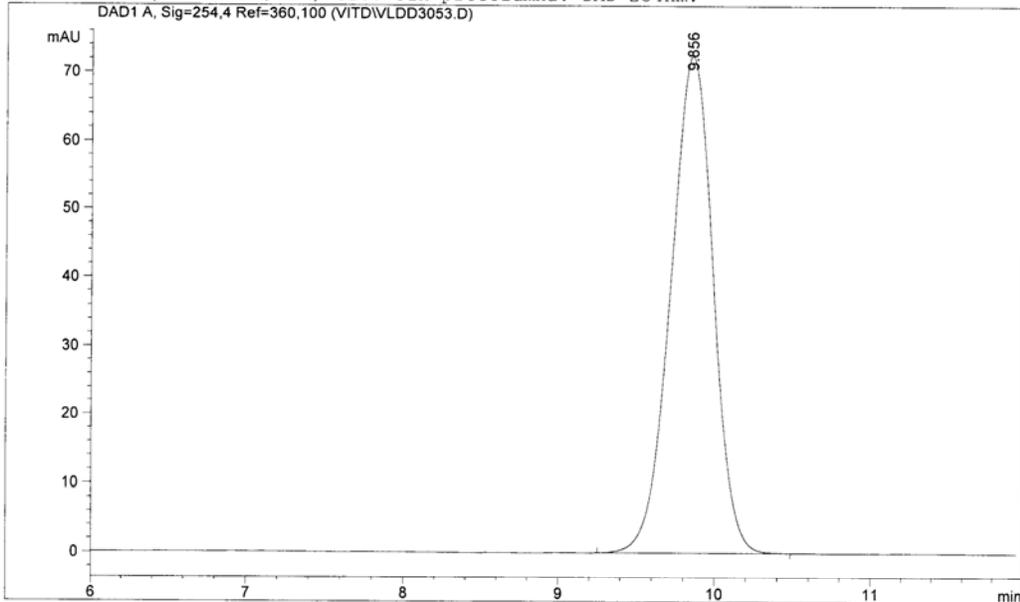
Anexo 8. Cromatograma de validación de vitamina D₃ de 33.6 µg/mL.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3053.D

Sample Name: 33.6 ug/mL ACNR5

Validación colecalciferol 33.6 ug/mL ACN R5
20.2 Celcius. 40 bar.

```
=====
Injection Date : 17/10/2006 05:52:40 p.m.
Sample Name    : 33.6 ug/mL ACNR5                Location : Vial 1
Acq. Operator  : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 17/10/2006 03:11:30 p.m. by DBravo
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
=====
```



```
=====
External Standard Report
=====
```

```
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount   :      20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Anexo 9. Cromatograma de validación de vitamina D₃ de 2.1 µg/mL.

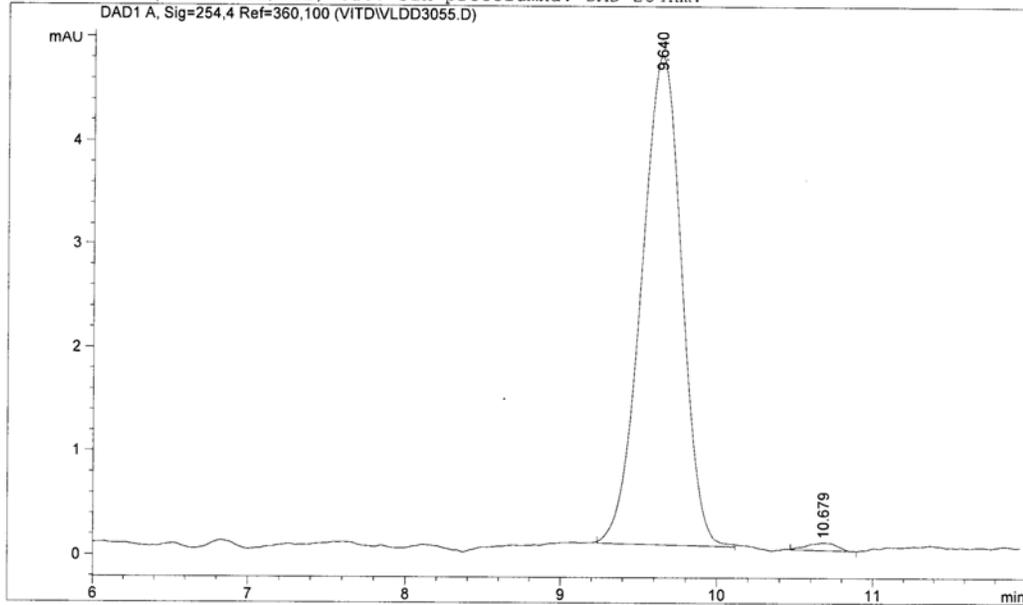
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3055.D

Sample Name: 2.1 ug/mL ACNR2

Validación colecalciferol 2.1 ug/mL ACN R2
20.4 Celcius. 40 bar.

```

=====
Injection Date   : 17/10/2006 06:22:26 p.m.
Sample Name     : 2.1 ug/mL ACNR2                Location : Vial 1
Acq. Operator   : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed    : 17/10/2006 03:11:30 p.m. by DBravo
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed    : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                  (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
Sample Amount    : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

```
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
10.184      -      -      -      -      -      -      -      -      -      -      -
                                         Colecalciferol
```

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

```
=====
Area Percent Report
=====
```

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	9.640	BB	0.2759	84.15111	98.8853	Colecalciferol
2	10.184		0.0000	0.00000	0.0000	
3	10.679	BP	0.1624	9.48597e-1	1.1147	

Totals : 85.09970

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

```
=====
*** End of Report ***
```

Anexo 10. Cromatograma de validación de vitamina D₃ de 1.05 µg/mL.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3055.D

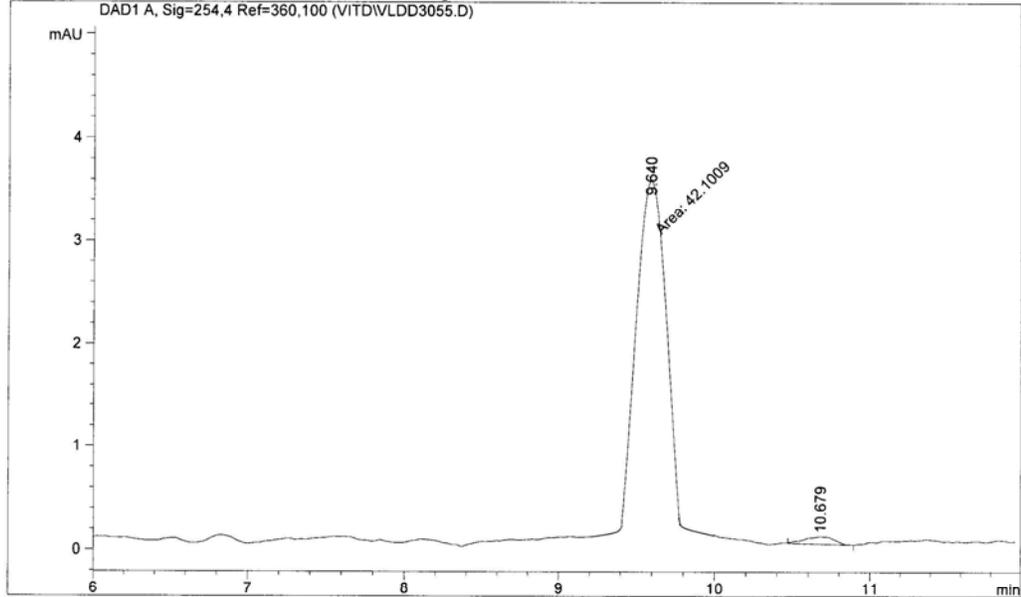
Sample Name: 1.05 ug/mL ACNR2

Validación colecalciferol 2.1 ug/mL ACN R2
20.4 Celcius. 40 bar.

```

=====
Injection Date : 17/10/2006 06:22:26 p.m.
Sample Name    : 2.1 ug/mL ACNR2                Location : Vial 1
Acq. Operator  : DBravo
Acq. Instrument: Instrument 1
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 17/10/2006 03:11:30 p.m. by DBravo
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100 (VITDIVLDD3055.D)
=====

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

```
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
10.184      -      -      -      -      -      -      -      -      -      -      -      -
Totals :                                          0.00000
```

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

```
=====
Area Percent Report
=====
```

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	9.640	MM	0.2132	42.10091	97.7965	Colecalciferol
2	10.184		0.0000	0.00000	0.0000	
3	10.679	BP	0.1624	9.48597e-1	2.2035	

Totals : 43.04951

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

```
=====
*** End of Report ***
```

Anexo 11. Cromatograma de validación de vitamina D₃ de 0.063 µg/mL.

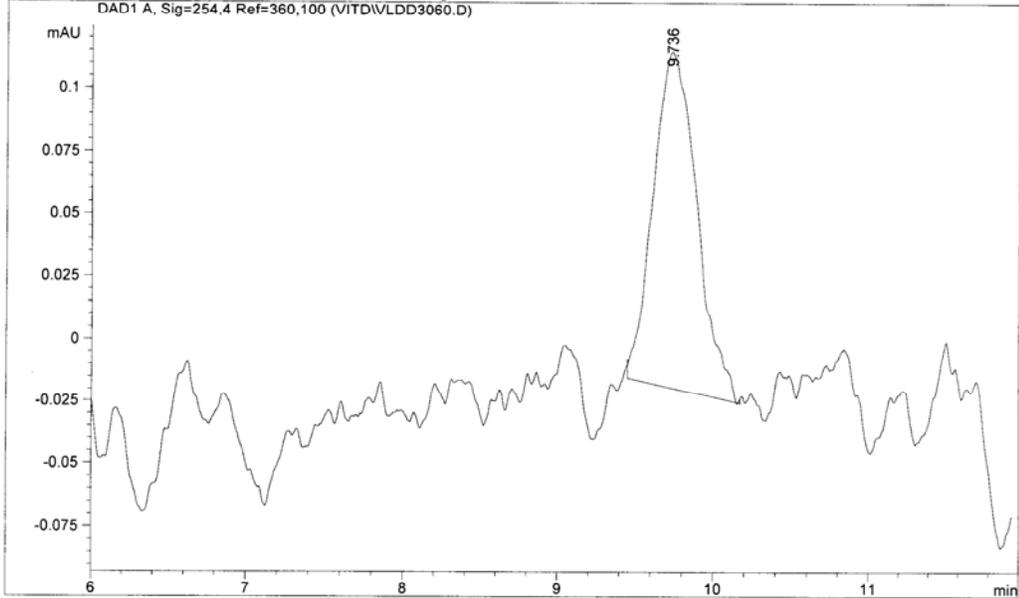
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3060.D

Sample Name: 0.063ug/mL ACNR4

Validación colecalciferol 0.063ug/mL ACN R4
20.6 Celcius. 40 bar.

```

=====
Injection Date : 17/10/2006 07:40:26 p.m.
Sample Name    : 0.063ug/mL ACNR4                Location : Vial 1
Acq. Operator  : DBravo
Acq. Instrument: Instrument 1
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 17/10/2006 07:06:11 p.m. by DBravo
                  (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed   : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                  (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
  
```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount   :      20.00000 [ng/ul]   (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

```
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
10.184      -      -      -      -      -      -      -      -      -      -      -      -
Colecalciferol
```

Totals : 0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

```
=====
Area Percent Report
=====
```

```
Sorted By      :      Signal
Calib. Data Modified :      Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amount  :      20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	9.736	BB	0.2416	2.61718	100.0000	Colecalciferol
2	10.184		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 2.61718

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

```
=====
*** End of Report ***
=====
```

Anexo 12. Cromatograma de validación de vitamina D₃ de 0.0378 µg/mL.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\VITD\VLDD3066.D

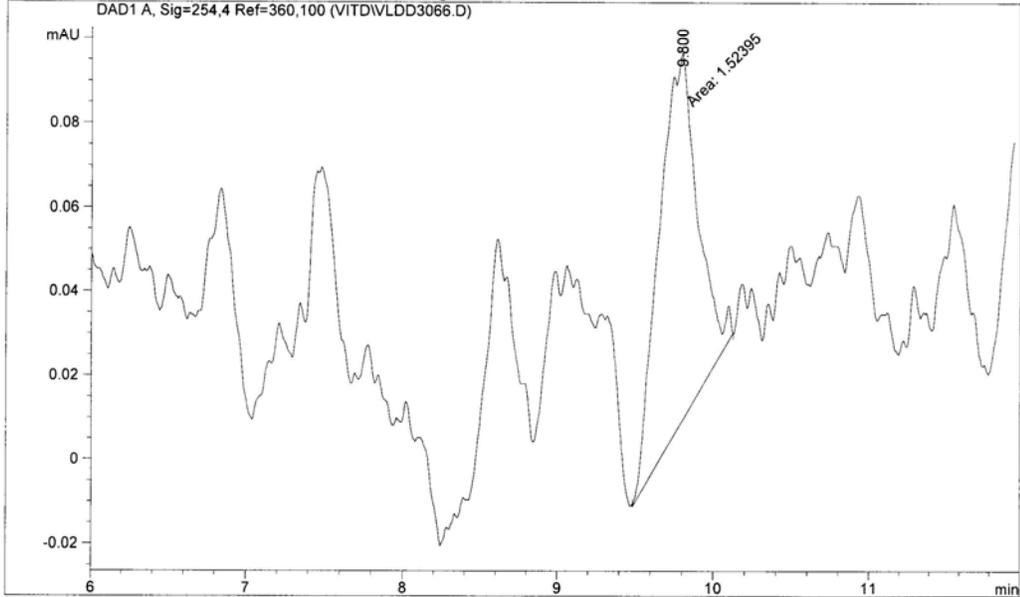
Sample Name: 0.0378 ug/mLACNR5

Validación colecalciferol 0.0315ug/mL ACN R5
20.5 Celcius. 40 bar.

```

=====
Injection Date   : 17/10/2006 09:09:09 p.m.
Sample Name     : 0.0315ug/mLACNR5           Location : Vial 1
Acq. Operator   : DBravo
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed    : 17/10/2006 07:06:11 p.m. by DBravo
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\CEA\VITD.M
Last changed    : 30/10/2006 04:15:32 p.m. by Victor Taleon
                  (modified after loading)
Método de lectura de vitamina D3 (colecalciferol) 800-0.008 UI/ml
Metanol:ACN (70:30 vol/vol) C18. sin precolumna. DAD 254nm.
DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100 (VITDVLDD3066.D)

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount   : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

[min]	[mAU*s]	[ng/ul]
10.184	-	-
Colecalciferol		
Totals :		0.00000

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Calib. Data Modified : Sunday, 01 1e October 1e 2006 08:07:34 p.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 20.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	9.800	MM	0.2886	1.52395	100.0000	Colecalciferol
2	10.184		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 1.52395

Results obtained with enhanced integrator!
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibrated compound(s) not found

=====
*** End of Report ***

Anexo 13. Correlación de concentraciones reales y proyectadas de colecalciferol.

<hr/>	
	Proyectado
Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	1.00000
Real	<0.0001
<hr/>	

Anexo 14. Prueba t de concentraciones reales y proyectadas de colecalciferol.

	$Pr> t $
Resultados	>0.9947

Anexo 15. Correlación de concentraciones reales y proyectadas de ergocalciferol.

Concentración (µg/mL)	
	Proyectado
	0.99998
Real	<0.0001

Anexo 16. Prueba t de concentraciones reales y proyectadas de ergocalciferol.

	$Pr> t $
Resultados	>0.9570