



**UNAP**



**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS  
ALIMENTARIAS**

**EXAMEN DE SUFICIENCIA PROFESIONAL**

**CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA APLICADA A ANÁLISIS DE  
ALIMENTOS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTADO POR:**

**DANISCA FRANGOYSI VELA TUANAMA**

**ASESOR:**

**Ing. ALENGUER GERÓNIMO ALVA ARÉVALO, Dr.**

**IQUITOS, PERÚ  
2022**

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



**UNAP**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Escuela Profesional de  
Ingeniería en Industrias Alimentarias

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DEL EXAMEN DE SUFICIENCIA PROFESIONAL N° 017- CGT-FIA-UNAP-2022

En Iquitos, en las instalaciones del laboratorio de ingeniería, ubicado en la Planta Piloto, sito Av. Freyre N° 610, a los 09 días del mes de mayo de 2022, a horas...17:10....., dando inicio a la sustentación pública del informe del examen de suficiencia profesional titulado: “**CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA APLICADA A ANÁLISIS DE ALIMENTOS**” presentado por el (la) Bachiller **DANISCA FRANGOYSI VELA TUANAMA**; para optar el Título Profesional de Ingeniero(a) en Industrias Alimentarias, que otorga la Universidad de acuerdo a Ley y Estatuto.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N° 0171-FIA-UNAP-2022 del 02 de mayo de 2022, está integrado por:

**Ing. SEGUNDO ARÉVALO DEL AGUILA, MSc**  
**Ing. JORGE LUIS CARRANZA GONZALES, Mtro.**  
**Ing. GIORGIO SERGIO URRO RODRIGUEZ, Mtro.**

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: SATISFACTORIAMENTE

El Jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y el informe del examen de suficiencia profesional, según promedio final, ha sido: APROBADA con la calificación MUY BUENA (17)

Estando el (la) bachiller apto(a) para obtener el Título Profesional de Ingeniero(a) en Industrias Alimentarias, Siendo las 18:10 se dió por terminado el acto de sustentación.

-----  
**Presidente**  
Ing. SEGUNDO ARÉVALO DEL AGUILA, MSc  
CIP: 26699

-----  
**Miembro**  
Ing. JORGE LUIS CARRANZA GONZALES, Mtro.  
CIP: 71113

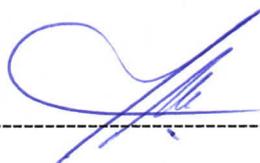
-----  
**Miembro**  
Ing. GIORGIO SERGIO URRO RODRIGUEZ, Mtro.  
CIP: 78406

-----  
**Asesor**  
Ing. ALENGUER GERONIMO ALVA AREVALO, Dr.  
CIP: 45167



## MIEMBROS DEL JURADO

Exámen de suficiencia profesional aprobada en sustentación pública en la ciudad de Iquitos en las instalaciones del laboratorio de ingeniería de alimentos ubicado en la avenida Augusto Freyre N° 610, Planta Piloto de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, llevado a cabo el día 09 de Mayo del 2022, siendo 05:10 pm del día Lunes, siendo los miembros del jurado calificador los abajo firmantes.



-----  
Ing. SEGUNDO ARÉVALO DEL ÁGUILA, MSc.

**PRESIDENTE**



-----  
Ing. JORGE LUIS CARRANZA GONZALES, Mtro.

**MIEMBRO**



-----  
Ing. GIORGIO SERGIO URRO RODRIGUEZ, Mtro.

**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a mi querida familia, mis padres Carmen y Simón, hermana Josie, mis amados sobrinos Flavia y Jeremy, a mis abuelitos Adelaida Grández que desde el cielo siempre está protegiéndome y mi abuelito Santiago Vela, también a dos personas muy especiales en mi vida Jean Guerrero y Benjamín Cárdenas, quienes siempre están apoyándome a seguir adelante y siguen creyendo en mi potencial como persona y profesional.

Danisca Vela

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecer a Dios por la vida, que bendice mi día a día pasando todos los obstáculos y permitir lograr satisfactoriamente todas mis metas.

A mi Alma Mater Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, a la Facultad de Industrias Alimentarias por brindar sus instalaciones y terminar satisfactoriamente mi formación profesional.

A mis docentes quienes brindaron los conocimientos y experiencias. Ahora soy parte de ello aplicando lo aprendido. Agradecimiento especial a mi asesor por confiar en mi persona.

A mi colega y gran amiga Sabrina Arévalo por su paciencia y apoyo incondicional en el proceso de este trabajo.

Danisca Vela

## ÍNDICE GENERAL

|  |             |
|--|-------------|
| <b>PORTADA</b>   | <b>i</b>    |
| <b>ACTA DE SUSTENTACIÓN</b>  | <b>ii</b>   |
| <b>MIEMBROS DEL JURADO</b>   | <b>iii</b>  |
| <b>DEDICATORIA</b>   | <b>iv</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTO</b>  | <b>v</b>    |
| <b>ÍNDICE GENERAL</b>  | <b>vi</b>   |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>  | <b>viii</b> |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>   | <b>ix</b>   |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>x</b>    |
| <b>RESUMEN</b>   | <b>ix</b>   |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>xii</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | <b>1</b>    |
| <b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO</b>   | <b>3</b>    |
| <b>1.1 Cromatografía</b>   | <b>3</b>    |
| <b>1.2 Clasificación</b>   | <b>3</b>    |
| <b>1.3 Cromatografía líquida</b>   | <b>4</b>    |
| <b>1.3.1 Cromatografía de alta resolución o HPLC</b>                             | <b>4</b>    |
| <b>1.3.1.1 Equipo</b>  | <b>4</b>    |
| <b>1.3.2 Selección de operación del HPLC</b>                                     | <b>7</b>    |
| <b>1.3.3 Tipos de HPLC</b>   | <b>8</b>    |
| <b>1.3.4 Ventajas</b>  | <b>9</b>    |
| <b>1.3.5 Desventajas</b>   | <b>10</b>   |
| <b>1.3.6 Validación de metodologías por HPLC en alimentos</b>                    | <b>10</b>   |
| <b>1.3.6.1 Selectividad</b>  | <b>10</b>   |
| <b>1.3.6.2 Linealidad.</b>   | <b>17</b>   |
| <b>1.3.6.3 Precisión</b>   | <b>20</b>   |
| <b>1.3.6.4 Exactitud</b>   | <b>24</b>   |
| <b>1.3.6.5 Límites de detección y cuantificación.</b>                            | <b>27</b>   |
| <b>1.3.6.6 Robustez</b>  | <b>30</b>   |
| <b>1.3.6.7 Fortaleza</b>   | <b>32</b>   |
| <b>1.3.6.8 Aseguramiento del sistema</b>   | <b>33</b>   |
| <b>1.3.7 Aplicaciones</b>  | <b>34</b>   |
| <b>1.3.7.1 Aplicaciones del método de HPLC en la detección por contaminantes</b> | <b>34</b>   |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1.3.7.2 Aplicaciones del método de HPLC en la detección de aminoácidos y antioxidantes</b>   | <b>35</b> |
| <b>1.3.7.3 Aplicaciones del método de HPLC en la detección de aditivos</b>                      | <b>36</b> |
| <b>1.3.7.4 Aplicaciones del método de HPLC en conservas de pescado</b>                          | <b>36</b> |
| <b>1.3.7.5 Aplicaciones del método de HPLC en verduras</b>                                      | <b>37</b> |
| <b>1.3.7.6 Aplicaciones del método de HPLC en validación de métodos en diferentes productos</b> | <b>37</b> |
| <b>II: CONCLUSIONES</b>   | <b>39</b> |
| <b>III: RECOMENDACIONES</b>   | <b>40</b> |
| <b>IV: FUENTES DE INFORMACIÓN</b>   | <b>41</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Selectividad en metodologías por HPLC aplicadas a alimentos.   | 16 |
| <b>Tabla 2.</b> Linealidad de metodologías por HPLC aplicadas a alimentos.   | 19 |
| <b>Tabla 3.</b> Precisión repetitiva (mismo día) e intermedia (diferentes días) evaluada en avena en hojuelas por HPLC, en la determinación de inositol fosfato ( $\mu\text{mol/g}$ ). | 21 |
| <b>Tabla 4.</b> Precisión repetitiva (mismo día) e intermedia (diferentes días), evaluada en vino por HPLC en la determinación de amino ácidos (ppm).                                  | 22 |
| <b>Tabla 5.</b> Precisión de metodologías por HPLC aplicadas a alimentos   | 23 |
| <b>Tabla 6.</b> Comparación de resultados por HPLC con otras metodologías  | 26 |
| <b>Tabla 7.</b> Exactitud de metodologías por HPLC, aplicadas a alimentos  | 26 |
| <b>Tabla 8.</b> Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de metodologías por HPLC aplicadas a alimentos.   | 29 |
| <b>Tabla 9.</b> Diseño experimental para la determinación de robustez.   | 32 |

## ÍNDICE DE FIGURA

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alto resolución                                   | 04 |
| <b>Figura 2.</b> Cromatograma típico obtenido por un HPLC  | 06 |
| <b>Figura 3.</b> Separación por HPLC, de ácidos orgánicos  | 13 |
| <b>Figura 4:</b> Comparación de un método de referencia (HPLC fase reversa) y otro método (cromatografía iónica) | 14 |
| <b>Figura 5:</b> Cromatografía de exclusión molecular con adición cualitativa de tirosina                        | 15 |
| <b>Figura 6:</b> Cromatogramas por HPLC, de antocianinas   | 15 |

## ABREVIATURAS

|         |   |
|---------|---|
| HPLC :  | Cromatografía líquida de alta resolución                  |
| CLAE :  | Cromatografía líquida de alta eficiencia                  |
| BHT :   | Butil- hidroxitolueno                                     |
| ICH :   | Conferencia internacional de armonización                 |
| FDA :   | Administración Estadounidense de Alimentos y Medicamentos |
| DE :    | Desviación estándar                                       |
| DER :   | Desviación estándar relativa                              |
| CV :    | Coefficiente de variación                                 |
| AOAC:   | Asociación de comunidades analíticas                      |
| LD :    | Límite de detección                                       |
| LC :    | Límite de cuantificación                                  |
| S/R :   | Relación señal / ruido                                    |
| MS :    | Espectrometría de masas                                   |
| Vis-UV: | Detector de ultravioleta visible                          |
| OTA :   | Ocratoxina A  |

## RESUMEN

La cromatografía líquida de alto resolución o HPLC es uno de procedimientos de análisis de todo tipo de materiales entre ellos los alimentos y el más utilizado en la actualidad, gracias a que emplea técnicas que previamente no estaban accesibles, como las cromatografías de adsorción, partición, exclusión molecular y afinidad. Este trabajo da a conocer los principios básicos del método y las formas como se puede abordar de forma exitosa la división y/o estudio de la muestra aplicada en análisis de alimentos.

**Palabra clave:** HPLC, método, muestra, análisis.

## **ABSTRACT**

High-performance liquid chromatography or HPLC is one of the analysis procedures for all types of materials, including food, and is currently the most widely used procedures today, thanks to the fact that it uses techniques that were previously not accessible, such as adsorption, division, molecular exclusion and affinity chromatography. This work reveals the basic principles of the method and the ways in which the division and/or study of the applied sample in food analysis can be successfully approached.

**Keyword:** HPLC , method, sample, analysis.

## INTRODUCCIÓN

La Seguridad Alimentaria es un aspecto fundamental hoy en día en la sociedad. Por ello, en la actualidad las distintas organizaciones tratan de concientizar a los consumidores la importancia de conocer la calidad y seguridad de los alimentos que se consume, siendo cada vez mayor el número de notificaciones sobre problemas de seguridad alimentaria, además de que éstos sean inocuos, es decir, que deben estar libres de contaminantes químicos, microorganismos u otros compuestos que puedan causar algún riesgo para la salud (Castilla Fernández, 2018). La contaminación de los alimentos puede producirse tanto en el cultivo de la materia prima, como en el propio alimento o la presencia de cualquier sustancia que no haya sido agregada intencionalmente al alimento en cuestión, pero que se encuentra en el mismo como residuo de la producción, fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como consecuencia de la contaminación medioambiental puede resultar perjudicial para la salud.

La cromatografía es usada para la separación de los elementos de una muestra, por medio de distribución en 2 fases: una estacionaria y otra móvil. La estacionaria podría ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase móvil podría ser líquida, sólida e inclusive un fluido supercrítico. Las principales formas de la cromatografía incorporan a: cromatografía gaseosa, cromatografía en capa fina, cromatografía en columna abierta y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta última tuvo una creciente difusión desde sus inicios hace bastante más de treinta años y actualmente es una de las técnicas más versátiles, empleada ampliamente en laboratorios: farmacéuticos, químicos, industriales y control de calidad de alimentos (Quattrocchi et al. 1992).

Los procedimientos de HPLC fueron al inicio desarrollados en alimentos, para cuantificar: aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos y vitaminas. Dichos compuestos no podían trabajarse correctamente con los grupos de cromatografía de gases accesibles en aquellos instantes, debido a que

presentaban inconvenientes como: baja volatilidad, complejidad para la formación de sus respectivos derivados o problemas para su división de la matriz de la muestra (Matissek, 1990).

En la actualidad se han aumentado de manera considerable el número de aplicaciones en HPLC en alimentos, gracias a nuevos desarrollos y mejoras como: automatización de los conjuntos, desarrollo de detectores con alta sensibilidad y especificidad, nuevos rellenos de columnas y mejor calidad de los mismos, sistemas de trueque de columnas, probabilidad de utilizar diversos detectores en línea y sistemas de procedimiento de muestras que son acoplados al HPLC en trabajos automatizados.

Cualquier procedimiento desarrollado por cromatografía líquida - HPLC debe ser validado para afirmar que es preciso, específico y reproducible en un rango de interés, en el que se va examinar un analito o diversos. Esto paralelamente posibilita tener más confianza en que la metodología podría ser transferida a otros laboratorios de estudio, para su adecuada aplicación.

El propósito del presente trabajo es la de hacer una revisión bibliográfica sobre lo cual implica conceptos en general y su aplicación en análisis de alimentos.

## **CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO**

### **1.1 Cromatografía**

El concepto cromatografía deriva de la palabra griego chroma- que significa color y -graphein que significa redactar. La primera cromatografía registrada fue la cromatografía en columna asignada al científico ruso Mikhail Tswet quien trituró carbonato de calcio en un tubo y luego agregó un extracto de hojas de una planta verde homogeneizadas, seguido de un solvente orgánico (Phenomenex 2017). Tswet identificó bandas de colores que se separaban a medida que el solvente pasaba por medio del tubo.

La cromatografía es un excelente método de separación que consiste en un conjunto de técnicas analíticas basadas en la separación de los componentes de una mezcla en dos fases inmiscibles y su posterior detección y/o cuantificación.

### **1.2 Clasificación**

Las distintas técnicas cromatográficas se pueden dividir según cómo esté dispuesta la fase estacionaria:

- Cromatografía plana. La fase estacionaria se coloca sobre una placa plana o sobre un papel. Las principales técnicas son cromatografía en papel y cromatografía en capa fina.
  
- Cromatografía en columna. La fase estacionaria se sitúa dentro de una columna. Según el fluido empleado como fase móvil se distinguen:
  - Cromatografía de líquidos
  - Cromatografía de gases
  - Cromatografía de fluidos supercríticos.

### 1.3 Cromatografía líquida

En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que circula a través de una columna en la que está contenida la fase estacionada. La fase móvil no sólo arrastra al analito, sino que existen interacciones intensas entre el analito y la fase móvil. Se clasifica en:

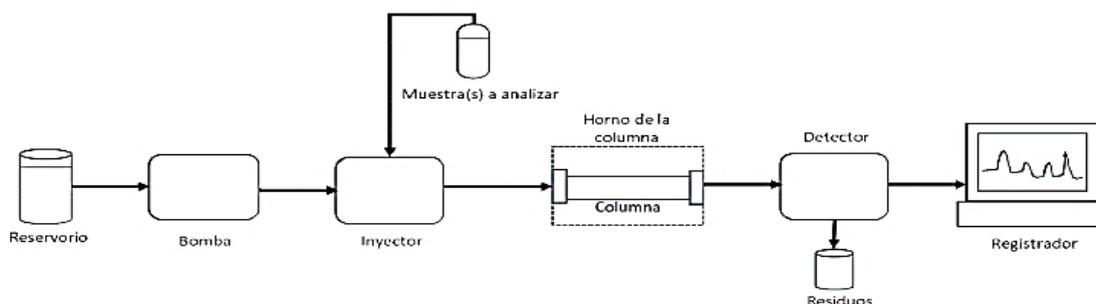
- Cromatografía Líquida Clásica: La columna es de vidrio y se usa para mezclas complejas.
- Cromatografía de Alta Resolución o HPLC: La columna es de acero inoxidable.

#### 1.3.1 Cromatografía de alta resolución o HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución es uno de los muchos métodos cromatográficos utilizados para separar y analizar los componentes químicos de las mezclas. Básicamente, el método consta de una fase móvil y estacionaria (no miscibles entre sí) y una muestra de prueba. La fase móvil es el líquido que transporta la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser una película sólida o un líquido depositado sobre un sólido inerte. Las diferentes fuerzas químicas y físicas que actúan sobre la mezcla analizada y entre las dos fases determinan la retención y separación de cada componente en la mezcla. (Fallon, Booth y Bell, 1987).

##### 1.3.1.1 Equipo

Un cromatógrafo líquido de alto rendimiento opera generalmente con cinco instrumentos: reservorio, bomba, inyector, horno (columna), detector y registrador.



**Figura 1.** Diagrama básico de un cromatógrafo líquido de alta resolución.

Fuente: Adaptado de Giri (2015).

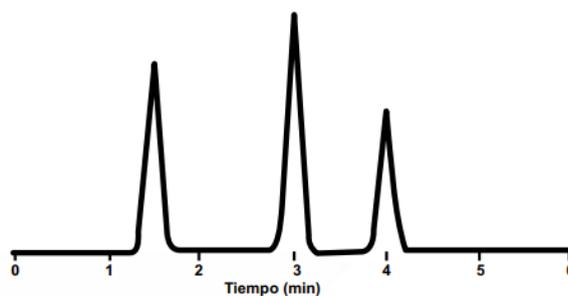
La fase móvil se encuentra en el reservorio. Esta etapa consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares cuya concentración depende de la muestra a analizar y debe ser filtrada para evitar obstrucciones por posibles partículas. Los reservorios suelen estar hechos de vidrio; se pueden requerir uno o más dependiendo de si se implementa o no un gradiente de concentración (Snyder et ál., 2010).

La bomba recoge la fase móvil del reservorio y permite que fluya a través del sistema a un ritmo preciso y constante. Aquí normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, el tamaño de la columna, la composición de la fase móvil y el caudal deseado. Normalmente, el volumen de inyección estará entre 5  $\mu$ L y 5 mL (Snyder et ál., 2010).

El inyector puede ser automático o manual. Los sistemas de inyección automático permiten un muestreo preciso de la fase móvil presurizada, razón por la cual los inyectores manuales rara vez se utilizan en la actualidad (Snyder et ál., 2010).

El horno de columna es responsable de regular y mantener la temperatura en la columna ya que esto tiene un efecto directo en su capacidad de retención y selectividad (Snyder et ál., 2010). Por otro lado, las columnas suelen ser de acero inoxidable con una longitud de 50-300 mm y rellenas de fase estacionaria, y su tamaño de partícula oscila entre 3 y 10  $\mu$ m (Giri, 2015). Estas diferencias de tamaño y material determinan la resolución, la eficiencia, la velocidad y la vida útil de la columna.

El detector al final de la columna capta y convierte los cambios en el efluente de la columna en una señal eléctrica que es captada por el registrador, que a su vez produce un cromatograma de intensidad variable en el tiempo (Figura 2); De estos, es deseable obtener picos gaussianos, cada uno correspondiente a un componente diferente de la muestra. (Brown y Weston, 1997).



**Figura 2.** Cromatograma típico obtenido por un HPLC

Fuente: Imagen tomada de documento Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Química, 2007, Técnicas Cromatográficas

Los detectores basados en una propiedad del soluto que no la suele presentar la fase móvil. Suelen ser muy selectivos y sensibles:

- ✓ Detectores de absorbanza ultravioleta, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta en ciertas longitudes de onda. Los más potentes son los que utilizan una matriz de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbanza se trazan como una función de la longitud de onda y el tiempo.
- ✓ Detectores de fluorescencia, son muy sensibles y selectivos y funcionan iluminando con una luz ultravioleta el componente de interés y luego midiendo la fluorescencia emitida por ellos.
- ✓ Detectores electroquímicos, es particularmente beneficioso para compuestos orgánicos debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicación. Las reacciones con analitos pueden oxidarse o reducirse. Es un ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (que se pueden detectar por oxidación) y cetonas y aldehídos (que se pueden detectar por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas para este fin son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

Los detectores basados en una propiedad de la disolución, responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:

- ✓ Detectores de índice de refracción, consta de una unidad con dos compartimentos, uno para la introducción de disolventes limpios y otro para la muestra, que transmite luz visible en paralelo. Cuando un soluto con un índice de refracción diferente al solvente ingresa a la celda, se produce una aberración y la señal enviada por la fotocélula cambia. Son muy sensibles a los cambios de temperatura y no son adecuados para la elución en gradiente.
  
- ✓ Detectores de conductividad, se usan más comúnmente cuando el eluyente es iónico, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de la separación por cromatografía de intercambio iónico. Son muy sensibles, baratos y duraderos. (Pássaro Carvalho, 2016)

Finalmente, el registrador recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los registra en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación (Giri, 2015).

### **1.3.2 Selección de Operación del HPLC**

Existen tres modos en los que se puede operar la cromatografía líquida de alto rendimiento:

- Fase reversa Es la primera opción para el análisis de la mayoría de las muestras, especialmente aquellas que contienen compuestos neutros o no iónicos que pueden disolverse en una mezcla de compuestos orgánicos y agua (Snyder et ál., 1997). La fase estacionaria es hidrófoba, mientras que la fase móvil es un líquido polar, generalmente una mezcla de agua-metanol o agua-acetonitrilo (Giri, 2015).

- Par ion. Este modo se utiliza cuando está presente la ionización de iones o compuestos, especialmente bases y cationes (Snyder et al., 1997). Al agregar contraiones lipofílicos, los iones en solución se pueden neutralizar y separar en pares de iones en una columna estándar o de fase inversa (Kazakevich, 2007).

- Fase normal. Método de separación de polaridad. La fase estacionaria (generalmente gel de sílice) es polar mientras que la fase móvil es no polar. Este

método se utiliza como segunda alternativa cuando ninguno de los anteriores funciona, aunque es el método preferido para muestras lipofílicas con poca solubilidad en mezclas de agua y compuestos orgánicos, base o mezcla de isómeros (Snyder et ál.,1997). Las fases móviles comúnmente utilizadas en este método son: hexano, diclorometano, cloroformo, éter dietílico y mezclas de los mismos (Giri, 2015).

### **1.3.3 Tipos de HPLC**

Se clasifican según el mecanismo de retención, el cual se escoge dependiendo de la naturaleza de los compuestos presentes en la muestra. Los tipos existentes son:

- Adsorción. Se basa en la competencia por la neutralidad del analito entre las fases móvil (líquida) y estacionaria (sólida) (Brown y Weston, 1997). Los compuestos de la muestra interactúan con la fase móvil a través de enlaces dipolo-dipolo reversibles. El tiempo de retención de la molécula depende de la fase estacionaria; por ejemplo, si se van a conservar compuestos polares, se debe utilizar una fase estacionaria de la misma polaridad; de lo contrario, se utilizará una fase estacionaria no polar. (Suarez D, 2018).

- Partición. También hay competencia por los analitos en esta HPLC. Sin embargo, a diferencia de la adsorción, la fase estacionaria es líquida. Debido a la inestabilidad de la fase líquida estacionaria, este método no se usa mucho en la actualidad (Brown y Weston, 1997).

- Exclusión molecular. Es adecuado para separar analitos cuyos tamaños moleculares difieren en más del 10 % para moléculas pequeñas y del 20 % para moléculas grandes. También se utiliza para calcular la masa de compuestos en una muestra. En este tipo de HPLC, la columna actúa como un tamiz molecular con una fase estacionaria sólida porosa de la que salen primero las moléculas más grandes (Brown y Weston, 1997).

- Afinidad. Este método utiliza la tendencia de algunas sustancias a reaccionar con otras como método cromatográfico (Suarez D, 2018). Es ampliamente utilizado para aislar biomoléculas capaces de formar complejos disociativos con otras especies como proteínas y ácidos nucleicos.

- Intercambio iónico. En esta HPLC, la carga superficial de la fase estacionaria es opuesta a la de los iones presentes en la muestra. Esta técnica se especializa en muestras iónicas o ionizadas. El tiempo de retención de la molécula está directamente relacionado con la carga de la muestra: cuanto mayor sea la carga, mayor será el tiempo de elución de la molécula. El método utiliza un tampón acuoso como fase móvil, y el pH y la fuerza iónica controlan el tiempo de elución (Suarez D, 2018).

#### **1.3.4 Ventajas**

A diferencia de otras técnicas, la HPLC cuenta con varias ventajas:

- Extensa gama de aplicaciones debido a la extensa disponibilidad de herramientas, ejes y otros materiales, lo cual lo hace capaz de examinar casi cualquier mezcla deseada (Snyder, Kirkland y Dolan, 2010).
- Alta precisión en resultados ( $\pm 0.5\%$  o menor) (Snyder et al., 2010).
- Diversas técnicas, en medio de las cuales permanecen la cromatografía por partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular (Fallon et al., 1987).
- Facilidad de manejo de los gradientes generados en la fase móvil (Fallon et al., 1987).
- Puede recolectar compuestos no destructivos, es decir, aquellos separados en la columna, lo que permite utilizar la HPLC como técnica de preparación o purificación de muestras (Fallon et al., 1987).
- Tiempo de separación inferior a 30 minutos para cada muestra analizada (Fallon et al., 1987).
- Alta reproducibilidad del análisis cuantitativo (Dong, 2013).
- Alta separabilidad y detección sensible (Dong, 2013).
- Funcionamiento flexible, personalizable y automático (Dong, 2013).
- No limitado por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra (Ozores, s. f.).

### **1.3.5 Desventajas**

- Instrumentación costosa.
- Difícil análisis cualitativo.
- No existe detector universal y sensible.
- Elevado costo de operación.
- Experiencia indispensable.

### **1.3.6 Validación de metodologías por HPLC en alimentos**

Esto incluye asegurarse de que los métodos sean precisos, específicos, reproducibles y que, dentro de ciertos límites, se puedan obtener resultados iguales o similares con diferentes analistas, equipos, laboratorios, etc.

Waters, (2002) señala que el ICH considera los siguientes aspectos:

- ✓ Selectividad
- ✓ Linealidad
- ✓ Precisión
- ✓ Exactitud
- ✓ Límites de detección y cuantificación
- ✓ Robustez
- ✓ Rango
- ✓ Aseguramiento del sistema

Aunque los aspectos anteriores se derivan principalmente de la literatura relacionada con la industria farmacéutica, también están aprobados por la FDA (2000; 2001) para la validación de métodos HPLC en la industria química y alimentaria. Por otro lado, en la bibliografía referente a la validación de HPLC en alimentos, la mayoría de los trabajos han sido examinados teniendo en cuenta estos parámetros. Por lo tanto, cada una de estas métricas se analizará a continuación en relación con su aplicación e idoneidad para los métodos de HPLC en alimentos.

#### **1.3.6.1 Selectividad**

Se refiere a la capacidad de un método para producir, de manera medible, una respuesta representada por una señal que depende completamente del analito de interés. La señal deberá estar libre de ruido y de una magnitud consistente con los requisitos esperados del análisis. (Swartz y Krull, 2003).

La complejidad de la matriz, los niveles de algunos analitos traza, la posible degradación de los compuestos diana e incluso la complejidad de la instrumentación utilizada hacen que cada procedimiento de evaluación de la selectividad sea único y su desarrollo completo sea un reto.

Las interferencias pueden provenir de una variedad de fuentes tales como:

Productos de descomposición del mismo analito (por acción microbiana, química, térmica, enzimática, metabolitos de degradación, etc).

Las sustancias que se encuentran naturalmente en la matriz y tienen una estructura química similar pueden pertenecer a la misma familia o grupos funcionales, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, flavonoides, ácidos grasos, etc.

Los compuestos, aunque estructuralmente no son similares, tienen las mismas propiedades químicas o físicas como absorción a la misma longitud de onda, solubilidad, etc (McCluskey y Devery, 1993). Esto significa comprender la estructura de la relación de interés y cómo la afecta. Para los alimentos, además de las condiciones de almacenamiento, también se deben considerar aspectos como la presencia, manipulación y procesamiento de otros compuestos.

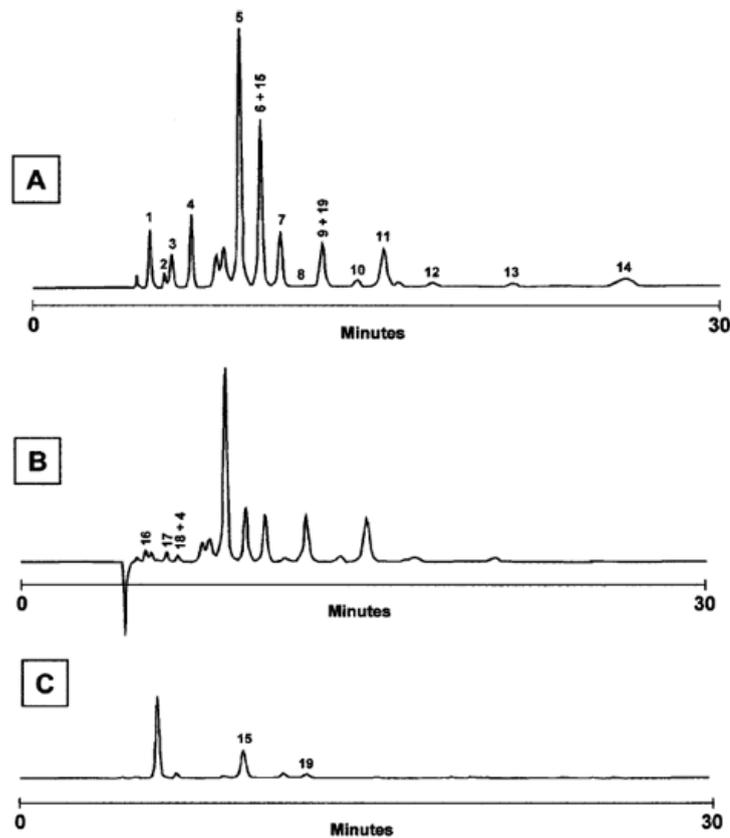
El primer parámetro utilizado para evaluar la pureza de un pico es su tiempo de retención relativo al estándar o su factor de capacidad ( $k$ ). Compare el tiempo y la forma del pico de referencia con el de la muestra, si se observa distorsión, puede deberse al ruido.

Otro procedimiento sencillo para evaluar la pureza de los picos es mezclar la muestra con el estándar e inyectarlo en el instrumento. Si se observan picos dobles o la formación de distorsiones, esto puede indicar ruido. En algunos casos, se puede alterar la fase móvil para cambiar la relación de algunos de sus componentes o el pH o la fuerza iónica para verificar cualquier distorsión o separación de los picos. Por otro lado, Wang et al. (2000) recomienda inyectar estándares y/o muestras concentrados seguidos de blancos para determinar si está presente el

"recordar", la ocurrencia de picos debido a algún grado de retención de la muestra previamente inyectada, generalmente debido a una sobrecarga.

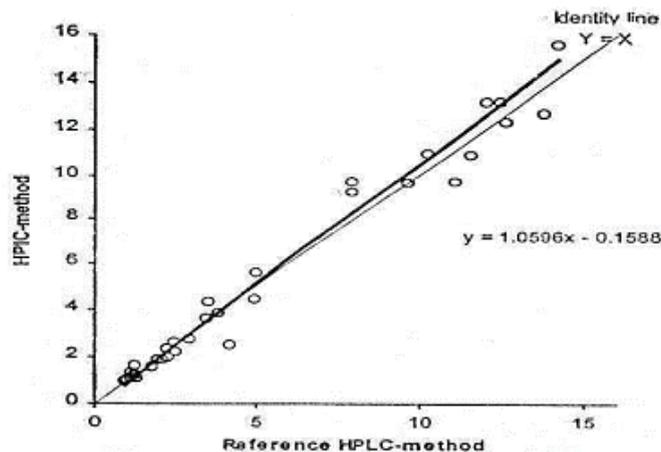
La selectividad debe complementarse con la evaluación de la pureza y homogeneidad del pico. Puede mostrarse en el cromatograma que un pico homogéneo está contenido dentro de otro pico superpuesto, siendo el valor obtenido mayor que el valor real. Para evidenciar esta interferencia puede usar el mismo sistema cromatográfico con solo el detector reemplazable (un UV por otro de fluorescencia) para chequear mejor la pureza del pico. También se utilizan electroforesis capilar, cromatografía de gases, capa fina etc y los resultados se comparan mediante evaluación estadística o también por comparando el número de picos y la relación entre los métodos.

En algunos estudios, se utilizó más de un detector para cuantificar más compuestos, así por ejemplo Zeppa et al. (2001) utilizaron detectores: UV (210 y 290 nm) con detectores de índice de refracción, gracias a los cuales pudieron cuantificar 12 compuestos diferentes en 30 minutos. Se observan picos superpuestos, sin embargo, utilizando un detector de índice de refracción, que es más selectivo para los azúcares, se pueden realizar cálculos para determinar la identificación de cada compuesto. Por ejemplo, el cromatograma A (UV a 290 nm) muestra un pico de 4 correspondiente a piruvato, mientras que el cromatograma B (detector de índice de refracción) muestra un pico de piruvato (4) unido a galactosa (18). Dado que el piruvato se puede cuantificar mediante la cromatografía A, se resta su contribución al área reportada por el detector de índice de refracción y se usa el estándar para este ácido para la cuantificación individual.



**Figura 3.** Separación por HPLC, de ácidos orgánicos (1, oxálico; 2, cítrico; 3, orótico; 4, pirúvico; 5, láctico; 6, fórmico; 7, acético; 9, propiónico; 10, isobutírico; 11, butírico; 12, isovalérico; 13, valérico; 14 hipúrico y 15, úrico. Azúcares: 16, lactosa; 17, glucosa y 18, galactosa. Diacetilo 8, y acetoína 19. Muestra de un queso comercial, con detección UV a 210 nm (A), y 290 nm (C) y detector de índice de refracción (B). Fuente: Zeppa et al. (2001).

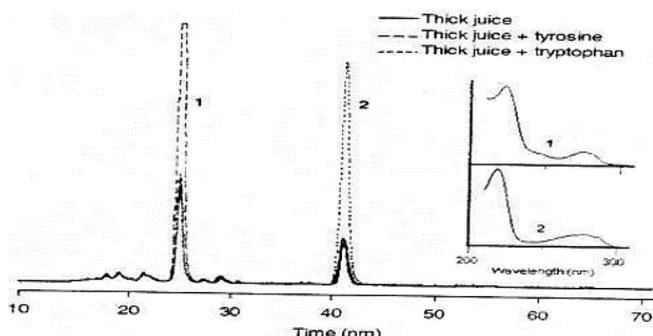
Carlsson et al. (2001), un método de HPLC modificado basado en la extracción de fosfato de inositol a partir de cereales. Como parte del protocolo de validación, compararon los resultados con el método HPLC original y encontraron que no había una diferencia significativa ( $P > 0,05$ ). Confirme que el nuevo proceso de extracción es apropiado porque es más rápido y usa menos solvente. La figura 4 muestra un gráfico que compara los resultados obtenidos por los dos métodos de HPLC, y si ambos obtuvieran exactamente los mismos resultados, se esperaría un valor de pendiente cercano a uno y un valor de corte cercano a uno es igual a cero.



**Figura 4.** Comparación de un método de referencia (HPLC fase reversa) y otro método (cromatografía iónica) propuesto para la determinación de inositol fosfato en alimentos. Fuente: Carlsson et al. (2001).

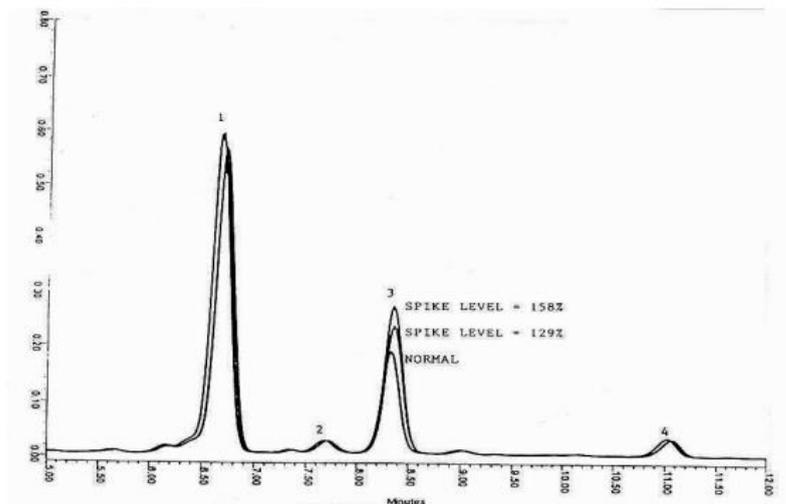
Baunsgaard et al. (2000), se analizó la presencia de compuestos con propiedades de fluorescencia de tirosina y triptofano, en jugo de remolacha por medio de la HPLC de exclusión molecular con dos tipos de detectores, el primero UV-Vis de fotodiodos (rango de 210-550 nm) y el segundo de fluorescencia excitación (250/450 nm) y emisión (300/500 nm). Los autores para identificar la pureza (FIGURA 5) de los picos de tirosina y triptófano realizaron las siguientes pruebas:

- Agregan estándares a una muestra para observar el comportamiento sobre el tiempo de retención y forma de picos.
- Con el detector de fotodiodos realizan un espectro entre 200-300 nm, tanto a las fracciones de los picos de la muestra, como a estándares.



**FIGURA 5.** Cromatografía de exclusión molecular con adición cualitativa de tirosina (1) y triptofano (2), a una muestra de jugo de remolacha, empleando un detector de fluorescencia a 285/325 nm. Los cromatogramas UV-Vis obtenidos con detector de diodos, (200-300 nm), corresponden a los estándares respectivos. Fuente: Baunsgaard et al. (2000).

Chandra et al. (2001) en un trabajo sobre la separación, identificación y cuantificación de antocianinas, en jugos deshidratados en polvo, comprueban la existencia de cianidina 3-rutinosa, por medio de el añadido de un estándar a la muestra como se muestra en la FIGURA 6, adicionalmente emplearon un detector de masas para confirmar enteramente la sustancia.



**FIGURA 6.** Cromatogramas por HPLC, de antocianinas (cianidina 3-rutinosa) en jugos deshidratados en polvo. Añadido en dos niveles 129 y 158%. Fuente: Chandra et al. (2001).

Se muestra un resumen de diversos trabajos en alimentos (Tabla 1) en los que, se han empleado diferentes métodos y detectores, para conocer la selectividad de la metodología. El más empleado se basa en la comparación con un estándar a la muestra, determinando tiempo de retención ( $t_r$ ) y forma de pico, es habitual además el añadido de un estándar para de esta forma evaluar si se muestra cualquier tipo de variación en dichos parámetros. Los detectores de fotodiodos y masas, cada vez tienen más grande utilidad como criterio para la evaluación de la pureza de pico.

**Tabla 1.** Selectividad en metodologías por HPLC aplicadas a alimentos.

| Referencia                          | Alimento                                   | Detector   | Analito                        | Identificación  |
|-------------------------------------|--|--|--------------------------------|---|
| Bicchi <i>et al.</i> (2001)         | Pulpa de manzana                           | Diodo UV   | Daminozida                     | Pico /tr a 295 y 325 nm<br>Espectro UV 200-375<br>Espectro de masas |
| Breithaupt, (2001)                  | Jugos de frutas                            | Diodos UV<br>284 nm                                      | Ácido fólico                   | Pico /tr<br>Espectro UV   |
| Esteve <i>et al.</i> (2001)         | Hongos                                     | Fluorescencia  | Tiamina<br>Riboflavina         | Pico /tr  |
| Grande <i>et al.</i> (2001)         | Alimento para animales                     | Diodos UV<br>264 y 230 nm                                | Sulfametazina<br>Trimetoprina  | Pico /tr<br>Espectro UV   |
| Kim-Kang <i>et al.</i> (2001)       | Atún                                       | Fluorescencia  | Emamectina                     | Pico /tr<br>Espectro de masas                                       |
| Nyman y Kumpulainen, (2001)         | Cerezas, fresas y vinos                    | Diodo Vis<br>530 y 510 nm                                | Antocianidinas (6)             | Pico/tr<br>Espectro UV  |
| Pripis-Nicolau <i>et al.</i> (2001) | Vinos y mostos                             | Fluorescencia  | 22 amino ácidos (AA)           | Pico /tr  |
| Rose-Sallin <i>et al.</i> (2001)    | Cereales instantáneos                      | Fluorescencia  | Niacina                        | Pico /tr  |
| Elmadfa, (2000)                     | Aceite oliva<br>Brócoli                    | Fluorescencia  | Vitamina K                     | Pico /tr<br>243, 272 y 330 nm de ex.                                |
| Izquierdo <i>et al.</i> (2000)      | Bebidas alcohólicas                        | Fluorescencia  | Cumarinas                      | Pico /tr<br>Espectros UV  |
| Mattila <i>et al.</i> (2000)        | Cebollas, té, limón, naranja, brócoli, etc | Diodo UV-Vis<br>270, 280 ,329 y 370 nm<br>Electroquímico | Flavonoides (17)               | Pico/tr<br>Espectros<br>Voltametría                                 |
| Sotelo y Serrano, (2000)            | Papas                                      | UV-Vis<br>200 nm   | Solanina (S)<br>Chaconina (Ch) | Pico/tr   |
| Wang <i>et al.</i> (2000)           | Té verde                                   | Diodo<br>Fluorescencia                                   | Cafeína<br>Ácido gálico        | Pico /tr<br>Espectro UV   |
| Woollard <i>et al.</i> (2000)       | Leche y formulas infantiles                | Diodo UV   | Ácido pantoténico              | Pico/tr<br>200, 205 y 240 nm  |

Fuente: Líquida, Validación De Metodologías De Cromatografía. Postgrado Interfacultades En Ciencia y Tecnología de Alimentos.

### 1.3.6.2 Linealidad.

En relación con la capacidad del procedimiento para obtener resultados proporcionales entre la concentración de un analito y su reacción, en un rango de interés, en algunas ocasiones tienen la posibilidad de hacer transformaciones matemáticas para obtener este parámetro (USP, 2002). Es deseable conocer en que parámetros de concentración se obtienen respuestas que tengan proporcionalidad, entre la variable sin dependencia (concentración) y la dependiente (respuesta del detector). Es una costumbre general en procedimientos que fueron validados el inyectar un solo estándar y con base a este, cuantificar una muestra. En esta situación es deseable que la concentración del estándar sea lo más aproximada o cercana del valor esperado de la muestra, de forma de reducir el error experimental, este método podría ser llevado a cabo en determinaciones rutinarias, en las cuales antes se ha evaluado la linealidad y se tiene suficiente confianza en el procedimiento como para realizar un estudio con un solo estándar.

Este rango también puede verse como un parámetro de validación que incluye el rango entre los valores de concentración de analito bajos y altos, entre los cuales hay suficiente precisión, exactitud y linealidad.

Para determinar la linealidad, puede:

- Continuar inyectando diferentes concentraciones de los estándares y determinar cada reacción, graficarla, estimar el comportamiento de la curva resultante, para mostrar la tendencia lineal, luego interpolar las reacciones obtenidas con las muestras.

- Agregar diferentes concentraciones de estándares a las muestras para evaluar el efecto de la matriz en la linealidad.

Se pueden considerar factores como los niveles máximos o mínimos permitidos o recomendados por las normas nacionales o internacionales para estimar las concentraciones que contendrá el estándar. Si la sustancia tiene el nivel máximo o mínimo permisible deseado, se puede ajustar el método agregando un punto por encima del 50% para que el nivel (después de realizar el tratamiento y la

correspondiente dilución o concentración) se encuentre en el centro de la curva. Y el valor predeterminado también es del 50%. Por otro lado, Fabre y Altria (2001) muestran que la linealidad también se puede estimar en el rango de 80-120% o 60-140%, mientras que para las impurezas se puede determinar cerca de este valor. Su valor máximo permisible, hasta el 200%. Aunque las consideraciones anteriores se refieren principalmente a los estudios de HPLC en productos farmacéuticos, todas se aplican a los alimentos.

Cuando se selecciona un rango lineal para la evaluación, se toman al menos 5 concentraciones diferentes del estándar y se inyectan al menos dos veces para producir una curva de regresión lineal para la suma de todos los ensayos, lo que permite el cálculo de la regresión lineal con el eje Y (a), pendiente (m) y regresión lineal. El punto de corte está representado por el coeficiente (r). Para a y m, se obtiene una curva que describe la actividad del detector en función de la concentración del analito, r es lineal: un valor de 1 o cercano significa una línea lineal, r es cercano a 0, lo que significa que no hay relación entre la respuesta y atención, o una gran desviación de eso. También se utiliza el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) porque proporciona una mejor estimación de la linealidad, así por ejemplo un valor de  $r^2$  de 0,99886 representa que solo un 0,114% ( $1,00000 - 0,99886 = 0,00114 \times 100 = 0,114\%$ ) de los datos tienen una desviación de la linealidad obtenida (Smith, 1998).

Los intervalos de confianza para los resultados se pueden calcular proporcionando los límites máximo y mínimo de la curva con una probabilidad dada (generalmente 95 %) (Montgomery, 2002) y un residual, que es la diferencia entre el valor de respuesta medido y la respuesta calculada de la ecuación actual, también debe estimarse. Se comprobará la normalidad de estos residuos mediante las siguientes pruebas:

- Ajuste a la curva de normalidad.
- Gráficas residuales contra tiempo y valores ajustados.
- Histograma de las frecuencias.
- Prueba de chi-cuadrado.

Se presentan los resultados de linealidad determinados por HPLC en diferentes trabajos alimentarios (tabla 2). Estos incluyen una amplia variedad de productos alimenticios, así como detectores. Todos los valores obtenidos de los

coeficientes de correlación son cercanos a 1000, lo cual es de esperar ya que los métodos tienen valores que se desvían significativamente de la tendencia lineal no reportada y los detectores utilizados para mostrar este comportamiento. La mayoría de los investigadores que informaron indicaron este grado de linealidad, con algunas excepciones.

**Tabla 2.** Linealidad de metodologías por HPLC aplicadas a alimentos.

| Referencia                             | Alimento   | Detector                        | Analito                           | Coefficiente de correlación<br>Rango (ppm)    |
|--|--|---------------------------------|-----------------------------------|---|
| Bicchi <i>et al.</i> (2001)            | Pulpa de manzana                                 | Diodos UV                       | Daminozida                        | 0,997<br>0,005-0,05                           |
| Breithaupt, (2001)                     | Jugos de frutas                                  | Diodos UV                       | Ácido fólico                      | 0,999<br>0,06-2,0                             |
| Carlsson <i>et al.</i> (2001)          | Cebada, avena<br>arroz, pan                      | UV                              | Inositol<br>fosfatos              | 1,000<br>0,1-0,8 mM                           |
| Chandra <i>et al.</i> (2001)           | Jugos en polvo<br>deshidratados                  | Vis                             | Antocianinas                      | 0,999<br>4-400                                |
| Esteve <i>et al.</i> (2001)            | Hongos   | Fluorescencia                   | Tiamina<br>Riboflavina            | 0,999<br>(T) 1,3-573 ppb<br>(R) 8,6-1.030 ppb |
| Grande <i>et al.</i> (2001)            | Alimento para<br>animales                        | Diodos UV                       | Sulfametazina<br>Trimetoprina     | 0,9996<br>0,9992<br>1-100                     |
| Kim-Kang <i>et al.</i><br>(2001)       | Atún   | Fluorescencia                   | Emamectina                        | mínimo 0,9800<br>2-100 ppb                    |
| Pripis-Nicolau <i>et al.</i><br>(2001) | Vinos y mostos                                   | Fluorescencia                   | 22 amino<br>ácidos (AA)           | 0,970 - 0,999<br>(*)                          |
| Rose-Sallin <i>et al.</i><br>(2001)    | Cereales<br>instantáneos                         | Fluorescencia                   | Niacina                           | 0,9995<br>0,25-100                            |
| Mattila <i>et al.</i> (2000)           | Cebollas, té,<br>limón, naranja,<br>brócoli, etc | Diodos UV-Vis<br>Electroquímico | Flavonoides<br>(17)               | > 0,999<br>2- 4                               |
| Sotelo y Serrano,<br>(2000)            | Papas  | UV-Vis                          | Solanina (S)<br>Chaconina<br>(Ch) | NR<br>S: 12 - 24<br>Ch: 15 - 30               |
| Wang <i>et al.</i> (2000)              | Té verde   | Diodos<br>Fluorescencia         | Cafeína<br>Ácido gálico           | 0,988 a 1,000<br>NR                           |

Fuente: Líquida, Validación De Metodologías De Cromatografía. Postgrado Interfacultades En Ciencia y Tecnología de Alimentos.

### 1.3.6.3 Precisión

Cuando se evalúa a partir de una muestra homogénea, es la dispersión de las medidas alrededor de la media. Se expresa matemáticamente como desviación estándar (DE), y como porcentaje de desviación estándar relativa (DER%) o coeficiente de variación (CV) (Smith, 1998). Estas estadísticas ayudan a evaluar la incertidumbre en las estimaciones de posibles mediciones, ya que los errores aleatorios y sistemáticos crean dispersión alrededor de la media. Por lo tanto, la precisión depende del número de determinaciones (Fabre y Altria, 2001).

Según Quattrocchi et al. (1992) la precisión es determinada en base a:

- Sistema: evaluando la dispersión de por lo menos 6 inyecciones del estándar.
- Método: evaluando la dispersión de numerosas preparaciones de la muestra final homogénea. En esta situación se tienen que hacer todo el método a partir del procedimiento de la muestra hasta su cuantificación final.

La precisión puede ser considerada en tres niveles:

- Repetitiva: tiene relación con cualquier variabilidad en un procedimiento una vez que es llevado a cabo por el mismo analista y equipo en un intervalo corto de tiempo (usualmente un día). Tienen la posibilidad de ser 5 inyecciones (intra-día) por 5 días seguidos (inter-día) con un mismo analista.
- Intermedia: es la exactitud que se recibe una vez que uno o diversos de los componentes (analista, día de operación, otra columna sin embargo de la misma marca y características) son cambiados en un mismo laboratorio. Podría ser inyección de una muestra por duplicado por 5 días diferentes, con 3 analistas diversos (Transfiguración et al. 2001).
- Reproducibilidad: Se trata de estudios en los que diferentes laboratorios analizan las mismas muestras con fines de comparación, en estas condiciones, utilizando diferentes analistas, fechas de estudio y artefactos casi continuos y diferentes columnas. Este tipo de precisión es considerado como fortaleza (en inglés "ruggedness") por algunos investigadores e instituciones.

La DER%, del sistema para precisión repetitiva, no debería ser mayor del 2% inyectando cinco veces una solución estándar, en algunos casos se pueden obtener valores inferiores al 1% e inclusive menores. Mientras que en muestras complejas o en trazas, es factible DER% de 5 a 10%. Según Transfiguración et al. (2001) en HPLC valores normalmente aceptados de DER%, en relación a los parámetros área del pico y tiempo de retención son iguales o menores de 15% y 2%, respectivamente.

Se recomienda realizar al menos 5 determinaciones para cada concentración, con al menos 3 determinaciones simultáneas. Más precisamente, se puede calcular un intervalo de confianza para una medición, lo que muestra que el valor de la población se encuentra dentro de un rango de niveles de probabilidad. La distribución Z se puede usar para calcular intervalos cuando se usan al menos 30 muestras independientes normalmente distribuidas para determinar la precisión. Pero cuando el tamaño de la muestra es inferior a 30, se debe utilizar la distribución t-student. (Smith, 1998).

**Tabla 3.** Precisión repetitiva (mismo día) e intermedia (diferentes días), evaluada en avena en hojuelas por HPLC, en la determinación de inositol fosfato ( $\mu\text{mol/g}$ ).

| Corrida | Día de extracción y análisis |       |       |       |       |       | DER% |
|---------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
|         | 1                            | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |      |
| 1       | 12,70                        | 13,22 | 12,34 | 14,74 | 15,24 | 13,42 | 8,16 |
| 2       | 12,82                        | 12,00 | 12,27 | 14,84 | 14,28 | 13,69 |      |
| 3       | 12,83                        | 11,69 |       |       |       |       |      |
| 4       | 12,41                        | 11,52 |       |       |       |       |      |
| 5       | 12,55                        | 11,80 |       |       |       |       |      |
| 6       | 12,37                        | 11,76 |       |       |       |       |      |
| 7       | 12,69                        | 11,77 |       |       |       |       |      |
| 8       | 12,49                        | 11,18 |       |       |       |       |      |
| 9       | 12,61                        | 11,22 |       |       |       |       |      |
| 10      | 12,63                        | 11,54 |       |       |       |       |      |
| DER%    | 1,25                         | 4,85  |       |       |       |       |      |

Fuente: Carlsson *et al.* (2001).

Observación: Las experiencias faltantes no fueron realizadas por los investigadores.

En la tabla 3, se muestran los resultados obtenidos por Carlsson et al. (2001) en la determinación de inositol fosfafo en avena en hojuelas. Se indican los valores de precisión repetitiva consistente de dos muestras inyectadas 10 veces cada una en dos días distintos (uno por muestra), los DER% obtenidos fueron de 1,25 y 4,85%, por otra parte la precisión intermedia (8,16%) se evaluó en dos muestras inyectadas por duplicado por seis días.

En un estudio realizado por Pripis-Nicolau et al. (2001) para la cuantificación de 22 aminoácidos en vino y licor para determinar repetibilidad (misma fecha) y precisión intermedia (diferente fecha). Los principales resultados se enumeran en la Tabla 4. Cabe señalar que la precisión varía ampliamente entre los diferentes aminoácidos. Según estos autores, para una concentración de 10 ppm, un %DER superior al 15% es el máximo admisible, y la lisina y la ornitina superan este valor.

**Tabla 4.** Precisión repetitiva (mismo día) e intermedia (diferentes días), evaluada en vino por HPLC en la determinación de amino ácidos (ppm).

| Amino ácido | Repetitiva           |      | Intermedia              |      |
|-------------|----------------------|------|-------------------------|------|
|             | Diez determinaciones |      | Tres días por duplicado |      |
|             | DE                   | DER% | DE                      | DER% |
| Triptofano  | 0,019                | 2,0  | ND                      | ND   |
| Histidina   | 0,005                | 3,7  | 0,009                   | 14,9 |
| Alanina     | 0,030                | 4,0  | 0,114                   | 2,7  |
| Lisina      | 0,010                | 19,8 | 0,009                   | 17,5 |
| Ornitina    | 0,011                | 18,5 | 0,012                   | 18,7 |
| Cisteína    | 0,006                | 5,7  | 0,002                   | 3,7  |
| Tirosina    | 0,013                | 8,0  | 0,017                   | 2,6  |
| Glutamina   | 0,004                | 7,0  | 0,003                   | 18,9 |

ND: no detectado

Fuente: Adaptado de Pripis-Nicolau *et al.* (2001).

En la tabla 5, se muestra la precisión obtenida en varios trabajos en HPLC aplicados a alimentos. En general los investigadores para chequear este parámetro realizan un número determinado de inyecciones (5-14) y proceden a calcular la DE y DER%

Los valores obtenidos usualmente son inferiores a un 5%, sin embargo también se reportan hasta un 10% de DER%, estos resultados se obtienen en determinaciones múltiples de varios compuestos, en los cuales se puede estar "sacrificando" precisión en la determinación de un compuesto, por mejorar la de otro.

**Tabla 5.** Precisión de metodologías por HPLC aplicadas a alimentos.

| Referencia                       | Alimento                                   | Detector                       | Analito                                  | N  | DS               | DER%       |
|----------------------------------|--|--------------------------------|--|----|------------------|------------|
| Bicchi <i>et al.</i> (2001)      | Pulpa de manzana                           | UV                             | Daminozida                               | 6  | 7,8              | 6,7        |
| Chandra <i>et al.</i> (2001)     | Jugos en polvo deshidratados               | Vis                            | Antocianinas                             | 5  | 0,012            | 3,1        |
| Dreassi <i>et al.</i> (2001)     | Cárnicos                                   | UV                             | Levamisol                                | 5  | NR               | 2,7 -4,0   |
| Esteve <i>et al.</i> (2001)      | Hongos                                     | Fluorescencia                  | Tiamina (T)<br>Riboflavina (R)           | 6  | (T) NR<br>(R) NR | 2,5<br>2,5 |
| Grande <i>et al.</i> (2001)      | Alimento para animales                     | Diodos UV                      | Sulfametazina<br>Trimetoprina            | 6  | NR               | 1,0        |
| Nyman y Kumpulainen, (2001)      | Cerezas, fresas y vinos                    | Diodos Vis                     | Antocianidinas                           | 14 | NR               | 1,4-2,6    |
| Rose-Sallin <i>et al.</i> (2001) | Cereales instantáneos                      | Fluorescencia                  | Niacina                                  | 10 | 0,05             | 0,8        |
| Zeppa <i>et al.</i> (2001)       | Quesos                                     | UV<br>Índice refracción        | Azúcares,<br>ácidos diacetilo y acetoína | 10 | NR               | 3,6- 0,7   |
| Elmadfa, (2000)                  | Brócoli                                    | Fluorescencia                  | Vitamina K                               | 8  | NR               | 7,6        |
| Izquierdo <i>et al.</i> (2000)   | Bebidas alcohólicas                        | Fluorescencia                  | Cumarinas                                | 10 | 0,37             | 0,3        |
| Mattila <i>et al.</i> (2000)     | Cebollas, té, limón, naranja, brócoli, etc | Diodo UV-Vis<br>Electroquímico | Flavonoides (17)                         | NR | NR               | 2,9 - 10,4 |
| Sotelo y Serrano, (2000)         | Papas                                      | UV-Vis                         | Solanina<br>Chaconina                    | 9  | NR               | 0,1 -0,4   |
| Wang <i>et al.</i> (2000)        | Té verde                                   | Diodos<br>Fluorescencia        | Cafeína (CF)<br>Ácido gálico (AG)        | 10 | CF NR<br>AG NR   | 0,3<br>8,9 |
| Woollard <i>et al.</i> (2000)    | Leche y formulas infantiles                | Diodo UV                       | Ácido pantoténico                        | 12 | NR               | 2,68       |

N: Número de muestras. DE: Desviación estándar. %DER: Porcentaje de desviación estándar relativa. NR: No reporta.

Fuente: Líquida, Validación De Metodologías De Cromatografía. Postgrado Interfacultades En Ciencia y Tecnología de Alimentos.

La sugerencia para evaluar este parámetro es aumentar el tamaño de la muestra para ajustarse mejor a la distribución normal, y por ende un mejor ajuste.

#### **1.3.6.4 Exactitud**

Es conocido como error sistemático o tendencia, y corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (promedio) y valor verdadero. Este parámetro establece las desviaciones del procedimiento analítico "ideal" y estas variaciones tienen la posibilidad de ser: procedimiento inadecuado, interferencias en la sustracción, variación del analito a lo largo del análisis.

La exactitud puede evaluarse de dos maneras:

1. Procedimiento absoluto, una vez que se dispone de una muestra que tiene una porción de un compuesto, no obstante debido a que es en realidad difícil contar con una muestra con un valor verdadero, es posible usar otra metodología (más compleja), que sea más precisa que la que se quiere evaluar y utilizar aquel costo como el verdadero.

2. Se emplea con más frecuencia el porcentaje de recuperación de la muestra, que se apoya en adicionar a la muestra unas porciones conocidas del analito, en un rango de interés y proceder a su cuantificación (Pomeranz y Meloan, 1994b).

Los valores de recuperación deben ser lo más cercano al 100%, lo cual significa que la presencia de errores probablemente es mínima o que su sumatoria (valores negativos y positivos) tiende a cero. No obstante es recurrente hallar valores entre 80 y hasta 110%, en la situación de trazas principalmente se obtienen recuperaciones entre 60 al 80%. Se propone utilizar un mínimo de 5 determinaciones por cada concentración, en términos generales con un mínimo de 3 concentraciones, el promedio debe estar en un 15% del valor anhelado, pero una vez que hablamos de valores mínimos se puede estar en un 20% (Swartz y Krull, 2003).

Este parámetro mide principalmente las pérdidas causadas por la alianza del analito a compuestos contenidos en la matriz de alimentos, que evitan su

sustracción y por consiguiente su cuantificación, por otro lado además se expresan efectos de diferencias de solubilidad de un compuesto a diferentes concentraciones o por la existencia de otros elementos (interferencia) en la matriz (Fabre y Altria, 2001). La precisión se puede ver seriamente afectada una vez que una interferencia, está en niveles cambiantes en muestras diferentes, con lo que un procedimiento se diseña y valida para ciertas condiciones, que luego no precisamente cumple para cada una de las muestras (Pomeranz y Meloan, 1994b).

En la tabla 6 se muestran los documentos de validación donde se utiliza el segundo método con fines de comparación para tener más confianza de que los resultados obtenidos con el método propuesto son correctos. Para efectos de comparación es preferible utilizar el método formal, sin embargo se puede notar que en la bibliografía este procedimiento no es tan frecuente entre los investigadores debido a que hay poca información al respecto.

**Tabla 6.** Comparación de resultados por HPLC con otras metodologías.

| Referencia                       | Alimento                    | Detector      | Analito                        | Método de comparación                    |
|----------------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------------------|--|
| Carlsson <i>et al.</i> (2001)    | Cereales                    | UV            | Inositol fosfato               | HPLC                                     |
| Esteve <i>et al.</i> (2001)      | Hongos                      | Fluorescencia | Tiamina (T)<br>Riboflavina (R) | AOAC<br>Fluorometría                     |
| Rose-Sallin <i>et al.</i> (2001) | Cereales instantáneos       | Fluorescencia | Niacina                        | Microbiológico                           |
| Izquierdo <i>et al.</i> (2000)   | Bebidas alcohólicas         | Fluorescencia | Cumarinas                      | Fluorometría                             |
| Woollard <i>et al.</i> (2000)    | Leche y formulas infantiles | Diodos UV     | Ácido pantoténico              | Microbiológico<br>Cromatografía de gases |

Fuente: Líquida, Validación De Metodologías De Cromatografía. Postgrado Interfacultades En Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Para obtener el porcentaje de recuperación, use al menos 3 concentraciones de analito por triplicado que pueden ser 50-150%, 80-120% y 60-140% del valor esperado). El porcentaje de recuperación se compara con el 100% (valor agregado) para determinar si existe una diferencia significativa.

Breithaupt (2001) indica que el rango de alimentación aceptable según las recomendaciones de la AOAC es del 80 al 110 % para el nivel de 1 ppm.

Principalmente bajos porcentajes de recuperación pueden ser ocasionados por una inadecuada preparación de la muestra, sistema de sustracción, interferencias o colaboraciones con la matriz (Lesnik et al. 2000).

**Tabla 7.** Exactitud de metodologías por HPLC, aplicadas a alimentos.

| Referencia                       | Alimento                                   | Detector                        | Analito  | N      | % recuperación                             |
|----------------------------------|--|---------------------------------|--|--------|--|
| Bicchi <i>et al.</i> (2001)      | Pulpa de manzana                           | UV                              | Daminozida                                     | 6      | 71-90                                      |
| Breithaupt, (2001)               | Jugos de frutas                            | diodos UV (284 nm)              | Ácido fólico                                   | 3      | jugo 97 néctar 79                          |
| Chandra <i>et al.</i> (2001)     | Jugos en polvo deshidratados               | Vis                             | Antocianinas                                   | 2      | 102  |
| Dreassi <i>et al.</i> (2001)     | Cárnicos                                   | UV                              | Levamisol                                      | 5      | 99 - 106                                   |
| Esteve <i>et al.</i> (2001)      | Hongos                                     | Fluorescencia                   | Tiamina (T)<br>Riboflavina (R)                 | 2      | (T) 91 (R) 96                              |
| Nyman y Kumpulainen, (2001)      | Cerezas, fresasy vinos                     | Diodos Vis                      | Antocianidinas                                 | 2 a 14 | 79 - 103<br>excepto malvidina 59-67        |
| Rose-Sallin <i>et al.</i> (2001) | Cereales instantáneos                      | Fluorescencia                   | Niacina  | 13     | 89- 110                                    |
| Zeppa <i>et al.</i> (2001)       | Quesos                                     | UV<br>Índice refracción         | Azúcares,<br>ácidos<br>diacetilo y<br>acetoína | 3      | >89 excepto lactosa y ácido orótico con 80 |
| Elmadfa, (2000)                  | Brócoli                                    | Fluorescencia                   | Vitamina K                                     | 8      | 97   |
| Izquierdo <i>et al.</i> (2000)   | Bebidas alcohólicas                        | Fluorescencia                   | Cumarinas                                      | 9      | 87-95                                      |
| Mattila <i>et al.</i> (2000)     | Cebollas, té, limón, naranja, brócoli, etc | Diodos UV-Vis<br>Electroquímico | Flavonoides (17)                               | NR     | 70 - 124                                   |
| Sotelo y Serrano,(2000)          | Papas                                      | UV-Vis<br>200 nm                | Solanina<br>Chaconina                          | 3      | 99   |
| Woollard <i>et al.</i> (2000)    | Leche y formulas infantiles                | Diodo UV                        | Ácido pantoténico                              | 4      | 98   |

N: Número de muestras., NR: no reporta.

Fuente: Líquida, Validación De Metodologías De Cromatografía. Postgrado Interfacultades En Ciencia y Tecnología de Alimentos.

En la tabla 7, se presentan trabajos en los cuales se han definido el porcentaje de recuperación de diferentes analitos en muestras de alimentos. El número de ensayos para evaluar este parámetro es bastante variable debido a que van a partir de 2 hasta 14 muestras, esto dependerá primordialmente del nivel de complejidad o trabajo para hacer este ensayo. La más grande parte no reporta un análisis sobre el porcentaje de recuperación a diversos niveles.

#### **1.3.6.5 Límites de detección y cuantificación.**

Al validar un método, es importante saber cuál es la cantidad mínima de analito que probablemente provoque una reacción en el instrumento. Los principales parámetros según Quattrocchi et al. (1992) con respecto a este concepto son:

Límite de detección (LD): representa la cantidad más pequeña de analito que puede producir una señal en el instrumento pero que no puede cuantificarse. En este caso, el cromatograma mostró una desviación del comportamiento de referencia, sin embargo el equipo no procede a su integración de una manera clara. Esta puede ser la concentración de la sustancia inyectada a veces integrada ya veces no. Con lo cual el equipo detecta una alteración pero no tiene la capacidad para dar una respuesta proporcional.

Límite de cuantificación (QL): corresponde a la cantidad más pequeña de un analito que produce una señal que puede cuantificarse con exactitud y precisión razonables en las condiciones de prueba.

LC y LD a menudo están relacionados en términos de sensibilidad, el último más relacionado con la variación en respuesta a los cambios en la concentración del analito, correspondiente a la pendiente de la curva de linealidad (Krull y Swartz, 1998).

LC y LD se evalúan principalmente para el análisis de impurezas, trazas, productos de degradación o cuando el nivel del analito está cerca del límite de detección. Sin embargo, vale la pena saber a qué nivel pueden responder los equipos y métodos.

La importancia de estos dos parámetros en la validación radica en que; es factible que al evaluar un analito no se detecte su presencia en un alimento.

Se emplean varias aproximaciones sencillas para LD y LC, las más utilizadas son:

1. Se recomiendan aproximadamente 20 inyecciones para estimar la relación señal/ruido (S/R) que se puede obtener del reactivo o del blanco. Un S/R 3 es generalmente estadísticamente aceptable para LD y para LC un S/R de 10. En ausencia de señal y línea de base recta, sin dudarlo, se puede obtener ruido de fondo para obtener LD y LC técnicos, también calculados a partir de 3 y 10 veces esta señal (IUPAC, 1997).

2. Se pueden realizar inyecciones múltiples de este estándar diluido. LD se considera el nivel cuando el grupo puede buscar un área de integración, pero no siempre (alrededor del 50-50%). Para LC se puede tener en cuenta la concentración inyectada, para LD se multiplica por un factor de 2-3, se inyecta y si se obtiene un pico pequeño pero estable en la región del tiempo de retención, este valor se puede tomar como LC. Krull y Swartz (1998) señalan que estos métodos no son muy confiables porque al realizar cromatogramas de analitos en soluciones muy diluidas, la integración superficial suele causar problemas, picos y picos mal registrados. En algunos casos, la línea de base no siempre es consistente y, a menudo, hay picos ocasionales en los que el analista puede ser responsable de decidir qué se debe y no se debe tener en cuenta. Estos autores señalan la posibilidad de utilizar un método alternativo sin herramientas, a saber, visual, como TLC o titulación para confirmar LD y LC. Los detectores UV-Vis, ya que pierden sensibilidad por la descarga de la lámpara durante su uso, la LD y LC determinada con ellos puede ser diferente, incluso se ha demostrado que dependiendo de la vivienda comercialmente puede haber hasta tres veces la diferencia en el cálculo de estos parámetros (CDER, 1994).

En HPLC, LD y LC suelen ser bajos y se pueden mejorar utilizando un volumen de inyección mayor o, si es posible, aumentando el volumen de células detectables. Krull y Swartz, (1998) y Lesnik et al. (2000) señalan que la LD y la LC pueden verse afectadas por el rendimiento de la matriz y la columna de la muestra,

por lo que las técnicas aplicables a una muestra en particular no deben extrapolarse a otra muestra o entre diferentes columnas.

**TABLA 8.** Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de metodologías por HPLC aplicadas a alimentos.

| Referencia                          | Alimento                                   | Detector                            | Analito  | LDppm<br>LC ppm                                | Determinación       |
|-------------------------------------|--|-------------------------------------|--|--|---------------------|
| Bicchi <i>et al.</i> (2001)         | Pulpa de manzana                           | UV                                  | Daminozida                                     | 0,100<br>0,150                                 | Dilución            |
| Breithaupt, (2001)                  | Jugos de frutas                            | Diodos UV                           | Ácido fólico                                   | 0,04<br>0,06                                   | Linealidad          |
| Esteve <i>et al.</i> (2001)         | Hongos                                     | Fluorescencia                       | Tiamina<br>Riboflavina                         | 0,0013<br>0,0086                               | Refiere a un método |
| Grande <i>et al.</i> (2001)         | Alimento para animales                     | Diodos UV                           | Sulfametazina<br>Trimetoprina                  | NR<br>0,3- 0,4                                 | Refiere a un método |
| Kim-Kang <i>et al.</i> (2001)       | Atún                                       | Fluorescencia                       | Emamectina                                     | 0,050<br>0,800                                 | Dilución            |
| Nyman y Kumpulainen, (2001)         | Cerezas, fresas y vinos                    | Diodos Vis                          | Antocianidinas                                 | 0,32-0,85<br>NR                                | S/R                 |
| Pripis-Nicolau <i>et al.</i> (2001) | Vinos y mostos                             | Fluorescencia                       | 22 amino ácidos (AA)                           | LD: 0,002 a 0,125<br>LC: 0,007 a 0,416 (*)     | S/R                 |
| Rose-Sallin <i>et al.</i> (2001)    | Cereales instantáneos                      | Fluorescencia                       | Niacina  | 0,1<br>1,0                                     | S/R                 |
| Zeppa <i>et al.</i> (2001)          | Quesos                                     | UV<br>Índice refracción             | Azúcares,<br>ácidos<br>diacetilo y<br>acetoína | 0,22-119,00<br>NR                              | S/R                 |
| Mattila <i>et al.</i> (2000)        | Cebollas, té, limón, naranja, brócoli, etc | Diodo UV-Vis<br>Electroquímico (EQ) | Flavonoides (17)                               | Diodos 0,08-0,25<br>NR<br>EQ 0,004-0,040<br>NR | S/R                 |
| Woollard <i>et al.</i> (2000)       | Leche y formulas infantiles                | Diodo UV                            | Ácido pantoténico                              | 3<br>NR  | Dilución            |

(\*) Los valores indicados corresponden a todos los amino ácidos excepto lisina y ornitina que registraron valores más altos de LD y LC de 2,1 y 7,1 ppm (lisina) y 1,9 y 6,3 ppm (ornitina).  
Determinación: Dilución: corresponde a diluciones de estándares o muestras., S/R: Método de Señal/Ruido., Linealidad: Mediante Gráficas y extrapolación., Refiere a un Método: Remite a una referencia y no explica el procedimiento., NR: No reporta.

Fuente: Líquida, Validación De Metodologías De Cromatografía. Postgrado Interfacultades En Ciencia y Tecnología de Alimentos.

La mayor parte de los trabajos se basan en la determinación de estos parámetros en el proceso de estimación del ruido de fondo y considera una relación S/R de 3 para LD y una relación S/R de 10 para LC. Obviamente, existe una gran variación en los resultados, principalmente debido a las características de absorción de luz UV-visible de cada compuesto, ya que la absorbancia puede variar en varios órdenes de magnitud según la sustancia. La sensibilidad del detector, la vida útil de la lámpara y el tipo de detector también tienen una gran influencia en estas actuaciones.

Según Quattrocchi et al. (1992), el método debe resistir algunos cambios posibles (pH, longitud de onda, porcentaje de fase móvil, etc.), pero no necesariamente todos, así por ejemplo una variación de pH en un buffer puede producir cambios drásticos en la separación. En este caso es posible evaluar el rango de pH donde la fase móvil no muestra una diferencia significativa en el análisis, lo que da mayor confianza en la variable pH.

#### **1.3.6.6 Robustez**

Aunque se seleccionen las mejores condiciones operacionales para un procedimiento analítico, es probable gracias a las diversas cambiantes relacionadas que se logren obtener resultados diversos entre laboratorios. Para evaluar estas variabilidades se proviene a establecer la robustez, la cual posibilita cuantificar el nivel de confiabilidad del procedimiento frente a cambios de variables usuales. Estas tienen la posibilidad de ser diferentes analistas, columnas, equipos, temperatura del controlador, flujo, pH, fases móviles etc (USP, 2002).

Según Quattrocchi et al. (1992) el procedimiento debería ser robusto en ciertos rangos de probables cambios (pH, longitud de onda, porcentaje de fase móvil etc), pero no precisamente debería serlo ante todos, de esta forma ejemplificando una alteración de pH en un buffer puede ocasionar cambios drásticos en la separación. En esta situación se puede evaluar el rango de pH, en el que la etapa móvil, no crea diferencias significativas en el resultado del estudio, con lo que se recibe una más grande confianza para la variable pH.

Fabre y Altria, (2001) señalan que en la evaluación de la robustez, se utilizan principalmente diseños factoriales, como los de Plackett y Burman, que permiten detectar los componentes críticos que tiene mayor peso o predominación sobre el procedimiento. Puede que se determine que ciertos componentes poseen cierta influencia, no obstante si esta es aceptable dentro del criterio de la metodología, se puede tener en cuenta el procedimiento como lo suficientemente robusto. Por otra parte, si cualquier componente tiene una influencia significativa, se puede ocupar para determinar mejor este impacto, la metodología de respuesta de área, de forma de pronosticar la alteración de la respuesta dentro del intervalo que se desee. En HPLC la decisión de la robustez principalmente involucra un enorme trabajo instrumental, se tienen que elegir las variables que se aspiran tener en cuenta, de forma de no crear un diseño experimental demasiado laborioso.

En la revisión bibliográfica no se observó que la robustez fuera realizada en los procesos de validación, el trabajo más completo es el realizado por Romero et al. (2002) y por lo tanto se procedieron a realizar un análisis y descripción del mismo, ya que este puede ser considerado como un guía para futuras experiencias. Estos autores señalan que la robustez de un método analítico puede ser realizada en las siguientes fases:

- 1.- Identificación de los factores a evaluar.
- 2.- Selección del nivel de los factores y número.
- 3.- Selección del diseño experimental
- 4.- Realización de los experimentos y medición de la respuesta del analito
- 5.- Cálculo del efecto de las variables
- 6.- Análisis e interpretación de resultados

El diseño experimental para robustez, se muestra en la tabla 9, incluye un estudio por triplicado del valor central y la ejecución en forma aleatoria de las experiencias. Como respuestas definieron altura y área del pico para feniletilamina, espermina y espermidina. En lo que es para tiramina, las respuestas fueron tiempo de retención y tiempo de retención ajustado, por otra lado para; histamina y cadaverina ha sido el componente de resolución entre los picos de las dos aminas.

Se puede observar como estos autores emplean diversas variables dependientes para establecer la robustez.

**Tabla 9.** Diseño experimental para la determinación de robustez.

| Experiencia | Gradiente | Temperatura | Factor  |        |    |          |    | %  | % |
|-------------|-----------|-------------|---------|--------|----|----------|----|----|---|
|             |           |             | columna | Buffer | pH | Longitud |    |    |   |
| 1           | +1        | +1          | +1      | +1     | +1 | +1       | +1 | +1 |   |
| 2           | +1        | +1          | -1      | -1     | -1 | -1       | -1 | -1 |   |
| 3           | +1        | -1          | +1      | +1     | -1 | -1       | -1 | -1 |   |
| 4           | +1        | -1          | -1      | -1     | -1 | +1       | +1 | +1 |   |
| 5           | -1        | +1          | -1      | -1     | -1 | +1       | +1 | -1 |   |
| 6           | -1        | +1          | +1      | +1     | -1 | -1       | -1 | +1 |   |
| 7           | -1        | -1          | -1      | -1     | +1 | +1       | -1 | +1 |   |
| 8           | -1        | -1          | +1      | +1     | +1 | +1       | +1 | -1 |   |
| 9           | 0         | 0           | 0       | 0      | 0  | 0        | 0  | 0  |   |
| 10          | 0         | 0           | 0       | 0      | 0  | 0        | 0  | 0  |   |
| 11          | 0         | 0           | 0       | 0      | 0  | 0        | 0  | 0  |   |

Fuente: Romero et al. (2002).

### 1.3.6.7 Fortaleza

La fortaleza establece que inconvenientes tienen la posibilidad de surgir en un procedimiento una vez que se cambian reactivos, columnas, artefactos o laboratorios, por consiguiente el proceso de validación se puede tener en cuenta en 2 niveles, en primera instancia se proviene a un análisis en un laboratorio, en caso de que el procedimiento cubra las expectativas que se esperan, se hace en segundo sitio a un trabajo de validación en otros laboratorios, de preferencia un mínimo de 3, de forma que se demuestre que cualquier analista o laboratorio, tiene la función de reproducir resultados confiables. En este paso el propósito primordial se basa en decidir si se obtienen los mismos resultados en un grado de confianza, utilizando operarios diversos e incluso insumos, conjuntos e instrumentales diferentes (Lesnik et al. 2000).

La aplicación de fortaleza podría ser elaborada, primordialmente por instituciones como la AOAC, Administración de Alimentos y Medicamentos y universidades que disponen de una red de laboratorios que tienen la posibilidad de prestar servicios de participación. Los procedimientos por HPLC integrados en la

AOAC (1997ab) fueron validados en su tiempo o durante su respectivo uso o además por medio de un análisis entre laboratorios, según directrices señaladas antes.

#### **1.3.6.8 Aseguramiento del sistema**

Un procedimiento podría ser validado por un laboratorio, no obstante como consecuencia de un mal diseño del proceso de validación, una vez que es transferido a otro laboratorio o un organismo que certifique su aplicabilidad tiene la posibilidad de surgir objeciones. Krull y Swartz, (2000) señalan las principales causas de errores encontrados por el FDA (Food Drug Administration), en la validación de métodos:

- No se sugiere la capacidad del sistema de HPLC en alusión a componente de cola o asimetría, platos teóricos, eficiencia de la columna, etc.
- Se observan picos de impurezas que no son identificados.
- No se especifica el proceso de dilución de las muestras.
- Las concentraciones de los buffers en la preparación de estándares y muestras son cambiadas y no se aclara el motivo.
- Inadecuada preparación previa del estándar (por ejemplo mal secado).
- Separaciones incompletas del pico de interés de otros picos.
- Límites de detección y cuantificación mal determinados.
- Fallas en la metodología de sustracción que originan presencia de turbidez, división de etapas en el extracto final.
- Fallas del proceso de limpieza de la muestra.
- Empleo de pocas muestras para la determinación de desviación estándar relativa.
- Inestabilidad de las muestras en funcionalidad del tiempo, en especial en grupos automáticos.
- Baja recuperación del analito.
- Falta de explicación en la preparación de las muestras, estándares, etc.

Cada vez que se va a utilizar un equipo para una decisión, se debería tener certeza de que esté en óptimas condiciones. Para este fin se debería llevar a cabo

un programa de verificación del funcionamiento del equipo, que puede consistir en la inyección de una sustancia, para evaluar su contestación a fronteras como: área del pico, tiempo de retención, platos teóricos de la columna, simetría del pico etc.

Dichos resultados son determinados periódicamente y registrados en gráficas de control, en las cuales se establecen parámetros, una vez que dichos son excedidos se toman las respectivas actividades correctivas, como cambio de columna, lámpara etcétera. Todos dichos procesos tienen que permanecer registrados y almacenados (FDA, 1987; Krull y Swartz, 1999).

### **1.3.7 Aplicaciones**

Antecedentes:

Entre las aplicaciones de esta técnica, la más importante es la diversidad de sus aplicaciones tanto a compuestos orgánicos como inorgánicos.

#### **1.3.7.1 Aplicaciones del método de HPLC en la detección por contaminantes**

El estudio de Francia Reyes, A (2021), evaluó la determinación de concentraciones de ocratoxina A (OTA) en cuatro muestras de paprika seca a granel procedente del mercado mayorista de Lima-Perú. La OTA se extrajo con metanol: bicarbonato de sodio al 3%, se purificó en una columna de inmunoafinidad y luego se cuantificó por cromatografía líquida de alto resolución (HPLC). El autor concluye que todas las muestras analizadas contenían OTA y que el 25% de las muestras excedieron el límite máximo aceptable de especificación de OTA según el Codex Alimentarius.

Según Milla Flores, F.; Castro Luna, A. (2020), evaluaron el nivel contaminante de la ocratoxina A (OTA) en *Coffea arabica* L. "café", de tipo tostado, la recolección de muestras de café tostado se realizó en la zona cafetalera de Chanchamayo, departamento de Junín-Perú, purificado mediante columnas de inmunoafinidad y cuantificado por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El estudio remarca la importancia de la trazabilidad en un producto de consumo frecuente a nivel nacional e internacional con la finalidad de garantizar su inocuidad.

Flores Santos, J.; Córdova Morales, I (2018) determinaron niveles de acrilamina en productos más distribuidos como hojuelas de papas fritas comercializadas en Lima Metropolitana en el año 2018 y los comparó con valores de referencia, como lo establecido por la Unión Europea (750 µg/kg), para sugerir estrategias de reducción de acrilamida. Los autores evaluaron 16 marcas de hojuelas de papas fritas provenientes de 9 fabricantes la cual fueron analizadas por cromatografía HPLC con columna HILIC, usando el método QUECHERS para extracción y purificación con una tasa de recuperación de 77,9%. Los resultados fueron que, de 12 de las 16 marcas, mostraron niveles promedio de acrilamida entre 868 y 2591 µg/kg; 2 de los 9 productores (fabricante de marcas M3, M6, M11 y M12) presentaron los niveles más bajos de acrilamida, con un promedio de 386 y 540 µg/kg. Las muestras M1 y M8, con una distribución y una ingesta más probable, mostraron niveles de acrilamida >1033 µg/kg. El estudio encontró un contenido promedio de acrilamida de 1234,18 µg/kg y que el 75 % de las marcas de hojuela de papas fritas comercializadas superó los valores de referencia de 750 µg/kg.

#### **1.3.7.2 Aplicaciones del método de HPLC en la detección de aminoácidos y antioxidantes**

Ccaccya Ana (2020), determinó compuestos bioactivos y actividad antioxidante del maíz morado *Zea Mays L.* procedente de tres regiones del Perú. Los resultados obtenidos por HPLC para la cuantificación de la cianidina-3-glucósido mostraron que los perfiles cromatográficos del extracto acuoso e hidroalcohólico de las tres muestras son parecidos, variando sólo en la proporción de cada antocianina. El autor concluyó los resultados comparando con los estudios de Pedreschi y Cisneros (2007), la cianidina-3-glucósido representa el principal tipo de antocianina presente en el extracto comercial de maíz morado obtenido de Lima, seguido por la cianidina-3-glucósido acilada. El autor comparó con Cuevas et al., (2008) en la que investigó sobre la caracterización de las antocianinas en granos de diferentes variedades de maíz boliviano, donde identificaron a la cianidina-3-glucósido y cianidina-3- (6"- malonilglucósido) como las mayoritarias, lo que concordaría con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Jimenez D.; Llerena T.; Salvá B. (2019), determinaron aminoácidos de la proteína previamente oxidada, incluida tirosina en una conserva de carne de trucha

arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) mecánicamente recuperada, mediante el método HPLC. El análisis reveló 9 aminoácidos esenciales, entre ellos: lisina>leucina>valina>treonina>fenilalanina>isoleucina>metionina>histidina>triptófano en orden decreciente de abundancia. Por lo que concluyeron que el producto elaborado es una buena fuente de nutrientes en proteínas.

### **1.3.7.3 Aplicaciones del método de HPLC en la detección de aditivos**

Mena Roberto (2019), determinó colorantes alimentarios sintéticos en alimentos mediante el método de HPLC/MS de tiempo de vuelo mediante ionización por electrospray. La investigación se centró en aquellos cuyo uso es controvertido o están prohibidos, como son Amarillo de quinoleína (monosulfónico y disulfónico), Amarillo Anaranjado, Tartracina, Carmoisina, Ácido Carmínico, Rojo Allura AC, Azul Brillante FCF y Sudán (I-IV). Dependiendo del estado de agregación de la muestra emplearon diferentes tratamientos de muestra incluyendo desgasificado, disolución y extracción en fase sólida, esta última como etapa de purificación.

El método incluyó un total de 12 colorantes sintéticos y fue aplicado a un total de 20 muestras incluyendo golosinas líquidas y semisólidas, bebidas gaseosas y gelatinas.

### **1.3.7.4 Aplicaciones del método de HPLC en conservas de pescado**

Chele Mera, B.; Tomalá Tomalá, A. (2018), evaluaron niveles de concentración de histamina en productos pesqueros comercializados en los mercados de Guayaquil, en la cual realizaron un muestreo aleatorio representativo en 2 mercados. La concentración de histamina se definió mediante cromatografía líquida con detección ultravioleta. De las 72 muestras analizadas; 9 de ellas, provenientes de 2 especies, superaron el límite máximo permitido según el Código Alimentarius (100 mg/Kg) y según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (200 mg/Kg) con un valor promedio de 217 ppm.

### **1.3.7.5 Aplicaciones del método de HPLC en verduras**

García Galarza., (2018), determinó el análisis de la relación existente entre la presencia de residuos de plaguicidas en hortalizas cultivadas en la parroquia San Joaquín, con la inactividad de la vitamina A, mediante análisis HPLC de la concentración de provitamina A.

Fernández I., García Eva María., Fuentes Ana., (2014), llevó a cabo la determinación de nitrato y nitrito en lechuga por HPLC, estableciendo condiciones cromatográficas para la identificación y cuantificación de los citados analitos.

### **1.3.7.6 Aplicaciones del método de HPLC en validación de métodos en diferentes productos**

Ruiz Hidalgo J. (2021), realizaron avances analíticos para la mejora de la información sobre seguridad en aceites vegetales y otros productos alimentarios vegetales de alto contenido graso. Se basó fundamentalmente para optimizar condiciones de extracción, cromatográficas y espectrométricas para la determinación de diferentes contaminantes y residuos en aceites vegetales y matrices relacionadas. Estos fueron validados para verificar su robustez, sensibilidad y fiabilidad. En la cual, se aplicaron a un amplio número de muestras aceites, frutos secos y alimentos procesados para comprobar su aplicabilidad y aportar información relevante sobre la presencia de estos compuestos en las muestras analizadas.

Guerra Huamán, K.; Rodríguez Ríos, Y. (2020), realizaron validación de un método analítico para cuantificar curcuminoides en palillo comercial por HPLC. En este estudio determinaron el LD que como resultado para bisdetoxicurcumina fue 1,032, detoxicurcumina 1,034 y curcumina 1,017  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lo que indica que el analito puede ser detectado y el LC en el mismo orden de curcuminoides resultó 1,109; 1,114 y 1,057  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; demostrando que a esa concentración el analito puede ser valorado, el porcentaje de recuperación fue entre 98 - 102 % y el Test de recuperación media para  $p = 0,05$ ; y  $n - 1$  grados de libertad dio un t experimental que indica que no existe diferencia significativa entre el porcentaje de recuperación hallado y el teórico; afirmando que el método analítico propuesto es exacto. Para la precisión se demostró que hay repetibilidad y precisión intermedia en su mayoría de las mediciones excepto para la bisdetoxicurcumina que el  $\text{RSD} \leq 2,0$  bajo las

condiciones experimentales establecidas. En conclusión, los resultados del HPLC demostraron la validación del procedimiento analítico planteado por su linealidad, exactitud y precisión.

Paredes Escobar, M. (2017), se realizó la validación de un procedimiento para la decisión de vitamina C en alimentos por cromatografía líquida de alta resolución - HPLC encontrando un límite de repetibilidad y reproducibilidad con valores de 2,16 mg/100g y 2,61 mg/100g de ácido ascórbico respectivamente.

Alcantara Durán J. (2015), investigó un procedimiento por HPLC-MS para la decisión de 6 vitaminas hidrosolubles del conjunto B, en cuatro suplementos alimenticios diferentes, a modo de zumos de frutas y grageas; estas son: B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (nicotinamida), B5 (ácido pantoténico), B6 (piridoxina) y B7 (biotina).

Fuentes et al. (2015), establecieron parámetros para identificar y cuantificar simultáneamente los dos aditivos más comunes que inhiben el crecimiento microbiano en los alimentos mediante HPLC utilizando sorbato de potasio y benzoato de sodio.

En el estudio de López Montoya J. (2012), analizó muestras de harina de trigo, masa panaria y un producto realizado en los que fueron cuantificados en vitaminas B1, B2, B3 y medición de grado ácido fólico por medio de cromatografía líquida de alta presión.

Correa N., Mosquera M. (2012), analizaron muestras comerciales de jugos, mermelada, galletas, pan y mayonesa por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) por el procedimiento del estándar externo, en las cuales se concluyeron concentraciones de los ácidos ascórbico y cítrico entre 0,0100-0,395g/L y 0,1000-3,098g/L, respectivamente. Además, se evaluaron los antioxidantes butil- hidroxitolueno (BHT) y vitamina E muestras de leche, aceite, margarina, galletas y tostadas, en las cuales se encontraron en una concentración entre 0,0180-0,0778g/L y 0,00820-0,0125g/L.

## **CAPÍTULO II: CONCLUSIONES**

La técnica de análisis por HPLC que, está en constante evolución en tecnología de la instrumentación y en el campo de los alimentos es una de las ramas con más grande aplicación en un futuro; la cual nos posibilita el correcto desarrollo de una división y análisis.

La aplicación en la producción y control de calidad de los alimentos posibilita examinar una amplia gama de analitos con enorme precisión y exactitud, informan sobre los diferentes tipos de nutrientes saludables, contaminantes que pueden contener dichos productos o alimentos, asimismo, velar la seguridad alimentaria de los consumidores.

### **CAPÍTULO III: RECOMENDACIONES**

Se debe utilizar las metodologías en las cuales se emplea HPLC propuestas en la AOAC, ya que fueron validadas. Al aplicarse por primera vez, es aconsejable hacer por lo menos una mínima revalidación.

De acuerdo a los estudios de la revisión bibliográfica se deben tomar medidas, tener mayor fiscalización continuo y estandarizar condiciones de fabricación de dichos productos.

## **CAPÍTULO IV: FUENTES DE INFORMACIÓN**

ALCÁNTARA-DURÁN, Jaime. Optimización de un método para la determinación de una mezcla de compuestos orgánicos en suplementos alimenticios mediante HPLC. 2016.

BAUNSGAARD, Dorrit; NORGAARD, Lars; GODSHALL, María An. Fluorescencia de azúcares de caña crudos evaluados por quimiometría. Revista de Química Agrícola y Alimentaria, 2000, vol. 48, nº 10, pág. 4955-4962.

BROWN, Phyllis R.; WESTON, Andrea. HPLC and CE: Principles and Practice. Academic Press, 1997.

CARLSSON, Nils-Gunnar, et al. Rapid analysis of inositol phosphates. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, vol. 49, no 4, p. 1695-1701.

CASTILLA-FERNÁNDEZ, Delia. Determinación de antibióticos y otros productos veterinarios en productos lácteos de marca blanca. 2018.

CCACCYA CCACCYA, Ana María. Compuestos bioactivos y actividad antioxidante del maíz morado Zea Mays L. procedente de tres regiones del Perú. 2020.

CDER. Validation of chromatographic methods. Reviewer Guidance. Committee of the Chemistry Manufacturing Controls Coordinating Committee (CMCCC). Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 1994, pp. 33.

CHANDRA, Amitabh; RANA, Jatinder; LI, Yingqin. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC- MS. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, vol. 49, no 8, p. 3515-3521.

CHELE MERA, Bryan Xavier; TOMALÁ TOMALÁ, Anabel Narcisa. Evaluación de histamina y metales pesados en productos pesqueros comercializados en los mercados de Guayaquil. 2018. Tesis

de Licenciatura. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas.

CORDOVA MORALES, Ivan Andrés; FLORES SANTOS, Juan Carlos. Niveles de acrilamida en hojuelas de papas fritas comercializadas en Lima Metropolitana en el año 2018 y valores de referencia. 2022.

CORREA, N., et al. Cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CIAE) de ácidos orgánicos, antioxidantes y azúcares en alimentos. Revista Tumbaga, 2012, vol. 7, p. 115-129.

DONG, Michael. The essence of modern HPLC: advantages, limitations, fundamentals, and opportunities. 2013.

EL LABORATORIO, MANUAL DE PRÁCTICAS PARA; DE QUÍMICA ORGÁNICA, I. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ESCOBAR, Mayra Liliana, et al. Alimentos Ciencia e Ingeniería. 2017. Vol. 25 (2).

FABRE, H.; ALTRIA, K. D. Validating CE methods for pharmaceutical analysis. LC GC EUROPE, 2001, vol. 14, no 5, p. 302-310.

FALLON, A.; BOOTH, R. F. G.; BELL, L. D. Applications of HPLC in Biochemistry. Elsevier, 1987.

FDA. 1987. Guideline on general principles of process validation. Food Drug Administration.

FERNÁNDEZ SEGOVIA, Isabel; GARCÍA MARTÍNEZ, Eva María; FUENTES LÓPEZ, Ana. Determinación de nitratos y nitritos en lechuga por HPLC. 2014.

FRANCIA REYES, Abel Junior. Evaluación Ocratoxina A (OTA) por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) en Capsicum annum L. "Páprika" procedente del mercado mayorista de Lima-Perú. 2021.

FUENTES LÓPEZ, Ana; GARCÍA MARTÍNEZ, Eva María; FERNÁNDEZ SEGOVIA, Isabel. Determinación de sorbato potásico y benzoato sódico en alimentos por HPLC. 2015.

- GARCÍA GALARZA, Mayra Jimena. Análisis de la relación existente entre la presencia de residuos de plaguicidas en hortalizas cultivadas en la parroquia San Joaquín, con la inactividad de la vitamina A, mediante análisis HPLC de la concentración de provitamina A. 2018. Tesis de Licenciatura.
- GIRI, Dhurba. High performance liquid chromatography (HPLC): principle, types, instrumentation and applications. Biochemistry, 2015.
- GUERRA HUAMAN, Kenyi Irineo; RODRIGUEZ RIOS, Yelthsin. Validación del método analítico para cuantificar curcuminoides en palillo comercial por cromatografía líquida de alta performance. SUNEDU.
- JIMENEZ, Diana; LLERENA, Tito; SALVÁ, Bettit. Elaboración de una conserva a partir de carne mecánicamente recuperada de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y su caracterización fisicoquímica y sensorial. Agroindustrial Science, 2019, vol. 9, no 1, p. 93-98.
- LESNIK, B., KRULL, I., y SWARTZ, M. Method validation issues for the resource conservation and recovery act program. 2000
- LÍQUIDA, VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS DE CROMATOGRFÍA. POSTGRADO INTERFACULTADES EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.
- LÓPEZ, Jairo Montoya. Determinación del efecto del procesamiento de panificación de la harina de trigo en la concentración de vitaminas y minerales. Revista Sinapsis, 2012, vol. 4, no 1, p. 135-141.
- MATISSEK, R.; WITTKOWSKI, R. HPLC in food control and research. Technomic Pbs. Basel, 1990.
- MCCLUSKEY, Sinead; DEVERY, Rosaleen. Validation of chromatographic analysis of cholesterol oxides in dried foods. Trends in Food Science & Technology, 1993, vol. 4, no 6, p. 175-178.
- MENA ARANDA, Roberto. Determinación de colorantes alimentarios sintéticos en alimentos mediante HPLC/MS. 2019.
- MILLA FLORES, Félix Hugo; CASTRO LUNA, Américo. Evaluación del nivel contaminante de ocratoxina a (ota) mediante columnas de

inmunoafinidad y cromatografía líquida de alta eficiencia en Coffea arabica I. "Café". Revista de la Sociedad Química del Perú, 2020, vol. 86, no 2, p. 164-174.

MONTGOMERY, D. Diseño y análisis de experimentos. 2 Ed. Editorial Limusa, México. pp. 681. 2002

OZORES, M. Cromatografía de líquidos HPLC. Laboratorios de técnicas instrumentales UVA.

PAREDES ESCOBAR, Mayra Liliana, et al. Alimentos Ciencia e Ingeniería. 2017, vol. 25 (2).

PÁSSARO CARVALHO, Catarina Pedro, et al. Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones. 2016.

POMERANZ, Y., MELOAN, C. High Performance Liquid Chromatography and Ion Chromatography. In "Food Analysis. Theory and Practice". 3 Ed. Chapman & Hall, International Thomson Publishing. pp. 325-351. 1994

QUATTROCCHI, Oscar Alberto; DE ANDRIZZI, Sara Inés Abelaira; LABA, Raúl Felipe. Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro, 1992.

RESTREPO OSORIO, Jaime. Validación de un método cromatográfico para evaluar la calidad proteica de alimentos y su impacto en los niveles plasmáticos. Revista de Ciencias, 2019, vol. 23, no 1, p. 43-62.

RUIZ HIDALGO, José. Avances analíticos para la mejora de la información sobre seguridad de aceites vegetales y otros productos alimentarios vegetales de alto contenido graso. Tesis Doctoral. Universidad de Almería. 2021

ROMERO, R., GÁZQUEZ, D., SÁNCHEZ-VIÑAS, M., CUADROS-RODRÍGUEZ, L., y BAGUR, M. A geometric approach to robustness testing in analytical HPLC. LCGC North America. 20 (1): 72-80. 2002

TRANSFIGURACIÓN, J., BERNIER, A., ARCAND, N., CHAHAL, P., and KAMEN, A. Validation of a high-performance liquid chromatographic assay for the quantification of adenovirus type 5 particles. J. Chromatogr B. 761: 187-194. 2001

- SANABRIA, Neida; MARTÍNEZ, Yudrany; LÓPEZ, Alexandra. Métodos para la determinación de aflatoxinas en alimentos. Revista Agrollania de Ciencia y Tecnología, 2017, vol. 14, p. 51-58.
- SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W. INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY. 2010.
- SMITH, J. 1998. Evaluation of analytical data. Chapter 4. In "Food Analysis" 2 Ed. Aspen Publication, Maryland, EUA. Edt. Suzanne Nielsen. p. 55-69.
- SNYDER, L. R. Changing reversed-phase high performance liquid chromatography selectivity Which variables should be tried first. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1997, vol. 689, no 1, p. 105-115.
- SUAREZ OSPINA, Daniela; MORALES HERNÁNDEZ, Yovanny. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. 2018.
- SWARTZ, Michael; KRULL, Ira. Validation of Bioanalytical Methods—Highlights of FDA's Guidance. LCGC North America, 2003, vol. 21, no 2, p. 136.
- USP. Validation of chromatographic procedures. United States Pharmacopeia. NF. Vol. III. The National Formulary. Edt. Webcom Limited. Toronto, Canada. pp. 2256-2259. 2002
- ZEPPA, Giuseppe; CONTERNO, Lorenza; GERBI, Vincenzo. Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. Journal of agricultural and food chemistry, 2001, vol. 49, no 6, p. 2722-2726.
- WANG, Huafu; HELLIWELL, Keith; YOU, Xiaoqing. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC. Food Chemistry, 2000, vol. 68, no 1, p. 115-121.
- WATERS. Validation procedures. 2002