



UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA

**“VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, PORCENTAJE DE
CENIZAS TOTALES Y CUANTIFICACIÓN DE ASPARTAME POR
CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) EN BEBIDAS
DESHIDRATADAS”.**

Trabajo de Titulación para optar al
Título de TÉCNICO
UNIVERSITARIO EN QUÍMICA
MENCIÓN QUÍMICA
ANALÍTICA

Alumno
Michelle Oyarzo Tapia

Profesor Guía
Jaime Carmi Karmy

Profesor correferente
Miguel Zazopulos

RESUMEN

Los análisis de alimentos son procedimientos necesarios para garantizar la calidad de los productos, y a su vez prevenir problemas de salud en los consumidores. Uno de los análisis recurrentes es la determinación del contenido de cenizas, el cual se utiliza como un indicador de calidad en algunos alimentos, permitiendo obtener la pureza de algunos ingredientes que se utilizan en la elaboración de los productos.

En el año 2021, el Reglamento Sanitario de Alimentos publica una nueva actualización, donde estipula que las bebidas deshidratadas o refrescos en polvo deberán contener como máximo un 2% de cenizas totales en su composición. Por esta razón surge la necesidad de validar esta metodología, para así demostrar el cumplimiento de la legislación nacional vigente, utilizando como producto principal bebidas deshidratadas en polvo marca Zuko Nacional de la empresa TRESMONTES LUCCHETTI S.A. En el estudio se analizaron como referencia 5 sabores de la marca realizando pruebas de Repetibilidad y Reproducibilidad.

Por otra parte, se realizó una validación retrospectiva a la metodología de separación y cuantificación de edulcorante Aspartame mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en fase reversa, utilizando una columna RP-18 y detección UV/Vis para el mismo producto en estudio, al cual se le realizaron pruebas de linealidad, límites (detección y cuantificación, además pruebas de precisión, exactitud y robustez. Se toma como referencia un método transferido no normalizado de un proveedor utilizado actualmente por la empresa.

A partir de los resultados obtenidos se logró determinar que las concentraciones de analito en la muestra, cumplía con la declarada en el etiquetado, cumpliendo así mismo con lo señalado en los parámetros establecidos con el reglamento Sanitario de los alimentos.

Keywords: Refrescos en polvo, HPLC, Aspartame, validación de métodos analíticos, RSA.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

OBJETIVOS 3

 OBJETIVO GENERAL 3

 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....3

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES GENERALES 4

 1.1 BEBIDAS DESHIDRATADAS O REFRESCOS EN POLVO 5

 1.1.1 Caracterización de bebidas deshidratadas en polvo.....5

 1.1.2 Requisitos para refrescos en polvo 5

 1.1.2.1 Norma Chilena Nch 2729 5

 1.1.2.2 Clasificación 6

 1.1.2.3 Requisitos de Materias Primas y Aditivos 6

 1.1.2.4 Materias Primas Opcionales.....6

 1.1.2.5 Requisitos del Producto 7

 1.1.2.6 Requisitos Organolépticos 7

 1.1.2.7 Otros Requisitos 7

 1.1.2.8 Requisitos físicos y químicos.....7

 1.1.2.9 Envases y Rotulación 8

 1.2 PRINCIPALES MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN
DE BEBIDAS DESHIDRATADAS O REFRESCOS EN POLVO AUTORIZADOS
POR LA LEGISLACIÓN VIGENTE.....8

 1.2.1 Azúcar 8

 1.2.2 Edulcorantes 8

 1.2.3 Saborizantes/Aromatizantes 10

 1.2.4 Colorantes 11

 1.2.5 Reguladores de Acidez.....12

 1.2.6 Enturbiantes.....13

 1.2.7 Sustancias Espesantes 14

 1.2.8 Sustancias Secuestrantes y Sinergistas de Antioxidantes 14

 1.2.9 Vitaminas 15

1.3 DEFINICIÓN DE LA LEGISLACIÓN VIGENTE EN CHILE PARA BEBIDAS DESHIDRATADAS EN POLVO.....	16
1.4 REFRESCO EN POLVO ZUKO NACIONAL	16
1.4.1 Ingredientes principales de Zuko Nacional.....	16
1.5 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE CENIZAS TOTALES	18
1.5.1 Fundamento teórico.....	18
1.5.2 Porcentaje de Cenizas Totales en Bebidas Deshidratadas permitido en Chile	19
1.6 ASPARTAME	20
1.6.1 Generalidades del Aspartame.....	20
1.6.2 Características del Aspartame	20
1.6.3 Estructura Química.....	20
1.6.4 Bioquímica del Aspartame	21
1.6.5 Degradación enzimática del Aspartame en el Organismo	21
1.6.6 Ingesta admisible de Aspartame en Chile	22
1.6.7 Antecedentes de Zuko Nacional Naranja	23
1.7 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC.....	25
1.7.1 Clasificación de la Cromatografía Líquida	25
1.8 INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA EN LA VALIDACIÓN	38
1.8.1 Fase móvil	38
1.8.2 Horno para columna.....	38
1.8.3 Columna fase reversa	38
1.8.4 Detector	39
CAPÍTULO 2: VALIDACIÓN.....	40
2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	41
2.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS.....	41
2.1.1 Linealidad.....	41
2.1.2 Límite de cuantificación.....	46
2.1.3 Precisión.....	46
2.1.3.1 Repetibilidad	47
2.1.3.2 Reproducibilidad	47
2.1.4 Exactitud	47
2.1.4.1 Veracidad	47
2.1.4.2 Recuperación.....	48

2.1.5 Robustez.....	49
2.1.6 Incertidumbre	51
2.2 VALIDACIÓN PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES.....	53
2.2.1 Precisión.....	53
2.3 VALIDACIÓN DE CUANTIFICACIÓN DE ASPARTAME VÍA HPLC	54
2.3.1 Linealidad.....	54
2.3.2 Límites (criterio de aceptabilidad)	54
2.3.3 Precisión.....	55
2.3.4 Veracidad	56
2.3.5 Robustez.....	57
2.3.6 Incertidumbre	58
CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL	63
3 .1 DETERMINACIÓN CENIZAS TOTALES.....	64
3.1.1 Procedimiento para la determinación de Cenizas totales.....	64
3.1.2 Preparación de crisoles.....	64
3.1.3 Tratamiento de la muestra.....	65
3.1.4 Procedimiento	65
3.1.5 Expresión de resultados.....	66
3.2 DETERMINACIÓN DE ASPARTAME VÍA HPLC	67
3.2.1 Principio del método	67
3.2.2 Equipo	67
3.2.4 Reactivos	68
3.2.5 Preparación de soluciones	68
3.3 PROCEDIMIENTO	70
3.3.1 Condiciones cromatográficas	70
3.3.2 Curva de calibración	70
3.3.3 Análisis de Muestras	70
4.1 VALIDACION DE % CENIZAS TOTALES	72
4.1.1 Prueba de Repetibilidad	72
4.1.2 Prueba de Reproducibilidad	74
4.2 VALIDACIÓN DE ASPARTAME VÍA HPLC.....	77
4.2.1 Resultados linealidad	78
4.2.2 Límites	79

4.2.3 Repetibilidad 80

4.2.4 Resultados pruebas de Reproducibilidad 80

4.2.5 Resultados pruebas de Sesgo 81

4.2.6 Resultados pruebas de Recuperación 82

4.2.7 Resultados pruebas de Robustez 82

4.2.8 Incertidumbre 84

DISCUSIÓN 89

CONCLUSIONES 91

ANEXOS 94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Zuko Nacional Naranja formato 35g/L con un contenido de Aspartame de 849-990 mg/100g.	23
Figura 1-2: Válvula de inyección de HPLC	27
Figura 1-3: Columna utilizada en la validación de Aspartame LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 125-4.	28
Figura 1-4: Clasificación de tipos de columnas de acuerdo con su capacidad de carga (µg) y diámetro interno (nm).	28
Figura 1-5: Propiedades de algunos rellenos comerciales basados en sílice.	29
Figura 1-6: Comparación de tamaño de relleno de una columna de HPLC.....	30
Figura 1-7: Características de hidrofobicidad entre fase estacionaria y el soluto.....	31
Figura 1-8: Anchura al 50% de la altura.	35
Figura 1-9: Anchura por tangentes.....	35
Figura 1-10: Resolución entre picos.	36
Figura 1-11: Anchura al 5% de la altura	37
Figura 1-12: Superficie columna fase reversa RP18.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Edulcorantes no nutritivos permitidos y su ingesta diaria admisible	9
Tabla 2-2: Prueba de Robustez de Younden y Steiner	50
Tabla 2-3 Criterios de Validación de Aspartame en la prueba de Robustez.	58
Tabla 3-4: Condiciones cromatográficas empleadas en la Validación de Aspartame.	70
Tabla 4-5: Resultados de % Cenizas totales Zuko Nacional Naranja 20g/L.	72
Tabla 4-6: Resultados de % Cenizas totales Zuko Nacional Melón 20g/L.	72
Tabla 4-7: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Durazno 20g/L.	72
Tabla 4-8: Resultados Prueba de Repetibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Piña 20g/L.	73
Tabla 4-9: Resultados Prueba de Repetibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Manzana 20g/L.	73
Tabla 4-10: Resultados de % Cenizas totales; Prueba de Repetibilidad de Zuko Nacional 20g/L.	73
Tabla 4-11: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Naranja 20g/L.	74
Tabla 4-12 Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Melón 20g/L.	74
Tabla 4-13: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Durazno 20g/L.	75
Tabla 4-14: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Piña 20g/L.	75
Tabla 4-15: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Manzana 20g/L.	76
Tabla 4-16: Resultados Prueba de Reproducibilidad de Zuko Nacional 20g/L.	76
Tabla 4-17: Resultados curva de calibrado del estudio de Linealidad de Aspartame.	78
Tabla 4-18: Resultados de los parámetros que se obtienen de la curva de calibrado del estudio de LD y LC.	78
Tabla 4-19: Límites de confianza que se obtienen con la recta de regresión en el estudio de linealidad.	78
Tabla 4-20: Resultados curva de calibrado estudio de Linealidad de Aspartame.	79
Tabla 4-21: Resultados de prueba de Límites detección y cuantificación obtenidos en la determinación de Aspartame	79
Tabla 4-22: Resultados de Precisión obtenidos en la determinación de Aspartame.	80
Tabla 4-23: Resultados de precisión obtenidos de la Reproducibilidad para la determinación de Aspartame.	80
Tabla 4-24: Resultados de la Veracidad expresado en el Sesgo obtenido en la determinación de Aspartame.	81

Tabla 4-25: Resultados del % de recuperación obtenidos en la determinación de Aspartame.	82
Tabla 4-26: Parámetros del Estudio de la Robustez obtenidos en la determinación de Aspartame.	82
Tabla 4-27: Resultados experimentales del estudio de la robustez.	83
Tabla 4-28: Resumen de la influencia de cada factor y su intervalo de confianza en el Estudio de la robustez.	83
Tabla 4-29: Resultados de la determinación de influencia en cada factor en el Estudio de la Robustez.	83
Tabla 4-30: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 5ml.	84
Tabla 4-31: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 10ml.	84
Tabla 4-32: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 25ml.	85
Tabla 4-33: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 50ml.	85
Tabla 4-34: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 250ml	86
Tabla 4-35: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 500ml.	86
Tabla 4-36: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 1000 ml.	87
Tabla 4-37: Límite del coeficiente de variación para análisis de impurezas en función de la concentración de analito (AOAC).	87
Tabla 4-38: Valores orientativos aceptables de recuperación según la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos), en función de la concentración del analito.	88

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo B-1 Certificado de análisis del hidrogeno fosfato de potasio.....	94
Anexo B-2 Certificado de análisis del Ácido Ortofosfórico	95
Anexo B-3 Certificado de análisis del Estándar de Aspartame	97
Anexo C Curva de calibración	98
Anexo D-1 Prueba de linealidad 1 de 3	99
Anexo D-2 Prueba de Linealidad 2 de 3	100
Anexo D-3 Prueba de Linealidad 3 de 3	101
Anexo E-1 Cromatograma ejemplo estándar 3,431 ppm repetición 1 de 10; Curva de calibrado estudio Límite de Cuantificación; Área 578849; Tr 12,053 min.	101
Anexo E-2 Cromatograma ejemplo estándar 3,484 ppm repetición 5 de 10; Curva de calibrado estudio Límite de Cuantificación; Área 586991; Tr 12,073 min.	101
Anexo E-3 Cromatograma ejemplo estándar 3,5 ppm repetición 10 de 10; Curva de calibrado estudio Límite de Cuantificación; Área 588209; Tr 12,067 min.	102
Anexo F-1 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja de 1967,624 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 6; Curva de calibrado estudio de Repetibilidad; Área 4976858; Tr 12,140 min.....	102
Anexo F-2 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja de 1997,295 mg/100g Aspartame; Repetición 3 de 6; Curva de calibrado estudio de Repetibilidad; Área 5051215; Tr 12,133 min.....	103
Anexo F-3 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja de 1997,340 mg/100g Aspartame; Repetición 6 de 6; Curva de calibrado estudio de Repetibilidad; Área 5051326; Tr 12,093 min.....	103
Anexo G-1 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja-1 de 1949,062 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 3; Curva de calibrado estudio de Reproducibilidad; Área 4944144; Tr 11,907 min.....	104
Anexo G-2 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja-2 de 1978,788 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 3; Curva de calibrado estudio de Reproducibilidad; Área 4992299; Tr 11,867 min.....	104
Anexo G-3 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja-3 de 2026,146 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 3; Curva de calibrado estudio de Reproducibilidad; Área 5123012; Tr 11,927 min.....	105
Anexo G-4 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja-4 de 2028,909 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 3; Curva de calibrado estudio de Reproducibilidad; Área 5158164; Tr 11,953 min.....	106
Anexo H-1 Cromatograma ejemplo estándar 18,335 ppm repetición 1 de 10; Curva de calibrado estudio Sesgo; Área 2893084; Tr 11,947 min.....	107

Anexo H-2 Cromatograma ejemplo estándar 18,399 ppm repetición 5 de 10; Curva de calibrado estudio Sesgo; Área 2903023; Tr 11,893 min.....	107
Anexo H-3 Cromatograma ejemplo estándar 18,481 ppm; Repetición 10 de 10; Curva de calibrado estudio Sesgo; Área 2915784; Tr 11,913 min.....	108
Anexo I-1 Cromatograma ejemplo Recuperación de 25,202 µg/mL de Aspartame; Repetición 1 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 3959429; Tr 11,913 min....	108
Anexo I-2 Cromatograma ejemplo Recuperación de 24,939 µg/mL de Aspartame; Repetición 3 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 3918572; Tr 11,907 min....	109
Anexo I-3 Cromatograma ejemplo Recuperación de 24,750 µg/mL de Aspartame; Repetición 6 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 3889246; Tr 11,900 min....	109
Anexo I-4 Cromatograma ejemplo Recuperación-Fortificado de 28,775 µg/mL de Aspartame; Repetición 1 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 4514266; Tr 11,933 min.	110
Anexo I-5 Cromatograma ejemplo Recuperación-Fortificado de 28,469 µg/mL de Aspartame; Repetición 3 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 4466786; Tr 12,027 min.	110
Anexo I-6 Cromatograma ejemplo Recuperación-Fortificado de 28,649 µg/mL de Aspartame; Repetición 6 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 4494608; Tr 12,073 min.	111
Anexo J-1 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 1-40°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 2087,034 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 5279729; Tr 11,853 min.	111
Anexo J-2 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 1-40°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 2237,824 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 5657871; Tr 13,073 min.	112
Anexo J-3 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 1-38°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 2067,788 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 5231464; Tr 12,367 min.	112
Anexo J-4 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 1-38°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 2124,454 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 5373569; Tr 12,827 min.	113
Anexo J-5 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 4-40°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 1881,635 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 4764644; Tr 11,760 min.	113
Anexo J-6 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 4-40°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 1933,743 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 4895317; Tr 12,287 min.	114
Anexo J-7 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 4-38°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 1919,566 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 4859763; Tr 12,387 min.	114

Anexo J-8 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 4-38°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 1932,734 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 4892787; Tr 12,373 min.	115
Anexo K Resultados prueba Limite de Cuantificación; Estándar Aspartame 3,49 ppm.	115
Anexo L Resultados prueba de Repetibilidad; Zuko Nacional Naranja Aspartame 1981,21 mg/100g.	116
Anexo M-1 Resultados prueba Reproducibilidad; Zuko Nacional Naranja 1 Aspartame 1952,54 mg/100g	116
Anexo M-2 Resultados prueba Reproducibilidad; Zuko Nacional Naranja 2; Aspartame 1965,70 mg/100g.	116
Anexo M-3 Resultados prueba Reproducibilidad; Zuko Nacional Naranja 3; Aspartame 2018,77 mg/100g.	117
Anexo M-4 Resultados prueba Reproducibilidad; Zuko Nacional Naranja 4; Aspartame 2019,36 mg/100g.	117
Anexo N Resultados prueba Sesgo; Estándar de Aspartame 18,23 ppm.	118
Anexo O-1 Resultados prueba de Recuperación; Zuko Nacional Naranja con dilución al 3% v/v; Aspartame recuperado 24,94 mg/100g aproximadamente un 102.5%.	118
Anexo O-2 Resultados prueba Recuperación; Zuko Nacional Naranja con dilución al 3% v/v y fortificado con 3,53 ppm de estándar; Aspartame recuperado 28,58 mg/100g. ...	119
Anexo P-1 Resultados estudio de la Robustez; Día 1-40°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 2082,36 mg/100g Aspartame.	119
Anexo P-2 Resultados estudio de la Robustez; Día 1-40°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 2196,68 mg/100g Aspartame.	119
Anexo P-3 Resultados estudio de la Robustez; Día 1-38°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 2067,04 mg/100g Aspartame.	120
Anexo P-4 Resultados estudio de la Robustez; Día 1-38°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 2125,37 mg/100g Aspartame.	120
Anexo P-5 Resultados estudio de la Robustez; Día 4-40°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 1878,68 mg/100g Aspartame.	120
Anexo P-6 Resultados estudio de la Robustez; Día 4-40°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 1932,74 mg/100g Aspartame.	121
Anexo P-7 Resultados estudio de la Robustez; Día 4-38°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 1919,62 mg/100g Aspartame.	121
Anexo P-8 Resultados estudio de la Robustez; Día 4-38°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 1929,65 mg/100g Aspartame.	121
Anexo Q Resultados prueba de robustez Eficiencia columna.....	122

SIGLAS Y SIMBOLOGÍA

Siglas:

- AOAC: Asociación de Colaboración Analítica Oficial Internacional
- RSA: Reglamento Sanitario de Alimentos
- STD: Material de Referencia
- HPLC: Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución
- IDA: Ingesta Diaria Admisible
- ODECU: Organización de Consumidores y Usuarios de Chile
- INN: Instituto Nacional de Normalización Chilena
- FDA: Administración de Drogas y Alimentos

Simbología:

- °C: Grados Celsius
- g: Gramos
- mg: Miligramos
- mL: Mililitros
- µL: Microlitros
- nm: Nanómetros
- % (p/p): Porcentaje peso sobre peso.
- a: Ordenada en el origen de la recta de regresión
- b: Pendiente de la recta de regresión
- C: Concentración
- k: Factor de cobertura
- r: Coeficiente de correlación

INTRODUCCIÓN

La validación de métodos es un procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio que un método analítico tiene las características de desempeño adecuadas para cumplir el requerimiento de las aplicaciones analíticas previstas. Está compuesta por un conjunto de pruebas, que comprueban y establecen las características de rendimiento de un método, demostrando así si dicho método es adecuado para un propósito analítico en particular.

El siguiente estudio pretende validar dos metodologías analíticas. El método de cenizas totales y la metodología de cuantificación de Aspartame por Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC) en bebida deshidratada en polvo Zuko Nacional de la empresa TRESMONTES LUCHETTI SA.

La determinación de cenizas totales es un método analítico gravimétrico por volatilización indirecta, basado en la medición del residuo inorgánico que se obtiene al incinerar la materia orgánica de un producto. La razón por la que se realizó la validación de esta metodología radica en una nueva actualización del Reglamento Sanitario de Alimentos, donde estipula que el contenido de cenizas totales en bebidas deshidratadas en polvo debe ser como máximo un 2%.^[5] En el análisis de alimentos, las cenizas representan un indicador del contenido de minerales y materia orgánica, microelementos que cumplen funciones metabólicas importantes en el organismo. Por otra parte, permite detectar posibles contaminaciones en el proceso de fabricación o adulteraciones en materias primas y productos terminados.^[7]

Para la determinación y cuantificación de Aspartame en la bebida Zuko Nacional se utiliza Cromatografía líquida de alta resolución, la que es ahora una de las herramientas más poderosas y empleadas en la química analítica.^[4] Tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra que se puede disolver en un líquido.

En la actualidad, la cromatografía líquida se ha convertido una de las técnicas de laboratorio más importante en la separación. Esta permite la cuantificación de varios aditivos en alimentos, entre ellos los edulcorantes artificiales. Es necesario realizar análisis cuantitativos de edulcorantes en los alimentos, para verificar que las concentraciones cumplan con las regulaciones establecidas y la presencia reportada en sus ingredientes. Hoy en día, compuestos en concentraciones tan bajas como partes por billón [ppb = ng/mL] pueden ser fácilmente identificados. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV/Vis) ha llegado a ser una de las técnicas de laboratorio más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos.^[3]

El objetivo principal de la validación es comprobar que el método utilizado por el laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como

también demostrar que las modificaciones que pudieron haber realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados obtenidos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Validar las metodologías de cenizas totales y cuantificación de Aspartame mediante Cromatografía Líquida de alta Resolución en muestras de Zuko Nacional de la empresa TESMONTES LUCCHETTI S.A.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar la metodología de cenizas totales en bebida deshidratada en polvo y comprobar si cumple los parámetros establecidos por el Reglamento sanitario de alimentos en Chile.
- Validar un método para la determinación y cuantificación de edulcorante artificial Aspartame, mediante técnica de Cromatografía Líquida de alta Resolución.
- Verificar el contenido de Aspartame en bebida deshidratada en polvo Zuko Nacional declarado en el envase.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES GENERALES

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1 BEBIDAS DESHIDRATADAS O REFRESCOS EN POLVO

Las bebidas deshidratadas o refrescos en polvo son un concentrado en polvo con sabor a frutas que se utiliza para dar sabor, color y aroma, usualmente al agua. Estas al mezclarse con el agua de acuerdo con las instrucciones del fabricante reconstituyen una bebida refrescante. Las bebidas deshidratadas en polvo son productos económicos y de fácil elaboración, que están constituidos por azúcares o por mezclas de azúcares y edulcorantes, acidulantes, saborizantes, colorantes, con o sin adición de enturbiantes, otros ingredientes y/o aditivos permitidos en la legislación nacional vigente.

Desde el punto de vista nutricional no tienen un aporte, ya que su aporte energético proveniente principalmente del azúcar que puedan contener en su formulación y de algunos aditivos que aportan carbohidratos de bajo aporte energético.

1.1.1 Caracterización de bebidas deshidratadas en polvo

La caracterización de una bebida en polvo indica la calidad del producto terminado. La bebida en polvo debe estar exenta de contaminantes y partículas extrañas.

Para estos productos se permite la adhesión de edulcorantes, sabores naturales y artificiales, ácido ascórbico, vitaminas y minerales en dosis controladas. También, para definir la calidad del producto es necesario evaluar diferentes criterios fisicoquímicos y sensoriales, garantizando estabilidad y evitando sabores y olores extraños.

Según la normativa, las mezclas de polvo para preparar bebidas deshidratadas o refrescos en polvo no deben poseer contaminantes físicos, aromas o sabores extraños, y cumplir con los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos estipulados por la legislación vigente.

1.1.2 Requisitos para refrescos en polvo

1.1.2.1 Norma Chilena Nch 2729

Se define como Refresco en polvo o Bebida instantánea al producto granulado constituido por azúcares, mezcla de azúcares y edulcorantes nutritivos o mezcla de

edulcorantes no nutritivos permitidos y saborizantes/aromatizantes, con o sin adición de reguladores de acidez, colorantes, enturbiantes y otros ingredientes y aditivos permitidos, que por dispersión en agua y/o leche permite la obtención de un refresco o bebida. ^[14]

1.1.2.2 Clasificación

Los refrescos pueden ser clasificados en dos clases, de acuerdo a la(s) sustancia(s) que le proporcionan el sabor dulce:

- Refrescos en polvo endulzados solo con azúcares.
- Refrescos en polvo endulzados con azúcares y/o edulcorantes nutritivos y/o edulcorantes no nutritivos, permitidos.

1.1.2.3 Requisitos de Materias Primas y Aditivos

Materias Primas Obligatorias

- Azúcares y/o edulcorantes nutritivos y/o edulcorantes no nutritivos permitidos.
- Saborizantes/aromatizantes naturales, idéntico al natural y artificiales, permitidos.

1.1.2.4 Materias Primas Opcionales

Se puede emplear colorantes naturales colorantes artificiales y sus derivados, permitidos.

- Frutas, pulpas de frutas o jugos de frutas deshidratados.
- Reguladores de acidez permitidos.
- Enturbiantes permitidos.
- Otros ingredientes, aditivos y micronutrientes permitidos.

1.1.2.5 Requisitos del Producto

- El refresco en polvo se debe presentar en forma de polvo y/o pequeños gránulos de tamaño uniforme. Debe fluir libremente y no mostrar aglomeraciones, excepto aquellas que se desintegren por la simple presión de los dedos.
- El refresco en polvo se debe presentar en envases sellados herméticamente.
- El refresco en polvo debe mantenerse sin alteraciones, por el periodo de vida útil indicado en el rotulo, en condiciones de almacenaje señaladas en el envase.

1.1.2.6 Requisitos Organolépticos

El producto reconstituido en la forma indicada en el envase debe presentar sabor, olor y color característico. La apariencia del producto debe estar libre de cualquier defecto que afecte su buen aspecto y su adecuada conservación. El color debe ser resultante de la mezcla del o los colorantes agregados, con el resto de los componentes.

1.1.2.7 Otros Requisitos

Los refrescos en polvo no deben contener impurezas o sustancias extrañas macroscópicas o microscópicas de cualquier naturaleza.

1.1.2.8 Requisitos físicos y químicos

- Humedad

Los refrescos en polvo deben contener un máximo de humedad de acuerdo con lo establecido por la autoridad competente. El reglamento sanitario de alimentos estipula que producto este debe ser un 5% máximo al momento de ser envasado.

- Azúcares

Los refrescos en polvo endulzados solo con azucars, deben contener un mínimo de 85% en peso del producto final de azucars totales. Este requisito no aplica para los

productos endulzados con azúcares y/o edulcorantes nutritivos y/o edulcorantes no nutritivos, permitidos.

- Cenizas

Los refrescos en polvo deben contener un máximo de cenizas según lo establecido por la autoridad competente. De acuerdo con la actualización en el reglamento sanitario de alimentos realizada en el 2021 estipula que las bebidas deshidratadas en polvo deben contener un porcentaje máximo de cenizas totales 2% con excepción de los enriquecidos o fortificados, para los cuales no regirá este límite.

1.1.2.9 Envases y Rotulación

Los envases para refrescos en polvo deben ser nuevos y estar en condiciones sanitarias adecuadas, limpios y exentos de materias extrañas a fin de que resguarden la estabilidad y calidad del producto envasado, debiendo, además protegerlo de cualquier contaminación durante su transporte, almacenamiento y comercialización. Se puede usar en el rótulo representaciones gráficas de frutas o sustancias cuyo sabor caractericen al producto.

1.2 PRINCIPALES MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA PRODUCCIÓN DE BEBIDAS DESHIDRATADAS O REFRESCOS EN POLVO AUTORIZADOS POR LA LEGISLACIÓN VIGENTE

Las bebidas deshidratadas en polvo están constituidas principalmente por las siguientes materias primas:

1.2.1 Azúcar

De acuerdo con la legislación vigente, se denomina azúcar a los carbohidratos endulzantes monosacáridos y disacáridos refinados, concentrados y/o cristalizados. Otros nombres para el azúcar son: sacarosa, azúcar común o azúcar de mesa. Aportan 4 calorías por gramo.

1.2.2 Edulcorantes

Los Edulcorantes son sustancias que en mezclas de ingredientes proporcionan sabor dulce a los alimentos. Estos pueden ser:

- a) Edulcorantes No Nutritivos: sustancias sin valor calórico.

- b) Edulcorantes Nutritivos: sustancias diferentes a los azúcares con valor calórico menor que la sacarosa.
- c) Sólo se permite usar los edulcorantes no nutritivos en los alimentos para regímenes de control de peso; en los alimentos bajos en grasas y/o calorías, y en los alimentos libres, bajos, reducidos o livianos en calorías, pudiendo emplearse únicamente los que se indican a continuación:

Tabla 1-1: Edulcorantes no nutritivos permitidos y su ingesta diaria admisible

EDULCORANTES	mg/kg
Acesulfame	0-15
Aspartame	0-40
Ciclamato de sodio y de calcio	0-11
Sacarina de sodio y de calcio	0-5
Sucralosa	0-15

- Acesulfame de potasio

El acesulfamo potásico es un endulzante sin calorías que se ha estado utilizando en alimentos y bebidas de todo el mundo durante los últimos años. Este ingrediente, que es 200 veces más dulce que el azúcar, se usa a menudo en mezclas de edulcorantes para producir un sabor más similar al del azúcar en un alimento o bebida también ayuda a que las mezclas retengan su dulzor a través del tiempo, por lo que aumentan la vida de los productos dulces.

- Aspartame

Endulzante bajo en calorías descubierto en 1965, conocido bajo el nombre comercial de NutraSweet. Por su naturaleza proteica, aporta 4 calorías por gramo, pero dado a su alto poder edulcorante, 180 veces más dulce que el azúcar, se requieren cantidades muy pequeñas, para endulzar un alimento, por lo que su aporte calórico es insignificante. La ingesta diaria admisible para el Aspartame se ha fijado en 40mg/Kg de peso corporal en Chile.

- Ciclamato de Sodio

Edulcorante de sintético, no nutritivo, aprobado para el uso en alimentos en más de 50 países en el mundo, pero está prohibido en Estados Unidos y en Chile. Es un

producto 30 veces más dulce que el azúcar. La ingesta diaria admisible para el ciclamato se ha fijado en 11mg/Kg de peso corporal.

- Sacarina de Sodio

Edulcorante no calórico, descubierto en 1879 y usado comercialmente para endulzar alimentos y bebidas desde comienzos de siglo y está aprobada en más de cien países. Es 500 veces más dulce que el azúcar. La ingesta diaria admisible se ha fijado en 5 mg/Kg de peso corporal.

- Sucralosa

La sucralosa se obtiene del azúcar a través de la sustitución de tres átomos de grupos hidrófilo por tres átomos de cloro, los cuales brindan una excelente estabilidad a la molécula de la sucralosa. Posee un perfil organoléptico de calidad que deja un resabio agradable.

Propiedades de la Sucralosa. Es un producto 600 veces más dulce que el azúcar. En sus aplicaciones puede ser manipulada igual que el azúcar, sin perder su sabor dulce, incluso siendo expuesta a altas temperaturas por períodos prolongados. No es calórica ni cariogénica. Soluble y dispersable en Solventes Comunes. No es metabolizada por el cuerpo como azúcar o hidrato de carbono, de modo que personas con problemas de salud, pueden consumirla con seguridad.

1.2.3 Saborizantes/Aromatizantes

Los Saborizantes/Aromatizantes son sustancias aromáticas o mezclas de ellas, naturales o sintéticas, utilizadas para dar al producto reconstituido sabor o aroma determinado.

La legislación vigente en Chile permite usar como saborizantes/aromatizantes aquellas sustancias aromáticas o mezclas de ellas obtenidas por procesos físicos o químicos de aislamiento o síntesis de tipo natural, idéntico a natural y artificial aceptados por FAO/OMS, Unión Europea, Food and Drug Administration y F.E.M.A. (Flavor and Extractive Manufacturing Assoc.). (R.S.A, art.155). ^[6]

Los saborizantes/aromatizantes se clasifican en:

- a. Saborizante/aromatizante natural: al producto puro de estructura química definida o al preparado saborizante de estructura química no definida, concentrado o no, que tiene características saporíferas y son obtenidos por un proceso físico, microbiológico o enzimático a partir de productos de origen vegetal o animal.

- b. Saborizante/aromatizante idéntico a natural: es aquel producto obtenido por procesos físicos, microbiológicos, enzimáticos, de síntesis química o de aislamiento por procesos químicos, cuya formulación incluye componentes idénticos a los existentes en la naturaleza. Saborizante/aromatizante artificial: es aquel producto que en su formulación incluye, en una proporción cualquiera, componentes que no se encuentran naturalmente en productos animales o vegetales y son obtenidos por síntesis química.

1.2.4 Colorantes

Los Colorantes son sustancias que dan o restituyen color en un alimento, utilizadas para dar al producto una coloración determinada. Estos agregan la característica de color a los alimentos que se consumen para mejorar su aceptación, ya que el color es la primera sensación que se percibe ya la que en muchos casos determina un primer juicio sobre la calidad del alimento. Se utilizan con un fin tecnológico y comercial para asegurar la uniformidad, restaurar la coloración original, intensificar los colores naturales cuando son débiles y hacer identificable un determinado alimento.

Los colorantes de acuerdo con su origen se pueden clasificar en:

- a) Colorantes Artificiales y sus lacas.
- b) Colorantes Naturales y sus derivados.

Los colorantes artificiales y sus lacas autorizados en Chile, en el Reglamento Sanitario de los Alimentos son:

- Amarillo Crepúsculo

Polvo de color rojo ladrillo, soluble en agua, alcohol de 30° e insoluble en aceite. Al igual que la tartrazina, la legislación chilena exige que se declare bajo rotulación destacada en los productos alimenticios que lo contengan. Es de uso masivo y se utiliza para colorear todo tipo de productos que necesiten coloración naranja.

- Amarillo de Quínola

Mezcla de sales sódicas. Se utiliza en repostería, bebidas, jugos, conservas, derivados cárneos, lácteos. Su uso es menor que la tartrazina por su costo y menor intensidad de coloración.

- Tartrazina

Polvo de color amarillo anaranjado brillante, soluble en agua, en alcohol de 55°, insoluble en aceite. Es un colorante artificial altamente utilizado en la industria alimentaria. La legislación chilena exige que debe ser declarado y rotulado con letra destacada en todos los productos alimenticios. Su uso está autorizado en muchos países incluyendo la Comunidad Europea, Estados Unidos y Chile, entre otros. ^[6]

- Azul Brillante

Polvo muy fino de color violeta oscuro, soluble en agua, alcohol de 40° e insoluble en aceite. En soluciones presenta una coloración azul ligeramente verdosa. Las aplicaciones de este colorante sirven para conseguir tonos azules y verdes principalmente, al combinarlos con colorantes amarillos.

- Azul Indigotina o Índigo Carmín

Polvo fino de color azul marino, soluble en agua, alcohol de 15° e insoluble en aceite. Utilizado en todo el mundo para conseguir colores verdes en alimentos.

- Azorrubina o Carmoisina

Polvo café oscuro soluble al agua, alcohol de 35° e insoluble en aceite. Utilizado para conseguir un color rojo frambuesa en helados, jugos, postres, etc.

- Ponceau 4R o Rojo de Cochinilla

Polvo de color rojo claro a oscuro, soluble en agua, alcohol de 45°, insoluble en aceite. No tiene relación con el colorante natural de cochinilla extraído de insectos. Presenta un color rojo frutilla en solución.

- Allura Red o Rojo 40

Polvo de color rojo ladrillo semi oscuro que en solución presenta coloración rojo frutilla con un tono más anaranjado que el ponceau 4R. Soluble en agua, en alcohol de 20°, insoluble en aceite.

1.2.5 Reguladores de Acidez

Los Reguladores de Acidez son sustancias que se añaden a los productos para controlar acidez, neutralidad o alcalinidad. En Chile se encuentran los siguientes reguladores de acidez, debidamente permitidos por la legislación vigente en el país:

- Ácido Cítrico

Es un buen conservante, acidulante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo en el envasado de muchos alimentos.

- Ácido fumárico

El ácido fumárico es un acidulante alimentario que se utiliza como regulador de acidez en el procesado y conservación de los alimentos por su potente acción antimicrobiana.

- Vitamina C (ácido ascórbico)

El ácido ascórbico y sus sales de sodio, potasio y calcio se utilizan de forma generalizada como antioxidantes y aditivos.

1.2.6 Enturbiantes

Los enturbiantes se utilizan en mezclas con otros componentes para dar turbidez al producto reconstituido. Los utilizados en los productos analizados son los siguientes:

- Maltodextrina

Es un polisacárido moderadamente dulce usado como aditivo alimentario, sin relación con la malta de cebada. Se produce del almidón de maíz y se ve generalmente como un polvo higroscópico blanco cremoso. La maltodextrina es fácilmente digerible, siendo absorbida tan rápidamente como la glucosa. También se permite utilizarla como estabilizador de humedad, agente de relleno y/o edulcorante, según legislación vigente.

[6]

- Dióxido de Titanio

Pigmento blanco que se emplea con el fin de atenuar o matizar algún color presente en el alimento. Si es de grado alimenticio no representa ningún riesgo para la salud.

- Goma arábiga

Es un polisacárido de origen natural, proveniente de la exudación o proceso de cicatrización de los árboles Acacia Senegal y Acacia Seyal. Esta resina es de color ámbar y es recolectada normalmente a mano cuando se ha secado. Es utilizada en la industria alimenticia por no tener efectos tóxicos. Utilizada como coloide para la protección de vinos jóvenes. 100% vegetal. No es calórica ni cariogénica. Buen fijador de aromas. Estabilizador de espumas y emulsiones. [6]

1.2.7 Sustancias Espesantes

Las sustancias que hacen posible formar o mantener una dispersión homogénea de una fase gaseosa en un alimento líquido o sólido y que aumentan la viscosidad de un alimento.

Las sustancias espesantes permitidas por el Reglamento Sanitario de los Alimentos y encontradas en los refrescos estudiados son:

- Carboximetilcelulosa

La carboximetilcelulosa es preparada a partir de la celulosa, la cual es el principal polisacárido constituyente de la madera y de todas las estructuras vegetales. Es preparada comercialmente de la madera y posteriormente modificada químicamente. Usos muy diversos, principalmente como agente espesante, pero también como producto de relleno, fibra dietética, agente antigrumoso y emulsificante. Es similar a la celulosa, pero a diferencia de ella, es muy soluble en agua.

- Goma Xantan

Es un polisacárido usado como aditivo para la industria alimenticia en donde se requieran procesos de hidratación rápida. Es producida en un proceso que involucra fermentación, glucosa y azúcar con la bacteria *Xantomonas Campestris*.

Provee una excelente suspensión para sólidos insolubles y aceites. También, estabilidad en congelamiento y derretimiento. Manifiesta baja viscosidad durante los procesos. Da gran solución viscosa a bajas concentraciones de goma. Manifiesta poca viscosidad en soluciones expuestas a altas temperaturas. Soluble y estable en ácidos y soluciones alcalinas. ^{[6][13]}

1.2.8 Sustancias Secuestrantes y Sinergistas de Antioxidantes

Son aquellas sustancias que forman compuestos químicos con iones metálicos. Las sustancias secuestrantes permitidas por el Reglamento Sanitario de los Alimentos y encontradas en los refrescos estudiados son:

- Citrato de Sodio – Citrato Trisódico

El citrato disódico tiene la fórmula química $\text{Na}_2\text{H}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO}))_3$ y se usa como antioxidante para preservar los alimentos, así como para mejorar el efecto de otros antioxidantes. También se emplea como regulador de acidez y como compuestos aromáticos comúnmente encontrados en gelatinas, jamones, helados, bebidas gaseosas, vinos, quesos procesados, entre otros productos.

- Sustancia antiaglomerante

Son sustancias que reducen la tendencia de las partículas de un alimento a unirse unas con otras. Las sustancias antiaglomerantes permitidas por el Reglamento Sanitario de los Alimentos y encontradas en los refrescos estudiados son:

- Dióxido de Silicio

Polvo blanco muy ligero y sin olor. Insoluble en medios líquidos tiende a espesar los medios en los que se agrega.

1.2.9 Vitaminas

- Vitamina A

Liposoluble, compuesto orgánico del retinol, diversas funciones como cofactor para la visión, sistema inmune, transcripción génica, entre otras.

- Vitamina C

Vitamina hidrosoluble, antioxidante, clave es la formación del colágeno, función inmune, entre otras funciones.

- Vitamina E

Vitamina liposoluble, función antioxidante, participa en función inmune, protector de oxidación lipoproteínas LDL, HDL, etc.

1.3 DEFINICIÓN DE LA LEGISLACIÓN VIGENTE EN CHILE PARA BEBIDAS DESHIDRATADAS EN POLVO

En Chile el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA) decreto supremo 977/96 especifica para las bebidas deshidratadas en polvo:

ARTÍCULO 404 “Polvos para preparar refrescos o bebidas instantáneas en polvo son los productos constituidos por azúcares o mezclas de azúcares y edulcorantes autorizados o mezclas de edulcorantes autorizados, acidulantes, saborizantes, colorantes, con o sin adición de enturbiantes y otros ingredientes”.^[5]

Estos productos deberán contener lo siguiente:

- a) Porcentaje máximo de humedad de 5 % al momento de envasar estos productos;
- b) Porcentaje máximo de cenizas totales 2% con excepción de los enriquecidos o fortificados, para los cuales no regirá este límite;**
- c) Porcentaje mínimo de 85 % de azúcares totales en peso del producto final, salvo para los refrescos o bebidas instantáneas en polvo, en los que se ha sustituido total o parcialmente los azúcares por edulcorantes no nutritivos.^[5]

1.4 REFRESCO EN POLVO ZUKO NACIONAL

Zuko es un producto producido por la empresa Tresmontes-Lucchetti, compañía que tiene más de 100 años. La empresa es experta en manufacturar y comercializar bebidas en polvo, escogiendo los mejores ingredientes para producir bebidas deshidratada en polvo. La compañía comienza a producir Zuko en el año 1974 gracias a un plan de diversificación.

La marca Zuko actualmente ofrece productos libres de colorantes artificiales con pigmentos naturales, bajo en calorías, libre de sellos y buena fuente de vitamina C.

1.4.1 Ingredientes principales de Zuko Nacional

Azúcar, ácido cítrico, Aspartamo, Goma de celulosa, Sabor naranja idéntico a natural, Citrato de potasio, Fosfato tricálcico, Acesulfamo de potasio, Vitamina c, Goma de acacia, Dióxido de titanio, Maltodextrina, Colorante curcumina, Colorante antocianinas, Fenilalanina.



Fuente: <https://www.zuko.cl/sin-colorantes-artificiales>

Figura 1-1: Productos Zuko Nacional 20 g/L sabores de la empresa TRESMONTES LUCCHETTI SA.

En el presente trabajo surge la necesidad de implementar y validar el método analítico para la cuantificación de cenizas en el laboratorio y así demostrar a través de resultados confiables, satisfactorios y reproducibles que la marca Zuko cumple con los requerimientos y normativa de la legislación vigente. En la (Figura 1) se visualizan los sabores utilizados en la validación de porcentaje de cenizas totales.

1.5 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE CENIZAS TOTALES

1.5.1 Fundamento teórico

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de incinerar la materia orgánica de un producto.

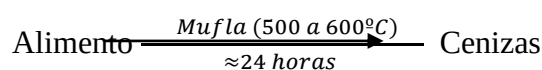
Cuando los alimentos son tratados térmicamente a temperaturas entre 500 y 600°C, el agua y otros constituyentes volátiles son expulsados como vapores en tanto los constituyentes orgánicos son transformados en presencia del oxígeno del aire en dióxido de carbono (CO₂) y óxido de nitrógeno (NO₂) mientras el hidrógeno es expulsado en forma de vapor de agua. ^[7]

Los minerales constituyentes (cenizas) permanecen en el residuo en forma de óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos y cloruros, en dependencia de las condiciones de incineración y la composición del producto analizado.

La determinación del contenido de cenizas en los alimentos es por tanto un indicador del contenido total de minerales y materia inorgánica, microelementos que cumplen funciones metabólicas importantes en el organismo. ^[7]

El procedimiento para realizar la determinación de cenizas consiste en incinerar una porción exactamente pesada del alimento en un crisol de porcelana o platino (resistente a altas temperaturas) utilizando una mufla a temperaturas entre 500 y 600°C durante 24 horas aproximadamente. El análisis se da por terminado cuando el residuo esté libre de partículas carbonosas (de color negro) y las cenizas presenten un color blanco o gris uniforme, ocasionalmente pueden ser rojizas o verdosas. Entonces, el crisol con las cenizas se enfría en un desecador y se pesa en balanza analítica hasta peso constante. ^[7]

Un esquema del proceso se muestra a continuación:



Las temperaturas de incineración empleadas en la determinación de cenizas dependen del tipo de alimento a analizar, pero rara vez superan los 600°C. Se plantea que, si se alcanza rápidamente una temperatura de 650°C, el cloruro de sodio y de potasio son volatilizados, el carbonato de calcio es convertido en óxido y los fosfatos alcalinos se funden protegiendo a las proteínas y evitando que toda la materia orgánica pase a dióxido de carbono. ^[7]

La cantidad de cenizas representa el contenido total de minerales en los alimentos y su importancia está dada por varias razones:

Ventajas de la determinación de cenizas

- Es un método seguro.
- No se adicionan reactivos.
- No requiere de atención directa una vez iniciada la calcinación.
- Se pueden realizar varias muestras a la vez.
- Las cenizas resultantes pueden ser utilizadas para otras mediciones.

1.5.2 Porcentaje de Cenizas Totales en Bebidas Deshidratadas permitido en Chile

En Chile el reglamento sanitario de alimentos (RSA) específica para las bebidas deshidratadas en polvo: **“Porcentaje máximo de cenizas totales 2% con excepción de los enriquecidos o fortificados, para los cuales no regirá este límite”.** ^[5]

1.6 ASPARTAME

1.6.1 Generalidades del Aspartame

James Schlatter, era investigador de los Laboratorios G. D. Searle (Estados Unidos), trabajaba en 1965 en el desarrollo de un nuevo tratamiento para la úlcera gástrica en base a péptidos. Dentro de los numerosos péptidos sintéticos que ensayó estaba el aspartilfenilalanina, el que había sintetizado en la forma de un metil ester. Entonces, fue necesario purificarlo por cristalización para lo cual primero hubo que calentarlo. Por descuido, hirvió bruscamente y el producto desbordó el matraz donde se calentaba. El experimento fue abandonado, pero pequeñas trazas del polvo blanco que se produjo quedaron en los dedos de Schlatter. Este, al fumar, más tarde, detectó un sabor dulce en sus dedos, era al aspartamo. El producto fue patentado por G.D. Searle casi de inmediato (1966) participando a Schlatter del beneficio económico a través de acciones de la compañía. Como otros productos sintéticos, el aspartamo no ha estado libre de cuestionamiento. Sin embargo, la Comisión Europea de protección de la Salud y del Consumidor, estableció en 2002, la seguridad del aspartamo como edulcorante de bajo aporte calórico.^[9]

1.6.2 Características del Aspartame

El Aspartame es un polvo blanco, cristalino, ligeramente higroscópico, ligeramente soluble en agua y en alcohol, prácticamente insoluble en hexano y en cloruro de metileno. Es considerado un edulcorante bajo en calorías, tiene un poder edulcorante 200 a 300 veces más que el azúcar, capaz de opacar sabores cítricos y frutales.

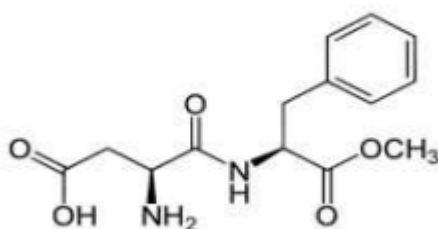
El Aspartame se puede almacenar en forma seca o acuosa. En la forma seca, la estabilidad depende principalmente de la temperatura y la estabilidad disminuye a temperaturas $< 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En la forma acuosa, la estabilidad es máxima a un pH de 4,3; más allá de este pH, el aspartame se degrada en sus 3 metabolitos conocidos (fenilalanina, ácido aspártico y metanol) y pierde parte de su dulzura. La forma acuosa también se vuelve más dulce al aumentar la temperatura.^[9]

1.6.3 Estructura Química

En su estructura química, aspartame presenta tres tipos de enlaces. Los enlaces C – C y C-H son covalentes, y no exhiben una polaridad real, Los enlaces C = C y C-O exhiben un carácter covalente real al igual que los enlaces C - N y N - H.^[9]

La polaridad del enlace N - H es mayor que la polaridad que presentan los otros tres tipos de enlace. Aspartame contiene un grupo básico débil -NH_2 y es un grupo típico de la mayoría de los aminoácidos en los cuales se transfiere el protón de la parte ácida de la molécula al par de electrones sin compartir de la amina formándose COO^- y NH_3^+ .^[9]

La variedad de polaridad de los tipos de enlaces en aspartame afecta profundamente las propiedades físicas y químicas que el compuesto presente. Cabe destacar que la estructura química de aspartame presenta un grupo metoxilo que es un buen grupo saliente y por tanto capaz de producir in situ metanol.^[9]



Fuente: Guerrero Villegas, T., & Mora Flores, G. (2014). Posibles riesgos para la salud por el consumo de Aspartamo. Enfoque UTE , 5 (2), págs. 1 - 13.

Figura 1-2: Estructura química edulcorante Aspartame.

1.6.4 Bioquímica del Aspartame

Aspartamo es un éster metílico de L -aspartil- L -FENILALANINA y es muy estable en condiciones secas cuando se almacena a temperaturas que oscilan entre 30 °C y 80 °C. Se degrada a altas temperaturas y en soluciones acuosas. La tasa de degradación en soluciones acuosas, sin embargo, depende tanto del pH como de la temperatura. A temperatura ambiente, el aspartame es más estable a pH 4.3, con una vida media de 300 días. La degradación es mínima cuando el pH oscila entre 4,0 y 5,0 y alcanza un máximo cuando se calienta en condiciones de alta humedad a un pH superior a 6,0. En condiciones fuertemente ácidas ($\text{pH} < 4,0$) o alcalinas ($\text{pH} > 6,0$), el aspartame puede generar metanol por hidrólisis. En condiciones más severas, como temperatura elevada o pH alto, los enlaces peptídicos también se hidrolizan. Esto da como resultado la liberación de aminoácidos libres (particularmente fenilalanina y ácido aspártico).^[9]

1.6.5 Degradación enzimática del Aspartame en el Organismo

Tras su ingestión, el Aspartame se metaboliza en el tracto intestinal, por acción de esterasas y peptidasas, en fenilalanina, ácido aspártico y metanol, de modo que casi nada

de aspartame llega a la sangre. La fenilalanina es un aminoácido esencial (que el organismo humano no puede sintetizar por sí mismo). El ácido aspártico es uno de los veinte aminoácidos con los que las células forman las proteínas, pero no es un aminoácido esencial; es importante en la síntesis de ADN y como neurotransmisor. El metanol se encuentra, en pequeñas cantidades, de forma natural en el organismo y en un gran número de alimentos. ^[16]

En el cuerpo, el metabolismo del ácido aspártico y del metanol producido es rápido, por lo que no se eleva significativamente la concentración de estas dos sustancias en la sangre, aun si se consumiera en una sola toma una cantidad equivalente a la IDA. ^[16]

Si el consumo supera la IDA, el nivel de fenilalanina en sangre puede aumentar proporcionalmente con la dosis administrada. Sin embargo, estos valores no son importantes, excepto para personas que presentan fenilcetonuria (PKU). ^[16]

La PKU es una afección congénita causada por la carencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, lo que impide descomponer apropiadamente la fenilalanina. Consecuentemente, este aminoácido se acumula y resulta tóxico para el sistema nervioso central, ocasionando daño cerebral. Por esta razón, en la UE y otros países los productos alimenticios que contienen Aspartame deben indicarlo en la etiqueta. ^[16]

1.6.6 Ingesta admisible de Aspartame en Chile

Definición de la ingesta diaria admisible (IDA)

La ingesta diaria admisible (IDA) es la cantidad estimada de un aditivo alimentario que puede ser consumida con seguridad, diariamente y durante toda la vida. Los organismos regulatorios asignan la IDA para un aditivo, la cual se expresa en miligramos (mg) por Kilógramo de peso corporal.

$$\text{IDA} = \text{mg de aditivo} \times \text{kg peso corporal}$$

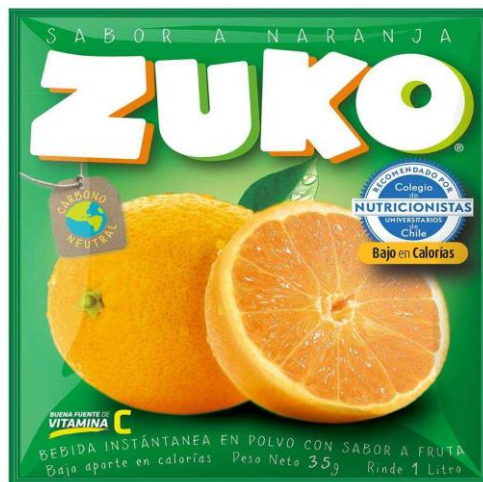
El nivel de consumo diario del edulcorante Aspartame se expresan mediante el valor de IDA, la cual tiene un máximo de 40 mg/kg de peso corporal/día según la legislación vigente acordada. ^[5]

1.6.7 Antecedentes de Zuko Nacional Naranja

La marca comenzó con un producto de Zuko Nacional Naranja de 35 g/L en gran parte su sabor dulce era debido a la cantidad de azúcar que contenía. Con los años se ha creado conciencia respecto a la alimentación saludable ocasionando modificaciones en el producto, por lo que se tomó la decisión de reducir el contenido de azúcar y subir la dosis de edulcorantes dentro de los parámetros establecidos por la legislación nacional vigente.

La empresa busca cada vez un producto más amigable con el medio ambiente y sin sellos. En los últimos años el producto sufrió una reducción de gramaje de 35 gramos, luego a 25 gramos y actualmente cuenta con un formato de 20 gramos por litro, siendo esta ultima la comercializada actualmente en el país.

La importancia de la validación de cuantificación de Aspartame en Zuko Nacional Naranja radica en revalidar la metodología en su nuevo formato y revisar a través de resultados confiables, satisfactorios y reproducibles, si este cumple las pruebas después de las modificaciones realizadas al producto. Además de comprobar que el contenido de Aspartame declarado en el envase corresponde con los resultados entregados por el método establecido en el laboratorio.



Fuente: <https://www.zuko.cl/sin-colorantes-artificiales>

Figura 1-1: Zuko Nacional Naranja formato 35g/L con un contenido de Aspartame de 849-990 mg/100g.



Fuente: <https://www.zuko.cl/sin-colorantes-artificiales>

Figura 1-4: Zuko Nacional Naranja formato 25g/L con un contenido de Aspartame de 1500-1750 mg/100g.



Fuente: <https://www.zuko.cl/sin-colorantes-artificiales>

Figura 1-5: Zuko Nacional Naranja formato 20g/L con un contenido de Aspartame de 1872-2184 mg/100g.

La cuantificación de Aspartame se realiza de la misma manera en todos los sabores de la marca, pero se tomará la muestra de Zuko Nacional Naranja como referencia para la validación, se utiliza Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC) con detector UV/Vis para la detección del analito por medio de un método no normalizado y trasferido por un proveedor externo.

1.7 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC

1.7.1 Clasificación de la Cromatografía Líquida

Los tipos de cromatografía líquida pueden clasificarse de diferentes maneras, sin embargo, la más habitual es en base a la naturaleza de la fase estacionaria, ya que es esta la que influye directamente en el mecanismo de separación. Se distinguen cuatro tipos de técnicas:

- Cromatografía de adsorción (líquido-sólido)
- Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente)
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de exclusión molecular

1.7.2 Fundamento de la Cromatografía Líquida de alta Resolución

Una de las técnicas más utilizadas en la industria alimentaria es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), debido a que posee un amplio rango de resolución para compuestos orgánicos, cuya metodología de separación es rápida y eficiente.

La HPLC es un método cromatográfico para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. En el método participan las fases móvil y estacionaria (inmiscibles entre sí) y la muestra de interés. La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la muestra a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad a la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad. Estas diferencias de velocidades dan origen a la separación de los componentes.

Los equipos de HPLC se clasifican en integrados, cuyas partes se encuentran reunidas de tal forma que impiden el intercambio con otros componentes, y en modulares, en los que se integran los instrumentos acordes a las necesidades específicas de los operarios. De esta manera, el equipo influye en la precisión de los resultados, en la facilidad de manipulación, en el tiempo de separación y en la preparación o purificación de las muestras.

1.7.3 Ventajas de la Cromatografía Líquida

Amplio rango de aplicabilidad debido a la alta disponibilidad de equipos, columnas y demás materiales, que la hacen capaz de analizar casi cualquier mezcla deseada.

- Alta precisión en sus resultados.
- Variedad de técnicas, entre las cuales están la cromatografía por partición, adsorción, intercambio iónico y exclusión molecular.
- Fácil manipulación de los gradientes generados en la fase móvil.
- No es destructiva, es decir, los compuestos separados en la columna pueden ser recolectados, lo que permite el uso de la HPLC como una técnica de preparación o purificación de muestras.
- Tiempo de separación menor a 30 min por muestra analizada.
- Alta reproducibilidad en los análisis cuantitativos.
- Alto poder de separación con detección sensible.
- La operación es flexible, personalizable y automatizada.
- No está restringida por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra.

1.7.4 Instrumentación de Cromatógrafo de Líquidos (HPLC)

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

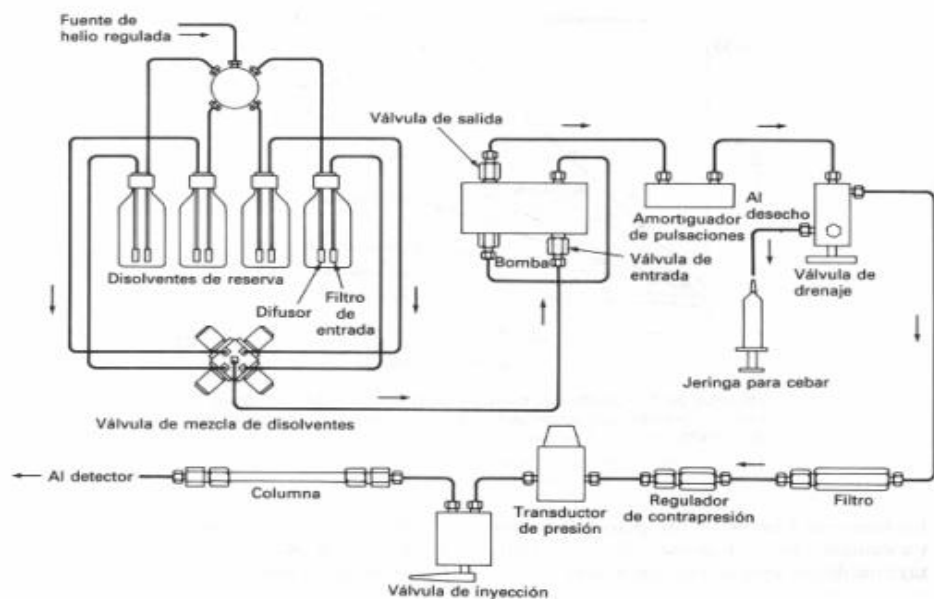


Figura 1-6: Esquema de un aparato de HPLC

1.7.4.1 Inyectores

La inyección de un volumen preciso de muestra debe hacerse a la entrada de la columna en un corto periodo de tiempo para perturbar lo menos posible el régimen de circulación establecido por la columna y detector, para ellos se utiliza una válvula de alta presión de vías manual o automatizada. Esta válvula funciona en dos tiempos:

- Posición de carga

La bomba y la columna están conectadas, la muestra es introducida a presión atmosférica, con la ayuda de la jeringa en un depósito tubular denominado bucle, este puede ser de diferentes volúmenes, puede ser exterior o puede estar integrado en el bloque de la válvula.

- Posición de inyección

La muestra es introducida en el flujo de la fase móvil por una rotación de palanca que permite invertir el sentido de circulación del bucle, el volumen inyectado debe ser de unas 5 a 10 veces mayor que la del bucle.

Estas posiciones se representan en la figura, se consideran presiones que puedan sobrepasar los 30.000 KPa en el caso de tener inyectores automáticos.

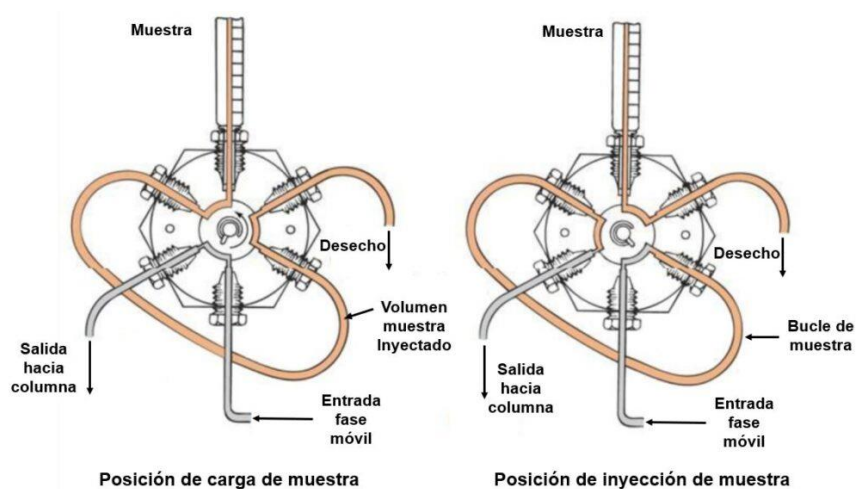


Figura 1-2: Válvula de inyección de HPLC

1.7.4.2 Columnas

La columna es parte esencial del cromatógrafo, ya que en ella a través de diferentes mecanismos: partición, absorción, intercambio iónico y exclusión molecular, tiene lugar la separación o discriminación entre analitos.

Las partes de una columna de cromatografía líquida se ven esquematizadas en la figura, las columnas más utilizadas en HPLC son las de relleno; estas columnas consisten en un tubo, relleno de acero inoxidable, relleno de una fase estacionaria adecuada al tipo de separación que se pretende realizar.



Figura 1-3: Columna utilizada en la validación de Aspartame LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 125-4.

Las columnas más utilizadas en HPLC son las de relleno; estas columnas consisten en un tubo, generalmente de acero inoxidable, rellena de una fase estacionaria adecuada para el tipo de separación que se pretende realizar, el diámetro interior puede variar entre 20 y 60 nm dependiendo de su utilización y su longitud oscila entre los 5 a 30 cm.

Tipo	Diámetro (mm)	Relación de flujo (µL/min)	Capacidad de muestra (µg)	Máxima carga de muestra (mg)
Capilar	0,075	0,25	0,05	-
	0,15	1,0	0,2	-
	0,30	5,0	1,0	-
	0,50	10	2,0	-
Microcalibre	1,0	25 - 50	0,05 - 10	-
Calibre estrecho	2,1	100 - 300	0,2 - 50	-
Analítica	4,6	500 - 1.500	1 - 200	10
Semi-preparativa	10	2.500 - 7.500	1.000	50
Preparativa	22	10.000 - 30.000	5.000	200

Figura 1-4: Clasificación de tipos de columnas de acuerdo con su capacidad de carga (µg) y diámetro interno (nm).

Las características de la columna que influyen sobre su capacidad de separación son: diámetro interno, longitud, relleno y tamaño de partícula de relleno.

- Diámetro interno

El diámetro interno es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar en la columna y también influye en el flujo y la sensibilidad. Cuando mayor es el diámetro interno, mayor es la capacidad de carga (μg) y el flujo a emplear, pero también aumenta la dilución del pico disminuyendo la sensibilidad y la eficiencia. Las columnas analíticas de más amplio uso suelen tener 4.6 mm de diámetro. ^[3]

- Longitud

La longitud afecta la resolución tanto como a la velocidad de la separación. El tiempo de análisis aumenta con la longitud de la columna, pero no necesariamente la eficiencia. Estas relaciones se adecuan al tipo de análisis; el rango de longitud varia desde los 20 a 300 mm. ^[3]

1.7.4.3 Relleno de columnas

Todas las separaciones cromatográficas tienen lugar sobre la fase estacionaria. Las fases están constituidas generalmente por partículas de materiales rígidos o semirrígidos, y en la gran mayoría de los rellenos se suele utilizar sílice, aunque también es posible encontrar rellenos basados en polímeros sintéticos. La calidad del gel de sílice para cromatografía depende de varios parámetros como por ejemplo la estructura interna., el tamaño de los granos, la porosidad abierta (dimensión y distribución de los poros), la superficie efectiva, la resistencia a la compresión y la polaridad. Sin embargo, los avances técnicos en la preparación de sílices de estructura conocida, con modificaciones químicas en la superficie, con poros y formas controladas, rangos amplios de pH, han permitido que este material de relleno sea el más utilizado en cromatografía de líquidos, desplazando así a los rellenos de polímero sintético.

Nombre comercial	Superficie específica.	ϕ poro	pH	Tipo de partícula
Hypersil	170 m ² /g	11,5 nm	9,0	esférica
LiChrosorb	100 -320 m ² /g	11,1 nm	7.0	irregular
Porasil	350 m ² /g	10.0 nm	7.2	irregular
Spherisorb	190 m ² /g	8,1 nm	9.5	esférica
Zorbax BPSil	300 m ² /g	5,6 nm	3.9	esférica
Pecosphere	300 m ² /g	8 nm	-	esférica

Figura 1-5: Propiedades de algunos rellenos comerciales basados en sílice.

- Tamaño de partícula del relleno

El tamaño de partícula está estrechamente relacionado con la eficacia de la separación ya que determina el número de platos teóricos. Las columnas con partículas de 3.5 micras son las utilizadas en equipos de HPLC convencionales. Las partículas más pequeñas ofrecen mayor tamaño de superficie y mejor separación, consiguiendo una mejor resolución.

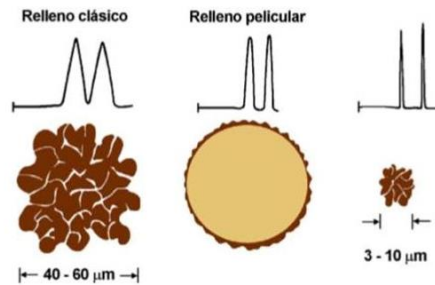


Figura 1-6: Comparación de tamaño de relleno de una columna de HPLC.

- Columnas de HPLC para fase reversa

En la cromatografía en fase inversa, la fase estacionaria es no-polar. La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil.

Los rellenos más comunes se preparan con sílice, son mecánicamente resistentes, porosos y uniformes, con diámetros entre 3 y 10 μm y se retiene la fase estacionaria sobre partículas de soportes. El grupo R del siloxano en estos recubrimientos son cadenas de tipo C_{18} (ODS n-octadecilo $-\text{C}_{18}\text{H}_{35}$), C_8 (n-octilo $-\text{C}_8\text{H}_{17}$), C_4 (butil $-\text{CH}_3$) y Ciano ($-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$).

Estas cadenas se alinean uno junto al otro y en perpendicular a la superficie de la partícula. Estos grupos orgánicos ligados producen un efecto similar al que tendría una capa extremadamente fina de disolvente orgánico sobre la superficie de las partículas de sílice, la distribución de los solutos entre la película superficial y la fase móvil se parece más a una extracción liquido-liquido. Además, cuanto más larga sea la cadena carbonada, la capa ligada se vuelve más orgánica.

Si la muestra tiene cadena carbonada ó grupo aromático la hidrofobicidad es fuerte, en cambio, si la muestra tiene grupo carboxílico, amino o hidroxilo la hidrofobicidad es débil. En el modo reverso, los solutos son eluidos según sus propiedades hidrofóbicas: el soluto más soluble está en el agua, y es el que sale más rápidamente de la columna.

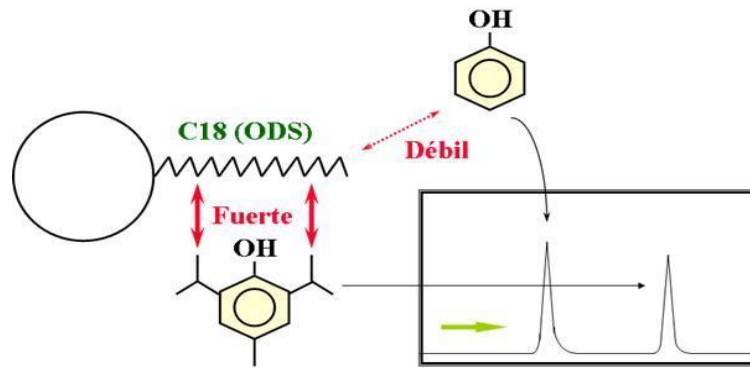


Figura 1-7: Características de hidrofobicidad entre fase estacionaria y el soluto.

Para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca delante una precolumna que elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. Además, se debe tomar la precaución de que el pH sea menor a 7,5, porque de lo contrario se puede producir la hidrólisis del siloxano, originando la destrucción del relleno.

1.7.4.4 Horno para columnas

Las prestaciones básicas que posee son: rango de temperatura: 4 a 80° C, control exactitud temperatura, 0.1 ° C, protección de temperatura máxima y sensor de pérdidas, corta automáticamente, enfría el horno cuando se detectan vapores orgánicos.

1.7.4.5 Detectores

Los detectores de HPLC miden una propiedad física o química de cada componente de la muestra que es eluida de la columna, provee información cualitativa y cuantitativa. La elección del detector depende de la naturaleza del analito, la sensibilidad y selectividad del detector.

Los detectores utilizados en HPLC son los siguientes:

- Detector Ultravioleta / Visible (UV/VIS): específico para compuestos que absorben luz.
- Detector por Arreglo de Fotodiodos (PDA): el pico se identifica usando el espectro UV.
- Detector de Fluorescencia (RF): detector específico, los compuestos deben ser fluorescentes.

- Detector de Conductividad (CDD): detector electroquímico específico para todos los iones.
- Detector de dispersión de luz en vapores: universal excepto para analitos volátiles.
- Detector viscosimétrico para disoluciones: volúmenes hidrodinámicos de un polímero.
- Detector de Índice de Refracción Diferencial (RID): detector universal. Mide cambios en el índice de refracción. No se puede usar con gradientes.
- Detector de Espectrómetro de Masas: universal.

1.7.4.6 Análisis del cromatograma y sus usos

Análisis cualitativos es la acción de identificar peak en el Cromatograma, de cada uno de los componentes de la muestra, la condición fundamental para hacerlo es la adecuada separación de las señales.

- Tiempo de retención (t_r):

Es el tiempo que la muestra permanece dentro de la columna y se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento del punto máximo de la señal o pico. Se expresa en minutos.

El tiempo de retención es siempre constante bajo condiciones experimentales cromatográficas idénticas. Es utilizado para identificación. ^[1]

- Tiempo de retención relativo (t_r')

Es la diferencia entre el tiempo de retención (t_r) y el tiempo muerto (t_o), es decir la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno en la columna. ^[1]

$$t_r' = t_r - t_o$$

- Tiempo muerto (t_o)

Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna. Se determina el tiempo de retención de la fase móvil misma.

1.7.4.7 Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo requiere que la relación entre la magnitud de la señal del detector y la cantidad de compuesto sea establecida. La señal del detector es medida por la altura o área del pico por medio de integrador o computador.

El área es proporcional a la cantidad de muestra inyectada y es usada para el cálculo de la concentración.

- Ancho del pico

Es la porción de la línea base interceptada pasando por el punto de inflexión, por líneas tangenciales trazadas a ambos lados de la señal cromatográfica. ^{[1] [2]}

Para picos Gausianos: $W_b = 4\sigma$

σ : Dispersión gaussiana de los valores

El valor de W_b se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia de los sistemas cromatográficos.

1.7.4.8 Evaluar la eficiencia en la separación y la performance de la columna

El cromatograma es utilizado también para evaluar la eficiencia de la separación y performance de la columna, para este efecto se utiliza los parámetros cromatográficos que se mencionan a continuación.

- Factor de capacidad (k')

El factor de capacidad, también definido como relación de distribución de masa (D), se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto del volumen inicial contenido en la columna (t_0). Este factor determina la retención de un soluto y puede ser calculado como:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Donde:

t_0 = tiempo en el que un compuesto no retenido pasa por el interior del sistema.

t_r = tiempo de retención del compuesto considerado.

Son aceptables valores de k' superiores a 1, consiguiéndose una óptima resolución con valores mayores a 2. Valores bajos de k' indica que el pico eluye muy próximo al frente de solvente, pudiendo verse comprometida la selectividad.

- Selectividad (α)

Es una indicación del grado de separación entre dos picos.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0}$$

Donde:

V_1 y V_2 = volumen de retención de los picos de solutos 1 y 2 respectivamente.

V_0 = volumen muerto de columna pico del solvente (pico no retenido).

El V_0 es aproximadamente el 50% del volumen de la columna, se calcula su valor mediante la siguiente fórmula:

$$V_0 \cong (\pi / 8 * 10^3) * D * L$$

Donde:

D= diámetro de la columna en mm

L= longitud de la columna en mm

Dos compuestos no pueden ser separados, si k' es exactamente el mismo para ambos.

- Número de platos teóricos

Es una medida de la eficacia del sistema cromatográfico, que expresa el número de picos que pueden aparecer en el cromatograma por unidad de tiempo y, por lo tanto, de la capacidad del sistema de proporcionar bandas de elusión estrecha.

El cálculo se basa en la relación entre el tiempo de retención y la anchura del pico cromatográfico. Se pueden emplear distintas fórmulas. En la Farmacopea Europea y Japonesa se considera:

$$N = 5,54 * \left(\frac{tr}{Wb_{0,5}} \right)^2$$

Donde:
 tr = tiempo de retención
 $Wb_{0.5}$ = anchura de pico al 50% de la altura.

En la siguiente figura se observa las variables a considerar en el pico para efecto de cálculos:

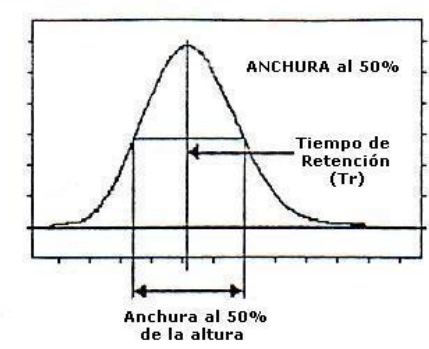


Figura 1-8: Anchura al 50% de la altura.

En la Farmacopea USP se utiliza la siguiente fórmula:

$$N = 16 * \left(\frac{tr}{Wb} \right)^2$$

Donde:
 tr = tiempo de retención
 Wb = anchura de pico en la línea de base determinado por la tangente ajustada a un % de la altura del pico tal como indica la figura.

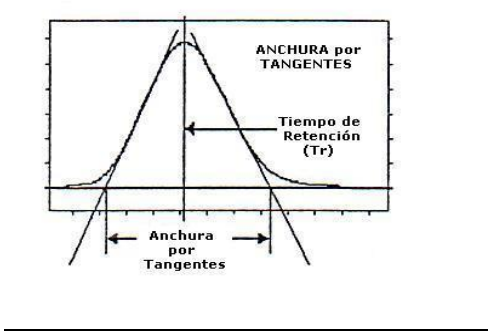


Figura 1-9: Anchura por tangentes.

Los parámetros que se pueden incidir para modificar el número de platos teóricos son la columna o soporte (longitud, calidad, tamaño de partícula) y las condiciones

cromatográficas de la metodología (temperatura, flujo, fase móvil, etc). Se recomienda que sea superior a 2000. ^[1]

- Altura equivalente de plato teórico

La altura equivalente de plato teórico está dada por la siguiente fórmula:

$$H = HEPT = \frac{L}{N}$$

Donde:

L= longitud de la columna expresada habitualmente en milímetros.

Si el valor de HETP es pequeño, significa un mayor número de platos por unidad de columna, por lo tanto, la columna es más eficiente.

- Resolución

Es la medida de separación entre dos picos. Este parámetro resulta muy útil para controlar el comportamiento de posibles interferencias. La fórmula de cálculo para la resolución es:

$$Rs = C * \frac{(tr_2 - tr_1)}{Wb_1 + Wb_2}$$

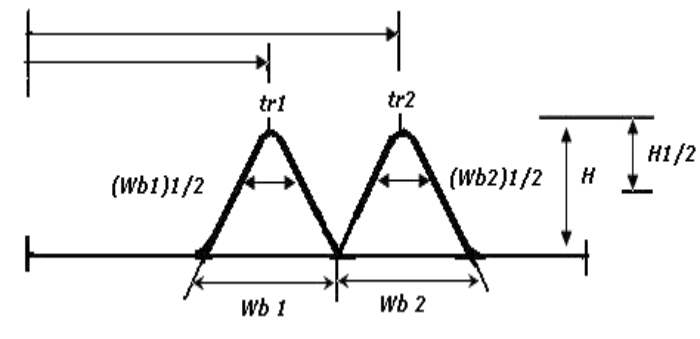


Figura 1-10: Resolución entre picos.

Donde:

tr_1 y tr_2 = tiempo de retención (tiempo de elusión del máximo del pico medido desde el inicio de la inyección), $tr_1 < tr_2$

C = constante cuyo valor varía según el criterio con el que se mida la anchura del pico.

$Wb_{1_{1/2}}$ y $Wb_{2_{1/2}}$ = ancho del pico al 50% de la altura. C = 1,18 (EP y JP)

Wb_1 y Wb_2 = anchura del pico por tangentes. C = 2,0 (USP)

En la siguiente fórmula se determina que la resolución es función de la selectividad, eficiencia de la columna y factor de capacidad:

$$Rs = 1/4 * \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \sqrt{N} \left(\frac{k'}{k'-1} \right)$$

Donde:

N = promedio de N₁ y N₂

k' = promedio de k'₁ y k'₂

Se aceptan valores de resolución de 1,5 pero es recomendable que sea superior a 2,0.

- Factor de Asimetría

Es la medida de la asimetría de la señal generada por el analito. ^[1] Mediante la siguiente fórmula se determina su valor:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2F}$$

Donde:

W_{0,05} = anchura al 5% de la altura del pico.

F = distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el frente al 5% de la altura del pico.

Un pico perfectamente simétrico tendrá un factor de asimetría de 1.0. Si presenta ensanchamiento por el inicio del pico tendrá valores inferiores y si presenta cola este valor será superior a la unidad. ^[1]

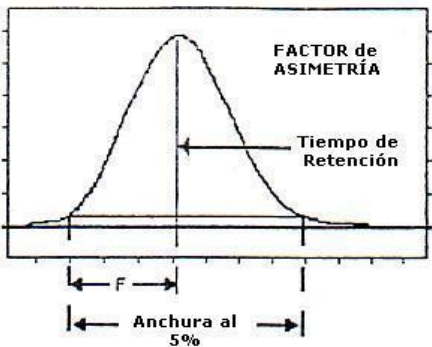


Figura 1-11: Anchura al 5% de la altura

Como norma general el factor de asimetría debería encontrarse entre 0.8 y 1.5, aunque pueden aceptarse valores de hasta 2.0.

1.8 INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA EN LA VALIDACIÓN

1.8.1 Fase móvil

La composición de la fase móvil en la determinación cuantitativa de Aspartame del método utilizado es 82% de buffer fosfato pH 4,3 y 18% de metanol grado HPLC.

1.8.2 Horno para columna

Se configura el horno a la temperatura de $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ de acuerdo con el procedimiento del análisis.

1.8.3 Columna fase reversa

Se utiliza columna LiChrospher RP 18 5 μm de tamaño de partícula, dimensiones 250 mm y 150 mm x 4,6 mm de diámetro.

El volumen de muestra que va hacia la columna es de 20 μL y la inyección es automática.

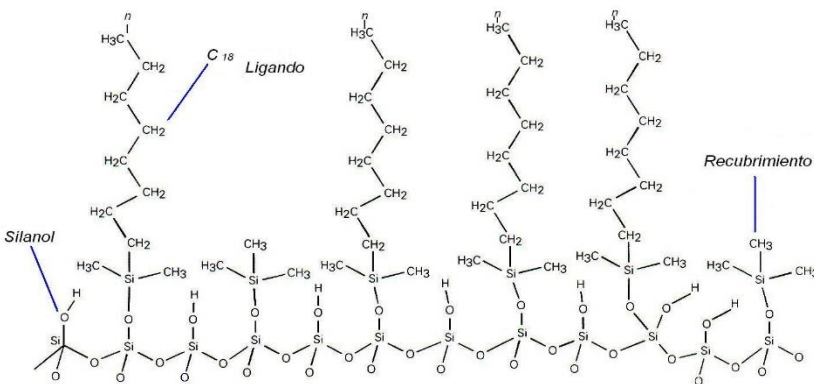


Figura 1-12: Superficie columna fase reversa RP18

En el relleno de la unión de las cadenas largas sobre la superficie no es completa, es decir, parte de la superficie de la sílice, inevitablemente, queda entre las regiones de la superficie hidrófoba. Estas superficies remanentes de sílice disminuyen la eficacia de la separación, produciendo ensanchamientos o colas en los picos. [3] Para mejorar la superficie de la fase reversa, estas áreas se recubren. Recubrimiento significa que, en una segunda reacción, grupos orgánicos de cadena corta (-CH₃) se unen a la superficie en la que los grupos de cadena larga no se habían unido.

1.8.4 Detector

En la realización de este trabajo, se utilizó una detección de analitos por medio de HPLC-UV/Vis con una longitud de onda fija de 210 nm. Esto se aplicó para la medición de Aspartame, a esta absorbancia es detectado el analito a un tiempo de retención de aproximadamente 15 minutos.

CAPÍTULO 2: VALIDACIÓN

2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Procedimiento para establecer por medio de estudios de laboratorio una demostración científica que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

El objetivo principal de la validación y la verificación es demostrar que el método utilizado por un laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así, como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados por este entregado. ^[2]

2.1.1 Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad de analito que se habrá de determinar en una matriz.

Para determinar el rango lineal se puede realizar un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como función de respuesta llamada curva de calibración. Esta se establece con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y patrones de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. Dado el caso se recomienda abarcar valores cercanos a cero y valores superiores LPM o al valor de interés. El número de punto a analizar deberá ser establecido por el analista y en general se utiliza un mínimo de cuatro valores. ^[2]

$$y = b * x + a$$

En la recta de regresión, **x** es la concentración, **y** la respuesta, **b** el valor de la pendiente y, **a** es el término independiente.

Para evaluar si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta se utilizan los siguientes parámetros con sus respectivas expresiones matemáticas:

- a) **Pendiente b:** se encuentra relacionada con la sensibilidad del método, suponiendo a mayor pendiente mayor sensibilidad, esto es, la respuesta del método frente a los cambios de concentración. Se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum X^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b) Término independiente a : u ordenada en el origen, es la intersección de la recta en el eje de las ordenadas y es indicativo de error sistemático:

$$a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

c) Coeficiente de correlación “ r ”: estima si los puntos experimentales se ajustan bien, o no a una línea recta, ^[12] por lo tanto, indica el grado de relación entre la variable independiente x y la variable dependiente y :

$$r = \frac{\sum [(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})]}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2 \sum (Y_i - \bar{Y})^2}}$$

Puede tener valores en el intervalo de $-1 \leq r \leq +1$. El valor recomendable para “ r ” es $\geq 0,999$, aunque en el caso de impurezas se admite $\geq 0,990$ al igual que en análisis de trazas.

d) Coeficiente de determinación “ r^2 ”: La información obtenida al calcular r es limitada y no justifica por sí sola la linealidad, siendo “ r^2 ” el que aporta mayor significación estadística debido a que expresa la proporción de la variación total de y explicada por el modelo. ^[1]

Los errores aleatorios en los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen de la recta de regresión son importantes. Entonces cualquier desviación de los puntos individuales respecto a la línea recta, proviene del error de la medición del área y que no existe error en los valores de X (los valores de estándares se conocen).

Se puede determinar el valor estimado para X_i y el valor residual respectivamente, donde i representa los grupos:

$$\hat{Y}_i = b * X_i + a$$

$$ei = \hat{Y}_i - Y_i$$

f) Varianza residual: la representación de los residuales ***ei*** aporta información acerca de la validez del modelo. La distribución debería ser aleatoria y no reflejar ninguna tendencia. ^[1]

$$S_{y/x}^2 = \frac{\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 2} = \frac{\sum e_i^2}{n - 2}$$

A partir de la varianza se puede obtener la desviación estándar de los residuales:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n - 2}}$$

g) Test de linealidad: se trata de comprobar que existe una pendiente significativamente distinta de cero mediante una prueba t de Student. ^[1] Para esto se determina el valor de la desviación estándar de la pendiente a partir del cálculo de la desviación estándar residual $S_{y/x}$:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{n \sum_i (X_i - \bar{X})^2}}$$

Se puede determinar la varianza de la pendiente:

$$S_b^2 = \frac{S_{y/x}^2}{\sum X^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

La pendiente tiene que ser estadísticamente distinta de cero para un grado de significación α igual a 0,05. ^[1]

$$t_{\text{exp}} = \frac{|b|}{S_b}$$

También se puede calcular los intervalos de confianza con valor de distribución t de Student para n-2 grados de libertad y un grado de significación α 0,05:

$$b \pm t * S_b$$

Las hipótesis planteadas son las siguientes:

H1: Estos intervalos de confianza no incluyen el cero.

H0: Estos intervalos de confianza incluyen el cero.

h) Test de proporcionalidad: permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas determinado si la variable independiente es significativamente distinta a cero. ^[1] Para esto se determina el valor de la desviación estándar de la ordenada en el origen a partir del cálculo de la desviación estándar residual $S_{y/x}$:

$$S_a = S_{y/x} * \sqrt{\frac{\sum_i X_i^2}{n \sum_i (X_i - \bar{X})^2}}$$

Además, se puede calcular la varianza del término independiente:

$$S_a^2 = \frac{S_{y/x}^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2} \times \frac{\sum X^2}{n}$$

La ordenada en el origen tiene que ser estadísticamente igual a cero para el grado de significación elegido. ^[1]

$$t_{\text{exp}} = \frac{|a|}{S_a}$$

Al igual que en caso de la pendiente, se puede calcular los intervalos de confianza con valor de distribución t de Student para $n-2$ grados de libertad y un grado de significación $\alpha 0,05$:

$$a \pm t^* S_a$$

Las hipótesis planteadas son las siguientes:

H1: Estos intervalos de confianza incluyen el cero.

H0: Estos intervalos de confianza no incluyen el cero.

h) Límites de Confianza

Para determinar los límites de confianza de los puntos observados, suponiendo que estén normalmente distribuidos alrededor de la línea de regresión, cabe esperar que el 68% de esos puntos se encuentren dentro de $\pm 1 S_{x/y}$, 95,5% dentro de $\pm 2 S_{x/y}$ y 99,7% dentro de $\pm 3 S_{x/y}$. El error estándar de la estimación se mide a lo largo del eje “Y”. Se debe usar la distribución t ($n < 30$) para evitar imprecisiones.

Los intervalos de predicción anteriores son aproximados. En efecto, los estadísticos pueden calcular el error estándar de la predicción, S_p , aplicando la siguiente fórmula: [10]

$$S_p = S_{x/y} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{X} - X_0)^2}{\sum X^2 - n\bar{X}^2}}$$

Donde:

$S_{x/y}$ = error típico ó error estándar de la estimación.

X_0 = valor específico de X para predecir el valor de Y .

Entonces, $\pm t S_p$ corresponde a los límites de tolerancia o de confianza para los respectivos valores de “Y” en la recta de regresión. En la gráfica de la recta de regresión, estos límites definen dos hipérbolas, donde los puntos cercanos al centro del intervalo

“X”, son los que tienen límites más estrechos y los puntos situados en ambos extremos del intervalo son los que tienen límites más amplios. Por otro lado, para $S_p = S_{x/y}$ las hipérbolas se transforman en rectas.

2.1.2 Límite de cuantificación

Límites de cuantificación corresponden a una concentración mínima de un analito que puede medirse dentro de los límites especificados de precisión y exactitud.

Corresponde a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo las condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud. ^[1] Es por tanto un término cuantitativo el cuál se expresa en unidades de concentración (%; ppm, ppb, etc.). Entonces la ecuación estaría dada por:

$$Y = Y_B + 10S_B$$

$$Y_B = a = \text{intercepto del eje Y ya calculado}$$

$$S_B = S_{x/y} = \text{error de los puntos que conforman la curva de calibrado.}$$

Luego Y se reemplaza en la ecuación de la curva correspondiente a la concentración de Aspartame medido en la muestra.

2.1.3 Precisión

El objetivo de estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de estos errores los análisis efectuados.

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i y $\bar{X}$ el estimador de la medida poblacional calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula matemáticamente de la siguiente manera:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Ambos estimadores, S y RSD permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida.

2.1.3.1 Repetibilidad

Es la precisión entre determinaciones independientes realizada en las mismas condiciones (un solo operador, el mismo equipo, los mismos reactivos, el mismo día, etc.). Se lleva a cabo sobre la base de un número suficiente de determinaciones de una mezcla homogénea del producto.

2.1.3.2 Reproducibilidad

Es la precisión entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones. Debe ser desarrollada en diferentes días, por diferentes personas, empleando diferentes reactivos, columnas, etc. La reproducibilidad describe la máxima variabilidad de un procedimiento analítico ya que incluye el estudio en diferentes condiciones.

2.1.4 Exactitud

2.1.4.1 Veracidad

Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado.

La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

- Sesgo (s)

La diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio.^[2]

Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado, material control, material ensayo de aptitud: Para este fin, se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido. Una diferencia sistemática importante en relación con el valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método.

$$s = X - X_a$$

Donde:

S= sesgo

X = lectura obtenida o valor promedio de las lecturas obtenidas.

Xa = valor asignado, valor certificado del material de referencia o valor esperado.

Para evaluar el sesgo, se debe realizar la prueba t, en la cual el $t_{obs} < t_{crit}$:

$$t_{calc} = \frac{X_a - X}{S \times \sqrt{n}}$$

Donde:

t calc= t observado o calculado

Xa = Valor esperado o valor certificado en concentración

X= Promedio de valores leídos u observados en concentración

S= Desviación estándar

n= Número de lecturas o valores observados.

Buscar t- Student teórico en tabla para grados de libertad (v) y el porcentaje de seguridad deseado (1- α) para un error α . Usualmente se trabaja con un valor de 0,05.

2.1.4.2 Recuperación

Dado que la exactitud es el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado, también esta indica la proximidad de la medición con respecto del valor de referencia que se ha usado para calibrar el instrumento, expresándose como porcentaje de recuperación (%R). Para calcular la exactitud, en el caso de no existir patrones de referencia certificados para el analito en cuestión se recurre a la determinación de la “Recuperación”, para ello debe usarse un blanco de

muestra adicionado de una cantidad conocida de analito, sometido al procedimiento analítico.

La muestra de concentración conocida se prepara a partir de un placebo cargado con cantidades conocidas de analito. El analito se determina en cada muestra utilizando el mismo método analítico a evaluar y se calcula la recuperación. ^[1]

La exactitud se expresará como porcentaje de recuperación.

$$R = \left(\frac{X_m}{\mu} \right) * 100$$

Donde:

R = Porcentaje de recuperación

X_m = valor hallado en la fórmula anterior

μ = valor aceptado como verdadero

a) Para establecer si la recuperación media difiere significativamente del valor aceptado como valor verdadero se aplica la siguiente prueba de t:

b)

$$t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R| * \sqrt{n}}{CV}$$

Donde:

t_{exp} = es el valor t de Student experimental

R = es la recuperación media porcentual

n = es el número de determinaciones

CV = es el coeficiente de variación

El t_{exp} calculado tiene valor de distribución t de Student para n-1 grados de libertad y un grado de significación α 0,05:

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, por lo que la exactitud es correcta.

2.1.5 Robustez

La robustez se define como la medida de la capacidad de un método analítico de permanecer inalterado ante variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de fiabilidad o estabilidad. ^[1]

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir en qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de resultados confiables. Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas.^[2]

A continuación, se detallan los ajustes permitidos para HPLC, de acuerdo con las condiciones cromatográficas originales que se definieron para modificar:

- a. pH de la fase móvil: Se trabaja la comparación entre distintos pH de la fase móvil. Siendo pH 4,3 el original del método y pH 4,1 uno menor. Se analizarán los resultados obtenidos con estas variables.
- b. Temperatura del horno: Esta variable es indispensable para la optimización del método. Por lo tanto, se miden las muestras en dos rangos de temperatura de 40°C, que corresponde a la original del método y a 38°C. Estableciendo como se ve afectada la separación por estas dos componentes.
- c. Estabilidad de la muestra: La muestra se analizará al 1er día de su preparación, luego se medirá nuevamente a los 4 días y se determina la variación que existe entre los resultados y comprobando su estabilidad.

Para esta determinación se aplica la prueba de Youden y Steiner para la evaluación de la robustez de un método químico analítico. Este procedimiento permite evaluar el efecto de siete variables con sólo ocho análisis de una muestra. ^[2]

Tabla 2-2: Prueba de Robustez de Younden y Steiner

CONDICION VARIABLE		ANALISIS							
Variable	(X-x)	1	2	3	4	5	6	7	8
pH Solución tampón	4,3-4,1	4,3	4,3	4,3	4,3	4,1	4,1	4,1	4,1
Temperatura columna °C	40-38	40	40	38	38	40	40	38	38
Estabilidad	1-4	1	4	1	4	1	4	1	4
Resultados		S	T	U	V	W	X	Y	Z

Se deben establecer las siete comparaciones posibles, es decir las diferencias entre la variable de mayor valor versus la de menor valor:

$$(A - a), (B - b), (C - c), (D - d), (E - e), (F - f) \text{ y } (G - g)$$

De este modo se puede conocer el efecto de cada variable. En este sentido, cuanto mayor sea la diferencia de los resultados entre el valor mayor y el valor menor ($\Delta = X - x$), mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico. ^[2]

Como criterio de aceptación para la robustez del método se considera que la diferencia entre el valor alto y el valor bajo sea superior a $\sqrt{2}$ de la desviación estándar de la precisión del método (S), es decir:

$$(X - x) < \sqrt{2} S.$$

En la prueba de Youden la desviación estándar de los resultados s a z constituye una medida excelente de la imprecisión previsible del método cuando se utiliza para el análisis de rutina, ya que este procedimiento introduce deliberadamente el tipo de variación en las variables que puede esperarse que ocurra durante el empleo normal del método. ^[2]

2.1.6 Incertidumbre

La incertidumbre de una medición es el parámetro asociado al resultado, es decir, caracteriza la dispersión de los valores que razonablemente pueden ser atribuidos al mesurando. En este sentido, es importante que, para un método validado o verificado por el laboratorio, se realice la determinación de las diferentes fuentes o componentes de la incertidumbre de la medición presentes:

- a) Muestreo
- b) Efectos de la muestra: tipo de matriz, almacenamiento, etc.
- c) Sesgos Instrumentales: Las debidas a las características de los equipos utilizados para realizar las medidas tales como: deriva, resolución, magnitudes de influencia. Ejemplo: temperatura
- d) Pureza de Reactivos: materiales de referencia, preparación de estándares.
- e) Analista: Las debidas a la serie de mediciones: variaciones en observaciones repetidas bajo condiciones aparentemente iguales. Ejemplo: paralelaje
- f) Condiciones de medición: Las debidas al certificado de calibración: en él se establecen las correcciones y las incertidumbres asociadas a ellas, para un valor de k determinado, en las condiciones de calibración. Ejemplo: material volumétrico, etc.

g) Condiciones de medición: temperatura, humedad, etc.

h) Otras: Método (por ejemplo, al interpolar en una recta), tablas (por ejemplo, las constantes), pesada, alícuota, efectos computacionales, etc. Generalmente para el análisis de las fuentes de incertidumbre se utiliza el diagrama de espina de pescado u otro tipo de diseño esquemático que permita con facilidad identificar las fuentes de incertidumbre presentes durante el proceso analítico.^[2]

La incertidumbre de la medición comprende, en general, muchos componentes. Algunos de estos pueden ser evaluados por tipo. Para este fin el laboratorio deberá realizar una evaluación de las incertidumbres tipo A y B que están presentes en el método:

- Evaluación de incertidumbre tipo A: Evaluación de un componente por un análisis estadístico de los valores de mediciones obtenidos en condiciones de medición definidas. Ejemplo: realizar varias mediciones en condiciones de repetibilidad.^[2]
- Evaluación de incertidumbre tipo B: Evaluación de un componente incertidumbre de la medición realizada por otros medios distinto a los del tipo A. Ejemplos: La evaluación basada en la información, obtenidos a partir de un certificado de calibración, obtenidos a partir de los límites deducirse a través de personal la experiencia, etc. En general, la incertidumbre está dada por los errores sistemáticos y aleatorios presentes en el ensayo analítico.^[2]

La determinación de la incertidumbre incluye generalmente 4 pasos, el primero como se ha dicho anteriormente corresponde a la determinación de las fuentes, el segundo en expresar los componentes en una incertidumbre estándar, el tercero combinar las diferentes incertidumbres y el cuarto paso es la determinación de la incertidumbre expandida es decir, multiplicar la incertidumbre combinada por un factor de cobertura de $k = 2$, a fin de entregar un 95% de confianza, y así establecer el intervalo entorno al resultado de la medición en el cual se puede esperar que se incluya la mayor fracción de la distribución de los valores que se pueden atribuir razonablemente al mesurando.^[2]

2.2 VALIDACIÓN PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES

2.2.1 Precisión

La precisión mide el grado de concordancia entre los resultados analíticos obtenidos de una serie de mediciones repetidas del mismo analito realizadas en las condiciones previstas en el método. La precisión refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza un método.

2.2.1.1 Repetibilidad

La reproducibilidad es expresada cuantitativamente en términos de las características de dispersión de los resultados. Es la cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas, efectuadas en las mismas condiciones de medición.

Las condiciones de repetibilidad son: el mismo procedimiento de medición, el mismo analista, el mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones, el mismo lugar y repetición dentro de un período de tiempo corto. ^[2]

- Se realizan en un mismo día y equipo 6 mediciones de cenizas totales de cada muestra de Zuko Nacional en su variedad de sabores.
- Se calcula el promedio de las lecturas obtenidas (ϕ) y la desviación estándar (σ).
- Se calcula el % de coeficiente de variación (%CV).

2.2.1.2 Reproducibilidad

El termino reproducibilidad es la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas bajo condiciones de medición que cambian, esta se expresa en forma cuantitativa y en función de las características de la dispersión de los resultados.

- Se realiza en diferentes semanas y en distintos equipos un total de 10 mediciones de cenizas totales de Zuko Nacional en su variedad de sabores.
- Se calcula el promedio de las lecturas obtenidas (ϕ) y la desviación estándar (σ).
- Se calcula el % de coeficiente de variación (%CV_R).

Los métodos para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad de las mediciones están basados en la evaluación estadística de las dispersiones de los resultados.

2.2.1.3 Incertidumbre

En el método de determinación de ceniza totales la incertidumbre esta principalmente determinada por la función calibración, específicamente por linealidad de la balanza. Al estimar la incertidumbre en una determinación gravimétrica en particular, la calibración de la balanza y la repetibilidad del método de ensayo constituyen las fuentes de incertidumbre más significativas.

2.3 VALIDACIÓN DE CUANTIFICACIÓN DE ASPARTAME VÍA HPLC

2.3.1 Linealidad

La linealidad es evaluada en 5 niveles de concentración de aproximadamente 4, 10, 21, 30 y 40 ppm. Las muestras para analizar se deben preparar a partir de estándares de analito o sea una única solución stock de la cual se tomarán las concentraciones requeridas para el análisis.

Se analizaron los resultados a través de la determinación de la ecuación de la recta. Además, se determina los límites de tolerancia o de confianza para los respectivos valores de “Y” en la recta de regresión.

- Se grafica área de peak v/s Concentración de Aspartame.
- Se calcula el coeficiente de correlación (r) promedio.
- Determinar el valor de coeficiente de correlación promedio de las 3 curvas. Criterio de aceptabilidad: $r > 0,99$.
- Se calcula el t-student, se considera un 95% de confianza ($\alpha = 0,05$), con n-2 grados de libertad y n=5 inyecciones.

2.3.2 Límites (criterio de aceptabilidad)

Para límite de cuantificación se utiliza el método de extrapolación de la recta de calibrado, que consiste en analizar muestras de estándar con concentraciones conocidas próximas al límite de cuantificación y calcular la ecuación de la recta en un gráfico de respuesta v/s concentración. ^[3]

Se debe tener en consideración los siguientes parámetros: Valor crítico, limite detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ). ^[3]

Límite crítico (LC):

- Se inyecta 10 veces el STD de aproximadamente 4 ppm de Aspartame.
- Se calcula la desviación estándar σ .
- $LC = 1,645 \times \sigma$

Límite de detección (LOD):

- $LOD = 3,29 \times \sigma$

Límite de cuantificación (LOQ):

- $LOQ = 10 \times \sigma$

2.3.3 Precisión

La precisión se establece en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados.

2.3.3.1 Repetibilidad

Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo.

- Se inyecta en un mismo día 6 veces una muestra de Zuko Nacional Naranja a una concentración que calce dentro de la curva de concentración.
- Se calcula el promedio de las lecturas obtenidas (ϕ) y la desviación estándar (σ).
- Se calcula el % de coeficiente de variación (%CV).

2.3.3.2 Reproducibilidad

Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros.

- Se inyectan 4 muestras de Zuko Nacional Naranja, en un mismo día a diferentes horas a una concentración que calce dentro de la curva de calibración.

- Se calcula el promedio de las lecturas obtenidas (ϕ) y la desviación estándar (σ).
- Se calcula el % de coeficiente de variación ($\%CV_R$).

2.3.4 Veracidad

Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado.

La veracidad es determinada por el sesgo y recuperación:

2.3.4.1 Sesgo

La diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio.

- Se inyecta en un mismo día 10 veces el STD de aproximadamente 21 ppm de Aspartame.
- Se calcula el promedio de las lecturas obtenidas (ϕ) y la desviación estándar (σ).
- Se calcula el sesgo = $\phi - (\text{concentración real de STD Aspartame})$
- Se calcula el t-student, se considera un 95% de confianza ($\alpha=0,05$), con n-1 grados de libertad y n=10 inyecciones.
- Si $t_{calc} < 2,571$, se acepta el resultado.

2.3.4.2 Recuperación (R)

Es la fracción de la sustancia agregada a la muestra (muestra fortificada) antes del análisis, al ser analizadas muestras fortificadas y sin fortificar. La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original.

- Se inyecta en un mismo día 6 veces una matriz de muestra.
- Se calcula la concentración de Aspartame de la matriz (C_0)
- Se fortifica la matriz con solución stock de Aspartame de modo tal que en el volumen total de la matriz hayan aproximadamente 4 ppm de Aspartame STD (C_a)

- Se inyecta 6 veces la matriz fortificada y se calcula la concentración de Aspartame (C_e)
- Se calcula el porcentaje de recuperación
- Se calcula el promedio de los %R (ϕ) y la desviación estándar (σ).
- Se calcula el t-student, se considera un 95% de confianza ($\alpha=0,05$), con n-1 grados de libertad y n=6 inyecciones
- Si $t_{ob} < 2,571$, se acepta el resultado

2.3.5 Robustez

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir en qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de estos resultados confiables.

Se inyecta una la muestra Zuko Nacional Naranja, en duplicado, bajo las condiciones descritas en la tabla.

Criterios:

- pH: Un cambio en el pH en la fase móvil afecta directamente en el tiempo de retención y elución completa del analito.
- Temperatura: El cambio de temperatura afecta directamente en el tiempo de retención y elución completa del analito.
- Estabilidad de la muestra: El Aspartame en estado acuoso es inestable en el tiempo.

Tabla 2-3 Criterios de Validación de Aspartame en la prueba de Robustez.

CONDICION VARIABLE		ANALISIS								
Variable	valor alto	valor bajo	1	2	3	4	5	6	7	8
pH Solución tampón	4,3	4,1	4,3	4,3	4,3	4,3	4,1	4,1	4,1	4,1
Temperatura columna	40°C	38°C	40	40	38	38	40	40	38	38
Estabilidad	1º día	4º día	1	4	1	4	1	4	1	4
Resultados			s	t	u	v	w	x	y	z

Cálculos:

- $V_A = \{(s+t+u+v) - (w+x+y+z)\} / 4$
- $V_B = \{(s+t+w+x) - (u+v+y+z)\} / 4$
- $V_C = \{(s+u+w+y) - (t+v+x+z)\} / 4$

Si $V_i < \sigma \times \sqrt{2}$ entonces es robusto en el paralelo “i” con σ desviación estándar de reproducibilidad dada anteriormente.

2.3.6 Incertidumbre

Especificación del medurado: Se mide el analito de Aspartame en unidades de mg/100g.

2.3.6.1 Identificación de las fuentes de incertidumbre:

Ambiente:

- Humedad relativa del laboratorio: no se considera dado que el laboratorio se mantiene con aire acondicionado que mantiene la humedad de este.
- Presión atmosférica del laboratorio: no se considera relevante.
- Temperatura del laboratorio: el laboratorio esta provisto de aire acondicionado, rango de trabajo permitido $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con distribución rectangular, entonces $\mu = 2/\sqrt{3} = 1.155^\circ\text{C}$;

$$\mu_{\text{relativa ambiente}} = 1.155^\circ\text{C}/20^\circ\text{C} = 0.058$$

Analista:

- Error de cálculo: no se considera dados que los cálculos se realizan directamente en el cromatógrafo.
- Error de lectura del resultado: no se considera dado que el analista ha sido entrenado en la triangulación del peak.
- Falta de capacitación, inexperiencia del analista, mala aplicación del ensayo y mala operación del equipo: no se considera dado que existe el ensayo e instructivo del equipo descrito claramente, el analista es un profesional titulado y fue capacitado en el ensayo y en el uso del equipo.
- Falta de supervisión en las tareas: no se considera dado que antes y durante la ejecución del ensayo se ponen a punto todos los detalles.

Ensayo:

Materiales: el material del laboratorio es clase A y se considera una distribución rectangular, por lo que:

Matraz aforado 1L ± 0.4 ml, entonces $\mu = 0.4/\sqrt{6} = 0.163$,

$$\mu_{\text{relativa 1L}} = 0.163\text{ml} / 1000\text{ml} = 1.63 \times 10^{-4}$$

- Matraz aforado 500 ml ± 0.25 ml, entonces $\mu = 0.102$,

$$\mu_{\text{relativa 500ml}} = 2.04 \times 10^{-4}$$

- Matraz aforado de 250 ml ± 0.15 ml, entonces $\mu = 0.061$,

$$\mu_{\text{relativa 250ml}} = 2.45 \times 10^{-4}$$

- Matraz aforado de 50 ml ± 0.06 ml, entonces $\mu = 0.025$,

$$\mu_{\text{relativa 50ml}} = 4.90 \times 10^{-4}$$

- Matraz aforado de 25 ml ± 0.04 ml, entonces $\mu = 0.016$,

$$\mu_{\text{relativa 25ml}} = 6.53 \times 10^{-4}$$

- Matraz aforado de 10 ml ± 0.04 ml, entonces $\mu = 0.016$,

$$\mu_{\text{relativa 10ml}} = 1.63 \times 10^{-3}$$

- Micropipeta 100-1000 μ L, incertidumbre entregada en el certificado CESMEC SMB-17263/13 $\mu_{\text{relativa}} = \sqrt{\Sigma(\mu/\text{volumen nominal})}$

$$\mu_{\text{relativa 1000}\mu\text{L}} = 0.003$$

- Deformación del material por cambios de temperatura = $(\text{volumen} \times \Delta t \times \beta) / \sqrt{3}$
(distribución rectangular)

Donde $\Delta t = 2^\circ\text{C}$ que es el intervalo de trabajo de la temperatura ambiente del laboratorio $\beta = 2.1 \times 10^{-4}^\circ\text{C}$ que es el coeficiente de expansión volumétrica del agua

Matraz aforado de 1L, $\mu = (1000\text{ml} \times 2 \times 2.1 \times 10^{-4}) / \sqrt{3} = 0.243$,

$$\mu_{\text{relativa 1L}} = 0.243\text{ml}/1000\text{ml} = 2.43 \times 10^{-4}$$

Matraz aforado de 500ml, $\mu = 0.121$, $\mu_{\text{relativa 500ml}} = 2.42 \times 10^{-4}$

Matraz aforado de 250ml, $\mu = 0.061$, $\mu_{\text{relativa 250ml}} = 2.43 \times 10^{-4}$

Matraz aforado de 50ml, $\mu = 0.012$, $\mu_{\text{relativa 50ml}} = 2.43 \times 10^{-4}$

Matraz aforado de 25ml, $\mu = 0.006$, $\mu_{\text{relativa 25ml}} = 2.43 \times 10^{-4}$

Matraz aforado de 10ml, $\mu = 0.002$, $\mu_{\text{relativa 10ml}} = 2.43 \times 10^{-4}$

Validación: el método está validado por lo que:

- Linealidad: a partir de los intervalos de confianza I_a y I_b se asumirá una distribución rectangular ($1/\sqrt{3}$)
- Repetibilidad: $\mu_{\text{relativa repet}} = \sigma_{\text{repet}}$
- Reproducibilidad: $\mu_{\text{relativa reprod}} = \sigma_{\text{reprod}}$
- Sesgo: $\mu_{\text{relativa sesgo}} = \sigma_{\text{sesgo}}$
- Recuperación: $\mu_{\text{relativa recup}} = \sigma_{\text{recup}}$

Equipo:

- Calibración: se considerará en la linealidad
- Deriva: no se considera, es un error que involucra la no inyección de la muestra repetición del ensayo
- Ruido: idem deriva
- Mantenimiento: se realiza anualmente, si no pasa la calibración el equipo no es utilizado
- Exactitud:
- BOMBA, incertidumbre entregada por el certificado

$$\text{HPLC } \mu_{\text{relativa flujo}} = 0.012, \mu_{\text{relativa gradiente}} = 0.029$$

- HORNO: incertidumbre entregada por el certificado

$$\text{HPLC } \mu_{\text{relativa horno}} = 0.015$$

- DETECTOR: incertidumbre entregada por el certificado

$$\text{HPLC } \mu_{\text{relativa detector}} = 8.801 \times 10^{-4}$$

- Sensibilidad: se considera en la linealidad
- Software: es un software patentado que no se puede intervenir a menos que se conozcan las claves que deben ser solicitadas directamente con el proveedor del equipo, cualquier falla presente impedirá su ejecución.
- Verificación: no se considera dado que se realiza cada vez que se hace la prueba de ruido y deriva, si no pasa la prueba no se realiza la inyección.

Materiales y reactivos:

- Agua grado HPLC: incertidumbre entregada por el certificado

$$\mu_{\text{relativa}} = 0.063$$

- Pureza STD Aspartame 100+1 (SIGMA), entonces $\mu = 0.5/\sqrt{3} = 0.577$,

$$\mu_{\text{relativa STD}} = 0.577/100 = 5.774 \times 10^{-3}$$

- Pureza Metanol 99.9±0.1% (MERCK), entonces $\mu_{\text{relativa MeOH}} = 0.1/\sqrt{3} = 0.058$,

$$\mu_{\text{relativa MeOH}} = 0.058/99.9 = 5.779 \times 10^{-4}$$

- Pureza Fosfato Monopotásico 100 ± 0.5% (MERCK), $\mu = 0.5/\sqrt{3} = 0.289$,

$$\mu_{\text{relativa fosfato}} = 0.289/100 = 2.887 \times 10^{-3}$$

- No se considera el ácido fosfórico ya que solo se utilizan unas gotas para ajustar el pH.

Medición:

- Dilución de la muestra: se considera esta incertidumbre como parte de la incertidumbre en la preparación de muestra, reactivos, material de vidrio y efecto del paralelaje.
- Efecto luz/estabilidad: esto depende de la robustez, si el ensayo es robusto este método no interferirá; si no es robusto se corrige manteniendo las muestras a oscuridad hasta el momento de la inyección y, por ende, no interfiere.

- Paralelaje: se llena 10 veces el matraz utilizado, se pesa y cuantifica la desviación estándar de los resultados.
- Matraz de aforado 1 L, $\mu = \sigma/\sqrt{6} = Y_{1000}$, $\mu_{\text{relativa1L}} = Y_{1000}/1000\text{ml}$
- Matraz aforado 500 ml, entonces $\mu = Y_{500}$, $\mu_{\text{relativa500ml}} = Y_{500}/500\text{ml}$
- Matraz aforado 250 ml, entonces $\mu = Y_{250}$, $\mu_{\text{relativa250ml}} = Y_{250}/250\text{ml}$
- Matraz aforado 50 ml, entonces $\mu = Y_{50}$, $\mu_{\text{relativa50ml}} = Y_{50}/50\text{ml}$
- Matraz aforado 25 ml, entonces $\mu = Y_{25}$, $\mu_{\text{relativa25ml}} = Y_{25}/25\text{ml}$
- Matraz aforado 10 ml, entonces $\mu = Y_{10}$, $\mu_{\text{relativa10ml}} = Y_{10}/10\text{ml}$

- Pesada de muestras/ reactivos:

- Balanza de precisión ISHIDA IB5000, incertidumbre entregada por el certificado
 $\mu_{\text{relativa}} = \sqrt{\sum(\mu/\text{carga nominal})}$

$$\mu_{\text{ISHIDA}} = 5.015 \times 10^4$$

- Balanza semmicroanalitica, incertidumbre entregada por el certificado de análisis

$$\mu_{\text{semimicro}} = 3.804 \times 10^{-6}$$

- Balanza de precisión PB-303S, incertidumbre entregada por el certificado

$$\mu_{\text{PB-303S}} = 2.198 \times 10^{-5}$$

- Preparación de reactivos: se considera la incertidumbre de la preparación de reactivos y la más representativa es la incertidumbre del peachimetro con el que se preparara el buffer de la fase móvil.

$$\mu_{\text{pH}} = 0.129/6.16 = 0.021$$

- Temperatura del análisis: depende de la robustez, si el ensayo es robusto este parámetro no interferirá; si no es robusto se corrige manteniendo a 40°C la columna y, por ende, no interfiere.
- Tratamiento de la muestra: no se considera dado que es una simple dilución.

CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DETERMINACIÓN CENIZAS TOTALES

El método de la AOAC se basa en la destrucción de la materia orgánica presente en la muestra por calcinamiento, hasta llegar a peso constante, determinándose gravimétricamente el contenido de materia inorgánica.

Materiales

- Agitador-calefactor (Placa calefactora)
- Balanza con sensibilidad $> 0.01\text{g}$
- Molino
- Crisoles de porcelana con tapa
- Desecador
- Cucharas
- Guantes de protección contra el calor
- Mufla Barnstead modelo FB1410M-26
- Mufla Barnstead modelo FB1410M-33
- Pinzas para mufla
- Pizeta
- Rejilla de amianto
- Guantes de nitrilo

3.1.1 Procedimiento para la determinación de Cenizas totales

Se toman aproximadamente 6 gramos de muestra en un crisol de porcelana a peso constante, las muestras que fueron pre-calcinadas sobre una placa calefactora hasta que deja de desprender humos; posteriormente fueron calcinadas en una mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ por mínimo 8 horas, dejando enfriar y pesar para la obtención de resultados.

3.1.2 Preparación de crisoles

Se debe realizar para mantener correctamente los crisoles de porcelana que se utilizaran en el análisis de cenizas. Se realiza cada vez que se van a utilizar y se comienzan a preparar 24 horas antes de ser utilizados.

Descripción de actividades:

- Lavar los crisoles con detergente sacando los restos de muestras anteriores, se enjuagan con abundante agua.
- Se dejan reposar 2 horas en Extran MA 02 Neutro, tanto el crisol como su respectiva tapa
- Se lavan con abundante agua destilada
- Llevar los crisoles a la mufla a 105°C por 1 hora.
- Aumenta la temperatura hasta llegar a 600°C por 4 horas.
- Luego de transcurrido el tiempo en la mufla, revisar los crisoles con ayuda de las pinzas verificando que no se encuentren trizados, si es así descartar inmediatamente, en caso contrario continuar.
- Traspasar al desecador y dejar enfriar 30-40 minutos, quedando listos para ser utilizados.

3.1.3 Tratamiento de la muestra

Se seca el contenido del sobre de ZUKO NACIONAL 20g/L por método de estufa 4 horas a 105°C hasta peso constante. Para que la muestra a trabajar sea homogénea se tritura previamente con molino el contenido del sobre de quedando un polvo fino y seco listo para el análisis.

3.1.4 Procedimiento

- Se pesa en balanza analítica el crisol con su respectiva tapa y se registra como M_0 .
- Traspasar al crisol una cantidad de 5 a 6 gramos de muestra triturada y seca. Registrar la pesada como M_1 .
- Se lleva el crisol con ayuda de las pinzas y una rejilla de amianto a una placa calefactora y calentar gradualmente hasta llegar a 420°C. Teniéndose la precaución de retirar el crisol cada vez que la muestra caramelizada empiece a subir, para volver a colocarlo en la placa una vez que ésta baja. Cuando esté totalmente derretida y quemada (café oscuro), se agrega un poco de agua cubriéndose la superficie de la parte quemada y dejar que se evapore completamente.

- Trasladar el crisol a la mufla con ayuda de las pinzas y rejilla para iniciar la calcinación a $200\pm 20^{\circ}\text{C}$. Se aumenta lentamente la temperatura hasta $550\pm 25^{\circ}\text{C}$ dependiendo de la cantidad de humo que se genere y que la muestra previamente quemada no rebalse el crisol.
- La calcinación debe durar como mínimo 8 horas o hasta cenizas blancas o grisáceas. Luego traspasar al desecador y dejar enfriar 30-40 minutos.
- Se humedecen las cenizas obtenidas con un poco de agua destilada y dejar secar en la plancha calefactora. Por último, llevar nuevamente a la mufla durante 2 horas, pero esta vez calcinar a $800\pm 25^{\circ}\text{C}$.
- Traspasar nuevamente al desecador, se deja enfriar y pesar. Registrar la pesada como M_2 .

3.1.5 Expresión de resultados

Calculo:

$$\text{Cenizas}(\%p/p) = \frac{(M_2 - M_0) \times 100}{M_1}$$

Donde: M_0 = gramos de crisol con tapa vacío.

M_1 = gramos de muestra seca.

M_2 = gramos del crisol con tapa más las cenizas.

3.2 DETERMINACIÓN DE ASPARTAME VÍA HPLC

3.2.1 Principio del método

El método consiste en separar y cuantificar el edulcorante Aspartame, mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, utilizando una columna RP-18 y detección UV.

3.2.2 Equipo

- Cromatografo Hitachi LaChrom Elite
- Horno cromatógrafo Hitachi L-2300
- Bomba cromatógrafo Hitachi L-2130
- Detector cromatógrafo UV-VIS Hitachi L-2455
- Inyector automático Hitachi L-2200
- Aguja Rheodyne (Art 7215 MERCK)
- Balanza con sensibilidad > 0,01g
- Agitador calefactor magnético
- Campana de extracción de gases
- Columna LiChroCart RP-18, 125 x 4mm, 5 µm (Art. 50943 MERCK)
- Columna policia LiChroCart RP-18, 5 µm (Art. 50962 MERCK)
- Computador cromatógrafo
- Equipo de filtración al vacío

3.2.3 Materiales

- Barra de agitación
- Espátula, cuchara y varillas de agitación
- Filtros de Poliamida 0.2 µm, 2.5 µm y 4.5µm
- Guantes de nitrilo
- Jeringa desechable de 3ml

- Matraz aforado 10 ml, 25 ml, 50 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml
- Micropipetas 100-1000 µl y 500-5000 µl
- Peachímetro
- Pesasustancias
- Pizeta
- Probeta de 1000 ml
- Vaso precipitado de 1000 ml

3.2.4 Reactivos

- Ácido Ortofosfórico 85% (Art.573, MERCK)
- Aspartame STD de referencia (Art. A-5139, SIGMA)
- Buffer Fosfato pH=4.3 (Preparación interna)
- Fosfato de potación monobásico (Art. 4873, MERCK)
- Metanol (Art. 6007, MERCK)
- Solución stock 800 ppm Aspartame (Preparación interna)
- Agua grado HPLC (Preparación interna)

3.2.5 Preparación de soluciones

3.2.5.1 Buffer Fosfato pH=4,3

- Se pesan exactamente entre 6,829 y 6,831g de fosfato de potasio y se traspasan a un vaso precipitado de 1L.
- Se disuelven en 1000ml de agua grado HPLC.
- Se trabaja bajo campana con guantes de nitrilo.
- Se agrega gota a gota el ácido Ortofosfórico hasta alcanzar el pH=4,3
- Se filtra al vacío con filtro de poliamida 4.5cm
- Se homogeniza y guarda en botella plástica limpia y seca
- Se guarda refrigerado
- Se eliminan desechos vía dilución

3.2.5.2 Solución stock 800 ppm Aspartame

- Se secan alrededor de 1g de estándar a $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, se registra como H_{STD} .
- Se pesan exactamente entre 0.19 y 0,21g Aspartame STD en base húmeda, se registra como M_{STD} .
- Se disuelven en 250ml de agua grado HPLC, aforando (solución Stock 800ppm).
- Se homogeniza y se guarda en botella de vidrio limpia y seca.
- Se toman desde la solución stock alícuotas de: 550 μL se enrasa con agua a 10ml (45ppm), 950 μL se enrasa con agua a 25ml (30ppm), 650 μL se enrasa con agua a 25ml (21ppm), 330 μL se enrasa con agua a 25ml (10ppm) y 250 μL se enrasa con agua a 50 ml (4ppm).
- Se homogeniza.
- Se eliminan los desechos vía dilución.

3.2.6 Tratamiento de la muestra

- Se verifica que la muestra sea homogénea.
- Pesar el contenido del sobre de Zuko Nacional 20g/L y disolver en un matraz de 500 ml con agua grado HPLC
- Preparar de la solución una dilución al 4% v/v de la muestra para calzar dentro de los rangos de la curva de calibración
- se registra V_a la alícuota tomada y como V_d el volumen final de la dilución.

3.3 PROCEDIMIENTO

3.3.1 Condiciones cromatográficas

Tabla 3-4: Condiciones cromatográficas empleadas en la Validación de Aspartame.

Fase Móvil	82% Buffer fosfato pH 4,3 – 18% Metanol
Longitud de Onda	210 nm
Flujo	1.0 ml/min.
Columna	Lichrocart RP-18 125-4
Presión Inicial	120 bar máx.
Tº Columna	40 ± 1°C
Curva de Calibración	Aspartame 4 a 45 ppm.
Tiempo de retención	15.0 minutos aprox.
Volumen de inyección	20 microlitros.
Elución	Socrática

Fuente: Elaboración propia.

3.3.2 Curva de calibración

Se inyecta en replicado la curva de calibración para obtener los factores de cálculo, inyectando estándares de aproximadamente 4, 10, 21, 30 y 45 ppm de Aspartame.

La curva se utiliza solo para la columna en la cual se inyectó; si se cambia la columna es necesario realizar una nueva curva de calibración.

3.3.3 Análisis de Muestras

La muestra de Zuko Nacional Naranja 20g/L se pesa y disuelve en un matraz aforado de 500 ml con agua grado HPLC. Posteriormente, de esta solución se diluye al 4% v/v, para ser inyectada en el HPLC con un volumen de inyección de 20 µl.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1 VALIDACION DE % CENIZAS TOTALES

4.1.1 Prueba de Repetibilidad

Tabla 4-5: Resultados de % Cenizas totales Zuko Nacional Naranja 20g/L.

<i>Zuko Nacional Naranja 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
30.21436	6.08689	30.31964	1.73
29.61493	6.05461	29.72523	1.82
32.64587	6.08243	32.75206	1.75
19.60820	6.07881	19.71748	1.80
21.81155	6.04907	21.92116	1.81
19.84006	6.04464	19.94050	1.66

Tabla 4-6: Resultados de % Cenizas totales Zuko Nacional Melón 20g/L.

<i>Zuko Nacional Melón 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
26.50942	6.03378	26.62419	1.90
30.82724	6.01240	30.94155	1.90
28.49425	6.08748	28.60993	1.90
28.50792	6.08148	28.62366	1.90
28.34099	6.01332	28.45567	1.91
47.07380	6.03629	47.18668	1.87

Tabla 4-7: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Durazno 20g/L.

<i>Zuko Nacional Durazno 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
30.14113	6.03598	30.24160	1.66
29.58164	6.05297	29.68379	1.69
20.45296	6.02202	20.55495	1.69
21.79293	6.01247	21.89448	1.69
19.58737	6.02498	19.68930	1.69
44.83371	6.05049	44.93564	1.68

Tabla 4-8: Resultados Prueba de Repetibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Piña 20g/L.

<i>Zuko Nacional Piña 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
28.44968	6.02906	28.54922	1.65
30.75743	6.04530	30.85732	1.65
28.34701	6.06410	28.44731	1.65
28.23205	6.07063	28.33215	1.65
26.43604	6.07389	26.53723	1.67
46.99473	6.06627	47.09550	1.66

Tabla 4-9: Resultados Prueba de Repetibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Manzana 20g/L.

<i>Zuko Nacional Manzana 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
28.19205	6.06824	28.28997	1.61
26.40756	6.08979	26.50603	1.62
28.42313	6.05058	28.52112	1.62
30.72287	6.0369	30.82044	1.62
28.32573	6.04931	28.4237	1.62
46.96547	6.06167	47.06392	1.62

Tabla 4-10: Resultados de % Cenizas totales; Prueba de Repetibilidad de Zuko Nacional 20g/L.

<i>PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES</i>						
<i>Equipo</i>	<i>Medición</i>	<i>Zuko Naranja</i>	<i>Zuko Melón</i>	<i>Zuko Durazno</i>	<i>Zuko Piña</i>	<i>Zuko Manzana</i>
MUFLA Nº1	1	1.73	1.90	1.66	1.65	1.61
	2	1.82	1.90	1.69	1.65	1.62
	3	1.75	1.90	1.69	1.65	1.62
	4	1.80	1.90	1.69	1.65	1.62
	5	1.81	1.91	1.69	1.67	1.62
	6	1.66	1.87	1.68	1.66	1.62
	Promedio	1.76	1.90	1.69	1.66	1.62
	Des. STD	0.06	0.01	0.01	0.01	0.00
	%CV	3.47	0.72	0.63	0.40	0.22

4.1.2 Prueba de Reproducibilidad

Tabla 4-11: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Naranja 20g/L.

<i>Zuko Nacional Naranja 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
29.36233	6.03383	29.47338	1.84
28.05405	6.06938	28.16545	1.84
30.66882	6.02504	30.77904	1.83
26.30874	6.02531	26.41929	1.83
19.5101	6.05112	19.62177	1.85
30.0612	6.03632	30.173	1.85
29.35195	6.0374	29.46397	1.86
28.2784	6.03987	28.38881	1.83
20.37444	6.07228	20.48368	1.80
46.90057	6.08936	47.01122	1.82

Tabla 4-12 Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Melón 20g/L.

<i>Zuko Nacional Melón 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
30.06454	6.05679	30.17827	1.88
29.34011	6.02245	29.45290	1.87
28.27266	6.06151	28.38342	1.83
46.86926	6.04429	46.98256	1.87
30.00386	6.06800	30.11727	1.87
28.33508	6.06587	28.44856	1.87
29.27268	6.04118	29.38584	1.87
27.9996	6.06422	28.11343	1.88
30.59226	6.05688	30.70597	1.88
46.78929	6.04926	46.90251	1.87

Tabla 4-13: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Durazno 20g/L.

<i>Zuko Nacional Durazno 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
29.98430	6.01284	30.08758	1.72
46.75787	6.03780	46.86097	1.71
19.57035	6.02832	19.67404	1.72
18.95234	6.01779	19.05328	1.68
46.71475	6.06304	46.81752	1.70
28.32662	6.05794	28.42987	1.70
30.52370	6.05721	30.62682	1.70
29.22280	6.05365	29.32618	1.71
19.57915	6.03329	19.68204	1.71
18.96010	6.04793	19.06311	1.70

Tabla 4-14: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Piña 20g/L.

<i>Zuko Nacional Piña 20g/L</i>			
<i>Crisol (g)</i>	<i>Muestra (g)</i>	<i>C+M (g)</i>	<i>Cenizas (% p/p)</i>
28.27910	6.03800	28.38296	1.72
27.97191	6.05065	28.07610	1.72
29.94921	6.06193	30.05334	1.72
19.57577	6.03653	19.67829	1.70
18.95016	6.06701	19.05149	1.67
19.56635	6.04868	19.66958	1.71
29.93872	6.02588	30.04121	1.70
29.91770	6.05420	30.02188	1.72
19.55480	6.06919	19.65850	1.71
18.93600	6.06870	19.03975	1.71

Tabla 4-15: Resultados Prueba de Reproducibilidad % Cenizas totales Zuko Nacional Manzana 20g/L.

Zuko Nacional Manzana 20g/L			
Crisol (g)	Muestra (g)	C+M (g)	Cenizas (% p/p)
27.93626	6.08933	28.03359	1.60
29.86360	6.04185	29.95986	1.59
29.14534	6.07004	29.24228	1.60
18.88645	6.05796	18.98288	1.59
19.52422	6.06697	19.62019	1.58
27.90070	6.04440	27.99612	1.58
29.83722	6.08072	29.93349	1.58
29.10312	6.06416	29.19957	1.59
18.84785	6.05913	18.94353	1.58
19.46260	6.16512	19.55998	1.58

Tabla 4-16: Resultados Prueba de Reproducibilidad de Zuko Nacional 20g/L.

PORCENTAJE DE CENIZAS TOTALES						
Equipo	Medición	Zuko Naranja	Zuko Melón	Zuko Durazno	Zuko Piña	Zuko Manzana
MUFLA N°2	1	1.84	1.88	1.72	1.72	1.60
	2	1.84	1.87	1.71	1.72	1.59
	3	1.83	1.83	1.72	1.72	1.60
	4	1.83	1.87	1.68	1.70	1.59
	5	1.85	1.87	1.70	1.67	1.58
	6	1.85	1.87	1.70	1.71	1.58
	7	1.86	1.87	1.70	1.70	1.58
	8	1.83	1.88	1.71	1.72	1.59
	9	1.80	1.88	1.71	1.71	1.58
	10	1.83	1.87	1.70	1.71	1.58
	Promedio	1.83	1.87	1.70	1.71	1.59
	Des. STD	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01
	%CV	0.91	0.80	0.70	0.91	0.48

4.2 VALIDACIÓN DE ASPARTAME VÍA HPLC

Cálculos de la SOLUCIÓN STOCK 800 ppm Aspartame:

STD primario Aspartame 0.08076 gr = 80,76 mg

STD % Humedad= 12,66

80,76 mg $\longrightarrow$ 100%

X $\longrightarrow$ 87,34% (100-12,66)

X = 70,5 mg

70,5 mg $\div$ 0,1 L = 705,3 mg/L en solución Stock de Aspartame.

Cálculos teóricos Concentración STD Aspartame:

- Cálculo concentración STD 1: $(705,36 \times 0,250) \div 50 = 3,5$ mg/L
- Cálculo concentración STD 2: $(705,36 \times 0,330) \div 25 = 9,3$ mg/L
- Cálculo concentración STD 3: $(705,36 \times 0,650) \div 25 = 18,3$ mg/L
- Cálculo concentración STD 4: $(705,36 \times 0,950) \div 25 = 26,8$ mg/L
- Cálculo concentración STD 5: $(705,36 \times 0,550) \div 10 = 38,7$ mg/L

4.2.1 Resultados linealidad

Tabla 4-17: Resultados curva de calibrado del estudio de Linealidad de Aspartame.

	$X_{(área)}$	$Y_{(ppm)}$	XY	X^2	Y^2
	584344	3.52680	2060864	341457910336	12.43831824
	1482981	9.31075	13807665	2199232646361	86.69006556
	2914529	18.33940	53450713	8494479291841	336.3335924
	4221762	26.80370	113158842	17823274384644	718.4383337
	6053839	38.79480	234857473	36648966637921	1505.036507
Promedio	3051491	19.35509	83467112	13101482174221	531.7873634
Sumatoria	15257455	96.77545	417335558	65507410871103	2658.936817

Tabla 4-18: Resultados de los parámetros que se obtienen de la curva de calibrado del estudio de LD y LC.

$a =$	-0.2951998
$b =$	6.4396×10^{-06}
$r =$	0,99996

Tabla 4-19: Límites de confianza que se obtienen con la recta de regresión en el estudio de linealidad.

$n =$	5
$t_{student} =$	3.182
$t_{calc} =$	233.11
$S^2_{xy} =$	0.014
$\Omega =$	1.89×10^{13}
$S_b =$	2.76×10^{-08}
$S_a =$	0.100
$l_{a+} =$	0.023
$l_{a-} =$	-0.613
$l_{b+} =$	1.29×10^{-05}
$l_{b-} =$	6.35×10^{-06}
Incertidumbre	
$l_a =$	0.1837
$l_b =$	5.07×10^{-08}

- Ecuación de la curva Concentración versus Área: $y = 155281 * x + 46008.6$

Tabla 4-20: Resultados curva de calibrado estudio de Linealidad de Aspartame.

	<i>Área₁</i>	<i>Área₂</i>	<i>Área₃</i>	<i>Área₄</i>	<i>Área₅</i>
<i>Curva N°1</i>	556359	1461910	2804352	4162967	6151982
<i>Curva N°2</i>	554538	1439757	2900394	4233064	5981467
<i>Curva N°3</i>	489160	1340975	2636158	4015004	5937184
<i>Promedio</i>	533352	1414214	2780301	4137012	6023544
<i>Sumatoria</i>	1600057	4242642	8340904	12411035	18070633

4.2.2 Límites

Tabla 4-21: Resultados de prueba de Límites detección y cuantificación obtenidos en la determinación de Aspartame

<i>Medición</i>	<i>mg/100g</i>
1	3.43
2	3.42
3	3.50
4	3.53
5	3.48
6	3.53
7	3.51
8	3.50
9	3.46
10	3.49
Promedio	3,49
Sumatoria	34,85
Des. STD	0.04
%CV	1.15

$\sigma =$	0.038
LC =	0,062 ppm
LOD =	0,125 ppm
LOQ =	0,380 ppm
Área Q =	104852

4.2.3 Repetibilidad

Tabla 4-22: Resultados de Precisión obtenidos en la determinación de Aspartame.

<i>Medición</i>	<i>mg/100g</i>
1	1967,62
2	1972,55
3	1997,30
4	1981,78
5	1970,67
6	1997,34
Promedio	1981,21
Sumatoria	11887,26
Desv. STD	13.34
%CV	0.67

4.2.4 Resultados pruebas de Reproducibilidad

Tabla 4-23: Resultados de precisión obtenidos de la Reproducibilidad para la determinación de Aspartame.

<i>Medición</i>	<i>Zuko₁</i> <i>(mg/100g)</i>	<i>Zuko₂</i> <i>(mg/100g)</i>	<i>Zuko₃</i> <i>(mg/100g)</i>	<i>Zuko₄</i> <i>(mg/100g)</i>
1	1949.11	1978.84	2026.22	2028.99
2	1960.72	1958.50	2003.49	2010.03
3	1947.93	1959.92	2026.80	2019.29
Promedio	1952.59	1965.75	2018.84	2036.77
Sumatoria	5857.76	5897.26	6056.51	6110.31
Des. STD	7.07	11,36	13.29	9.48
%CV	0.36	0.58	0.66	0.47

Promedio Resultados	1993.49 mg/100g
Promedio Desviación Estándar	10.30

4.2.5 Resultados pruebas de Sesgo

Tabla 4-24: Resultados de la Veracidad expresado en el Sesgo obtenido en la determinación de Aspartame.

<i>Lectura</i>	<i>mg/100g</i>	<i>Sesgo (S)</i>
1	18.33	-0.01
2	18.34	0.00
3	18.29	-0.05
4	17.53	-0.81
5	18.40	0.06
6	18.25	-0.09
7	18.19	-0.15
8	18.27	-0.07
9	18.25	-0.09
10	18.48	0.14
Promedio	18.23	
Sumatoria	182.33	
Desv. STD	0.26	
V. Teórico	18.34	
Sesgo	-0.11	
N	10	
T Student	2.262	
T calc	-0.134	
<i>Incertidumbre</i>		
μ relativo sesgo	0.26	

4.2.6 Resultados pruebas de Recuperación

Tabla 4-25: Resultados del % de recuperación obtenidos en la determinación de Aspartame.

<i>Medición</i>	<i>Zuko (C₀) mg/100g</i>	<i>Fortificado (C_a) mg/100g</i>	<i>C_e mg/100g</i>	<i>%R</i>
1	25,20	28,78	3,58	101.5
2	24,93	28,45	3,52	99.8
3	24,94	28,47	3.53	100.1
4	24,94	28,52	3,58	101.5
5	24,85	28,57	3,72	105.5
6	24,90	28,65	3,75	106.3
Promedio	24,96	28.57	3.61	102.5
Sumatoria	149,76	171.44	21.68	614.7
Desv. STD	0.15	0.12	0.10	2.77
Adición (Ca)	3.5268			
t-student	2.751			
n	6			
t calc.	-0.36			
<i>Incertidumbre</i>				
μ relat.recup	2.77			

4.2.7 Resultados pruebas de Robustez

Tabla 4-26: Parámetros del Estudio de la Robustez obtenidos en la determinación de Aspartame.

<i>Medición</i>	<i>Temperatura °C</i>	<i>S. Tampón pH</i>	<i>Estabilidad Días</i>		<i>Zuko (mg/100g)</i>
R1	40	4,1	1	s	2196,68
R2	40	4,1	4	t	1932,74
R3	40	4,3	1	u	2082,36
R4	40	4,3	4	v	2125,37
R5	38	4,1	1	w	2125,37
R6	38	4,1	4	x	1929,65
R7	38	4,3	1	y	2067,04
R8	38	4,3	4	z	1919,62

Tabla 4-27: Resultados experimentales del estudio de la robustez.

Resultados	LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART 125-4		
	Área	N	Tr (min)
R1	5554683,00	2621	12,80
R2	4892801,50	2429	12,32
R3	5267996,50	2774	11,85
R4	4757245,50	2760	11,82
R5	5375875,00	3241	12,81
R6	4885053,50	2436	12,34
R7	5229591,50	3023	12,37
R8	4859897,00	2456	12,39
Suma	40823143,5	21740	98,7
Promedio	5102893	2717,5	12.34
Des. STD	290825,6	295,8	0.37

Tabla 4-28: Resumen de la influencia de cada factor y su intervalo de confianza en el Estudio de la robustez.

LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART 125-4									
Factor	Influencia			Intervalo de confianza					
	Área	N	Tr (min)	Área		N		Tr (min)	
Temperatura (°C)	30577	-143	- 0,28	-212598	273752	-390	104	-0,59	0,03
Estabilidad (Días)	508287	-42	0,46	-94754	391596	-319	175	0,15	0,77
S. Tampón pH	148421	395	0,24	265112	751462	148	642	-0,07	0,55

Tabla 4-29: Resultados de la determinación de influencia en cada factor en el Estudio de la Robustez.

Variable	Si/No influye significativamente sobre el resultado		
	Área	N	Tr min
Temperatura (°C)	SI	NO	NO
Estabilidad (Días)	SI	NO	SI
S. tampón (pH)	SI	SI	SI

4.2.8 Incertidumbre

Paralelaje:

Tabla 4-30: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 5ml.

5 mL	
N°	Gramos
1	4.97370
2	4.95314
3	4.95501
4	4.97554
5	4.97716
6	4.95955
7	4.95932
8	4.96897
9	4.96942
10	4.96340
Promedio	5.0
Sumatoria	49.65521
Desv. STD	0.009
Incertidumbre	
μ	0.004
μ relat.	1.411×10 ⁻⁰⁴

Tabla 4-31: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 10ml.

10mL	
N °	Gramos
1	9.94748
2	9.92868
3	9.94058
4	9.91555
5	9.92442
6	9.95805
7	9.94783
8	9.91979
9	9.91927
10	9.90478
Promedio	9.9
Sumatoria	99.3
Desv. STD	0.017
Incertidumbre	
μ	0.007
μ relat.	1.392×10 ⁻⁰⁴

Tabla 4-32: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 25ml.

25mL	
N °	Gramos
1	24.864
2	24.838
3	24.840
4	24.810
5	24.831
6	24.856
7	24.849
8	24.816
9	24.853
10	24.838
Promedio	24.8
Sumatoria	248.395
Desv. STD	0.017
Incertidumbre	
μ	0.007
μ relat.	3.499×10 ⁻⁰⁵

Tabla 4-33: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 50ml.

50mL	
N °	Gramos
1	49.746
2	49.769
3	49.722
4	49.763
5	49.756
6	49.717
7	49.728
8	49.729
9	49.742
10	49.731
PROMEDIO	49.7
SUMATORIA	497.403
DESV. STD	0.018
Incertidumbre	
μ	0.007
μ relat.	2.913×10 ⁻⁰⁵

Tabla 4-34: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 250ml

250mL	
N °	Gramos
1	249.040
2	249.020
3	249.050
4	249.120
5	249.090
6	248.980
7	249.100
8	249.080
9	249.070
10	249.190
PROMEDIO	249.1
SUMATORIA	2490.74
DESV. STD	0.058
Incertidumbre	
μ	0.024
μ relat.	1.179×10 ⁻⁰⁴

Tabla 4-35: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 500ml.

500mL	
N °	Gramos
1	497.980
2	498.120
3	498.100
4	498.120
5	498.200
6	498.160
7	498.120
8	498.140
9	498.100
10	498.200
PROMEDIO	498.1
SUMATORIA	4981.2
DESV. STD	6.240×10 ⁻⁰²
Incertidumbre	
μ	2.547×10 ⁻⁰²
μ relat.	5.095×10 ⁻⁰⁵

Tabla 4-36: Medición de incertidumbre Matraz aforado de 1000 ml.

1000mL	
N °	Gramos
1	996.08
2	996.08
3	996.14
4	996.18
5	995.98
6	996.18
7	996.04
8	996.30
9	996.06
10	996.00
PROMEDIO	996.1
SUMATORIA	9961.0
DESV. STD	9.698×10 ⁻⁰²
Incertidumbre	
μ	3.959×10 ⁻⁰²
μ relat.	7.918×10 ⁻⁰⁵

Tabla 4-37: Límite del coeficiente de variación para análisis de impurezas en función de la concentración de analito (AOAC).

% Analito	Relación	Unidades	CV (%)
10	10 ⁻¹	10%	2.8
1	10 ⁻²	1%	2.7
0.1	10 ⁻³	0.1%	3.7
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm	5.3
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm	7.3
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm	11
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb	15
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb	21
0.0000001	10 ⁻⁹	1 ppb	30

Tabla 4-38: Valores orientativos aceptables de recuperación según la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos), en función de la concentración del analito.

% Analito	Relación	Unidades	Factor de recuperación (%)
100	1	100%	98 -102
≥ 10	10^{-1}	10%	98 -102
≥ 1	10^{-2}	1%	97 -103
≥ 0.1	10^{-3}	0.1%	95 -105
0.01	10^{-4}	100 ppm	90 -107
0.001	10^{-5}	10 ppm	80 -110
0.0001	10^{-6}	1 ppm	80 -110
0.00001	10^{-7}	100 ppb	80 -110
0.000001	10^{-8}	10 ppb	60 -115
0.0000001	10^{-9}	1 ppb	40 -120

DISCUSIÓN

De acuerdo con el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA) el producto de la empresa TRESMONTES LUCCHETTI S.A. cumple con la norma vigente, puesto que los resultados en la validación de porcentaje de cenizas totales para Zuko Nacional sabores 20g/L fueron inferiores al 2% máximo dictado por el reglamento.

En las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad del método arrojaron resultados homogéneos dando pequeñas variaciones que pueden deberse a la homogeneidad de la muestra, ya que se ocuparon distintos sobres de producto terminado Zuko Nacional en sus distintos sabores. El ensayo arrojó coeficientes de variación aceptables según criterios de validación.

La incertidumbre de un método gravimétrico como es el caso de la determinación de cenizas totales está determinada principalmente, por la calibración de la balanza y la repetibilidad del método que constituyen las fuentes de variación más significativas. El método de cuantificación de cenizas totales para Zuko Nacional sabores, está dentro de los límites esperados en función a la concentración de analitos dictados por la AOAC (Tabla 4-37), se considera aceptable.

Por otra parte, la validación de método de determinación y cuantificación de Aspartame arrojó resultados de gran importancia para asegurar la consistencia y la calidad del producto Zuko Nacional, el cual, a lo largo de los años ha sufrido modificaciones en la concentración de Aspartame, debido a cambios en el gramaje y en su formulación. Al contar con un método validado y confiable, se puede llevar un adecuado control en la fabricación y verificación en el cumplimiento de las regulaciones establecidas.

La linealidad de modelo ajustado es una de las pruebas que se determinaron durante la validación de Aspartame por vía HPLC. En esta se estableció un modelo lineal con la ecuación de la recta $y = 155281 * x + 46008.6$, donde “y” representa la respuesta del detector y “x” es la concentración de Aspartame. El coeficiente de correlación obtenido es de 0.99997 e indica la relación positiva entre la concentración del analito y la respuesta del detector, describiendo así la relación entre lo esperado y obtenido.

Así, las pruebas de límites confirman que la cantidad de analito se encuentra por encima de la concentración mínima cuantificable y puede detectarse de manera confiable. Por otra parte, se trata de una metodología reproducible, dado que los resultados en las pruebas de precisión en base a la repetibilidad y reproducibilidad arrojaron resultados considerados aceptables por la AOAC.

En la validación podemos dar cuenta que para cuantificar la simetría de una distribución de datos se utiliza el coeficiente de sesgo (S), prueba que dio resultados en

su mayoría negativos demostrando que el método cuantifica por debajo o igual del promedio de la concentración verdadera.

El criterio de aceptabilidad de la prueba de Recuperación se encuentra dentro del rango estipulado por la AOAC (Tabla 4-38) para el nivel de fortificación realizado (Ca), siendo este en promedio 102% que se considera aceptable.

De acuerdo con todos los parámetros de validación aplicados a este trabajo, se logra validar ambas metodologías con resultados positivos en las pruebas realizadas.

CONCLUSIONES

- La muestra de Zuko Nacional sabores cumple con lo estipulado en el reglamento sanitario de alimentos al no contener el 2% máximo aceptado.
- Se determinó que el método de cenizas totales es repetitivo en las mismas condiciones de trabajo.
- Se determinó que el método es reproducible en distintos equipos, en distintos días y en diferentes sobres de producto terminado.
- Los coeficientes de variación en las pruebas de cenizas totales están dentro de los parámetros establecidos por la AOAC.
- Se logro validar el método de separación, determinación y cuantificación del edulcorante artificial Aspartame en bebida deshidratada Zuko Nacional Naranja, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplado a detector UV/Vis.
- Los niveles de Aspartame encontrados en la muestra no presentan grandes diferencias con lo indicado en el rotulado de los envases.
- La metodología ya implementada y validada en este trabajo demostró ser una técnica rápida y eficiente en la determinación Aspartame.
- De acuerdo con el estudio de la robustez se pudo comprobar la inestabilidad del Aspartame en solución acuosa.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Aguirre L, García F, García T, et al. Validación de métodos analíticos. Monografías de la asociación española de farmacéuticos de la industria. Barcelona, España, 2001.
- [2] Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “aspectos generales sobre la validación de métodos”. El Instituto de Salud Pública de Chile, 2010.
- [3] Quattrocchi O, Abelaira S., Laba R. Introducción a la HPLC Aplicación y práctica Buenos Aires, Argentina, 1992.
- [4] Pía Javiera Troncoso Gjakoni. Desarrollo y Validación de Metodología para Determinación de Edulcorantes en Alimentos. Universidad Austral de Chile, 2014.
- [5] República de Chile ministerio de salud. Reglamento Sanitario de alimentos, Chile, 2021.
- [6] Lorena Zapata, Andrea Espinosa. Refrescos en Polvo. Organización de Consumidores y Usuarios de Chile (ODECU). Región Metropolitana, 2010.
- [7] H. Zumbado. Análisis Químico de los alimentos Métodos Clásicos. Instituto de farmacia y alimentos Universidad de la Habana. 2002.
- [8] Evaluaciones químicas y técnicas de aditivos alimentarios (CTA). [En línea] <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/technical-assessments/en/>
- [9] Arbind Kumar Choudhary, Eteresia Pretoria Nutrition Reviews, volumen 75, número 9, septiembre de 2017, páginas 718–730. [En línea] <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/75/9/718/4101228>
- [10] Dong W. Michael Modern; HPLC for Practicing Scientists Wareham, Massachusetts, EE. UU. 2006. [En línea] <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=RYOHFneTy-UC&oi=fnd&pg=PR5&dq=libros+de+HPLC+&ots=SlT1QLJsNa&sig=lYRJcQ4iMWybIMkToMlgXLPkuHI#v=onepage&q&f=false>
- [11] Samuel Durán A., Karla Cordon A., María del Pilar Rodríguez N. Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso, Revista chilena nutrición, vol.40, Santiago. 2013. [En línea] https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182013000300014
- [12] S. Badui, Química de los Alimentos, 4ta edición. 2013. [En línea] <https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/libro-badui200626571.pdf>

[13] Análisis ingredientes de los refrescos. Organización de Consumidores y Usuarios de Chile (ODECU). Región Metropolitana, 2020. [En línea] <https://www.odecu.cl/wpcontent/uploads/2020/02/AN%C3%81LISIS-INGREDIENTES-DE-LOS-REFRESCOS.pdf>

[14] Instituto Nacional de Normalización, Refrescos en polvo Requisitos NCh 2729.of2002, Chile.2002.

[15] Castillo Jara Raquel Lilian, Validación de la metodología para la determinación de ácido Domoico (biotoxina asp) en moluscos bivalvos por Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC), 2006.

[16] Guerrero Villegas, T., & Mora Flores, G. (2014). Posibles riesgos para la salud por el consumo de aspartamo. Enfoque UTE, 5 (2), págs. 1 - 13. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v5n2.36> [En línea].

ANEXOS

Anexo A Datos del equipo HPLC

User Name: HPLC2
Print Time: 11-01-2023 14:53:36

Instrument Configuration
=====

Instrument Name: ELITE DAD
Instrument Type: Hitachi LaChrom Elite

General Options
=====

System Suitability: Enabled
SEC: Disabled
PDA: Enabled
Baseline Check: Enabled

Hitachi L-2300
Column Oven
=====

System ID: 1
IFB Program Number: 8918190-00
Serial Number: 22E81-010
Program Number: 8908130-04
Column Selector Valve: No

Hitachi L-2130
Pump
=====

System ID: 1
IFB Program Number: 8918190-00
Gradient Mode: Low
Number of Pumps: 1
Pressure Unit: bar

Pump A Serial Number: 22E53-007
Pump A Program Number: 8908110-08
Pump A Gradient Kit ID:

Hitachi L-2455
Diode Array Detector
=====

System ID: 1
IFB Program Number: 8918190-00
Detector Name: DAD
Serial Number: 22E81-009
Program Number: 8908146-01
Flow Cell ID:
Analog Output: No
2D Data Acquisition: No

Hitachi L-2200
Auto-Sampler
=====

System ID: 1
IFB Program Number: 8918190-00
Serial Number: 24E98-037
Program Number: 8908121-01
Rack Type: Single
Rack A Name: 1-STD
Thermo Unit Option: No
Advance Injection: No

Anexo A-1 Certificado de análisis del hidrogeno fosfato de potasio



Certificate of Analysis

1.04873.0250 Potassium dihydrogen phosphate for analysis EMSURE® ISO
Batch AM1704373

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (alkalimetric, calculated on dried substance)	99.5 - 100.5	%	99.8	%
Assay (alkalimetric; dried substance)	≥ 99.5	%	99.9	%
pH-value (5 %; water)	4.2 - 4.5		4.3	
Chloride (Cl)	≤ 0.0005	%	≤ 0.0005	%
Sulfate (SO ₄)	≤ 0.003	%	≤ 0.003	%
Total nitrogen (N)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.0010	%	≤ 0.0010	%
As (Arsenic)	≤ 0.0002	%	≤ 0.0002	%
Cu (Copper)	≤ 0.0003	%	≤ 0.0003	%
Fe (Iron)	≤ 0.0010	%	≤ 0.0010	%
Na (Sodium)	≤ 0.02	%	≤ 0.02	%
Pb (Lead)	≤ 0.001	%	≤ 0.001	%
Reducing substances	passes test		passes test	
Loss on drying (110 °C)	≤ 0.2	%	< 0.2	%
Loss on drying (130 °C)	≤ 0.2	%	< 0.1	%

Corresponds to ISO

Date of release (DD.MM.YYYY) 07.05.2021
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.01.2026

Claudia Wiegand
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Anexo B-2 Certificado de análisis del Ácido Ortofosfórico



Certificate of Analysis

1.00573.2500 ortho-Phosphoric acid 85% for analysis EMSURE® ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Batch K48484973

	Spec. Values		Batch Values	
Assay (alkalimetric)	≥ 85.0	%	85.6	%
Identity	passes test		passes test	
Appearance of solution	passes test		passes test	
Colour	≤ 10	Hazen	≤ 10	Hazen
Chloride (Cl)	≤ 2	ppm	< 1	ppm
Fluoride (F)	≤ 1	ppm	≤ 1	ppm
Nitrate (NO ₃)	≤ 3	ppm	< 2	ppm
Phosphite and Hypophosphite (as H ₃ PO ₃)	≤ 20	ppm	≤ 20	ppm
Hypophosphite, phosphite	passes test		passes test	
Heavy metals (as Pb)	≤ 10	ppm	≤ 10	ppm
Sulphate (SO ₄)	≤ 20	ppm	≤ 20	ppm
As (Arsenic)	≤ 0.5	ppm	< 0.2	ppm
Ca (Calcium)	≤ 20	ppm	< 10	ppm
Cd (Cadmium)	≤ 0.5	ppm	< 0.2	ppm
Co (Cobalt)	≤ 0.5	ppm	< 0.2	ppm
Cu (Copper)	≤ 0.5	ppm	< 0.2	ppm
Fe (Iron)	≤ 10	ppm	< 5	ppm
K (Potassium)	≤ 5	ppm	< 2	ppm
Mg (Magnesium)	≤ 5	ppm	< 2	ppm
Mn (Manganese)	≤ 0.5	ppm	< 0.2	ppm
Na (Sodium)	≤ 200	ppm	< 50	ppm
Ni (Nickel)	≤ 1.0	ppm	< 0.5	ppm
Pb (Lead)	≤ 0.5	ppm	< 0.2	ppm
Sb (Antimony)	≤ 5	ppm	< 3	ppm
Zn (Zinc)	≤ 2	ppm	< 1	ppm
Matter precipitated by ammonia	passes test		passes test	
Volatile acids (as Acetic acid)	≤ 10	ppm	≤ 10	ppm
Substances reducing potassium permanganate (as O)	≤ 10	ppm	≤ 10	ppm
Insoluble matter	≤ 10	ppm	≤ 10	ppm

Date of release (DD.MM.YYYY) 31.10.2016
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY) 31.10.2021

Dr. Reiner Vogt
Responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature.

Anexo B-3 Certificado de análisis del Estándar de Aspartame

4/12/2019

Certificate Of Analysis

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name

Product Number

Product Brand

CAS Number

Molecular Formula

Molecular Weight

Storage Temp

Asp-Phe methyl ester,
≥98%

A5139

SIGMA

[22839-47-0](#)

$\text{HOOCCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CONHCH}(\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5)\text{COOCH}_3$

294.30

2-8°C

TEST

APPEARANCE

SOLUBILITY

IR SPECTRUM

LOSS ON DRYING

CARBON

NITROGEN

PURITY BY THIN LAYER
CHROMATOGRAPHY

QC RELEASE DATE

PRODUCT CROSS REFERENCE
INFORMATION

SPECIFICATION

WHITE TO OFF-WHITE POWDER

CLEAR TO SLIGHTLY HAZY

COLORLESS TO VERY FAINT YELLOW
SOLUTION AT 250 MG PLUS 5 ML IN
0.5M HYDROCHLORIC ACID

CONSISTENT WITH STRUCTURE

< OR = 4.5%

54.6 TO 58.6%

9.2 TO 9.8%

> OR = 98%

LOT 019K1062 RESULTS

WHITE POWDER

CLEAR COLORLESS

CONFORMS

3.1%

55.2%

9.2%

>99%

JANAUARY 2009

REPLACEMENT FOR ALDRICH #858900



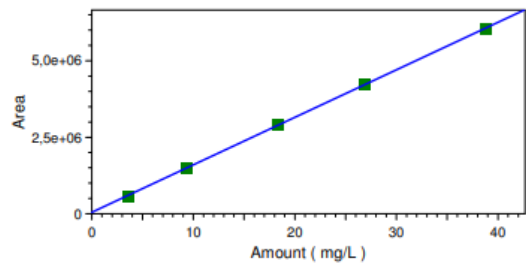
Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

Anexo C Curva de calibración

Calibration Report

Method: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Print Time: 11-01-2023 15:01:32
User: HPLC2
Instrument: ELITE DAD

Aspartame (DAD-CH1)
Average RF: 159488, RF StDev: 3692,86 RF %RSD: 2,31545
Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
Replicate Mode: Wt Average (Weight: 100)
Fit Type: Linear
 $y = 155281, x + 46008,6$
Goodness of fit (r^2): 0,999945
Peak: Aspartame -- ESTD -- DAD-CH1



	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	3,5268	9,31075	18,3394	26,8037	38,7948
Area	584344	1482981	2914529	4221762	6053839
RF	165686,5997	159276,159278	158922,0670732	157506,8050357	156047,67907
	50482	254	24	26	0391
Last Area	489160	1340975	2636158	4015004	5937184
Residual	0,0599637	0,0567592	-0,133695	-0,0878568	0,104829
Rep StDev	625,79	1291,88	5624,33	5224,1	15038
Rep %RSD	0,107093	0,087114	0,192976	0,123742	0,248405
Rep 1 Area	583901	1483894	2918506	4218068	6043205
Rep 1 User	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2
Rep 1 Data File	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\1-Rep1.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\2-Rep1.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\3-Rep1.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\4-Rep1.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\5-Rep1.dat
Rep 1 Sample ID	1	2	3	4	5
Rep 1 Calib. Time	11-01-2023 15:00:56	11-01-2023 15:01:01	11-01-2023 15:01:06	11-01-2023 15:01:12	11-01-2023 15:01:17
Rep 2 Area	584786	1482067	2910552	4225456	6064472
Rep 2 User	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2
Rep 2 Data File	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\1-Rep2.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\2-Rep2.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\3-Rep2.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\4-Rep2.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\CurvaASP021-3\5-Rep2.dat
Rep 2 Sample ID	1	2	3	4	5
Rep 2 Calib. Time	11-01-2023 15:00:59	11-01-2023 15:01:04	11-01-2023 15:01:09	11-01-2023 15:01:15	11-01-2023 15:01:20

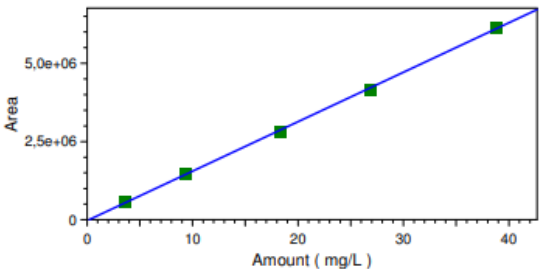
Anexo D-1 Prueba de linealidad 1 de 3

Calibration Report

Method: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Print Time: 11-01-2023 14:54:39
User: HPLC2
Instrument: ELITE DAD

Aspartame (DAD-CH1)
Average RF: 156314, RF StDev: 2249,35 RF %RSD: 1,43899
Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
Replicate Mode: Wt Average (Weight: 100)
Fit Type: Linear
 $y = 158127x - 33051,2$
Goodness of fit (r^2): 0,999502

Peak: Aspartame -- ESTD -- DAD-CH1



	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	3,5268	9,31075	18,3394	26,8037	38,7948
Area	556359	1461910	2804352	4162967	6151982
RF	157751,7863	157013,129984	152914,3874159	155313,2629549	158577,48976
	21878	158	19	38	667
Last Area	584344	1482981	2914529	4221762	6053839
Residual	-0,200642	-0,143416	0,395563	0,267974	-0,319479
Rep StDev					
Rep %RSD					
Rep 1 Area	556359	1461910	2804352	4162967	6151982
Rep 1 User	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2
Rep 1 Data File	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\1\1.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\2\2.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\3\3.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\4\4.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\5\5.dat
Rep 1 Sample ID	1	2	3	4	5
Rep 1 Calib. Time	11-01-2023 14:50:32	11-01-2023 14:50:34	11-01-2023 14:50:36	11-01-2023 14:50:38	11-01-2023 14:50:40

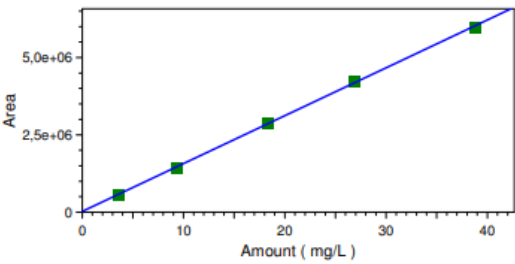
Anexo D-2 Prueba de Linealidad 2 de 3

Calibration Report

Method: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Print Time: 11-01-2023 14:58:08
User: HPLC2
Instrument: ELITE DAD

Aspartame (DAD-CH1)
Average RF: 156426, RF StDev: 1879,89 RF %RSD: 1,20177
Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
Replicate Mode: Wt Average (Weight: 100)
Fit Type: Linear
 $y = 154769, x + 26273,4$
Goodness of fit (r^2): 0,999567

Peak: Aspartame -- ESTD -- DAD-CH1



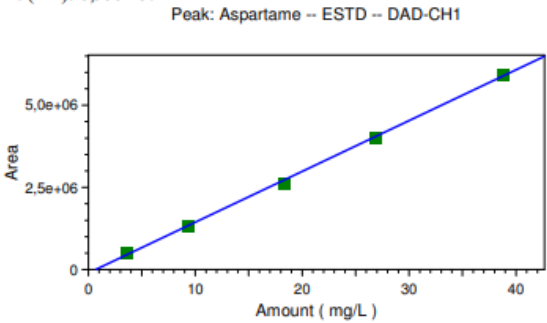
	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	3,5268	9,31075	18,3394	26,8037	38,7948
Area	554538	1439757	2900394	4233064	5981467
RF	157235,4542	154633,837231	158151,3204386	157928,4635542	154182,18421
	36135	158	63	58	0255
Last Area	556359	1461910	2804352	4162967	6151982
Residual	0,11356	0,177904	-0,231001	-0,377372	0,31691
Rep StDev					
Rep %RSD					
Rep 1 Area	554538	1439757	2900394	4233064	5981467
Rep 1 User	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2
Rep 1 Data File	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\2\1.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\2\2.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\2\3.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\2\4.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\2\5.dat
Rep 1 Sample ID	1	2	3	4	5
Rep 1 Calib. Time	11-01-2023 14:57:35	11-01-2023 14:57:37	11-01-2023 14:57:40	11-01-2023 14:57:42	11-01-2023 14:57:44

Anexo D-3 Prueba de Linealidad 3 de 3

Calibration Report

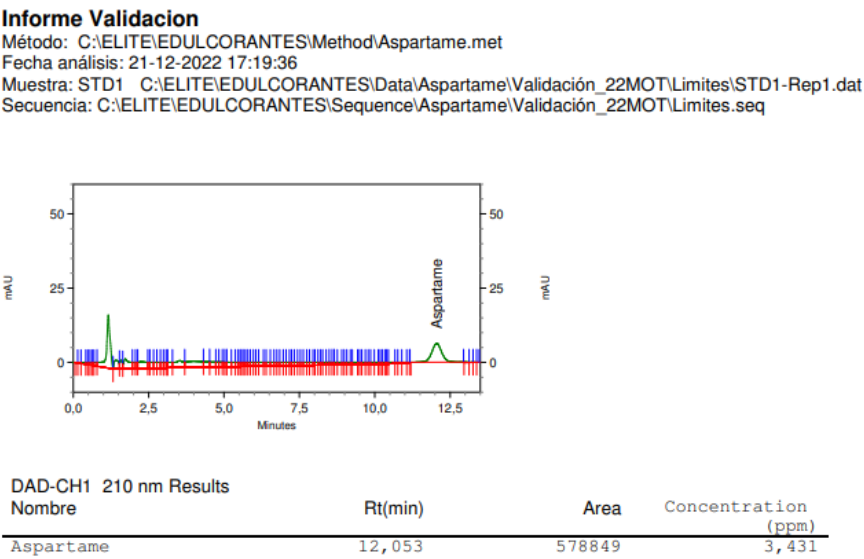
Method: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Print Time: 11-01-2023 14:59:18
User: HPLC2
Instrument: ELITE DAD

Aspartame (DAD-CH1)
Average RF: 145860, RF StDev: 5616,41 RF %RSD: 3,85055
Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
Replicate Mode: Wt Average (Weight: 100)
Fit Type: Linear
y = 154528,x - 107203,
Goodness of fit (r^2): 0,999267

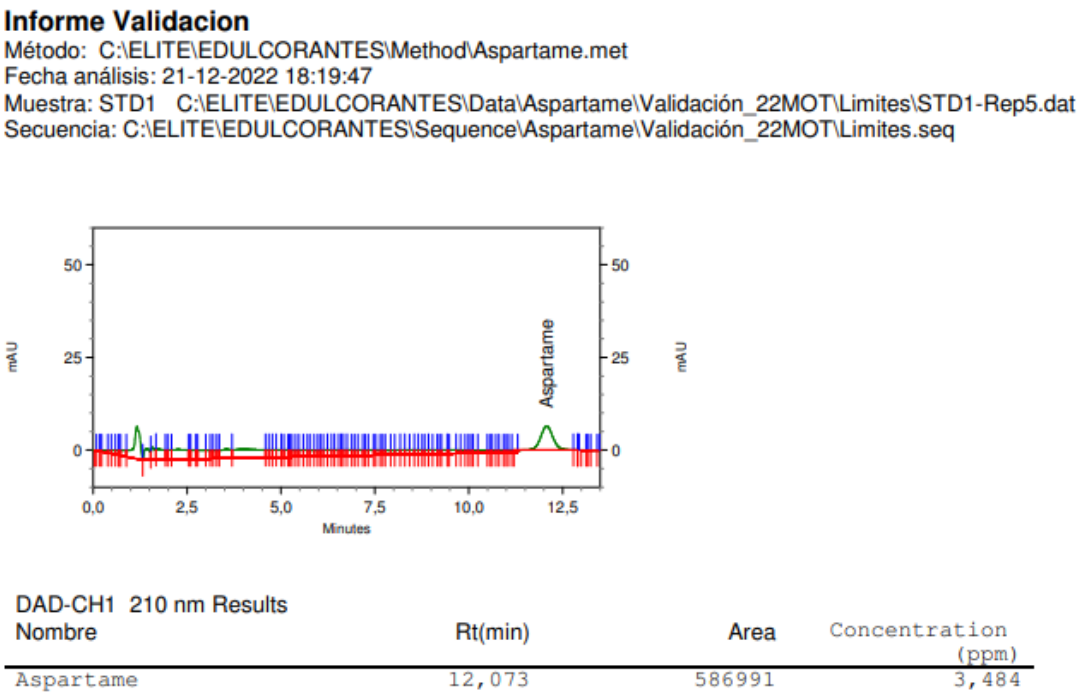


	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5
Amount	3,5268	9,31075	18,3394	26,8037	38,7948
Area	489160	1340975	2636158	4015004	5937184
RF	138697,9698	144024,380420	143743,1840587	149793,0134966	153040,71679
	31008	482	68	54	7097
Last Area	554538	1439757	2900394	4233064	5981467
Residual	-0,332456	-0,0608777	0,586182	0,127542	-0,32039
Rep StDev					
Rep %RSD					
Rep 1 Area	489160	1340975	2636158	4015004	5937184
Rep 1 User	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2	HPLC2
Rep 1 Data File	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\3\1.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\3\2.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\3\3.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\3\4.dat	C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Linealidad\3\5.dat
Rep 1 Sample ID	1	2	3	4	5
Rep 1 Calib. Time	11-01-2023 14:58:58	11-01-2023 14:59:01	11-01-2023 14:59:03	11-01-2023 14:59:05	11-01-2023 14:59:08

Anexo E-1 Cromatograma ejemplo estándar 3,431 ppm repetición 1 de 10; Curva de calibrado estudio Límite de Cuantificación; Área 578849; Tr 12,053 min.

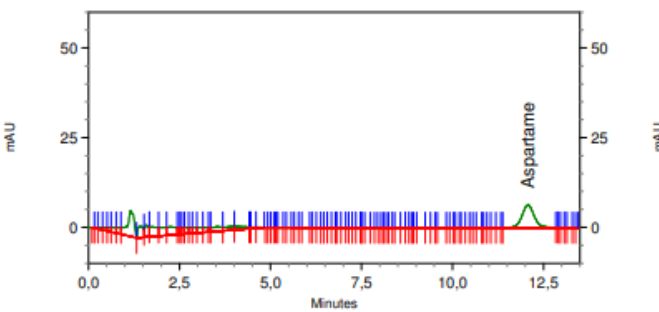


Anexo E-2 Cromatograma ejemplo estándar 3,484 ppm repetición 5 de 10; Curva de calibrado estudio Límite de Cuantificación; Área 586991; Tr 12,073 min.



Anexo E-3 Cromatograma ejemplo estándar 3,5 ppm repetición 10 de 10; Curva de calibrado estudio Límite de Cuantificación; Área 588209; Tr 12,067 min.

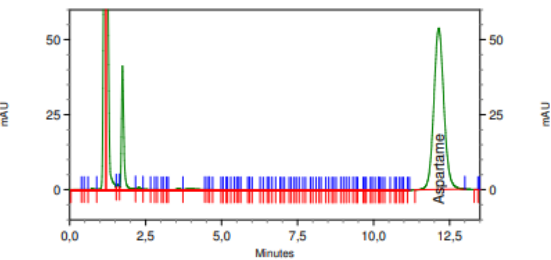
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 21-12-2022 19:35:11
Muestra: STD1 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Límites\STD1-Rep10.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Límites.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (ppm)
Aspartame	12,067	588209	3,492

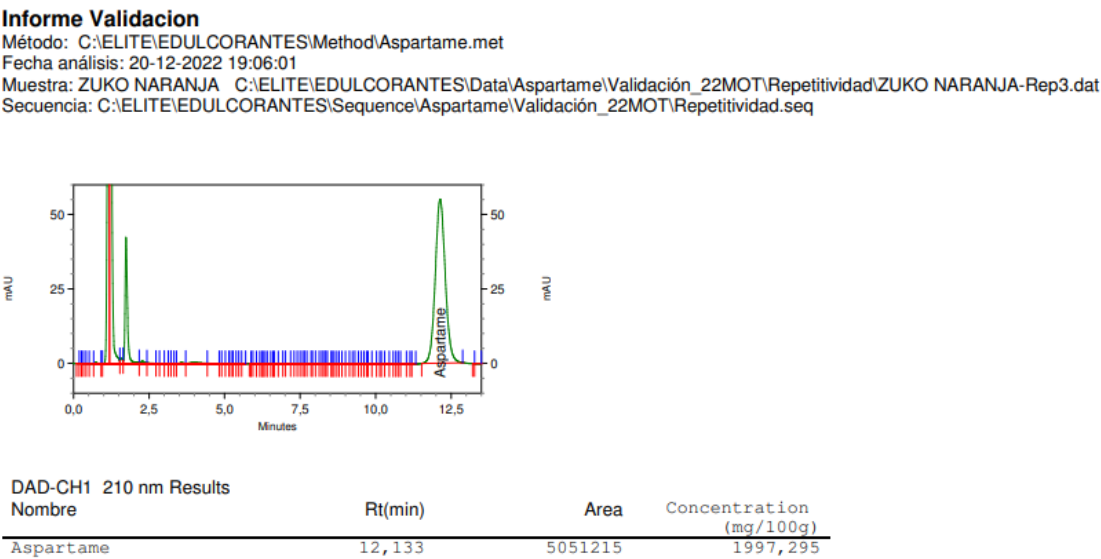
Anexo F-1 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja de 1967,624 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 6; Curva de calibrado estudio de Repetibilidad; Área 4976858; Tr 12,140 min.

Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 20-12-2022 18:35:52
Muestra: ZUKO NARANJA C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Repetitividad\ZUKO NARANJA-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Repetitividad.seq

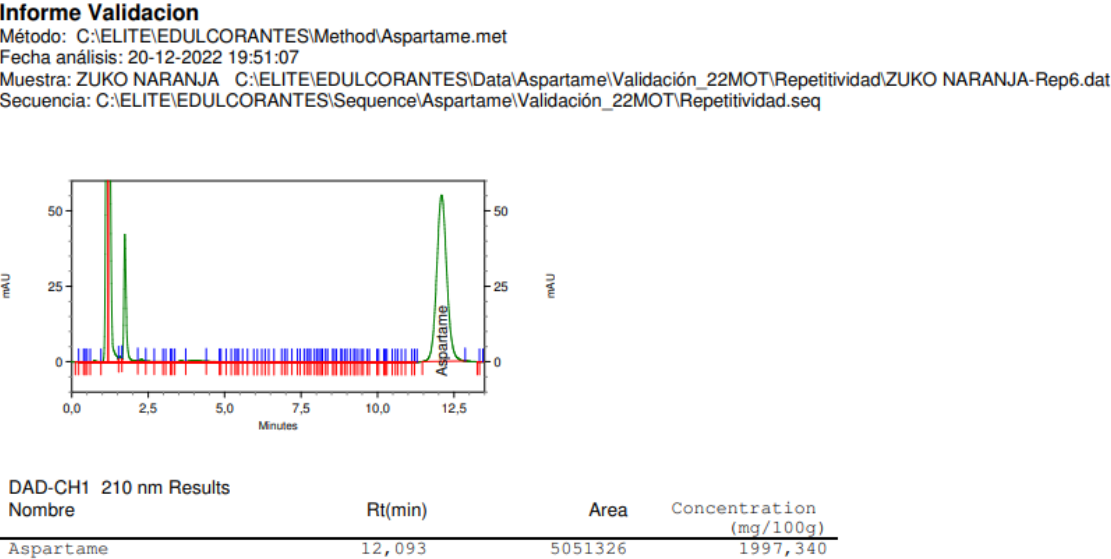


DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	12,140	4976858	1967,624

Anexo F-2 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja de 1997,295 mg/100g Aspartame; Repetición 3 de 6; Curva de calibrado estudio de Repetibilidad; Área 5051215; Tr 12,133 min.

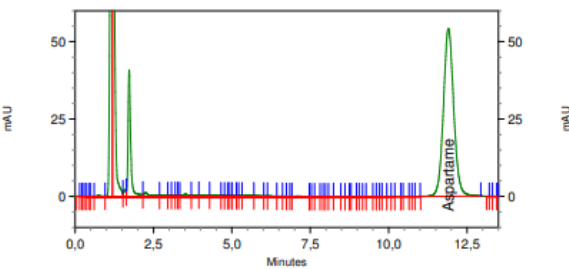


Anexo F-3 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja de 1997,340 mg/100g Aspartame; Repetición 6 de 6; Curva de calibrado estudio de Repetibilidad; Área 5051326; Tr 12,093 min.



Anexo G-1 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja-1 de 1949,062 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 3; Curva de calibrado estudio de Reproducibilidad; Área 4944144; Tr 11,907 min.

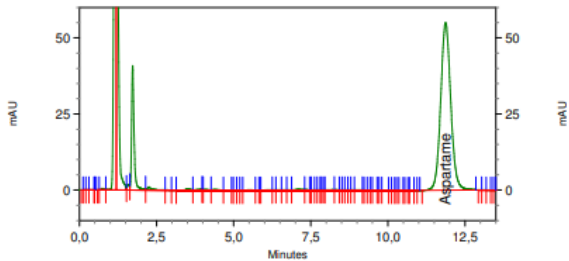
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 21-12-2022 8:34:21
Muestra: ZUKO NAR.1 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Reproducibilidad\ZUKO NAR.1-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Reproducibilidad.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	11,907	4944144	1949,062

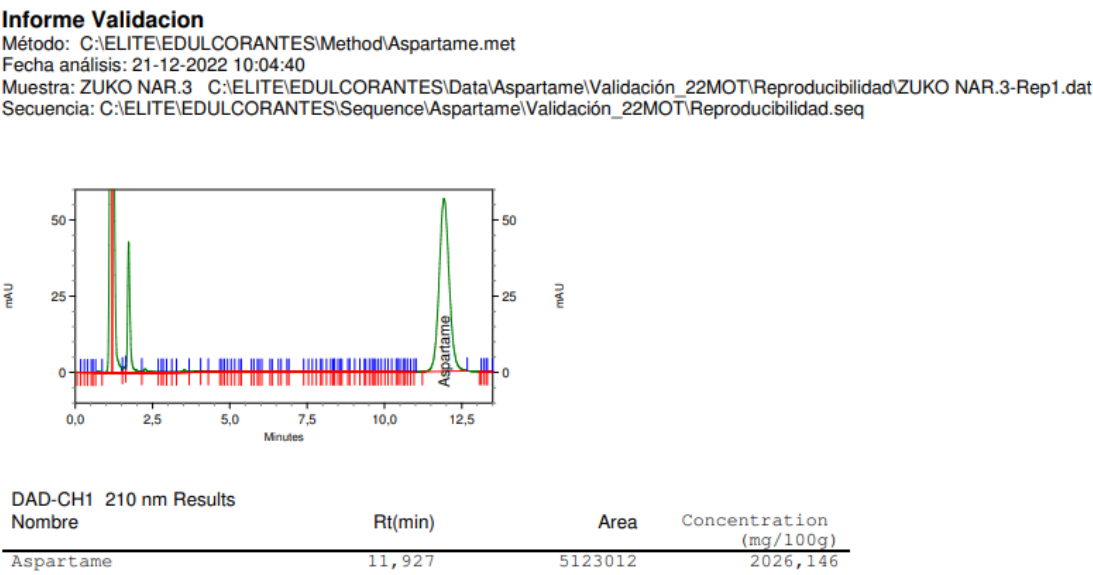
Anexo G-2 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja-2 de 1978,788 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 3; Curva de calibrado estudio de Reproducibilidad; Área 4992299; Tr 11,867 min.

Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 21-12-2022 9:19:30
Muestra: ZUKO NAR.2 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Reproducibilidad\ZUKO NAR.2-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Reproducibilidad.seq

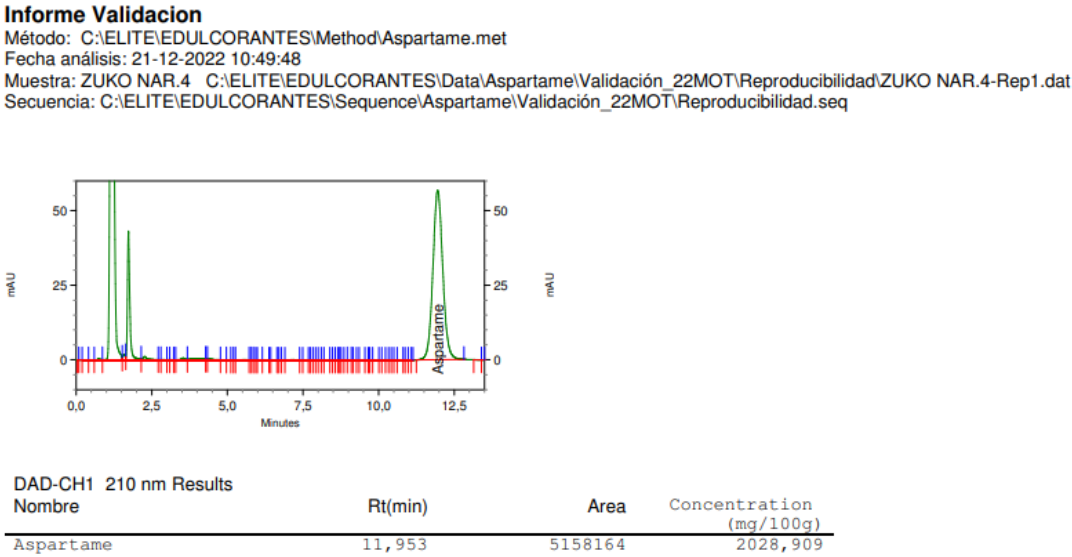


DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	11,867	4992299	1978,788

Anexo G-3 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja-3 de 2026,146 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 3; Curva de calibrado estudio de Reproducibilidad; Área 5123012; Tr 11,927 min.

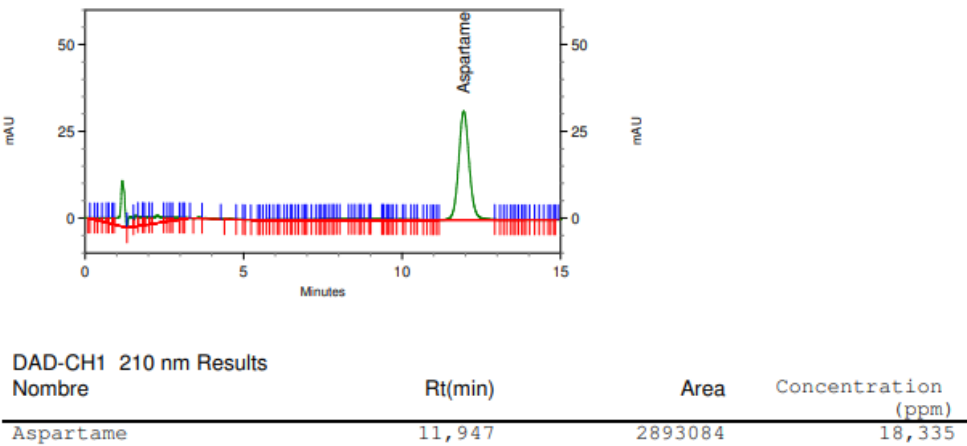


Anexo G-4 Cromatograma ejemplo Zuko Nacional Naranja-4 de 2028,909 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 3; Curva de calibrado estudio de Reproducibilidad; Área 5158164; Tr 11,953 min.



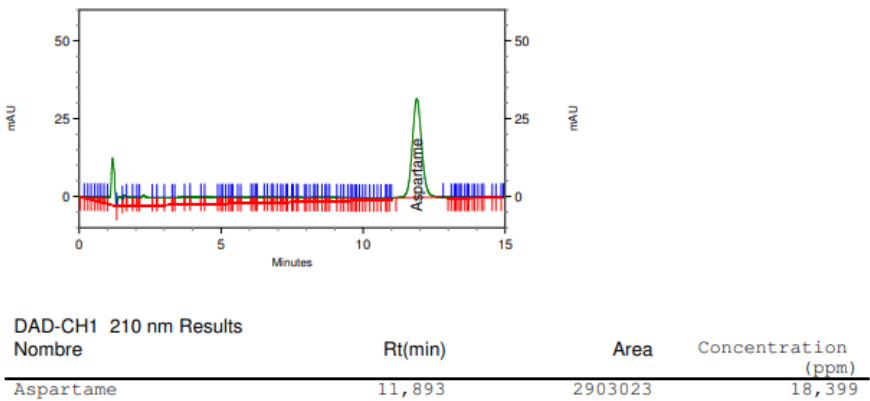
Anexo H-1 Cromatograma ejemplo estándar 18,335 ppm repetición 1 de 10; Curva de calibrado estudio Sesgo; Área 2893084; Tr 11,947 min.

Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 04-01-2023 12:27:37
Muestra: STD3 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Sesgo\STD3-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Sesgo.seq



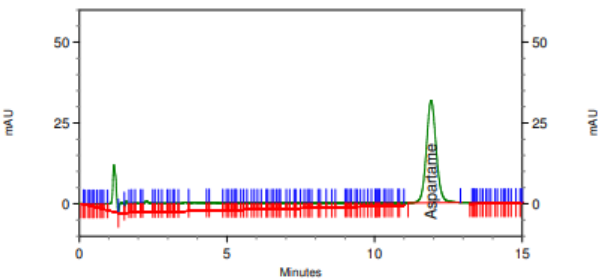
Anexo H-2 Cromatograma ejemplo estándar 18,399 ppm repetición 5 de 10; Curva de calibrado estudio Sesgo; Área 2903023; Tr 11,893 min.

Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 04-01-2023 14:42:38
Muestra: STD3 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Sesgo\STD3-Rep5.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Sesgo.seq



Anexo H-3 Cromatograma ejemplo estándar 18,481 ppm; Repetición 10 de 10;
Curva de calibrado estudio Sesgo; Área 2915784; Tr 11,913 min.

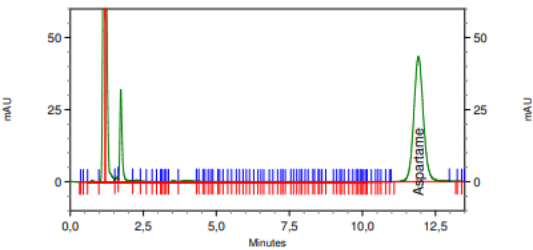
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 04-01-2023 16:05:14
Muestra: STD3 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Sesgo\STD3-Rep10.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Sesgo.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (ppm)
Aspartame	11,913	2915784	18,481

Anexo I-1 Cromatograma ejemplo Recuperación de 25,202 µg/mL de Aspartame;
Repetición 1 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 3959429; Tr 11,913 min.

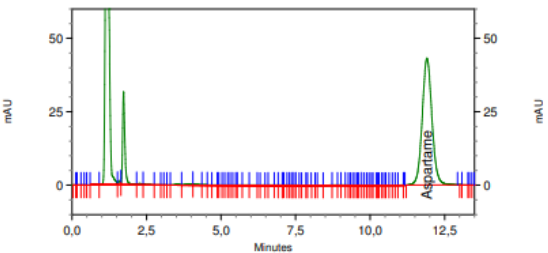
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 21-12-2022 14:18:44
Muestra: ZUKO NARANJA C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Recuperación\ZUKO NARANJA-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Recuperación.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (ppm)
Aspartame	11,913	3959429	25,202

Anexo I-2 Cromatograma ejemplo Recuperación de 24,939 µg/mL de Aspartame;
Repetición 3 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 3918572; Tr 11,907 min.

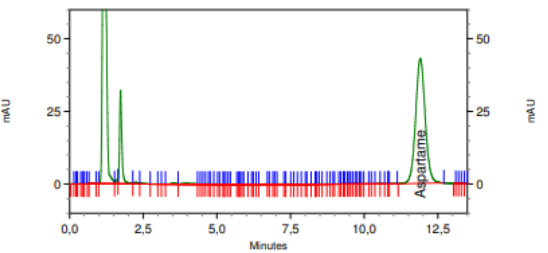
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 21-12-2022 14:48:54
Muestra: ZUKO NARANJA C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Recuperación\ZUKO NARANJA-Rep3.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Recuperación.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (ppm)
Aspartame	11,907	3918572	24,939

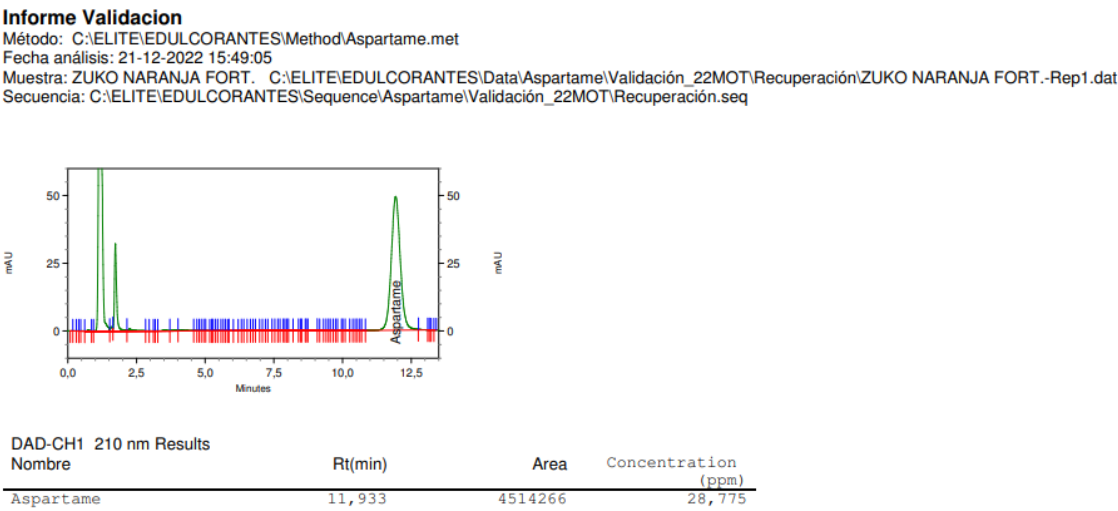
Anexo I-3 Cromatograma ejemplo Recuperación de 24,750 µg/mL de Aspartame;
Repetición 6 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 3889246; Tr 11,900 min.

Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 21-12-2022 15:34:08
Muestra: ZUKO NARANJA C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Recuperación\ZUKO NARANJA-Rep6.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Recuperación.seq

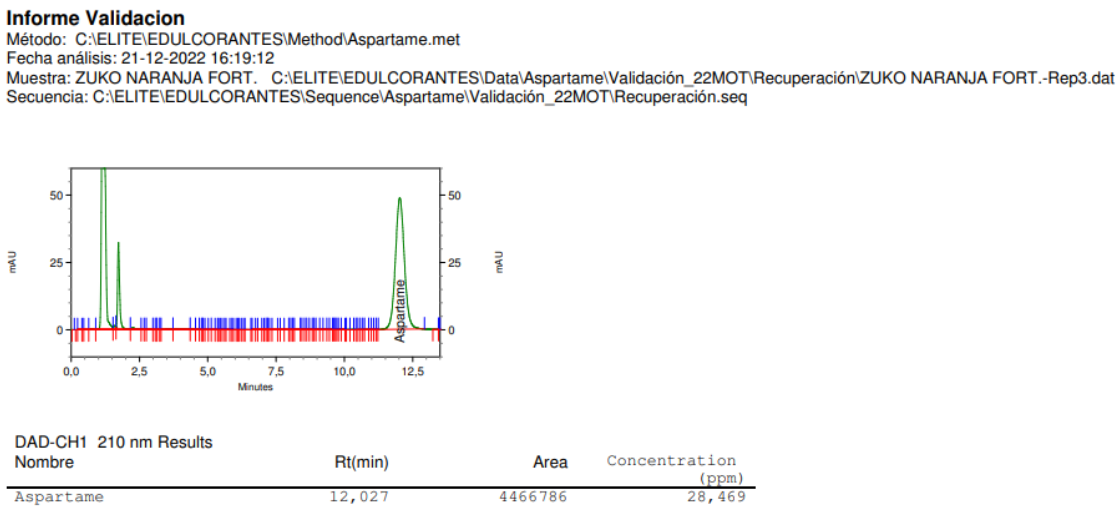


DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (ppm)
Aspartame	11,900	3889246	24,750

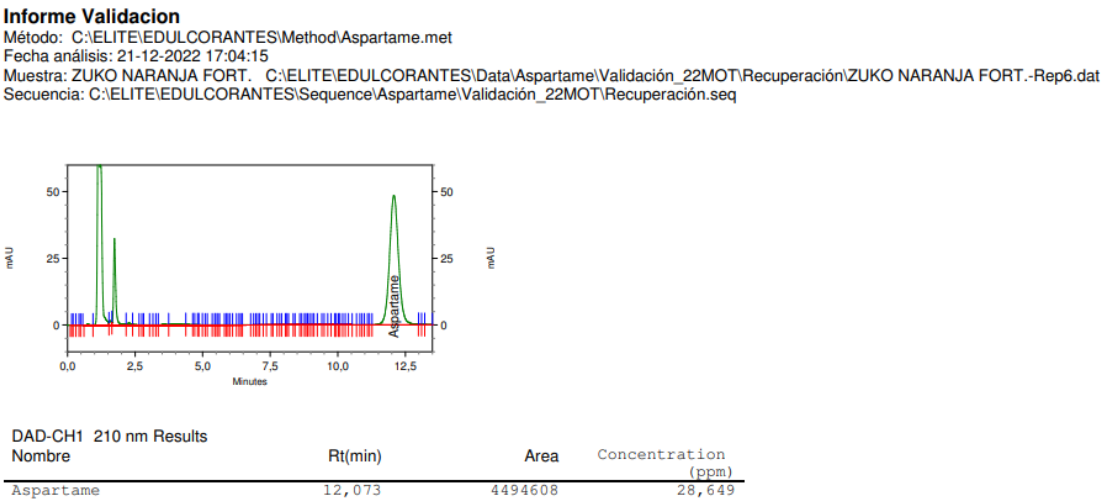
Anexo I-4 Cromatograma ejemplo Recuperación-Fortificado de 28,775 µg/mL de Aspartame; Repetición 1 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 4514266; Tr 11,933 min.



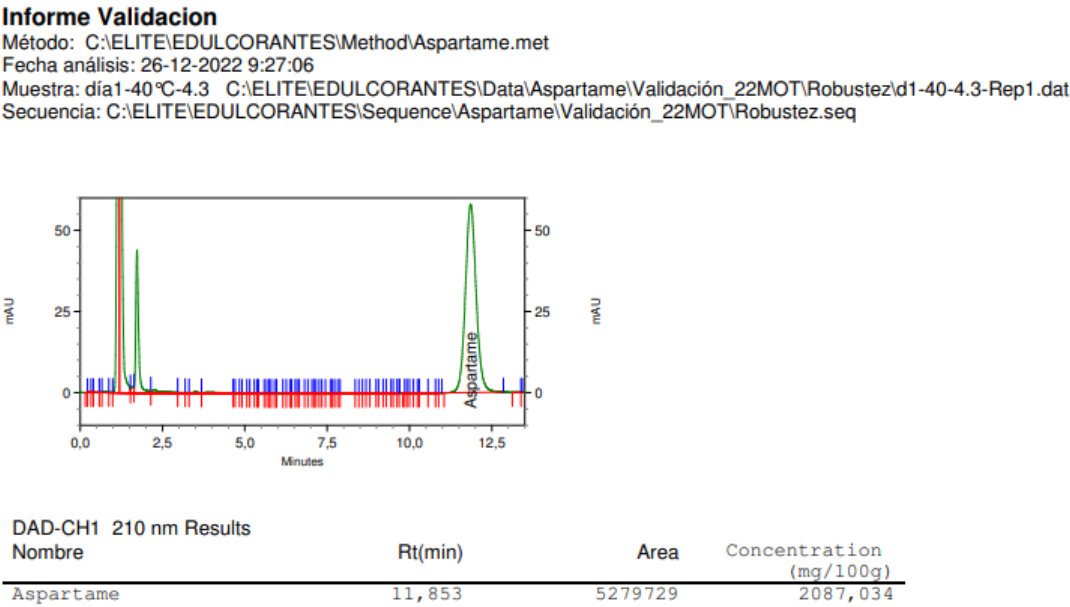
Anexo I-5 Cromatograma ejemplo Recuperación-Fortificado de 28,469 µg/mL de Aspartame; Repetición 3 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 4466786; Tr 12,027 min.



Anexo I-6 Cromatograma ejemplo Recuperación-Fortificado de 28,649 µg/mL de Aspartame; Repetición 6 de 6; Muestra Zuko Nacional Naranja; Área 4494608; Tr 12,073 min.

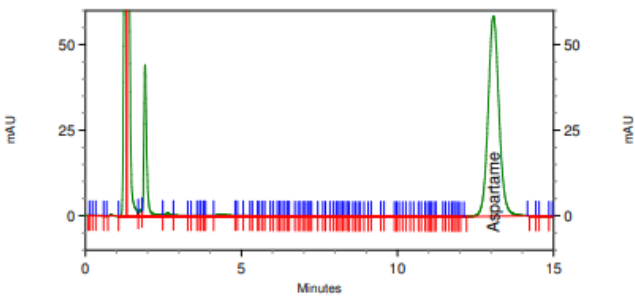


Anexo J-1 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 1-40°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 2087,034 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 5279729; Tr 11,853 min.



Anexo J-2 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 1-40°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 2237,824 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 5657871; Tr 13,073 min.

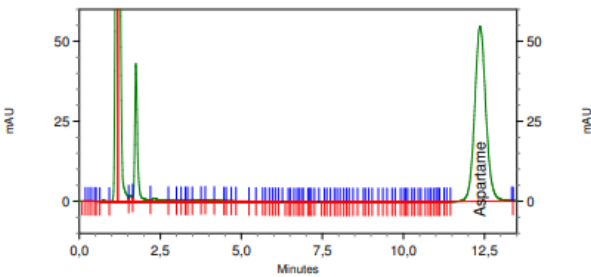
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 26-12-2022 12:41:18
Muestra: d1-40-4.1-2 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez\d1-40-4.1-Rep1
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	13,073	5657871	2237,824

Anexo J-3 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 1-38°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 2067,788 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 5231464; Tr 12,367 min.

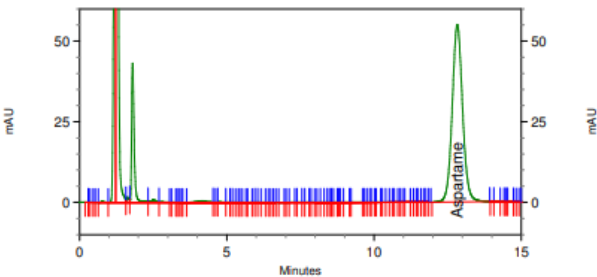
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 26-12-2022 10:12:45
Muestra: día1-38°C-4.3 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez\d1-38-4.3-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	12,367	5231464	2067,788

Anexo J-4 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 1-38°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 2124,454 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 5373569; Tr 12,827 min.

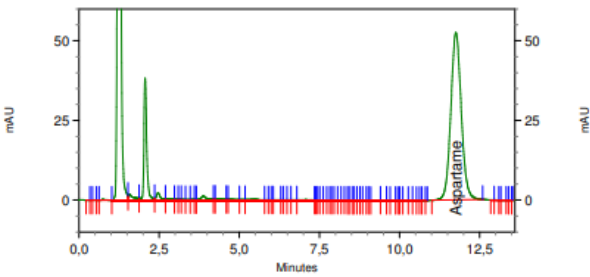
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 26-12-2022 13:26:37
Muestra: día1-38°C-4.1 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez\d1-38-4.1-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	12,827	5373569	2124,454

Anexo J-5 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 4-40°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 1881,635 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 4764644; Tr 11,760 min.

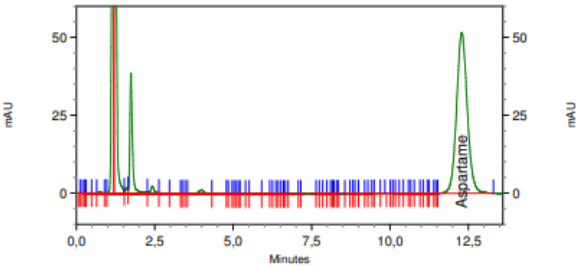
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 29-12-2022 9:51:40
Muestra: día4-40°C-4.3 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez\d4-40-4.3-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	11,760	4764644	1881,635

Anexo J-6 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 4-40°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 1933,743 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 4895317; Tr 12,287 min.

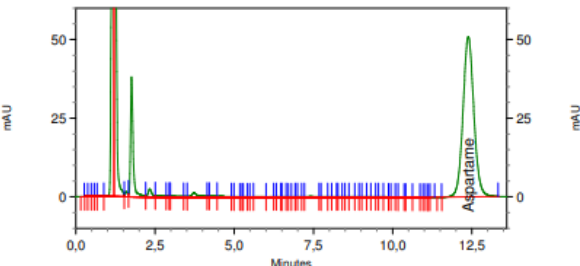
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 29-12-2022 13:24:34
Muestra: día4-40°C-4.1 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez\d4-40-4.1-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	12,287	4895317	1933,743

Anexo J-7 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 4-38°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 1919,566 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 4859763; Tr 12,387 min.

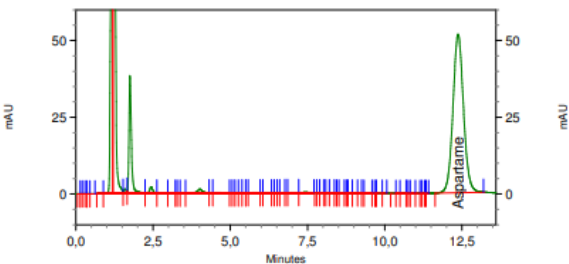
Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 29-12-2022 11:24:41
Muestra: día4-38°C-4.3 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez\d4-38-4.3-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	12,387	4859763	1919,566

Anexo J-8 Cromatograma Estudio de la Robustez; Día 4-38°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 1932,734 mg/100g Aspartame; Repetición 1 de 2; Área 4892787; Tr 12,373 min.

Informe Validacion
Método: C:\ELITE\EDULCORANTES\Method\Aspartame.met
Fecha análisis: 29-12-2022 12:36:23
Muestra: día4-38°C-4.1 C:\ELITE\EDULCORANTES\Data\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez\d4-38-4.1-Rep1.dat
Secuencia: C:\ELITE\EDULCORANTES\Sequence\Aspartame\Validación_22MOT\Robustez.seq



DAD-CH1 210 nm Results			
Nombre	Rt(min)	Area	Concentration (mg/100g)
Aspartame	12,373	4892787	1932,734

Anexo K Resultados prueba Limite de Cuantificación; Estándar Aspartame 3,49 ppm.

SECUENCIA: Limites.seq

DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame
Sample ID	Area	ppm
STD1	578849,00	3,43
STD1	577835,00	3,42
STD1	589814,00	3,50
STD1	594288,00	3,53
STD1	586991,00	3,48
STD1	593644,00	3,53
STD1	590761,00	3,51
STD1	589804,00	3,50
STD1	582975,00	3,46
STD1	588209,00	3,49
Min:		3,42
Max:		3,53
Mean:		3,49
Std Dev:		0,04
%RSD:		1,06

Anexo L Resultados prueba de Repetibilidad; Zuko Nacional Naranja Aspartame 1981,21 mg/100g.

SECUENCIA:		Repetitividad.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
ZUKO NARANJA	4976858,00	1967,62	
ZUKO NARANJA	4989193,00	1972,55	
ZUKO NARANJA	5051215,00	1997,30	
ZUKO NARANJA	5012330,00	1981,78	
ZUKO NARANJA	4984485,00	1970,67	
ZUKO NARANJA	5051326,00	1997,34	
Min: 4976858,00		1967,62	
Max: 5051326,00		1997,34	
Mean: 5010901,17		1981,21	
Std Dev: 33434,74		13,34	
%RSD: 0,67		0,67	

Anexo M-1 Resultados prueba Reproducibilidad; Zuko Nacional Naranja 1 Aspartame 1952,54 mg/100g

SECUENCIA:		Reproducibilidad.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
ZUKO NAR.1	4944144,00	1949,06	
ZUKO NAR.1	4973299,00	1960,66	
ZUKO NAR.1	4941175,00	1947,88	
Min: 4941175,00		1947,88	
Max: 4973299,00		1960,66	
Mean: 4952872,67		1952,54	
Std Dev: 17751,90		7,06	
%RSD: 0,36		0,36	

Anexo M-2 Resultados prueba Reproducibilidad; Zuko Nacional Naranja 2; Aspartame 1965,70 mg/100g.

SECUENCIA:		Reproducibilidad.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
ZUKO NAR.2	4992299,00	1978,79	
ZUKO NAR.2	4941474,00	1958,46	
ZUKO NAR.2	4945014,00	1959,87	
Min: 4941474,00		1958,46	
Max: 4992299,00		1978,79	
Mean: 4959595,67		1965,70	
Std Dev: 28377,17		11,35	
%RSD: 0,57		0,58	

Anexo M-3 Resultados prueba Reproducibilidad; Zuko Nacional Naranja 3;
Aspartame 2018,77 mg/100g.

SECUENCIA:		Reproducibilidad.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
ZUKO NAR.3	5123012,00	2026,15	
ZUKO NAR.3	5066082,00	2003,43	
ZUKO NAR.3	5124471,00	2026,73	
Min:		5066082,00	2003,43
Max:		5124471,00	2026,73
Mean:		5104521,67	2018,77
Std Dev:		33297,72	13,29
%RSD:		0,65	0,66

Anexo M-4 Resultados prueba Reproducibilidad; Zuko Nacional Naranja 4;
Aspartame 2019,36 mg/100g.

SECUENCIA:		Reproducibilidad.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
ZUKO NAR.4	5158164,00	2028,91	
ZUKO NAR.4	5110410,00	2009,96	
ZUKO NAR.4	5133730,00	2019,21	
Min:		5110410,00	2009,96
Max:		5158164,00	2028,91
Mean:		5134101,33	2019,36
Std Dev:		23879,17	9,48
%RSD:		0,47	0,47

Anexo N Resultados prueba Sesgo; Estándar de Aspartame 18,23 ppm.

SECUENCIA:		Sesgo.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	ppm	
STD3	2893084,00	18,33	
STD3	2893548,00	18,34	
STD3	2886210,00	18,29	
STD3	2767849,00	17,53	
STD3	2903023,00	18,40	
STD3	2879393,00	18,25	
STD3	2869807,00	18,19	
STD3	2883082,00	18,27	
STD3	2879499,00	18,25	
STD3	2915784,00	18,48	
Min: 2767849,00		17,53	
Max: 2915784,00		18,48	
Mean: 2877127,90		18,23	
Std Dev: 40569,87		0,26	
%RSD: 1,41		1,43	

Anexo O-1 Resultados prueba de Recuperación; Zuko Nacional Naranja con dilución al 3% v/v; Aspartame recuperado 24,94 mg/100g aproximadamente un 102.5%.

SECUENCIA:		Recuperación.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	ppm	
ZUKO NARANJA	3959429,00	25,20	
ZUKO NARANJA	3917046,00	24,93	
ZUKO NARANJA	3918572,00	24,94	
ZUKO NARANJA	3919376,00	24,94	
ZUKO NARANJA	3905205,00	24,85	
ZUKO NARANJA	3889246,00	24,75	
Min: 3889246,00		24,75	
Max: 3959429,00		25,20	
Mean: 3918145,67		24,94	
Std Dev: 23280,33		0,15	
%RSD: 0,59		0,60	

Anexo O-2 Resultados prueba Recuperación; Zuko Nacional Naranja con dilución al 3% v/v y fortificado con 3,53 ppm de estándar; Aspartame recuperado 28,58 mg/100g.

SECUENCIA:		Recuperación.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	ppm	
ZUKO NARANJA FORT.	4514266,00	28,78	
ZUKO NARANJA FORT.	4464570,00	28,46	
ZUKO NARANJA FORT.	4466786,00	28,47	
ZUKO NARANJA FORT.	4483381,00	28,58	
ZUKO NARANJA FORT.	4482557,00	28,57	
ZUKO NARANJA FORT.	4494608,00	28,65	
Min: 4464570,00		28,46	
Max: 4514266,00		28,78	
Mean: 4484361,33		28,58	
Std Dev: 18461,25		0,12	
%RSD: 0,41		0,42	

Anexo P-1 Resultados estudio de la Robustez; Día 1-40°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 2082,36 mg/100g Aspartame.

SECUENCIA:		Robustez.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
día1-40°C-4.3	5279729,00	2087,03	
día1-40°C-4.3	5256264,00	2077,68	
Min: 5256264,00		2077,68	
Max: 5279729,00		2087,03	
Mean: 5267996,50		2082,36	
Std Dev: 16592,26		6,62	
%RSD: 0,31		0,32	

Anexo P-2 Resultados estudio de la Robustez; Día 1-40°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 2196,68 mg/100g Aspartame.

SECUENCIA:		Robustez.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
día1-40°C-4.1	5657871,00	2237,82	
día1-40°C-4.1	5451495,00	2155,53	
Min: 5451495,00		2155,53	
Max: 5657871,00		2237,82	
Mean: 5554683,00		2196,68	
Std Dev: 145929,87		58,19	
%RSD: 2,63		2,65	

Anexo P-3 Resultados estudio de la Robustez; Día 1-38°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 2067,04 mg/100g Aspartame.

SECUENCIA:		Robustez.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
día1-38°C-4.3	5231464,00	2067,79	
día1-38°C-4.3	5227719,00	2066,29	
Min:		2066,29	
Max:		2067,79	
Mean:		2067,04	
Std Dev:		1,06	
%RSD:		0,05	

Anexo P-4 Resultados estudio de la Robustez; Día 1-38°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 2125,37 mg/100g Aspartame.

SECUENCIA:		Robustez.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
día1-38°C-4.1	5373569,00	2124,45	
día1-38°C-4.1	5378181,00	2126,29	
Min:		2124,45	
Max:		2126,29	
Mean:		2125,37	
Std Dev:		1,30	
%RSD:		0,06	

Anexo P-5 Resultados estudio de la Robustez; Día 4-40°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 1878,68 mg/100g Aspartame.

SECUENCIA:		Robustez.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
día4-40°C-4.3	4764644,00	1881,64	
día4-40°C-4.3	4749847,00	1875,73	
Min:		1875,73	
Max:		1881,64	
Mean:		1878,68	
Std Dev:		4,17	
%RSD:		0,22	

Anexo P-6 Resultados estudio de la Robustez; Día 4-40°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 1932,74 mg/100g Aspartame.

SECUENCIA:		Robustez.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
día4-40°C-4.1	4895317,00	1933,74	
día4-40°C-4.1	4890286,00	1931,74	
Min:		1931,74	
Max:		1933,74	
Mean:		1932,74	
Std Dev:		1,42	
%RSD:		0,07	

Anexo P-7 Resultados estudio de la Robustez; Día 4-38°C-pH 4,3; Muestra Zuko Nacional Naranja 1919,62 mg/100g Aspartame.

SECUENCIA:		Robustez.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
día4-38°C-4.3	4859763,00	1919,57	
día4-38°C-4.3	4860031,00	1919,67	
Min:		1919,57	
Max:		1919,67	
Mean:		1919,62	
Std Dev:		0,08	
%RSD:		0,00	

Anexo P-8 Resultados estudio de la Robustez; Día 4-38°C-pH 4,1; Muestra Zuko Nacional Naranja 1929,65 mg/100g Aspartame.

SECUENCIA:		Robustez.seq	
DAD-CH1 210 nm	Aspartame	Aspartame	
Sample ID	Area	mg/100g	
día4-38°C-4.1	4892787,00	1932,73	
día4-38°C-4.1	4877320,00	1926,57	
Min:		1926,57	
Max:		1932,73	
Mean:		1929,65	
Std Dev:		4,36	
%RSD:		0,23	

Anexo Q Resultados prueba de robustez Eficiencia columna

Área

Influencia:

$$T^o_{38-40} = \frac{1}{4} * (5554683 + 4892801 + 5267997 + 4757246) - \frac{1}{4} * (5375875 + 4885054 + 5229592 + 48598979) \\ = 30577$$

$$pH_{4,1-4,3} = \frac{1}{4} * (5554648 + 4892802 + 5375875 + 4885054) - \\ \frac{1}{4} * (5267997 + 4757246 + 5229592 + 4859897) \\ = 148421$$

$$D_{1-4} = \frac{1}{4} * (5554648 + 5267997 + 5375875 + 5229592) - \frac{1}{4} * (4892801 + 4757246 + 4885054 + 48598979) \\ = 508287$$

Intervalo de confianza:

$$T^o_{38-40} = 30577 \pm 2,365 * (290825,6/\sqrt{8}) = 30577 \pm 243175 = -212598 / 273752$$

$$pH_{4,1-4,3} = 148421 \pm 2,365 * (290825,6/\sqrt{8}) = 148421 \pm 243175 = -94754 / 391596$$

$$D_{1-4} = 508287 \pm 2,365 * (290825,6/\sqrt{8}) = 508287 \pm 243175 = 265112 / 751462$$

Platos Teóricos

Influencia:

$$T^o_{38-40} = \frac{1}{4} * (2621 + 2621 + 2774 + 2760) - \frac{1}{4} * (3241 + 2436 + 3023 + 2456) = -143$$

$$pH_{4,1-4,3} = \frac{1}{4} * (2621 + 2621 + 3241 + 2436) - \frac{1}{4} * (2774 + 2760 + 3023 + 2456) = -72$$

$$D_{1-4} = \frac{1}{4} * (2621 + 2774 + 3241 + 3023) - \frac{1}{4} * (2621 + 2760 + 2436 + 2456) = 395$$

Intervalo de confianza:

$$T^o_{38-40} = -143 \pm 2,365 * (295,8/\sqrt{8}) = -143 \pm 247 = -390 / 104$$

$$pH_{4,1-4,3} = -72 \pm 2,365 * (295,8/\sqrt{8}) = -72 \pm 247 = -319 / 175$$

$$D_{1-4} = 395 \pm 2,365 * (295,8/\sqrt{8}) = 395 \pm 247 = 148 / 642$$

Tiempo de retención***Influencia:***

$$T_{38-40}^o = \frac{1}{4} * (12,80 + 12,32 + 11,85 + 11,82) - \frac{1}{4} * (12,81 + 12,34 + 12,37 + 12,39) = -0,28$$

$$pH_{4,1-4,3} = \frac{1}{4} * (12,80 + 12,32 + 12,81 + 12,34) - \frac{1}{4} * (11,85 + 11,82 + 12,37 + 12,39) = 0,46$$

$$D_{1-4} = \frac{1}{4} * (12,80 + 11,85 + 12,81 + 12,37) - \frac{1}{4} * (12,32 + 11,82 + 12,34 + 12,39) = 0,24$$

Intervalo de confianza:

$$T_{38-40}^o = -0,28 \pm 2,365 * (0,37/\sqrt{8}) = -0,28 \pm 0,31 = -0,59 / 0,03$$

$$pH_{4,1-4,3} = 0,46 \pm 2,365 * (0,37/\sqrt{8}) = 0,46 \pm 0,31 = 0,15 / 0,77$$

$$D_{1-4} = 0,24 \pm 2,365 * (0,37/\sqrt{8}) = 0,24 \pm 0,31 = -0,07 / 0,55$$

